

**ÍRIS TODESCHINI**

**Estudo funcional e estrutural do cluster PAS – GGDEF na  
sinalização c-di-GMP em *Leptospira interrogans* sorovar  
Copenhageni**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane  
Rodrigues Guzzo Carvalho

Versão original

**São Paulo**

**2020**

## RESUMO

TODESCHINI, I. **Estudo Funcional e Estrutural do Cluster PAS – GGDEF na sinalização c-di-GMP em *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni**. 2020. 107 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

O objetivo deste trabalho é estudar a estrutura e função das sete proteínas parálogas compostas por domínios PAS e GGDEF (genes LIC\_11125 a LIC\_11131) presente em cepas de *Leptospira interrogans* sorovar *Copenhageni* (agente etiológico da zoonose *Leptospirose*), as quais possuem assinatura GG(D/E)EF responsável pela produção do segundo mensageiro bacteriano c-di-GMP, sendo que o domínio PAS regula a atividade do domínio GGDEF. Neste trabalho foi possível identificar o dipeptídeo brevianamida F (ciclo L-prolina L-triptofano) sintetizada por fungos (dentre os quais encontra-se *Aspergillus fumigatus*) que interage com a LcdD (codificada pelo gene LIC\_11128) coordenando a interação proteína-proteína entre os domínios LcdB<sub>PAS</sub>, LcdC<sub>PAS</sub> e LcdD<sub>PAS</sub>, modificando a provável heterodimerização entre esses domínios. Além disso, foi possível obter diferentes culturas de *L. interrogans* sorovar *Copenhageni*, na qual uma expressa a LcdD, e a outra não; de forma que a cultura cuja bactéria expressa a LcdD não apresenta alterações morfológicas após adição de brevianamida F ao cultivo em meio EMJH, mas a cultura que não expressa a proteína apresenta alterações morfológicas e diminuição da curva de crescimento. Logo, é possível levantar a hipótese de que a presença da LcdD esteja relacionada a um mecanismo de resistência da *L. interrogans* sorovar *Copenhageni* a presença da toxina fúngica brevianamida F.

**Palavras chave:** *Leptospira interrogans*. Atividade enzimática. Biologia estrutural. Interação proteína-proteína. Interação proteína-ligante.

## ABSTRACT

TODESCHINI, I. Functional and Structural Study of the PAS - GGDEF Cluster in c-di-GMP signaling in *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. 2020.107p. Dissertation (Master in Microbiology) - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2020.

The aim of this work is to study the structure and function of seven parallel proteins composed by PAS and GGDEF domains (genes LIC\_11125 to LIC\_11131) present in strains of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni (etiological agent of the zoonosis Leptospirosis), which have a signature GG(D/E)EF responsible for the production of the second bacterial messenger c-di-GMP, with the PAS domain regulating the activity of the GGDEF domain. In this work, it was possible to identify the dipetid brevianamide F (L-proline L-tryptophane cycle) synthesized by fungi (among which is found *Aspergillus fumigatus*) that interacts with LcdD (encoded by the LIC\_11128 gene) coordinating the protein-protein interaction between the LcdB<sub>PAS</sub>, LcdC<sub>PAS</sub> and LcdD<sub>PAS</sub> domains, modifying the probable heterodimerization between these domains. In addition, it was possible to obtain different cultures of *L. interrogans* serovar Copenhageni, in which one expresses the LcdD, and the other don't express this protein; so that the culture whose bacterium expresses LcdD does not show morphological changes after adding brevianamide F to the culture in EMJH medium, but the culture that does not express the protein shows morphological changes and reduced growth curve. Therefore, it is possible to raise the hypothesis that the presence of LcdD is related to a resistance mechanism of *L. interrogans* serovar Copenhageni to the presence of the fungal toxin brevianamide F.

**Keywords:** *Leptospira interrogans*. Enzymatic activity. Structural biology. Protein-protein interaction. Protein-ligand interaction.

# 1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose emergente amplamente distribuída pelo mundo cujo agente etiológico pertence ao gênero *Leptospira*. A doença afeta humanos e também outros mamíferos domésticos e selvagens (ADLER; LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

A *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni (membro da família *Leptospiraceae*) é agente etiológico da leptospirose em humanos. Trata-se de uma bactéria Gram-negativa, alongada, delgada, altamente móvel, em forma de espiral com diâmetro médio de aproximadamente 0,1  $\mu$  m, faixa de comprimento de 6 à 20  $\mu$  m, amplitude helicoidal de 0,1 a 0,15  $\mu$  m e comprimento de onda de 0,5  $\mu$  m (CARLETON et al., 1979) (GOLDSTEIN; CHARON, 1990).

Presume-se que a leptospirose seja a zoonose mais difundida no mundo, ou seja, a incidência da doença ocorre em diversos países, sendo que os desastres naturais podem aumentar a taxa de incidência desta doença (LEVETT, 2001). As séries históricas de casos confirmados no Estado de São Paulo, no período entre 1986 a 2011, registraram 17.541 casos de leptospirose, variando entre 239 (1986) a 1.057 (2006) casos anuais. A incidência teve variação de 0,84 (1986) a 2,87 (1991) casos por 100 mil habitantes. Nesse mesmo período, foram informados 2.217 óbitos, com variação de 43 (1990) a 131 (2006) óbitos anuais, sendo há relação entre a incidência da doença e os períodos chuvosos nos quais ocorrem desastres naturais e alagamentos o que aumenta o contato dos humanos a bactéria (CCZ, 2013).

As fontes de disseminação da leptospirose são essencialmente mamíferos selvagens e domesticados que estão infectados por *Leptospira* apresentando ou não sintomatologia, sendo que *Rattus norvegicus* e *Rattus rattus* são os principais hospedeiros da *L. interrogans*. Estes animais na maioria das vezes são portadores assintomáticos da doença, sendo que a bactéria geralmente coloniza os túbulos renais proximais destes animais e são eliminadas no ambiente através da micção. Em seguida os seres humanos se infectam por intermédio do contato direto com a urina ou indiretamente através de água ou alimentos contaminados. A *L.*

*interrogans* pode adentrar no hospedeiro através das mucosas dos olhos, nariz ou garganta e através de cortes ou abrasões na pele, em seguida, invadem os tecidos e fluídos do hospedeiro colonizando principalmente regiões privadas do sistema imune. Nos seres humanos, a evolução e gravidade da doença varia na dependência da espécie de *Leptospira*, do estado de saúde e imunidade do hospedeiro e da dose infectante (CINCO, 2010). No entanto, atividades ocupacionais envolvendo animais infectados e solo e água contaminados são fatores de risco para o desenvolvimento da leptospirose

Na maioria dos casos a leptospirose em humanos tem uma apresentação clínica bifásica, que começa com a fase septicêmica seguida de manifestações imunológicas. A leptospirose não apresenta sinais patognômicos, na fase inicial da doença o paciente apresenta febre e mialgia (sintomas comuns a diversas doenças) o que dificulta o diagnóstico e conseqüentemente a notificação da doença. As formas graves da doença, que ocorrem posteriormente, podem ser fatais, com danos em vários sistemas, incluindo insuficiência renal, disfunção hepática, dano vascular, miocardite, hemorragia pulmonar e lesões musculares (síndrome de Weil) nestas fase devido a gravidade dos sinais e a provável soroconversão do paciente o diagnóstico ocorre mais frequentemente, porém a taxa de letalidade é de aproximadamente 10 a 15%. (BRITO; SILVA; ABREU, 2018) (CINCO, 2010) (LEVETT, 2001).

Um fator interessante da fisiologia de *Leptospira interrogans* que impacta na sua prevalência na população é a capacidade da bactéria prosperar no solo e na água por longos períodos de tempo e ainda infectar o hospedeiro (MEHROTRA et al., 2017). Para que a bactéria seja capaz de sobreviver em diferentes ambientes é necessário haver mecanismos de regulação e adaptação. Sendo que, em bactérias, o segundo mensageiro bacteriano c-di-GMP (3',5'-di-guanosina monofosfato cíclico) regula a fisiologia da bactéria conforme mudanças no meio externo e já foi descrito como um fator chave na regulação de diferentes fenótipos bacterianos, tais quais a vida da célula internalizada em um biofilme ou a regulação para a saída do microorganismo em busca de um novo ambiente a ser colonizado; além disso, o c-di-GMP está relacionado ao ciclo celular, diferenciação e mudança

de estado virulento nas infecções agudas ao estado menos virulento, porém mais resistente (RÖMLING; GALPERIN; GOMELSKY, 2013).

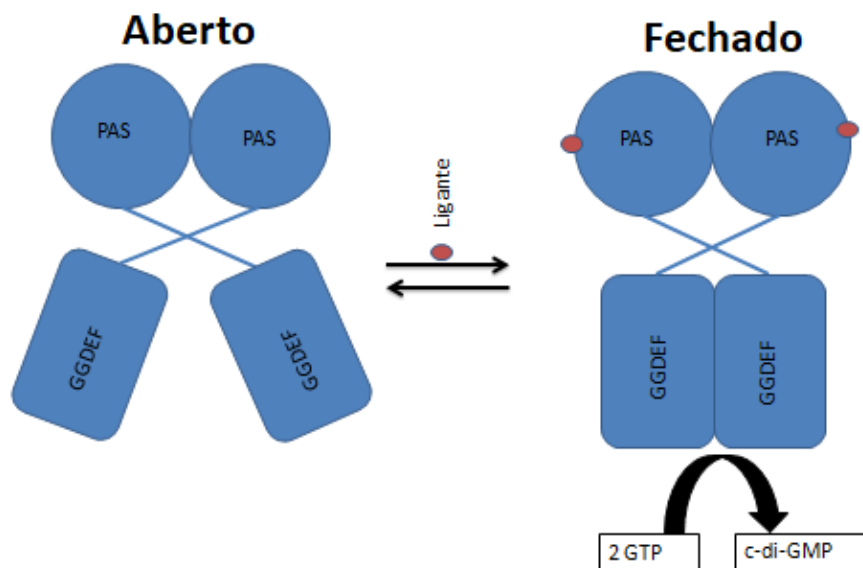
A produção do segundo mensageiro bacteriano c-di-GMP na célula é feita por proteínas com domínio GGDEF a qual possui a assinatura GG(D/E)EF essencial para a atividade diguanilato ciclase. Para que ocorra a formação de c-di-GMP, cada monômero da proteína (domínio GGDEF) deve se ligar a uma molécula de GTP na presença de dois íons metálicos ( $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$ ) para que haja formação de c-di-GMP e duas moléculas de pirofosfato. No entanto, o domínio GGDEF se liga a somente uma molécula de GTP por vez, o que implica na necessidade na formação de estados oligoméricos pelo menos diméricos para que as moléculas de GTP se aproximem o suficiente possibilitando a ciclização da molécula de c-di-GMP (SCHIRMER, 2016) (CHAN et al., 2004). Desta forma, as proteínas que contêm domínio GGDEF enzimaticamente ativas não seguem o modelo cinético de Michaelis-Menten, em que uma molécula de proteína liga a um substrato e produz um produto. No caso de enzimas com domínio GGDEF, também chamadas de diguanilato ciclase (DGC), há a formação de dímeros em que cada proteína liga a uma molécula de GTP para, então, sintetizar apenas uma molécula de c-di-GMP.

Análises de bioinformática mostraram que *L. interrogans* possui vários genes que codificam proteínas envolvidas na síntese, degradação e ligação ao c-di-GMP, sendo ao todo 16 proteínas codificam o domínio GGDEF, das quais sete são proteínas parálogas localizadas no cluster LIC\_11125, LIC\_11126, LIC\_11127, LIC\_11128, LIC\_11129, LIC\_11130 e LIC\_11131 e possuem a assinatura GG(D/E)EF. Estas sete proteínas parálogas apresentam a mesma arquitetura de domínios, um domínio PAS, na região N-terminal, e um domínio GGDEF no C-terminal.

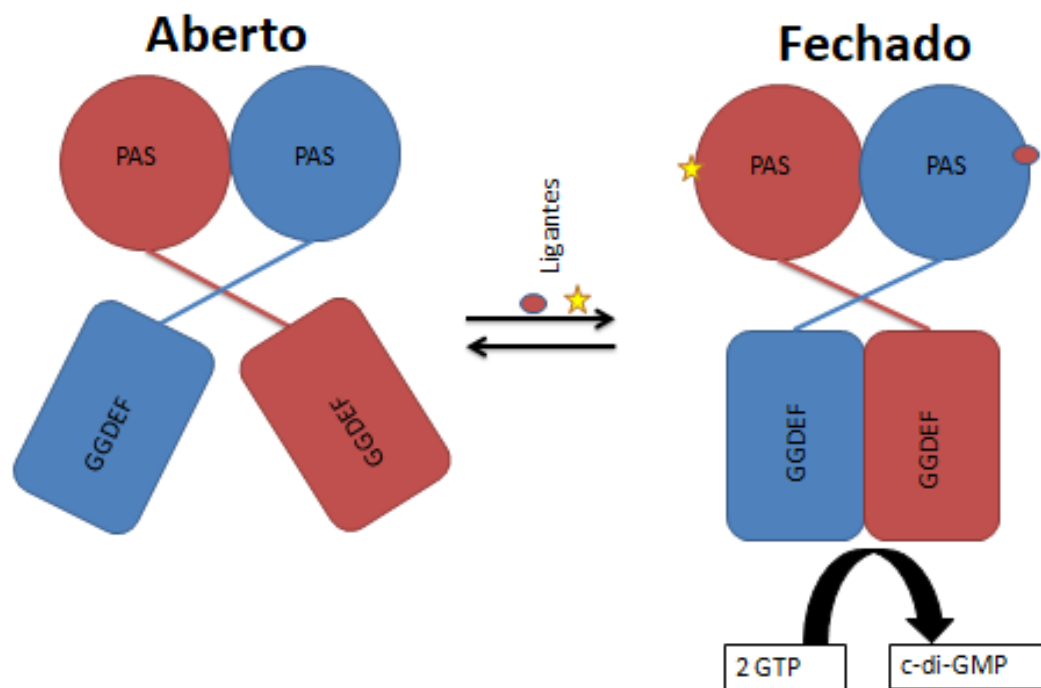
Os domínios PAS são sensores versáteis e módulos de interação em proteínas de transdução de sinal, sendo que, já foram mostradas interações destes domínios com diversas moléculas, dentre as quais podemos citar grupamento heme, flavina, ácido carboxílico e ácido graxo (HENRY; CROSSON, 2011). Os domínios PAS são sensores que geralmente estão acoplados a domínios efetores regulando a atividade destes domínios (MÖGLICH; AYERS; MOFFAT, 2009).

A presença do cluster de 7 genes parálogos em *L. interrogans* (LIC\_11125 a LIC\_11131) chama a atenção devido ao fato destas proteínas serem capazes de produzir o segundo mensageiro bacteriano c-di-GMP tendo o domínio PAS como regulador da atividade diguanilato ciclase uma vez que os domínios GGDEFs precisam dimerizar para se tornarem enzimaticamente ativos. (PAUL et al., 2007).

Por isso, foram feitas as seguintes hipóteses sobre a regulação da atividade diguanilato ciclase (DGC) das sete proteínas em estudo: I) formação de homodímeros e II) formação de heterodímeros. Na ocorrência de homodímero a atividade DGC da proteína poderia ser mediada pela presença de um dado ligante o qual poderia ser responsável pela oscilação entre as conformações aberta (inativa) e fechada (ativa) da proteína (**Figura 1**). Na hipótese de formação de heterodímeros haveria um mecanismo de regulação mais complexo, uma vez que há necessidade da interação entre duas proteínas as quais, provavelmente, interagem com diferentes ligantes para regulação da atividade diguanilato ciclase (**Figura 2**).



**Figura 1 - Hipótese da síntese de c-di-GMP através da formação de homodímeros.** Nesta hipótese cada proteína interage com outra molécula da mesma proteína e a modulação da atividade diguanilato ciclase ocorre através da interação do domínio PAS com seu respectivo ligante, a ser identificado.



**Figura 2 - Hipótese da síntese de c-di-GMP através da formação de heterodímeros.** Nesta hipótese dentre as sete proteínas parálogas haveria interação entre duas destas proteínas e a produção de c-di-GMP seria mediada pela interação de diferentes domínios PAS os quais provavelmente reconheceriam diferentes moléculas. Dessa forma a regulação do estado aberto para o fechado seria mediada pela presença de dois ligantes ao invés de um único ligante.

Neste trabalho dentre os sete domínios PAS estudados, foi possível obter a estrutura de três proteínas ( $LcdC_{PAS}$ ,  $LcdD_{PAS}$  apo e em complexo com brevianamida F e  $LcdG_{PAS}$ ). Devido à complexidade do trabalho e do tempo focamos no estudo  $LcdD$  cujo ligante foi identificado como sendo brevianamida F (ciclo L-prolina, L-triptofano); este composto trata-se de um produto natural produzido por fungos. Um fato interessante advindo da identificação deste ligante é que a presença da brevianamida afeta a interação proteína-proteína entre os domínios PAS, o que corrobora com a hipótese II apresentada anteriormente.

Brevianamida F é um composto fúngico precursor de uma variedade de alcaloides pré-metilados com atividade biológica, incluindo a produção de *fumitremorgin A*, B e C e produção de triprostatina B (MAIYA et al., 2006). A via metabólica de produção e utilização da brevianamida está descrita em *Aspergillus fumigatus* (MAIYA et al., 2006), mas a presença deste dipeptídeo também ocorre em outros fungos tais como *Penicillium sp.* (BIRCH; WRIGHT, 1969), e em



bactérias dos gêneros *Actinomyces sp.* e *Streptomyces sp.* as quais produzem brevianamida F, mas ainda não está claro o papel biológico desta molécula na fisiologia destas bactérias (BEN AMEUR MEHDI et al., 2009) (BEN AMEUR MEHDI et al., 2009).

Do ponto de vista antimicrobiano a brevianamida F já se eficaz contra diversos microrganismos tais como *Mycobacterium bovis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* (HUANG et al., 2016), (BEN AMEUR MEHDI et al., 2009). Neste trabalho brevianamida F apresenta toxicidade na (concentração de 100  $\mu$ M) para *L. interrogans* sorovar Copenhageni quando esta bactéria não expressa a proteína LcdD a níveis detectáveis por *Western Blotting* (fentograma de proteína). Quando a *L. interrogans* sorovar Copenhageni apresenta a expressão da proteína LcdD a níveis detectáveis por *Western blotting* a adição de 100  $\mu$ M de brevianamida F ao meio EMJH não gera alterações morfológicas, sendo que ainda há necessidade de realizar a curva de crescimento da *L. Interrogans* sorovar Copenhageni que expressa a proteína LcdD em diferentes concentrações de brevianamida F, ou seja, apesar deste composto ser tóxico para diversas bactérias a presença da proteína LcdD em *L. Interrogans* sorovar Copenhageni aparentemente gera resistência desta bactéria à brevianamida F.

## 2 CONCLUSÃO

O cluster LIC\_11125 – LIC\_11131 codifica proteínas parálogas que possuem baixa similaridade de sequência primária no sítio N-terminal das proteínas (domínio PAS) e maior similaridade de sequência no sítio C-terminal (domínio catalítico GGDEF). Este grupo de proteínas parálogas estão presentes principalmente em cepas patogênicas da família *Leptospiraceae* sugerindo um possível papel destas proteínas na virulência, patogênese ou adaptação ao hospedeiro.

Devida a complexidade do trabalho foi dado foco ao estudo funcional e estrutural de LcdD a qual foi possível determinar a estrutura cristalográfica e a interação com o ligante brevianamida F. Sendo que a interação foi comprovada tanto por ensaios de cristalização com o ligante como por RMN, ITC e termoforese em microescala. Os ensaios de ITC e termoforese forneceram constantes de dissociação similares em torno de  $7,3 \pm 0,6 \mu\text{M}$ . A proteína LcdD<sub>PAS</sub>, assim como os outros domínios PAS estudados neste trabalho, se apresenta no estado oligomérico de dímero, sendo que a constante de dissociação para formação de homodímero é de  $3,3 \pm 0,6 \mu\text{M}$ . Um fato interessante desta proteína é que mesmo cristalizando a proteína com 2 mM de brevianamida F, só há uma molécula de brevianamida F por dímero de LcdD<sub>PAS</sub>, somando-se a isso, os ensaios de termoforese em microescala mostraram haver necessidade da dimerização para que ocorra interação entre LcdD<sub>PAS</sub> e brevianamida F e nos experimentos de ITC a razão molar obtida está próxima de 0,5 o que corrobora com a necessidade de duas moléculas de LcdD<sub>PAS</sub> para haver ligação de uma molécula de brevianamida F. Ensaios de atividade enzimática mostram que LcdD sintetiza c-di-GMP na ausência e presença de brevianamida F, porém a adição do ligante diminui a atividade enzimática da proteína.

Através de experimentos de interação proteína-proteína por RMN foi possível identificar heterodimerização mediada pelo ligante brevianamida F, sendo que LcdB<sub>PAS</sub> interage com LcdD<sub>PAS</sub> na ausência do ligante e após a adição do ligante LcdD<sub>PAS</sub> passa a interagir com LcdC<sub>PAS</sub>. A interação entre LcdB<sub>PAS</sub> e LcdD<sub>PAS</sub> na ausência de brevianamida F também foi possível ser identificada por termoforese

em microescala e foi possível comprovar que esta interação é mais forte do que a interação para formação de homodímero. Futuramente será determinado o estado oligomérico da interação entre LcdB<sub>PAS</sub> e LcdD<sub>PAS</sub> para saber se ocorre formação de heterodímero.

Ensaio funcionais de crescimento bacteriano de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (L1-130) mostraram que quando não há expressão da proteína LcdD a adição de brevianamida F na concentração de 100  $\mu$ M gera diminuição da curva de crescimento e alterações morfológicas nas células residuais. Mas quando a bactéria expressa a proteína LcdD as alterações morfológicas não ocorrem, futuramente será feito a curva de crescimento da *L. interrogans* sorovar Copenhageni que expressa a proteína LcdD na presença e ausência de brevianamida F.

Além da estrutura tridimensional de LcdD<sub>PAS</sub>, também foi possível determinar a estrutura tridimensional de LcdC<sub>PAS</sub> e LcdG<sub>PAS</sub>. A estrutura terciária de LcdD<sub>PAS</sub> é levemente mais divergente em relação aos outros dois domínios PAS sendo as estruturas de LcdC<sub>PAS</sub> e LcdG<sub>PAS</sub> mais similares entre si do que com LcdD o que condiz com os dados de filogenia que mostram uma relação evolutiva mais próxima entre LcdC e LcdG. Assim como ocorre com LcdD<sub>PAS</sub>, todos cristalizaram como dímeros e a proteína LcdC<sub>PAS</sub> também apresenta apenas uma molécula do ligante por dímero, já a proteína LcdG<sub>PAS</sub> cristaliza como dímero, mas apresenta um ligante por molécula de proteína, ou seja, dois ligantes por dímero.

Logo, LcdD presente no cluster LIC\_11125 – LIC\_11131 possui atividade diguanilato ciclase, forma homodímeros e interage com LcdB e LcdC na dependência de brevianamida F, sendo que LcdD<sub>PAS</sub> liga especificamente brevianamida F que é uma toxina sintetizada por fungos que coabitam o mesmo nicho de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, e quando esta bactéria expressa a proteína LcdD ela não apresenta alterações morfológicas mediante a adição de brevianamida F.

### 3 REFERÊNCIAS

ADLER, B.; LA PEÑA MOCTEZUMA, A. De. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary microbiology**, v. 140, n. 140, p. 287–296, 2010.

AMEZCUA, C. A.; HARPER, S. M.; RUTTER, J.; GARDNER, K. H. Structure and interactions of PAS Kinase N-terminal PAS domain: Model for intramolecular kinase regulation. **Structure**, v. 10, n. 10, p. 1349–1361, 2002.

BEN AMEUR MEHDI, R.; SHAABAN, K. A.; REBAI, I. K.; SMAOUI, S.; BEJAR, S.; MELLOULI, L. Five naturally bioactive molecules including two rhamnopyranoside derivatives isolated from the *Streptomyces* sp. strain TN58. **Natural Product Research**, v. 23, n. 12, p. 1095–1107, 2009.

BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICALDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **THE LANCET Infectious Diseases**, v. 3, n. December, p. 757–771, 2003.

BIRCH, A. J.; WRIGHT, J. J. The brevianamides: A new class of fungal alkaloid. **Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications**, v. 4, n. 12, p. 644–645, 1969.

BIRD, L. **OPPF-UK Standard Protocols: Cloning and Expression Screening Oxford Protein Production Facility**. [s.l: s.n.].

BOONSILP, S.; THAI PADUNG PANIT, J.; AMORNCHAI, P.; WUTHIEKANUN, V.; BAILEY, M. S.; HOLDEN, M. T. G.; ZHANG, C.; JIANG, X.; KOIZUMI, N.; TAYLOR, K.; GALLOWAY, R.; HOFFMASTER, A. R.; CRAIG, S.; SMYTHE, L. D.; HARTSKEERL, R. A.; DAY, N. P.; CHANTRATITA, N.; FEIL, E. J.; AANENSEN, D. M.; SPRATT, B. G.; PEACOCK, S. J. A Single Multilocus Sequence Typing (MLST) Scheme for Seven Pathogenic *Leptospira* Species. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 1, 2013.

BRITO, T. de; SILVA, A. M. G.; ABREU, P. A. E. Pathology and pathogenesis of human leptospirosis: a commented review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 60, n. January, p. 1–10, 2018.

CARDOSO, M. V. C.; RIVERA, J. D.; VITALE, P. M.; DEGENHARDT, M.; ABIKO, L. A.; OLIVEIRA, C. P.; SALINAS, R. K. An investigation of the CALX-CBD1 Ca<sup>2+</sup>-binding cooperativity using NMR spectroscopy and calorimetry experiments with Bayesian statistics. **Biophysical journal**, n. 7, p. 1–13, 2019.

CARLETON, O.; CHARON, N. W.; ALLENDER, P.; O'BRIEN, S. Helix handedness of *Leptospira interrogans* as determined by scanning electron microscopy. **Journal of Bacteriology**, v. 137, n. 3, p. 1413–1416, 1979.

CASANOVAS-MASSANA, A.; HAMOND, C.; SANTOS, L. A.; DE OLIVEIRA, D.; HACKER, K. P.; BALASSIANO, I.; COSTA, F.; MEDEIROS, M. A.; REIS, M. G.; KO, A. I.; WUNDER, E. A. *Leptospira yasudae* sp. nov. and *Leptospira stimsonii* sp. nov., two new species of the pathogenic group isolated from environmental sources. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2019.

CCZ. Leptospirose no Estado de São Paulo, 2007 a 2011. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 9, n. 107, p. 5–11, 2013.

CHAN, C.; PAUL, R.; SAMORAY, D.; AMIOT, N. C.; GIESE, B.; JENAL, U.; SCHIRMER, T. Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 49, p. 17084–17089, 2004.

CINCO, M. New insights into the pathogenicity of leptospires: **New Microbiologica**, v. 33, p. 283–292, 2010.

GOLDSTEIN, S. F.; CHARON, N. W. Multiple-exposure photographic analysis of a motile spirochete. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 13, p. 4895–4899, 1990.

HENRY, J. T.; CROSSON, S. Ligand-Binding PAS Domains in a Genomic, Cellular, and Structural Context. **Annual Review of Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 261–286, 2011.

HUANG, P.; XIE, F.; REN, B.; WANG, Q.; WANG, J.; WANG, Q.; ABDEL-MAGEED, W. M.; LIU, M.; HAN, J.; OYELEYE, A.; SHEN, J.; SONG, F.; DAI, H.; LIU, X.; ZHANG, L. Anti-MRSA and anti-TB metabolites from marine-derived

Verrucosipora sp. MS100047. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 17, p. 7437–7447, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-7406-y>>.

INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, v. 96, n. 1, p. 23–28, 1990.

JERABEK-WILLEMSSEN, M.; WIENKEN, C. J.; BRAUN, D.; BAASKE, P.; DUHR, S. Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 9, n. 4, p. 342–353, 2011.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, n. 2, p. 296–326, 2001.

MAIYA, S.; GRUNDMANN, A.; LI, S. M.; TURNER, G. The fumitremorgin gene cluster of *Aspergillus fumigatus*: Identification of a gene encoding brevianamide F synthetase. **ChemBioChem**, v. 7, n. 7, p. 1062–1069, 2006.

MEHROTRA, P.; RAMAKRISHNAN, G.; DHANDAPANI, G.; SRINIVASAN, N.; MADANAN, M. G. Comparison of *Leptospira interrogans* and *Leptospira biflexa* genomes: analysis of potential leptospiral–host interactions. **Molecular BioSystems**, v. 13, p. 883–891, 2017. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2017/mb/c6mb00856a>>.

MÖGLICH, A.; AYERS, R. A.; MOFFAT, K. Structure and Signaling Mechanism of Per-ARNT-Sim Domains. **Structure**, v. 17, n. 10, p. 1282–1294, 2009.

MORI, S.; ABEYGUNAWARDANA, C.; JOHNSON, M. O.; ZUL, P. C. M. Van. Hsqc.Pdf. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 108, n. B, p. 94–98, 1995.

PAUL, R.; ABEL, S.; WASSMANN, P.; BECK, A.; HEERKLOTZ, H.; JENAL, U. Activation of the diguanylate cyclase PleD by phosphorylation-mediated dimerization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 40, p. 29170–29177, 2007.

**PDBe & PISA & EMBL-EBI.** Disponível em: <[http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot\\_int/cgi-bin/piserver](http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/cgi-bin/piserver)>. Acesso em: 29 out. 2018.

RÖMLING, U.; GALPERIN, M. Y.; GOMELSKY, M. Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 1, p. 1 LP – 52, 1 mar. 2013. Disponível em: <<http://mmbbr.asm.org/content/77/1/1.abstract>>.

SCHIRMER, T. C-di-GMP Synthesis: Structural Aspects of Evolution, Catalysis and Regulation. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, n. 19, p. 3683–3701, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2016.07.023>>.

SHI, Y.; MOWERY, R. A.; ASHLEY, J.; HENTZ, M.; RAMIREZ, A. J.; BILGICER, B.; SLUNT-BROWN, H.; BORCHELT, D. R.; SHAW, B. F. Abnormal SDS-PAGE migration of cytosolic proteins can identify domains and mechanisms that control surfactant binding. **Protein Science**, v. 21, n. 8, p. 1197–1209, 2012.

STACKEBRANDT, E.; CHERTKOV, O.; LAPIDUS, A.; NOLAN, M.; LUCAS, S.; HAMMON, N.; DESHPANDE, S.; CHENG, J. F.; TAPIA, R.; GOODWIN, L. A.; PITLUCK, S.; LIOLIOS, K.; PAGANI, I.; IVANOVA, N.; MAVROMATIS, K.; MIKHAILOVA, N.; HUNTEMANN, M.; PATI, A.; CHEN, A.; PALANIAPPAN, K.; LAND, M.; PAN, C.; ROHDE, M.; GRONOW, S.; GÖKER, M.; DETTER, J. C.; BRISTOW, J.; EISEN, J. A.; MARKOWITZ, V.; HUGENHOLTZ, P.; WOYKE, T.; KYRPIDES, N. C.; KLENK, H. P. Genome sequence of the free-living aerobic spirochete *Turneriella parva* type strain (HT), and emendation of the species *Turneriella parva*. **Standards in Genomic Sciences**, v. 8, n. 2, p. 228–238, 2013.

VINCENT, A. T.; SCHIETTEKATTE, O.; GOARANT, C.; NEELA, V. K.; BERNET, E.; THIBEAUX, R.; ISMAIL, N.; KHALID, M. K. N. M.; AMRAN, F.; MASUZAWA, T.; NAKAO, R.; KORBA, A. A.; BOURHY, P.; VEYRIER, F. J.; PICARDEAU, M. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 5, 2019.

WEISS, J. N. The Hill equation revisited: uses and misuses. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental**

**Biology**, p. 835–841, 1974.