



Carolina Almeida Lavado Brizida

Licenciada em Bioquímica

Interaction between a *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane protein (Inc) and host cell 14-3-3 proteins

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Luís Jaime Mota, Professor auxiliar, Faculdade de Ciências e
Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Doutor José Paulo Nunes de Sousa Sampaio,
Professor Associado com Agregação, FCT/UNL

Arguente: Doutor Francisco Magalhães Sarmiento Ribeiro de
Mesquita, Investigador da École Polytechnique
Fédérale de Lausanne

Vogal: Doutor Luís Jaime Gomes Ferreira da Silva Mota,
Professor Auxiliar, FCT/UNL

Novembro, 2020



Carolina Almeida Lavado Brizida

Licenciada em Bioquímica

Interaction between a *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane protein (Inc) and host cell 14-3-3 proteins

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Luís Jaime Mota, Professor auxiliar, Faculdade de Ciências e
Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa

Novembro, 2020



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Interaction between a *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane protein (Inc) and host cell 14-3-3 proteins

Copyright Carolina Almeida Lavado Brizida, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Ao professor Jaime Mota por me ter dado esta oportunidade, pelo apoio e ajuda incrível em todas as fases desta dissertação.

À Joana Bugalhão por tudo o que me ensinou, por toda a paciência que sempre teve comigo, estando sempre presente e disponível para ajudar e por confiar nas minhas capacidades.

A todas as minhas colegas de laboratório, Maria, Inês, Irina e Maria por todas as vezes que tiraram um pouco do seu tempo para me ajudarem e esclarecerem as minhas dúvidas. E à Joana Saraiva por termos feito este caminho da tese juntas.

Às três pessoas que este mestrado me permitiu conhecer e que ficaram minhas amigas, a Carolina pela compreensão, ajuda e incentivo, e em especial à Márcia e à Leonor por todos os dias conversarem comigo e me mostrarem que não estava sozinha neste momento, o que tornou tudo mais fácil.

A todos os meus amigos mais próximos que estiveram lá para mim e me fazem rir e desanuviar a cabeça nos bons e maus momentos.

À minha família por estarem sempre presentes e pela preocupação sempre demonstrada comigo, em especial aos meus pais, por todas as oportunidades que sempre me proporcionaram, acreditando e confiando sempre em mim, sem eles nada seria possível.

À minha mãe por ser a pessoa mais importante, a quem posso sempre recorrer, a que me apoia em tudo e sei que independentemente do que aconteça posso contar sempre com ela para o que precisar.

Resumo

Chlamydia trachomatis é uma bactéria intracelular obrigatória que causa infecções genitais e oculares em humanos. A sua multiplicação em células hospedeiras ocorre exclusivamente no interior de um compartimento com invólucro membranar, denominado de inclusão. Para conseguir entrar, multiplicar-se e sair de células hospedeiras, *C. trachomatis* transporta proteínas através de um sistema de secreção do tipo III para a célula hospedeira. Estas proteínas incluem as Inc, que se inserem na membrana da inclusão, modificando-a, e que manipulam a célula hospedeira de várias formas. Neste trabalho, estudou-se a interação de uma proteína Inc (CT006) de *C. trachomatis* com as proteínas 14-3-3 da célula hospedeira. Existem sete isoformas das proteínas 14-3-3 conhecidas em mamíferos, que na generalidade têm a capacidade de se ligar a diversas proteínas de sinalização, podendo regular diversos processos celulares. Observou-se que todas as isoformas das 14-3-3 ($\beta/\epsilon/\eta/\gamma/\sigma/\pi/\zeta$) são recrutadas para a periferia da membrana de inclusão, provavelmente de uma maneira independente da Inc CT006, mas apenas as 14-3-3 $\gamma/\eta/\beta/\sigma$ interagem com a Inc CT006. Pela análise da estrutura primária da Inc CT006 percebeu-se que apesar da proteína ter potenciais motivos de ligação a 14-3-3, nenhum parece ser exclusivamente necessário para a interação, mas sim qualquer um dos presentes, que esteja ativo, consegue promover a interação. Pensa-se ainda que as 14-3-3 interagem com a Inc CT006 através do seu *groove* de ligação conservado. Em resumo, este trabalho suporta a ideia de que as proteínas 14-3-3 tenham um papel relevante na multiplicação intracelular de *C. trachomatis*. Estudos futuros com *C. trachomatis* com o gene que codifica para a Inc CT006 inativo ou sobre-expresso, e/ou com células hospedeiras com níveis reduzidos das proteínas 14-3-3, poderão clarificar como a interação da Inc CT006 com algumas proteínas 14-3-3 contribui para a multiplicação intracelular de *C. trachomatis*.

Termos chave: *Chlamydia trachomatis*; Inc CT006; Proteínas 14-3-3; Interação proteína-proteína

Abstract

Chlamydia trachomatis is an obligate intracellular bacterium that causes genital and ocular infections in humans. Its multiplication in host cells occurs exclusively inside a membrane-bound compartment, known as inclusion. To enter, multiply and exit host cells, *C. trachomatis* transports proteins through a type III secretion system into the host cell. These proteins include Incs, which insert into the inclusion membrane, modifying it, and manipulating the host cell in various ways. In this work, the interaction of an Inc protein (CT006) from *C. trachomatis* with 14-3-3 proteins of the host cell was studied. There are seven isoforms of 14-3-3 proteins known in mammals that in general have the capacity to bind to several signaling proteins, being able to regulate several cellular processes. It was observed that all 14-3-3 isoforms ($\beta/\epsilon/\eta/\gamma/\sigma/\tau/\zeta$) are recruited to the periphery of the inclusion membrane, probably in an Inc CT006-independent-manner, but only 14-3-3 $\beta/\eta/\gamma/\sigma$ interact with Inc CT006. By analyzing the primary structure of Inc CT006 it was realized that although the protein has potential 14-3-3 binding motifs, none seems to be exclusively necessary for the interaction. However, any one of the motifs when present and active can promote the interaction. 14-3-3 proteins are also thought to interact with Inc CT006 through their conserved binding groove. In summary, this work supports the idea that 14-3-3 proteins have a relevant role in the intracellular multiplication of *C. trachomatis*. Future studies with *C. trachomatis* with the gene encoding Inc CT006 inactivated or overexpressed, and/or with host cell with reduced levels of 14-3-3 proteins, might clarify how the interaction of Inc CT006 with 14-3-3 proteins contribute to the intracellular multiplication of *C. trachomatis*.

Keywords: *Chlamydia trachomatis*; Inc CT006; 14-3-3 proteins; Protein-Protein Interaction

Índice de Matérias

| | |
|---|------|
| Agradecimentos | V |
| Resumo | VII |
| Abstract | IX |
| Índice de Matérias | XI |
| Índice de Figuras..... | XIII |
| Índice de Tabelas..... | XIII |
| Abreviaturas, Siglas e Símbolos | XVII |
| 1. Introdução | 1 |
| <i>Chlamydia</i> | 1 |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> | 3 |
| Ciclo de desenvolvimento de <i>C. trachomatis</i> | 4 |
| Sistema de Secreção do tipo III | 7 |
| Proteínas da membrana de inclusão (Incs) | 8 |
| Manipulação da célula hospedeira por proteínas efectoras de <i>C. trachomatis</i> | 10 |
| Proteínas eucarióticas 14-3-3 | 11 |
| Proteínas Inc que interagem com as proteínas eucarióticas 14-3-3 | 14 |
| Inc CT006..... | 14 |
| Objetivos | 16 |
| 2. Materiais e Métodos..... | 19 |
| Estirpes bacterianas e condições de crescimento..... | 19 |
| Manutenção de linhas celulares humanas..... | 19 |
| Manipulação e manutenção de <i>C. trachomatis</i> | 19 |
| Manipulação de DNA, plasmídeos e <i>primers</i> | 20 |
| Transfecção de células HeLa 229 e HEK293T..... | 27 |
| Infeção com <i>C. trachomatis</i> | 28 |
| Microscopia de Fluorescência..... | 28 |
| Anticorpos e corantes fluorescentes | 28 |
| Ensaio de co-imunoprecipitação | 29 |
| <i>Immunoblotting</i> | 30 |
| Alinhamentos das sequências de aminoácidos das proteínas 14-3-3..... | 30 |
| 3. Resultados | 31 |

| | |
|---|----|
| Expressão ectópica das proteínas 14-3-3 em células de mamífero | 31 |
| As proteínas 14-3-3 apresentam uma localização citoplasmática quando expressas ectopicamente em células HeLa 229 | 31 |
| As proteínas 14-3-3 são recrutadas para a periferia da membrana de inclusão em células infectadas com <i>C. trachomatis</i> | 33 |
| A proteína Inc CT006 consegue interagir com as proteínas 14-3-3 γ , 14-3-3 η , 14-3-3 β e 14-3-3 σ | 37 |
| Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas 14-3-3 | 38 |
| As proteínas CT006 _{S150-152->AAA} , CT006 _{S165-167->AAA} e CT006 _{S188->A} interagem com a proteína 14-3-3 β apesar de um dos seus potenciais motivos de ligação 14-3-3 estarem mutados..... | 40 |
| As proteínas CT006 _{S150-152, S165-167->As} , CT006 _{S165-167, S188->As} , CT006 _{S150-152, S188->As} e CT006 _{S150-152, S165-167, S188->As} são expressas ectopicamente em células de mamífero | 43 |
| As proteínas CT006 _{S150-152, S165-167->As} , CT006 _{S165-167, S188->As} e CT006 _{S150-152, S188->As} interagem com a proteína 14-3-3 β apesar de dois dos seus potenciais motivos de ligação 14-3-3 estarem mutados..... | 44 |
| Construção de plasmídeos que codificam para as proteínas FLAG-HA-14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎ e FLAG-HA-14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎ | 46 |
| As proteínas 14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎ e 14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎ apresentam uma localização citoplasmática em células HeLa 229 | 47 |
| As proteínas 14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎ e 14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎ são recrutadas para a periferia da membrana de inclusão após 24 h de infeção com <i>C. trachomatis</i> | 47 |
| As proteínas 14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎ e 14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎ são expressas ectopicamente em células HEK293T | 48 |
| As proteínas 14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎ e 14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎ não interagem com a proteína Inc CT006 | 49 |
| 4. Discussão e Conclusão..... | 51 |
| 5. Bibliografia..... | 59 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1.1 - Reconstrução filogenética do género <i>Chlamydia</i> | 2 |
| Figura 1.2 - Filogenia de <i>C. trachomatis</i> : segregação das estirpes de acordo com o tropismo baseado em 819 genes conservados entre espécies | 4 |
| Figura 1.3 - Representação esquemática do ciclo de desenvolvimento de <i>Chlamydia</i> | 5 |
| Figura 1.4 - Modelo do sistema de secreção do tipo III (T3SS) | 7 |
| Figura 1.5 - Proteínas Inc..... | 9 |
| Figura 1.6 - Representação esquemática da proteína Inc CT006..... | 15 |
| Figura 1.7 - A proteína CT006 interage com a proteína 14-3-3 β após expressão ectópica em células de mamífero | 15 |
| Figura 1.8 - Análise da interação, através de ensaios de co-imunoprecipitação, entre a proteína 14-3-3 β e a proteína CT006 fragmentada após expressão ectópica em células HEK293T..... | 16 |
| Figura 3.1 - Análise da expressão ectópica das diferentes 14-3-3 em células HeLa 229. | 31 |
| Figura 3.2 - Análise da localização intracelular das diferentes proteínas 14-3-3 quando expressas ectopicamente em células HeLa 229..... | 33 |
| Figura 3.3 - Análise do recrutamento para a periferia da membrana de inclusão das diferentes 14-3-3 após 24 h ou 32 h de infeção com <i>C. trachomatis</i> | 35 |
| Figura 3.4 - Análise do recrutamento para a periferia da membrana de inclusão das diferentes 14-3-3 após 8 h ou 16 h de infeção com <i>C. trachomatis</i> | 36 |
| Figura 3.5 - Análise da interação, através de ensaios de co-imunoprecipitação, entre as proteínas 14-3-3 e a proteína CT006 após expressão ectópica em células HEK293T. | 38 |
| Figura 3.6 - Alinhamento das sequências das proteínas 14-3-3 com percentagem de identidade representada a azul | 39 |
| Figura 3.7 - Representações esquemáticas da proteína Inc CT006 com diferentes mutações..... | 41 |
| Figura 3.8 - Análise da interação, através de ensaios de co-imunoprecipitação, entre a proteína 14-3-3 β e as proteínas CT006 com mutações nos motivos de ligação das proteínas 14-3-3 após expressão ectópica em células HEK293T | 42 |
| Figura 3.9 - Representação esquemática das proteínas CT006 com mutações nos potenciais motivos de ligação das 14-3-3..... | 43 |
| Figura 3.10 - Análise da expressão ectópica das proteínas Inc CT006 mutantes em células HeLa 229. | 44 |
| Figura 3.11 - Análise da interação, através de ensaios de co-imunoprecipitação, entre a proteína 14-3-3 β e as proteínas Inc CT006 com mutações nos potenciais motivos de ligação das proteínas 14-3-3 após expressão ectópica em células HEK293T | 45 |
| Figura 3.12 - Representação esquemática da proteína 14-3-3 β e das suas regiões. | 46 |

| | |
|--|----|
| Figura 3.13 - Análise da localização intracelular das proteínas 14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎ e 14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎ quando expressas ectopicamente em células HeLa 229 | 47 |
| Figura 3.14 - Análise do recrutamento para a periferia da membrana de inclusão das proteínas 14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎ e 14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎ após 24 h de infecção com <i>C. trachomatis</i> | 48 |
| Figura 3.15 - Análise da expressão ectópica das proteínas 14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎ e 14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎ em células HeLa 229 e HEK293T | 49 |
| Figura 3.16 - Análise da interação, através de ensaios de co-imunoprecipitação, entre as proteínas 14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎ 14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎ e a proteína Inc CT006 após expressão ectópica em células HEK293T | 50 |

Índice de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1.1 - Lista de proteínas Inc e os seus potenciais alvos na célula hospedeira..... | 9 |
| Tabela 1.2 - Isoformas das proteínas 14-3-3 com o respetivo símbolo. | 12 |
| Tabela 2.1 – Plasmídeos utilizados neste trabalho | 21 |
| Tabela 2.2 – <i>Primers</i> utilizados neste trabalho..... | 25 |
| Tabela 3.1 - Percentagem de semelhança entre as proteínas 14-3-3 duas a duas | 40 |

Abreviaturas, Siglas e Símbolos

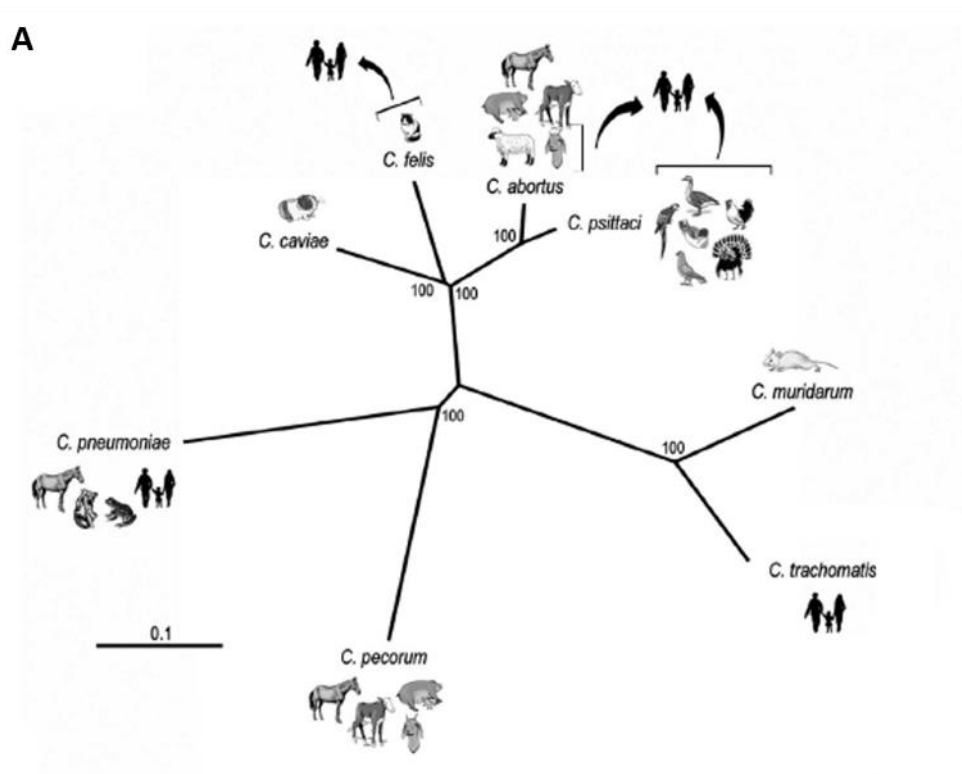
| | |
|------------|---|
| α | Alfa |
| β | Beta |
| δ | Delta |
| ϵ | Épsilon |
| η | Eta |
| γ | Gama |
| σ | Sigma |
| τ | Tau |
| ζ | Zeta |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| AF488 | Fluoróforo Alexa Fluor 488 |
| Akt | Proteína cinase B |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| BLAST | <i>Basic local alignment search tool</i> |
| CERT | <i>Ceramide transfer protein</i> |
| Co-IP | Co-imunoprecipitação |
| DMEM | <i>Dulbecco's modified eagle medium</i> |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| ECACC | <i>European Collection of Authenticated Cell Cultures</i> |
| FBS | Soro fetal bovino (<i>Fetal bovine serum</i>) |
| GEF | <i>Guanine Exchange Factors</i> |
| GFP | Proteína verde fluorescente |
| HA | Hemaglutinina do vírus da gripe |
| HBSS | <i>Hank's balanced salt solution</i> |
| HRP | <i>Horseradish Peroxidase</i> |
| HSPGs | <i>Heparan sulfate proteoglycans</i> |
| IFUs | Unidades formadoras de inclusões |
| Inc | Proteína da membrana de inclusão |
| LB | <i>Lysogeny broth</i> |
| LD | Gotículas de lípidos (<i>Lipid droplets</i>) |
| LGV | Linfogranuloma Venéreo |
| mEGFP | <i>Monomeric Enhanced green fluorescent protein</i> |
| MOI | Multiplicidade de infecção |
| MOMP | <i>Major outer membrane protein</i> |
| MVB | Corpos multi-vesiculares |
| PBS | <i>Phosphate-buffered saline</i> |
| PCR | Reação em cadeia da Polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>) |
| PFA | Paraformaldeído |

| | |
|----------|---|
| p.i | Pós-infecção |
| PI3K | <i>Phosphoinositide 3-kinases</i> |
| PMSF | <i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i> |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| SDS | <i>Sodium dodecyl sulphate</i> |
| SDS-PAGE | <i>Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis</i> |
| SNARE | <i>Soluble N Ethylmaleimide Sensitive Factor Attachment Protein</i> |
| SPG | <i>Sucrose Phosphate Glutamate</i> |
| T3SS | Sistema de secreção do tipo III |
| TarP | <i>Translocated actin recruiting phosphoprotein</i> |
| T-coffee | <i>Tree-based Consistency Objective Function For alignment Evaluation</i> |
| TGN | Rede trans-golgi |

1. Introdução

Chlamydia

O filo *Chlamydiae* é composto por bactérias Gram-negativas e intracelulares obrigatórias¹ que são patogênicas ou simbiotes de diversos organismos desde os humanos até às amibas. O grupo mais bem estudado deste filo é a família *Chlamydiaceae*, da qual fazem parte onze espécies de *Chlamydia* que são patogênicas para humanos ou para animais. As principais espécies desta família que infetam os humanos, sendo responsáveis por uma grande diversidade de doenças, são as espécies *Chlamydia trachomatis* (que provocam doenças oculares e genitais) e *Chlamydia pneumoniae* (uma das causas predominantes de infeções respiratórias)². As espécies *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia avium* e *Chlamydia gallinacea* são patogênicas para aves que causam doenças respiratórias e infeções assintomáticas (*C. avium* e *C. gallinacea*). *Chlamydia pecorum* é uma espécie patogênica para gado (como ovelhas, porcos e cabras) causando poliartrite, conjuntivite, pneumonia e encefalomielite. *Chlamydia abortus* afeta a placenta de ovelhas e cabras, podendo algumas gestações resultar em aborto. As mulheres grávidas que forem expostas a infeções zoonóticas podem correr o risco de abortar. A espécie patogênica *Chlamydia felis* causa conjuntivite em gatos; *Chlamydia caviae* causa conjuntivite e infeções do trato genital em porquinhos-da-índia; *Chlamydia muridarum* coloniza os pulmões e o trato genital de ratinhos e por fim, *Chlamydia suis* provoca infeções em suínos (Figura 1.1)³.



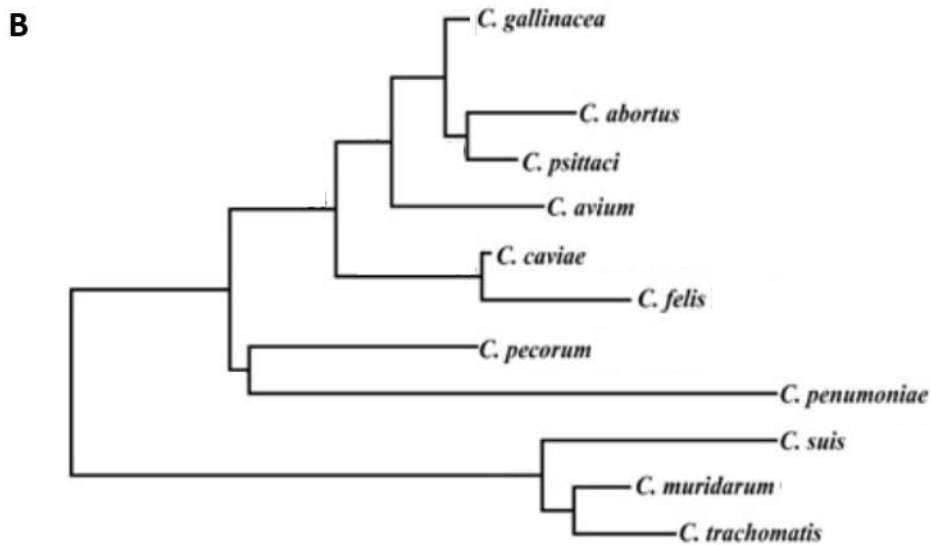


Figura 1.1 - Reconstrução filogenética do género *Chlamydia*. (A) Os hospedeiros de cada espécie estão representados na figura junto da mesma. As transmissões zoonóticas comprovadas em estudos anteriores, estão representadas na figura através de setas para os ícones humanos, e correspondem às espécies *C. psittaci*, *C. abortus* e *C. felis*. As espécies *C. suis*, *C. avium* e *C. gallinacea* não estão representadas na figura mas sabe-se que infetam, principalmente, suínos, pombos e galinhas, respetivamente. Esta árvore é baseada em 600 genes ortólogos. Adaptado de Nunes e Gomes, 2014.⁴ (B) Comparação filogenética baseada nas sequências genéticas 16S rRNA com o software Clustalx 1.83. Adaptado de Li, L. *et al*, 2017⁵

As bactérias do género *Chlamydia* têm genomas substancialmente reduzidos onde faltam muitas enzimas metabólicas, isto faz com que estas bactérias dependam do hospedeiro para muitos dos seus processos metabólicos. Aproximadamente dois terços das proteínas de *Chlamydia* são compartilhadas entre espécies, o que reflete a conservação genética e as restrições evolutivas que são impostas pelo seu ciclo de desenvolvimento intracelular e conservado².

As *Chlamydia* são caracterizadas por terem um ciclo de desenvolvimento bifásico; replicam-se dentro de um compartimento vacuolar especializado, denominado de inclusão, e utilizam as várias proteínas excretadas para se internalizarem e posteriormente sobreviverem no ambiente intracelular do hospedeiro⁴. Apesar de diferentes *Chlamydiae* exibirem diferenças no tropismo do hospedeiro, espectro da doença e alguns aspetos da biologia, a natureza da inclusão é comum dentro deste género¹.

Tal como outros organismos patogénicos intracelulares, o vacúolo onde as *Chlamydia* se replicam não se funde com endossomas ou lisossomas. No entanto, as *Chlamydia* são únicas no aspeto em que a inclusão é transportada para uma região peri-Golgi e se torna fusogénica com um subconjunto de vesículas exocíticas originadas na rede *trans*-Golgi (TGN)^{6,7}. Esta interação única com as vias de transporte vesicular do hospedeiro é dependente da síntese proteica chlamydiana e permite que as bactérias evitem os mecanismos de defesa celulares do hospedeiro, como a degradação pelas hidrolases lisossomais. A infeção de células hospedeiras por *Chlamydia* induz também a fosforilação de tirosinas de proteínas do hospedeiro, a secreção de citocinas e de moléculas de adesão, regulação

da resposta imunológica do hospedeiro (como a expressão de MHC1 e MHC2) e inibição da apoptose em resposta a vários estímulos apoptóticos⁸.

Estas interações associadas com a infeção por *Chlamydia*, bem como o percurso intracelular da inclusão, necessitam de comunicação entre a bactéria e a célula hospedeira. Devido a residir num vacúolo durante todo o seu ciclo de vida, estas interações entre o hospedeiro e a bactéria são mediadas por proteínas de *Chlamydia*⁸.

Aproximadamente, 10% dos genomas das espécies *Chlamydia* codificam para um grande número de proteínas que são excretadas (proteínas efetoras)⁹. Estas são transportadas através de sistemas de secreção especializados até à superfície da bactéria (sistema de secreção do tipo V), ao lúmen da inclusão (sistema de secreção do tipo II), até ao citosol do hospedeiro ou à membrana de inclusão da bactéria (sistema de secreção do tipo III)², podendo assim contactar com as células hospedeiras⁹.

Chlamydia trachomatis

C. trachomatis é a causa bacteriana mais frequente de doenças sexualmente transmissíveis nos países em desenvolvimento e de infertilidade não congénita nos países ocidentais⁹, sendo ainda a principal causa de cegueira que se pode prevenir em todo o mundo⁸. As estirpes de *C. trachomatis* estão divididas em 3 biovars (tracoma, urogenital e linfogranuloma venéreo (LGV)) divididos em serótipos. Os serótipos A-C são responsáveis por tracoma, a causa principal de cegueira não congénita nos países em desenvolvimento; os serótipos D-K estão relacionados com a infeção do trato genital, que podem levar a uretrite, cervicite, proctite¹⁰, doença inflamatória da pélvis, infertilidade e gravidez ectópica⁴. Os serótipos L1-L3 correspondem ao LGV que causa infeções urogenitais ou anorretais² (Figura 1.2).

Durante o seu ciclo de desenvolvimento (com duração de 48-72 h), *C. trachomatis*, tal como as restantes *Chlamydiae*, manipula as células hospedeiras usando o sistema de secreção do tipo III para libertar as várias proteínas efetoras para a célula hospedeira¹¹. As proteínas da membrana de inclusão (Incs) fazem parte do grupo de proteínas efetoras excretadas por *C. trachomatis* e são caracterizadas por terem um motivo hidrofóbico “bilobado” na sua estrutura, que se pensa mediar a sua inserção na membrana de inclusão. Estudos bioinformáticos indicam que *C. trachomatis* codifica cerca de 60 proteínas Inc¹²⁻¹⁴ e 37 delas já foram detetadas experimentalmente na membrana de inclusão^{15,16}.

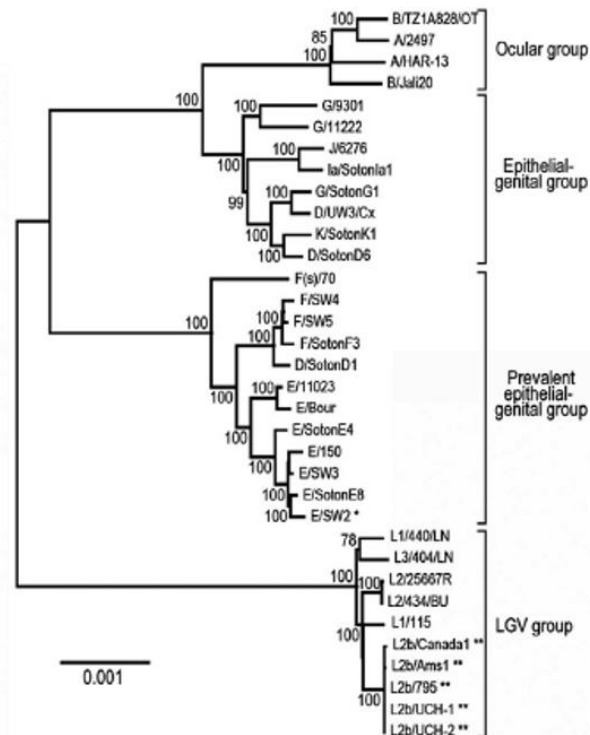


Figura 1.2 - Filogenia de *C. trachomatis*: segregação das estirpes de acordo com o tropismo baseado em 819 genes conservados entre espécies. Retirado de Nunes e Gomes, 2014⁴

Ciclo de desenvolvimento de *C. trachomatis*

Todas as *Chlamydiae* partilham o ciclo de desenvolvimento bifásico¹⁷ que consiste em alternar entre a forma extracelular e infecciosa, os corpos elementares, e a forma intracelular e não infecciosa, os corpos reticulados¹⁵ (Figura 1.3).

Os corpos elementares e os corpos reticulados são morfológica e funcionalmente diferentes. Os corpos elementares são pequenos (0.3 μm) e redondos, contêm um nucleóide central e denso e funcionam como um “esporo”, com uma parede celular rígida que permite a sua sobrevivência num ambiente extracelular rigoroso. Esta parede é estabilizada por uma rede de proteínas que sofrem ligação cruzada (ligadas por ligações dissulfeto), denominadas complexo da membrana externa, que confere resistência ao stress osmótico e físico. Os corpos reticulados são maiores (1 μm), estruturalmente flexíveis e osmoticamente frágeis, são mais ricos em RNA e contêm DNA difuso e fibrilado. Estas propriedades permitem a replicação intracelular, aquisição e transporte de nutrientes, síntese proteica e outras atividades metabólicas⁴.

Os corpos elementares contêm uma elevada quantidade de proteínas necessárias para o metabolismo central e para o catabolismo da glucose, o que pode ser usado para a atividade metabólica requerida na sua entrada para a célula hospedeira e para levar à diferenciação destes em corpos reticulados. Durante esta diferenciação, os complexos de ligações cruzadas são reduzidos, o que permite fluidez

à membrana, que é uma característica necessária para a replicação². Os corpos reticulados são especializados em aquisição de nutrientes e na replicação; expressam proteínas que estão envolvidas na geração de ATP, síntese proteica e transporte de nutrientes, tais como V-ATP sintase, proteínas ribossomais e transportadores de nucleótidos. Provavelmente dependem do ATP do hospedeiro como recurso energético, o que indica que as duas formas de desenvolvimento têm requisitos metabólicos diferentes².

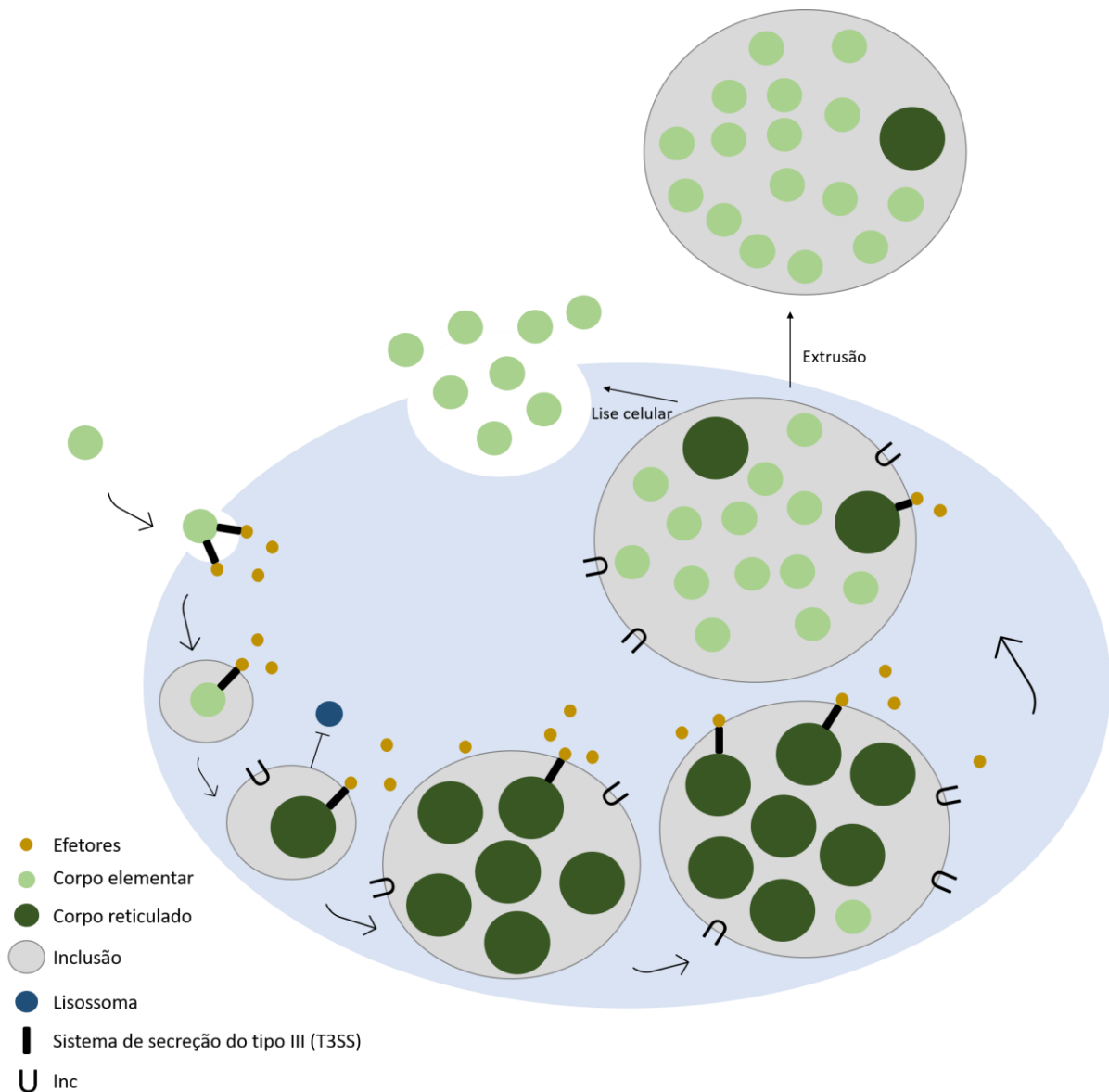


Figura 1.3 - Representação esquemática do ciclo de desenvolvimento de *Chlamydia*. Este ciclo bifásico alterna entre duas formas, os corpos elementares que são extracelulares e infecciosos e os corpos reticulados que são intracelulares, não infecciosos e capazes de se replicar. Os corpos elementares ao entrarem na célula hospedeira são internalizados num vacúolo denominado inclusão, que é modificada pela inserção de proteínas da membrana da inclusão (Incs), impedindo assim a fusão com lisossomas. Os corpos elementares vão diferenciar-se em corpos reticulados, que por sua vez vão residir e multiplicar-se na inclusão até serem diferenciados de novo em corpos elementares. Por fim vão ser libertados por lise celular ou extrusão da inclusão e poderão começar um novo ciclo de infecção. Durante todo o ciclo, o sistema de secreção do tipo III secreta proteínas efetoras para a célula hospedeira.

No início do ciclo de desenvolvimento (Figura 1.3), os corpos elementares agregam-se e invadem as células epiteliais do hospedeiro. A ligação destes à célula hospedeira envolve vários ligandos bacterianos e recetores do hospedeiro. Pensa-se que a ligação da bactéria à célula hospedeira é um processo de dois passos, para algumas espécies, envolvendo uma interação inicial reversível entre os corpos elementares e a célula hospedeira mediada por HSPGs (*heparan sulfate proteoglycans*), seguido de uma ligação de alta especificidade irreversível a um recetor secundário¹⁰. Aquando do contacto, proteínas efetoras pré-sintetizadas do sistema de secreção do tipo III são injetadas e o corpo elementar é internalizado, formando-se um vacúolo.

Após a invasão e formação do vacúolo (Figura 1.3), este acaba por se afastar da via endolisossomal, embora seja transportado ao longo dos microtúbulos até ao centróssoma, de uma forma dependente de dineína. Poucas horas após a infeção (6-8 h), inicia-se a diferenciação do corpo elementar em corpo reticulado e os primeiros genes são transcritos. Os efetores iniciais remodelam a membrana de inclusão, o que impede a fusão com lisossomas e redireciona as vesículas exocíticas para a inclusão, facilitando as interações hospedeiro-organismo patogénico. Nas horas seguintes (8-16 h) são expressos os denominados genes intermédios, os quais incluem efetores que medeiam a aquisição de nutrientes e mantêm a viabilidade da célula hospedeira. A bactéria divide-se então por fissão binária e a inclusão aumenta¹⁷. Em fases tardias da infeção (24-72 h), a re-diferenciação dos corpos reticulados em corpos elementares é feita de uma forma assíncrona, o que poderá ser estimulado pela sua separação da membrana de inclusão. Os denominados genes de fim de ciclo codificam para o complexo da membrana externa e para proteínas que se ligam ao DNA (Hc1 e Hc2)¹⁸, que o condensam e param a transcrição de vários genes. Alguns efetores produzidos na fase final do ciclo são empacotados nos corpos elementares, que por sua vez vão ser libertados por lise celular ou extrusão da inclusão, de forma a poderem começar novos ciclos de infeção¹⁷. A lise celular envolve a rutura da inclusão e das membranas celulares por proteases de cisteína¹⁹, em contraste, a extrusão das inclusões necessita de polimerização de actina e deixa a célula hospedeira intacta^{2,10}.

Este ciclo de desenvolvimento necessita da expressão temporal de fatores específicos, como os fatores sigma alternativos, ativadores e repressores transcricionais, reguladores de resposta, pequenos RNAs e reguladores do superenrolamento do DNA. O ciclo pode ser interrompido de forma reversível por fatores ambientais e stress, como a privação de nutrientes, exposição às citocinas do hospedeiro e antibióticos que tenham como alvo a síntese da parede celular, sendo que sob estas condições os corpos reticulados transformam-se em formas persistentes aberrantes que não se dividem².

Durante todo o ciclo, a inclusão interage ainda com vários organelos da célula hospedeira, incluindo o complexo de Golgi, o retículo endoplasmático, corpos multi-vesiculares (MVBs; que podem servir como fonte de esfingolípido e colesterol), gotículas de lípidos (que são translocadas até ao lúmen da inclusão, podendo servir como fonte de lípidos)^{20,21}, mitocôndria e lisossomas (que podem ser fonte de aminoácidos essenciais derivados da degradação proteica do hospedeiro). Todas estas interações

facilitam a aquisição de nutrientes para a replicação bacteriana e para a estabilidade e expansão da membrana de inclusão¹⁰.

Sistema de Secreção do tipo III

O sistema de secreção do tipo III (T3SS) é um complexo formado por cerca de 20 proteínas¹¹, presente em bactérias Gram-negativas, que transporta proteínas (efetores) através da membrana externa e interna da bactéria e através de uma membrana eucariótica, para o citosol ou para a membrana da célula hospedeira²². Este sistema é semelhante a uma seringa molecular e pode ser referido como injetissoma¹¹. Permite a injeção direta de efetores bacterianos através da membrana de uma célula do hospedeiro² (Figura 1.4). A atividade de secreção deste sistema é regulada de forma fixa e é estimulada apenas após o contato com as moléculas do hospedeiro²².

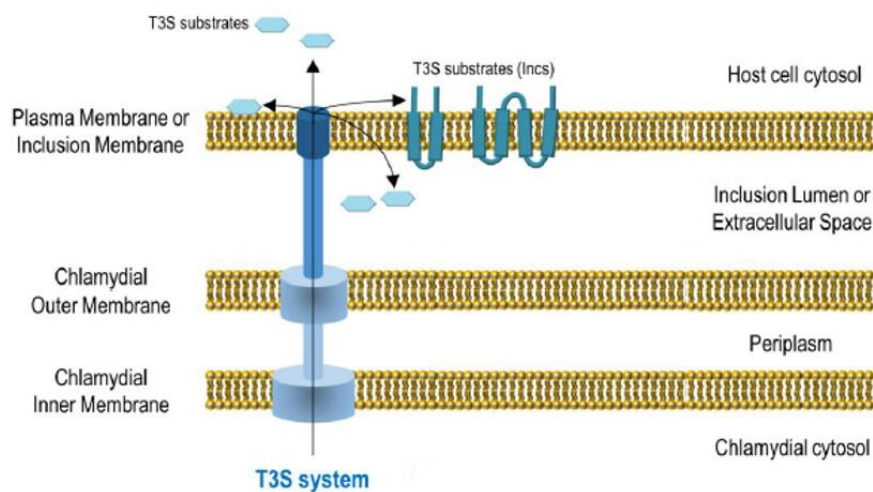


Figura 1.4 - Modelo do sistema de secreção do tipo III (T3SS). Este sistema é um complexo em forma de agulha que permite a *C. trachomatis* translocar proteínas efetoras diretamente da bactéria para o citosol da célula hospedeira ou para a membrana de inclusão. Adaptado de Bugalhão e Mota, 2019²³

A montagem do T3SS é iniciada por três proteínas: uma proteína de anel da membrana externa, uma lipoproteína que forma o anel de membrana interna e uma proteína associada à membrana interna que liga os dois anéis²². Os componentes extracelulares do T3SS incluem a denominada agulha, a sua ponta e um par de proteínas translocadoras²⁴. Após a ativação do sistema, que ocorre após contacto com uma membrana eucariótica, as proteínas translocadoras são as primeiras a serem exportadas, formando um poro na membrana eucariótica que permite a translocação direta das proteínas efetoras²⁵.

O T3SS inclui chaperones específicos, que ajudam no seu funcionamento interagindo com moléculas translocadoras e efetoras no citosol bacteriano²². Estas proteínas chaperones ligam-se diretamente a alguns substratos do sistema e facilitam assim a sua secreção. Em geral, estas proteínas diméricas

protegem os substratos bacterianos da degradação, mantêm-nos em estado competente para a secreção, parcialmente desenrolados, previnem interações proteicas prematuras e/ou improdutivas com os seus substratos, e dirige-os diretamente para secreção por interação direta com componentes selecionados do T3SS¹¹.

As proteínas efetoras manipulam várias funções celulares específicas em diferentes fases da infeção. Tais como: invasão celular e inibição da fagocitose, estabelecimento da inclusão, aquisição de nutrientes, modulação do transporte intracelular, inibição precoce e indução tardia da apoptose, e evita as repostas do sistema imunitário inato⁴.

Resumindo, *Chlamydia* possui e utiliza o T3SS em várias fases da infeção (Figura 1.3), durante a fase inicial quando o corpo elementar entra em contacto com a célula hospedeira¹¹ e durante a fase intracelular, onde os efetores são injetados no citosol da célula hospedeira e conseguem ter acesso a outros componentes intracelulares. Em *Chlamydia*, o T3SS localiza-se num polo do corpo elementar e está concentrado no local onde os corpos reticulados contactam com a membrana de inclusão². Estudos de proteómica indicam que os corpos elementares são pré-carregados com efetores e chaperones específicos que ajudam à sua secreção, enquanto que no final do ciclo as proteínas chaperones e os componentes do T3SS estão presentes em pouca quantidade nos corpos reticulados¹¹.

O contacto com a célula hospedeira induz a atividade do sistema e inicia a secreção dos primeiros efetores. De seguida, os denominados efetores de início de ciclo, incluindo as proteínas Inc que inibem a fusão com os compartimentos endossomais, são excretados depois da síntese de novo nos corpos reticulados. Complexos T3SS adicionais são produzidos a meio do ciclo, conforme *C. trachomatis* se replica, e contribuem para a secreção de efetores adicionais, incluindo os envolvidos na promoção da fusogenicidade com os compartimentos vesiculares do hospedeiro. Nas fases finais do ciclo, a atividade do T3SS cessa durante a diferenciação de corpos reticulados de volta a corpos elementares, presumivelmente quando os corpos reticulados se libertam da membrana de inclusão. T3SS mantém-se inativo durante a saída da célula hospedeira¹¹.

Proteínas da membrana de inclusão (Incs)

As proteínas da membrana de inclusão, Incs, são definidas por terem um ou mais domínios bilobados hidrofóbicos. Estes são compostos por duas regiões transmembranares, estreitamente espaçadas, que são separadas por um *loop hairpin* curto, com o seu N-terminal e/ou C-terminal situado no citoplasma da célula hospedeira² (Figura 1.5). Para além deste domínio, a estrutura primária das várias Incs partilha pouca semelhança entre elas. Para além disso, as Inc partilham muito pouca identidade em relação a quaisquer outras proteínas¹.

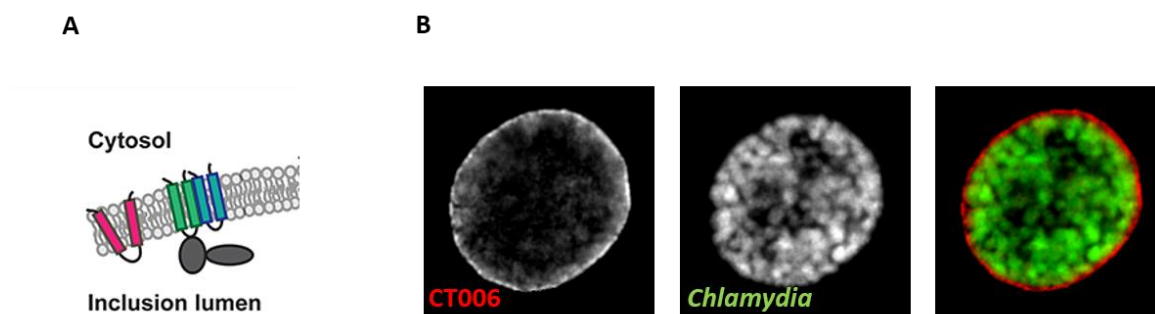


Figura 1.5 - Proteínas Inc. (A) Representação esquemática predita de proteínas Inc na membrana de inclusão de *C. trachomatis*. Adaptado de Moore e Ouellette, 2014²⁶ (B) Visualização da proteína de *C. trachomatis* CT006, em células HeLa 229 infectadas com *C. trachomatis* L2/434, por microscopia de fluorescência.

O facto das Incs terem as suas regiões N-terminal e C-terminal expostas para o citosol da célula hospedeira faz com que sejam mediadoras da interação hospedeiro-*Chlamydia*¹. Pensa-se que estas proteínas recrutem proteínas do hospedeiro para a membrana de inclusão de forma a promover a fusão com compartimentos ricos em nutrientes, inibir a fusão com compartimentos degradativos, sequestrar maquinaria ou organelos do hospedeiro, e ainda interromper as vias normais do hospedeiro. As Incs formam complexos homotípicos ou heterotípicos na superfície da inclusão e podem fornecer estabilidade estrutural à membrana da inclusão, que está em crescimento². Sendo assim, a identificação de interações entre as proteínas Inc e as proteínas da célula hospedeira é um processo chave para perceber a biologia celular da inclusão de *C. trachomatis*¹.

Pensa-se então que as Incs interagem com os componentes da célula hospedeira (Tabela 1.1) para facilitar a sua subversão por *C. trachomatis*. No entanto, aproximadamente um quarto de todas as Incs putativas codificam para um domínio citoplasmático curto, cerca de 20 aminoácidos, sem domínios estruturais. Não está descrito como é que essas pequenas proteínas conseguem interagir com os componentes da célula hospedeira. Uma hipótese é que estas Incs tenham uma função alternativa para criar suporte dentro da membrana de inclusão facilitando a montagem de complexos multi-proteicos específicos que, por sua vez, interagem com o componente da célula hospedeira²⁷.

Tabela 1.1 - Lista de proteínas Inc e os seus potenciais alvos na célula hospedeira. ND - Não definido. Adaptado de Bugalhão e Mota, 2019²³

| Proteínas Inc | Alvos na célula hospedeira |
|---------------|----------------------------------|
| CT005/IncV | VAPA/B |
| CT006 | PTK7; 14-3-3 $\beta/\gamma/\eta$ |
| CT101/MrcA | ITPR3 |
| CT115 /IncD | CERT |
| CT116/IncE | SNX5/6 |
| CT117/IncF | ND |
| CT118/IncG | 14-3-3 β |

Tabela 1.1 (Continuação) - Lista de proteínas Inc e os seus potenciais alvos na célula hospedeira. ND-Não definido. Adaptado de Bugalhão e Mota, 2019²³

| Proteínas Inc | Alvos na célula hospedeira |
|----------------------|------------------------------------|
| CT119/IncA | VAMP3/7/8 |
| CT134 | ND |
| CT135 | ND |
| CT147 | ND |
| CT179 | ND |
| CT192 | ND |
| CT222 | ND |
| CT223/IPAM | CEP170 |
| CT224 | ND |
| CT225 | ND |
| CT226 | ND |
| CT227 | ND |
| CT228 | MYP1 |
| CT229/CpoS | RABs |
| CT232/IncB | ND |
| CT233/IncC | ND |
| CT249 | ND |
| CT288 | CCDC146 |
| CT345 | ND |
| CT358 | ND |
| CT383 | ND |
| CT440 | ND |
| CT442/CrpA | ND |
| CT449 | ND |
| CT483 | ND |
| CT565 | ND |
| CT618 | ND |
| CT813/InaC | 14-3-3ε/γ/η/ζ/τ/β; ARF1/4; VAMP7/8 |
| CT850 | DYNLT1 |

Manipulação da célula hospedeira por proteínas efetoras de *C. trachomatis*

No geral, as proteínas efetoras atuam por associação direta, modificação enzimática ou mimetizam fatores do alvo hospedeiro. A entrada de *C. trachomatis* nas células epiteliais é acompanhada por alterações na membrana plasmática do hospedeiro, que possivelmente se devem aos efetores relacionados com a invasão¹¹.

As proteínas de *Chlamydia* e da célula hospedeira podem funcionar em conjunto para promover a invasão. As proteínas TarP (*translocated actin recruiting phosphoprotein*) e CT694 são proteínas efetoras relacionadas com a invasão. A TarP é um efetor excretado no início da invasão, que recruta a actina, independentemente ou em cooperação com Arp2/3, sendo esta proteína essencial para uma invasão eficiente¹¹. Contribui para a internalização bacteriana devido à sua capacidade de nuclear diretamente a polimerização de actina por meio de um mimetizador do domínio de ligação a actina WH2 e por recrutar GEFs (*Guanidine Exchange Factors*), Sos1 e Vav2, que ativam Rac1 e sinalizam a maquiaria de actina¹⁰. Rac1 é necessário para a entrada de *C. trachomatis*²⁸, a atividade desta resulta no recrutamento dos reguladores de actina WAVE2, Abi-1 e Arp2/3, que são necessários para a reorganização da actina induzida por *C. trachomatis*²⁹.

Várias proteínas Inc têm um papel importante demonstrado nas interações entre *Chlamydia* e a célula hospedeira²⁷. Por exemplo, a proteína IncA de *C. trachomatis*, oligomeriza³⁰, está envolvida na fusão de inclusões presentes na mesma célula³¹ e interage ainda com as proteínas eucarióticas SNARE que catalisam a reação da fusão de membranas durante o transporte vesicular intracelular³²; a proteína IncG interage com a proteína da célula hospedeira 14-3-3 β , uma proteína regulatória⁸; a proteína IncD associa-se à proteína CERT³³, que está envolvida no transporte não vesicular de ceramida do retículo endoplasmático até ao complexo de Golgi^{27,34}; a proteína IncV prende a inclusão ao retículo endoplasmático³⁵; MrcA e CT228 regulam o processo de saída de *C. trachomatis* da célula hospedeira^{36,37}; IncE modula o transporte vesicular da célula hospedeira⁹; IPAM e InaC estão envolvidos na manipulação dos microtúbulos da célula hospedeira^{38,39}; a proteína InaC promove ainda a montagem de actina e a redistribuição do Golgi em redor da inclusão⁴⁰; CT850 liga-se à cadeia leve da dineína e medeia o transporte da inclusão até ao centróssoma⁴¹; CpoS inibe a morte celular em células infetadas com *C. trachomatis*^{42,43}.

Um dos mecanismos possíveis para proteger as células infetadas com *C. trachomatis* da apoptose, pode ser também parcialmente devido à ativação de PI3K e Akt. A infeção leva à ativação de PI3K, que por sua vez resulta na ativação de Akt e na subsequente fosforilação de BAD, a maior parte da BAD que está desfosforilada é degradada. Como IncG está presente na inclusão de *Chlamydia* e se liga a 14-3-3 β , permite à inclusão recrutar o BAD fosforilado, impedindo o restante BAD de se translocar para a mitocôndria e induzir a morte da célula hospedeira⁴⁴.

Proteínas eucarióticas 14-3-3

As proteínas 14-3-3 são uma família de proteínas que estão presentes em muitos organismos eucarióticos, como os humanos, as plantas e os fungos. Enquanto os eucariontes inferiores (como a levedura) contêm apenas dois genes 14-3-3, os eucariontes superiores possuem até quinze genes. Em mamíferos são conhecidas sete isoformas ($\epsilon, \gamma, \eta, \zeta, \delta, \tau, \beta/\alpha, \sigma$)⁴⁵ (Tabela 1.2), sendo as isoformas δ e α as formas fosforiladas de ζ e β , na serina 184 ou 186, respetivamente, que podem ser encontradas

no cérebro⁴⁶. Com exceção da isoforma 14-3-3 σ , todas as proteínas 14-3-3 podem formar tanto homodímeros quanto heterodímeros. Todas as 14-3-3 são altamente conservadas, com cerca de 50% de identidade entre os aminoácidos, dentro da mesma espécie e entre espécies diferentes⁴⁷.

A interação das 14-3-3 com diversas variedades de moléculas de sinalização, sugere que estas proteínas desempenham papéis regulatórios importantes em várias vias de transdução de sinal, como a regulação do ciclo celular, a sobrevivência e diferenciação celular⁸.

Tabela 1.2 - Isoformas das proteínas 14-3-3 com o respectivo símbolo.

| Proteínas | Símbolo |
|-------------------|----------------|
| 14-3-3 Épsilon | ϵ |
| 14-3-3 Gama | γ |
| 14-3-3 Eta | η |
| 14-3-3 Zeta/Delta | ζ/δ |
| 14-3-3 Tau | τ |
| 14-3-3 Beta/Alfa | β/α |
| 14-3-3 Sigma | σ |

As 14-3-3 são proteínas pequenas (~30 kDa)⁴⁵ que se ligam a fosfoserinas⁴⁸ ou fosfotreoninas dentro de motivos específicos de ligação, tendo sido as primeiras moléculas a serem identificadas como tal⁴⁵. Os motivos de ligação aos quais as 14-3-3 se ligam são o Modo I: RSX(pS/pT)XP, o Modo II: RX(F/Y)X(pS)XP⁴⁹ (onde R é arginina, S é serina, X é qualquer aminoácido, pS é fosfoserina, pT é fosfotreonina, P é prolina, F é fenilalanina e Y é tirosina)⁴⁷ e mais recentemente, um terceiro motivo de ligação, o Modo III: penúltimo resíduo de aminoácido na região C-terminal é o resíduo fosforilado (pS/pT-X1-2-COOH) foi identificado, e foi demonstrado que as proteínas alvo com esta sequência se ligam às 14-3-3 com afinidade mais baixa em comparação às proteínas que se ligam através dos motivos do modo I e II⁴⁵. A descoberta de que as proteínas 14-3-3 se ligam a motivos específicos, contendo fosfoserinas ou fosfotreoninas nos seus alvos, sugeriu a sua importância na transdução de sinal, e apontou ainda para um possível papel importante para a fosforilação das serinas/treoninas em complexos proteína-proteína⁴⁵.

Estudos subsequentes revelaram que as proteínas 14-3-3 também podem reconhecer motivos não fosforilados⁵⁰, o que aumenta ainda mais a quantidade e diversidade de ligandos alvo possíveis para estas proteínas.

As primeiras estruturas cristalinas das proteínas humanas 14-3-3 ϵ e 14-3-3 τ revelaram que as proteínas 14-3-3 são diméricas e altamente helicoidais. Cada monômero consiste em nove hélices α antiparalelas (H1-H9) e a sua superfície côncava contém um *groove* de ligação anfipático formado pelas hélices H3, H5, H7 e H9⁴⁵. Tal como a região C-terminal, a região N-terminal destas proteínas não é altamente conservada. A região N-terminal é a região responsável pela dimerização das

proteínas 14-3-3 (os resíduos 5-21 de um monómero contactam com os resíduos 58-89 do outro monómero⁵¹), estas heterodimerizam em combinações específicas nas células, e a distribuição específica de pares de heterodímeros pode ter implicações substanciais para os efeitos biológicos exercidos pelas proteínas 14-3-3⁴⁵. A flexibilidade de ligação das 14-3-3 ao seu dímero pode facilitar a ligação a ligandos alvo de diferentes tamanhos e formas. As isoformas individuais 14-3-3, embora altamente conservadas, diferem significativamente na sua tendência para formar homodímeros ou heterodímeros. Essas diferenças resultam de pequenas, mas estruturalmente importantes, variações na sequência das proteínas⁴⁷.

Algumas diferenças estruturais observadas entre as isoformas 14-3-3 são os vários comprimentos e conformações das regiões de *loop* (especialmente os *loops* entre as hélices H3-H4, e H8-H9) e o comprimento das hélices H3 e H4.

As primeiras estruturas cristalinas de complexos da proteína 14-3-3 com fosfopeptídeos sintéticos revelaram pouca mudança na estrutura da proteína 14-3-3 em comparação com a forma livre⁴⁵. O facto de existirem muitas hélices α nestas proteínas fornece-lhes uma estrutura muito rígida⁴⁷. Os fosfopeptídeos ligam-se às 14-3-3 na sua região mais conservada, dentro da mesma espécie e entre espécies, o *groove* de ligação. O grupo fosfato interage por meio de ligações iónicas e de hidrogénio com os resíduos Lisina-49, Arginina-56, Arginina-127 e Tirosina-128 (correspondentes à isoforma 14-3-3 ζ), que são completamente conservados em todas as proteínas 14-3-3 conhecidas e formam cargas positivas dentro do *groove* de ligação⁴⁷. As moléculas não fosforiladas ligam-se às proteínas 14-3-3 no mesmo local que os alvos fosforilados, podendo competir com os fosfopeptídeos pela ligação, o que adiciona complexidade no reconhecimento das 14-3-3.

Estudos estruturais, bioquímicos e bioinformáticos de complexos formados por proteínas 14-3-3 revelaram várias características comuns que parecem ser importantes para a capacidade das 14-3-3 se ligarem e regularem os seus parceiros: a estrutura rígida do seu dímero, a presença frequente de múltiplos motivos de ligação 14-3-3 em moléculas alvo e a presença frequente de motivos de ligação 14-3-3 dentro de regiões desordenadas.

Muitos parceiros de ligação das proteínas 14-3-3 contêm dois ou mais motivos de ligação 14-3-3, que podem ligar-se simultaneamente a ambos os *grooves* de ligação dentro de um dímero 14-3-3. Foi demonstrado que os péptidos duplamente fosforilados se ligam com afinidade significativamente maior do que os mesmos péptidos contendo apenas um motivo. Levando assim a hipotetizar que um dos motivos de ligação pode funcionar como um local dominante (um "*gatekeeper*"), cuja presença é absolutamente necessária para a ligação a 14-3-3, e o local secundário de baixa afinidade, embora insuficiente para promover uma associação estável com 14-3-3 na ausência do motivo do *gatekeeper*, é assim necessário para uma atividade biológica mais completa⁴⁵. Dois locais "imperfeitos" podem ainda ser suficientes para se ligar ao dímero 14-3-3 se estiverem na orientação antiparalela e forem

capazes de atingir o espaçamento correto. Na verdade, um modo de ligação envolvendo dois locais imperfeitos pode ser o modo mais comum de interação entre as proteínas 14-3-3 e os seus alvos⁴⁷.

Há evidências de que a isoforma 14-3-3 σ é única entre as 14-3-3. Esta é evolutivamente distante das outras proteínas 14-3-3 e parece ser o resultado de um evento de inserção de retrotransposição. Além disso, esta isoforma preferencialmente sofre homodimerização e não heterodimerização e exibe uma especificidade de parceiro de ligação distinta das apresentadas pelas outras isoformas. A cristalização da 14-3-3 σ revelou uma base estrutural para o facto desta isoforma preferir homodimerização, bem como para sua seletividade específica para proteínas de ligação. A posição da sua nona hélice α difere das outras isoformas e alguns dos seus resíduos de aminoácidos são específicos para esta isoforma⁴⁶. A especificidade para com o parceiro parece ser o resultado de diferenças de aminoácidos fora do *groove* de ligação⁴⁷.

Têm sido propostos vários modelos de ação em relação a como funcionam as proteínas 14-3-3. Estas podem: induzir uma mudança conformacional na proteína alvo, mascarar uma região específica na proteína alvo e facilitar a interação entre duas proteínas⁴⁷. Uma função relacionada com o facto da proteína 14-3-3 conseguir mascarar a região específica, é o facto de poder proteger a proteína alvo contra a desfosforilação e/ou degradação proteolítica. A natureza dimérica das proteínas 14-3-3 ajuda no facto destas atuarem como moléculas de suporte que juntam duas proteínas próximas uma da outra⁴⁵.

Proteínas Inc que interagem com as proteínas eucarióticas 14-3-3

A isoforma 14-3-3 β foi a primeira proteína hospedeira encontrada que se liga a uma Inc (IncG) e que é recrutada para a periferia da membrana de inclusão de *C. trachomatis*⁸. Após esta descoberta, através de um estudo de proteómica encontraram-se potenciais parceiros adicionais para as proteínas 14-3-3. A proteína de *C. trachomatis* InaC interage com as proteínas 14-3-3 $\epsilon/\gamma/\eta/\zeta/\tau/\beta$ ⁴⁰ e a proteína Inc CT006 poderá interagir com as proteínas 14-3-3 $\gamma/\eta/\beta$ ⁹.

A proteína IncG ao interagir com a proteína 14-3-3 β permite à inclusão recrutar o BAD fosforilado, impedindo assim a proteína de se translocar para a mitocôndria e induzir a morte da célula hospedeira⁴⁴.

Inc CT006

A proteína Inc CT006 é uma proteína da membrana de inclusão (Inc) de *C. trachomatis*. É composta por 189 aminoácidos com três potenciais regiões transmembranares (Figura 1.6).

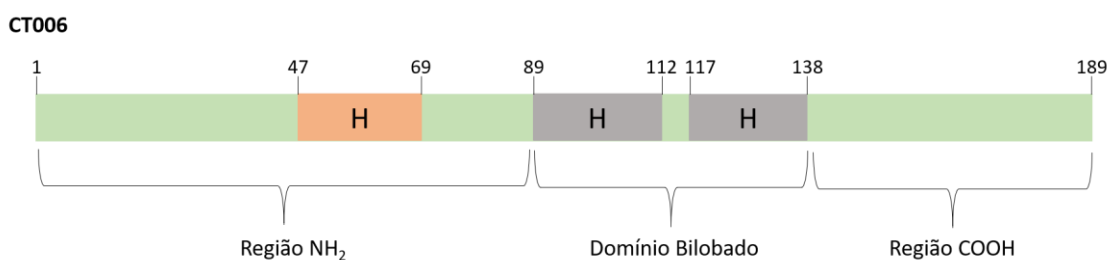


Figura 1.6 - Representação esquemática da proteína Inc CT006. A verde está representada a proteína, que contém três possíveis domínios transmembranares, no qual um pertence à região NH₂ e os restantes ao domínio bilobado. Os números representam a posição dos aminoácidos. H- Região hidrofóbica

Ainda é uma proteína de *C. trachomatis* com função desconhecida, embora se tenha mostrado que pode interagir com as proteínas 14-3-3 $\gamma/\eta/\beta$ e PTK7⁹. Visto que a família de proteínas 14-3-3 é uma família de moléculas regulatórias que são responsáveis por processos vitais nas células eucarióticas é relevante continuar os estudos sobre esta potencial interação.

Em resultados não publicados (Bugalhão e Mota) confirmou-se a interação entre a proteína 14-3-3 β e a proteína Inc CT006 (Figura 1.7). Estudos adicionais revelaram ainda que a região da proteína CT006 que interage com a isoforma 14-3-3 β é a região C-terminal (Figura 1.8).

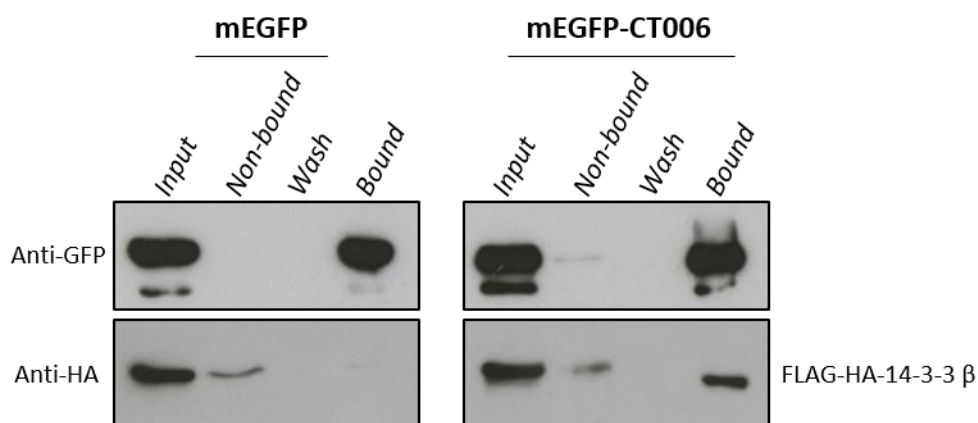


Figura 1.7 - A proteína CT006 interage com a proteína 14-3-3 β após expressão ectópica em células de mamífero. As células HEK293T foram co-transfetadas com plasmídeos que codificam para mEGFP e FLAG-HA-14-3-3 β ou mEGFP-CT006 e FLAG-HA-14-3-3 β . As células foram posteriormente lisadas e incubadas com GFP trap beads (ChromoTek). As amostras *Input*, *Non-Bound*, *Wash* e *Bound* foram analisadas por *immunoblotting*, utilizando os anticorpos anti-HA e anti-GFP para deteção das proteínas. O marcador de pesos moleculares utilizado foi NZYColour Protein Marker II. A massa molecular da proteína mEGFP, mEGFP-CT006 e FLAG-HA-14-3-3 β é 26,9 kDa, 47,3 kDa e 30,6 kDa, respetivamente.

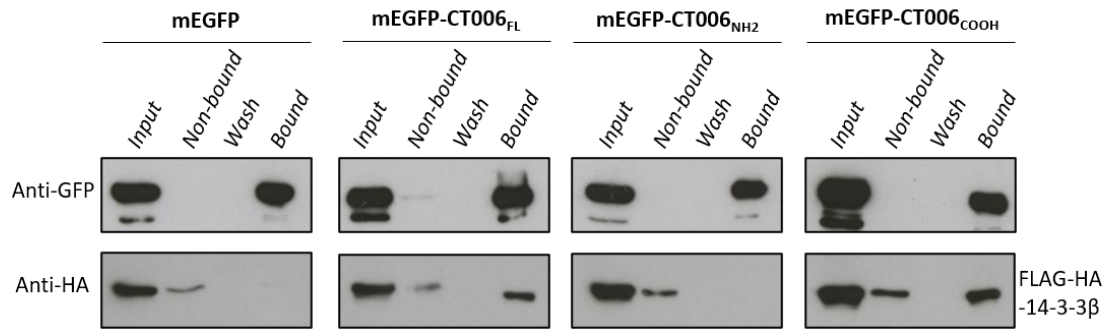


Figura 1.8 - Análise da interação, através de ensaios de co-imunoprecipitação, entre a proteína 14-3-3 β e a proteína CT006 fragmentada após expressão ectópica em células HEK293T. As células HEK293T foram co-transfetadas em diferentes combinações com os plasmídeos que codificam para mEGFP, mEGFP-CT006, mEGFP-CT006_{NH2} ou mEGFP-CT006_{COOH} e com o plasmídeo que codifica para a proteína FLAG-HA-14-3-3 β . Após 24 h, as células foram lisadas e incubadas com GFP *trap beads* (ChromoTek). As amostras *Input*, *Non-Bound*, *Wash* e *Bound* foram analisadas por *immunoblotting* utilizando os anticorpos anti-HA e anti-GFP para a detecção das proteínas. A combinação 14-3-3 β e mEGFP foi utilizada como controlo negativo e a combinação 14-3-3 β e mEGFP-CT006 como controlo positivo. O marcador de pesos moleculares utilizado foi NZYColour Protein Marker II. A massa molecular da proteína mEGFP, mEGFP-CT006, mEGFP-CT006_{NH2}, mEGFP-CT006_{COOH} e FLAG-HA-14-3-3 β é 26,9 kDa, 47,4 kDa, 36, kDa, 36,1 kDa e 30,6 kDa, respetivamente.

Objetivos

Em estudos anteriores foram identificadas potenciais interações entre a proteína Inc CT006 de *C. trachomatis* e as proteínas eucarióticas 14-3-3 γ , 14-3-3 η e 14-3-3 β ⁹. No laboratório, foi confirmado, através da técnica de co-imunoprecipitação, que a proteína 14-3-3 β interage com CT006 e, por microscopia de fluorescência, que é recrutada para a periferia da membrana de inclusão de *C. trachomatis* (Bugalhão e Mota, resultados não publicados). Uma vez que existem 7 isoformas conhecidas das proteínas 14-3-3 em mamíferos, neste trabalho pretende-se analisar o recrutamento para a periferia da membrana de inclusão de *C. trachomatis* de todas as proteínas 14-3-3 por microscopia de fluorescência, e a interação entre as 14-3-3 e a proteína CT006 por co-imunoprecipitação.

As proteínas 14-3-3 ligam-se a fosfoserinas/fosfotreoninas presentes em motivos específicos na proteína alvo⁴⁹. Uma vez que a proteína Inc CT006 contém alguns destes motivos na sua sequência, neste trabalho pretende-se também analisar a importância destes motivos na interação entre a proteína 14-3-3 β e a proteína Inc CT006.

O principal objetivo deste trabalho consistiu então em analisar o recrutamento das proteínas 14-3-3 para a periferia da membrana de inclusão e analisar a interação das mesmas com a proteína Inc CT006.

Para tal foram cumpridas as seguintes metas:

- Analisar o recrutamento para a periferia da membrana de inclusão das proteínas 14-3-3 em diferentes horas após a infeção com *C. trachomatis*
- Testar a interação entre as proteínas 14-3-3 e a proteína Inc CT006
- Identificar motivos/aminoácidos das sequências das proteínas 14-3-3 e da proteína Inc CT006 que possam estar envolvidos na interação

2. Materiais e Métodos

Estirpes bacterianas e condições de crescimento

A estirpe bacteriana utilizada para a construção e purificação de plasmídeos foi *Escherichia coli* NEB 10 β (New England Biolabs). Esta estirpe foi crescida em meio LB (*lysogeny broth*; NZYTech), líquido ou sólido (contendo agar 15% (p/v) (NZYTech)) com os antibióticos apropriados (Ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$ ou Canamicina 50 $\mu\text{g/ml}$). Os plasmídeos foram introduzidos em *E. coli* por eletroporação. A estirpe *Chlamydia trachomatis* LGV serovar 434/Bu (L2/434; ATCC) foi propagada em células HeLa 229 usando técnicas descritas anteriormente⁵² e detalhadas abaixo.

Manutenção de linhas celulares humanas

As células HeLa 229 e as células HEK293T (European Collection Authenticated of Cell Cultures; ECACC) foram mantidas em *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM; CORNING) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (*fetal bovine serum*, FBS; gibco) inativado por calor, numa câmara a 37 °C com 5% (v/v) de CO₂.

A passagem das células consistiu nos seguintes passos: inicialmente as células estavam num frasco de cultura T75 em meio DMEM suplementado com 10% (v/v) de FBS. De seguida, o meio foi aspirado e as células aderentes foram lavadas com 5 ml de PBS (*Phosphate-buffered saline*). De seguida incubou-se durante 5 minutos com 1,5 ml de TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific), de forma desassociar as células da parede. Por fim adicionou-se 8,5 ml de meio DMEM suplementado com 10% (v/v) de FBS, transferindo de seguida para um novo frasco T75, por exemplo, 3 ml (HeLa 229) ou 1 ml (HEK293T) perfazendo com meio DMEM suplementado com 10% (v/v) de FBS.

Manipulação e manutenção de *C. trachomatis*

Os *stocks* de *C. trachomatis* são preparados nos seguintes passos: propagação, congelados a -80°C onde permanecem até utilização e titulação de forma a perceber a concentração do *stock*.

Começou-se por infetar com *C. trachomatis* um frasco T75 com células HeLa 229, aproximadamente 48 horas depois lisou-se as células HeLa 229 com H₂O, adicionou-se SPG 2X (*Sucrose Phosphate Glutamate*; 0,2 mM sacarose, 17 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄, 5 mM L-ácido glutâmico) e centrifugou-se a 180 g para eliminar os restos celulares, dividindo-se o sobrenadante, onde estão os corpos elementares, em alíquotas para congelar.

Para titular o *stock* fez-se um *seeding* de 1x10⁵ células por poço, em placas de 24 poços. Após 24 h uma alíquota do *stock* de *C. trachomatis* foi descongelada e fizeram-se diluições em série em SPG. As

células foram infetadas com 200 µl de cada diluição e foram incubadas 30 min a 37 ° C numa atmosfera com de 5% (v/v) CO₂. O inóculo foi removido e adicionou-se DMEM suplementado com 10% (v/v) FBS e 10 µg/ml de gentamicina. 24 horas após a infecção, as células foram fixadas com metanol e marcadas com um anticorpo anti-*C. trachomatis* acoplado ao fluoróforo isotiocianato de fluoresceína para marcar as bactérias. As amostras foram então analisadas num microscópio de fluorescência onde se contou o número de inclusões por campo.

Para determinar as unidades formadoras de inclusões (IFUs)/ml, utilizou-se a equação:

$$\text{IFUS/ml} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ médio de inclusões/campo} \times \text{fator de diluição} \times \text{N}^{\circ} \text{ de campos/cover slip}^*}{\text{volume do inóculo (200 ml)}}$$

* = 12778,83 (usando a objetiva de 40x do microscópio de fluorescência Zeiss AxioImager D2)

Manipulação de DNA, plasmídeos e primers

Os plasmídeos e primers utilizados neste trabalho estão representados na Tabela 2.1 e na Tabela 2.2, respetivamente. A purificação e extração de DNA plasmídico foi realizada utilizando o kit NZYMINIprep (NZYtech), de acordo com as instruções do fabricante.

Foram realizadas oito clonagens neste trabalho: o gene que codifica para a proteína 14-3-3ε foi clonado no vetor pcDNA3-FLAG-HA de forma a expressar a proteína 14-3-3ε num novo vetor de transfeção, o gene que codifica para a proteína 14-3-3τ foi clonado no vetor pcDNA3-FLAG-HA de forma a colocar este gene num vetor de transfeção, o gene que codifica para a proteína Inc CT006, com substituições em alguns nucleótidos, foi clonado no vetor pALT2 de forma a testar se os motivos de ligação de 14-3-3 presentes na proteína Inc CT006 estavam relacionados com a interação entre esta proteína e as proteínas 14-3-3 e o gene que codifica para a proteína 14-3-3β foi truncado em dois. Estes dois genes foram clonados no vetor pcDNA3-FLAG-HA de forma a perceber que região da proteína estaria envolvida na interação entre a mesma e a proteína Inc CT006.

Os inserts resultaram de PCRs a partir dos plasmídeos que codificavam para as proteínas de interesse com a enzima Phusion High Fidelity DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific). As purificações dos produtos de PCR antes e após digestão com enzimas de restrição foram realizadas com o kit DNA Clean & Concentrator-5 (Zymo Research) e a purificação dos vetores depois de digeridos foi feita com o kit Zymoclean Gel DNA Recovery (Zymo Research). As enzimas de restrição usadas foram BamHI, EcoRI e XhoI (Thermo Fisher Scientific). As enzimas e kits indicados foram utilizados de acordo com as instruções dos fabricantes.

Os inserts e os vetores para as clonagens foram ligados com a enzima T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific). Após realizada a transformação de *E. coli* NEB 10β por eletroporação foi feito um colony

PCR com a enzima NZYtaq II DNA polymerase (NZYtech), de acordo com as indicações do fabricante, de forma a selecionar as colônias que poderiam possuir os plasmídeos pretendidos. Por fim procedeu-se à extração e purificação do DNA dos plasmídeos construídos e confirmou-se a precisão da sequência de nucleótidos por sequenciação de Sanger (Stabvida).

Tabela 2.1 – Plasmídeos utilizados neste trabalho

| Plasmídeo | Descrição/construção | Referência |
|--------------------------------|--|----------------------------------|
| pcDNA3.1-HA-14-3-3 ϵ | Plasmídeo que permite a expressão de 14-3-3 ϵ acoplado a HA | Addgene # 48797 ⁵³ |
| pcDNA3-FLAG-HA-14-3-3 γ | Plasmídeo que permite a expressão de 14-3-3 γ acoplado a FLAG-HA | Addgene #9000 |
| pCS2-HA-14-3-3 η | Plasmídeo que permite a expressão de 14-3-3 η acoplado a HA | Addgene # 116887 ⁵⁴ |
| pGEX-4T2-GST- 14-3-3 τ | Plasmídeo que permite a expressão de 14-3-3 τ acoplado a GST | Addgene # 13281 ⁵⁵ |
| pCS2-HA-14-3-3 ζ | Plasmídeo que permite a expressão de 14-3-3 ζ acoplado a HA | Addgene # 116888 ⁵⁴ |
| pcDNA3-HA-14-3-3 σ | Plasmídeo que permite a expressão de 14-3-3 σ acoplado a HA | Addgene # 11946 ⁵⁶ |
| pcDNA3-FLAG-HA-14-3-3 β | Plasmídeo que permite a expressão de 14-3-3 β acoplado a FLAG-HA | Addgene # 8999 |
| pCB1 | Plasmídeo derivado de pcDNA3-FLAG-HA-14-3-3 γ que permite a expressão de 14-3-3 τ acoplado a FLAG-HA. O <i>insert</i> resultou de um PCR a partir do plasmídeo pGEX-4T2-GST-14-3-3 τ com os <i>primers</i> 2540 e 2541. As enzimas de restrição utilizadas foram EcoRI e XhoI. | Este trabalho |
| pCB4 | Plasmídeo derivado de pcDNA3-FLAG-HA-14-3-3 γ que permite a expressão de 14-3-3 ϵ acoplado a FLAG-HA. O <i>insert</i> resultou de um PCR a partir do plasmídeo pcDNA3.1-HA-14-3-3 ϵ com os <i>primers</i> 2633 e 2634. As enzimas de restrição utilizadas foram EcoRI e XhoI. | Este trabalho |
| pALT2 | Plasmídeo derivado de pEGFP-C1 (Clontech) que permite a expressão de EGFP monomérico (mEGFP) | Ana Luzia Trindade ⁵⁷ |

Tabela 2.1 (Continuação) – Plasmídeos utilizados neste trabalho

| Plasmídeo | Descrição/construção | Referência |
|-----------|---|-------------------------------|
| pJB104 | Plasmídeo derivado de pALT2 que permite a expressão de CT006 acoplado à mEGFP. O <i>insert</i> resultou de um PCR a partir de DNA genómico de <i>C. trachomatis</i> L2 434/Bu com os <i>primers</i> 2237 e 2238. As enzimas de restrição usadas foram XhoI e BamHI. | Joana Bugalhão, não publicado |
| pJB116 | Plasmídeo derivado de pALT2 que permite a expressão de uma proteína CT006 mutante (com as serinas nas posições 165, 166 e 167 substituídas por alaninas) acoplada à mEGFP. O <i>insert</i> resultou de duas reações de PCR diferentes a partir do plasmídeo pJB104 com os <i>primers</i> 2237 e 2399 e 2398 e 628. Foi realizado um <i>overlapping</i> PCR usando como <i>template</i> os produtos de PCR das reações anteriores e os <i>primers</i> 2237 e 628. As enzimas de restrição usadas foram XhoI e BamHI. | Joana Bugalhão, não publicado |
| pJB117 | Plasmídeo derivado de pALT2 que permite a expressão de uma proteína CT006 mutante (com as serinas nas posições 150, 151 e 152 substituídas por alaninas) acoplada à mEGFP. O <i>insert</i> resultou de duas reações de PCR diferentes a partir do plasmídeo pJB104 com os <i>primers</i> 2237 e 2442 e 2441 e 628. Foi realizado um <i>overlapping</i> PCR usando como <i>template</i> os produtos de PCR das reações anteriores e os <i>primers</i> 2237 e 628. As enzimas de restrição usadas foram XhoI e BamHI. | Joana Bugalhão, não publicado |

Tabela 2.1 (Continuação) – Plasmídeos utilizados neste trabalho

| Plasmídeo | Descrição/construção | Referência |
|-----------|--|-------------------------------|
| pJB118 | Plasmídeo derivado de pALT2 que permite a expressão de uma proteína CT006 mutante (com a serina na posição 188 substituída por alanina) acoplada à mEGFP. O <i>insert</i> resultou de duas reações de PCR diferentes a partir do plasmídeo pJB104 com os <i>primers</i> 2237 e 2444 e 2443 e 628. Foi realizado um <i>overlapping</i> PCR usando como <i>template</i> os produtos de PCR das reações anteriores e os <i>primers</i> 2237 e 628. As enzimas de restrição usadas foram XhoI e BamHI. | Joana Bugalhão, não publicado |
| pCB5 | Plasmídeo derivado de pcDNA3-FLAG-HA-14-3-3 β que permite a expressão de um fragmento de 14-3-3 β (resíduos de aminoácidos 1 ao 134) acoplado a FLAG-HA. O <i>insert</i> resultou de um PCR a partir do plasmídeo pcDNA3-FLAG-HA-14-3-3 β com os <i>primers</i> 2666 e 2667. As enzimas de restrição utilizadas foram BamHI e EcoRI. | Este trabalho |
| pCB6 | Plasmídeo derivado de pcDNA3-FLAG-HA-14-3-3 β que permite a expressão de um fragmento de 14-3-3 β (resíduos de aminoácidos 135 ao 246) acoplado a FLAG-HA. O <i>insert</i> resultou de um PCR a partir do plasmídeo pcDNA3-FLAG-HA-14-3-3 β com os <i>primers</i> 2668 e 2669. As enzimas de restrição utilizadas foram BamHI e EcoRI. | Este trabalho |
| pCB7 | Plasmídeo derivado de pALT2 que permite a expressão de uma proteína CT006 mutante (com as serinas nas posições 150, 151, 152 e 188 substituídas por alaninas) acoplada à mEGFP. O <i>insert</i> resultou de duas reações de PCR diferentes a partir do plasmídeo pJB117 com os <i>primers</i> 2237 e 2444 e 2443 e 628. Foi realizado um <i>overlapping</i> PCR usando como <i>template</i> os produtos de PCR das reações anteriores e os <i>primers</i> 2237 e 628. As enzimas de restrição usadas foram XhoI e BamHI. | Este trabalho |

Tabela 2.1 (Continuação) – Plasmídeos utilizados neste trabalho

| Plasmídeo | Descrição/construção | Referência |
|-----------|---|---------------|
| pCB8 | Plasmídeo derivado de pALT2 que permite a expressão de uma proteína CT006 mutante (com as serinas nas posições 150, 151, 152, 165, 166 e 167 substituídas por alaninas) acoplada à mEGFP. O <i>insert</i> resultou de duas reações de PCR diferentes a partir do plasmídeo pJB116 com os <i>primers</i> 2237 e 2442 e 2441 e 628. Foi realizado um <i>overlapping</i> PCR usando como <i>template</i> os produtos de PCR das reações anteriores e os <i>primers</i> 2237 e 628. As enzimas de restrição usadas foram XhoI e BamHI. | Este trabalho |
| pCB9 | Plasmídeo derivado de pALT2 que permite a expressão de uma proteína CT006 mutante (com as serinas nas posições 165, 166, 167 e 188 substituídas por alaninas) acoplada à mEGFP. O <i>insert</i> resultou de duas reações de PCR diferentes a partir do plasmídeo pJB116 com os <i>primers</i> 2237 e 2444 e 2443 e 628. Foi realizado um <i>overlapping</i> PCR usando como <i>template</i> os produtos de PCR das reações anteriores e os <i>primers</i> 2237 e 628. As enzimas de restrição usadas foram XhoI e BamHI. | Este trabalho |
| pCB10 | Plasmídeo derivado de pALT2 que permite a expressão de uma proteína CT006 mutante (com as serinas nas posições 150, 151, 152, 165, 166, 167 e 188 substituídas por alaninas) acoplada à mEGFP. O <i>insert</i> resultou de duas reações de PCR diferentes a partir do plasmídeo pCB7 com os <i>primers</i> 2237 e 2399 e 2398 e 628. Foi realizado um <i>overlapping</i> PCR usando como <i>template</i> os produtos de PCR das reações anteriores e os <i>primers</i> 2237 e 628. As enzimas de restrição usadas foram XhoI e BamHI. | Este trabalho |

Tabela 2.2 – Primers utilizados neste trabalho

| Código | Descrição | Sequência | Enzima de restrição |
|---------------|---|---|----------------------------|
| 2540 | <i>Primer forward</i> para a construção de pCB1 | GACTGAATTCATGGAGAAGACTGAGCTGATCC | EcoRI |
| 2541 | <i>Primer reverse</i> para a construção de pCB1 | GACTCTCGAGTTAGTTTTTCAGCCCCTTCTGCCGCATCAC | XhoI |
| 2339 | <i>Primer forward</i> de sequenciação T7 | TAATACGACTCACTATAGGG | - |
| 2358 | <i>Primer forward</i> de sequenciação CMV | CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG | - |
| 2633 | <i>Primer forward</i> para a construção de pCB4 | GATCGAATTCGATGATCGAGAGGATCTGG | EcoRI |
| 2634 | <i>Primer reverse</i> para a construção de pCB4 | GATCCTCGAGTTACTGATTTTCGTCTTCCACGTCC | XhoI |
| 2666 | <i>Primer forward</i> para a construção de pCB5 | GATCGGATCCACAATGGATAAAAGTGAGCTGG | BamHI |
| 2667 | <i>Primer reverse</i> para a construção de pCB5 | GATCGAATTCTTACACTTCAGAAAGATACCTAAAATAATC TCC | EcoRI |
| 2668 | <i>Primer forward</i> para a construção de pCB6 | GATCGGATCCGCATCTGGAGACAACAAACAAACC | BamHI |
| 2669 | <i>Primer reverse</i> para a construção de pCB6 | GATCGAATTCTTAGTTCTCTCCCTCCCCAGCGTCTCC | EcoRI |
| 2237 | <i>Primer forward</i> para a construção de pCB7, pCB8, pCB9 e pCB10 | GATCCTCGAGAACCCTCCACTGTTGCACC | XhoI |
| 2441 | <i>Primer forward</i> que permite a substituição das serinas nas posições 150, 151 e 152 para alaninas na proteína CT006 <i>Primer forward</i> para a construção de pCB8 | GAACATAAACCAGCTGCTGCCCTTAAAATCG | - |

Tabela 2.2 (Continuação) – Primers utilizados neste trabalho

| Código | Descrição | Sequência | Enzima de restrição |
|---------------|---|---------------------------------|----------------------------|
| 2442 | <i>Primer reverse</i> que permite a substituição das serinas nas posições 150, 151 e 152 para alaninas na proteína CT006 <i>Primer reverse</i> para a construção de pCB8 | CGATTTTAAGGGCAGCAGCTGGTTTATGTTC | - |
| 628 | <i>Primer reverse</i> de sequenciação para pJB116, pJB117, pJB118, pCB7, pCB8, pCB9 e pCB10 <i>Primer reverse</i> para construção de pCB7, pCB8, pCB9 e pCB10 | TTATGTTTCAGGTTTCAGGG | - |
| 2443 | <i>Primer forward</i> que permite a substituição da serina na posição 188 para alanina na proteína CT006 <i>Primer forward</i> para a construção de pCB7 e pCB9 | CCTTCCCAACGCTTTGCCGCTTAA | - |
| 2444 | <i>Primer reverse</i> que permite a substituição da serina na posição 188 para alanina na proteína CT006 <i>Primer reverse</i> para a construção de pCB7 e pCB9 | TTAAGCGGCAAAGCGTTGGGAAGG | - |

Tabela 2.2 (Continuação) – Primers utilizados neste trabalho

| Código | Descrição | Sequência | Enzima de restrição |
|---------------|--|-------------------------------------|----------------------------|
| 2398 | <i>Primer forward</i> que permite a substituição das serinas nas posições 165, 166 e 167 para alaninas na proteína CT006 <i>Primer forward</i> para a construção de pCB10 | CCAAGCTCCCCCGTGCTGCCGCTGCTCCCGATCTG | - |
| 2399 | <i>Primer reverse</i> que permite a substituição das serinas nas posições 165, 166 e 167 para alaninas na proteína CT006 <i>Primer reverse</i> para a construção de pCB10 | CAGATCGGGAGCAGCGGCAGCACGGGGGAGCTTGG | - |

Transfecção de células HeLa 229 e HEK293T

De forma a proceder à análise da localização intracelular de proteínas por microscopia de fluorescência e expressão ectópica em células de mamíferos por *immunoblotting*, as células HeLa 229 foram transfetadas com DNA plasmídico.

Para microscopia de fluorescência foi feito um *seeding* 24 h antes da transfecção com 6×10^4 células por poço numa placa de 24 poços. Para *immunoblotting* o *seeding* foi realizado com 1×10^5 células por poço numa placa de 24 poços. Em ambos os casos as células foram transfetadas utilizando o reagente de transfecção jetPEI (Polyplus transfection), utilizando por poço: 250 ng de DNA plasmídico misturado com 50 μ l de 150 mM NaCl e 1,5 μ l de jetPEI misturados com 50 μ l de 150 mM NaCl. As soluções foram misturadas em vórtex e brevemente centrifugadas. A solução contendo o reagente jetPEI foi adicionada à solução contendo DNA plasmídico, misturada em vórtex e brevemente centrifugada antes de ser incubada 30 minutos à temperatura ambiente. Por fim, foram adicionados 100 μ l a cada poço. As células foram incubadas numa câmara a 37°C com 5% (v/v) de CO₂ e recolhidas para *immunoblotting* ou imunofluorescência nos tempos indicados. Nas experiências em que as células foram transfetadas com plasmídeos e infetadas com *C. trachomatis*, a transfecção foi realizada no tempo zero de infeção.

As células HEK293T foram transfetadas com DNA plasmídico para se proceder aos ensaios de co-immunoprecipitação. 24 h antes da transfecção foi feito o *seeding* de 5×10^5 células por poço em placas

de 6 poços, previamente tratadas com Poli-L-lisina (SIGMA-ALDRICH; diluída 1:10 em PBS). O procedimento de transfeção foi semelhante ao referido em cima, com as seguintes exceções: os volumes de todas as soluções e quantidades de DNA plasmídico foram multiplicados por 5 e trocou-se o meio DMEM suplementado com 10% (v/v) FBS antes da transfeção e após 4 h.

Infeção com *C. trachomatis*

As células HeLa 229 foram infetadas com *C. trachomatis* L2/434. No dia anterior à infeção foi realizado um *seeding* em placas de 24 poços. Após 24 h, trocou-se o meio DMEM suplementado com 10% (v/v) FBS por meio *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS; gibco) e as células foram incubadas a 37 °C numa atmosfera com 5% (v/v) CO₂ durante 10 minutos. Procedeu-se à preparação de um inóculo de *C. trachomatis* em 200 µl/poço de SPG com uma multiplicidade de infeção (MOI) de 10. Retirou-se o HBSS, adicionou-se o inóculo e as células foram incubadas durante 30 minutos a 37 °C numa atmosfera com 5% (v/v) de CO₂. Após remoção do inóculo foi adicionado DMEM suplementado com 10% (v/v) FBS contendo 10 µg/mL gentamicina, sendo este considerado o tempo zero de infeção. As células infetadas foram incubadas a 37 °C numa atmosfera com 5% (v/v) de CO₂ até ao momento de preparação para análise.

Microscopia de Fluorescência

Para microscopia de fluorescência, as células foram fixadas com 4% (p/v) paraformaldeído (PFA) durante 15 minutos à temperatura ambiente e colocadas em PBS contendo cloreto de amónia (NH₄Cl; 0,01 M). As células foram lavadas em PBS contendo 0,1% (p/v) saponina (PBSS; (VWR)) ou PBS contendo 0,1% (v/v) Triton X-100 (PBS-Triton; (SIGMA-ALDRICH)), incubadas durante 1 h com anticorpos primários (1:200) diluídos em PBSS ou PBS-Triton contendo 10% (v/v) de soro de cavalo e posteriormente incubadas com anticorpos secundários (1:200) apropriados acoplados a fluoróforos. Para finalizar, lavaram-se sequencialmente as células em PBSS ou PBS-Triton, PBS e H₂O destilada e colocaram-se numa lâmina com líquido de montagem *Aqua-poly/Mount* (Polysciences). As amostras foram analisadas usando um microscópio de fluorescência (Zeiss AxioImager D2) e as imagens obtidas foram processadas usando o software Fiji⁵⁸.

Anticorpos e corantes fluorescentes

Para microscopia de fluorescência foram utilizados os anticorpos primários anti-HA de ratazana (Roche; 1:200) e anti-MOMP de cabra (Abcam; 1:200) e os anticorpos secundários anti-IgG de ratazana conjugado a *Rhodamine Red-X* (Jackson ImmunoResearch; 1:200) e anti-IgG de cabra conjugado a AF488 (Jackson ImmunoResearch; 1:200). Foi ainda utilizada faloidina conjugada a AF488 (Life Technologies; 1:200) para marcar os filamentos de actina.

Para *immunoblotting* foram utilizados os anticorpos primários anti-HA de ratazana (Roche; 1:1000), anti- α -tubulina de rato (Sigma-Aldrich; 1:1000), anti-GFP de coelho (Abcam; 1:1000) e anti-GFP de cabra (SICGEN; 1:1000). Os anticorpos secundários conjugados à enzima *Horseradish Peroxidase* (HRP) utilizados foram anti-IgG de ratazana (Sigma-Aldrich; 1:10 000), anti-IgG de rato (GE Healthcare; 1:10 000), anti-IgG de coelho (Jackson ImmunoResearch; 1:10 000) e anti-IgG de cabra (Jackson ImmunoResearch; 1:10 000).

Ensaio de co-imunoprecipitação

Para os ensaios de co-imunoprecipitação foi utilizado o kit *GFP-Trap* (ChromoTek), de acordo com as instruções do fabricante. 48 horas antes de iniciar o ensaio foi feito um *seeding* de 5×10^5 células HEK293T por poço numa placa de 6 poços previamente tratada com Poli-L-lisina (SIGMA-ALDRICH). Após 24 h, as células foram co-transfetadas, em várias combinações diferentes, com os plasmídeos que codificam para mEGFP, mEGFP-CT006 ou mEGFP-CT006 mutantes e com os plasmídeos que codificam para as diferentes proteínas 14-3-3 ou para as proteínas 14-3-3 $\beta_{(1-134)}$ e 14-3-3 $\beta_{(135-246)}$ com o epítipo HA ou FLAG-HA, tendo sido utilizados dois poços para cada condição em estudo.

No dia seguinte, o meio de cultura foi substituído por 500 μ l de PBS por poço e as células foram raspadas e transferidas para microtubos de 1,5 ml. Para proceder à lise celular as células foram centrifugadas durante 5 minutos a 3070 g, ressuspendidas em 200 μ l de *Co-IP Lysis Buffer* (20 mM Tris pH 7,5, 137 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP40, inibidores de proteases [1:100] e PMSF [1:100]), arrefecido em gelo, incubadas durante 30 minutos em gelo sendo ressuspendidas de 10 em 10 minutos. O lisado foi centrifugado a 24,100 g durante 10 min a 4 °C e 20 μ l de sobrenadante (*Input*-amostra inicial) foi recolhido para análise por *immunoblotting*. O restante lisado foi diluído em 800 μ l de *GFP-Trap dilution buffer* (10 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA) e incubado com as *GFP-Trap beads* (ChromoTek), previamente lavadas 3 vezes com *GFP-Trap dilution buffer*, durante 4 h com agitação a 4°C.

Após o tempo de incubação, foram recolhidos 20 μ l da fração não ligada às *GFP-Trap beads* (*Non-Bound* – Não ligantes) e procedeu-se à lavagem das *beads* com 500 μ l de *GFP-Trap dilution buffer*, com centrifugações de 2 min a 2000 g, 4°C. Este processo de lavagem foi repetido 6 vezes, 3 das quais entre a adição do *GFP-Trap dilution buffer* e a centrifugação, as *beads* foram incubadas a 4 °C durante 5 minutos com agitação. Recolheu-se a última lavagem (*Wash* - Lavagem) e guardou-se o último *pellet* (*Bound* – Ligandos), onde se encontram as proteínas que interagem com mEGFP-CT006. Durante todo este processo foram guardados 20 μ l de cada amostra (*Input*, *Non-Bound*, *Wash* e *Bound*), às quais foram adicionados 20 μ l de 2X SDS *Loading Buffer* (0,25 M Tris-HCl pH 6,8, 10% (p/v) SDS, 50% (v/v) Glycerol, 0,5 M β -mercaptoethanol, 0,5 % (p/v) Bromophenol blue) previamente aquecido. Por fim as amostras foram fervidas a 100 °C durante 10 minutos e analisadas por *immunoblotting*.

Immunoblotting

Para recolher os extratos celulares de forma a serem analisados por *immunoblotting*, lavou-se as células HeLa 229 com PBS, adicionou-se 50 µl de TrypLE Express por poço e incubou-se as células a 37 °C numa atmosfera com 5% (v/v) de CO₂ durante 5 minutos. Foram adicionados 500 µl por poço de meio DMEM suplementado com 10 % (v/v) FBS para de seguida as células serem transferidas para um microtubo de 1,5 ml (2 poços por microtubo). Centrifugou-se as células durante 2 minutos a 4,500 g, 4°C e ressuspendeu-se o *pellet* em 500 µl de PBS. Voltou a centrifugar-se nas mesmas condições, mas desta vez ressuspendeu-se o *pellet* em 40 µl de SDS *Loading Buffer* previamente aquecido. As amostras foram incubadas durante 10 minutos a 100 °C e separadas em 12% SDS-PAGE ou 15% SDS-PAGE.

As proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose através do sistema de transferência Trans-Blot Turbo (BioRad), de acordo com as instruções do fabricante, e de seguida as membranas foram bloqueadas com 4% (p/v) de leite em pó diluído em PBS contendo 0,2% (v/v) Tween-20 (AMRESCO). Posteriormente as membranas foram incubadas com os anticorpos primários apropriados e com anticorpos secundários acoplados à enzima HRP. As lavagens das membranas foram feitas com PBS contendo 0,2% (v/v) Tween-20 e detetadas com SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific), de acordo com as indicações do fabricante, por exposição em Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare).

Alinhamentos das sequências de aminoácidos das proteínas 14-3-3

O alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas 14-3-3 foi feito com o programa BLAST^{59,60}, T-Coffee^{61,62} e Jalview⁶³.

3. Resultados

Expressão ectópica das proteínas 14-3-3 em células de mamífero

De forma a expressar as proteínas 14-3-3 ectopicamente em células HeLa 229, estas células foram transfetadas com plasmídeos que codificam para as proteínas 14-3-3 acopladas aos epítomos hemaglutinina do vírus da gripe (HA) ou FLAG-HA: HA-14-3-3 ϵ (31 kDa), FLAG-HA-14-3-3 ϵ (32,1 kDa), FLAG-HA-14-3-3 γ (31,4 kDa), HA-14-3-3 η (30 kDa), HA-14-3-3 ζ (29,5 kDa), FLAG-HA-14-3-3 τ (31 kDa), FLAG-HA-14-3-3 β (30,6 kDa) e HA-14-3-3 σ (29,4 kDa). De seguida a produção das proteínas foi analisada por *immunoblotting*.

Na Figura 3.1A é possível observar que todas as proteínas foram produzidas de acordo com a sua massa molecular, tal como deduzido a partir da sua estrutura primária, com exceção da proteína HA-14-3-3 ϵ . Clonou-se então o gene que codifica para a proteína 14-3-3 ϵ num novo vetor de transfeção e, como podemos ver na figura 3.1B, a presença da banda indica que a proteína FLAG-HA-14-3-3 ϵ foi produzida com a massa molecular prevista.

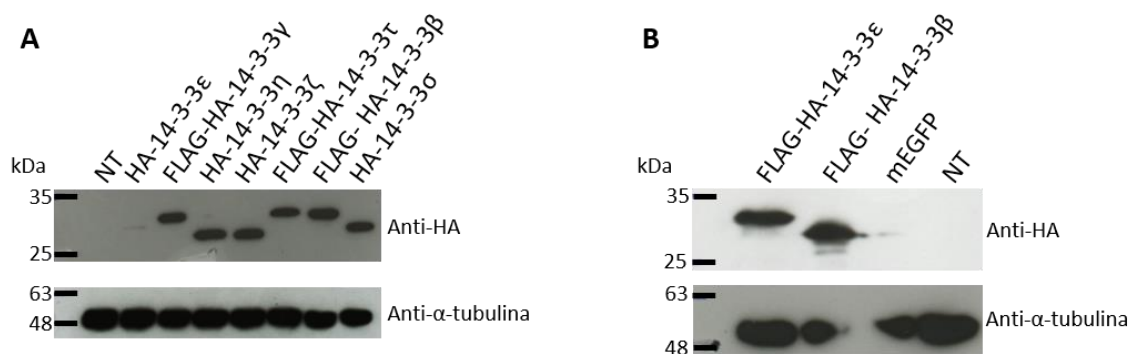
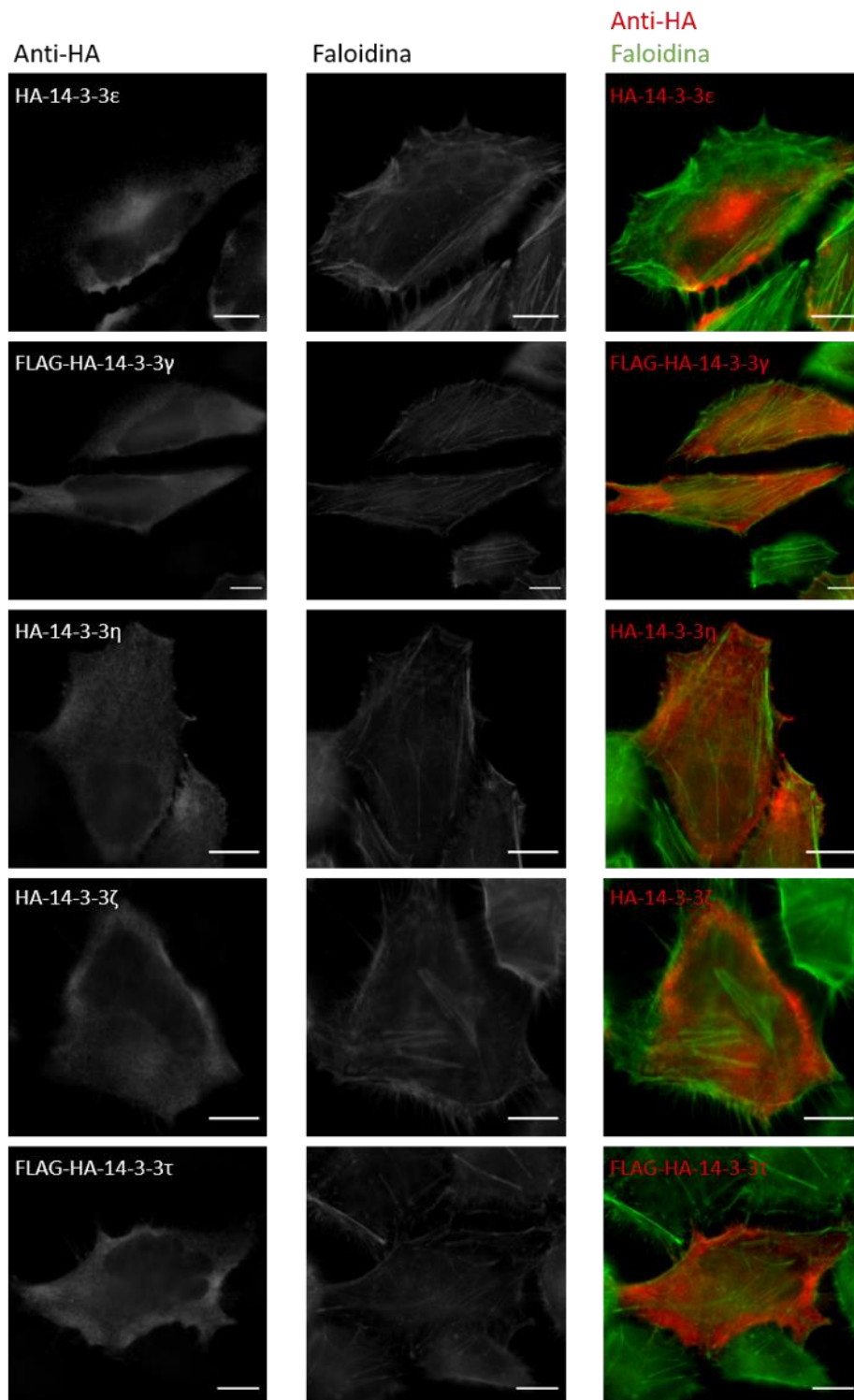


Figura 3.1 - Análise da expressão ectópica das diferentes 14-3-3 em células HeLa 229. As células foram transfetadas com os diferentes plasmídeos que codificam para as proteínas 14-3-3, indicadas na figura, e após 24 h procedeu-se à análise por *immunoblotting*. Os anticorpos anti-HA e anti- α -tubulina foram utilizados para deteção das proteínas e o marcador de pesos moleculares utilizado foi NZYColour Protein Marker II (NZYtech). **(A)** Todas as proteínas foram produzidas de acordo com a sua massa molecular prevista, com exceção da proteína HA-14-3-3 ϵ . **(B)** Expressão da proteína 14-3-3 ϵ após se ter construído um plasmídeo novo para expressar a proteína acoplada aos epítomos FLAG-HA num vetor de transfeção diferente. A fração NT corresponde às células não transfetadas servindo como controlo negativo. A massa molecular da proteína mEGFP, HA-14-3-3 ϵ , FLAG-HA-14-3-3 γ , HA-14-3-3 η , HA-14-3-3 ζ , FLAG-HA-14-3-3 τ , FLAG-HA-14-3-3 β , HA-14-3-3 σ e FLAG-HA-14-3-3 ϵ é 26,9 kDa, 31 kDa, 31,4 kDa, 30 kDa, 29,5 kDa, 31 kDa, 30,6 kDa, 29,4 kDa e 32,1 kDa, respetivamente.

As proteínas 14-3-3 apresentam uma localização citoplasmática quando expressas ectopicamente em células HeLa 229

Para analisar a localização intracelular das proteínas 14-3-3 em células de mamífero, as células HeLa 229 foram transfetadas com os plasmídeos que codificam para as proteínas 14-3-3 acopladas a HA ou FLAG-HA (HA-14-3-3 ϵ , FLAG-HA-14-3-3 γ , HA-14-3-3 η , HA-14-3-3 ζ , FLAG-HA-14-3-3 τ , FLAG-HA-14-

3-3 β e HA-14-3-3 σ) e analisadas por imunofluorescência utilizando o anticorpo anti-HA. Faloidina conjugada ao fluoróforo AF488 foi utilizada para a marcação dos filamentos de actina. Verificamos que todas as proteínas 14-3-3 estão dispersas pela célula (Figura 3.2). Pudemos então concluir que todas as isoformas das proteínas 14-3-3 aparentam apresentar uma localização citoplasmática.



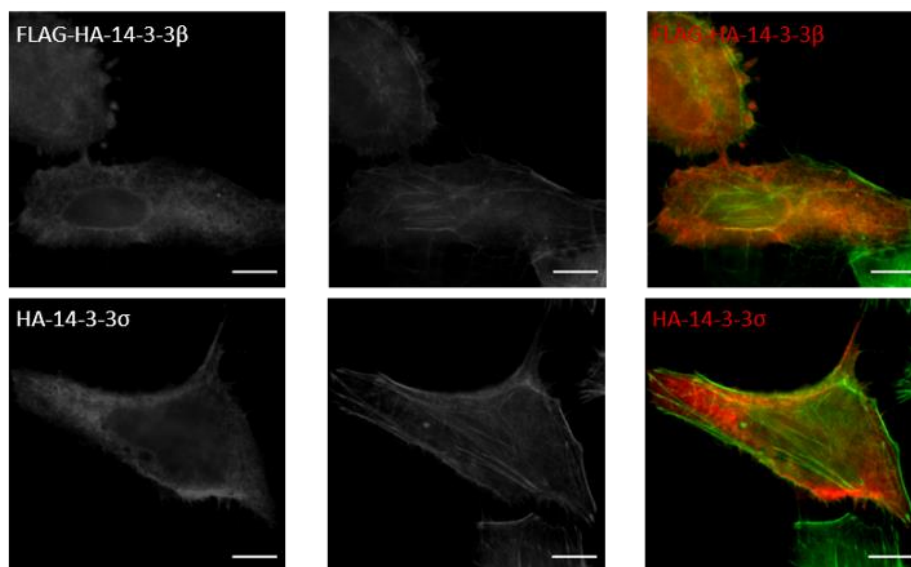


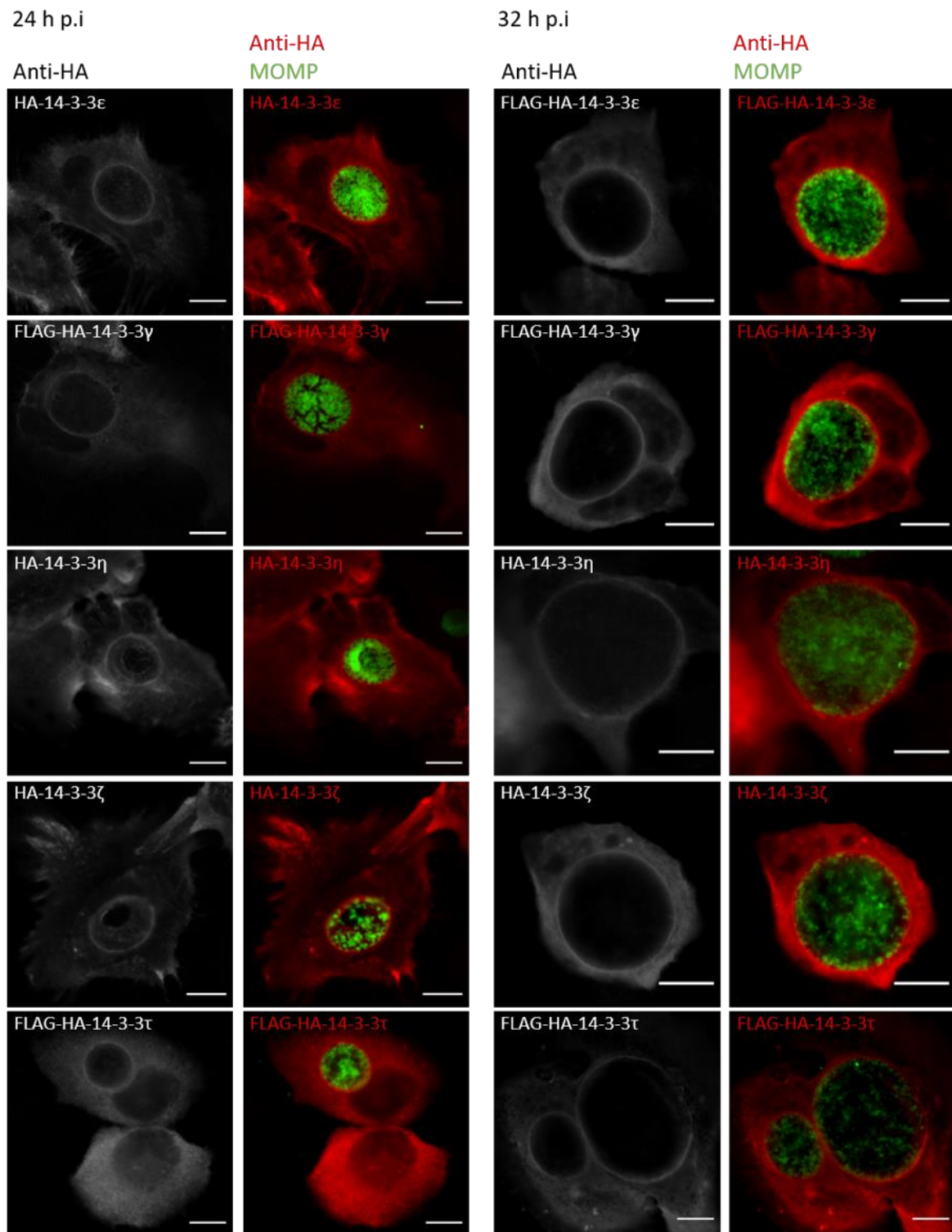
Figura 3.2 - Análise da localização intracelular das diferentes proteínas 14-3-3 quando expressas ectopicamente em células HeLa 229. As proteínas 14-3-3 apresentam uma localização citoplasmática. As células HeLa 229 foram transfetadas com os plasmídeos que codificam para as diferentes 14-3-3 e após 24 h foram fixadas com 4% (p/v) paraformaldeído. Posteriormente foram marcadas, para serem analisadas por microscopia de fluorescência, com o anticorpo anti-HA e com um anticorpo secundário apropriado conjugado a um fluoróforo vermelho e com faloidina conjugada ao fluoróforo AF488. Barra de escala, 10 μ m.

As proteínas 14-3-3 são recrutadas para a periferia da membrana de inclusão em células infectadas com *C. trachomatis*

A proteína Inc CT006 localiza-se na membrana de inclusão de *C. trachomatis*. Antes de testar a interação entre as proteínas 14-3-3 e a proteína Inc CT006 verificou-se primeiro se as proteínas 14-3-3 eram recrutadas para a periferia da membrana de inclusão durante a infecção. As células HeLa 229 foram infectadas com *C. trachomatis* e transfetadas com os plasmídeos que codificam para as diferentes isoformas das proteínas 14-3-3 (HA-14-3-3 ϵ , FLAG-HA-14-3-3 γ , HA-14-3-3 η , HA-14-3-3 ζ , FLAG-HA-14-3-3 τ , FLAG-HA-14-3-3 β e HA-14-3-3 σ). A diferentes horas após a infecção, as células foram fixadas e analisadas por imunofluorescência utilizando o anticorpo anti-HA para a detecção das 14-3-3 e o anticorpo anti-MOMP (que reconhece a *Major Outer Membrane Protein* de *C. trachomatis*) para a detecção das bactérias no interior da inclusão.

Começamos por analisar a localização intracelular das proteínas 14-3-3 após 24 h de infecção com *C. trachomatis*. É possível observar na Figura 3.3 que as proteínas 14-3-3 mantêm parcialmente a sua localização citoplasmática, mas podemos notar que também se localizam num círculo à volta da inclusão. Isto indica acumulação das proteínas 14-3-3 naquela zona, coincidindo com a membrana de inclusão. Foi possível então concluir que todas as isoformas das proteínas 14-3-3 são recrutadas para a periferia da membrana de inclusão de *C. trachomatis*.

De seguida fomos analisar se após 32 h de infeção as proteínas 14-3-3 ainda se localizam na periferia da membrana de inclusão. Tal como se pode observar na Figura 3.3, as inclusões são maiores e as proteínas 14-3-3 mantêm-se à sua volta, o que significa que essas proteínas se localizam na membrana de inclusão após 32 h de infeção.



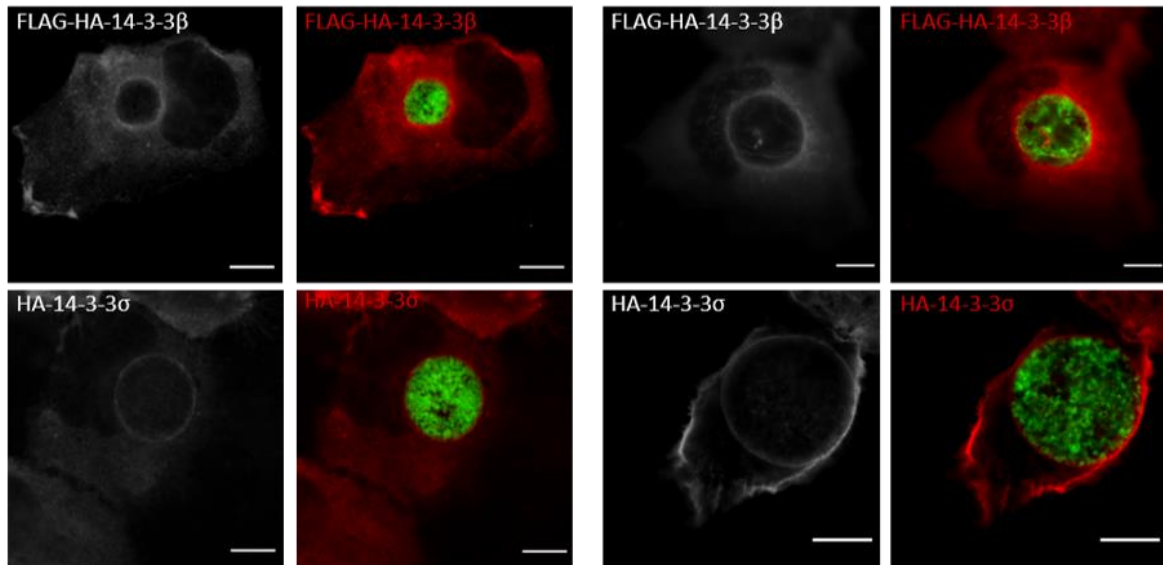


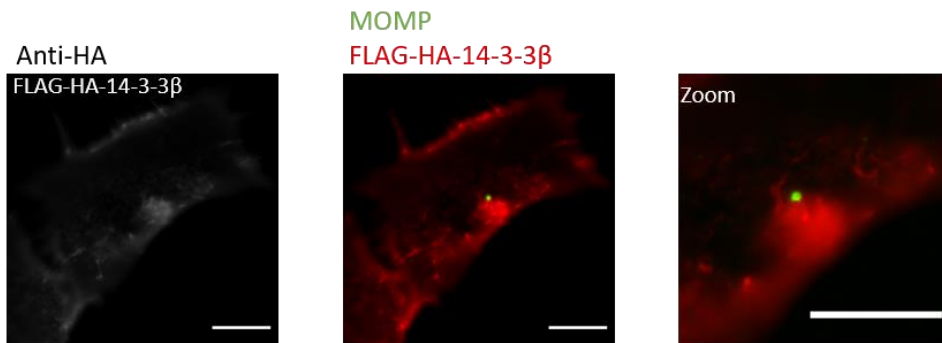
Figura 3.3 - Análise do recrutamento para a periferia da membrana de inclusão das diferentes 14-3-3 após 24 h ou 32 h de infecção com *C. trachomatis*. Após 24 h ou 32 h de infecção todas as proteínas 14-3-3 são recrutadas para a periferia da membrana de inclusão. As células HeLa 229 foram infetadas com *C. trachomatis* L2/434 e transfetadas com os plasmídeos que codificam para as diferentes proteínas 14-3-3. Após 24 h ou 32 h, as células foram fixadas com 4% (p/v) paraformaldeído e marcadas com os anticorpos anti-HA e anti-MOMP e com anticorpos secundários apropriados conjugados a fluoróforos vermelhos ou verdes, respetivamente. As células foram analisadas por microscopia de fluorescência. h p.i: horas pós-infecção. Barra de escala, 10 μ m

O próximo passo foi perceber quando é que estas proteínas começavam a ser recrutadas para a periferia da membrana de inclusão de *C. trachomatis*. Analisámos então as células após 8 h e 16 h de infecção. A análise após 8 h de infecção apenas foi feita para a proteína 14-3-3 β , pois a sua interação com Inc CT006 já tinha sido validada anteriormente (Bugalhão e Mota, resultados não publicados). Tal como ilustrado na Figura 3.4A, pudemos concluir que após 8 h de infecção a proteína FLAG-HA-14-3-3 β ainda não é recrutada para a periferia da membrana de inclusão. A inclusão é muito pequena e apenas conseguimos ver a proteína 14-3-3 β dispersa na célula.

A Figura 3.4B mostra que as proteínas HA-14-3-3 η , HA-14-3-3 ζ , FLAG-HA-14-3-3 τ , FLAG-HA-14-3-3 β e HA-14-3-3 σ são recrutadas para a periferia da membrana de inclusão 16 h após a infecção. Também foi testado para as proteínas FLAG-HA-14-3-3 ϵ e FLAG-HA-14-3-3 γ , mas não foi possível encontrar células transfetadas aquando da análise no microscópio de fluorescência. Prevê-se então que provavelmente as proteínas 14-3-3 começam a ser recrutadas para a periferia da inclusão entre 8 h e 16 h após a infecção por *C. trachomatis*.

A

8 h p.i



B

16 h p.i

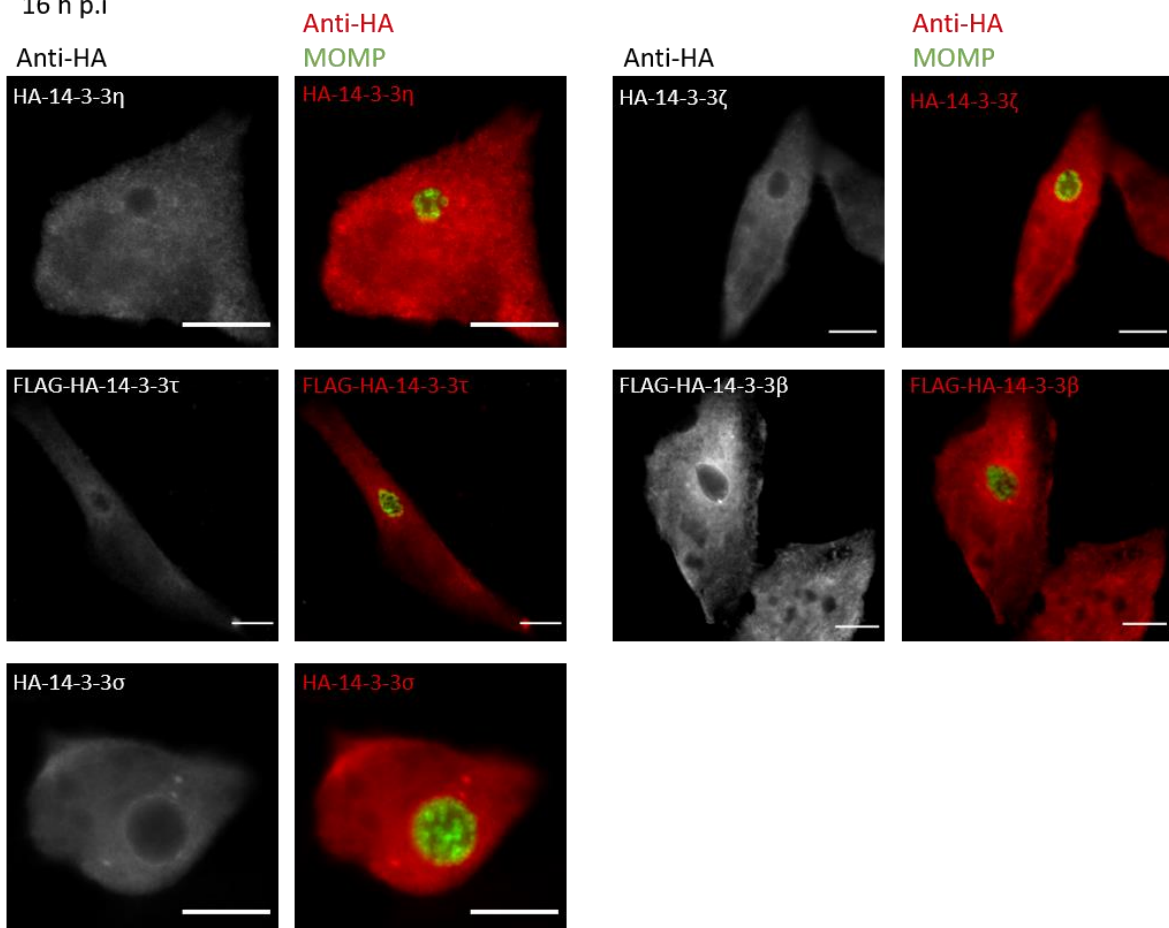


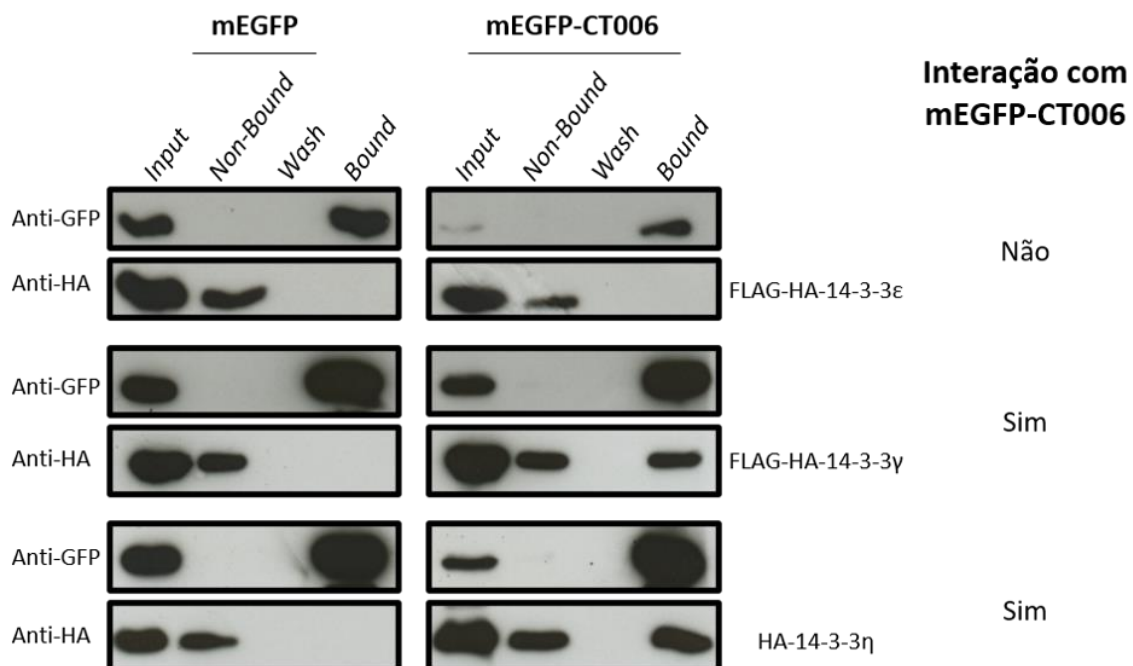
Figura 3.4 - Análise do recrutamento para a periferia da membrana de inclusão das diferentes 14-3-3 após 8 h ou 16 h de infecção com *C. trachomatis*. (A) Após 8 h de infecção a proteína 14-3-3 β não é recrutada para a membrana de inclusão. (B) Após 16 h de infecção as proteínas 14-3-3 η , 14-3-3 ζ , 14-3-3 τ , 14-3-3 β e 14-3-3 σ são recrutadas para a membrana de inclusão.

As células HeLa 229 foram infectadas com *C. trachomatis* L2/434 e transfectadas com os plasmídeos que codificam para as proteínas 14-3-3. As células foram fixadas após 8 h e 16 h de infecção com 4% (p/v) paraformaldeído e marcadas com os anticorpos anti-HA e anti-MOMP e com anticorpos secundários apropriados conjugados a fluoróforos vermelhos ou verdes, respectivamente. As células foram analisadas por microscopia de fluorescência. h p.i: horas pós-infecção. Barra de escala, 10 μ m

A proteína Inc CT006 consegue interagir com as proteínas 14-3-3 γ , 14-3-3 η , 14-3-3 β e 14-3-3 σ

Para testar a interação entre as diferentes isoformas das proteínas 14-3-3 e a proteína Inc CT006 foi utilizada a técnica de co-immunoprecipitação. Para isso, foram co-transfetadas células HEK293T com cada um dos plasmídeos que codificam para as proteínas 14-3-3 acopladas a HA ou FLAG-HA e com o plasmídeo que codifica para mEGFP (controlo negativo) ou mEGFP-CT006. Uma vez que a interação entre mEGFP-CT006 e FLAG-HA-14-3-3 β já tinha sido validada anteriormente (Bugalhão e Mota, resultados não publicados), esta combinação foi utilizada como controlo positivo. Este ensaio foi realizado com as *GFP Trap beads*, que são *beads* de agarose ligadas a um anticorpo contra GFP. Neste ensaio, as amostras *Input*, *Non-Bound*, *Wash* e *Bound* foram analisadas por *immunoblotting* utilizando os anticorpos anti-HA e anti-GFP. Uma vez que a proteína CT006 está acoplada à GFP irá sempre ligar-se a estas *beads* e aparecer na fração *Bound* do *immunoblotting*. Caso alguma das proteínas 14-3-3 interaja com mEGFP-CT006 será também detetada na fração *Bound*.

Como é possível observar na Figura 3.5, as proteínas FLAG-HA-14-3-3 γ , HA-14-3-3 η , FLAG-HA-14-3-3 β e HA-14-3-3 σ foram detetadas na fração *Bound*, o que significa que interagem com a proteína mEGFP-CT006. As proteínas FLAG-HA-14-3-3 ϵ e HA-14-3-3 ζ foram detetadas na fração *Input*, o que significa que estavam presentes na amostra inicial. No entanto, o facto de não serem detetadas na fração *Bound* indica que não interagem com mEGFP-CT006. Em relação à proteína FLAG-HA-14-3-3 τ não foi possível retirar conclusões acerca da interação, uma vez que os resultados obtidos em seis experiências independentes não foram reprodutíveis.



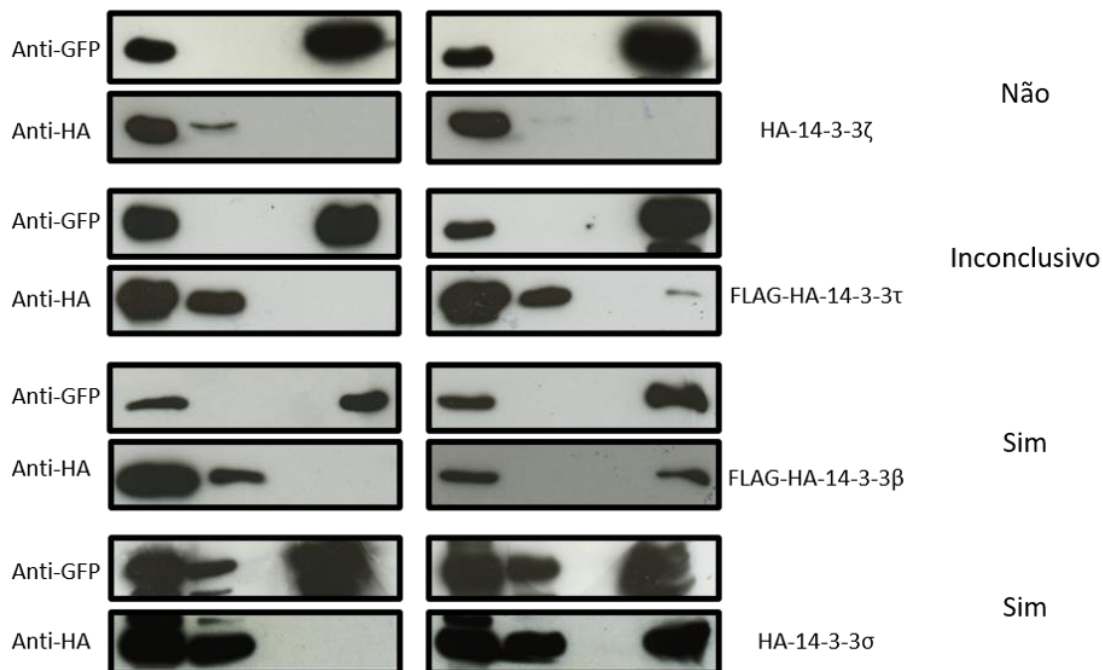


Figura 3.5 - Análise da interação, através de ensaios de co-imunoprecipitação, entre as proteínas 14-3-3 e a proteína CT006 após expressão ectópica em células HEK293T. As células HEK293T foram co-transfetadas em diferentes combinações com os plasmídeos que codificam para mEGFP ou mEGFP-CT006 e com os plasmídeos que codificam para as diferentes isoformas das proteínas 14-3-3 acopladas a HA ou FLAG-HA. Após 24 h, as células foram lisadas e incubadas com GFP *trap beads* (ChromoTek). As amostras *Input*, *Non-Bound*, *Wash* e *Bound* foram analisadas por *immunoblotting* utilizando os anticorpos anti-HA e anti-GFP para a detecção das proteínas. O marcador de pesos moleculares utilizado foi NZYColour Protein Marker II. A massa molecular da proteína mEGFP, mEGFP-CT006, FLAG-HA-14-3-3 ϵ , FLAG-HA-14-3-3 γ , HA-14-3-3 η , HA-14-3-3 ζ , FLAG-HA-14-3-3 τ , FLAG-HA-14-3-3 β , HA-14-3-3 σ é 26,9 kDa, 47,4 kDa, 32,1 kDa, 31,4 kDa, 30 kDa, 29,5 kDa, 31 kDa, 30,6 kDa, 29,4 kDa, respetivamente. Cada ensaio foi realizado pelo menos três vezes para cada proteína 14-3-3 com exceção da proteína 14-3-3 ζ , onde apenas foram realizados dois ensaios. Está representada na figura a conclusão da interação entre as proteínas 14-3-3 e a proteína mEGFP-CT006.

Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas 14-3-3

Como foi possível observar anteriormente algumas das isoformas das proteínas 14-3-3 interagem com a proteína Inc CT006 e outras não. De forma a tentar perceber se isto estava relacionado com as sequências de aminoácidos das isoformas, avaliando quais seriam as diferenças e semelhanças entre elas, fomos fazer um alinhamento entre todas as isoformas das proteínas 14-3-3 e calcular a percentagem de identidade entre as isoformas duas a duas. Recorreu-se primeiro ao programa T-Coffee para fazer um alinhamento de todas as sete sequências de aminoácidos das proteínas 14-3-3 e de seguida o programa Jalview coloriu as sequências consoante a percentagem de identidade de aminoácidos entre elas. Com o BLAST fez-se um alinhamento das isoformas 14-3-3 duas a duas, calculando assim melhor quais seriam as mais diferentes entre si (Tabela 3.1).

Pela Figura 3.6 podemos dizer que, tal como esperado, as isoformas são todas muito idênticas entre si, sendo a região menos idêntica entre todas, a região C-terminal, apesar de ao longo das sequências encontrarmos algumas regiões pouco idênticas. Pode ver-se que todas as isoformas têm os resíduos conservados, Lisina-49, Arginina-56, Arginina-127 e Tirosina-128 (resíduos correspondentes à proteína 14-3-3ζ), as hélices H3, H5, H7 e H9 pertencentes ao *groove* de ligação também parecem ser conservadas entre isoformas, e tal como esperado a região C-terminal e N-terminal apresentam diferenças^{45,47}. Podemos ainda ver que as proteínas que são menos idênticas às outras isoformas, são as isoformas 14-3-3ε e 14-3-3σ, resultados apoiados pela Tabela 3.1, onde está mostrado que estas são as proteínas com menor percentagem de identidade em relação às outras isoformas. Dito isto, parece que o facto de as sequências de aminoácidos apresentarem diferenças não estará relacionado com o facto das proteínas 14-3-3 interagirem ou não com a proteína Inc CT006, a isoforma 14-3-3σ faz parte do grupo que tem menor percentagem de identidade com as outras isoformas, mas interage com a Inc CT006.

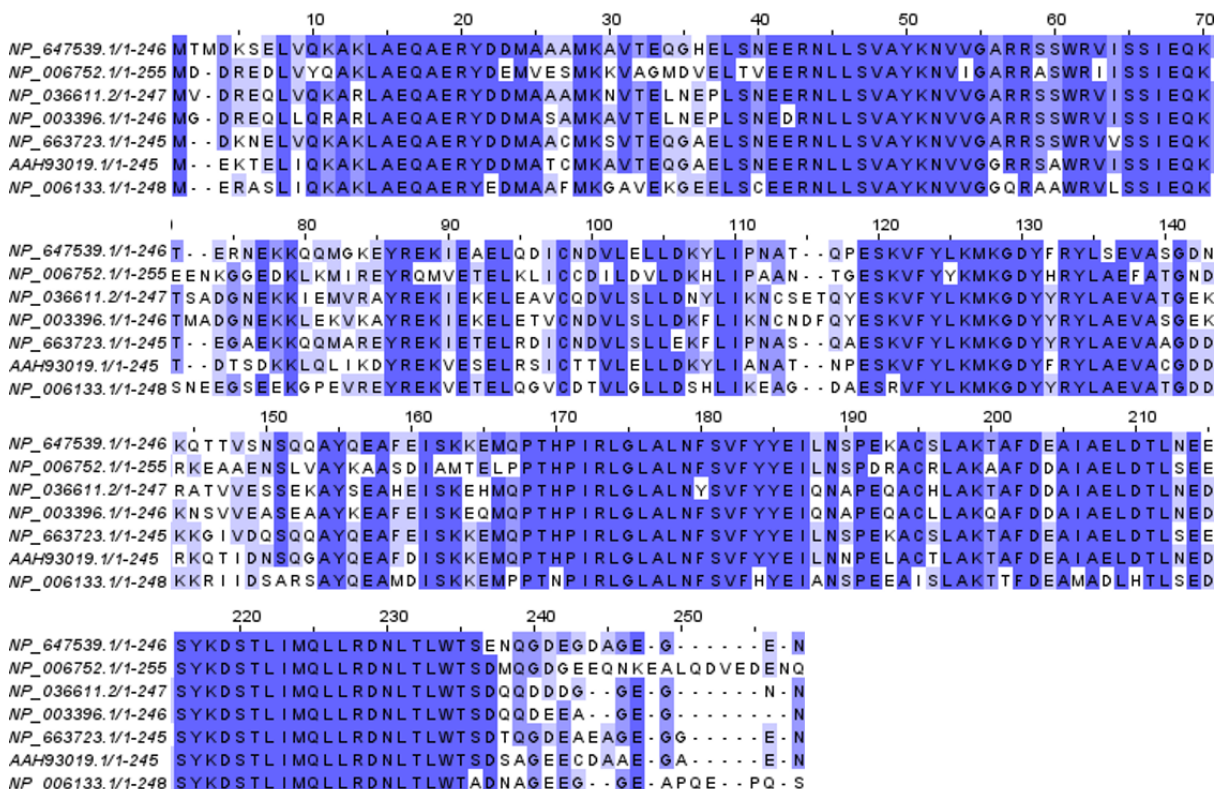


Figura 3.6 - Alinhamento das sequências das proteínas 14-3-3 com percentagem de identidade representada a azul. Com o programa T-Coffee fez-se o alinhamento das sete isoformas 14-3-3. Com o programa JalView colocou-se a percentagem de identidade. A ordem da sequência das proteínas 14-3-3 é: 14-3-3β, 14-3-3ε, 14-3-3γ, 14-3-3η, 14-3-3ζ, 14-3-3τ e 14-3-3σ, respetivamente. Quanto mais escuro o azul maior a percentagem de identidade entre as 7 isoformas, sendo o azul mais escuro quando existe pelo menos 6 aminoácidos iguais.

Tabela 3.1 - Percentagem de identidade entre as proteínas 14-3-3 duas a duas. Alinhamento feito com o programa BLAST.

| 14-3-3 | Épsilon (ϵ) | Gama (γ) | Eta (η) | Zeta (ζ) | Tau (τ) | Beta (β) | Sigma (σ) |
|------------------------|------------------------|-------------------|----------------|------------------|----------------|------------------|--------------------|
| Épsilon (ϵ) | - | 64% | 63% | 69% | 65% | 66% | 60% |
| Gama (γ) | 64% | - | 87% | 74% | 70% | 75% | 65% |
| Eta (η) | 63% | 87% | - | 74% | 71% | 76% | 64% |
| Zeta (ζ) | 69% | 74% | 74% | - | 80% | 88% | 71% |
| Tau (τ) | 65% | 70% | 71% | 80% | - | 82% | 71% |
| Beta (β) | 66% | 75% | 76% | 88% | 82% | - | 69% |
| Sigma (σ) | 60% | 65% | 64% | 71% | 71% | 69% | - |

As proteínas CT006_{S150-152->AAA}, CT006_{S165-167->AAA} e CT006_{S188->A} interagem com a proteína 14-3-3 β apesar de um dos seus potenciais motivos de ligação 14-3-3 estar mutado

As proteínas 14-3-3 ligam-se a fosfoserinas/fosfotreoninas na proteína com a qual interagem e têm três possíveis motivos de ligação aos quais se podem ligar, Modo I:RSX(pS/T)XP, Modo II:RX(F/Y)X(pS)XP e Modo III: penúltimo resíduo de aminoácido na região C-terminal é o resíduo fosforilado⁴⁹. Foi anteriormente descoberto no laboratório, através de ensaios de co-immunoprecipitação, que a região C-terminal da proteína Inc CT006 era necessária e suficiente para a interação entre esta e a proteína 14-3-3 β (Bugalhão e Mota, resultados não publicados).

Após análise da sequência de aminoácidos da proteína Inc CT006 verificou-se que existem duas potenciais sequências (Figura 3.7) que coincidem com dois dos motivos de ligação das 14-3-3, RSXpSXP e o facto do penúltimo aminoácido na região C-terminal ser uma serina, coincidindo ainda que estas duas sequências se encontram na região C-terminal da proteína.

De forma a tentar perceber se estes potenciais motivos de ligação na proteína Inc CT006 estavam envolvidos na interação entre as proteínas construíram-se dois plasmídeos, onde em cada um deles se mutaram estes motivos, substituindo as serinas presentes por alaninas (pois este aminoácido não altera a conformação da cadeia principal nem é um aminoácido reativo⁶⁴). Ou seja, substituiu-se as serinas S165, S166, S167 e S188 por alaninas, dando origem a dois plasmídeos que codificam para as proteínas mEGFP-CT006_{S165-167->AAA} e mEGFP-CT006_{S188->A}. Como nesta região da proteína encontram-se ainda três serinas, construiu-se então também um novo plasmídeo onde as serinas S150, S151, S152 foram substituídas por alaninas dando origem a um plasmídeo que codifica para a proteína mEGFP-CT006_{S150-152->AAA}.

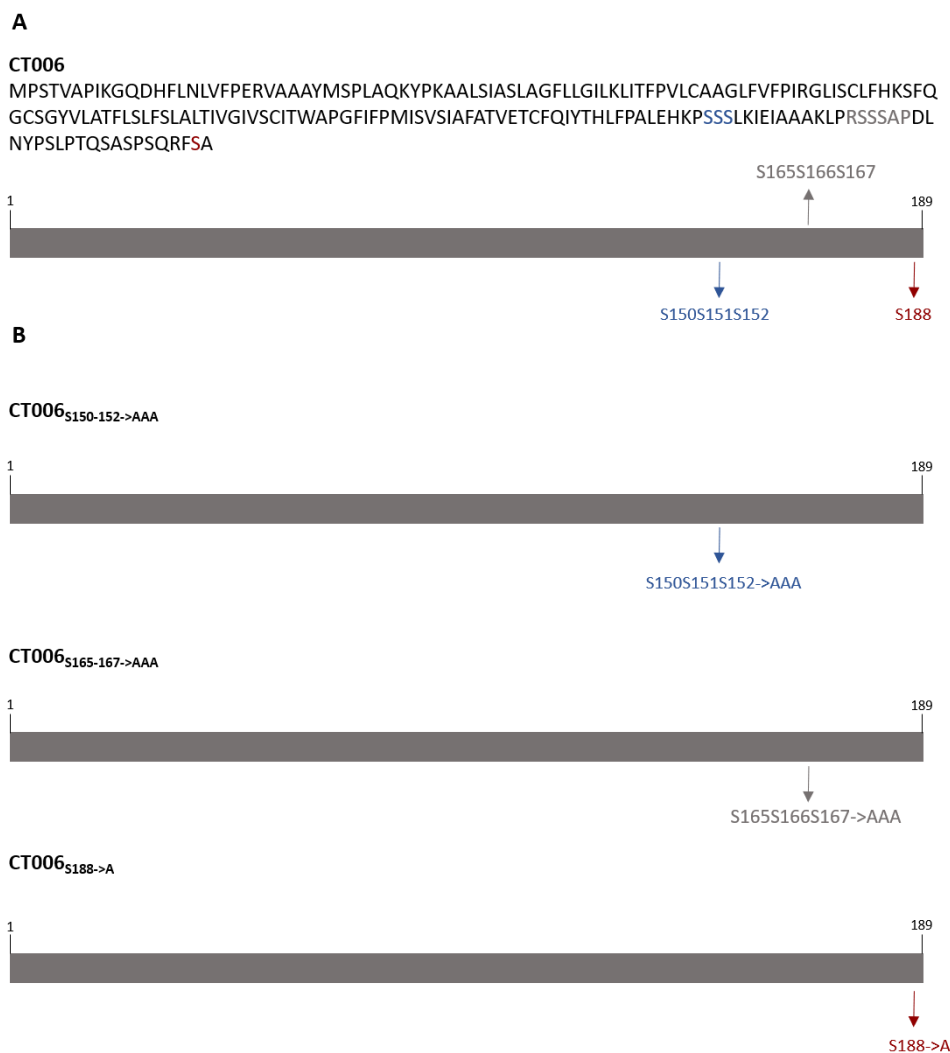


Figura 3.7 - Representações esquemáticas da proteína Inc CT006 com diferentes mutações. (A) Sequência de aminoácidos da proteína CT006 onde estão realçados os potenciais motivos de ligação das proteínas 14-3-3. A cinzento está representado o motivo RSXpSXP (motivo I), a vermelho escuro está representado o motivo III e a azul estão representas as três serinas. Por baixo encontra-se a representação esquemática da proteína com realce nas serinas dos possíveis motivos, destacados anteriormente nas mesmas cores, os quais foram mudados na proteína. **(B)** Representação esquemática das proteínas CT006 com as serinas substituídas por alaninas nos possíveis motivos de ligação 14-3-3, com realce, nas mesmas cores, nestas substituições realizadas. Estas substituições foram feitas por *overlapping* PCR e de seguida o gene que codifica para as mesmas foi clonado no vetor pALT2, dando origem aos plasmídeos pJB117, pJB116 e pJB118 (Tabela 2.1), respetivamente.

Uma vez que estes motivos podem estar envolvidos na interação entre as proteínas 14-3-3 e a proteína Inc CT006, utilizou-se a técnica de co-imunoprecipitação para perceber se a interação se mantinha. Fez-se então um ensaio entre a proteína 14-3-3 β e as novas proteínas CT006 com as serinas substituídas por alaninas. Células HEK293T foram co-transfetadas com os plasmídeos que codificam para as proteínas mEGFP-CT006 mutantes e com o plasmídeo que codifica para a proteína FLAG-HA-14-3-3 β . A proteína 14-3-3 β foi a escolhida para fazer estes ensaios entre todas as sete isoformas pois, como já tinha referido anteriormente, já tinha sido confirmada a sua interação com a região C-terminal da proteína Inc CT006 no laboratório (Bugalhão e Mota, resultados não publicados). Foi ainda utilizado como controlo positivo deste ensaio a interação entre a proteína FLAG-HA-14-3-3 β e a

proteína mEGFP-CT006 e como controlo negativo a ausência de interação entre a proteína mEGFP e FLAG-HA-14-3-3 β .

Como é possível observar na Figura 3.8, a proteína FLAG-HA-14-3-3 β foi detetada em todas as frações *Bound* correspondentes a todas as proteínas CT006 mutantes. Pelo que as proteínas mEGFP-CT006_{S150-152->AAA}, mEGFP-CT006_{S165-167->AAA} e mEGFP-CT006_{S188->A} interagem com a proteína FLAG-HA-14-3-3 β . Este ensaio já tinha sido realizado anteriormente servindo assim como ensaio de confirmação (Bugalhão e Mota, resultados não publicados).

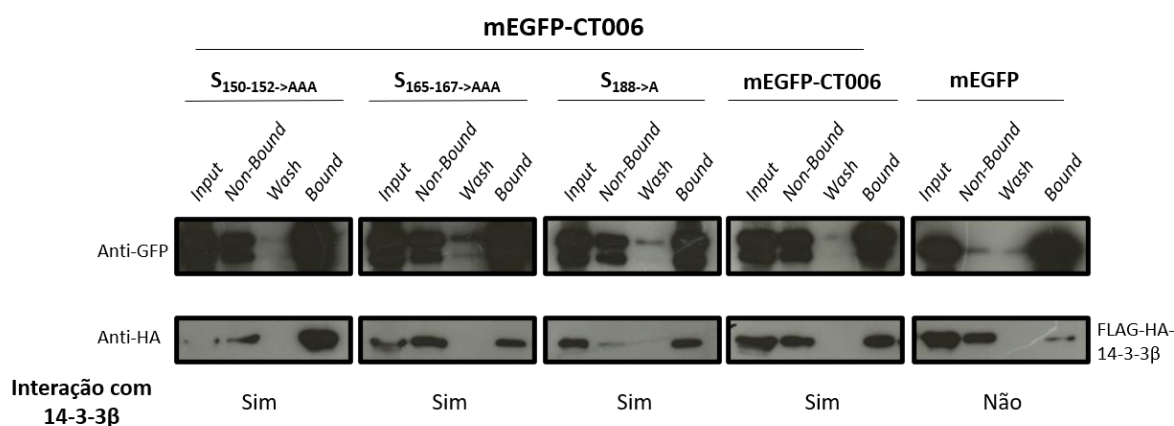


Figura 3.8 - Análise da interação, através de ensaios de co-imunoprecipitação, entre a proteína 14-3-3 β e as proteínas CT006 com mutações nos motivos de ligação das proteínas 14-3-3 após expressão ectópica em células HEK293T. As células HEK293T foram co-transfetadas em diferentes combinações com os plasmídeos que codificam para mEGFP, mEGFP-CT006 ou mEGFP-CT006 com as mutações indicadas na figura e com o plasmídeo que codifica para a proteína FLAG-HA-14-3-3 β . Após 24 h, as células foram lisadas e incubadas com GFP *trap beads* (ChromoTek). As amostras *Input*, *Non-Bound*, *Wash* e *Bound* foram analisadas por *immunoblotting* utilizando os anticorpos anti-HA e anti-GFP para a deteção das proteínas. A combinação FLAG-HA-14-3-3 β e mEGFP foi utilizada como controlo negativo e a combinação FLAG-HA-14-3-3 β e mEGFP-CT006 como controlo positivo. O marcador de pesos moleculares utilizado foi NZYBlue Protein Marker. A massa molecular da proteína mEGFP, mEGFP-CT006, mEGFP-CT006_{S150-152->AAA}, mEGFP-CT006_{S165-167->AAA}, mEGFP-CT006_{S188->A} e FLAG-HA-14-3-3 β é 26,9 kDa, 47,4 kDa, 47,3 kDa, 47,3 kDa, 47,3 kDa, 30,6 kDa, respetivamente. Este ensaio foi realizado apenas uma vez, mas já tinha sido realizado anteriormente (Bugalhão e Mota, resultados não publicados). Está representada a conclusão da interação entre a proteína 14-3-3 β e as proteínas mEGFP-CT006 mutantes.

Apesar da proteína Inc CT006 ter os potenciais motivos de ligação mutados parece continuar a interagir com a proteína 14-3-3 β . Supusemos então duas hipóteses: estes motivos não estão diretamente envolvidos na interação entre as duas proteínas ou como na sequência da proteína continua a existir mais do que um potencial motivo de ligação, pois apenas se mudou um deles, pode existir alguma compensação e outro motivo interagir.

De forma a esclarecer esta questão construíram-se quatro novos plasmídeos, onde as mutações mostradas anteriormente, estavam presentes duas a duas na sequência da proteína Inc CT006 e um dos plasmídeos tinha presente as três mutações. Foram então realizadas as mutações seguintes: S150, S151, S152 e S165, S166, S167 foram substituídas por alaninas, S165, S166, S167 e S188

foram substituídas por alaninas, S150, S151, S152 e S188 foram substituídas por alaninas e S150, S151, S152, S165, S166, S167 e S188 foram substituídas por alaninas, dando origem a plasmídeos que codificam para as proteínas mEGFP-CT006_{S150-152, S165-167->As}, mEGFP-CT006_{S165-167, S188->As}, mEGFP-CT006_{S150-152, S188->As} e mEGFP-CT006_{S150-152, S165-167, S188->As}, respetivamente (Figura 3.9).

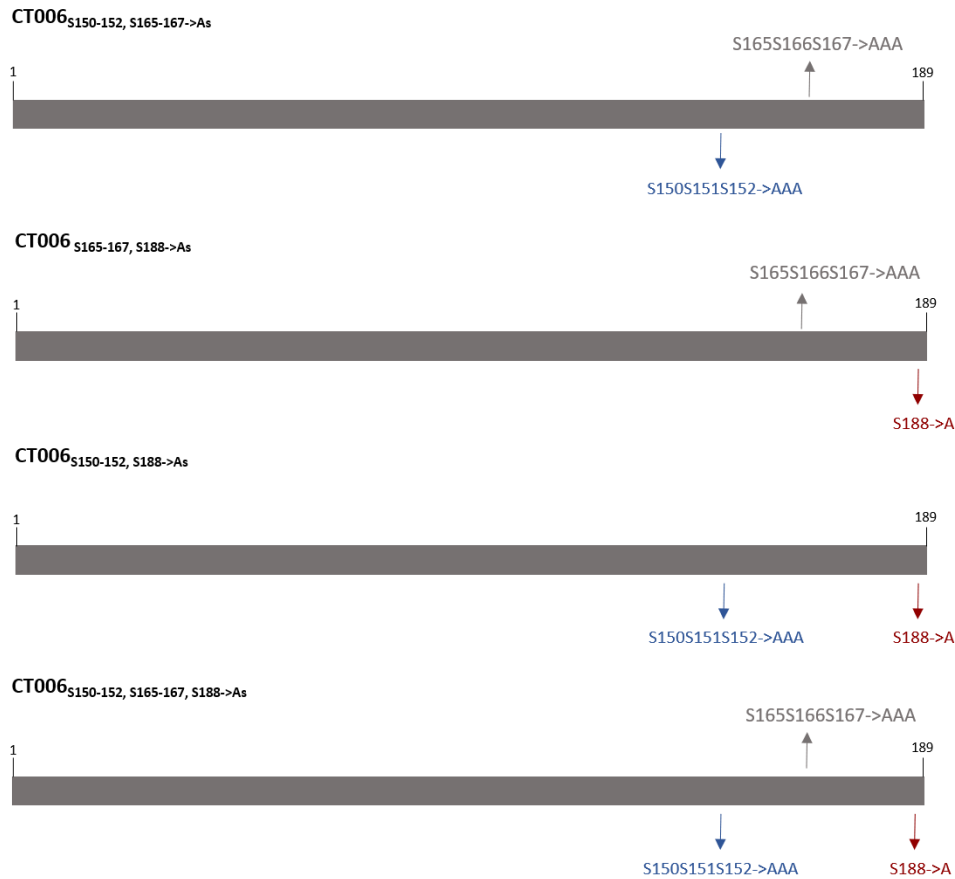


Figura 3.9 - Representação esquemática das proteínas CT006 com mutações nos potenciais motivos de ligação das 14-3-3. Proteínas CT006_{S150-152, S165-167->As}, CT006_{S165-167, S188->As}, CT006_{S150-152, S188->As} e CT006_{S150-152, S165-167, S188->As}, respetivamente, com realce nas serinas dos possíveis motivos de ligação 14-3-3 que foram substituídas por alaninas. Estas substituições foram feitas por *overlapping* PCR e de seguida cada gene que codifica para estas proteínas mutadas foi clonado no vetor pALT2, dando origem aos plasmídeos pCB8, pCB9, pCB7 e pCB10 (Tabela 2.1), respetivamente.

As proteínas CT006_{S150-152, S165-167->As}, CT006_{S165-167, S188->As}, CT006_{S150-152, S188->As} e CT006_{S150-152, S165-167, S188->As} são expressas ectopicamente em células de mamífero

De forma a testar se as proteínas Inc CT006 mutantes eram expressas ectopicamente em células HeLa 229, as células foram transfetadas com os plasmídeos que codificam para as proteínas mEGFP-CT006, com as mutações referidas anteriormente nos motivos de ligação, e analisadas por *immunoblotting*.

Na Figura 3.10 é possível observar que todas proteínas mEGFP-CT006_{S150-152, S165-167->As} (47,3 kDa), mEGFP-CT006_{S165-167, S188->As} (47,3 kDa), mEGFP-CT006_{S150-152, S188->As} (47,3 kDa) e mEGFP-CT006_{S150-152, S165-167, S188->As} (47,3 kDa) estão a ser produzidas de acordo com a sua massa molecular prevista.

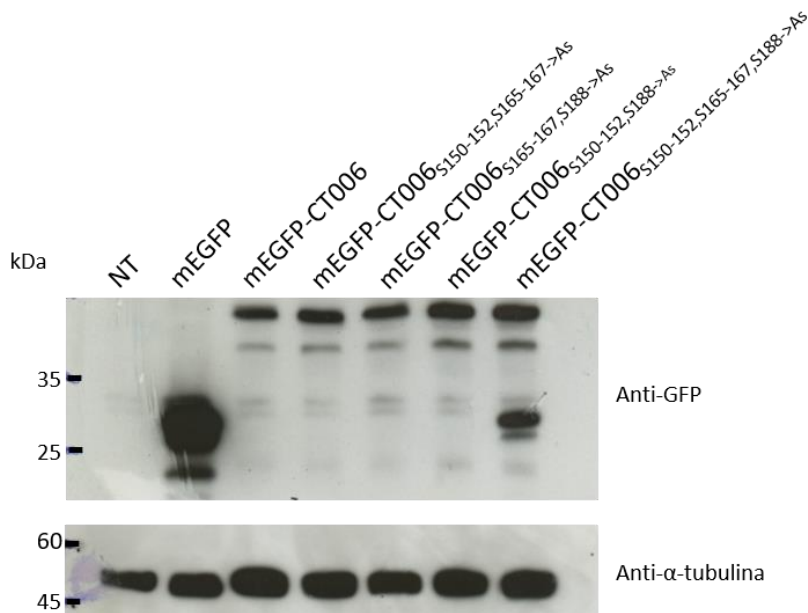


Figura 3.10 - Análise da expressão ectópica das proteínas Inc CT006 mutantes em células HeLa 229. As células foram transfetadas com os plasmídeos que codificam para as proteínas mEGFP-CT006 com as mutações indicadas na figura, nos potenciais motivos de ligação 14-3-3 e após 24 h procedeu-se à análise por *immunoblotting*. Os anticorpos anti-GFP e anti- α -tubulina foram utilizados para deteção das proteínas e o marcador de pesos moleculares utilizado foi NZYBlue Protein Marker. As proteínas estão todas a ser produzidas de acordo com a sua massa molecular prevista.

A fração NT corresponde às células não transfetadas servindo como controlo negativo. As frações mEGFP e mEGFP-CT006 servem como controlo positivo. A massa molecular das proteínas mEGFP, mEGFP-CT006, mEGFP-CT006_{S150-152, S165-167->As}, mEGFP-CT006_{S165-167, S188->As}, mEGFP-CT006_{S150-152, S188->As} e mEGFP-CT006_{S150-152, S165-167, S188->As} é 26,9 kDa, 47,4 kDa, 47,3 kDa, 47,3 kDa, 47,3 kDa e 47,3 kDa, respetivamente.

As proteínas CT006_{S150-152, S165-167->As}, CT006_{S165-167, S188->As} e CT006_{S150-152, S188->As} interagem com a proteína 14-3-3 β apesar de dois dos seus potenciais motivos de ligação 14-3-3 estarem mutados

Depois da expressão ser confirmada pudemos finalmente testar a interação entre estas novas proteínas Inc CT006 e a proteína 14-3-3 β . Foi utilizada a técnica de co-immunoprecipitação para testar esta interação. Células HEK293T foram co-transfetadas com os plasmídeos que codificam para as proteínas mEGFP-CT006 mutantes e com o plasmídeo que codifica para a proteína FLAG-HA-14-3-3 β . A proteína 14-3-3 β foi mais uma vez utilizada para estes ensaios, uma vez que a sua interação com a região C-terminal da Inc CT006 já tinha sido validada anteriormente (Bugalhão e Mota, resultados não publicado). Foi ainda utilizado como controlo positivo deste ensaio a interação entre a proteína FLAG-HA-14-3-3 β e a proteína mEGFP-CT006 e como controlo negativo a ausência de interação entre a proteína mEGFP e FLAG-HA-14-3-3 β .

Na Figura 3.11 podemos observar a presença de banda correspondente à proteína FLAG-HA-14-3-3β na fração *Bound* correspondente às proteínas mEGFP-CT006_{S150-152,S165-167->As}, mEGFP-CT006_{S165-167,S188->As} e mEGFP-CT006_{S150-152,S188->As}, o que significa que estas proteínas continuam a conseguir interagir com a proteína FLAG-HA-14-3-3β. Apesar de se ter detetado a proteína FLAG-HA-14-3-3β na fração *Input* correspondente à proteína mEGFP-CT006_{S150-152, S165-167, S188->As}, significando que estava presente na amostra inicial, esta não é detetada na fração *Bound*, logo indica que provavelmente esta proteína não interage com a proteína FLAG-HA-14-3-3β. Os ensaios para as proteínas CT006_{S150-152, S165-167->As} e CT006_{S150-152, S165-167, S188->As} apenas foram realizados uma vez, precisando assim de confirmação.

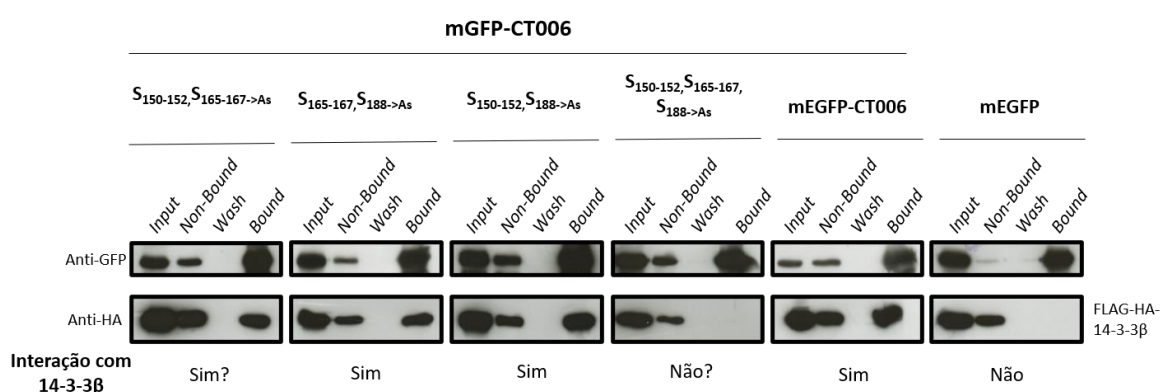


Figura 3.11 - Análise da interação, através de ensaios de co-immunoprecipitação, entre a proteína 14-3-3β e as proteínas Inc CT006 com mutações nos potenciais motivos de ligação das proteínas 14-3-3 após expressão ectópica em células HEK293T. As células HEK293T foram co-transfetadas em diferentes combinações com os plasmídeos que codificam para mEGFP, mEGFP-CT006 ou mEGFP-CT006 com as mutações indicadas na figura e com o plasmídeo que codifica para a proteína FLAG-HA-14-3-3β. Após 24 h, as células foram lisadas e incubadas com GFP *trap beads* (ChromoTek). As amostras *Input*, *Non-Bound*, *Wash* e *Bound* foram analisadas por *immunoblotting* utilizando os anticorpos anti-HA e anti-GFP para a deteção das proteínas. A combinação FLAG-HA-14-3-3β e mEGFP foi utilizada como controlo negativo e a combinação FLAG-HA-14-3-3β e mEGFP-CT006 como controlo positivo. O marcador de pesos moleculares utilizado foi NZYBlue Protein Marker. A massa molecular da proteína mEGFP, mEGFP-CT006, mEGFP-CT006_{S150-152,S165-167->As}, mEGFP-CT006_{S165-167,S188->As}, mEGFP-CT006_{S150-152,S188->As} e mEGFP-CT006_{S150-152,S165-167,S188->As} e FLAG-HA-14-3-3β é 26,9 kDa, 47,4 kDa, 47,3kDa , 47,3 kDa , 47,3 kDa, 47,3 kDa e 30,6 kDa, respetivamente. Para cada proteína foram realizados pelo menos dois ensaios com exceção das proteínas CT006_{S150-152, S165-167->As} e CT006_{S150-152, S165-167,S188->As}, onde apenas foi realizado uma vez e por isso estes resultados precisam de ser confirmados. Está representada a conclusão da interação entre a proteína 14-3-3β e as proteínas CT006 mutantes. ? : Resultados precisam de ser confirmados

Em resumo, se as proteínas continuam a interagir pode significar que estes motivos de ligação não estão envolvidos diretamente na interação entre as proteínas 14-3-3 e a proteína Inc CT006. Se os resultados para a proteína com os três potenciais motivos de ligação mutados se vierem a confirmar pode querer dizer que, para a interação apenas é necessário um dos motivos apresentados anteriormente.

Construção de plasmídeos que codificam para as proteínas FLAG-HA-14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎ e FLAG-HA-14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎

De forma a tentar identificar qual seria a região importante para a interação entre a proteína 14-3-3 β e a proteína Inc CT006, construiu-se dois novos plasmídeos que codificavam cada um para aproximadamente metade da proteína 14-3-3 β . Após análise da estrutura secundária da proteína (Figura 3.12), destacavam-se nove hélices α (Uniprot P31946) e dois aminoácidos que ligam a fosfoserinas nas proteínas alvo (Uniprot P31946). Para deixar estes aminoácidos juntos na mesma região, pois podem estar envolvidos na interação, e tentar cortar entre hélices, tentando que a estrutura secundária da proteína fique o menos prejudicada possível, a proteína foi dividida da seguinte forma: um plasmídeo codifica para a proteína 14-3-3 β do aminoácido 1 ao 134 (14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎) e o segundo plasmídeo codifica para a proteína 14-3-3 β do aminoácido 135 ao 246 (14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎), ambas acopladas a FLAG-HA (Figura 3.12).

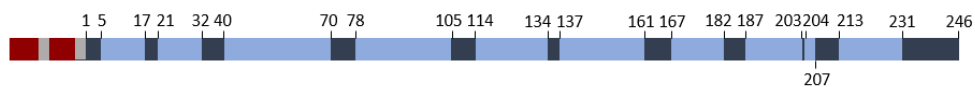
A

14-3-3 β

MTMDKSELVQKAKLAEQAERYDDMAAAMKAVTEQGHLSNEERNLLSVAYKNVVGAR**R**SSWRVISSIEQKTERNEKK
 QQMGKEYREKIEAELQDICNDVLELLDKYLIPNATQPESKVFYLMKMGDY**F**RYLSEV**A**SGDNKQTTVSNSQQAYQEAFEI
 SKKEMQPPTHPIRLGLALNFSVFYIEILNSPEKACSLAKTAFDEAIAELDTLNEESYKDSTLIMQLLRDNLTLWTSENQGDE
 GDAGEGEN

B

FLAG-HA-14-3-3 β



C

FLAG-HA-14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎



FLAG-HA-14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎



Figura 3.12 - Representação esquemática da proteína 14-3-3 β e das suas regiões. (A) Sequência de aminoácidos da proteína 14-3-3 β , com realce a vermelho nos aminoácidos que interagem com fosfoserinas nas proteínas alvo (Uniprot P31946) e realce a azul nos aminoácidos entre quais a proteína 14-3-3 β foi dividida em duas regiões. **(B)** Representação esquemática da proteína FLAG-HA-14-3-3 β com as suas 9 hélices α representadas a azul claro (Uniprot P31946). A vermelho escuro estão representadas as tags FLAG e HA, respetivamente. Os números indicam os resíduos de aminoácidos. **(C)** Representação esquemática das proteínas FLAG-HA-14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎ e FLAG-HA-14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎. A azul claro estão representadas as hélices α e a vermelho escuro as tags FLAG e HA, respetivamente. A proteína 14-3-3 β foi cortada entre hélices de forma prejudicar o menos possível a estrutura da proteína e mantendo os dois aminoácidos que interagem com fosfoserinas na mesma região. Os genes que codificam para as proteínas foram clonados no vetor pcDNA3-FLAG-HA, criando os plasmídeos pCB5 e pCB6 (Tabela 2.1), respetivamente.

As proteínas 14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎ e 14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎ apresentam uma localização citoplasmática em células HeLa 229

Como está mostrado na Figura 3.2, a proteína 14-3-3 β apresenta uma localização citoplasmática. É importante perceber se com a proteína dividida em regiões esta continua a manter a sua localização citoplasmática. Para analisar a localização intracelular das proteínas 14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎ e 14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎ em células de mamífero, células HeLa 229 foram transfetadas com os plasmídeos que codificam para estas proteínas acopladas a FLAG-HA e analisadas por imunofluorescência utilizando o anticorpo anti-HA.

Tal como ilustrado na Figura 3.13, pudemos notar que ambas as proteínas continuam dispersas na célula pelo que mantêm a sua localização celular apesar de truncadas. Estas proteínas têm assim uma localização citoplasmática e por comparação com a proteína FLAG-HA-14-3-3 β parece que a divisão da proteína não altera a sua localização intracelular.

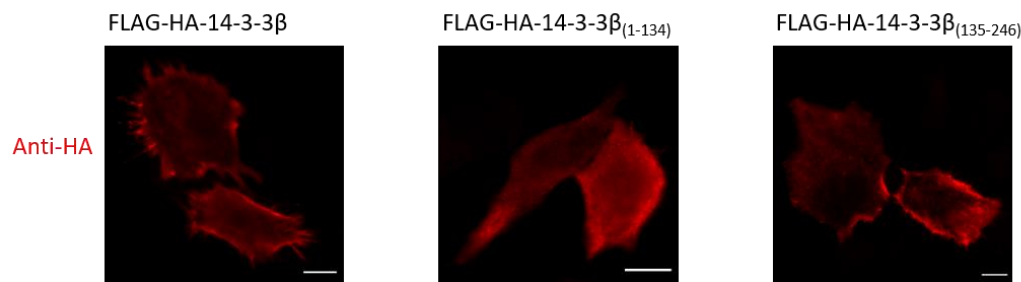


Figura 3.13 - Análise da localização intracelular das proteínas 14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎ e 14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎ quando expressas ectopicamente em células HeLa 229. Estas proteínas apresentam uma localização citoplasmática. As células HeLa 229 foram transfetadas com os plasmídeos que codificam para as proteínas indicadas e após 24 h foram fixadas com 4% (p/v) paraformaldeído. Posteriormente foram marcadas, para serem analisadas por microscopia de fluorescência, com o anticorpo anti-HA e com um anticorpo secundário apropriado conjugado a um fluoróforo vermelho. Barra de escala, 10 μ m.

As proteínas 14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎ e 14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎ são recrutadas para a periferia da membrana de inclusão após 24 h de infeção com *C. trachomatis*

Na Figura 3.3 está ilustrado que a proteína 14-3-3 β é recrutada para a periferia da membrana de inclusão 24 h após a infeção por *C. trachomatis*. Para perceber se as proteínas 14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎ e 14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎ também são recrutadas para a periferia da membrana de inclusão, tal como a proteína 14-3-3 β , células HeLa 229 foram infetadas com *C. trachomatis* e transfetadas com os plasmídeos que codificam para as proteínas FLAG-HA-14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎ e FLAG-HA-14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎. 24 horas após a infeção as células foram fixadas e de seguida analisadas por imunofluorescência utilizando o anticorpo anti-HA para a deteção das 14-3-3 e o anticorpo anti-MOMP para a deteção das bactérias no interior da inclusão.

Foi observado que, tal como a proteína FLAG-HA-14-3-3 β , estas proteínas (FLAG-HA-14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎ e FLAG-HA-14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎) mantêm parcialmente a sua localização citoplasmática mas passa a existir uma acumulação à volta da inclusão, o que significa que estas proteínas são também recrutadas para a membrana de inclusão.

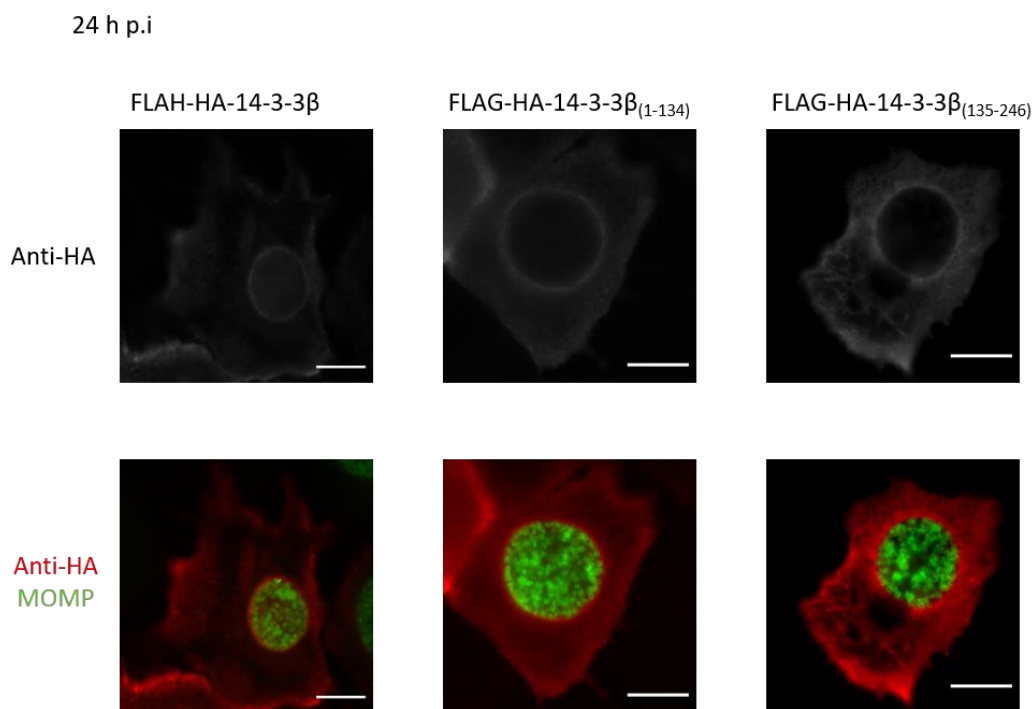


Figura 3.14 - Análise do recrutamento para a periferia da membrana de inclusão das proteínas 14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎ e 14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎ após 24 h de infeção com *C. trachomatis*. Após 24 h de infeção as proteínas indicadas são recrutadas para a periferia da membrana de inclusão. As células HeLa 229 foram infetadas com *C. trachomatis* L2/434 e transfetadas com os plasmídeos que codificam para as proteínas FLAG-HA-14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎ e FLAG-HA-14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎. Após 24 h as células foram fixadas com 4% (p/v) paraformaldeído e marcadas com os anticorpos anti-HA e anti-MOMP e com anticorpos secundários apropriados conjugados a fluoróforos vermelhos ou verdes, respetivamente. As células foram analisadas por microscopia de fluorescência. h p.i: horas pós-infeção. Barra de escala, 10 μ m

As proteínas 14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎ e 14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎ são expressas ectopicamente em células HEK293T

Para testar se as proteínas FLAG-HA-14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎ e FLAG-HA-14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎ são produzidas quando expressas ectopicamente em células de mamífero, células HeLa 229 foram transfetadas com os plasmídeos que codificam para estas seguindo-se uma análise por *immunoblotting*. Como ilustrado na Figura 3.15A, apenas foi possível observar a expressão da proteína FLAG-HA-14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎, de acordo com a sua massa molecular prevista. Uma vez que a proteína FLAG-HA-14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎ parece ser menos produzida que a proteína FLAG-HA-14-3-3 β intacta e que foi possível detetar a produção da proteína FLAG-HA-14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎ por microscopia de fluorescência (Figura 3.13), tentou expressar-se ambas proteínas em células HEK293T. Nestas células a eficiência de transfeção é normalmente maior do que nas células HeLa 229. Sendo assim, células HEK293T foram transfetadas com os

plasmídeos que codificam para as proteínas FLAG-HA-14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎ e FLAG-HA-14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎ e de seguida realizada uma análise por *immunoblotting*.

Tal como ilustrado na Figura 3.15B, ambas as proteínas (FLAG-HA-14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎(18,3 kDa) e FLAG-HA-14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎(15,3 kDa)) foram produzidas de acordo com a sua massa molecular prevista. Tal como previsto, a proteína FLAG-HA-14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎ parece ser produzida em menos quantidade (Figura 3.15).

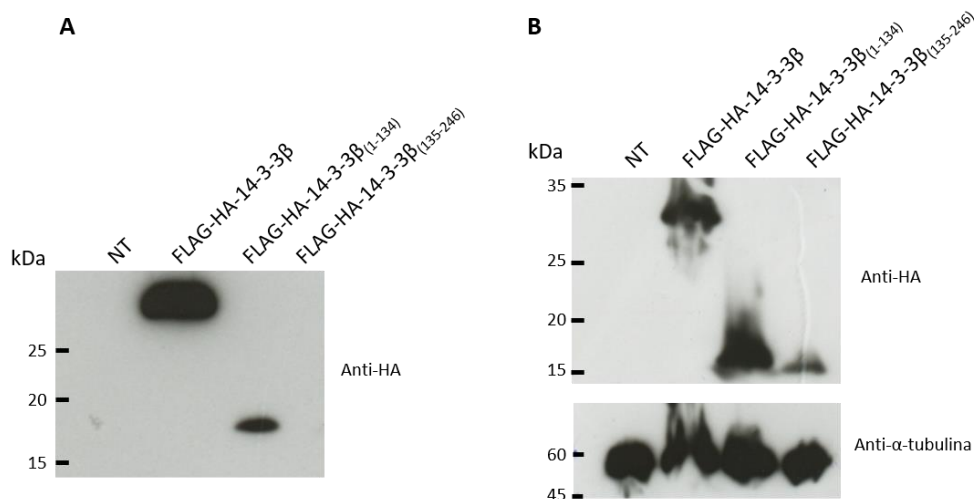


Figura 3.15 - Análise da expressão ectópica das proteínas 14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎ e 14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎ em células HeLa 229 e HEK293T. As células foram transfectadas com os plasmídeos que codificam para as proteínas indicadas na figura e após 24 h procedeu-se à análise por *immunoblotting*. Os anticorpos anti-HA e anti- α -tubulina foram utilizados para deteção das proteínas e o marcador de pesos moleculares utilizado foi NZYblue Protein Marker. **(A)** A proteína 14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎ está a ser produzida de acordo com a sua massa molecular prevista mas não é possível observar a proteína 14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎. **(B)** Ambas as proteínas estão a ser produzidas, em células HEK293T, de acordo com a sua massa molecular prevista.

A fração NT corresponde às células não transfectadas servindo como controlo negativo. A fração FLAG-HA-14-3-3 β serve como controlo positivo pois a sua expressão já tinha sido mostrada anteriormente. A massa molecular da proteína FLAG-HA-14-3-3 β , FLAG-HA-14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎ e FLAG-HA-14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎ é 30,6 kDa, 18,3 kDa e 15,3 kDa, respetivamente.

As proteínas 14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎ e 14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎ não interagem com a proteína Inc CT006

Para compreender qual das regiões da proteína 14-3-3 β seria necessária para a interação com a proteína Inc CT006, foi realizado um ensaio de co-immunoprecipitação para testar a interação entre as proteínas 14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎ e 14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎ e a proteína Inc CT006. Foram co-transfectadas células HEK293T com os plasmídeos que codificam para as proteínas FLAG-HA-14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎ e FLAG-HA-14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎ e com o plasmídeo que codifica para mEGFP (controlo negativo) ou mEGFP-CT006. A combinação FLAG-HA-14-3-3 β e mEGFP foi utilizada como controlo negativo do ensaio e a combinação FLAG-HA-14-3-3 β e mEGFP-CT006 como controlo positivo, pois estas interações já tinham sido validadas anteriormente (Bugalhão e Mota, resultados não publicados).

O facto das proteínas FLAG-HA-14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎ e FLAG-HA-14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎ não terem sido detetadas na fração *Bound* e apenas na fração *Input* significa que estas proteínas estavam na amostra inicial mas não conseguem interagir com a proteína Inc CT006. Visto que a proteína 14-3-3 β interage com a proteína Inc CT006, significa que provavelmente com o corte, a proteína perde o fator que a faz interagir com a proteína Inc CT006. O ensaio apenas foi realizado uma vez para cada proteína, portanto estes resultados precisam de ser confirmados.

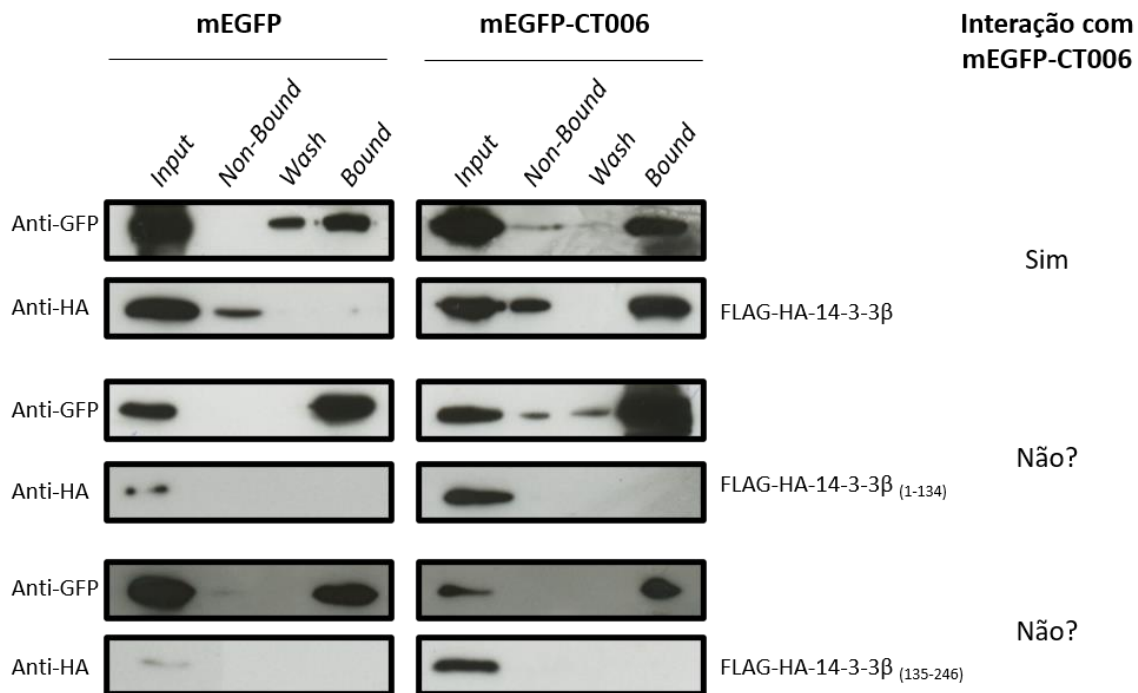


Figura 3.16 - Análise da interação, através de ensaios de co-immunoprecipitação, entre as proteínas 14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎, 14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎ e a proteína Inc CT006 após expressão ectópica em células HEK293T. As células HEK293T foram co-transfetadas em diferentes combinações com os plasmídeos que codificam para mEGFP ou mEGFP-CT006 e com os plasmídeos que codificam para as proteínas FLAG-HA-14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎ FLAG-HA-14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎. Após 24 h, as células foram lisadas e incubadas com GFP *trap beads* (ChromoTek). As amostras *Input*, *Non-Bound*, *Wash* e *Bound* foram analisadas por *immunoblotting* utilizando os anticorpos anti-HA e anti-GFP para a deteção das proteínas. O marcador de pesos moleculares utilizado foi NZYBlue Protein Marker. A massa molecular da proteína mEGFP, mEGFP-CT006, FLAG-HA-14-3-3 β , FLAG-HA-14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎ e FLAG-HA-14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎ é 26,9 kDa, 47,4 kDa, 30,6 kDa, 18,3 kDa e 15,3 kDa, respetivamente. Cada ensaio foi realizado apenas uma vez para cada proteína, portanto estes resultados precisam de ser confirmados. Está representada a conclusão da interação entre as proteínas 14-3-3 β truncadas e a proteína CT006. ?: Resultados precisam de ser confirmados

4. Discussão e Conclusão

As 14-3-3 são uma família de proteínas altamente conservadas, expressas em todas as células eucarióticas, que regulam vários processos biológicos⁴⁵. A proteína 14-3-3 β foi a primeira proteína hospedeira descoberta a interagir com uma proteína Inc (IncG) e a ser recrutada para a periferia da membrana de inclusão de *C. trachomatis*⁸. Ao descobrir-se que a proteína 14-3-3 β interagia com IncG revelou-se também, através de imunofluorescência, que esta proteína apenas era recrutada para a periferia da membrana de inclusão em espécies de *Chlamydia* que expressavam IncG, o que provavelmente relaciona o recrutamento das 14-3-3 com esta proteína⁸. Mais recentemente, através de estudos de imunoprecipitação com InaC, seguida de espectrometria de massa, descobriu-se que as proteínas 14-3-3 interagem com InaC⁴⁰. Isto foi validado para as proteínas 14-3-3 β e 14-3-3 ϵ por co-imunoprecipitação⁴⁰. Posteriormente, analisou-se se InaC mediava o recrutamento das 14-3-3 através da sua localização em células infetadas com *C. trachomatis* ou estirpes mutantes de InaC. Como as proteínas 14-3-3 ϵ/β se encontram na periferia membrana de inclusão na estirpe selvagem, o que não se verifica numa estirpe mutante que não expressa InaC e é mais evidente numa estirpe em que InaC é sobre-expresso, concluiu-se que InaC pode mediar e ser necessário para o recrutamento destas proteínas para a periferia da membrana de inclusão⁴⁰. Aliando isto ao facto de ter sido descoberta através de um *screen* proteómico, onde se usou AP-MS (*affinity purification-mass spectrometry*) para identificar interações proteína-proteína entre Incs e proteínas humanas, a interação entre as proteínas 14-3-3 $\beta/\eta/\gamma$ e a Inc CT006⁹, uma proteína Inc de função desconhecida, é muito relevante continuar o estudo destas proteínas.

Neste trabalho o objetivo consistiu em analisar a interação entre as proteínas eucarióticas 14-3-3 e a proteína Inc CT006 de *C. trachomatis*. Primeiramente analisou-se se as proteínas 14-3-3 eram recrutadas para a periferia da membrana de inclusão de *C. trachomatis*, depois realizaram-se ensaios de co-imunoprecipitação, de forma a perceber se as proteínas 14-3-3 interagem com a proteína Inc CT006; por fim, analisou-se as sequências das proteínas para tentar encontrar motivos/aminoácidos que estejam envolvidos na interação.

Em células HeLa 229 infetadas com *C. trachomatis* todas as sete isoformas das proteínas 14-3-3 foram recrutadas para a periferia da membrana de inclusão. Esta observação já tinha sido descrita para a proteína 14-3-3 β ⁸ e para a proteína 14-3-3 ϵ ⁴⁰. Isto foi então confirmado neste trabalho, onde também se revelou que as restantes isoformas são recrutadas para a periferia da inclusão. Percebeu-se ainda que as proteínas 14-3-3 começam a ser recrutadas para a membrana de inclusão entre as 8 h e 16 h após infeção. Apesar de todas as proteínas 14-3-3 serem recrutadas para a periferia da membrana de inclusão nem todas parecem interagir com a proteína Inc CT006 (tal como discutido de seguida), logo é possível que este recrutamento seja independente da proteína Inc CT006. Como teste de confirmação era necessário ter uma estirpe de *C. trachomatis* que não expresse a Inc CT006 e analisar novamente o recrutamento em células infetadas com esta estirpe mutante.

Em termos de interação entre a Inc CT006 e as proteínas 14-3-3, neste trabalho observou-se a interação das isoformas 14-3-3 $\gamma/\eta/\beta/\sigma$ com a Inc CT006. Isto está de acordo com estudos anteriores⁹, com o acréscimo da interação com a isoforma σ . Por outro lado, as isoformas 14-3-3 ζ , 14-3-3 τ e 14-3-3 ϵ não interagiram com a Inc CT006 nos ensaios realizados.

É claro que as isoformas 14-3-3 podem ligar-se a outras proteínas com afinidades diferentes⁶⁵, o que explica que algumas isoformas possam interagir com a proteína Inc CT006, e outras não. Por exemplo, a proteína A20 liga-se preferencialmente à proteína 14-3-3 η , tem afinidade intermédia para a isoforma ϵ e mostrou muito pouca afinidade para as isoformas β , ζ e γ ⁶⁶; noutro exemplo, a fosfatase CDC25B apresenta interação mais forte com as isoformas ζ , β e η , baixa afinidade para a isoforma γ e interação praticamente inexistente com a isoforma ϵ ⁶⁷;

De forma a tentar perceber porque algumas 14-3-3 interagem com a Inc CT006 e outras não, fez-se um alinhamento das sequências de todas as isoformas 14-3-3. Contudo, não parece haver uma relação óbvia entre as sequências de aminoácidos das proteínas 14-3-3 e a sua capacidade de interagir com a Inc CT006. Por exemplo, as isoformas ϵ e σ são as menos idênticas entre todas e a isoforma σ interage com a Inc CT006 e a ϵ não.

Uma possível explicação alternativa para a interação diferencial das proteínas 14-3-3 com a Inc CT006 são modificações pós-traducionais que existem nas proteínas 14-3-3, que podem regular a sua função, a interação com outras proteínas ou a especificidade de dimerização entre isoformas. Algumas destas modificações podem ser fosforilação, oxidação, acilação ou acetilação e poliglicilação⁴⁶.

No caso da proteína 14-3-3 ϵ , ela poderá não conseguir interagir com a Inc CT006 devido a alguma destas mudanças pós-traducionais. É também possível que algumas diferenças na sequência possam ser significativas e não conseguir assim interagir.

A proteína 14-3-3 ζ é fosforilada *in vivo* na serina 58, o que promove a formação de um monómero em vez de um dímero. Os dímeros são normalmente estáveis, no entanto a fosforilação nesta serina pode interromper a ligação e alterar a sua forma, podendo assim desta maneira afetar a ligação a péptidos^{47,68,69}. Esta proteína é também fosforilada, em células HEK293, na treonina que se encontra na posição 232 pela caseína cinase 1⁷⁰. Este aminoácido encontra-se na região C-terminal, que regula a ligação das proteínas 14-3-3 ao ligando⁶⁵. A fosforilação na posição 232 da proteína 14-3-3 ζ afeta a sua ligação a outros péptidos⁷¹ e pode ser esta a razão para não interagir com a proteína Inc CT006. Sabe-se que a proteína fosforilada nesta zona não interage com Raf-1, apenas interage quando não está fosforilada, sugerindo que esta modificação afete negativamente a ligação aos péptidos^{70,71}.

Pensa-se que a região C-terminal das proteínas 14-3-3 ocupe o *groove* de ligação na ausência de uma proteína alvo⁷². Assim, a fosforilação de um resíduo nesta região pode aumentar a afinidade da região C-terminal para o *groove* de ligação, sendo que quando o resíduo 232 está fosforilado pode inibir

competitivamente a ligação ao alvo. No entanto, proteínas que se liguem com muita afinidade podem superar esta inibição⁴⁷.

Dentro de todas as isoformas 14-3-3 só a ζ e τ têm na sua região C-terminal o sítio de fosforilação 232⁷¹, no caso da isoforma τ uma serina, o que pode ser observado no alinhamento de sequências feito neste trabalho⁵¹. Esta fosforilação pode interromper a ligação das 14-3-3 aos ligandos pois altera a conformação da região C-terminal⁶⁹. Sabe-se que a isoforma τ é fosforilada *in vitro* nesta posição e que afeta a sua ligação⁶⁵, sendo talvez por isso que a proteína 14-3-3 τ não apresentou resultados conclusivos. De forma a confirmar se estas proteínas estão fosforiladas nos ensaios realizados, poderíamos fazer a sua imunoprecipitação seguida de análise de *immunoblotting* com um anticorpo específico para fosfoserinas ou fosfotreoninas.

As proteínas 14-3-3 são conhecidas por se ligarem a fosfoserinas/treoninas dentro de certos motivos de ligação.⁴⁵ Dois desses motivos foram encontrados dentro da sequência da proteína Inc CT006 na região C-terminal. Construíram-se então plasmídeos que codificam para proteínas Inc CT006 mutantes, com as serinas destes dois motivos e três serinas que se encontravam nestas regiões substituídas por alaninas.

Fizeram-se então ensaios de co-imunoprecipitação para testar a interação entre as proteínas mEGFP-CT006_{S150-152->AAA}, mEGFP-CT006_{S165-167->AAA} e mEGFP-CT006_{S188->A} com FLAG-HA-14-3-3 β e tentar perceber qual era a região responsável pela interação. Os resultados mostraram que as três proteínas mutantes continuam a interagir com a proteína 14-3-3 β . Estes resultados estão de acordo com resultados não publicados (Bugalhão e Mota). Sendo que propuseram-se duas hipóteses: estes motivos não estão diretamente envolvidos na interação entre as proteínas, ou como existe mais do que um potencial motivo presente na sequência da proteína esta pode conseguir interagir com os motivos disponíveis⁴⁶.

Como ensaios futuros, podiam ser realizados testes de afinidade de forma a perceber se quando a proteína tem as serinas mudadas isso influencia a afinidade da proteína 14-3-3 β para com a Inc CT006. Se esta diminuísse provavelmente quereria dizer que estes potenciais motivos estão envolvidos na interação de alguma maneira, podem não ser o motivo exclusivo ou o único necessário, mas sim conseguem todos ligar-se e quando um não está presente a proteína rearranja-se de forma a continuar a interagir. Esta informação opõe-se ao modo de interação da proteína IncG, outra proteína Inc de *C. trachomatis*, com 14-3-3 β , que tem mais que um motivo de ligação mas ao substituir a fosfoserina presente no motivo principal, as proteínas deixam de interagir⁸.

De forma a esclarecer as dúvidas em relação a estes três potenciais motivos de ligação 14-3-3, construíram-se plasmídeos que codificam para proteínas Inc CT006 mutantes, onde os potenciais motivos de ligação estão mudados em conjunto.

Depois de se confirmar que as proteínas estavam a ser produzidas realizaram-se ensaios de co-precipitação com a proteína FLAG-HA-14-3-3 β . Alguns destes resultados apenas foram realizados uma vez por isso precisam de ser confirmados. As proteínas CT006_{S150-152, S165-167->As}, CT006_{S165-167, S188->As}, CT006_{S150-152, S188->As} parecem interagir na mesma com 14-3-3 β e a CT006_{S150-152, S165-167, S188->As} não. Se estes resultados se confirmarem, quer dizer que os três potenciais motivos de ligação são de facto motivos de ligação e a proteína Inc CT006 só precisa de um deles ativo para conseguir interagir, servindo todos juntos eventualmente para uma maior afinidade entre as proteínas. Poderíamos realizar testes de afinidade no futuro e analisar os valores para a proteína selvagem e para as proteínas mutantes de cada vez, de forma a perceber se cada uma das mutações vai alterando a afinidade da ligação. Poderíamos também realizar testes de fosforilação para perceber se a proteína Inc CT006 é fosforilada e tentar saber quais das serinas presentes nos motivos estão fosforiladas.

Se ao repetir os ensaios se verificar que a proteína Inc CT006 mutada nos três possíveis motivos consegue interagir na mesma, era importante fazer também os testes de fosforilação para a proteína Inc CT006⁸. Se for fosforilada é muito possível que o resíduo fosforilado seja onde se ligam as proteínas 14-3-3 e teríamos de encontrar na sequência que resíduo seria este. Se a proteína não for fosforilada é possível que os motivos responsáveis sejam outros semelhantes aos mostrados na literatura para interação de proteínas 14-3-3 com proteínas não fosforiladas ou um motivo novo. Existem vários casos descritos onde a proteína ligando de 14-3-3 não é fosforilada, como: um terceiro motivo de ligação na proteína Raf-1, um domínio rico em cisteínas⁷³, glicoproteína Iba⁷⁴, ExoS⁷⁵, *Inositol Polyphosphate 5-Phosphatase*⁷⁶, o péptido sintético R18⁴⁵ e p190RhoGEF⁷⁷. A proteína Inc CT006 pode tratar-se de um destes casos. Já foi proposto que aminoácidos com carga negativa podem ser capazes de mimetizar o ambiente dos motivos com fosfoserinas, o que pode explicar proteínas não fosforiladas se ligarem às 14-3-3⁷⁵, sendo uma hipótese para a proteína Inc CT006.

No caso da glicoproteína Iba, a proteína 14-3-3 ζ liga-se numa zona onde existe a presença de serinas a cada 2 ou 3 resíduos (XXXSXXXSXXXSXXS)⁷⁴, chamada de potencial motivo rico em serinas. Na região C-terminal da Inc CT006 existe uma sequência semelhante a este motivo da glicoproteína Iba, onde também existe a presença de várias serinas alternadas com outros resíduos de aminoácidos, com foco na região 174-189 (PSLPTQSASPSQRFS). Como esta sequência é semelhante ao motivo rico em serinas, e este é um potencial motivo de ligação 14-3-3⁷⁴, pode ser um motivo para a Inc CT006 se ligar. Prevê-se assim que um dos motivos presente em proteínas não fosforiladas que se ligam às proteínas 14-3-3 são hélices anfipáticas em *clusters* de serina⁷⁴, que pode ser este o caso. Uma maneira de testar esta hipótese seria construir uma proteína Inc CT006 mutante onde esta região final, onde se encontram as serinas, estaria eliminada e testávamos a interação por co-precipitação e veríamos se é uma zona importante.

Uma questão em aberto é se a proteína Inc CT006 interage diretamente com as proteínas 14-3-3. A técnica de co-precipitação não permite identificar se a interação entre as proteínas é indireta ou direta e pode dar-se o caso das proteínas 14-3-3 e da proteína Inc CT006 interagirem indiretamente,

ou seja, pode existir um intermediário na ligação. No futuro, poderíamos fazer ensaios de *yeast two hybrid* para confirmar se a interação é direta.

Seria ainda interessante testar outras isoformas das 14-3-3 com as proteínas CT006 mutantes, para perceber se existe diferença de ligação entre as isoformas, e perceber se estas se ligam exclusivamente a algum destes motivos. Seria interessante perceber se há alguma diferença, pois tal como umas isoformas parecem interagir e outras não, também pode acontecer interagirem de maneiras diferentes. Poderíamos testar também outra isoforma de 14-3-3 com a proteína IncG e com a proteína IncG mutante incapaz de ligar à proteína 14-3-3 β , pois sabe-se qual o motivo principal de ligação 14-3-3 presente em IncG. Assim perceberíamos se as isoformas das 14-3-3 têm a mesma maneira de atuar com a mesma proteína ou pode existir motivos diferentes para as isoformas diferentes. Seria uma forma de ajudar a compreender melhor como as proteínas 14-3-3 interagem com as proteínas de *C. trachomatis*, de maneira a tentar perceber a sua influência durante o ciclo de infeção.

Continuando o estudo dos motivos relacionados com a interação para a sequência das proteínas 14-3-3, sabe-se que estas proteínas interagem maioritariamente com as proteínas alvo através do seu *groove* de ligação conservado, mas também está reportado que pode ser através do seu C-terminal.⁶⁵

De forma a tentar compreender onde a proteína Inc CT006 se liga às 14-3-3, truncou-se a 14-3-3 β em duas zonas (14-3-3 β ₍₁₋₁₃₄₎ e 14-3-3 β ₍₁₃₅₋₂₄₆₎). Em complemento percebemos que ambas as proteínas truncadas continuam a ser recrutadas para a periferia da membrana de inclusão de *C. trachomatis*. O recrutamento parece então ser independente da sequência estar inteira ou dividida, não parecendo haver uma região específica.

Finalmente testou-se por co-imunoprecipitação a interação das proteínas 14-3-3 truncadas com a proteína CT006. Os resultados precisam de ser confirmados, mas parece que nenhuma das proteínas consegue interagir, fazendo parecer que só o N-terminal ou só o C-terminal não são capazes de interagir com a proteína Inc CT006 sozinhos. Isto sugere que o local de ligação presente na 14-3-3 é o *groove* de ligação conservado como está reportado para a maior parte das proteínas, pois este *groove* precisa de hélices e de aminoácidos tanto do N-terminal como do C-terminal⁷⁸.

Sabe-se que ao interagir com o *groove* as proteínas ligam-se aos resíduos K49, R56, R127 e Y128. O resíduo K120, na parte carregada do *groove*, em conjunto com N173 e N224 estabilizam a conformação do ligando, fazendo parte das hélices H3, H5, H7 e H9 necessárias para o *groove*.⁶⁵ Ao truncar a proteína, provavelmente, a estrutura ficou muito afetada e não interage assim com a proteína Inc CT006⁴⁵. Como forma de confirmação da ligação ser neste *groove*, poderíamos mutar estes aminoácidos no *groove* e testar de novo a interação com a proteína CT006.

Trabalhos em curso no laboratório mostraram que a proteína Inc CT006 tem a capacidade de se associar com gotículas de lípidos (LDs; *Lipid Droplets*) (Bugalhão e Mota, resultados não publicados).

As LDs são organelos citosólicos de armazenamento de lípidos que são importantes para o metabolismo dos mesmos, homeostase energética, sinalização celular e inflamação. *C. trachomatis* induz a acumulação destas gotículas do hospedeiro durante a infecção e pensa-se que servem como fonte de lípidos e energia para a bactéria⁷⁹. Durante a infecção as gotículas de lípidos acumulam-se na periferia da inclusão de *Chlamydia* ou podem ser internalizadas para a inclusão⁸⁰. As proteínas 14-3-3 também podem estar envolvidas no metabolismo e armazenamento dos lípidos^{81,82}. Foram encontradas proteínas 14-3-3 em gotículas de lípidos recolhidas e purificadas de células não infetadas e infetadas com *C. trachomatis*⁸⁰, parecendo existir relação entre as LDs e estas proteínas. As 14-3-3 sendo proteínas regulatórias e envolvidas em vias de sinalização, tal como as gotículas de lípidos, parece ser importante interagir com uma Inc para melhor manipulação do hospedeiro por parte de *C. trachomatis* e parece interessante poder existir uma possível relação entre a interação CT006-14-3-3 e as LDs.

A região N-terminal da proteína Inc CT006 parece ser a envolvida na associação da proteína com as gotículas de lípidos, opondo-se ao facto de que a região que interage com as 14-3-3 é a C-terminal. Ao ser recrutada para a membrana de inclusão a proteína 14-3-3 pode também, de alguma forma, recrutar as gotículas de lípidos e a Inc CT006 pode ligar-se simultaneamente às duas moléculas de forma a manipular o hospedeiro e desta forma permitir a internalização das gotículas de lípidos para dentro da inclusão. Como as proteínas 14-3-3 também atuam de forma a facilitar a interação entre duas proteínas, podem funcionar como um intermediário para a associação CT006-LDs.

Existem várias possibilidades de como as proteínas 14-3-3 podem funcionar durante a infecção com *C. trachomatis*. Em primeiro lugar, como as proteínas 14-3-3 são recrutadas para a membrana de inclusão durante a infecção, grandes quantidades destas proteínas passam a localizar-se nesta zona, o que leva a que os níveis no citoplasma fiquem provavelmente reduzidos, alterando assim, possivelmente, outras interações hospedeiro-14-3-3. Levando assim talvez a alterar as vias de transdução de sinal do hospedeiro. Alternativamente, porque 14-3-3 atua como um dímero, a associação das 14-3-3 com a membrana de inclusão pode trazer um ligando secundário que pode ficar associado à membrana de inclusão e ser importante para a patogénese da *Chlamydia*⁸. Pensa-se ainda que as proteínas 14-3-3, ao estarem localizadas na periferia da membrana de inclusão, podem recrutar proteínas do hospedeiro e assim ajudar na sobrevivência da bactéria, como é o caso da proteína Raf-1 ou da proteína BAD. A proteína Raf-1 fosforilada pensa-se ser recrutada para a inclusão, de uma maneira dependente de Akt por interação direta com 14-3-3 β . Estas interações sugerem que *Chlamydia* inibe a função de Raf-1 ao ser recrutada para a inclusão⁸³. A proteína da célula hospedeira BAD fosforilada também é recrutada para a inclusão por meio de uma interação com 14-3-3 β , que por sua vez interage com IncG, de uma forma dependente de Akt, impedindo a capacidade do restante BAD se translocar para a mitocôndria e induzir a morte da célula hospedeira⁴⁴.

As isoformas 14-3-3 desempenham um papel no transporte vesicular, e como a inclusão de *Chlamydia* demonstrou interromper as vias de transporte vesicular do hospedeiro⁸⁴, é possível que o recrutamento

das 14-3-3 para a inclusão influencie as interações entre a inclusão e as vias de transporte vesicular do hospedeiro.⁸

Contudo, as proteínas 14-3-3 interagem com uma ampla variedade de outras proteínas da célula hospedeira, incluindo moléculas de sinalização, proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular e proteínas cinases. Assim, a função real das proteínas 14-3-3 durante a infecção com *C. trachomatis* ainda é uma questão aberta e importante¹.

Resumindo, como conclusões principais temos o facto das proteínas 14-3-3 apresentarem localização intracelular citosólica, todas as isoformas serem recrutadas para a periferia da membrana de inclusão de *C. trachomatis* de uma maneira que parece ser independente de CT006 e as proteínas 14-3-3 $\gamma/\eta/\beta/\sigma$ interajam com a proteína Inc CT006. Os potenciais motivos de ligação das proteínas 14-3-3 encontrados na sequência da Inc CT006 parecem não ser exclusivos e unicamente necessários. Parece ser apenas necessário um dos motivos presentes estar ativo. A proteína 14-3-3 β parece necessitar de estar intacta e na sua conformação normal para interagir com a Inc CT006, o que dá a ideia de que esta proteína interage com o seu *groove* de ligação conservado, como na maioria das outras proteínas.

Como perspectivas futuras seria desde logo muito importante confirmar a interação entre a Inc CT006 e as proteínas 14-3-3 através de ensaios de co-immunoprecipitação em células infetadas com *C. trachomatis*. Para além disso, seria interessante perceber se a proteína Inc CT006 é fosforilada, realizar um *yeast two hybrid* de forma a perceber se a ligação entre as 14-3-3 e a Inc CT006 é direta, usando todas as isoformas para confirmar. E de forma a estabelecer quais as regiões de ambas as proteínas envolvidas na interação, seria relevante eliminar regiões específicas no C-terminal da Inc CT006, de forma a perceber que resíduos são mais importantes, e substituir os resíduos conservados na proteína 14-3-3 de forma a confirmar se o *groove* é de facto responsável pela interação.

5. Bibliografia

1. Rockey DD, Scidmore MA, Bannantine JP, Brown WJ. Proteins in the chlamydial inclusion membrane. *Microbes Infect.* 2002;4(3):333-340. doi:10.1016/s1286-4579(02)01546-0
2. Elwell C, Mirrashidi K, Engel J. Chlamydia cell biology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(6):385-400. doi:10.1038/nrmicro.2016.30
3. Bachmann NL, Polkinghorne A, Timms P. Chlamydia genomics: providing novel insights into chlamydial biology. *Trends Microbiol.* 2014;22(8):464-472. doi:10.1016/j.tim.2014.04.013
4. Nunes A, Gomes JP. Evolution, phylogeny, and molecular epidemiology of Chlamydia. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* 2014;23:49-64. doi:10.1016/j.meegid.2014.01.029
5. Li L, Luther M, Macklin K, et al. Chlamydia gallinacea: a widespread emerging Chlamydia agent with zoonotic potential in backyard poultry. *Epidemiol Infect.* 2017;145(13):2701-2703. doi:10.1017/S0950268817001650
6. Scidmore MA, Fischer ER, Hackstadt T. Sphingolipids and glycoproteins are differentially trafficked to the Chlamydia trachomatis inclusion. *J Cell Biol.* 1996;134(2):363-374. doi:10.1083/jcb.134.2.363
7. Hackstadt T, Scidmore MA, Rockey DD. Lipid metabolism in Chlamydia trachomatis-infected cells: directed trafficking of Golgi-derived sphingolipids to the chlamydial inclusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(11):4877-4881. doi:10.1073/pnas.92.11.4877
8. Scidmore MA, Hackstadt T. Mammalian 14-3-3beta associates with the Chlamydia trachomatis inclusion membrane via its interaction with IncG. *Mol Microbiol.* 2001;39(6):1638-1650. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02355.x
9. Mirrashidi KM, Elwell CA, Verschueren E, et al. Global Mapping of the Inc-Human Interactome Reveals that Retromer Restricts Chlamydia Infection. *Cell Host Microbe.* 2015;18(1):109-121. doi:10.1016/j.chom.2015.06.004
10. Bastidas RJ, Elwell CA, Engel JN, Valdivia RH. Chlamydial intracellular survival strategies. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(5):a010256. doi:10.1101/cshperspect.a010256
11. Mueller KE, Plano G V, Fields KA. New frontiers in type III secretion biology: the Chlamydia perspective. *Infect Immun.* 2014;82(1):2-9. doi:10.1128/IAI.00917-13
12. Bannantine JP, Griffiths RS, Viratyosin W, Brown WJ, Rockey DD. A secondary structure motif predictive of protein localization to the chlamydial inclusion membrane. *Cell Microbiol.* 2000;2(1):35-47. doi:10.1046/j.1462-5822.2000.00029.x
13. Dehoux P, Flores R, Dauga C, Zhong G, Subtil A. Multi-genome identification and characterization of chlamydiae-specific type III secretion substrates: the Inc proteins. *BMC Genomics.* 2011;12:109. doi:10.1186/1471-2164-12-109
14. Lutter EI, Martens C, Hackstadt T. Evolution and conservation of predicted inclusion membrane proteins in chlamydiae. *Comp Funct Genomics.* 2012;2012:362104. doi:10.1155/2012/362104
15. Weber MM, Bauler LD, Lam J, Hackstadt T. Expression and localization of predicted inclusion membrane proteins in Chlamydia trachomatis. *Infect Immun.* 2015;83(12):4710-4718. doi:10.1128/IAI.01075-15
16. Almeida F, Luís MP, Pereira IS, Pais S V, Mota LJ. The Human Centrosomal Protein CCDC146 Binds Chlamydia trachomatis Inclusion Membrane Protein CT288 and Is Recruited to the Periphery of the Chlamydia-Containing Vacuole. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:254. doi:10.3389/fcimb.2018.00254
17. Valdivia RH. Chlamydia effector proteins and new insights into chlamydial cellular microbiology. *Curr Opin Microbiol.* 2008;11(1):53-59. doi:10.1016/j.mib.2008.01.003
18. Grieshaber NA, Sager JB, Dooley CA, Hayes SF, Hackstadt T. Regulation of the Chlamydia trachomatis histone H1-like protein Hc2 is IspE dependent and IhtA independent. *J Bacteriol.* 2006;188(14):5289-5292. doi:10.1128/JB.00526-06
19. Hybiske K, Stephens RS. Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium Chlamydia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(27):11430-11435. doi:10.1073/pnas.0703218104
20. Kumar Y, Cocchiario J, Valdivia RH. The obligate intracellular pathogen Chlamydia trachomatis

- targets host lipid droplets. *Curr Biol.* 2006;16(16):1646-1651. doi:10.1016/j.cub.2006.06.060
21. Cocchiaro JL, Kumar Y, Fischer ER, Hackstadt T, Valdivia RH. Cytoplasmic lipid droplets are translocated into the lumen of the Chlamydia trachomatis parasitophorous vacuole. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(27):9379-9384. doi:10.1073/pnas.0712241105
 22. Betts-Hampikian HJ, Fields KA. The Chlamydial Type III Secretion Mechanism: Revealing Cracks in a Tough Nut. *Front Microbiol.* 2010;1:114. doi:10.3389/fmicb.2010.00114
 23. Bugalhão JN, Mota LJ. The multiple functions of the numerous Chlamydia trachomatis secreted proteins: the tip of the iceberg. *Microb cell (Graz, Austria).* 2019;6(9):414-449. doi:10.15698/mic2019.09.691
 24. Mueller CA, Broz P, Cornelis GR. The type III secretion system tip complex and translocon. *Mol Microbiol.* 2008;68(5):1085-1095. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06237.x
 25. Mota LJ. Type III secretion gets an LcrV tip. *Trends Microbiol.* 2006;14(5):197-200. doi:10.1016/j.tim.2006.02.010
 26. Moore ER, Ouellette SP. Reconceptualizing the chlamydial inclusion as a pathogen-specified parasitic organelle: an expanded role for Inc proteins. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4:157. doi:10.3389/fcimb.2014.00157
 27. Gauliard E, Ouellette SP, Rueden KJ, Ladant D. Characterization of interactions between inclusion membrane proteins from Chlamydia trachomatis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015;5:13. doi:10.3389/fcimb.2015.00013
 28. Carabeo RA, Grieshaber SS, Hasenkrug A, Dooley C, Hackstadt T. Requirement for the Rac GTPase in Chlamydia trachomatis invasion of non-phagocytic cells. *Traffic.* 2004;5(6):418-425. doi:10.1111/j.1398-9219.2004.00184.x
 29. Carabeo RA, Dooley CA, Grieshaber SS, Hackstadt T. Rac interacts with Abi-1 and WAVE2 to promote an Arp2/3-dependent actin recruitment during chlamydial invasion. *Cell Microbiol.* 2007;9(9):2278-2288. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.00958.x
 30. Delevoye C, Nilges M, Dautry-Varsat A, Subtil A. Conservation of the biochemical properties of IncA from Chlamydia trachomatis and Chlamydia caviae: oligomerization of IncA mediates interaction between facing membranes. *J Biol Chem.* 2004;279(45):46896-46906. doi:10.1074/jbc.M407227200
 31. Suchland RJ, Rockey DD, Bannantine JP, Stamm WE. Isolates of Chlamydia trachomatis that occupy nonfusogenic inclusions lack IncA, a protein localized to the inclusion membrane. *Infect Immun.* 2000;68(1):360-367. doi:10.1128/iai.68.1.360-367.2000
 32. Delevoye C, Nilges M, Dehoux P, et al. SNARE protein mimicry by an intracellular bacterium. *PLoS Pathog.* 2008;4(3):e1000022. doi:10.1371/journal.ppat.1000022
 33. Derré I, Swiss R, Agaisse H. The lipid transfer protein CERT interacts with the Chlamydia inclusion protein IncD and participates to ER-Chlamydia inclusion membrane contact sites. *PLoS Pathog.* 2011;7(6):e1002092. doi:10.1371/journal.ppat.1002092
 34. Agaisse H, Derré I. Expression of the effector protein IncD in Chlamydia trachomatis mediates recruitment of the lipid transfer protein CERT and the endoplasmic reticulum-resident protein VAPB to the inclusion membrane. *Infect Immun.* 2014;82(5):2037-2047. doi:10.1128/IAI.01530-14
 35. Stanhope R, Flora E, Bayne C, Derré I. IncV, a FFAT motif-containing Chlamydia protein, tethers the endoplasmic reticulum to the pathogen-containing vacuole. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(45):12039-12044. doi:10.1073/pnas.1709060114
 36. Nguyen PH, Lutter EI, Hackstadt T. Chlamydia trachomatis inclusion membrane protein MrcA interacts with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3 (ITPR3) to regulate extrusion formation. *PLoS Pathog.* 2018;14(3):e1006911. doi:10.1371/journal.ppat.1006911
 37. Lutter EI, Barger AC, Nair V, Hackstadt T. Chlamydia trachomatis inclusion membrane protein CT228 recruits elements of the myosin phosphatase pathway to regulate release mechanisms. *Cell Rep.* 2013;3(6):1921-1931. doi:10.1016/j.celrep.2013.04.027
 38. Dumoux M, Menny A, Delacour D, Hayward RD. A Chlamydia effector recruits CEP170 to reprogram host microtubule organization. *J Cell Sci.* 2015;128(18):3420-3434. doi:10.1242/jcs.169318
 39. Wesolowski J, Weber MM, Nawrotek A, et al. Chlamydia Hijacks ARF GTPases To Coordinate

- Microtubule Posttranslational Modifications and Golgi Complex Positioning. *MBio*. 2017;8(3). doi:10.1128/mBio.02280-16
40. Kokes M, Dunn JD, Granek JA, et al. Integrating chemical mutagenesis and whole-genome sequencing as a platform for forward and reverse genetic analysis of Chlamydia. *Cell Host Microbe*. 2015;17(5):716-725. doi:10.1016/j.chom.2015.03.014
 41. Mital J, Lutter EI, Barger AC, Dooley CA, Hackstadt T. Chlamydia trachomatis inclusion membrane protein CT850 interacts with the dynein light chain DYNLT1 (Tctex1). *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;462(2):165-170. doi:10.1016/j.bbrc.2015.04.116
 42. Sixt BS, Bastidas RJ, Finethy R, et al. The Chlamydia trachomatis Inclusion Membrane Protein CpoS Counteracts STING-Mediated Cellular Surveillance and Suicide Programs. *Cell Host Microbe*. 2017;21(1):113-121. doi:10.1016/j.chom.2016.12.002
 43. Weber MM, Lam JL, Dooley CA, et al. Absence of Specific Chlamydia trachomatis Inclusion Membrane Proteins Triggers Premature Inclusion Membrane Lysis and Host Cell Death. *Cell Rep*. 2017;19(7):1406-1417. doi:10.1016/j.celrep.2017.04.058
 44. Verbeke P, Welter-Stahl L, Ying S, et al. Recruitment of BAD by the Chlamydia trachomatis vacuole correlates with host-cell survival. *PLoS Pathog*. 2006;2(5):e45. doi:10.1371/journal.ppat.0020045
 45. Obsil T, Obsilova V. Seminars in Cell & Developmental Biology Structural basis of 14-3-3 protein functions. *Semin Cell Dev Biol*. 2011;22(7):663-672. doi:10.1016/j.semcd.2011.09.001
 46. Aitken A. Post-translational modification of 14-3-3 isoforms and regulation of cellular function. *Semin Cell Dev Biol*. 2011;22(7):673-680. doi:10.1016/j.semcd.2011.08.003
 47. Bridges D, Moorhead GBG. 14-3-3 proteins: a number of functions for a numbered protein. *Sci STKE*. 2005;2005(296):re10. doi:10.1126/stke.2962005re10
 48. Muslin AJ, Tanner JW, Allen PM, Shaw AS. Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell*. 1996;84(6):889-897. doi:10.1016/s0092-8674(00)81067-3
 49. Madeira F, Tinti M, Murugesan G, et al. 14-3-3-Pred: improved methods to predict 14-3-3-binding phosphopeptides. *Bioinformatics*. 2015;31(14):2276-2283. doi:10.1093/bioinformatics/btv133
 50. Masters SC, Pederson KJ, Zhang L, Barbieri JT, Fu H. Interaction of 14-3-3 with a nonphosphorylated protein ligand, exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*. 1999;38(16):5216-5221. doi:10.1021/bi982492m
 51. Dubois T, Howell S, Amess B, et al. Structure and sites of phosphorylation of 14-3-3 protein: role in coordinating signal transduction pathways. *J Protein Chem*. 1997;16(5):513-522. doi:10.1023/a:1026321813463
 52. Scidmore MA. Cultivation and Laboratory Maintenance of Chlamydia trachomatis. *Curr Protoc Microbiol*. 2005;Chapter 11:Unit 11A.1. doi:10.1002/9780471729259.mc11a01s00
 53. Chen H-K, Fernandez-Funez P, Acevedo SF, et al. Interaction of Akt-phosphorylated ataxin-1 with 14-3-3 mediates neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 1. *Cell*. 2003;113(4):457-468. doi:10.1016/s0092-8674(03)00349-0
 54. Li F-Q, Mofunanya A, Harris K, Takemaru K-I. Chibby cooperates with 14-3-3 to regulate beta-catenin subcellular distribution and signaling activity. *J Cell Biol*. 2008;181(7):1141-1154. doi:10.1083/jcb.200709091
 55. Yaffe MB, Rittinger K, Volinia S, et al. The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell*. 1997;91(7):961-971. doi:10.1016/s0092-8674(00)80487-0
 56. Wilker EW, Grant RA, Artim SC, Yaffe MB. A structural basis for 14-3-3: functional specificity. *J Biol Chem*. 2005;280(19):18891-18898. doi:10.1074/jbc.M500982200
 57. Pais S V, Key CE, Borges V, et al. CteG is a Chlamydia trachomatis effector protein that associates with the Golgi complex of infected host cells. *Sci Rep*. 2019;9(1):6133. doi:10.1038/s41598-019-42647-3
 58. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):676-682. doi:10.1038/nmeth.2019
 59. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation

- of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(17):3389-3402. doi:10.1093/nar/25.17.3389
60. Altschul SF, Wootton JC, Gertz EM, et al. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS J.* 2005;272(20):5101-5109. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04945.x
 61. Zimmermann L, Stephens A, Nam S-Z, et al. A Completely Reimplemented MPI Bioinformatics Toolkit with a New HHpred Server at its Core. *J Mol Biol.* 2018;430(15):2237-2243. doi:10.1016/j.jmb.2017.12.007
 62. Notredame C, Higgins DG, Heringa J. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol.* 2000;302(1):205-217. doi:10.1006/jmbi.2000.4042
 63. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics.* 2009;25(9):1189-1191. doi:10.1093/bioinformatics/btp033
 64. Lefèvre F, Rémy MH, Masson JM. Alanine-stretch scanning mutagenesis: a simple and efficient method to probe protein structure and function. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(2):447-448. doi:10.1093/nar/25.2.447
 65. Fu H, Subramanian RR, Masters SC. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000;40:617-647. doi:10.1146/annurev.pharmtox.40.1.617
 66. Vincenz C, Dixit VM. 14-3-3 proteins associate with A20 in an isoform-specific manner and function both as chaperone and adapter molecules. *J Biol Chem.* 1996;271(33):20029-20034. doi:10.1074/jbc.271.33.20029
 67. Mils V, Baldin V, Goubin F, et al. Specific interaction between 14-3-3 isoforms and the human CDC25B phosphatase. *Oncogene.* 2000;19(10):1257-1265. doi:10.1038/sj.onc.1203419
 68. Liu D, Bienkowska J, Petosa C, Collier RJ, Fu H, Liddington R. Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. *Nature.* 1995;376(6536):191-194. doi:10.1038/376191a0
 69. Neal CL, Yu D. 14-3-3 ζ as a prognostic marker and therapeutic target for cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 2010;14(12):1343-1354. doi:10.1517/14728222.2010.531011
 70. Dubois T, Rommel C, Howell S, et al. 14-3-3 is phosphorylated by casein kinase I on residue 233. Phosphorylation at this site in vivo regulates Raf/14-3-3 interaction. *J Biol Chem.* 1997;272(46):28882-28888. doi:10.1074/jbc.272.46.28882
 71. Obsilova V, Herman P, Vecer J, Sulc M, Teisinger J, Obsil T. 14-3-3zeta C-terminal stretch changes its conformation upon ligand binding and phosphorylation at Thr232. *J Biol Chem.* 2004;279(6):4531-4540. doi:10.1074/jbc.M306939200
 72. Silhan J, Obsilova V, Vecer J, et al. 14-3-3 protein C-terminal stretch occupies ligand binding groove and is displaced by phosphopeptide binding. *J Biol Chem.* 2004;279(47):49113-49119. doi:10.1074/jbc.M408671200
 73. McPherson RA, Harding A, Roy S, Lane A, Hancock JF. Interactions of c-Raf-1 with phosphatidylserine and 14-3-3. *Oncogene.* 1999;18(26):3862-3869. doi:10.1038/sj.onc.1202730
 74. Du X, Fox JE, Pei S. Identification of a binding sequence for the 14-3-3 protein within the cytoplasmic domain of the adhesion receptor, platelet glycoprotein Ib alpha. *J Biol Chem.* 1996;271(13):7362-7367. doi:10.1074/jbc.271.13.7362
 75. Hallberg B. Exoenzyme S binds its cofactor 14-3-3 through a non-phosphorylated motif. *Biochem Soc Trans.* 2002;30(4):401-405. doi:10.1042/bst0300401
 76. Campbell JK, Gurung R, Romero S, et al. Activation of the 43 kDa inositol polyphosphate 5-phosphatase by 14-3-3zeta. *Biochemistry.* 1997;36(49):15363-15370. doi:10.1021/bi9708085
 77. Zhai J, Lin H, Shamim M, Schlaepfer WW, Cañete-Soler R. Identification of a novel interaction of 14-3-3 with p190RhoGEF. *J Biol Chem.* 2001;276(44):41318-41324. doi:10.1074/jbc.M107709200
 78. Tzivion G, Avruch J. 14-3-3 proteins: active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem.* 2002;277(5):3061-3064. doi:10.1074/jbc.R100059200
 79. Libbing CL, McDevitt AR, Azcueta R-MP, Ahila A, Mulye M. Lipid Droplets: A Significant but Understudied Contributor of Host-Bacterial Interactions. *Cells.* 2019;8(4).

doi:10.3390/cells8040354

80. Saka HA, Thompson JW, Chen Y-S, et al. Chlamydia trachomatis Infection Leads to Defined Alterations to the Lipid Droplet Proteome in Epithelial Cells. *PLoS One*. 2015;10(4):e0124630. doi:10.1371/journal.pone.0124630
81. Yang W, Thein S, Wang X, et al. BSCL2/seipin regulates adipogenesis through actin cytoskeleton remodelling. *Hum Mol Genet*. 2014;23(2):502-513. doi:10.1093/hmg/ddt444
82. Oppong A, Diallo K, Frayne IR, Des Rosiers C, Lim GE. 14-3-3 ζ regulates lipolysis by influencing adipocyte maturity. *bioRxiv*. January 2020:2020.02.24.962662. doi:10.1101/2020.02.24.962662
83. Gurumurthy RK, Mäurer AP, Machuy N, et al. A Loss-of-Function Screen Reveals Ras- and Raf-Independent MEK-ERK Signaling During Chlamydia trachomatis Infection. *Sci Signal*. 2010;3(113):ra21 LP-ra21. doi:10.1126/scisignal.2000651
84. Hackstadt T, Rockey DD, Heinzen RA, Scidmore MA. Chlamydia trachomatis interrupts an exocytic pathway to acquire endogenously synthesized sphingomyelin in transit from the Golgi apparatus to the plasma membrane. *EMBO J*. 1996;15(5):964-977.