UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

ANDRÉ ARASHIRO PULSCHEN

Estudos da resposta estrigente de *Bacillus subtilis* e busca por pequenas moléculas moduladoras de RelA

Versão original da Tese defendida

São Paulo, 05/09/2017

ANDRÉ ARASHIRO PULSCHEN

Estudos da resposta estrigente de *Bacillus subtilis* e busca por pequenas moléculas moduladoras de RelA

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)*

Orientador: Prof. Dr. Frederico José Gueiros Filho

São Paulo, 2017

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

A113 e Arashiro Pulschen, André
Estudos da resposta estrigente de Bacillus subtilis e busca por pequenas moléculas moduladoras de RelA / André Arashiro Pulschen. - São Paulo, .
p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de
Bioquímica.

Orientador: Jose Gueiros-Filho, Frederico

1. (p)ppGpp. 2. Resposta estrigente. 3.
Bacillus subtilis. 4. Ácidos graxos. 5. RelBS. I.
T. II. Jose Gueiros-Filho, Frederico , orientador.

Folha de aprovação

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Cezar e Cristina, meu irmão Victor e a minha família pelo apoio incondicional;

A Universidade de São Paulo (USP) e ao programa de pós-graduação em Bioquímica pela oportunidade da realização do Doutorado; ao Instituto de Química e seus professores por cederem a infraestrutura necessária para a realização do projeto de pesquisa;

Ao Prof. Dr. Frederico José Gueiros-Filho pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pela liberdade científica e pelos ensinamentos em ciência ao longo desses anos;

Aos meus colegas do laboratório: Rodrigo, Camila, Ana, Ashwana, Patrícia, Alexandre e Valdir pela amizade e convivência. Em especial, aos colegas Diego Sastre e Jonathan Benites pela convivência, colaborações em projetos e discussão científica;

Aos pesquisadores Dr. Diego de Mendoza e Dra. Daniela Albanessi, do Instituto de Biologia de Rosário (Argentina) por terem me recebido, pelo fornecimento da estrutura de seu laboratório e reagentes para a realização dos experimentos em colaboração. Ao doutorando Federico Machinandiarena pela ajuda aos experimentos realizados na Argentina;

Aos colegas de departamento: Diorge, Gian, Gilberto, Ana, Thais, Cícero, Gabriel, Willan, entre outros, pela amizade, ajuda com os estudos e discussões científicas;

A CAPES pelos primeiros anos de bolsa e projeto de apoio a pesquisa (1169/2013 Pesquisador Visitante Especial CAPES), e a FAPESP pela bolsa de estudo (2014/265280-4) e apoio a pesquisa (2016/03412-6);

Por fim e em especial, agradeço a minha esposa Letícia Meneguello, por todo amor, carinho e apoio ao longo desses anos de doutorado.

Parte do texto e figuras foram baseadas no conteúdo do manuscrito “The stringent response plays a key role in *Bacillus subtilis* survival of fatty acid starvation. *Molecular Microbiology*, Feb; **103** (4):698-712”, publicado pelo aluno. Uma vez que parte da tese foi inspirada no manuscrito, a colaboração dos outros autores para a realização de experimentos (em especial ensaios de TLC e taxa de síntese proteica) e discussão foram importantes para a elaboração dessa tese.

RESUMO

Pulschen, A.A. **Estudos da resposta estrigente de *Bacillus subtilis* e busca por pequenas moléculas moduladoras de RelA**. 2017. 107p. Tese – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Seja no meio ambiente, dentro de um hospedeiro ou em outro habitat, bactérias estarão frequentemente enfrentando condições adversas, como exposição a compostos antibacterianos ou carência nutricional. Em situações como essas, as bactérias são capazes de ativar a chamada resposta estrigente, modulada pelo alarmônio (p)ppGpp. O acúmulo de (p)ppGpp promove a inibição da transcrição de rRNAs e tRNAs e a supressão do processo de tradução, e a ativação de operons de biossíntese de aminoácidos. Sabe-se também hoje que a resposta estrigente está relacionada a outras importantes carências nutricionais em *Escherichia coli*, como a falta de ácidos graxos, porém não se sabe se o mesmo ocorre em *Bacillus subtilis* ou em outras Gram-positivas. (p)ppGpp atua também direta e indiretamente em vários outros processos celulares, como motilidade, resistência a antibióticos, virulência e persistência, indicando que (p)ppGpp é um regulador central que integra informação metabólica e respostas adaptativas. O presente trabalho buscou estudar a correlação da resposta estrigente de *B. subtilis* com a carência de ácidos graxos e a busca por pequenas moléculas capazes de modular RelA (a principal proteína envolvida na síntese de (p)ppGpp) e impedir o acúmulo de (p)ppGpp. Para a indução da carência de ácidos graxos, foram utilizadas duas estratégias; uso da droga Cerulenina (inibidor de FabF) e mutantes condicionais no gene FabF. Observou-se que mutantes incapazes de ativar a resposta estrigente (cepa ppGpp(0) ou RelA_{D264G}) apresentaram grande perda de viabilidade celular durante a carência de ácidos graxos, ao passo que a cepa selvagem manteve sua viabilidade celular. A causa da morte se deu majoritariamente devido ao colapso do potencial de membrana. Apesar de não termos observado aumento de (p)ppGpp nas células selvagens durante a carência de ácidos graxos, observou-se uma redução da razão GTP/ATP, ao passo que na cepa ppGpp(0), a razão GTP/ATP aumentou, devido ao acúmulo de GTP. O uso da droga decoinina, capaz de reduzir os níveis intracelulares de GTP, resgatou parcialmente a viabilidade da cepa e impediu a perda do potencial de membrana, indicando que os níveis de GTP são importantes durante a carência de ácidos graxos em *B. subtilis*. Para a triagem de pequenas moléculas inibidoras do acúmulo de (p)ppGpp, foi utilizada uma biblioteca de 2320 diferentes compostos químicos, e buscou-se drogas capazes de reverter o fenótipo de crescimento lento de cepas de *B. subtilis* que acumulam (p)ppGpp (via mutação pontual; mutante RelA_{H77A} e via tratamento com o indutor hidroxamato de arginina) em meio rico. A primeira etapa selecionou 40 moléculas capazes de resgatar o crescimento de células tratadas com arginina-hidroxamato, porém apenas uma, salicilanilida, foi capaz de também resgatar o crescimento da cepa RelA_{H77A}. Todavia, apesar de ser capaz de acelerar o crescimento de *B. subtilis* esse efeito é limitado. Diversos análogos de salicilanilida foram testados, porém não apresentaram efeito superior a salicilanilida para a reversão do fenótipo de crescimento lento de *B. subtilis*. Em adição, a droga não foi capaz de aumentar a sensibilidade dos organismos a diversos antibióticos testados, e aparentemente é incapaz de alterar os níveis internos de (p)ppGpp, porém é capaz de causar alterações nos níveis de ATP. Logo, acredita-se que o efeito observado para o crescimento das células seja devido a efeitos indiretos, possivelmente envolvendo alteração de outros nucleotídeos fosforilados.

Palavras-chave: Resposta estrigente, (p)ppGpp, *B. subtilis*, RelA, ácidos graxos, Cerulenina

ABSTRACT

Pulschen, A.A. **Studies of the stringent response of *Bacillus subtilis* and search for small molecules capable of modulating RelA activity.** 2017. 107p. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Chemistry Institute, University of São Paulo, São Paulo.

In the environment, inside a host or other habitat, bacteria will always face adverse conditions, as for example exposure to antimicrobials or starvation. In situations like those, bacteria activate the stringent response, modulated by the alarmone (p)ppGpp. (p)ppGpp accumulation promotes inhibition of rRNA and tRNA transcription and suppression of translational process, at the same time that it activates several amino acid biosynthesis operons. It is known also that the stringent response it is related to other starvation stress in *Escherichia coli*, like lack of fatty acids, but there is no knowledge if the same occurs for *Bacillus subtilis* or other gram-positive bacteria. ppGpp acts directly and indirectly affecting several other cellular process, as motility, resistance to antibiotics, virulence and persistence, indicating that (p)ppGpp is a central regulator that integrates metabolic information and adaptive responses. This work aimed to study the correlation between the stringent response in *B. subtilis* with fatty acid starvation, and search for small molecules capable of modulating RelA (the main enzyme responsible for ppGpp synthesis) and stop (p)ppGpp production. For fatty acid starvation induction, two strategies were used; use of the drug Cerulenin (inhibitor of the FabF protein) and conditional mutants of the FabF gene. We observed that mutants incapable of activating the stringent response (strains ppGpp(0) ou RelA_{D264G}) presented great loss of viability during fatty acid starvation, whereas the wild-type strain keeps its viability. The main cause of death is due membrane rupture in some cells, but mainly due to membrane potential collapse. Although we did not observed increase of (p)ppGpp in wild-type strains during fatty acid starvation, we observed reduction in GTP/ATP ratios, a hallmark of (p)ppGpp production in gram-positive bacteria. In the strain ppGpp(0) GTP/ATP ratio increased, mainly due to GTP increase. Using the drug decoyinine, capable of reducing GTP levels, partially recued viability and protects cells of losing its membrane potential, indicating that GTP levels plays an important role during fatty acid starvation in *B. subtilis*. For the screening of small molecules capable of inhibit (p)ppGpp production, a library of 2320 different chemical compounds were used, and we looked for drugs capable of reverting the slow growth phenotype of *B. subtilis* strains with (p)ppGpp accumulation (using a mutant RelA_{H77A}; and using a stringent response inductor, arginine hidroxamate). The first step selected for 40 molecules capable of rescuing the growth of cells treated with arginine hidroxamate, but only one drug, salicilanilyde could also rescue the growth of the strain RelA_{H77A}. Although capable of rescuing growth of *B. subtilis* that accumulates (p)ppGpp, this rescue is limited. Several analogues of salicilanilyde were tested, but none were stronger than salicilanilyde itself in rescuing growth of slow growing strains of *B. subtilis*. In addition, the drug was not capable of increasing antibiotic sensibility and it is incapable of changing intracellular (p)ppGpp levels, but it does shifts ATP levels. Therefore, we believe that the observed effects of salicilanilyde is due indirect action, probably involving other phosphorylated nucleotides, rather than modifying (p)ppGpp levels.

Keywords: Stringent response, (p)ppGpp, *B. subtilis*, RelA, Fatty acids, Cerulenin.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Resposta estrigente	10
1.2 Proteínas RSH, SAS e síntese de (p)ppGpp	11
1.3 Reprogramação do metabolismo pela resposta estrigente	16
1.4 Consequências da ausência da resposta estrigente para a viabilidade celular	20
1.5 Resposta estrigente como alvo de novas drogas	25
2. OBJETIVOS	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Cepas e construção dos mutantes	31
3.2 Condições de crescimento e ensaios de viabilidade durante a carência de ácidos graxos	34
3.3 Mudanças na taxa de crescimento (temperaturas menores e meio mínimo) e ensaio de sobrevivência	35
3.4 Preparação de FAME	36
3.5 Microscopia de fluorescência	36
3.6 Ensaios de potencial de membrana	37
3.7 Medidas de TLC	38
3.8 Medidas de taxa de síntese proteica	39
3.9 Estabelecimento da metodologia da triagem	39
3.10 Montagem das placas para a triagem de compostos químicos	40
3.11 Ensaios de concentração inibitória mínima (MIC)	40
3.12 Extração de nucleotídeos para análise por HPLC – MS/MS (Amazon, Bruker)	41
3.13 Corrida e análise dos nucleotídeos em HPLC-MS/MS	42
3.14 Extração de nucleotídeos para análise por HPLC (Akta pure, GE)	42
3.15 Corrida e análise dos nucleotídeos por HPLC	43
4. RESULTADOS	44
RESULTADOS PARTE 1	44
4.1 Inibição da biossíntese de ácidos graxos é letal na ausência de (p)ppGpp	44
4.2 Carência de ácidos graxos causa alterações morfológicas e danos na membrana em células incapazes de sintetizar (p)ppGpp	49
4.3 Células incapazes de sintetizar (p)ppGpp perdem seu potencial de membrana quando submetidas à carência de ácidos graxos	52
4.4 Alterações na razão GTP/ATP estão associadas à adaptação à carência de ácidos graxos em <i>B. subtilis</i>	55

RESULTADOS PARTE 2	59
4.5 Estabelecimento da metodologia para a triagem de pequenas moléculas químicas moduladoras de RelA.....	59
4.6 Triagem da biblioteca Spectrum Collection	64
4.7 Avaliação da droga salicilanilida como potencial inibidor da resposta estrigente.....	68
4.8 Avaliação da capacidade da salicilanilida em modular os níveis de (p)ppGpp	75
4.9 Caracterização de outros “hits” da biblioteca de compostos químicos.....	80
5. DISCUSSÃO	84
DISCUSSÃO PARTE 1	84
5.1 Papel da resposta estrigente durante a carência de ácidos graxos é conservada em bactérias	84
5.2 Resposta estrigente sem o acúmulo detectável de (p)ppGpp.....	86
5.3 Como a resposta estrigente preserva a viabilidade?	87
5.4 (p)ppGpp como coordenador central da biossíntese bacteriana	91
DISCUSSÃO PARTE 2	92
5.5 Estabelecimento da metodologia e triagens baseadas no resgate do crescimento	92
5.6 Salicilanilida reverte apenas parte dos fenótipos relacionados a produção de (p)ppGpp e aparenta ser incapaz de alterar os níveis de (p)ppGpp.....	94
5.7 Seleção de drogas com atuação preferencial sobre hidroxamato de arginina na triagem de compostos químicos: implicações para triagens futuras	96
REFERÊNCIAS	99
Anexo 1. Lista de Produção Bibliográfica	107

1. INTRODUÇÃO

1.1 Resposta estrigente

No meio ambiente, células bacterianas estão constantemente expostas a diversas condições ambientais adversas, sendo a principal delas a carência nutricional. De fato, acredita-se que os microrganismos no meio natural apresentem apenas breves e esporádicos períodos de crescimento, estando principalmente em estado de dormência, em uma condição similar à fase estacionária (Navarro Llorens et al., 2010; Gray et al., 2004).

Sabe-se hoje que a carência nutricional em bactérias causa uma alteração no metabolismo celular conhecida como resposta estrigente. Essa resposta é controlada pelo alarmônio (p)ppGpp (abreviação para guanosina pentafofato e guanosina tetrafofato), moléculas derivadas do GTP as quais são sintetizadas e se acumulam no interior celular durante a resposta estrigente (Figura 1). O acúmulo intracelular desses nucleotídeos sinalizadores produz uma ampla reprogramação da transcrição e do metabolismo, causando acentuada diminuição na síntese proteica e outras atividades biosintéticas (transcrição de RNAs estáveis, replicação do DNA, síntese da parede celular e de lipídeos) resultando em uma redução do crescimento. Além disso, a mudança no padrão de expressão gênica leva à ativação de respostas gerais e específicas a estresse que favorecem a sobrevivência da célula (Liu et al., 2015; Hauryliuk et al., 2015; Potrykus & Cashel, 2008).

Classicamente, o acúmulo de (p)ppGpp foi descrito em situações de carência de aminoácidos (Cashel & Kalbacher, 1970). Sabe-se hoje que além de seu papel na resposta à falta de aminoácidos, a resposta estrigente também está relacionada à carência de outros metabólitos importantes, como glicose, ácidos graxos (Seyfzadeh et al., 1993; Gong et al., 2002), fósforo (Spira et al., 1995) e ferro (Vinella et al., 2005). Essa regulação do crescimento celular dependente dos nutrientes é vital para a manutenção da viabilidade, uma vez que já foi demonstrado que a incapacidade de sintetizar o alarmônio (p)ppGpp em situações nutricionais

limitantes acarreta na morte celular (Kriel et al., 2012; O'Farrell, 1978; Nyström, 1994). A produção de (p)ppGpp é um fenômeno naturalmente observado também durante o início da fase estacionária de uma cultura microbiana, na qual a diminuição na quantidade de nutrientes do meio de cultura desencadeia a reação de produção do alarmônio (Hirsch & Elliott, 2002).

1.2 Proteínas RSH, SAS e síntese de (p)ppGpp

Os primeiros estudos sobre a resposta estrigente foram feitos com *Escherichia coli*, sendo a proteína RelA a primeira enzima a ser descoberta, capaz de produzir (p)ppGpp (Haseltine et al., 1972, Cashel & Gallant, 1969). Mais tarde, se descobriu outra sintetase em *E. coli*, a proteína SpoT, que na verdade se tratava de uma enzima bi-funcional, capaz tanto de hidrolisar como sintetizar (p)ppGpp (Xiao et al., 1991). Desde então, diversas outras proteínas produtoras de (p)ppGpp foram descobertas, batizadas como proteínas homólogas de RelA/SpoT, abreviadamente RSH (do inglês, RelA/SpoT homologues). Beta e gama-proteobactérias, possuem duas proteínas RSH: RelA e SpoT. Bactérias Gram-positivas, em contraste, geralmente possuem uma única RSH bifuncional, possuindo também uma ou mais sintetases minoritárias (Figura 2A). Aparentemente, com exceção das bactérias que compõe o superfilo PVC (Planctomyces, Verrucomicrobiota e Chlamidya), todos outros grupos bacterianos possuem proteínas capazes de sintetizar e hidrolisar ppGpp, demonstrando assim sua importância para o metabolismo bacteriano (Atkinson et al., 2011).

A síntese de (p)ppGpp por RelA ou SpoT é feita convertendo-se GTP e ATP em pppGpp, pela transferência de um pirofosfato do ATP à hidroxila ligada ao carbono 3' da ribose, liberando dessa forma AMP. Se um dos substratos for GDP ao invés de GTP o produto será ppGpp. A hidrólise de (p)ppGpp por SpoT ou RelA ocorre pela remoção do pirofosfato do 3' da ribose, gerando GTP (ou GDP) e pirofosfato como produtos, conforme ilustrado na Figura 1.

Figura 1. Representação das reações de síntese e degradação de (p)ppGpp pelas proteínas RSHs. (A) Conversão de GDP/GTP mais ATP em (p)ppGpp. (B) Esquema de síntese e hidrólise de (p)ppGpp em *E. coli*. Adaptado de Haurlyuk et al., 2015.

Os sítios catalíticos das proteínas RSH se encontram em sua região N-terminal (Figura 2A e 2B). Síntese e hidrólise de (p)ppGpp são atividades mutuamente exclusivas que ocorrem em domínios independentes na região catalítica das proteínas RSH (Hogg et al., 2004) (Figure 3). Apesar de possuir estrutura e organização semelhante às RSH bifuncionais, a enzima RelA de *E. coli* possui seu domínio de hidrólise degenerado, sendo incapaz de hidrolisar (p)ppGpp (Figura 2A e 2B). RelA como SpoT possuem além de seus domínios catalíticos um domínio regulatório, localizado na metade C-terminal da proteína (Figura 2B). Este domínio é necessário para que a atividade de síntese e hidrólise de (p)ppGpp seja modulada pelas condições nutricionais (Battesti & Bouveret, 2006; Hogg et al., 2004; Schreiber et al., 1991). O domínio regulatório seria capaz de sentir a carência nutricional e outros estresses, transmitindo essa informação para a porção catalítica no N-terminal. (Avarbock et al., 2000; Mechold et al.,

2002). Apesar de possuir a mesma nomenclatura, RelA de *Bacillus subtilis* não é ortóloga a RelA de *E. coli*, sendo muito mais semelhante a SpoT. Assim como SpoT, a proteína RelA de *Bacillus subtilis* é bifuncional como SpoT, possuindo dois sítios catalíticos funcionais (sendo capaz tanto de sintetizar como hidrolisar (p)ppGpp) e possuindo também um domínio regulatório (Hauryliuk et al., 2015) (Figura 2B). Tendo em vista possíveis confusões de nomenclatura, Atkinson et al., (2011) sugere a nomeação Rel para organismos que possuem apenas uma RSH longa.

Figura 2. (A) Proteínas RSHs e SAS, suas atividades e distribuições nas bactérias. (B) Comparação dos domínios das proteínas RSHs e SAS.

Além da enzima Rel, *B. subtilis* conta com duas sintetases minoritárias de (p)ppGpp: YwaC e YbjM, (Nanamiya et al., 2008). Estas proteínas, também chamadas de RelQ e RelP são classificadas como SAS (do inglês, *small alarmone synthetases*), são bem menores que RelA e

SpoT, possuem homologia com o domínio sintetase dessas proteínas, porém não possuem domínio regulatório, sendo sua atividade regulada a nível transcricional (Geiger et al., 2014). Ao passo que as proteínas RSHs parecem responder a estímulos de carência nutricional, as sintetases minoritárias de bactérias Gram-positivas, ainda pouco exploradas, parecem ter papel importante em danos relacionados ao envelope celular (Geiger et al., 2014) e choque alcalino (Nanamiya et al., 2008). Recentemente, se propôs um mecanismo regulatório de uma das sintetases minoritárias dependente da interação com RNAs, no qual a ligação de um RNAm inibiria a atividade de síntese da proteína (Beljantseva et al., 2017a).

Figura 3. Estrutura da porção catalítica de RelA de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, a primeira estrutura de uma RSH bifuncional resolvida, demonstrando as conformações de síntese e hidrólise. (A) Estrutura tridimensional da proteína com a conformação favorável a síntese de (p)ppGpp (B) Estrutura tridimensional da proteína com a conformação favorável a hidrólise de (p)ppGpp (C) Desenho ilustrativo mostrando as diferentes conformações proteicas assumidas por RelA. Adaptado de Hogg et al., 2004.

Recentemente, três grupos de pesquisa independentes resolveram a estrutura de RelA de *E. coli* interagindo com o ribossomo e ajudaram a elucidar o mecanismo de ativação de RelA

durante a carência de aminoácidos (Arenz et al., 2016; Loveland et al., 2016; Brown et al., 2016), assim como suas diferentes conformações adotadas (Figura 4).

Figura 4. Mecanismo proposto para ativação de RelA e produção de (p)ppGpp durante a carência de aminoácidos. NTD: domínio catalítico N-terminal. CTD: domínio regulatório C-terminal. Fonte: Arenz et al., 2016.

Em condições ótimas de crescimento, tRNAs carregados com aminoácidos são direcionados para o ribossomo através da interação com o complexo EF-Tu. Porém durante a carência de aminoácidos, ocorre um acúmulo de tRNAs descarregados, fazendo com que a síntese proteica esteja sujeita a erros, situação que pode ser letal para a célula (Nyström 1994). RelA é capaz de interagir com tRNAs descarregados livres através da região TGS (Figura 2B) mas também é capaz de interagir com o ribossomo contendo tRNAs descarregados, através da região CC/ATC (Figura 2B) do seu domínio regulatório (Figura 4). Ao interagir com o tRNA descarregado e/ou o ribossomo, RelA adota uma conformação “aberta”, na qual é capaz de sintetizar (p)ppGpp (Arenz et al., 2016; Loveland et al., 2016; Brown et al., 2016). Na ausência da

interação com ribossomo e tRNAs descarregados, RelA adota uma conformação “fechada”, em um estado autoinibitório devido a interação do domínio catalítico (CTD) e o domínio regulatório (NTD) (Hogg et al., 2004; Mechold et al., 2002; Arenz et al., 2016) e a produção de (p)ppGpp é impedida. Já durante a carência de ácidos graxos, a proteína responsável pela ativação da resposta estrigente em *E. coli* é a RSH bifuncional SpoT.

Durante a carência de ácidos graxos, a proteína ACP (proteína carreadora de acila) envolvida na elongação e síntese das cadeias de ácidos graxos, se torna desacilada. Nesse estado, SpoT é capaz de interagir com ACP através do seu domínio TGS (Figura 2B) e possivelmente estabilizada através de interação também com a região N-terminal (Battesti & Bouveret, 2006). Essa interação então mudaria a conformação da proteína de modo a favorecer a síntese de (p)ppGpp. A interação entre SpoT e ACP também foi detectada para *Pseudomonas aeruginosa* e *Legionella pneumophila* e é provável que esse mecanismo seja comum a todas as bactérias que possuem duas proteínas RSH, caso de alguns grupos de bactérias Gram-negativas (Battesti & Bouveret, 2009).

Em comparação, muito pouco se sabe sobre como bactérias Gram-positivas lidam com a carência de ácidos graxos. Existe um relato de tratamento de *Staphylococcus aureus* com cerulenina, no qual se observou que a carência de ácidos graxos não induziu a produção de (p)ppGpp (Greenwood & Gentry, 2002). Tal fato, juntamente com a observação de que, através de ensaios *in vitro*, as proteínas RSH de Gram-positivas são incapazes de interagir com ACP (Battesti & Bouveret, 2009), levantou a possibilidade que esse grupo de bactérias não dependeria da resposta estrigente e de (p)ppGpp para lidar com os efeitos da carência de ácidos graxos.

1.3 Reprogramação do metabolismo pela resposta estrigente

A reprogramação do metabolismo pela resposta estrigente ocorre de modo diferente em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A maior diferença se encontra na modulação ao nível

da transcrição: muitas das alterações causadas pela resposta estrigente em Gram-negativas ocorrem devido à interação direta com a RNA polimerase, em cooperação com DksA (Figura 5) (Dalebroux & Swanson, 2012). A interação do (p)ppGpp com a RNA polimerase pode tanto potencializar a transcrição como diminuí-la, de acordo com a natureza do promotor (Haugen et al., 2008).

Figura 5. Alteração da transcrição gênica por (p)ppGpp, via interação com DksA e RNA polimerase. Fonte: (Dalebroux & Swanson, 2012).

Entretanto, em Gram-positivas, a modulação da transcrição por (p)ppGpp é indireta e ocorre através da alteração dos níveis de GTP/ATP, consequência do aumento de (p)ppGpp (Krásný & Gourse, 2004; Srivatsan & Wang, 2008; Wolz et al., 2010). As alterações dos níveis de GTP e ATP possuem grande impacto durante a transcrição, pois a falta de disponibilidade de GTP ou ATP como nucleotídeo iniciador (posição +1) é capaz de afetar a taxa de transcrição de diferentes genes (Krásný & Gourse, 2004; Krásný et al., 2008). Por exemplo, genes reprimidos durante a carência de aminoácidos em *B. subtilis* se iniciam com o nucleotídeo G (posição +1), como por exemplo os que codificam proteínas ribossomais (Krásný et al., 2008). Devido à diminuição de GTP disponível (devido ao aumento de (p)ppGpp), a iniciação da transcrição desses genes é reduzida. Por outro lado, os níveis de ATP aumentam em resposta a (p)ppGpp, aumentando

assim a transcrição de genes que se iniciam com o nucleotídeo A, como por exemplo genes de biossíntese de aminoácidos e genes relacionados ao uso de fontes de nitrogênio alternativas a aminoácidos (Krásný et al., 2008). As alterações nos níveis de GTP controlam também o repressor global CodY, o qual reprime vários genes relacionados a fase estacionária e adaptação a condições de estresse (Sonenshein, 2005). Uma diminuição dos níveis de GTP faz com que o repressor se desligue do DNA, permitindo assim a transcrição dos genes sob seu controle (Figura 6).

Figura 6. Alteração da transcrição por (p)ppGpp em bactérias Gram-positivas. (A) Modulação dos níveis de ATP e GTP por (p)ppGpp. (B) Alterações na transcrição dependentes dos nucleotídeos iniciadores e pelo repressor CodY. Adaptado de Dalebroux & Swanson (2012).

Os genes regulados durante a ativação da resposta estrogênica, seja em bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas, são similares: genes relacionados à biossíntese de aminoácidos e genes relacionados à adaptação a condições de estresse (Krásný et al., 2008; Liu et al., 2015) têm seu nível de transcrição aumentado. De fato, os fatores de transcrição sigmaS e sigmaE, os quais promovem a transcrição de genes relacionados a estresse, são positivamente regulados por (p)ppGpp em *E. coli* (Battesti et al., 2011; Merrikh et al., 2009). Além disso, genes relacionados à

síntese de rRNA, proteínas ribossomais, tRNAs e fatores de tradução tem seus níveis de transcrição diminuídos (Krásný et al., 2008; Liu et al., 2015).

Todavia, a regulação do metabolismo por (p)ppGpp também ocorre por interação direta de (p)ppGpp com enzimas, como por exemplo a inibição da replicação do DNA através da inibição de DnaG, uma DNA primase (Wang et al., 2007). (p)ppGpp atua sobre a síntese proteica através da inibição do fator de início de tradução IF2 e EF-G (Milon et al., 2006) e interação com pequenas GTPases envolvidas na maturação do ribossomo (Feng et al., 2014; Corrigan et al., 2016). (p)ppGpp também é capaz de interagir diretamente com uma exopolifosfatase (PPX), regulando o metabolismo de polifosfato (Kuroda et al., 1997), com a enzima fosfo-N-acetilmuramil-pentapeptídeo translocase (Ishiguro & Ramey, 1976), controlando a biossíntese de peptídeoglicano, e com a enzima glicose 6-fosfato isomerase (Taguchi et al., 1978), controlando a glicólise. Já a alteração dos níveis de GTP e ATP por (p)ppGpp ocorre devido à inibição direta das enzimas Gmk e HprT, envolvidas na síntese de GTP (Kriel et al., 2012). Uma vez que essa inibição leva ao acúmulo de IMP, a via metabólica é direcionada então para a síntese de ATP. Todas essas alterações conjuntas resultam em adaptação e sobrevivência da bactéria (Figura 7).

A grande variedade de alvos proteicos passíveis de interação com uma mesma molécula é intrigante, o que levou ao questionamento da existência de um motivo proteico de interação com (p)ppGpp comum a todas essas proteínas. Todavia, aparentemente não existe um sítio consenso de interação de (p)ppGpp (Steinchen & Bange, 2016). O que se descobriu através do estudo de diferentes estruturas de proteínas co-cristalizadas com o alarmônio é que (p)ppGpp pode assumir variadas conformações e torções de modo a se ligar com diferentes alvos (Steinchen & Bange, 2016), sendo essas torções estabilizadas por íons de manganês e magnésio.

Figura 7. Resumo ilustrativo da modulação da fisiologia bacteriana por (p)ppGpp em seus diferentes níveis (replicação, transcrição, tradução e metabolismo). Fonte: Liu et al., 2015.

1.4 Consequências da ausência da resposta estrigente para a viabilidade celular

Células incapazes de produzir (p)ppGpp (como por exemplo cepas ppGpp(0), isto é, com deleção de todas as sintetases de (p)ppGpp) não crescem em meios mínimos sem a suplementação da maioria dos aminoácidos, ou em alguns casos, mesmo na ausência de apenas um aminoácido, uma vez que são incapazes de ativar os genes relacionados à biossíntese de alguns aminoácidos (sendo consideradas portanto auxotróficas) (Kriel et al., 2012; Kriel et al., 2014). Uma característica importante dessas cepas é que elas não só são incapazes de crescer em meios mínimos, como também sofrem de severa perda de viabilidade celular quando enfrentam situações de carência nutricional.

A perda da viabilidade celular durante carências nutricionais diversas tem sido reportada em diversas espécies bacteriana, como por exemplo *Bacillus subtilis* (Pulschen et al., 2017; Kriel et al., 2012; Kriel et al., 2014), *Escherichia coli* (Gong et al., 2002; Nyström, 1994), *Caulobacter crescentus* (Lesley & Shapiro, 2008), *Mycobacterium tuberculosis* (Primm et al., 2000), *Borrelia burgdorferi* (Drecktrah et al., 2015), *Enterococcus faecalis* (Chávez de Paz et al., 2012), *Staphylococcus aureus* (Geiger et al., 2010) e espécies marinhas de *Vibrio* (Ostling et al., 1995). Logo, fica evidente que a produção de (p)ppGpp não se trata apenas de uma questão de adaptação ambiental, e sim uma questão de sobrevivência.

Alterações metabólicas aparentam ocorrer indiferentemente da fonte de carência nutricional. A falta de ácidos graxos, aminoácidos ou glicose possuem potencial de gerar desordens fisiológicas em células bacterianas, capazes de afetar a viabilidade celular imediatamente ou a longo prazo (Figura 8). Como efeito geral, durante a carência nutricional, cepas selvagens interrompem seu crescimento e reduzem seu tamanho celular (Pulschen et al., 2017; Stott et al., 2015; Yao et al., 2012; Traxler et al., 2008), diminuem a síntese de RNA e taxa de síntese proteica (Seyfzadeh et al., 1993; Wille et al., 1975; Nyström, 1994; O'Farrell, 1978) e mantêm a viabilidade celular (Pulschen et al., 2017; Stott et al., 2015; Nyström, 1994; Kriel et al., 2012; Lesley & Shapiro, 2008). Em contrapartida, durante a carência nutricional, cepas incapazes de sintetizar (p)ppGpp ou com deleções/mutações em proteínas RSH específicas apresentam severas desordens metabólicas (Figura 8).

Figura 8. Alterações metabólicas enfrentadas por células durante a falta de nutrientes na ausência de (p)ppGpp. Imagem feita pelo autor. Referencias da Figura: [1] Pulschen et al., 2017; [2] Stott et al., 2015; [3] Yao et al., 2012; [4] Seyfzadeh et al., 1993; [5] Gong et al., 2002; [6] Wille et al., 1975; [7] Nysrtöm 1994; [8] Traxler et al., 2008; [9] Kriel et al., 2012; [10] O'Farrell, 1978; [11] Kriel et al., 2014; [12] Wang et al., 2007; [13] Tehranchi et al., 2010; [14] Sørensen et al., 1994; [15] Geiger et al., 2010; [16] Nyström 1994; [17] Boutte et al., 2012; [18] Lesley & Shapiro, 2008; [19] Ostling et al., 1995; [20] Fredriksson et al., 2007.

Em relação à carência de aminoácidos, células de *E. coli* incapazes de ativar a resposta estrigente falham em bloquear a síntese de proteínas, RNA e não reduzem seu volume celular (Nyström, 1994; Traxler et al., 2008), sofrem de terminação prematura da síntese proteica e erros de tradução (O'Farrell, 1978; Nyström, 1994; Sørensen et al., 1994), levando a uma severa perda de viabilidade celular e comprometimento da sobrevivência a longo prazo (Nyström, 1994). A replicação do DNA também é afetada: nas cepa selvagens, a replicação do DNA é diminuída ou para completamente, ao passo que na ausência de (p)ppGpp, a replicação do DNA continua (Tehranchi et al., 2010). A mesma desregulação na replicação do DNA foi descrita para células de *B. subtilis* incapazes de sintetizar (p)ppGpp (Wang et al., 2007). Adicionalmente, cepas ppGpp(0) de *B. subtilis*, quando privadas de amino ácidos, sofrem alterações na razão GTP/ATP, principalmente devido ao aumento de GTP. Além das alterações nos níveis de GTP/ATP, as células apresentam grande perda de viabilidade, ao passo que a carência de aminoácidos possui apenas efeitos bacteriostáticos em cepas selvagens (Kriel et al., 2012). Mesmo quando todos os aminoácidos requeridos para a cepa ppGpp(0) são suplementados no meio de cultura, as células ainda perdem viabilidade se a troca de meio de cultura (meio rico para um meio mínimo com suplementação de aminoácidos) ocorrer de modo repentino e imediato, demonstrando que cepas ppGpp(0) de *B. subtilis* também são incapazes de se adaptar a alterações bruscas nos níveis de nutrientes disponíveis para seu crescimento. (Kriel et al., 2014). Perdas abruptas de viabilidade celular também foram observadas durante a carência de aminoácidos para cepas de *S. aureus* incapazes de ativar a resposta estrigente (Geiger et al., 2010).

Considerando-se a privação de carbono, cepas $\Delta spoT$ de *C. crescentus* falham em diminuir o tamanho celular e frear seu metabolismo, porém também sofrem desregulação da replicação do DNA, levando ao surgimento de múltiplos eventos de replicação do DNA (Boutte et al., 2012; Lesley & Shapiro, 2008). Adicionalmente, após a iniciação inapropriada da

replicação do DNA, células $\Delta spoT$ também deixam de completar a duplicação do cromossomo, por causa de forquilhas de replicação travadas, colapso dessas forquilhas e severa perda de viabilidade (Lesley & Shapiro, 2008). Aumento da perda da viabilidade também foi observada em uma linhagem ambiental de *Vibrio* incapaz de ativar a resposta estrigente durante a carência de carbono (Ostling et al., 1995). Para *E. coli*, similarmente ao que já foi reportado para a carência de aminoácidos, (p)ppGpp é importante para evitar a perda de fidelidade na tradução durante a carência de carbono (Fredriksson et al., 2007), fator que pode ser responsável pela abrupta queda de viabilidade observada durante a privação de glicose (Nyström, 1994).

Alterações fisiológicas durante a carência de ácidos graxos na ausência de (p)ppGpp também tem sido reportadas. Para *C. crescentus*, cepas que não sintetizam (p)ppGpp, são incapazes de frear seu crescimento, sofrem de perturbação na replicação do DNA e entram em um estado referido como viáveis-mas-não-cultiváveis (VBNC), no qual as células são incapazes de crescer novamente e que persiste mesmo após a restauração da síntese de ácidos graxos, o que leva portanto a uma drástica redução na contagem de unidades formadoras de colônias (Stott et al., 2015). Em *E. coli*, células incapazes de ativar a resposta estrigente não reduzem seu tamanho celular e não bloqueiam a síntese de RNA durante a carência de ácidos graxos (Seyfzadeh et al., 1993; Yao et al., 2012), e sofrem de grande perda de viabilidade (Vadia et al., 2017). A deleção do gene *fabH* (envolvido na síntese de ácidos graxos) não é letal, porém se demonstrou que mutações em *fabH* e *spoT* são letais sintéticas (Yao et al., 2012), sugerindo que a carência de ácidos graxos na ausência de *spoT* leva à perda de viabilidade. Cepas $\Delta spoT$ também se tornam extremamente sensíveis a estresse oxidativo durante a carência de ácidos graxos, de modo que mesmo a exposição a lâmpadas fluorescentes comuns de laboratório (as quais emitem radiação UV extremamente fraca) aumentam drasticamente a morte celular (Gong et al., 2002).

O presente trabalho caracterizou as consequências da carência de ácidos graxos para linhagens de *B. subtilis* que não produzem (p)ppGpp (Pulschen et al., 2017). A carência de ácidos graxos normalmente possui efeitos bacteriostáticos, fazendo as células reduzirem seu crescimento e tamanho celular, porém mantendo a viabilidade. Todavia, na ausência de (p)ppGpp ou em cepas contendo mutações pontuais em RelA (RelA_{D264G}), células são incapazes de reduzir seu tamanho e frear seu metabolismo. Como consequência, as células sofrem severa perda de potencial de membrana, levando a uma rápida diminuição na viabilidade celular (Pulschen et al., 2017).

1.5 Resposta estrigente como alvo de novas drogas

Drogas capazes de induzir a carência nutricional, em condições que se comportam como compostos bacteriostáticos em cepas selvagens, se tornam bactericidas na ausência de (p)ppGpp, como por exemplo hidroxamato de arginina e hidroxamato de serina (Kriel et al., 2012; Nyström, 1994), cerulenina (Pulschen et al., 2017; Seyfzadeh et al., 1993) e mupirocina (Reiss et al., 2012), devido aos diversos eventos de descoordenação metabólica. Por essa razão, a descoberta de drogas que impeçam a síntese de (p)ppGpp pelas células bacterianas permitiria transformar compostos bacteriostáticos em bactericidas, potencializando seu efeito. (Drecktrah et al., 2015; Pulschen et al., 2017; Kriel et al., 2012; Primm et al., 2000; Nyström, 1994).

Todavia, é importante ressaltar que a sensibilidade aumentada de cepas incapazes de produzir (p)ppGpp não ocorre apenas com drogas que causam situações de carência nutricional, tendo sido observada freqüentemente com as mais diversas classes de antimicrobianos, em diversas espécies bacterianas diferentes (Abranches et al., 2009; Gaca et al., 2013; Khakimova et al., 2013; Corrigan et al., 2016; Wu et al., 2010; Geiger et al., 2014).

Apesar de não estarem relacionados a situações de privação nutricional, tal sensibilidade aumentada pode ser devido a perturbação metabólica e descoordenação de eventos celulares de biossíntese. Por exemplo, a droga ciprofloxacina (inibidor da DNA girase), em concentrações

normalmente bacteriostáticas, se torna bactericida em cepas de *S. aureus* incapazes de bloquear a síntese proteica, devido a mutações em GTPases que são controladas por (p)ppGpp (Corrigan et al., 2016). Logo, a incapacidade de bloquear a síntese proteica (por um mecanismo sob o controle de (p)ppGpp) faz com que a inibição da replicação do DNA por um antimicrobiano, antes apenas bacteriostático, se torne letal. Aumento da letalidade também foi observado com tratamento por Penicilina G, nesse caso, potencializando ainda mais seus efeitos bactericidas (Corrigan et al., 2016). Uma observação relacionada é que a síntese aumentada de (p)ppGpp, por reduzir a velocidade de crescimento, pode influenciar na sensibilidade a antibióticos, como demonstrado em cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) (Dordel et al., 2014).

Células sem (p)ppGpp são mais sensíveis a estresse oxidativo (Khakimova et al., 2013; Abranches et al., 2009; Nguyen et al., 2011) e aparentam acumular níveis mais elevados de moléculas oxidativas (Nguyen et al., 2011, Gaca et al., 2013). O papel de (p)ppGpp na homeostase redox ocorre através da ativação da expressão de fatores sigma S (Greenway & England, 1999), expressão de catalases e aumentando a resistência contra agentes oxidantes (Nguyen et al., 2011). Embora ainda um assunto controverso (Liu & Imlay, 2013), alguns autores propõem que certos antibióticos promovem a geração de estresse oxidativo (Khakimova et al., 2013; Nguyen et al., 2011), logo, a maior sensibilidade geral das bactérias que não produzem (p)ppGpp a antimicrobianos poderia estar relacionado, ao menos em parte, a sua incapacidade em lidar com estresse oxidativo.

A evolução, portanto, fez com que diversas vias metabólicas e sistemas de resposta fossem dependentes (diretamente ou indiretamente) de (p)ppGpp, uma solução elegante que permite que as células bacterianas coordenem todas suas respostas de modo eficiente e unificado. Todavia, como consequência, tal centralização de respostas adaptativas também faz com que as células bacterianas se tornem vulneráveis frente a praticamente toda condição

estressante quando (p)ppGpp está ausente, tornando portanto a resposta estrigente e (p)ppGpp alvos extremamente interessantes para o desenvolvimento de novas drogas. Tal interesse é potencializado pelo fato que (p)ppGpp já foi apontado como tendo papel importante também na formação de biofilmes, no fenômeno de virulência e persistência bacterianas e que em situações em que ocorre o aumento de (p)ppGpp, a resistência a antibióticos é magnificada (Chávez de Paz et al., 2012; Maisonneuve et al., 2013; Korch et al., 2003; Thompson et al., 2006; Nguyen et al., 2011). Adicionalmente, não foi detectada a existência de (p)ppGpp ou proteínas RSH em humanos (com exceção da proteína Mesh1, a qual contém apenas um domínio hidrolase de (p)ppGpp (Sun et al., 2010)).

Desde os últimos anos, avanços ocorreram em busca de moléculas que possam inibir a resposta estrigente. Como exemplo desses esforços foram descritos alguns inibidores baseados em compostos que pudessem mimetizar (p)ppGpp, como por exemplo a droga relacina (Wexselblatt et al., 2012) e seus análogos (Wexselblatt et al., 2010), as quais inibem RelA *in vitro* e são capazes de diminuir a produção de (p)ppGpp *in vivo*, embora mesmo em elevadas concentrações (da ordem de mM) não são capazes de abolir completamente a síntese de (p)ppGpp. Um peptídeo anti-biofilme (peptídeo 1018) foi proposto como tendo como alvo (p)ppGpp, levando à sua degradação *in vivo*, embora possuindo também um forte efeito bactericida (de la Fuente-Núñez et al., 2014). Todavia, nem a relacina nem o peptídeo 1018 passaram no critério de seleção de uma triagem para antagonistas de (p)ppGpp baseada no fenótipo de auxotrofia, que se baseava na expectativa de que uma molécula capaz de impedir a síntese de (p)ppGpp deveria tornar uma linhagem selvagem auxotrófica (Andresen et al., 2016b). Adicionalmente, o peptídeo 1018 foi testado em mais ensaios, e sua especificidade por (p)ppGpp, assim como sua capacidade de diminuir seus níveis *in vivo* mostraram-se questionáveis (Andresen et al., 2016a). Novos análogos de (p)ppGpp (como por exemplo ppApp) foram desenvolvidos, e embora não possuam eficiência *in vivo*, se mostraram potentes

inibidores de RelA de *E. coli* em ensaios *in vitro*. Estes análogos podem ser utilizados como precursores para o desenvolvimento de novos inibidores de proteínas RSHs (Beljantseva et al., 2017b). Por fim, outros análogos de (p)ppGpp, nomeados compostos AC e AB, demonstraram eficiência em inibir Rel_{msm} (RelA de *Mycobacterium smegmatis*) *in vitro* e com razoável eficiência, a produção de (p)ppGpp de *Mycobacterium smegmatis* *in vivo*, interferindo inclusive na formação de biofilme e viabilidade desse organismo (Syal et al., 2017).

Qualquer inibidor das proteínas RSHs que venha a surgir deve ser capaz de reduzir satisfatoriamente os níveis de (p)ppGpp *in vivo*. Existem situações em que fenótipos descritos relacionados à redução de (p)ppGpp (Ex: auxotrofia, tolerância a alguns antibióticos, aumento dos níveis de H₂O₂ e virulência em *E. faecalis*) são observados apenas mediante deleção de todas as sintetases de (p)ppGpp (Kriel et al., 2012; Nguyen et al., 2011; Gaca et al., 2013; Abranches et al., 2009). Nesses casos, mesmo pequenos incrementos de (p)ppGpp ou então a manutenção de níveis basais de (p)ppGpp são capazes de evitar a perda de viabilidade, a auxotrofia e impedir o acúmulo de H₂O₂ (Gaca et al., 2013; Traxler et al., 2008; Gaca et al., 2015) por exemplo. Isso pode explicar porque a droga relacina, apesar de ser capaz de reduzir parcialmente os níveis *in vivo* de (p)ppGpp, é incapaz de gerar um fenótipo de auxotrofia em células de *B. subtilis* (Andresen et al., 2016b). Consequentemente, ainda se carece da descoberta de inibidores mais potentes da resposta estrigente. Um caminho alternativo ao desenho de análogos para a descoberta de inibidores de (p)ppGpp são as triagens sem vieses (*unbiased*) de pequenas moléculas (Zlitni et al., 2009).

A proximidade evolutiva de *B. subtilis* com patógenos Gram-positivos (como *L. monocytogenes* e *S. aureus*) e a maior facilidade para manipulação desse organismo (tanto em termos de manipulação genética quanto em relação à segurança laboratorial) o torna um organismo excelente para a realização de triagens de compostos antimicrobianos. De fato, há exemplos de moléculas descobertas contra *B. subtilis* que foram posteriormente utilizadas como

ponto de partida para a otimização de compostos antimicrobianos com atividade contra patógenos, a exemplo de um promissor inibidor da proteína de divisão FtsZ com grande efeito em *S. aureus* e *S. aureus* MRSA (Haydon et al., 2008). Além disso, *B. subtilis* é rotineiramente utilizado com sucesso em triagens de compostos antimicrobianos (Stokes et al., 2005; Czarny et al., 2014) e estabelecimento de triagens validadas posteriormente para *S. aureus* (D'Elia et al., 2009).

Adicionalmente, as triagens sem vieses apresentam como vantagem a possibilidade de identificar sítios inibitórios não previstos nas moléculas alvo, frequentemente diferentes dos sítios catalíticos. No caso de RelA, acredita-se que o domínio regulatório da proteína pode ser um alvo tão interessante quanto o domínio catalítico na busca de inibidores. Além de seu potencial aplicado, as descobertas de pequenas moléculas desse tipo podem auxiliar a entender melhor a regulação de RelA, ainda não totalmente esclarecida.

2. OBJETIVOS

O presente projeto de doutorado teve como objetivos:

(I) Estudar o papel de (p)ppGpp na resposta de *Bacillus subtilis* à carência de ácidos graxos.

Objetivos específicos: (a) Verificar se a carência de ácidos graxos desencadeia a resposta estrigente em *B. subtilis*, através de medidas dos níveis internos de (p)ppGpp, GTP e ATP; (b) Avaliar os efeitos da depleção de ácidos graxos na viabilidade de células incapazes de ativar a resposta estrigente (cepas RelA_{D264G} e ppGpp(0)); (c) Avaliar qual sintetase de (p)ppGpp é importante durante a carência de ácidos graxos.

(II) Realizar uma triagem para identificar pequenas moléculas capazes de diminuir os níveis intracelulares de (p)ppGpp em *Bacillus subtilis*.

Objetivos específicos: (a) Estabelecer uma metodologia satisfatória para triagem de pequenas moléculas capazes de alterar os níveis internos de (p)ppGpp; (b) Triagem da biblioteca Spectrum Collection (2320 diferentes compostos químicos) fazendo-se uso da metodologia estabelecida em (a); (c) Validação da capacidade dos “hits” da biblioteca em alterar os níveis internos de (p)ppGpp de *B. subtilis*; (d) Avaliação da capacidade dos “hits” em alterar os fenótipos de células de *B. subtilis* com a resposta estrigente ativada (ex: resgate do crescimento, alteração na persistência, sensibilidade a antibióticos e esporulação); (e) Avaliação da capacidade dos “hits” de diminuir a resistência de *S. aureus* à vancomicina/oxacilina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cepas e construção dos mutantes

As cepas utilizadas nesse estudo estão listadas na tabela 1. Todas as cepas de *B. subtilis* são derivadas da cepa selvagem PY79. As transformações de *B. subtilis* foram realizadas pelo método de uma etapa descrito anteriormente (Kunst & Rapoport, 1995). Antibióticos, foram utilizados nas seguintes concentrações finais: 5 µg/mL para cloranfenicol, 1 µg/mL de eritromicina em adição de 25 µg/mL de lincomicina para MLS; 100 µg/mL para espectinomicina; 10 µg/mL para tetraciclina. Isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside (IPTG) e xilose foram utilizados nas concentrações finais 1 mM e 0,5%, respectivamente. Os plasmídeos utilizados nesse trabalho estão apresentados na tabela 2 e os oligonucleotídeos estão listados na tabela 3.

FG1316 foi criado transformando a cepa PY79 com DNA genômico da cepa EUB004 (Nanamiya et al., 2008), seguido da seleção com espectinomicina e eritromicina com lincomicina.

AP1 foi criado transformando a cepa PY79 com o DNA genômico da cepa GS85 (Schujman et al., 2001), seguido de seleção por cloranfenicol.

AP2 foi criado transformando a cepa AP1 com o DNA genômico da cepa FG1316 seguido da seleção com espectinomicina.

AP10 foi criado através da transformação da cepa PY79 com o DNA genômico das cepas RIK908 (Nanamiya et al., 2008), seguido de seleção por espectinomicina. Em seguida, a cepa resultante (FG1314) foi transformada com o DNA genômico da cepa RIK909 (Nanamiya et al., 2008), seguido de seleção por cloranfenicol.

AP12 foi criado através da transformação da cepa AP11 com o DNA genômico da cepa FG1316, seguido de seleção por espectinomicina e eritromicina com lincomicina.

AP6 foi criada através da transformação da cepa AP10 com o DNA genômico da cepa RIK900 (Nanamiya et al. 2008), seguido da seleção com eritromicina com lincomicina

AP15 foi criado através da transformação da cepa AP6 com o plasmídeo pCm::Tc, para trocar a resistência de cloranfenicol para tetraciclina (Steinmetz & Richter, 1994). Em seguida, a cepa resultante (AP14) foi transformada com o DNA genômico da cepa FG173, seguido de seleção por cloranfenicol.

AP16 foi criada através da transformação da cepa FG1316 com o DNA genômico da cepa FG173, seguido de seleção por cloranfenicol.

AP23 foi criada através da transformação da cepa PY79 com o DNA genômico da cepa RIK900 (Nanamiya et al., 2008), seguido de seleção por eritromicina com lincomicina.

AP9 foi criado através da transformação da cepa PY79 com o plasmídeo PDR111 contendo a variante *rel*_{BS}^{H77A}, seguido de seleção com espectinomicina. Em seguida, a cepa resultante (AP7) foi transformado com o DNA genômico da cepa FG1316 e seleção por eritromicina em adição de lincomicina. A cepa resultante (AP8) foi então transformado com o DNA genômico da cepa FG1318, seguido de seleção com cloranfenicol.

Os sequenciamentos de DNA foram feitos utilizando-se o kit Big Dye Terminator (Applied Biosystem) utilizando o protocolo recomendado pelo fabricante, seguido de purificação com precipitação por etanol 100%. As amostras purificadas foram encaminhadas ao serviço de sequenciamento no Instituto de Química da USP.

Tabela 1. Lista de cepas utilizadas no projeto

Cepa	Código	Genótipo da cepa	Origem
PY79	FG1	Cepa selvagem <i>B. subtilis</i>	Youngman, 1983
Rel _{BS} ^{D264G}	FG1316	$\Delta rel_{BS}::erm$ aprE::Pspac rel _{BS} ^{D264G} spc	Estoque Lab
$\Delta relQ$	FG1317	$\Delta relQ::spc$	Estoque Lab
$\Delta relP$	FG1318	$\Delta relP::cat$	Estoque Lab
MinD-YFP	FG173	amyE::Pxyl-yfp-minD cat	Estoque Lab
Pxyl-fabF	AP1	fabF Ω Pxyl-fabF cat	Esse trabalho
Pxyl-fabF Rel _{BS} ^{D264G}	AP2	$\Delta rel_{BS}::erm$ aprE::Pspac- } rel _{BS} ^{D264G} spc fabF Ω Pxyl-fabF cat	Esse trabalho
ppGpp(0)	AP6	$\Delta rel_{BS}::erm$ $\Delta relQ::spc$ $\Delta relP::cat$	Esse trabalho
Rel _{BS} Rel _{BS} ^{H77A}	AP7	amyE::Pspank- } rel _{BS} ^{H77A} spc	Esse trabalho
Rel _{BS} ^{H77A} intermediária	AP8	$\Delta rel_{BS}::erm$ amyE::Pspank- } rel _{BS} ^{H77A} spc	Esse trabalho
Rel _{BS} ^{H77A}	AP9	$\Delta rel_{BS}::erm$ amyE::Pspank- } rel _{BS} ^{H77A} spc $\Delta relP::cat$	Esse trabalho
$\Delta relQ$ $\Delta relP$	AP10	$\Delta relQ::spc$ $\Delta relP::cat$	Esse trabalho
$\Delta codY$	AP11	$\Delta codY$	Esse trabalho
Rel _{BS} ^{D264G} $\Delta codY$	AP12	$\Delta rel_{BS}::erm$ aprE::Pspac rel _{BS} ^{D264G} spc $\Delta codY$	Esse trabalho
ppGpp(0) cm::tet	AP14	$\Delta rel_{BS}::erm$ $\Delta relQ::spc$ $\Delta relP::tet$	Esse trabalho
ppGpp(0) MinD-YFP	AP15	amyE::Pxyl-yfp-minD cat $\Delta rel_{BS}::erm$ $\Delta relQ::spc$ $\Delta relP::tet$	Esse trabalho
Rel _{BS} ^{D264G} MinD-YFP	AP16	$\Delta rel_{BS}::erm$ aprE::Pspac rel _{BS} ^{D264G} spc amyE::Pxyl-yfp-minD cat	Esse trabalho
Δrel_{BS}	AP23	$\Delta rel_{BS}::erm$	Esse trabalho

Tabela 2. Lista de plasmídeos utilizados nesse trabalho

Plasmídeo	Descrição	Origem
pDR111	Vetor integrativo em amyE sobre o controle de Physpank (IPTG)	Ben-Yehuda et al., 2003
pCm::Tc	Plasmídeo para troca de resistência a antibióticos, cm::tet	Steinmetz and Richter, 1994

Tabela 3. Lista de oligonucleotídeos utilizados nesse trabalho

Oligo	Sequência (3'-5')	Descrição
FG556	CGTAGCTAGCATTTGGCTATTTGAACTTCTGC	Fw RelA NheI
FG557	TAACGCATGCAACGCTTGCTTCTGTTACTCGC	Rv RelA SphI
FG562	CGGGAAACGGTCTGATAAGA	Rv ponta LacI (sequenciamento)
FG563	GGCAAGAACGTTGCTCGAGG	Pspank pDR111 (sequenciamento)
FG564	CGCTTGACCATAAGCTTCGG	RelA Fw 3000 (sequenciamento)
FG565	CCTTGCGGGTATGGCTTAGG	RelA Rv 2000 (sequenciamento)
FG566	GAAACTGGTTCGGAATTGGG	YbjM Fw
FG567	ATCTCCTTTTGATGATACGG	Ybjm Rv
FG568	GTATCTTCCACGACATCCGCCAAAAATCCGCCCGCG	Rv RelAH77A (Mut. pontual)
FG569	CGCGGGCGGATTTTTGGCGGATGTCGTGGAAGATAC	Fw RelAH77A (Mut. Pontual)
FG579	CTGACCGGATGGCCTTTTTCGCG	Anterior pspank (sequenciamento)
FG580	AGAGCTTTATGTCGATGAG	Interno 3700 (sequenciamento)
FG596	GAAATTTACGATTTGTTGGC	RelA Fw 3561
FG597	AACCCCTTTAGTTCATGACG	RelA Rv 2179
FG598	TGAAGCTTGCCCAACATCC	RelA Fw 2950
FG655	TTCTGCTCCCTCGCTCAG	oJM028
FG656	CAGGGAGCACTGGTCAAC	ojM029
FG657	GCGGTATCTTGTGAAATAAGGG	UpFw 1000 ywaC
FG658	CTGAGCGAGGGAGCAGAAGTCTGCTGCAAGGTTCTA	Misto_upRv+Marker
FG659	TTGACCAGTGCTCCCTGAAGACGGCACCCAAGTGCC	Misto_dwFw+Marker
FG660	GAGTGCCCTATTGATCGCCTC	DwRv 1000 ywaC
FG661	GATATCCTTCCGATTGTTGAAG	CodY up 600
FG662	AAGACGCGAGGATTCTTGATC	CodY down 600

3.2 Condições de crescimento e ensaios de viabilidade durante a carência de ácidos graxos

A carência de ácidos graxos foi causada através do tratamento das células com a droga cerulenina (Cayman chemical, Michigan). As células foram crescidas em meio Luria-Bertani (LB) até atingirem uma medida em Klett de 40 ($OD_{600nm} \sim 0,4$). Essa cultura foi então utilizada

para inocular um novo frasco na contagem de $2\text{-}5 \times 10^6$ células por mL e cerulenina era adicionada na concentração de $10 \mu\text{g/mL}$. Ensaios realizados com a cepa $\text{Rel}_{\text{Bs}}^{\text{D264G}}$ foram sempre realizados adicionando-se 1mM de IPTG (concentração final) para a indução da variante. Para os ensaios com as cepas Pxyl-fabF , o pré-inóculo foi crescido em meio LB contendo $0,2\%$ de xilose até uma DO de aproximadamente $0,4$. Então, cerca de 1 mL era recolhido e lavado duas vezes (centrifugação 3 min a $4000 \times g$) e inoculado em frascos novos contendo LB + cloranfenicol ($5 \mu\text{g/mL}$) sem a presença de xilose, causando dessa forma a carência de ácidos graxos por falta de expressão do gene *fabF*. Para os ensaios de viabilidade, alíquotas eram tomadas, diluídas em série e plaqueadas em meio LB. As placas eram então incubadas a 37°C *overnight* para a estimativa de UFC/mL. Para os ensaios com decoinina, a droga (Cayman chemical, Michigan) foi adicionada na concentração final de $250 \mu\text{g/mL}$ para a cepa $\text{ppGpp}(0)$ e cepa selvagem (*wild-type*) e $50 \mu\text{g/mL}$ para a cepa $\text{Rel}_{\text{Bs}}^{\text{D264G}}$, juntamente com a adição de cerulenina e a viabilidade foi estimada após 120 minutos. Para os ensaios de complementação por FAME, as culturas foram preparados pela adição de BSA ($10 \mu\text{g/mL}$, concentração final), cerulenina ($10 \mu\text{g/mL}$, concentração final) e FAME ($2,5 \mu\text{g/mL}$, concentração final) e a viabilidade estimada após 120 minutos de tratamento. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

3.3 Mudanças na taxa de crescimento (temperaturas menores e meio mínimo) e ensaio de sobrevivência

Para avaliar a sobrevivência durante a carência de ácidos graxos a menores temperaturas, células da cepa $\text{ppGpp}(0)$ foram crescidas em meio LB até uma $\text{DO}_{600\text{nm}} \sim 0,4$. Essa cultura foi então utilizada para inocular um novo frasco, a temperatura ambiente ($\sim 23^\circ\text{C}$) para uma contagem inicial de $2\text{-}5 \times 10^6$ células por mL, juntamente com cerulenina ($10 \mu\text{g/mL}$, concentração final). O conteúdo desse frasco foi então dividido em dois tubos: um foi incubado a 37°C e outro a 23°C . A sobrevivência foi estimada por UFC/mL (usando placas LB) após 60

minutos e 120 minutos. Para avaliar a sobrevivência das células em meio mínimo suplementado com aminoácidos, células foram crescidas em meio TSS (composto por 0,2% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,4% de K_2HPO_4 , 0,6% de KH_2PO_4 , 0,1% de citrato de sódio. $2\text{H}_2\text{O}$, 0,5 % de glucose, 0,01% de triptofano, 0,05% de casaminoácidos 0,1% de MgCl_2 , 0,05% de extrato de levedura, 0,001% de FeCl_3) até uma $\text{DO}_{600\text{nm}} \sim 0,2$. Essa cultura foi então utilizada para inocular um novo frasco de modo que a contagem inicial de células estava em torno de $2-5 \times 10^6$ células por mL e então tratados com cerulenina (concentração final de 10 $\mu\text{g/mL}$ e 20 $\mu\text{g/mL}$). A sobrevivência foi avaliada por contagem de UFC/mL. Todos ensaios foram realizados em triplicata.

3.4 Preparação de FAME

Metil-esters de ácidos graxos (do inglês, *fatty acid methyl esters* (FAMES)) foram extraídos de células de *B. subtilis* de acordo com um procedimento modificado, descrito anteriormente por Rogozinski (Rogozinski, 1964) e realizado por Sastre e colaboradores (Sastre et al., 2016). Uma cultura de *B. subtilis* da cepa selvagem (PY79) foi crescida em 500 mL de meio LB até uma $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de aproximadamente 0,5, seguido de centrifugação a $4000 \times g$ por 20 minutos e ácidos graxos livres foram extraídos e transesterificados através do aquecimento do pellet de células em ácido sulfúrico 10% em 2 mL de metanol por 2 h a 80°C . Os FAMES formados na solução metanol/ácido sulfúrico foram extraídos com n-hexano (1 mL) e água Milli-Q (1 mL) através de vortexação e centrifugação de (5 min a $3000 \times g$) para a recuperação da fase orgânica superior, recolhida com o auxílio de pipeta. A amostra foi secada sobre um fluxo de gás nitrogênio, pesada para a estimativa de massa extraída e então ressuspendido em etanol 100% e armazenado a -20°C até seu uso.

3.5 Microscopia de fluorescência

As imagens de microscopia de fluorescência foram adquiridas utilizando-se o Nikon Eclipse TiE microscope, equipado com uma objetiva Plan APO VC Nikon 100X objective

(NA51.4), um 25-mm SmartShutter e uma câmera Andor EMCCD i-Xon. Para observações em fluorescência, as cepas foram crescidas e quando necessário, cerulenina adicionada na concentração final de 10 $\mu\text{g/mL}$. As células eram concentradas 10x em meio LB fresco através de centrifugação quando necessário. Para a visualização de membrana e danos gerados pela carência de ácidos graxos, utilizou-se 50 $\mu\text{g/mL}$ de FM1-43 (Invitrogen) e 10 $\mu\text{g/mL}$ de iodeto de propídio. Ao menos 200 células de cada tratamento e condição experimental foram analisadas. Para a estimativa do tamanho celular, cerca de 200 células de cada cepa foram medidas utilizando-se o software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Para a observação da parede celular e possíveis danos a essa, as células foram resuspendidas em 50 $\mu\text{g/mL}$ de FM4-64 (Invitrogen) para marcação da membrana e 10 $\mu\text{g/mL}$ de WGA-Alexa Fluor 350 (Invitrogen) para a marcação da parede celular. Para a localização de MinD, as células foram crescidas em meio LB juntamente 0,5% de xilose para a expressão da fusão MinD-YFP até a $\text{DO}_{600\text{ nm}} \sim 0,4$ e então, quando necessário, privadas de ácidos graxos do mesmo modo que descrito anteriormente. Todas as microscopias foram realizadas com as células imobilizadas em pads de agarose (LB 25%) solidificados com 1,5% (w/vol) agarose.

3.6 Ensaios de potencial de membrana

Para os ensaios de potencial de membrana, as células foram crescidas e privadas em ácidos graxos conforme descrito anteriormente, porém utilizando-se LB 25% (para redução da autofluorescência do meio LB), suplementado com 0,2% de glicose e 100 mM de KCl (Strahl and Hamoen, 2010). Um comportamento similar de sobrevivência frente ao tratamento com cerulenina foi obtido com células crescidas em LB 25% e LB 100%. Após 60 minutos ou 120 minutos de tratamento por cerulenina, o indicador de potencial de membrana DiSC3(5) (Invitrogen) foi adicionado na concentração final de 1 mM, e os frascos permaneceram sobre agitação a 37°C por 10 minutos adicionais, permitindo assim o transporte do marcador para o

interior das células. Após esse período, as células foram recolhidas e aplicadas a um pad de agarose para observações sobre o microscópio de fluorescência.

3.7 Medidas de TLC

Um meio de baixa concentração de fosfato (LPM), descrito por Vasantha and Freese (Vasantha & Freese, 1980) foi utilizado para os ensaios. O meio LPM é composto por 50 mM MOPS pH 7,0, 0,5% glicose, 0,5 mM K_3PO_4 , 10 mM $(NH_4)SO_4$, 0,1% glutamato, 0,01% triptofano, 0,01% fenilalanina, 0,5% casaminoácidos, 2 mM $MgCl_2$ e elementos traços. As cepas foram crescidas *overnight* em meio LB a 37°C e subsequentemente inoculados em meio LPM para uma DO_{600nm} inicial de ~0,1. As culturas foram então incubadas a 37°C com agitação até a DO_{600nm} ~0,5 e então diluídas até uma DO_{600nm} = 0,1. ^{32}P -orthophosphoric acid (8500-9120 Ci.mmmole⁻¹; 5 mCi/mL; Perkin Elmer) foi adicionado até a concentração final de 100 lCi/mL e o crescimento foi continuado por 2 h. Então, as culturas foram diluídas novamente para uma DO_{600nm} de 0,1 (mantendo a concentração do composto radioativo, adicionados ao meio de cultura) e então dividido em frações para os diferentes tratamentos. A extração e análise dos nucleotídeos foi realizada seguindo protocolos publicados anteriormente (Schneider et al., 2003) com pequenas modificações. Resumidamente, amostras de 20 µL de cada cultura tratada foram recolhidas em tempos variados, misturando com 4 µL de ácido fórmico (12 M) resfriado em gelo e mantido no gelo por 30 minutos. Subsequentemente, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 15 min a 20.000 ×g. Alíquotas do sobrenadante foram recuperadas e esgotadas (~10 µL) nas placas de TLC (polyethyleneimine (PEI)cellulose F thin layer chromatography (TLC, Merck)). Para a separação otimizada de ppGpp e pppGpp, as corridas foram realizadas em solução 1,5 M KH_2PO_4 (pH 3,4). Para a separação otimizada de GTP e ATP, as corridas foram realizadas em solução 0,85M KH_2PO_4 (pH 3,4). Após a corrida, as placas foram então colocadas em um Storage Phosphor Screen e analisadas utilizando-se o scanner Typhoon (Molecular Dynamics Typhoon Scanner). A quantificação dos “spots” foi realizada posteriormente

utilizando-se o programa GelPro Analyzer. As quantificações dos níveis de GTP e ATP foram realizadas utilizando-se as corridas correspondentes a três ensaios independentes, realizados em dias distintos. Para a indução da carência de ácidos graxos, 20 µg/mL (concentração final) de cerulenina foram utilizados.

3.8 Medidas de taxa de síntese proteica

As cepas testadas foram crescidas em meio salino Spizizen suplementado com 0,5% glicose, 0,01% triptofano, 0,01% felinalanina, 0,05% casaminoácidos, e elementos traços a 37 °C com agitação até uma OD₆₀₀ ~ 0,5 e então diluídas até uma OD₆₀₀ = 0,1. Cada cultura foi então dividida em dois, e uma das frações foi suplementado com cerulenina 20 µg/mL. Então, alíquotas de 0,5 mL foram recolhidas nos tempos indicados e incubados ³⁵S-L-metionina e ³⁵S-L-cisteína (³⁵S EasyTag™ EXPRESS³⁵S Protein Labeling Mix, Perkin Elmer) na concentração final de 4,4 µCi.mL⁻¹ por 5 min a 37 °C. As reações foram terminadas com a centrifugação e ressuspensão do pellet em 0,2 mL de ácido tricloroacético 10%. Então, as amostras foram mantidas em gelo por 20 minutos e subsequentemente centrifugadas. Os pellets foram lavados repetidamente com 50 mM Tris-HCl pH 8,0 até que não se detectou mais radiação no sobrenadante. Finalmente, a radioatividade dos pellets foi determinada por contagem em cintilador.

3.9 Estabelecimento da metodologia da triagem

A linhagem selvagem e cepas com deficiência na síntese de (p)ppGpp foram testadas quanto às suas respostas frente a L-arginina-hidroxamato (HRX). As linhagens foram crescidas em meio LB a 37°C sob agitação e utilizados como pré-inóculos em frascos contendo LB e HRX com diferentes concentrações das drogas (Figura 20). A cada hora, uma alíquota foi retirada do frasco e a leitura da DO_{600 nm} foi realizada, durante o período de 5 horas.

O desenho experimental para os cálculos do valor de Z' (Zhang et al., 1999) seguiu as sugestões para validação de triagens de pequenas moléculas químicas de pesquisadores da universidade Harvard e disponibilizado online (<http://harvard.eagle-i.net/i/0000012c-752efba6-c437-ff0b80000000>). O experimento foi montado dividindo-se uma placa de 96 poços em duas partes: controles positivos de um lado e controles negativos do outro lado, de modo a ter 30 repetições da mesma situação por experimento, permitindo um cálculo robusto do valor de Z' (Figura 21). A cada poço foram adicionados 100 µL de meio LB + L-arginina-hidroxamato (0,5 mM concentração final) inoculado com a respectiva linhagem (para o controle positivo, *wild-type* e para o controle negativo, a cepa ppGpp(0)). As placas de 96 poços foram então incubadas a 37°C em agitador orbital a 250 rpm e a leitura da placa foi realizada de hora em hora com o uso do leitor de placas Epoch (Biotek).

3.10 Montagem das placas para a triagem de compostos químicos

A biblioteca de 2320 compostos (Spectrum Collection) a ser utilizada nesse estudo foi adquirida da MicroSource Discovery Inc. (Groton, CT). A biblioteca consiste em sua maioria de moléculas atualmente usadas na terapêutica humana ou drogas aprovadas pela FDA (*Food and Drug Administration*), além de compostos naturais. A lista dos compostos da biblioteca pode ser encontrada em www.msdiscovery.com/spect.html. Os compostos se encontram em dimetil sulfóxido (DMSO) na concentração de 10 mM. Utilizou-se um pipetador automático (robô Eppmotion, Eppendorf) para diluir as drogas até a concentração final de trabalho (20 µM), que então foram distribuídas em placas de 96 poços estéreis. As placas foram então armazenadas em -20°C até seu uso para a realização da triagem.

3.11 Ensaios de concentração inibitória mínima (MIC)

Para os ensaios de MIC, as respectivas cepas testadas foram crescidas em meio LB a 37°C até a DO_{600nm} final de 0,5. Após atingirem a DO desejada, 100 µL de cada cultura foram

aplicadas em placas LB solidificadas com Agar, com alturas similares (Aproximadamente 0,5 cm), conforme recomenda o fabricante das fitas de MIC (M.I.C.E. Evaluator, ThermoFischer Scientific). As placas foram então secadas em fluxo laminar e após secas, as fitas de avaliação foram adicionadas as placas com o auxílio de uma pinça estéril e as placas foram incubadas a 37°C por 24 a 72 h, dependendo da velocidade do crescimento da cepa. Após o crescimento, o MIC foi avaliado conforme recomenda o fabricante (M.I.C.E. Evaluator, ThermoFischer Scientific).

3.12 Extração de nucleotídeos para análise por HPLC – MS/MS (Amazon, Bruker)

Para análise por MS/MS, diversas metodologias foram aplicadas a fim de se obter um bom extrato de nucleotídeos, sendo algumas metodologias idênticas as propostas por alguns artigos (Buckstein et al., 2008). Porém, muitas das mesmas se mostraram metodologias exaustivas e pouco práticas, sendo que algumas tomam cerca de 3 dias até a extração completa dos nucleotídeos (Buckstein et al., 2008). Dessa forma, estabeleceu-se uma metodologia mais simplificada para a extração, baseado em diferentes protocolos existentes na literatura, uma vez que não existe um consenso da metodologia ideal.

Células de *B. subtilis* foram crescidas em frascos com volumes de cerca de 50 mL a 37°C e 200 rpm. Após atingirem a DO desejada, as células foram tratadas com HRX nas concentrações de 0,5 mM e quando desejado e Salicilanilida foi adicionado na concentração final de 20 µM. Para os controles, foi adicionado DMSO na concentração final de 20 µM.

Para a extração, as células de cada crescimento foram transferidas para tubos cônicos de centrifugação de 50 mL (porcionados em duas partes de 25 mL) contendo 2,5 mL de ácido fórmico 1 M e imediatamente congelados utilizando-se nitrogênio líquido. Após o congelamento, as células foram descongeladas vagarosamente em gelo e vortexadas, para a lise celular. Após a lise, as células foram centrifugadas a 5000 rpm, por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi recolhido e filtrado utilizando-se uma coluna Cutoff de 10 kDa. O filtrado foi

então passado em uma coluna de Q-Sepharose para a ligação dos nucleotídeos. Após a passagem do sobrenadante na coluna (Cerca de 2 h), os nucleotídeos foram eluídos utilizando-se uma solução de formiato de amônio 1 M. Após a eluição, os nucleotídeos em suspensão foram congelados utilizando-se nitrogênio líquido e então liofilizados *overnight*. Após a liofilização, o liofilizado foi ressuspendido em cerca de 100 µL de água Milli-Q para então injeção no HPLC-MS/MS (Amazon, Bruker).

3.13 Corrida e análise dos nucleotídeos em HPLC-MS/MS

A corrida foi realizada em um HPLC (Shimatzu) acoplado a um espectrômetro de massas MSMS (Amazon, Bruker) na Central Analítica do Instituto de Química, Universidade de São Paulo. A detecção dos compostos foi realizada através do espectrômetro de massas, utilizando-se fragmentação sequencial para análise dos íons-filhos gerados. Foi utilizado para as corridas a coluna C18 (GE healthcare) e também a coluna ZIC-HILIC (GE healthcare). Os padrões (GDP, ADP, GTP, ATP, ppGpp e pppGpp) para a corrida foram injetados em concentrações de aproximadamente 10 µM para a validação da metodologia, e dessa forma para a anotação dos tempos de eluição de cada composto. Um exemplo dos resultados obtidos está demonstrado na Figura 31.

3.14 Extração de nucleotídeos para análise por HPLC (Akta pure, GE)

Para a análise dos nucleotídeos por HPLC, culturas de *B. subtilis* foram crescidas em frascos, em volumes de aproximadamente 30 mL a 37°C, 200 rpm. Após atingirem a DO_{600nm} desejada, as células foram tratadas com HRX nas concentrações de 0,5 mM ou 2,5 mM (Ver resultados) quando desejado e salicilanilida foi adicionado na concentração final de 20 µM. Para os controles, foi adicionado DMSO na concentração final de 20 µM. Para a extração, as células foram primeiramente fixadas adicionando-se 3 mL de formaldeído 1,9% e incubadas no gelo por 25 minutos. Após a fixação, os conteúdos dos frascos foram transferidos para tubos

cônicos de 50 mL e centrifugados a 4.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e descartado utilizando-se um pipetador, e então o pellet foi ressuspensionado em 600 µL de ácido fórmico 1 M. A suspensão foi então vortexada vigorosamente por cerca de 20 segundos, e mantida no gelo por 30 minutos adicionais. Após a lise ácida, os conteúdos dos frascos foram transferidos para eppendorfs de 2 mL, os quais foram centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então recolhido e filtrado em falcons Cutoff de 10 kDa, para remoção de impurezas, a 4.000 rpm por 5 minutos a 4°C. O conteúdo filtrado foi então ajustado para o volume final de 2 mL com água Milli-Q estéril e uma etapa final de centrifugação a 10.000 rpm, 5 min a 4°C foi realizada. O sobrenadante foi então injetado em um loop de 2 mL no equipamento HPLC Äcta pure (GE healthcare).

3.15 Corrida e análise dos nucleotídeos por HPLC

A corrida foi realizada em um HPLC Äcta pure (GE healthcare), no Instituto de Física da Universidade de São Paulo, Campus II, São Carlos. Para a detecção dos compostos, foi utilizado absorbância a 260 nm. Foi utilizado para as corridas a coluna de troca iônica Mono Q 5/50 GL (GE healthcare). Os Buffers de corrida utilizados foram: Buffer A (Tampão inicial); 20 mM Tris-HCl em pH 8,0 e Buffer B (Tampão de eluição); 20 mM Tris-HCl e 1 M NaCl em pH 8,0. Por um período de 30 minutos, a concentração do Buffer B foi aumentado em 1% por minuto, de modo a realizar uma rampa. Os padrões (GDP, ADP, GTP, ATP, ppGpp e pppGpp) para a corrida foram injetados em concentrações de aproximadamente 10 µM para a validação da metodologia, e dessa forma para a anotação dos tempos de eluição de cada composto. Após a validação da metodologia e observação da boa separação dos compostos na coluna (Figura 32A), prosseguiu-se com a análise dos extratos celulares.

4. RESULTADOS

RESULTADOS PARTE 1

4.1 Inibição da biossíntese de ácidos graxos é letal na ausência de (p)ppGpp

Para estudar o papel da resposta estrigente durante a carência de ácidos graxos em *B. subtilis*, comparou-se os efeitos do tratamento com cerulenina, um inibidor bem caracterizado da enzima de síntese de ácidos graxos FabF (Schujman et al., 2001, Trajtenberg et al., 2014), sobre a viabilidade de uma cepa selvagem (PY79) e uma cepa incapaz de produzir (p)ppGpp (ppGpp(0)). A cepa ppGpp(0) não possui nenhum dos genes que codificam as sintetases de (p)ppGpp em *B. subtilis* (RelA, RelP e RelQ) e sua taxa de crescimento e contagem de células viáveis é similar ao observado para a cepa selvagem em condições de crescimento em meio rico (Figura 9A e 9B). Conforme reportado anteriormente (Wille et al., 1975), o tratamento de cepas selvagens de *B. subtilis* com cerulenina leva a uma rápida parada do crescimento, porém as células mantiveram a viabilidade, conforme avaliado por ensaio de formação de colônias (Figura 9C). Em contraste, a viabilidade da cepa ppGpp(0) foi dramaticamente reduzida, para aproximadamente 0,01% do valor inicial após duas horas de tratamento com cerulenina em meio rico (LB) a 37°C (Figura 9C). A morte da cepa ppGpp(0) em resposta ao tratamento com cerulenina também ocorre em condições em que as células apresentam menores taxas de crescimento, como em LB a 23°C, ou utilizando-se meio mínimo com glicose suplementado com aminoácidos (Figura 10), embora nesses casos a perda de viabilidade seja menor. Esses resultados indicam que (p)ppGpp é importante para a adaptação e sobrevivência durante a interrupção da síntese de lipídeos, em especial quando a taxa de crescimento é elevada.

Figura 9. (p)ppGpp é importante para a manutenção da viabilidade de *B. subtilis* durante a carência de ácidos graxos. (A) Densidade ótica (medida por Klett) de diferentes cepas, tratadas ou não com cerulenina. (B) Viabilidade (UFC/mL) de diferentes cepas sem tratamento por cerulenina e (C) após tratamento com 10 µg/mL de cerulenina.

Para determinar qual das três (p)ppGpp sintetases de *B. subtilis* é responsável pela manutenção da viabilidade durante o tratamento com cerulenina, foram realizados testes com cepas contendo mutações individuais em cada sintetase e com uma linhagem carregando deleções simultâneas nas duas sintetases minoritárias (cepa ΔRelQ ΔRelP). Para inativar a síntese dependente de RelA de *B. subtilis* (Chamada aqui de Rel_{BS}), foi realizado uma mutação

pontual (Rel_{Bs}^{D264G}) a qual especificamente elimina a atividade de síntese sem afetar a atividade de hidrólise de (p)ppGpp (Nanamiya et al., 2008). O uso de um mutante pontual é necessário porque a deleção de rel_{Bs} elimina a única enzima capaz de hidrolisar (p)ppGpp na célula causando assim acúmulo de (p)ppGpp devido a atividade basal das sintetases minoritárias (Nanamiya et al., 2008).

Figura 10. A diminuição da velocidade de crescimento melhora a sobrevivência da cepa ppGpp(0) à carência de ácidos graxos. (A) Esquema da metodologia para o ensaio em diferentes temperaturas. (B) Viabilidade celular da cepa ppGpp(0) para o ensaio com diferentes temperaturas. (C) Viabilidade celular da cepa ppGpp(0) em meio mínimo suplementado com aminoácidos.

Conforme observado na Figura 9C, a viabilidade do mutante Rel_{Bs}^{D264G} foi reduzida a níveis similares à cepa ppGpp(0) após tratamento com cerulenina. Em contraste, a deleção das sintetases minoritárias não afetou a viabilidade celular. Curiosamente, não se observou perda de viabilidade em uma cepa contendo deleção de *relBs* (Figura 9C). Essa observação parece paradoxal, porém como discutido acima, um mutante com deleção de *relBs* acumula (p)ppGpp devido a atividade das sintetases minoritárias, o que sugere que o acúmulo de (p)ppGpp em níveis acima dos basais é suficiente para a manutenção da viabilidade celular. Todavia, o fato que a cepa Δ RelQ Δ RelP se comporta como a cepa selvagem e que a cepa Rel_{Bs}^{D264G} se comporta similarmente à cepa ppGpp(0) demonstra que Rel_{Bs} é a proteína responsável pela adaptação e sobrevivência de *B. subtilis* durante a carência de ácidos graxos.

Para confirmar que o efeito letal de cerulenina em cepas incapazes de ativar a resposta estrigente (ppGpp(0) e Rel_{Bs}^{D264G}, doravante chamadas de cepas SR-) ocorre devido à inibição da síntese de ácidos graxos, e não devido a um efeito secundário e inespecífico da droga, dois ensaios controle foram realizados. O primeiro consistiu em bloquear a síntese de ácidos graxos geneticamente, colocando-se o gene *fabF* sob o controle de um promotor induzível por xilose (P_{xyl}). Conforme demonstrado nas Figuras 11A e 11B, a depleção de FabF (através da remoção da xilose do meio de cultura) causou perda de viabilidade similar ao tratamento com cerulenina, em uma cepa contendo a variante Rel_{Bs}^{D264G}. O segundo controle foi testar se a adição de ácidos graxos exógenos poderia atenuar a letalidade do tratamento por cerulenina em cepas incapazes de ativar a resposta estrigente. Conforme demonstrado nas Figuras 11C e 11D, a suplementação do meio com ésteres metílicos de ácido graxos (FAMES) aumentou significativamente a viabilidade da cepa ppGpp(0). O efeito da suplementação de FAMES na viabilidade porém, foi parcial, conforme observado anteriormente em mutantes de *B. subtilis* com deficiência na síntese de fosfolípidos (Parsons et al., 2014, Sastre et al., 2016), provavelmente devido ao fato de a via metabólica que permite o uso de ácidos graxos exógenos

por *B. subtilis* ser ineficiente. Todavia, considerando-se em conjunto os resultados da depleção de FabF e suplementação por FAMES (Figura 11), estes sugerem que a cerulenina está agindo conforme o esperado, e que as cepas SR- perdem sua viabilidade devido à carência de ácidos graxos.

Figura 11. (A) Curvas de crescimento dos mutantes condicionais *fabF*. (B) Estimativa da viabilidade dos mutantes após a remoção da xilose do meio de cultura. (C) Suplementação com FAMES resgata a viabilidade da cepa (p)ppGpp(0). (D) Esquema da via metabólica pela qual FAMES são capazes de parcialmente suportar a síntese de fosfolipídeos em *B. subtilis*.

4.2 Carência de ácidos graxos causa alterações morfológicas e danos na membrana em células incapazes de sintetizar (p)ppGpp

Observações microscópicas revelaram diversas alterações morfológicas em células de *B. subtilis* privadas de ácidos graxos. Cepas selvagens tratadas com cerulenina por 240 minutos apresentaram tamanho reduzido, quando comparadas a células não tratadas (Figuras 12A e 12B). A redução no tamanho celular já havia sido reportada para bactérias com a resposta estrigente ativa (Schreiber et al., 1995) ou durante a carência de ácidos graxos (Wille et al., 1975; Yao et al., 2012; Stott et al., 2015) e provavelmente reflete a diminuição ou parada do crescimento nessas condições. Curiosamente, a carência de ácidos graxos teve pouco ou nenhum efeito no comprimento das células das linhagens RelA_{Bs}^{D264G} e ppGpp(0) (Figuras 12A e 12B) sugerindo que essas linhagens continuam a crescer após o tratamento com cerulenina.

A visualização das células por microscopia de fluorescência, usando o marcador de membrana FM1-43 e iodeto de propídio (PI) mostrou que as membranas das células selvagens estão intactas após o tratamento com cerulenina, como esperado pelo fato dessas células se manterem viáveis (Figura 12A). Em contraste, uma porção significativa das células SR- tratadas com cerulenina (Aproximadamente 10-15% para RelA_{Bs}^{D264G} e 20-25% para ppGpp(0)) exibiram evidentes descontinuidades na marcação da membrana (Figura 12A, setas vermelhas), indicando ruptura da membrana citoplasmática. Essa ruptura foi confirmada por marcação com PI, que mostrou que as células que possuem buracos em suas membranas se tornaram permeáveis ao marcador, conforme esperado (Figura 12A). Células com danos em suas membranas apresentaram parede celular intacta, conforme avaliado através de marcação com WGA-Alexa Fluor 350 (Figura 12D), indicando que a carência nutricional em cepas SR- danifica apenas a membrana.

Figura 12. Fenótipo das cepas selvagem, Rel_{BS}^{D264G} e $ppGpp(0)$ tratadas com cerulenina. (A) A integridade da membrana e permeabilidade foram testadas através de tratamento com o marcador FM1-43 (em verde nas Figuras) e iodeto de propídio (vermelho nas Figuras). Buracos nas membranas estão evidenciados por setas vermelhas. (B) Tamanho celular (comprimento) medidos antes e após 240 minutos de tratamento com cerulenina. (C) Porcentagem de células marcadas com iodeto de propídio após 120 e 240 minutos de tratamento por cerulenina. (D) Microscopia de fluorescência da cepa $ppGpp(0)$ tratada com o marcador de membrana FM4-64 (verde nas Figuras) e com o marcador de parede WGA-Alexa Fluor 350 (vermelho nas Figuras). Embora vários buracos estejam evidentes na membrana, a parede celular permanece intacta após 240 minutos de tratamento com cerulenina.

Uma observação intrigante do ensaio apresentado na Figura 12A foi que a maioria das células SR- (90% após 120 minutos de tratamento) permaneceram impermeáveis ao iodeto de propídeo (Figura 12C). Tendo em vista que a viabilidade dessa população (avaliada por contagem de UFC/mL, conforme apresentado na Figura 9C) diminuiu cerca de 99% após 120 minutos de tratamento, a população remanescente que permaneceu impermeável a PI poderia representar tanto células que perderam sua viabilidade porém não se tornaram permeáveis imediatamente a PI, ou então células que entraram em um estado “viável mas não cultivável” (VBNC), conforme proposto para *C. crescentus* (Stott et al., 2015). Para distinguir essas duas possibilidades, as células foram tratadas com cerulenina por 120 minutos, lavadas (para a remoção da droga) e então aplicadas sobre *pads* de agarose (LB + 1,5% (w/v) de agarose) e o crescimento foi acompanhado sob o microscópio. Foi observado que um longo período (300 minutos) após a remoção da cerulenina, a grande maioria das células SR- tornou-se marcada com PI e não conseguiu recuperar seu crescimento, ao passo que as células selvagens, após remoção da droga, retornaram ao crescimento e à divisão celular normalmente (Figura 13A e 13B). Caso as células SR- estivessem em um estado VBNC, as mesmas não se dividiriam, porém não se tornariam permeáveis a PI com o passar do tempo. Esse resultado indica, portanto, que as células que não conseguem ativar a resposta estrigente sofrem de um dano irreversível após a exposição à cerulenina, do qual não conseguem se recuperar mesmo após a remoção da droga.

Figura 13. Ensaios de microscopia mostraram que as cepas SR- acabam se tornando marcadas com PI, mesmo após 300 min da remoção da cerulenina, comprovando que as células estão de fato mortas. (A) Microscopia de fluorescência (FM1-43 em verde e PI em vermelho) para avaliação da permeabilidade das células. (B) Percentual de células marcadas por PI após a remoção da cerulenina, em diferentes tempos.

4.3 Células incapazes de sintetizar (p)ppGpp perdem seu potencial de membrana quando submetidas à carência de ácidos graxos

Conforme discutido, a fração de células que se tornam marcadas com PI após 120 minutos de tratamento com cerulenina é muito menor do que a queda de viabilidade estimada por contagem de UFC/mL. Essa diferença sugere que a maioria das células SR- perdem sua viabilidade por mecanismos que não causam ruptura imediata da membrana plasmática. Portanto, decidimos investigar alterações mais sutis na membrana que poderiam ser responsáveis pela perda de viabilidade observada. Focamos em avaliar o potencial de membrana, uma vez que perturbações nessa propriedade celular podem ter efeitos drásticos, como mudanças no transporte de solutos e síntese de ATP, atividades cruciais para a viabilidade celular (Lamsa et al., 2012). Um trabalho realizado por Strahl e Hamoen (2010) demonstrou que a perda do potencial de membrana causa a delocalização de proteínas envolvidas na divisão

celular, sendo uma delas MinD. Utilizando-se uma fusão YFP-MinD, nós observamos que o tratamento com cerulenina não afetou a localização de MinD (normalmente localizada nos polos e septos em *B. subtilis*) na cepa selvagem, porém produziu forte delocalização em cepas SR- (Figura 14). Notavelmente, a delocalização de MinD, ao contrário da marcação por PI, seguiu a mesma cinética de perda de viabilidade celular observada nos ensaios de UFC/mL (Figura 9). Após 60 minutos de tratamento com cerulenina, a grande maioria das células das cepas Rel_{BS}^{D264G} e ppGpp(0) já apresentavam alteração na localização de MinD, e evidente delocalização após 120 minutos. Esse resultado sugere que o funcionamento da membrana se torna comprometido muito antes das células se tornarem permeáveis a iodeto de propídio. Uma vez que a delocalização de MinD é um indicativo indireto do potencial de membrana, também foi utilizado o marcador DiSC3(5) e microscopia de fluorescência (Strahl & Hamoen, 2010) para medir diretamente o potencial de membrana.

Figura 14. Localização da proteína MinD (YFP-MinD) na cepa selvagem ou em cepas SR-, tratadas ou não com cerulenina.

Utilizando-se esse método, foi observado que a cepa selvagem consegue manter o potencial de membrana após o tratamento com cerulenina (Figura 15A), embora a quantificação da fluorescência indique que, após 120 minutos, o potencial de membrana é ligeiramente reduzido (diminuição de cerca de 40% na intensidade), quando comparado a células não tratadas. Em contraste, células comprometidas na síntese de (p)ppGpp perdem totalmente seu potencial de membrana quando expostas à cerulenina, exibindo um comportamento similar ao observado quando utilizamos o ionóforo CCCP, um composto que conhecidamente dissipa o potencial de membrana, como controle positivo (Figura 15B).

Figura 15. (A) Medidas de potencial de membrana após o tratamento com cerulenina. (B) Medidas de potencial de membrana da cepa selvagem com o controle positivo CCCP. A ausência de fluorescência indica a perda do potencial de membrana.

É importante ressaltar que, assim como observado para MinD, a perda do potencial de membrana segue a mesma cinética de perda de viabilidade observada nos ensaios de UFC/mL,

uma vez que em 60 minutos já se observa perda de potencial de membrana para a cepa ppGpp(0). Portanto, a perda do potencial de membrana é a causa provável de perda de viabilidade em células de *B. subtilis* incapazes de ativar a resposta estrigente durante a carência de ácidos graxos.

4.4 Alterações na razão GTP/ATP estão associadas à adaptação à carência de ácidos graxos em *B. subtilis*

Embora a carência de ácidos graxos cause um efeito dramático na viabilidade celular das cepas Rel_{BS}^{D264G} e ppGpp(0), fomos incapazes de detectar um aumento significativo de (p)ppGpp em células de *B. subtilis* tratadas com cerulenina. Diferentes concentrações de cerulenina, assim como o uso de cepas com bloqueio genético da síntese de ácidos graxos e diferentes tempos de incubação foram testados, todos sem sucesso (Figura 16). Todavia, experimentos de TLC revelaram grandes diferenças nas razões GTP/ATP entre as cepas selvagem e ppGpp(0), quando tratadas com cerulenina (Figura 17). Na presença de cerulenina, a razão GTP/ATP da cepa selvagem diminui quando comparado com a ausência do antibiótico, ao passo que a razão GTP/ATP da cepa ppGpp(0) aumenta significativamente após o tratamento com cerulenina (Figuras 17A e 17B). Em bactérias Gram-positivas, muitas das alterações promovidas pela resposta estrigente resultam da redução dos níveis intracelulares de GTP e do aumento de ATP, ao invés de um efeito direto de (p)ppGpp (Krásný & Gourse, 2004, Krásný et al., 2008, Geiger & Wolz, 2014). A observação que a razão GTP/ATP da cepa ppGpp(0) aumenta após o tratamento com cerulenina sugere uma desregulação nos níveis de nucleotídeos, especialmente devido a incapacidade da cepa de reduzir seus níveis intracelulares de GTP (Figura 17A).

Figura 16. A carência de ácidos graxos não causa aumentos detectáveis nos níveis de ppGpp e pppGpp em *B. subtilis*. (A) Diferentes concentrações e tempos de tratamento com o antibiótico cerulenina e a cepa selvagem (B) Depleção genética de ácidos graxos, utilizando-se o mutante condicional *fabF* (*P_{xyl}-fabF*).

Para verificar se a queda nos níveis intracelulares de GTP tinha relação causal com a adaptação de *B. subtilis* à carência de ácidos graxos, a cepa selvagem, juntamente com a cepa ppGpp(0), foram tratadas com cerulenina em combinação com a droga decoinina, a qual é capaz de inibir a síntese de GTP devido à inibição da GMP sintetase. Observou-se que a decoinina foi capaz de reduzir substancialmente a morte da cepa ppGpp(0) ao passo que a mesma substância apresentou pouco efeito na sobrevivência da cepa selvagem (Figura 17C). Também se empregou o uso de decoinina juntamente com FAMES em ensaios de microscopia de fluorescência e observou-se que esse tratamento foi capaz de prevenir a perda do potencial de membrana de células SR- expostas à cerulenina (Figura 17D).

Figura 17. Alterações nas razões GTP/ATP são importantes durante a adaptação de *B. subtilis* à carência de ácidos graxos. (A) TLC de nucleotídeos marcados com ^{32}P extraídos das cepas selvagem e ppGpp(0) tratados com cerulenina (B) Razões GTP/ATP dos diferentes tratamentos. (C) Tratamento com decoinina impede a perda de viabilidade da cepa ppGpp(0) tratada com cerulenina, mesmo após 120 minutos de tratamento. (D) O uso de FAMES em combinação com decoinina impede a perda do potencial de membrana da cepa ppGpp(0) tratada com cerulenina, mesmo após 120 minutos de tratamento.

Uma vez que GTP apresentou um importante papel durante a sobrevivência e adaptação de *B. subtilis* à carência de ácidos graxos, decidiu-se testar o papel do repressor CodY nessa situação de estresse, uma vez que a diminuição intracelular de GTP também inativa o repressor CodY, ativando genes relacionados à fase estacionária e à sobrevivência a condições estressantes (Geiger & Wolz, 2014). Todavia, observamos que a deleção de CodY apenas

atrasou, porém não foi capaz de suprimir a perda de viabilidade de cepas SR- tratadas com cerulenina, sendo muito menos eficiente no resgate da viabilidade do que a droga decoinina (Figura 18). Esse resultado sugere que CodY não possui um papel importante para a sobrevivência e adaptação durante a carência de ácidos graxos em *B. subtilis*.

Por fim, foi observado que os níveis de síntese proteica aparentemente se mantêm maiores na cepa ppGpp(0) tratada com cerulenina, em comparação com a cepa selvagem, o que pode indicar que a cepa ppGpp(0) mantém seu crescimento mesmo na ausência de ácidos graxos (Figura 19)

Figura 18. A deleção em CodY não é capaz de resgatar a viabilidade da cepa Rel_{BS}^{D264G} , apenas atrasando a perda de viabilidade, ao passo que o tratamento com decoinina é capaz de manter a viabilidade a longo prazo. Todas as cepas foram tratadas com cerulenina na concentração de 10 $\mu g/mL$.

Figura 19. Taxa de síntese proteica das cepa selvagem (PY79) e ppGpp(0) após tratamento com cerulenina. (A) Contagens normalizadas por OD e (B) contagens normalizadas por UFC/mL

RESULTADOS PARTE 2

4.5 Estabelecimento da metodologia para a triagem de pequenas moléculas químicas moduladoras de RelA

O desenho experimental foi montado de modo a identificar compostos que possam inibir a síntese de (p)ppGpp *in vivo*, utilizando células intactas de *B. subtilis*. Triagens fenotípicas *in vivo* tem se mostrado mais efetivas que triagens com alvos purificados na descoberta de novos fármacos (Swinney & Anthony, 2011). O princípio da triagem se baseia no fato que células com elevados níveis de (p)ppGpp tem seu crescimento retardado, ou até completamente cessado, mesmo em meio rico em nutrientes. Todavia, caso algum composto químico interaja com RelA de modo a impedir a síntese de (p)ppGpp, ou então aumentar a atividade de hidrólise de (p)ppGpp da enzima, os níveis do alarmônio serão reduzidos e a célula poderá restaurar seu crescimento (Figura 20). Este comportamento pode ser evidenciado através da leitura da densidade óptica a 600 nm.

Figura 20. Possíveis cenários pelos quais pequenas moléculas químicas interagiriam com a enzima Rel_{BS} (RelA) e impediriam, o acúmulo intracelular de (p)ppGpp. Esquerda: inibição da atividade de síntese de Rel_{BS} por uma molécula capaz de ligar em seu sítio ativo de sintetase (S) - inibição competitiva. Direita: situação em que a molécula se ligaria ao sítio regulatório e modularia a enzima estimulando sua atividade de hidrólise de (p)ppGpp – inibição alostérica.

Para aumentar o nível intracelular de (p)ppGpp artificialmente (isto é, aumentar os níveis de (p)ppGpp mesmo em uma situação em que não há carência nutricional), duas estratégias foram utilizadas: a primeira foi o uso de drogas capazes de simular a carência nutricional, como a hidroxamato de arginina, um análogo da arginina. A segunda estratégia foi a construção de mutantes de Rel_{BS} que tivessem maior produção de (p)ppGpp, a qual será abordada mais à frente.

A hidroxamato de arginina (HRX) age como inibidor da arginil-tRNA sintetase (Kisumi et al., 1971) gerando uma "falsa carência" de aminoácidos para a célula, ativando assim a resposta estrigente. Uma célula comum exposta a tal droga teria seu crescimento diminuído, tanto pela redução da disponibilidade de t-RNAs carregados com arginina como devido ao aumento de (p)ppGpp gerado por ela. Assim, uma célula incapaz de sintetizar (p)ppGpp, em teoria, seria capaz de manter parte do crescimento, mesmo quando sob o efeito da droga, desde que a mesma esteja em concentração sub-inibitória, uma vez que em elevadas concentrações, sabe-se que o tratamento por HRX causa perda de viabilidade (Kriel et al., 2012).

Essa hipótese da manutenção do crescimento foi testada expondo mutantes com deficiência na síntese de (p)ppGpp (Rel_{BS}^{D264G} e ppGpp(0)) a diferentes concentrações de HRX.

O tratamento com 0,5 mM de HRX (Figura 21) foi o que gerou o melhor resultado, por ter sido a concentração que produziu a maior diferença de crescimento entre as cepas SR- e a cepa selvagem.

Figura 21. Teste comparativo do crescimento das cepas Rel_{Bs}^{D264G}, ppGpp(0) e selvagem após o tratamento com HRX em meio LB. Note que o crescimento das cepas incapazes de ativar a resposta estrigente é maior, quando utilizado uma concentração sub-inibitória de HRX. Os resultados são representativos de três repetições independentes.

Uma vez estabelecida a concentração de HRX (0,5 mM) e tempo de tratamento (5 horas) ideais para detectar compostos com impedimento ou inibição da síntese de (p)ppGpp, foram realizados testes em formato de placas de 96 poços para validar a adequação de nosso ensaio para a realização de triagens do tipo “*high throughput*” (larga escala). Cálculos estatísticos próprios para metodologias de triagem de pequenas moléculas em larga escala são utilizados para estabelecer se um determinado ensaio exibe suficiente reprodutibilidade para uma triagem. O parâmetro Z’ (Zhang et al., 1999) é a medida mais aceita para estimar a qualidade dos ensaios utilizados em grandes triagens, sendo calculado pela seguinte fórmula:

$$Z' = 1 - \frac{(3\sigma_{c+} + 3\sigma_{c-})}{|\mu_{c+} - \mu_{c-}|}$$

Nesta fórmula, σ_{c+} representa o desvio padrão dos resultados gerados por um controle positivo do ensaio, σ_{c-} corresponde ao desvio padrão dos resultados do controle negativo, μ_{c+} é a média dos resultados do controle positivo e μ_{c-} consiste na média dos resultados do controle negativo. Valores de Z' entre 0,5 – 1 são considerados ideais e indicam um ensaio com alta confiabilidade. Valores entre 0 – 0,5 indicam que a metodologia pode ser utilizada, porém haverá uma maior incidência de resultados falsos-positivos e falsos-negativos. Em valores de Z' abaixo de zero, os ensaios são considerados como pouco confiáveis.

Foi utilizado como controle positivo a linhagem ppGpp(0), a qual mimetiza a situação em que uma droga está inibindo completamente a síntese de (p)ppGpp. Já como controle negativo foi usado a linhagem selvagem, a qual mimetiza uma droga que não interfere na produção de (p)ppGpp. HRX foi utilizada na concentração final de 0,5 mM e as mesmas condições utilizadas no ensaio representado na Figura 21. O ensaio foi montado com 30 réplicas de cada controle por placa de 96 poços e repetido sete vezes, a fim de se obter uma estatística sólida, e seus valores de Z' foram calculados em cada caso: 0,6395; 0,4648; 0,7177; 0,5600; 0,4147; 0,5383; 0,7300, respectivamente. Foi possível obter valores de Z' acima de 0,5 (considerado ótimo) em cinco dos sete testes. Mesmo os valores mais baixos estiveram próximos de 0,5, portanto, foi considerado que o ensaio estava adequado para triagem. A ilustração de uma placa e o resultado de um dos testes realizados estão apresentados na Figura 22.

Figura 22. Esquema de uma placa dos ensaios realizados para o cálculo do valor de Z' para a triagem de pequenas moléculas químicas, utilizando-se a cepa selvagem como controle negativo e a cepa ppGpp(0) como controle positivo. Os poços nas bordas das placas normalmente não são usados nas triagens e continham água (azul). O resultado é representativo de sete ensaios independentes realizados. Como pode se observar, após 5 horas de ensaio, a cepa ppGpp(0) cresceu mais do que a cepa selvagem, tratada com HRX.

4.6 Triagem da biblioteca Spectrum Collection

Após verificarmos que a metodologia estabelecida era confiável, uma biblioteca de 2320 compostos químicos bioativos (Spectrum Collection, ver Materiais e Métodos) foi distribuída em placa de 96 poços com o auxílio de um robô pipetador e as pequenas moléculas químicas foram triadas quanto a sua capacidade de resgatar o crescimento da linhagem indicadora, que continha as mutações $\Delta\text{RelQ } \Delta\text{RelP}$. Decidimos utilizar essa linhagem ao invés da selvagem pelo fato da cepa ppGpp(0) ter crescido mais do que a cepa $\text{Rel}_{\text{Bs}}^{\text{D264G}}$ após o tratamento com HRX (Figura 21). Dessa forma, a ausência das sintetases minoritárias potencializou a capacidade de crescimento de uma cepa cuja síntese de (p)ppGpp por Rel_{Bs} esteja inibida, sendo mais fácil, portanto, distinguir os “hits” positivos. Além disso, é importante ressaltar que a cepa $\Delta\text{RelQ } \Delta\text{RelP}$ se comporta de modo idêntico à cepa selvagem com tratamento por HRX. A triagem foi realizada em duplicata, de modo que todo composto químico da biblioteca foi testado ao menos duas vezes. Após a triagem, cada composto foi analisado comparando-se a sua capacidade de acelerar o crescimento frente ao controle negativo (DMSO) realizado no dia (Figura 23A).

Uma compilação dos resultados obtidos na triagem está mostrada na Figura 23B. Ao todo, cerca de 60 moléculas foram capazes de produzir um aumento substancial na densidade óptica a 600nm, quando comparados ao controle. Todavia, cerca de 20 dessas moléculas constituem falsos-positivos (aumento na DO causado por precipitação da droga ou alteração/intensificação da coloração do meio, e não devido ao aumento do crescimento bacteriano), tendo sido, portanto, desconsideradas para os experimentos seguintes de avaliação. Dessa forma, considerou-se que 40 “hits” foram obtidos na primeira etapa da triagem dos 2320 compostos químicos. Seus nomes e atividades conhecidas estão apresentados em forma de tabela (Tabela 4).

Figura 23. (A) Exemplo de resultado obtido com uma placa (80 compostos químicos) da biblioteca. A barra em azul corresponde ao tratamento controle. Conforme observado, apenas um composto dessa placa acelerou o crescimento da cepa indicadora (B) Compilação de todos os dados obtidos na triagem, normalizados pelos crescimentos controle. O quadrado amarelo simboliza a faixa que leva em consideração os desvios padrões dos controles, sendo todos os compostos dentro dessa faixa considerados iguais ao controle, segundo Zhang et al., (1999).

Tabela 4. “Hits” obtidos durante a triagem com HRX.

Código	Nome	Função
3#D11	Salicilanilida	Antipirético, fungicida
3#E4	Cloridrato de mianserina	Antagonista de 5HT
3#A8	Tolnaftato	Fungicida
5#F3	Diflusinal	Analgésico, anti-inflamatório
6#H9	Cloridrato de oxidopamina	Antagonista adrenérgico
12#H8	Succinato de Pregnenolona	Glicocorticoide, antiinflamatório
13#E10	Clozapina	Antipsicótico
15#H2	Tiopental de sódio	Anestésico
15#H4	Cinchonina	Antimalárico
15#H9	Tiamilal de sódio	Anestésico
16#H2	Nanofina	Antihipertensivo
16#E11	Amitraz	Escabicida (Acaricida)
17#G9	Cloridrato de Clorgilina	Inibidor MAO-A, antidepressivo, antiparkinson
17#H11	Ebselen	Antioxidante, inibidor da lipooxygenase
18#H4	Ácido hidroxitolúico	Analgésico, antisséptico
18#H5	Levomentol	Analgésico, antipruriginoso
18#H6	Barbital	Sedativo
18#B10	Aceturato de diminazeno	Antiprotozoário
19#H6	Ácido elágico	Hemostático, antimutagênico
20#A6	Securinina	Bloqueador do receptor GABAA, estimulante do SNC
20#A7	Lufenurona	Inibidor de mofo, inseticida
20#D6	Nifenazona	Analgésico, anti-inflamatório
21#D4	Deoxikhivorina	(Sem descrição disponível)
22#H10	Cloranil	Antipsoríase
22#A6	Deoxigedunina	Neuroprotetor, antidepressivo
22#H8	Ácido estictídico	Potencial anticancerígeno
23#C3	1-Monopalmitina	(Sem descrição disponível)
24#C3	Peucenina	Droga para leucodistrofia
24#D8	3beta-hidroxideoxodihidrodeoxugeduinina	(Sem descrição disponível)
25#H2	Convalatoxina	Cardiotônico
25#H3	Galagina 3-O-metil éter	(Sem descrição disponível)
26#H6	Diflubezuron	Inseticida, inibidor da síntese de melanossomo
26#H5	o-veratraldeído	(Sem descrição disponível)
26#E8	3-benziloxi-4,4-bisnor-8,11,13-podocarpatrianol	(Sem descrição disponível)
26#H9	12-metoxi-4,4-bisnor-5beta-8,11,13-podocaespatrianol	(Sem descrição disponível)
28#C6	7,4'-dimetilisoflavona	(Sem descrição disponível)
28#D6	Cloridrato de 1,2-dimetilhidrazina	Antineoplásico
29#C5	Pomiferina dimetil-éter	(Sem descrição disponível)
29#C11	Apigenina	Antiespasmódico, antineoplásico, inibidor da topoisomerase I

Os “hits” obtidos foram então triados novamente em uma segunda etapa, utilizando-se um mutante que acumula (p)ppGpp por causa de uma alteração genética. Essa etapa visou eliminar qualquer possível “hit” que tenha sido obtido devido a efeitos indiretos com ou pelo uso de hidroxamato de arginina. Para isso, foi construído e utilizado um mutante de *B. subtilis* com mutação pontual no resíduo 77 de RelA (Rel_{Bs}^{H77A}), um aminoácido chave para a atividade de hidrólise de RelA, cuja troca por alanina reduz mas não abole esta atividade totalmente (Hogg et al., 2004). Dessa forma, o mutante cresce bem mais lentamente do que a cepa selvagem por acumular níveis anormais de (p)ppGpp.

Ao testarmos os “hits” da biblioteca contra esse mutante, observamos que apenas um composto (3#D11), salicilanilida, conseguiu acelerar o crescimento da cepa, ao passo que todos os outros compostos não apresentaram efeito significativo na aceleração do crescimento (Figura 24).

Figura 24. Aceleração do crescimento da cepa Rel_{Bs}^{H77A} pela droga salicilanilida. Por questões de clareza, na Figura estão apresentados apenas parte dos 40 “hits” testados.

4.7 Avaliação da droga salicilanilida como potencial inibidor da resposta estrigente

O efeito de aceleração do crescimento de *B. subtilis* pela salicilanilida foi testado em uma amplitude maior de concentrações. Observou-se que a concentração ideal para a aceleração do crescimento estava em torno de 20 μM - 15 μM . Curiosamente, em concentrações mais elevadas, o crescimento era inibido, indicando toxicidade da droga, ao passo que em concentrações menores a droga não apresenta efeito (Figura 25A). Foi observado também que a droga apresentou capacidade em acelerar o crescimento de cepas de *Staphylococcus aureus* tratadas com HRX, porém com concentração ótima ao redor de 2 μM (Figura 25B).

Figura 25. (A) Aceleração do crescimento da cepa *Rel_{Bs}^{H77A}* por salicilanilida (B) Aceleração do crescimento de *S. aureus* tratado com HRX por salicilanilida. Os resultados são representativos de duas repetições independentes.

Apesar de apresentar efeito reprodutível, a salicilanilida restaura apenas parcialmente o crescimento de cepas de *B. subtilis* que acumulam (p)ppGpp, quando comparado ao crescimento da cepa selvagem no mesmo meio de cultura (Figura 26).

Figura 26. Capacidade da salicilanilida (SL) em resgatar o crescimento da cepa Rel_{Bs}^{H77A}. Apesar de resgatar o crescimento, o efeito é pouco expressivo quando comparado a velocidade de crescimento da cepa selvagem no mesmo meio de cultura.

Tendo isso em vista, diversos análogos da salicilanilida foram obtidos a fim de investigar se pequenas alterações na estrutura da salicilanilida poderiam gerar moléculas com efeito potencializado. Foram testados ao total seis análogos (Figura 27) contra a cepa Rel_{Bs}^{H77A}, e a capacidade de acelerar o crescimento foi comparado à salicilanilida em sua concentração ideal (marcado como SL20 nos gráficos). Apesar de estruturalmente diversos, observamos que nenhum análogo se mostrou mais eficaz que a salicilanilida em acelerar o crescimento celular. Algumas das drogas até inibiram o crescimento da cepa Rel_{Bs}^{H77A}, indicando que estes derivados de salicilanilida tem atividade citotóxica nas concentrações testadas (a exemplo do análogo niclosamida, e dos análogos 365841 e 361520). Alguns análogos, como por exemplo 674763 e 524532 tiveram um fraco efeito de aceleração do crescimento em determinadas concentrações, porém muito aquém do efeito obtido pela salicilanilida. Por fim, o análogo 042005 não teve nem efeito acelerador nem efeito inibitório.

Figura 27. Teste com diferentes análogos de salicilanilida e suas capacidades de acelerar o crescimento da cepa *Rel_{Bs}^{H77A}*. Os tratamentos foram comparados com a salicilanilida na concentração 20 µM (SL20) após 5 a 6 horas de tratamento.

A partir dos resultados obtidos, foi possível classificar as drogas, juntamente com a salicilanilida, em termos de sua relação entre estrutura e atividade (Figura 28). Todos os análogos halogenados (niclosamida, 365841 e 361520) apresentaram letalidade muito acima da

observada em relação aos outros compostos. Já as drogas 674763 e 524532, as quais não são halogenadas e possuem um radical hidroxila no anel aromático à esquerda da ligação amida (o grupo salicilato, na salicilanilida) apresentaram capacidade de acelerar o crescimento. A ausência de halogênios e o radical hidroxila no anel aromático à esquerda da ligação amida são características compartilhada entre esses análogos e a salicilanilida. Por fim, o análogo 042005 não possui halogênios, porém também não apresenta o radical hidroxila do salicilato, e não possui efeito de acelerar o crescimento, nem de letalidade.

Figura 28. Classificação dos análogos de salicilanilida quanto à sua relação estrutura-atividade.

Figura 29. (A) Salicilanilida (20 μM) altera a velocidade de crescimento e tamanho celular das cepas Δ RelA e Rel_{Bs}^{H77A}. Os resultados apresentados são representativos de três repetições independentes. (B) Apesar de ser capaz de acelerar o crescimento, a droga não é capaz de alterar o MIC das cepas frente a oxacilina.

Observou-se que a salicilanilida é capaz de acelerar a velocidade do crescimento de outras cepas que acumulam (p)ppGpp por alterações genéticas, a exemplo da cepa com deleção de *relB_s* (Δ RelA). Além disso, a droga é capaz de aumentar o tamanho das células das cepas Δ RelA e Rel_{Bs}^{H77A} (Figura 29A).

Apesar de seu efeito modesto no resgate do crescimento das linhagens que acumulam (p)ppGpp, decidiu-se testar a capacidade da salicilanilida de alterar a sensibilidade dessas cepas contra antibióticos betalactâmicos, uma vez que células com maiores velocidades de crescimento tendem a serem mais suscetíveis a antibióticos betalactâmicos (Tuomanen et al., 1986). Todavia, não se observou efeito da droga nas concentrações inibitórias mínimas (MIC –

do inglês “*minimal inhibitory concentration*”) de oxacilina para as duas cepas (Figura 29B). O MIC da cepa Rel_{Bs}^{H77A} se manteve em torno de 5 µg.mL⁻¹ e da cepa ΔRelA em torno de 1,2 µg.mL⁻¹. Logo, apesar da salicilanilida ser capaz de acelerar o crescimento das cepas, a mesma não é capaz de alterar o MIC frente ao tratamento com oxacilina. Tal incapacidade em alterar o MIC pode ser devido ao efeito discreto da salicilanilida na aceleração do crescimento. Testou-se também a capacidade da salicilanilida de alterar o MIC de *S. aureus* frente aos antibióticos oxacilina e vancomicina, muito utilizados para o tratamento de infecções por *S. aureus* e MRSA (Gardete & Tomasz, 2014; Dordel et al., 2014). Observamos que a salicilanilida não foi capaz de alterar o MIC da cepa de *S. aureus* para os dois antibióticos (Figura 30).

Figura 30. Resultado dos testes de MIC em *S. aureus* tratado com diferentes concentrações de salicilanilida frente aos antibióticos oxacilina (A) e vancomicina (B).

Por fim, buscou-se também avaliar se a salicilanilida possuía a capacidade de gerar o fenótipo de auxotrofia na cepa $\Delta\text{RelQ } \Delta\text{RelP}$, uma vez que é sabido que cepas incapazes de produzir (p)ppGpp não crescem em meios mínimos não suplementados com todos os aminoácidos (Kriel et al., 2014; Andresen et al., 2016b). Observou-se, todavia, que a salicilanilida não foi capaz de gerar o fenótipo de auxotrofia na cepa $\Delta\text{RelQ } \Delta\text{RelP}$; de modo contrário, aparentou aumentar o crescimento, ao passo que a cepa ppGpp(0) foi incapaz de crescer no meio (Figura 31). Após um longo período de crescimento, observou-se aumento da DO na cepa ppGpp(0), porém atribui-se esse crescimento ao surgimento de mutantes supressores, conforme descrito anteriormente (Kriel et al., 2012).

Figura 31. Crescimento das cepas em meio mínimo (TSS) suplementado com glicose (0,5%). Observa-se que a salicilanilida (SL) não é capaz de gerar auxotrofia em *B. subtilis*.

4.8 Avaliação da capacidade da salicilanilida em modular os níveis de (p)ppGpp

Avaliou-se a capacidade da salicilanilida de modular os níveis de ppGpp e pppGpp em células de *B. subtilis*, através de cromatografia de camada fina e marcação com fósforo radioativo (Figura 32). O ensaio inicial consistiu em tratar previamente as células com salicilanilida (20 μ M) por 2 horas a fim de verificar se a mesma evitaria o aumento de (p)ppGpp causado pela adição de hidroxamato de arginina (HRX). Não se observou diminuição de pppGpp (Figura 32A, compare HRX com HRX+SL) com o tratamento. Supreendentemente, observou-se que nas amostras tratadas com salicilanilida houve o aparecimento de um intenso “spot” na TLC, próximo à altura esperada para a molécula tetrafosfatada, ppGpp (Figura 32A). Este “spot” é dependente apenas da salicilanilida, pois é formado também quando células são tratadas apenas com esse composto (veja Figura 32A e 32B, SL 20 μ M). A velocidade de formação do spot foi acompanhada por 180 minutos (Figura 32B).

Após 1 hora já é possível se observar um intenso “spot”, que se intensifica ainda mais a partir de 90 minutos de indução. Ao se utilizar um diferente tampão de corrida a fim de melhor separar os “spots”, observou-se que na verdade o “spot” induzido por salicilanilida se encontra entre ppGpp e pppGpp (Figura 32B e 32C), e, portanto, deve ser uma molécula fosforilada diferente destas. Outra evidência que suporta essa conclusão foi a observação de que a formação do “spot” é independente da presença de Rel_{BS} ou de qualquer sintetase de (p)ppGpp em *B. subtilis*, uma vez que mesmo utilizando-se uma cepa com a três sintetases deletadas (cepa ppGpp(0)), ainda se observou a presença do “spot” (Figura 32C).

Figura 32. Medidas de ppGpp e pppGpp de *B. subtilis* tratado com salicilanilida. (A) Células (selvagem) foram tratadas previamente por 2 horas com salicilanilida antes da adição de hidroxamato de arginina (HRX). Surpreendentemente, um “spot” intenso já podia ser observado logo no tempo inicial, causado pelo tratamento prévio com salicilanilida. (B) A velocidade de formação do “spot” foi acompanhada por 180 minutos. Conforme observado, após 1 hora já é possível se observar um intenso spot. (C) Detecção do “spot” nas cepas PY79 (selvagem) e ppGpp(0).

Decidiu-se então utilizar outras técnicas com a finalidade de se medir uma possível alteração de (p)ppGpp, assim como identificar o composto fosforilado desconhecido, como por exemplo HPLC acoplado a MS/MS. Em parceria com a Central Analítica (IQ-USP), diversas metodologias de extração e diferentes colunas de HPLC (C18 e ZIC-HILIC), juntamente com diferentes protocolos de corrida foram empregados a fim de se obter uma metodologia de quantificação confiável e com baixa variabilidade, a qual poderia ser utilizada para avaliar

alterações sutis nos níveis de (p)ppGpp em células tratadas com salicilanilida. Todavia, mesmo após a otimização dos processos, os cromatogramas dos nucleotídeos se apresentaram muito fragmentados e confiáveis apenas para a quantificação de grandes variações nos níveis dos nucleotídeos (Figura 33).

Figura 33. Exemplo de cromatogramas obtidos para ppGpp e pppGpp, após cromatografia na coluna ZIC-HILIC e detecção no espectrômetro de massas Amazon (Bruker). Os valores de MS3 indicam as massas dos íons indicadores de cada composto. Como pode-se observar, os compostos não eluíram em um único pico.

Decidimos, portanto, estabelecer uma metodologia para a quantificação de (p)ppGpp apenas por HPLC. O uso apenas de HPLC, sem a necessidade de análise posterior por massas, facilita a metodologia de extração, uma vez que solventes ou elevadas concentrações de sais podem estar presentes na amostra final (a exemplo da análise por TLC). Além disso, permite o uso de colunas de troca iônica para a separação dos compostos, boa para a separação de nucleotídeos, porém incompatível para o uso com espectrometria de massas acoplado. A otimização do protocolo de corrida e extração foi realizado, e picos evidentes de cada nucleotídeo foram obtidos e comparados a padrões comerciais dos nucleotídeos a serem testados (Figura 34).

Figura 34. (A) Corrida de nucleotídeos comerciais. (B) Corrida de nucleotídeos extraídos de *B. subtilis*. Conforme pode ser observado, na extração dos nucleotídeos do tratamento controle de *B. subtilis*, não se observou picos significativos de ppGpp e pppGpp, o que era esperado, uma vez que a resposta estrigente não estava induzida.

Para testarmos o efeito da salicilanilida por este novo protocolo, a priori da extração, as células foram tratadas de modo similar à metodologia utilizada para a triagem dos compostos químicos, utilizando-se a mesma densidade ótica e concentrações de HRX utilizadas anteriormente. Confirmando os dados obtidos anteriormente por TLC, observamos que o tratamento com salicilanilida não foi capaz de alterar os níveis de (p)ppGpp em *B. subtilis* (Figura 35).

A diminuição nos níveis de GTP e GDP após o tratamento com HRX já eram esperadas, uma vez que são reflexo da ativação da resposta estrigente, assim como o aumento nos níveis de ATP (Figura 35A). Todavia, observou-se que, no tratamento das células com HRX+salicilanilida, os níveis de ATP aparentaram diminuir. Esse resultado se repetiu mesmo quando as células foram tratadas com uma metodologia diferente da utilizada na triagem, como por exemplo utilizando-se culturas em DO_{600nm} mais elevada ou diferentes concentrações de HRX (Figura 36). Dessa forma, acredita-se que o tratamento por salicilanilida, de algum modo, é capaz de diminuir os níveis intracelulares de ATP. Infelizmente, não se conseguiu observar

o aparecimento de nenhum outro pico adicional após o tratamento com salicilanilida (Figura 35), que poderia corresponder ao “spot” que foi observado nas análises por TLC (Figura 32). Portanto, ainda não foi possível a identificação do “spot” induzido pela droga.

Figura 35. Seções de cromatogramas dos nucleotídeos extraídos da cepa selvagem. (A) Níveis de GDP, ATP e GTP dos tratamentos controle, HRX e HRX com salicilanilida (SL). (B) Níveis de ppGpp e pppGpp. As imagens são representativas de dois ensaios independentes realizados

Figura 36. Cromatograma de nucleotídeos extraídos de *B. subtilis* com o uso de 5 vezes mais hidroxamato de arginina (2,5 mM) do que o utilizado na triagem de compostos químicos, comparado ao tratamento com a mesma concentração de HRX e 20 μ M de salicilanilida.

Uma vez que a droga Salicilanilida foi capaz de reduzir os níveis de ATP, buscamos verificar se alterações nos níveis de ATP são capazes por si só de acelerar o crescimento de cepas como a *Rel_{Bs}^{H77A}*. Para isso, empregamos o uso da droga CCCP, um conhecido ionóforo capaz de inibir a síntese de ATP por dissipar o potencial de membrana. Todavia, mesmo empregando concentrações sub-inibitórias, CCCP não foi capaz de mimetizar o efeito da salicilanilida em nossos ensaios preliminares (Figura 37).

Figura 37. O uso de CCCP em concentrações subinibitórias não aparenta reproduzir o efeito da salicilanilida (SL 20).

4.9 Caracterização de outros “hits” da biblioteca de compostos químicos

Dentre os 40 “hits” identificados na triagem que aceleraram o crescimento de células tratadas com HRX, apenas a droga salicilanilida apresentou efeito também em células com acúmulo de (p)ppGpp via mutação genética (cepas *Rel_{Bs}^{H77A}* e *ΔrelA*). Mesmo assim, decidiu-se investigar outros “hits” da biblioteca, apesar dos mesmos não apresentam efeito em cepas que acumulam (p)ppGpp via mutação genética. Uma investigação mais aprofundada de outros “hits” da biblioteca pode dar pistas do porquê muitos dos “hits” não aparentam ter efeitos em células com acúmulo de (p)ppGpp via mutação genética, e se são falsos positivos.

Compostos químicos da classe dos Tetranortriterpenos (drogas 21#D4, 22#A6 e 24#D8), muito similares estruturalmente foi obtida durante a triagem, todos apresentando grande capacidade de resgate de crescimento da cepa ($\Delta\text{RelQ } \Delta\text{RelP}$) de *B. subtilis* tratado com HRX (Figura 38).

Figura 38. Curvas de crescimento de parte dos “hits” da biblioteca, utilizando-se a mesma metodologia da triagem. Observa-se que vários compostos se destacaram mais nesse ensaio do que a salicilanilida (3#D11), apesar de nenhum ter sido capaz de resgatar o crescimento de cepas com acúmulo de (p)ppGpp por vias genéticas.

As estruturas dos compostos 21#D4, 22#A6 e 24#D8 estão apresentadas na Figura 39. Estas moléculas foram testadas novamente, dessa vez utilizando-se a cepa selvagem. Conforme pode ser observado na Figura 38, as moléculas apresentaram grande capacidade de resgatar o crescimento da cepa selvagem tratada com HRX, confirmando o resultado obtido anteriormente durante a triagem de compostos químicos. Ao observamos mais atentamente outros “hits” da biblioteca, observamos que outras moléculas estruturalmente similares às drogas 21#D4, 22#A6 e 24#D8 também foram obtidas, a exemplo dos “hits” 12#H8 e 25#H2. Tais resultados

demonstram que a metodologia utilizada para a triagem favoreceu a seleção de moléculas com estrutura química semelhante.

Figura 39. Moléculas muito similares estruturalmente foram obtidas durante a triagem, todas apresentando efeito com intensidades similares, capazes de resgatar o crescimento da cepa selvagem tratada com HRX. (A) Estrutura química dos compostos 21#D4, 22#A6 e 24#D8. (B) Resgate do crescimento da cepa selvagem tratada com HRX e com as drogas 21#D4, 22#A6 e 24#D8. (C) Culturas após 300 minutos de crescimento.

Todavia, ao testarmos as drogas 21#D4, 22#A6 e 24#D8 induzindo a resposta estrigente com a droga hidroxamato de serina (SHX), cujo efeito é similar ao uso de hidroxamato de arginina (indução da resposta estrigente via geração de tRNAs descarregados), foi observado que nenhuma das drogas foi capaz de alterar o fenótipo de crescimento da cepa selvagem (Figura 40), mesmo utilizando-se concentrações variadas de SHX. Esse resultado

sugere que as drogas dessa classe são capazes de resgatar o crescimento de *B. subtilis* apenas quando as células são tratadas com HRX.

Figura 40. As drogas 21#D4, 22#A6 e 24#D8 são incapazes de alterar o crescimento da cepa PY79 (selvagem) quando a resposta estrigente é induzida via tratamento com hidroxamato de serina (SHX).

5. DISCUSSÃO

DISCUSSÃO PARTE 1

5.1 Papel da resposta estrigente durante a carência de ácidos graxos é conservada em bactérias

Apesar da universalidade da resposta estrigente, trabalhos recentes mostraram que os “inputs” que ativam a produção de (p)ppGpp e os “outputs” produzidos pela acumulação desse sinal variam entre as bactérias, refletindo suas necessidades metabólicas específicas e diferentes estilos adaptativos (Boutte & Crosson, 2013; Gaca et al., 2015; Liu et al., 2015). Nesse trabalho, mostramos que a dependência de (p)ppGpp durante a carência de ácidos graxos, reportada anteriormente apenas para bactérias Gram-negativas, também ocorre na bactéria Gram-positiva modelo *B. subtilis*. Ao passo que a cepa selvagem de *B. subtilis* para seu crescimento, porém se mantém viável quando é privada de ácidos graxos, cepas de *B. subtilis* incapazes de ativar a resposta estrigente sofrem grande perda de viabilidade. Apesar de não termos conseguido detectar um aumento (p)ppGpp em resposta à carência de ácidos graxos, a sobrevivência a esta privação se correlaciona com uma diminuição nas razões intracelulares de GTP/ATP, um efeito característico do aumento de (p)ppGpp. Portanto, propomos que existe um aumento nos níveis de (p)ppGpp durante a carência de ácidos graxos, apesar deste ser pequeno demais para ser detectado em nossos ensaios.

Análises utilizando-se diferentes mutantes mostraram que a enzima bifuncional Rel_{BS} (RelA) é a enzima que responde à carência de ácidos graxos em *B. subtilis*. Em todas as bactérias em que esse fenômeno foi estudando, a resposta à carência de ácidos graxos depende de uma RSH bifuncional, normalmente chamada de SpoT, embora em um caso (*C. crescentus*) a enzima bifuncional não seja um ortólogo verdadeiro de SpoT (Atkinson et al., 2011). Uma aparente exceção é a bactéria *Vibrio cholerae*, na qual RelV, uma sintetase minoritária, foi descrita como respondendo à carência de ácidos graxos. Essa observação foi baseada no fato

de mutantes com deleções em RelA_{Vc} e SpoT_{Vc} ainda conseguirem acumular (p)ppGpp durante o tratamento com cerulenina, tendo como única sintetase RelV (Das et al., 2009). De toda forma, SpoT_{Vc} também responde à carência de ácidos graxos, uma vez que se demonstrou que uma cepa possuindo apenas SpoT_{Vc} também era capaz de acumular (p)ppGpp durante a carência de ácidos graxos (Das et al., 2009).

Levando-se em consideração trabalhos anteriores que investigaram a resposta estrigente frente a diferentes estímulos, parece ser claro que as proteínas longas bifuncionais (RSH) são as enzimas que monitoram sinais endógenos e atuam sobre o metabolismo, desligando-o se necessário. Essa tarefa foi especializada nas proteobactérias beta e gama, nas quais RelA, uma proteína RSH degenerada que não mais hidroliza (p)ppGpp, tem papel específico de monitorar a carência de aminoácidos. Porém, tal especificidade é provavelmente uma solução evolutiva circunstancial, uma vez que a proteína RSH presente na maioria das bactérias é igualmente capaz de responder a carência de aminoácidos, ácidos graxos e outros estresses ambientais (Boutte & Crosson, 2013; Hauryliuk et al., 2015). Portanto, nosso trabalho colabora para um melhor entendimento da especialização funcional das sintetases de (p)ppGpp.

Uma questão interessante para futura investigação é como Rel_{Bs} é ativada durante a carência de ácidos graxos. Em *E. coli*, SpoT interage com ACP não acilado, o qual acumula durante a carência de ácidos graxos (Battesti & Bouveret, 2006). Todavia, mostrou-se que ACP de *B. subtilis* não interage com Rel_{Bs} (Battesti & Bouveret, 2009), sugerindo que o sinal que ativa a resposta estrigente é diferente nesses dois organismos modelos. A descoberta de quem é a molécula sinalizadora que ativa Rel_{Bs} irá aprimorar nosso conhecimento acerca dos mecanismos pelos quais a resposta estrigente pode ser regulada. Os mecanismos de regulação já descritos (por carência de aminoácidos ou de ácidos graxos em bactérias Gram-negativas) ambos dependem de interações proteína-proteína envolvendo Rel/SpoT (com o ribossomo ou

com ACP). Uma possibilidade interessante seria se metabólitos fossem capazes de regular diretamente a atividade de proteínas RSH, num mecanismo clássico de modulação alostérica.

5.2 Resposta estrigente sem o acúmulo detectável de (p)ppGpp

Embora nossos ensaios tenham demonstrado que células incapazes de ativar a resposta estrigente são extremamente sensíveis à carência de ácidos graxos (Figura 9), nós não conseguimos detectar um aumento significativo de (p)ppGpp nestas condições (Figura 15). Esse resultado foi de certa forma inesperado. Porém uma observação mais cuidadosa da literatura revelou situações nas quais um estímulo conhecido por ativar a resposta estrigente não levou ao acúmulo de (p)ppGpp, ou casos nos quais alterações fenotípicas marcantes dependentes de sintetases de (p)ppGpp foram acompanhados de aumentos pouco expressivos ou nenhum aumento nos níveis deste nucleotídeo. Por exemplo, não foi detectado aumento nos níveis de (p)ppGpp de *S. aureus* (Greenwood & Gentry, 2002) e *C. crescentus* (Stott et al., 2015) submetidos à carência de ácidos graxos, e a carência de glicose nem sempre leva ao acúmulo de (p)ppGpp em *B. subtilis* (Krásný & Gourse, 2004). Adicionalmente, o crescimento lento e o aumento da resistência a antibióticos em mutantes RSH de *B. subtilis*, *E. faecalis* e *S. aureus* está associado com baixo ou nenhum acúmulo de (p)ppGpp (Lemos et al., 2007; Nanamiya et al., 2008; Abranches et al., 2009). Por outro lado, assim como nosso trabalho, outros também detectaram alterações nos níveis de GTP e ATP em resposta a carências nutricionais, efeito este que indica um aumento de (p)ppGpp por ser o nucleotídeo que afeta a síntese de GTP (Lopez et al., 1981; Kriel et al., 2012). Uma explicação alternativa para nossa incapacidade de detectar (p)ppGpp seria que não há de fato aumento de (p)ppGpp induzido pela carência de ácidos graxos em *B. subtilis* e a importância de Rel_{BS} para a manutenção da viabilidade nesta situação seria por alguma outra função desconhecida desta enzima. Esta hipótese, no entanto, não é compatível com a observação de que um mutante com deleção de *rel_{BS}* permanece viável quando tratado com cerulenina (Figura 9). Na ausência de Rel_{BS}, as

células acumulam (p)ppGpp, devido ao efeito das sintetases minoritárias RelP e RelQ. Logo, nossos resultados sugerem fortemente que a resposta fisiológica de *B. subtilis* à carência de ácidos graxos requer ao menos um pequeno aumento de (p)ppGpp intracelular.

Tendo em vista a aparente dificuldade de diversos trabalhos de detectarem pequenos incrementos de (p)ppGpp, propomos que se basear apenas na observação de aumento ou não de (p)ppGpp não é suficiente para avaliar a importância deste nucleotídeo em uma determinada situação. Caso tivéssemos decidido nos basearmos na detecção do acúmulo de (p)ppGpp, provavelmente teríamos concluído que a adaptação à carência de ácidos graxos não possui correlação alguma com (p)ppGpp em *B. subtilis*. Seguindo o mesmo raciocínio, existem diversas evidências na literatura de espécies bacterianas que são incapazes de acumular (p)ppGpp em resposta a diversos estímulos em que se esperaria a ativação da resposta estrigente (para uma compilação desses casos, ver Boutte & Crosson, 2011). Esses casos tem sido interpretados como adaptações alternativas à carência nutricional, não dependentes de (p)ppGpp (Boutte & Crosson, 2011, Boutte & Crosson, 2013), porém, podem na verdade representar casos nos quais pequenos aumentos de (p)ppGpp não foram detectados. Seria interessante revisitar alguns desses estudos e observar o comportamento de cepas com deleções em sintetases de (p)ppGpp, ou então observar alterações nos níveis de GTP/ATP como indicativos da dependência de (p)ppGpp, antes de se concluir que uma determinada bactéria não depende da resposta estrigente ao se deparar com um certo estímulo.

5.3 Como a resposta estrigente preserva a viabilidade?

Para entender como a resposta estrigente contribui para a sobrevivência na ausência de ácidos graxos, foi examinado detalhadamente como as cepas SR- perdiam sua viabilidade celular. Observou-se que células de *B. subtilis* incapazes de produzir (p)ppGpp rapidamente perdiam seu potencial de membrana durante a privação de ácidos graxos (Figuras 14 e 15), indicando conforme esperado, perturbação da função da membrana. Curiosamente, na mesma

população apenas uma pequena fração de células exibiram ruptura evidente da membrana e se tornaram permeáveis a iodeto de propídio, indicando que a perturbação da função da membrana precede a perda de sua integridade física (Figura 12). Uma observação similar foi feita por Stott e colaboradores (Stott et al., 2015), estudando a resposta de *C. crescentus* à carência de ácidos graxos. Todavia, esses autores interpretaram que as células que permaneceram impermeáveis a iodeto de propídio mas eram incapazes de formarem colônias estavam em um estado “viável mas não cultivável” (VBNC). A distinção experimental entre células mortas e em estado VBNC não é simples, mas ensaios com acompanhamento das células sob um microscópio demonstraram que todas as células SR- tratadas com cerulenina, mesmo após a remoção da droga, se tornavam permeáveis a iodeto de propídio após um certo período de tempo (Figura 13). Esse resultado indica que as células SR- perderam sua viabilidade de forma irreversível antes de serem marcadas com PI.

O potencial de membrana está diretamente relacionado com a capacidade de produzir ATP e a importação de nutrientes e íons pela célula (Allen et al., 1991; Silverman et al., 2003). Portanto, não é surpreendente que a perda do potencial de membrana seja suficiente para comprometer irreversivelmente a viabilidade celular. Uma vez que a diminuição do potencial de membrana segue a mesma cinética da perda de viabilidade em nossos experimentos, nós postulamos que essa é a razão principal para a perda de viabilidade em cepas SR- de *B. subtilis*. Outra evidência que apoia a hipótese de que a perda do potencial de membrana é suficiente para tornar as células inviáveis se baseia no estudo do modo de ação da proteína SDP, a toxina do canibalismo de *B. subtilis* (Lamsa et al., 2012). A proteína SDP colapsa o potencial de membrana, causando uma redução abrupta na viabilidade celular, conforme avaliado por UFC/mL. Assim como observado em nossos ensaios, a maior parte das células tratadas com SDP permaneceram impermeáveis a um indicador de permeabilidade (SYTOX Green) apesar de terem perdido sua viabilidade celular (Lamsa et al., 2012).

Como a carência de ácidos graxos compromete as funções membranares em células incapazes de ativar a resposta estrigente? Uma possibilidade simples é que a ausência de (p)ppGpp levaria ao desacoplamento das vias de biosíntese de *B. subtilis*, como por exemplo a síntese de lipídeos e a síntese de proteínas. Desta forma, as células tentam continuar seu crescimento mesmo sem serem capazes de sintetizar nova membrana. O aumento no tamanho celular na ausência de nova síntese de membrana acabaria por impor um estresse físico na membrana que fatalmente aumentaria sua permeabilidade a pequenas moléculas e íons, perturbando assim o potencial de membrana. O acoplamento entre a síntese de lipídeos e síntese de proteínas é apoiada por um relato anterior (Wille et al., 1975), o qual demonstra que a taxa de síntese proteica cai após o tratamento de células de *B. subtilis* com cerulenina.

Nós conduzimos experimentos similares, porém incluindo também uma cepa ppGpp(0) no ensaio, e observamos que apesar de uma redução inicial na taxa de incorporação de aminoácidos marcados radioativamente, existe uma tendência da síntese proteica da cepa ppGpp(0) em se manter mais elevada do que a cepa selvagem após 20 minutos de tratamento (Figura 19). A hipótese de que as células perdem sua viabilidade porque não freiam seu crescimento também é consistente com as alterações no tamanho celular observadas (Figura 12B), nas quais se mostra que células SR- se mantêm maiores que as células selvagens após tratamento com cerulenina. Nós interpretamos essa diminuição no tamanho celular das células selvagens como consequência da diminuição da taxa de crescimento, e a observação de que células SR- com crescimento mais lento são menos sensíveis à carência nutricional (Figura 10) também é compatível com esta hipótese. Finalmente, nosso modelo de como a resposta estrigente preserva a viabilidade na ausência de lipídeos também é apoiado pela alteração nos níveis dos nucleotídeos ATP e GTP, sendo que cepas SR- apresentam aumento em sua razão GTP/ATP ao passo que essa razão diminui na cepa selvagem (Figura 17). A redução no nível intracelular de GTP causado por (p)ppGpp é um fator chave na resposta estrigente em bactérias

Gram-positivas (Wolz et al., 2010; Kriel et al., 2012; Gaca et al., 2013). A alteração nos níveis de GTP inibe a transcrição de genes de RNA ribossomal (Krásný & Gourse, 2004) e também afeta várias etapas da tradução (Milon et al., 2006; Corrigan et al., 2016). Um trabalho elegante realizado por Bittner e colaboradores (2014) demonstrou que a sobrevivência à carência de aminoácidos é uma função inversa da razão GTP/ATP (quanto maior a razão GTP/ATP menor a sobrevivência). Também foi demonstrado que a taxa de crescimento de *B. subtilis* possui correlação positiva com a razão GTP/ATP e que a resistência à carência nutricional é inversamente proporcional à taxa de crescimento (Bittner et al., 2014).

Portanto, nós propomos que células que não conseguem reduzir sua razão GTP/ATP durante a carência de ácidos graxos continuam a sintetizar proteínas e mantêm seu crescimento, até o momento em que suas membranas se tornam comprometidas (Figura 41). De maneira consistente com essa possibilidade, o tratamento de cepas SR- com um inibidor da síntese de GTP (decoinina) resgatou significativamente a sua viabilidade (Figura 17).

Figura 41. Modelo do papel de (p)ppGpp durante a carência de ácidos graxos em *B. subtilis*.

Mesmo que nossos resultados apontem que a maior contribuição de (p)ppGpp durante a carência de ácidos graxos seja através da parada do crescimento celular, nós não podemos eliminar totalmente outras possíveis contribuições. Existem relatos de que células na ausência

de (p)ppGpp se tornam extremamente sensíveis a estresses redox e esse pode ser um fator relevante em células privadas de ácidos graxos (Gong et al., 2002; Nguyen et al., 2011). Também sabe-se que (p)ppGpp regula a acilação de fosfolipídeos de membrana (Heath et al., 1994), etapa que ocorre após a produção de ácidos graxos. Portanto, a possível desregulação destas aciltransferases na ausência de seus substratos poderia ter efeitos negativos. Nós acreditamos que investigações futuras poderão produzir um cenário mais detalhado, em conjunto com nossos dados, de como exatamente (p)ppGpp preserva a viabilidade de células privadas de ácidos graxos.

5.4 (p)ppGpp como coordenador central da biossíntese bacteriana

Criar uma nova célula bacteriana requer a coordenação da síntese de ao menos quatro tipo de macromoléculas: ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos e polissacarídeos (normalmente peptideoglicano, PG). Essa coordenação é parcialmente atingida pela interdependência química de algumas vias metabólicas. Por exemplo, uma vez que mRNAs são necessários para a síntese proteica, a inibição da transcrição irá rapidamente inibir a síntese proteica. Em contraste, lipídeos ou PG não são necessários para a síntese proteica. Portanto, do ponto de vista bioquímico, sua ausência não deveria impactar tal processo. Todavia, uma vez que a falta de coordenação entre as diferentes vias metabólicas pode ter severas consequências para a célula bacteriana, conforme ilustrado pela dramática perda de viabilidade de mutantes SR- privados de ácidos graxos, uma forte pressão seletiva para acoplar mecanismos que normalmente não estão conectados ao nível bioquímico deve ter ocorrido. Nós propomos que os efeitos regulatórios de (p)ppGpp e a resposta estrigente evoluíram em resposta à essa pressão seletiva fundamental.

DISCUSSÃO PARTE 2

5.5 Estabelecimento da metodologia e triagens baseadas no resgate do crescimento

A descoberta de inibidores da síntese de (p)ppGpp que sejam eficientes *in vivo* apresentaria como vantagens a potencialização de antibióticos já existentes (a exemplo do observado nessa tese com a droga cerulenina, ou então outros antibióticos, como relatado em Nguyen et al. (2011), e a diminuição do fenômeno de persistência e virulência bacteriana (Maisonneuve et al., 2013; Chávez de Paz et al., 2012). Tendo em vista o aumento crescente de casos de bactérias superresistentes ao redor do mundo, (p)ppGpp se tornou um alvo extremamente atraente para a descoberta de novas drogas (Andresen et al., 2016b). O estabelecimento de metodologias de triagem eficientes é, portanto, um passo importante para a busca de inibidores da síntese de (p)ppGpp.

Nossa metodologia, baseada nas diferenças de crescimento entre a cepa selvagem e a cepa ppGpp(0), ambas tratadas com um ativador da resposta estrigente (HRX) se mostrou positiva, apresentando um valor de Z' elevado (acima de 0,5) sendo considerada portanto, uma triagem confiável (Zhang et al., 1999). Como resultado foram obtidos aproximadamente 60 “hits” iniciais. Por se tratar de uma triagem *in vivo*, a metodologia estabelecida tem como vantagem a seleção de drogas que modifiquem o fenótipo diretamente na célula bacteriana, eliminando o problema de permeabilidade de membrana de drogas descobertas via ensaios *in vitro* (Wexselblatt et al., 2010; Wexselblatt et al., 2012; Beljantseva et al., 2017b). Um outro ponto importante a ser levantado é que nossa metodologia se baseia em ganho de função (resgate do crescimento), e não simplesmente diminuição na capacidade de crescimento, como os ensaios baseados em auxotrofia reportados por Andresen e colaboradores, (2016b). Dessa forma, nosso ensaio foi extremamente seletivo em sua primeira etapa, tendo em vista que a

grande maioria dos compostos existentes na biblioteca inibiram o crescimento de *B. subtilis* (Figura 23, todos os pontos abaixo da faixa amarela).

Um pequeno revés observado pela metodologia baseada no aumento de densidade ótica foi a dificuldade de se avaliar com precisão se compostos capazes de alterar a coloração do meio de cultura eram potenciais “hits” ou não. Alguns dos compostos apresentavam coloração inicial intensa. Já outros não apresentavam cor inicialmente, porém mudavam a coloração do meio de cultura ao decorrer da triagem, a exemplo da droga 28#A11 (Figura 42), fazendo com que a DO aumentasse artificialmente. Para esses compostos, distinguir se os mesmos eram capazes de aumentar ou não o crescimento da cepa indicadora apenas por medidas de densidade ótica foi dificultado.

Inicial	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A		0,056	0,046	0,045	0,058	0,059	0,044	0,046	0,045	0,046	0,052
B		0,046	0,046	0,045	0,047	0,048	0,053	0,047	0,048	0,048	0,045
C		0,045	0,045	0,047	0,047	0,062	0,047	0,052	0,047	0,047	0,048
D		0,045	0,044	0,048	0,055	0,049	0,047	0,047	0,047	0,057	0,045
E		0,047	0,046	0,053	0,048	0,05	0,047	0,046	0,046	0,046	0,046
F		0,047	0,044	0,049	0,049	0,049	0,049	0,051	0,047	0,046	0,048
G		0,053	0,063	0,048	0,058	0,081	0,048	0,048	0,047	0,046	0,047
H		0,049	0,047	0,068	0,048	0,05	0,049	0,046	0,048	0,048	0,047

Final	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A		0,066	0,092	0,044	0,055	0,108	0,095	0,101	0,099	0,056	0,167
B		0,071	0,091	0,098	0,078	0,101	0,097	0,099	0,097	0,092	0,108
C		0,087	0,052	0,084	0,094	0,152	0,063	0,072	0,063	0,102	0,064
D		0,049	0,091	0,097	0,062	0,088	0,09	0,098	0,089	0,055	0,121
E		0,075	0,094	0,048	0,045	0,067	0,091	0,098	0,094	0,087	0,098
F		0,097	0,095	0,105	0,046	0,061	0,085	0,078	0,073	0,069	0,103
G		0,09	0,091	0,044	0,12	0,15	0,097	0,082	0,107	0,101	0,08
H		0,069	0,085	0,047	0,095	0,09	0,075	0,085	0,1	0,124	0,113

Figura 42. Exemplo de falso positivo obtido na triagem.

A eliminação de falsos positivos resultou em uma lista com 40 “hits” positivos. Porém apenas a droga 3#D11, salicilanilida passou na segunda etapa da triagem da biblioteca, utilizando-se a cepa Rel_{Bs}^{H77A}. Triagens de compostos químicos normalmente se baseiam em duas etapas ou mais (Andresen et al., 2016b), com a finalidade de reduzir ao máximo o número de falsos positivos.

5.6 Salicilanilida reverte apenas parte dos fenótipos relacionados a produção de (p)ppGpp e aparenta ser incapaz de alterar os níveis de (p)ppGpp

Apesar de ser capaz de resgatar o crescimento de cepas com acúmulo genético de (p)ppGpp, acúmulo de (p)ppGpp via indutores e aumentar o tamanho das células (Figura 28), todos fenótipos relacionados à diminuição dos níveis intracelulares de (p)ppGpp, a salicilanilida não foi capaz de aumentar a sensibilidade de cepas de *B. subtilis* e *S. aureus* ao tratamento por antibióticos e também foi incapaz de gerar auxotrofia em *B. subtilis*, fenótipos também associados à redução nos níveis intracelulares de (p)ppGpp (Kriel et al., 2012; Kriel et al., 2014; Geiger et al., 2014). Nesse caso, é possível que a salicilanilida seja capaz de alterar pouco os níveis de (p)ppGpp, fazendo com que apenas fenótipos decorrentes da redução parcial de (p)ppGpp fossem reproduzidos, sendo que, no caso da sensibilidade aumentada a antibióticos e auxotrofia, seria necessário uma diminuição maior nos níveis de (p)ppGpp. Diversos análogos foram testados, com a finalidade de se obter drogas mais poderosas do que a salicilanilida, porém não obtivemos sucesso (Figura 27).

Nossas análises por TLC e HPLC (Figuras 32 e 35) demonstraram que a salicilanilida aparenta ser incapaz de alterar os níveis internos de (p)ppGpp em *B. subtilis*. Todavia, duas alterações marcantes foram observadas: nas análises por TLC, observou-se a indução de um composto fosforilado que migrou entre ppGpp e pppGpp, e nas análises por HPLC, pode-se observar uma redução marcante dos níveis intracelulares de ATP. Infelizmente, não fomos

capazes de identificar o composto fosforilado induzido, uma vez que o mesmo não gerou um pico evidente nas corridas por HPLC.

A alteração nos níveis de ATP poderia explicar parte dos efeitos da salicilanilida; apesar de ser incapaz de alterar os níveis de GTP, a alteração nos níveis de ATP é capaz de mudar a razão GTP/ATP, e esta por sua vez é capaz de modular a velocidade de crescimento de *B. subtilis* (Bittner et al., 2014). É possível então que essa alteração na razão GTP/ATP seja a responsável pelos fenótipos observados de aceleração de crescimento.

As alterações nos níveis de ATP por salicilanilida podem ser explicados de duas formas distintas: a primeira seria uma diminuição devido à formação do composto fosforilado desconhecido, o qual usaria ATP como substrato para sua síntese. A segunda explicação seria que a salicilanilida seria capaz de alterar ligeiramente o potencial de membrana de *B. subtilis* e *S. aureus* nas concentrações testadas, diminuindo assim a produção de ATP. Tal afirmação se baseia no fato que drogas análogas à salicilanilida já foram descritas como capazes de dissipar o potencial de membrana (Fonseca et al., 2012; Niven & MacLeod, 1980; Kirchhoff & Cypionka, 2017). Isso ajudaria a explicar também o porquê de a droga apresentar um comportamento de aceleração de crescimento em forma de “sino”, sendo que em elevadas concentrações começa a perder seu efeito (Figura 25). Caso a hipótese seja correta, drogas que conhecidamente alteram o potencial de membrana seriam capazes de reduzir a produção de ATP, alterando a razão GTP/ATP e acelerar o crescimento da cepa Rel_{Bs}^{H77A}. Um ensaio preliminar foi realizado a fim de testar essa hipótese (Figura 37), utilizando-se o ionóforo CCCP. Todavia, observamos que o mesmo não foi capaz de acelerar o crescimento de Rel_{Bs}^{H77A}. Mais ensaios são necessários para afirmarmos que o efeito da salicilanilida não se dá devido a uma possível alteração no potencial de membrana. Porém existe a possibilidade que as mudanças de ATP observadas sejam devido a formação do “spot” desconhecido.

5.7 Seleção de drogas com atuação preferencial sobre hidroxamato de arginina na triagem de compostos químicos: implicações para triagens futuras

Apesar de não ser capaz de alterar os níveis de (p)ppGpp, a droga salicilanilida foi a única que apresentou capacidade de resgatar o crescimento de cepas que acumulam (p)ppGpp em todas as condições testadas: tanto por indução genética como via indução por drogas. Decidiu-se então avaliar outros “hits” da biblioteca a fim de entender melhor porque tais drogas foram selecionadas na primeira etapa da triagem. Levantou-se a possibilidade de a triagem ter selecionado compostos que atuem apenas durante a resposta estrigente ativada pela carência de aminoácidos. Recentemente, três grupos de pesquisa distintos elucidaram a estrutura de RelA de *E. coli* em complexo com o ribossomo, em condições de carência de aminoácidos (Arenz et al., 2016; Loveland et al., 2016; Brown et al., 2016). Essa conformação seria distinta da encontrada por RelA em sua forma não ligada ao ribossomo, indicando, portanto, uma alteração conformacional que poderia também alterar a interação com possíveis moléculas ligantes.

Investigamos então uma classe de compostos químicos com estrutura extremamente similar que se destacaram na primeira etapa da triagem: 21#D4, 22#A6, 24#D8, 12#H8 e 25#H2. Os compostos 21#D4, 22#A6 e 24#D8 foram os “hits” que mais se destacaram na primeira etapa da triagem (Figura 36), apresentando capacidade de resgate de crescimento muito superior à salicilanilida no tratamento da cepa $\Delta\text{RelQ } \Delta\text{RelP}$. A capacidade de resgate de crescimento por essas drogas foi reproduzida também na cepa selvagem tratada com hidroxamato de arginina (Figura 38B). Todavia, utilizando-se um indutor de carência de aminoácidos diferente (hidroxamato de serina), o qual também induz a formação de tRNAs descarregados, nenhuma das drogas foi capaz de alterar o crescimento (Figura 39). A incapacidade das drogas dessa classe em alterar o crescimento de cepas com a resposta estrigente ativada via mutação genética, e a incapacidade de causar alteração no crescimento após carência de aminoácidos utilizando-se hidroxamato de serina, sugere que na verdade tais

drogas podem apresentar efeito seletivo ao tratamento com hidroxamato de arginina, de modo independente de RelA ou da produção de (p)ppGpp.

De fato, uma droga selecionada na primeira etapa da triagem, cloranil (22#H10) é um exemplo de “hit” que é específico para hidroxamato de arginina. O cloranil é um composto que possui alta reatividade com grupos amino (Birks & Slifkin, 1963), sendo utilizado inclusive em ensaios para a avaliação de grupos amino secundários livres. Dessa forma, o cloranil é capaz de reagir diretamente com hidroxamato de arginina, atuando como um aceptor de elétrons (Birks & Slifkin, 1963) e, portanto, é capaz de oxidar o hidroxamato de arginina. Assim, as células ficam livres do estresse e são capazes de crescer mais rapidamente.

O porquê das drogas 21#D4, 22#A6, 24#D8, 12#H8 e 25#H2 possuírem efeito seletivo em relação a hidroxamato de arginina é desconhecido. Reações químicas entre as drogas e hidroxamato de arginina é uma das hipóteses. Uma hipótese alternativa seria que compostos da classe das Tetranortriterpenos (drogas 21#D4, 22#A6, 24#D8 12#H8 e 25#H2) seriam capazes de induzir um aumento da biossíntese de arginina em *B. subtilis*. Dessa forma, com o aumento da disponibilidade de arginina, por efeito de competição, o hidroxamato de arginina teria seu efeito reduzido. Independentemente da explicação, nossos resultados demonstram que a metodologia escolhida para a triagem apresentou um viés no momento da seleção de moléculas que poderiam afetar a resposta estrigente. Um favorecimento a determinadas classes de moléculas químicas também foi observado em uma das etapas da triagem realizada por Andresen e colaboradores em busca de inibidores de RelA (Andresen et al., 2016b), porém os autores também não foram capazes de explicar o motivo desse favorecimento.

Observações como essas são importantes para a realização de triagens futuras em busca de inibidores da produção de (p)ppGpp e eliminação de falsos positivos. Apesar de não termos obtido nenhum composto capaz de reduzir drasticamente os níveis internos de (p)ppGpp, fomos capazes de encontrar, em nossa primeira triagem com uma pequena biblioteca (2300 compostos

químicos), uma droga capaz de reverter parte dos fenótipos causados pelo aumento de (p)ppGpp, e capaz também de induzir mudanças nos níveis internos de nucleotídeos fosforilados (Figuras 32 e 36), um resultado animador. Acreditamos que o uso da mesma estratégia de triagem, baseada no resgate do crescimento mas utilizando uma linhagem indicadora cuja produção aumentada de (p)ppGpp não seja induzida por um composto químico (por exemplo, a cepa Rel_{BS}^{H77A}) e utilizando-se bibliotecas químicas maiores aumentaria o potencial para a descoberta de drogas que atuem diretamente sobre Rel_{BS}.

REFERÊNCIAS

- Abranches, J., Martinez, A.R., Kajfasz, J.K., Chávez, V., Garsin, D.A., and Lemos, J.A. (2009) The molecular alarmone (p)ppGpp mediates stress responses, vancomycin tolerance, and virulence in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* **191**: 2248-2256.
- Allen, N.E., Alborn, W.E., and Hobbs, J.N. (1991) Inhibition of membrane potential-dependent amino acid transport by daptomycin. *Antimicrob Agents Chemother* **35**: 2639-2642.
- Andresen, L., Tenson, T., and Hauryliuk, V. (2016a) Cationic bactericidal peptide 1018 does not specifically target the stringent response alarmone (p)ppGpp. *Sci Rep* **6**: 36549.
- Andresen, L., Varik, V., Tozawa, Y., Jimmy, S., Lindberg, S., Tenson, T., and Hauryliuk, V. (2016b) Auxotrophy-based High Throughput Screening assay for the identification of *Bacillus subtilis* stringent response inhibitors. *Sci Rep* **6**: 35824.
- Arai, K., Arai, N., Kawakita, M., and Kaziro, Y. (1972) Interaction of guanosine 5'-diphosphate, 2'-(or 3')-diphosphate(ppGpp) with elongation factors from *E. coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **48**: 191-196.
- Arenz, S., Abdelshahid, M., Sohmen, D., Payoe, R., Starosta, A.L., Berninghausen, O., Hauryliuk, V., Beckmann, R., and Wilson, D.N. (2016) The stringent factor RelA adopts an open conformation on the ribosome to stimulate ppGpp synthesis. *Nucleic Acids Res* **44**: 6471-6481.
- Atkinson, G.C., Tenson, T., and Hauryliuk, V. (2011) The RelA/SpoT homolog (RSH) superfamily: distribution and functional evolution of ppGpp synthetases and hydrolases across the tree of life. *PLoS One* **6**: e23479.
- Avarbock, D., Avarbock, A., and Rubin, H. (2000) Differential regulation of opposing RelMtb activities by the aminoacylation state of a tRNA.ribosome.mRNA.RelMtb complex. *Biochemistry* **39**: 11640-11648.
- Battesti, A., and Bouveret, E. (2006) Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. *Mol Microbiol* **62**: 1048-1063.
- Battesti, A., and Bouveret, E. (2009) Bacteria possessing two RelA/SpoT-like proteins have evolved a specific stringent response involving the acyl carrier protein-SpoT interaction. *J Bacteriol* **191**: 616-624.
- Battesti, A., Majdalani, N., and Gottesman, S. (2011) The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* **65**: 189-213.
- Beljantseva, J., Kudrin, P., Andresen, L., Shingler, V., Atkinson, G.C., Tenson, T., and Hauryliuk, V. (2017a) Negative allosteric regulation of *Enterococcus faecalis* small alarmone synthetase RelQ by single-stranded RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**: 3726-3731.
- Beljantseva, J., Kudrin, P., Jimmy, S., Ehn, M., Pohl, R., Varik, V., Tozawa, Y., Shingler, V., Tenson, T., Rejman, D., and Hauryliuk, V. (2017b) Molecular mutagenesis of ppGpp: turning a RelA activator into an inhibitor. *Sci Rep* **7**: 41839.
- Ben-Yehuda, S., Rudner, D.Z., and Losick, R. (2003) RacA, a bacterial protein that anchors chromosomes to the cell poles. *Science* **299**: 532-536.
- Bergmann, G.T., Bates, S.T., Eilers, K.G., Lauber, C.L., Caporaso, J.G., Walters, W.A., Knight, R., and Fierer, N. (2011) The under-recognized dominance of Verrucomicrobia in soil bacterial communities. *Soil Biol Biochem* **43**: 1450-1455.
- Bittner, A.N., Kriel, A., and Wang, J.D. (2014) Lowering GTP level increases survival of amino acid starvation but slows growth rate for *Bacillus subtilis* cells lacking (p)ppGpp. *J Bacteriol* **196**: 2067-2076.

- Boutte, C.C., and Crosson, S. (2011) The complex logic of stringent response regulation in *Caulobacter crescentus*: starvation signalling in an oligotrophic environment. *Mol Microbiol* **80**: 695-714.
- Boutte, C.C., and Crosson, S. (2013) Bacterial lifestyle shapes stringent response activation. *Trends Microbiol* **21**: 174-180.
- Boutte, C.C., Henry, J.T., and Crosson, S. (2012) ppGpp and polyphosphate modulate cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **194**: 28-35.
- Brown, A., Fernández, I.S., Gordiyenko, Y., and Ramakrishnan, V. (2016) Ribosome-dependent activation of stringent control. *Nature* **534**: 277-280.
- Buckstein, M.H., He, J., and Rubin, H. (2008) Characterization of nucleotide pools as a function of physiological state in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **190**: 718-726.
- Cashel, M., and Gallant, J. (1969) Two compounds implicated in the function of the RC gene of *Escherichia coli*. *Nature* **221**: 838-841.
- Chávez de Paz, L.E., Lemos, J.A., Wickström, C., and Sedgley, C.M. (2012) Role of (p)ppGpp in biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Appl Environ Microbiol* **78**: 1627-1630.
- Corrigan, R.M., Bellows, L.E., Wood, A., and Gründling, A. (2016) ppGpp negatively impacts ribosome assembly affecting growth and antimicrobial tolerance in Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**: E1710-1719.
- Czarny, T.L., Perri, A.L., French, S., and Brown, E.D. (2014) Discovery of novel cell wall-active compounds using P ywaC, a sensitive reporter of cell wall stress, in the model gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Antimicrob Agents Chemother* **58**: 3261-3269.
- D'Elia, M.A., Millar, K.E., Bhavsar, A.P., Tomljenovic, A.M., Hutter, B., Schaab, C., Moreno-Hagelsieb, G., and Brown, E.D. (2009) Probing teichoic acid genetics with bioactive molecules reveals new interactions among diverse processes in bacterial cell wall biogenesis. *Chem Biol* **16**: 548-556.
- Dalebroux, Z.D., and Swanson, M.S. (2012) ppGpp: magic beyond RNA polymerase. *Nat Rev Microbiol* **10**: 203-212.
- Das, B., Pal, R.R., Bag, S., and Bhadra, R.K. (2009) Stringent response in *Vibrio cholerae*: genetic analysis of spoT gene function and identification of a novel (p)ppGpp synthetase gene. *Mol Microbiol* **72**: 380-398.
- de la Fuente-Núñez, C., Reffuveille, F., Haney, E.F., Straus, S.K., and Hancock, R.E. (2014) Broad-spectrum anti-biofilm peptide that targets a cellular stress response. *PLoS Pathog* **10**: e1004152.
- Dordel, J., Kim, C., Chung, M., Pardos de la Gándara, M., Holden, M.T., Parkhill, J., de Lencastre, H., Bentley, S.D., and Tomasz, A. (2014) Novel determinants of antibiotic resistance: identification of mutated loci in highly methicillin-resistant subpopulations of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *MBio* **5**: e01000.
- Drecktrah, D., Lybecker, M., Popitsch, N., Rescheneder, P., Hall, L.S., and Samuels, D.S. (2015) The *Borrelia burgdorferi* RelA/SpoT Homolog and Stringent Response Regulate Survival in the Tick Vector and Global Gene Expression during Starvation. *PLoS Pathog* **11**: e1005160.
- Feng, B., Mandava, C.S., Guo, Q., Wang, J., Cao, W., Li, N., Zhang, Y., Wang, Z., Wu, J., Sanyal, S., Lei, J., and Gao, N. (2014) Structural and functional insights into the mode of action of a universally conserved Obg GTPase. *PLoS Biol* **12**: e1001866.
- Fonseca, B.D., Diering, G.H., Bidinosti, M.A., Dalal, K., Alain, T., Balgi, A.D., Forestieri, R., Nodwell, M., Rajadurai, C.V., Gunaratnam, C., Tee, A.R., Duong, F., Andersen, R.J., Orłowski, J., Numata, M., Sonenberg, N., and Roberge, M. (2012) Structure-activity analysis of niclosamide reveals potential role for cytoplasmic pH in control of

- mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling. *J Biol Chem* **287**: 17530-17545.
- Fredriksson, A., Ballesteros, M., Peterson, C.N., Persson, O., Silhavy, T.J., and Nyström, T. (2007) Decline in ribosomal fidelity contributes to the accumulation and stabilization of the master stress response regulator sigmaS upon carbon starvation. *Genes Dev* **21**: 862-874.
- Freitas, S., Hatosy, S., Fuhrman, J.A., Huse, S.M., Welch, D.B., Sogin, M.L., and Martiny, A.C. (2012) Global distribution and diversity of marine Verrucomicrobia. *ISME J* **6**: 1499-1505.
- Gaca, A.O., Colomer-Winter, C., and Lemos, J.A. (2015) Many means to a common end: the intricacies of (p)ppGpp metabolism and its control of bacterial homeostasis. *J Bacteriol* **197**: 1146-1156.
- Gaca, A.O., Kajfasz, J.K., Miller, J.H., Liu, K., Wang, J.D., Abranches, J., and Lemos, J.A. (2013) Basal levels of (p)ppGpp in *Enterococcus faecalis*: the magic beyond the stringent response. *MBio* **4**: e00646-00613.
- Gardete, S., and Tomasz, A. (2014) Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* **124**: 2836-2840.
- Geiger, T., Goerke, C., Fritz, M., Schäfer, T., Ohlsen, K., Liebeke, M., Lalk, M., and Wolz, C. (2010) Role of the (p)ppGpp synthase RSH, a RelA/SpoT homolog, in stringent response and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **78**: 1873-1883.
- Geiger, T., Kästle, B., Gratani, F.L., Goerke, C., and Wolz, C. (2014) Two small (p)ppGpp synthases in *Staphylococcus aureus* mediate tolerance against cell envelope stress conditions. *J Bacteriol* **196**: 894-902.
- Geiger, T., and Wolz, C. (2014) Intersection of the stringent response and the CodY regulon in low GC Gram-positive bacteria. *Int J Med Microbiol* **304**: 150-155.
- Gong, L., Takayama, K., and Kjelleberg, S. (2002) Role of spoT-dependent ppGpp accumulation in the survival of light-exposed starved bacteria. *Microbiology* **148**: 559-570.
- Gray, J.V., Petsko, G.A., Johnston, G.C., Ringe, D., Singer, R.A., and Werner-Washburne, M. (2004) "Sleeping beauty": quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 187-206.
- Greenway, D.L., and England, R.R. (1999) The intrinsic resistance of *Escherichia coli* to various antimicrobial agents requires ppGpp and sigma s. *Lett Appl Microbiol* **29**: 323-326.
- Greenwood, R.C., and Gentry, D.R. (2002) The effect of antibiotic treatment on the intracellular nucleotide pools of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* **208**: 203-206.
- Haseltine, W.A., Block, R., Gilbert, W., and Weber, K. (1972) MSI and MSII made on ribosome in idling step of protein synthesis. *Nature* **238**: 381-384.
- Haugen, S.P., Ross, W., and Gourse, R.L. (2008) Advances in bacterial promoter recognition and its control by factors that do not bind DNA. *Nat Rev Microbiol* **6**: 507-519.
- Hauryliuk, V., Atkinson, G.C., Murakami, K.S., Tenson, T., and Gerdes, K. (2015) Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nat Rev Microbiol* **13**: 298-309.
- Haydon, D.J., Stokes, N.R., Ure, R., Galbraith, G., Bennett, J.M., Brown, D.R., Baker, P.J., Barynin, V.V., Rice, D.W., Sedelnikova, S.E., Heal, J.R., Sheridan, J.M., Aiwale, S.T., Chauhan, P.K., Srivastava, A., Taneja, A., Collins, I., Errington, J., and Czaplewski, L.G. (2008) An inhibitor of FtsZ with potent and selective anti-staphylococcal activity. *Science* **321**: 1673-1675.

- Heath, R.J., Jackowski, S., and Rock, C.O. (1994) Guanosine tetraphosphate inhibition of fatty acid and phospholipid synthesis in *Escherichia coli* is relieved by overexpression of glycerol-3-phosphate acyltransferase (plsB). *J Biol Chem* **269**: 26584-26590.
- Hirsch, M., and Elliott, T. (2002) Role of ppGpp in rpoS stationary-phase regulation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**: 5077-5087.
- Hogg, T., Mechold, U., Malke, H., Cashel, M., and Hilgenfeld, R. (2004) Conformational antagonism between opposing active sites in a bifunctional RelA/SpoT homolog modulates (p)ppGpp metabolism during the stringent response [corrected]. *Cell* **117**: 57-68.
- Ishiguro, E.E., and Ramey, W.D. (1976) Stringent control of peptidoglycan biosynthesis in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **127**: 1119-1126.
- Khakimova, M., Ahlgren, H.G., Harrison, J.J., English, A.M., and Nguyen, D. (2013) The stringent response controls catalases in *Pseudomonas aeruginosa* and is required for hydrogen peroxide and antibiotic tolerance. *J Bacteriol* **195**: 2011-2020.
- Kirchhoff, C., and Cypionka, H. (2017) Boosted Membrane Potential as Bioenergetic Response to Anoxia in *Dinoroseobacter shibae*. *Front Microbiol* **8**: 695.
- Kisumi, M., Kato, J., Sugiura, M., and Chibata, I. (1971) Production of L-arginine by arginine hydroxamate-resistant mutants of *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol* **22**: 987-991.
- Korch, S.B., Henderson, T.A., and Hill, T.M. (2003) Characterization of the hipA7 allele of *Escherichia coli* and evidence that high persistence is governed by (p)ppGpp synthesis. *Mol Microbiol* **50**: 1199-1213.
- Kriel, A., Bittner, A.N., Kim, S.H., Liu, K., Tehranchi, A.K., Zou, W.Y., Rendon, S., Chen, R., Tu, B.P., and Wang, J.D. (2012) Direct regulation of GTP homeostasis by (p)ppGpp: a critical component of viability and stress resistance. *Mol Cell* **48**: 231-241.
- Kriel, A., Brinsmade, S.R., Tse, J.L., Tehranchi, A.K., Bittner, A.N., Sonenshein, A.L., and Wang, J.D. (2014) GTP dysregulation in *Bacillus subtilis* cells lacking (p)ppGpp results in phenotypic amino acid auxotrophy and failure to adapt to nutrient downshift and regulate biosynthesis genes. *J Bacteriol* **196**: 189-201.
- Krásný, L., and Gourse, R.L. (2004) An alternative strategy for bacterial ribosome synthesis: *Bacillus subtilis* rRNA transcription regulation. *EMBO J* **23**: 4473-4483.
- Krásný, L., Tiserová, H., Jonák, J., Rejman, D., and Sanderová, H. (2008) The identity of the transcription +1 position is crucial for changes in gene expression in response to amino acid starvation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **69**: 42-54.
- Kunst, F., and Rapoport, G. (1995) Salt stress is an environmental signal affecting degradative enzyme synthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **177**: 2403-2407.
- Kuroda, A., Murphy, H., Cashel, M., and Kornberg, A. (1997) Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **272**: 21240-21243.
- Lamsa, A., Liu, W.T., Dorrestein, P.C., and Pogliano, K. (2012) The *Bacillus subtilis* cannibalism toxin SDP collapses the proton motive force and induces autolysis. *Mol Microbiol* **84**: 486-500.
- Lemos, J.A., Lin, V.K., Nascimento, M.M., Abranches, J., and Burne, R.A. (2007) Three gene products govern (p)ppGpp production by *Streptococcus mutans*. *Mol Microbiol* **65**: 1568-1581.
- Lesley, J.A., and Shapiro, L. (2008) SpoT regulates DnaA stability and initiation of DNA replication in carbon-starved *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **190**: 6867-6880.
- Liu, K., Bittner, A.N., and Wang, J.D. (2015) Diversity in (p)ppGpp metabolism and effectors. *Curr Opin Microbiol* **24**: 72-79.
- Liu, Y., and Imlay, J.A. (2013) Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species. *Science* **339**: 1210-1213.

- Lopez, J.M., Dromerick, A., and Freese, E. (1981) Response of guanosine 5'-triphosphate concentration to nutritional changes and its significance for *Bacillus subtilis* sporulation. *J Bacteriol* **146**: 605-613.
- Loveland, A.B., Bah, E., Madireddy, R., Zhang, Y., Brilot, A.F., Grigorieff, N., and Korostelev, A.A. (2016) Ribosome•RelA structures reveal the mechanism of stringent response activation. *Elife* **5**.
- Maisonneuve, E., Castro-Camargo, M., and Gerdes, K. (2013) (p)ppGpp controls bacterial persistence by stochastic induction of toxin-antitoxin activity. *Cell* **154**: 1140-1150.
- Mechold, U., Murphy, H., Brown, L., and Cashel, M. (2002) Intramolecular regulation of the opposing (p)ppGpp catalytic activities of Rel(Seq), the Rel/Spo enzyme from *Streptococcus equisimilis*. *J Bacteriol* **184**: 2878-2888.
- Merrikh, H., Ferrazzoli, A.E., Bougdour, A., Olivier-Mason, A., and Lovett, S.T. (2009) A DNA damage response in *Escherichia coli* involving the alternative sigma factor, RpoS. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 611-616.
- Milon, P., Tischenko, E., Tomsic, J., Caserta, E., Folkers, G., La Teana, A., Rodnina, M.V., Pon, C.L., Boelens, R., and Gualerzi, C.O. (2006) The nucleotide-binding site of bacterial translation initiation factor 2 (IF2) as a metabolic sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 13962-13967.
- My, L., Rekoske, B., Lemke, J.J., Viala, J.P., Gourse, R.L., and Bouveret, E. (2013) Transcription of the *Escherichia coli* fatty acid synthesis operon *fabH* is directly activated by FadR and inhibited by ppGpp. *J Bacteriol* **195**: 3784-3795.
- Nanamiya, H., Kasai, K., Nozawa, A., Yun, C.S., Narisawa, T., Murakami, K., Natori, Y., Kawamura, F., and Tozawa, Y. (2008) Identification and functional analysis of novel (p)ppGpp synthetase genes in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **67**: 291-304.
- Navarro Llorens, J.M., Tormo, A., and Martínez-García, E. (2010) Stationary phase in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 476-495.
- Nguyen, D., Joshi-Datar, A., Lepine, F., Bauerle, E., Olakanmi, O., Beer, K., McKay, G., Siehnell, R., Schafhauser, J., Wang, Y., Britigan, B.E., and Singh, P.K. (2011) Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science* **334**: 982-986.
- Niven, D.F., and MacLeod, R.A. (1980) Sodium ion-substrate symport in a marine bacterium. *J Bacteriol* **142**: 603-607.
- Nyström, T. (1994) Role of guanosine tetraphosphate in gene expression and the survival of glucose or seryl-tRNA starved cells of *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet* **245**: 355-362.
- O'Farrell, P.H. (1978) The suppression of defective translation by ppGpp and its role in the stringent response. *Cell* **14**: 545-557.
- Ostling, J., Flärdh, K., and Kjelleberg, S. (1995) Isolation of a carbon starvation regulatory mutant in a marine *Vibrio* strain. *J Bacteriol* **177**: 6978-6982.
- Parsons, J.B., Frank, M.W., Jackson, P., Subramanian, C., and Rock, C.O. (2014) Incorporation of extracellular fatty acids by a fatty acid kinase-dependent pathway in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **92**: 234-245.
- Potrykus, K., and Cashel, M. (2008) (p)ppGpp: still magical? *Annu Rev Microbiol* **62**: 35-51.
- Primm, T.P., Andersen, S.J., Mizrahi, V., Avarbock, D., Rubin, H., and Barry, C.E. (2000) The stringent response of *Mycobacterium tuberculosis* is required for long-term survival. *J Bacteriol* **182**: 4889-4898.
- Pulschen, A.A., Sastre, D.E., Machinandiarena, F., Crotta Asis, A., Albanesi, D., de Mendoza, D., and Gueiros-Filho, F.J. (2017) The stringent response plays a key role in *Bacillus subtilis* survival of fatty acid starvation. *Mol Microbiol* **103**: 698-712.

- Reiss, S., Pané-Farré, J., Fuchs, S., François, P., Liebeke, M., Schrenzel, J., Lindequist, U., Lalk, M., Wolz, C., Hecker, M., and Engelmann, S. (2012) Global analysis of the *Staphylococcus aureus* response to mupirocin. *Antimicrob Agents Chemother* **56**: 787-804.
- Rogozinski, M., (1964) A Rapid Quantitative Esterification Technique for Carboxylic Acids. In. *Journal of Chromatographic Science*, pp. 136-137.
- Sastre, D.E., Bisson-Filho, A., de Mendoza, D., and Gueiros-Filho, F.J. (2016) Revisiting the cell biology of the acyl-ACP:phosphate transacylase PlsX suggests that the phospholipid synthesis and cell division machineries are not coupled in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **100**: 621-634.
- Schneider, D.A., Murray, H.D., and Gourse, R.L. (2003) Measuring control of transcription initiation by changing concentrations of nucleotides and their derivatives. *Methods Enzymol* **370**: 606-617.
- Schreiber, G., Metzger, S., Aizenman, E., Roza, S., Cashel, M., and Glaser, G. (1991) Overexpression of the *relA* gene in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **266**: 3760-3767.
- Schreiber, G., Ron, E.Z., and Glaser, G. (1995) ppGpp-mediated regulation of DNA replication and cell division in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* **30**: 27-32.
- Schujman, G.E., Choi, K.H., Altabe, S., Rock, C.O., and de Mendoza, D. (2001) Response of *Bacillus subtilis* to cerulenin and acquisition of resistance. *J Bacteriol* **183**: 3032-3040.
- Seyfzadeh, M., Keener, J., and Nomura, M. (1993) *spoT*-dependent accumulation of guanosine tetraphosphate in response to fatty acid starvation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 11004-11008.
- Silverman, J.A., Perlmutter, N.G., and Shapiro, H.M. (2003) Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 2538-2544.
- Sonenshein, A.L. (2005) CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria. *Curr Opin Microbiol* **8**: 203-207.
- Spira, B., Silberstein, N., and Yagil, E. (1995) Guanosine 3',5'-bispyrophosphate (ppGpp) synthesis in cells of *Escherichia coli* starved for Pi. *J Bacteriol* **177**: 4053-4058.
- Srivatsan, A., and Wang, J.D. (2008) Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. *Curr Opin Microbiol* **11**: 100-105.
- Steinchen, W., and Bange, G. (2016) The magic dance of the alarmones (p)ppGpp. *Mol Microbiol* **101**: 531-544.
- Steinmetz, M., and Richter, R. (1994) Plasmids designed to alter the antibiotic resistance expressed by insertion mutations in *Bacillus subtilis*, through in vivo recombination. *Gene* **142**: 79-83.
- Stokes, N.R., Sievers, J., Barker, S., Bennett, J.M., Brown, D.R., Collins, I., Errington, V.M., Foulger, D., Hall, M., Halsey, R., Johnson, H., Rose, V., Thomaides, H.B., Haydon, D.J., Czaplewski, L.G., and Errington, J. (2005) Novel inhibitors of bacterial cytokinesis identified by a cell-based antibiotic screening assay. *J Biol Chem* **280**: 39709-39715.
- Stott, K.V., Wood, S.M., Blair, J.A., Nguyen, B.T., Herrera, A., Mora, Y.G., Cuajungco, M.P., and Murray, S.R. (2015) (p)ppGpp modulates cell size and the initiation of DNA replication in *Caulobacter crescentus* in response to a block in lipid biosynthesis. *Microbiology* **161**: 553-564.
- Strahl, H., and Hamoen, L.W. (2010) Membrane potential is important for bacterial cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 12281-12286.
- Sun, D., Lee, G., Lee, J.H., Kim, H.Y., Rhee, H.W., Park, S.Y., Kim, K.J., Kim, Y., Kim, B.Y., Hong, J.I., Park, C., Choy, H.E., Kim, J.H., Jeon, Y.H., and Chung, J. (2010) A

- metazoan ortholog of SpoT hydrolyzes ppGpp and functions in starvation responses. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 1188-1194.
- Swinney, D.C., and Anthony, J. (2011) How were new medicines discovered? *Nat Rev Drug Discov* **10**: 507-519.
- Syal, K., Flentie, K., Bhardwaj, N., Maiti, K., Jayaraman, N., Stallings, C.L., and Chatterji, D. (2017) Synthetic (p)ppGpp Analogue Is an Inhibitor of Stringent Response in Mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **61**.
- Sørensen, M.A., Jensen, K.F., and Pedersen, S. (1994) High concentrations of ppGpp decrease the RNA chain growth rate. Implications for protein synthesis and translational fidelity during amino acid starvation in Escherichia coli. *J Mol Biol* **236**: 441-454.
- Taguchi, M., Izui, K., and Katsuki, H. (1978) Stringent control of glycolysis in Escherichia coli. *Biochem Biophys Res Commun* **84**: 195-201.
- Tehranchi, A.K., Blankschien, M.D., Zhang, Y., Halliday, J.A., Srivatsan, A., Peng, J., Herman, C., and Wang, J.D. (2010) The transcription factor DksA prevents conflicts between DNA replication and transcription machinery. *Cell* **141**: 595-605.
- Thompson, A., Rolfe, M.D., Lucchini, S., Schwerk, P., Hinton, J.C., and Tedin, K. (2006) The bacterial signal molecule, ppGpp, mediates the environmental regulation of both the invasion and intracellular virulence gene programs of Salmonella. *J Biol Chem* **281**: 30112-30121.
- Trajtenberg, F., Altabe, S., Larrieux, N., Ficarra, F., de Mendoza, D., Buschiazzi, A., and Schujman, G.E. (2014) Structural insights into bacterial resistance to cerulenin. *FEBS J* **281**: 2324-2338.
- Traxler, M.F., Summers, S.M., Nguyen, H.T., Zacharia, V.M., Hightower, G.A., Smith, J.T., and Conway, T. (2008) The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **68**: 1128-1148.
- Tuomanen, E., Cozens, R., Tosch, W., Zak, O., and Tomasz, A. (1986) The rate of killing of Escherichia coli by beta-lactam antibiotics is strictly proportional to the rate of bacterial growth. *J Gen Microbiol* **132**: 1297-1304.
- Vadia, S., Tse, J.L., Lucena, R., Yang, Z., Kellogg, D.R., Wang, J.D., and Levin, P.A. (2017) Fatty Acid Availability Sets Cell Envelope Capacity and Dictates Microbial Cell Size. *Curr Biol* **27**: 1757-1767.e1755.
- Vasantha, N., and Freese, E. (1980) Enzyme changes during Bacillus subtilis sporulation caused by deprivation of guanine nucleotides. *J Bacteriol* **144**: 1119-1125.
- Vinella, D., Albrecht, C., Cashel, M., and D'Ari, R. (2005) Iron limitation induces SpoT-dependent accumulation of ppGpp in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **56**: 958-970.
- Wang, J.D., Sanders, G.M., and Grossman, A.D. (2007) Nutritional control of elongation of DNA replication by (p)ppGpp. *Cell* **128**: 865-875.
- Wexselblatt, E., Katzhendler, J., Saleem-Batcha, R., Hansen, G., Hilgenfeld, R., Glaser, G., and Vidavski, R.R. (2010) ppGpp analogues inhibit synthetase activity of Rel proteins from Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Bioorg Med Chem* **18**: 4485-4497.
- Wexselblatt, E., Oppenheimer-Shaanan, Y., Kaspary, I., London, N., Schueler-Furman, O., Yavin, E., Glaser, G., Katzhendler, J., and Ben-Yehuda, S. (2012) Relacin, a novel antibacterial agent targeting the Stringent Response. *PLoS Pathog* **8**: e1002925.
- Wille, W., Eisenstadt, E., and Willecke, K. (1975) Inhibition of de novo fatty acid synthesis by the antibiotic cerulenin in Bacillus subtilis: effects on citrate-Mg²⁺ transport and synthesis of macromolecules. *Antimicrob Agents Chemother* **8**: 231-237.
- Wolz, C., Geiger, T., and Goerke, C. (2010) The synthesis and function of the alarmone (p)ppGpp in firmicutes. *Int J Med Microbiol* **300**: 142-147.
- Wu, J., Long, Q., and Xie, J. (2010) (p)ppGpp and drug resistance. *J Cell Physiol* **224**: 300-304.

- Xiao, H., Kalman, M., Ikehara, K., Zemel, S., Glaser, G., and Cashel, M. (1991) Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of relA null mutants can be eliminated by spoT null mutations. *J Biol Chem* **266**: 5980-5990.
- Yao, Z., Davis, R.M., Kishony, R., Kahne, D., and Ruiz, N. (2012) Regulation of cell size in response to nutrient availability by fatty acid biosynthesis in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: E2561-2568.
- Zhang, J.H., Chung, T.D., and Oldenburg, K.R. (1999) A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen* **4**: 67-73.
- Zlitni, S., Blanchard, J.E., and Brown, E.D. (2009) High-throughput screening of model bacteria. *Methods Mol Biol* **486**: 13-27.

Anexo 1. Lista de Produção Bibliográfica

- **Artigos científicos publicados**

Pulschen, A.A.; Sastre, D.E.; Machinandiarena, F.; Asis, A.C.; Albanesi, D.; de Mendoza, D.; Gueiros-Filho, F.J (2017). The stringent response plays a key role in *Bacillus subtilis* survival of fatty acid starvation. *Molecular Microbiology*, Feb; **103** (4):698-712.

- **Artigos científicos submetidos ou em preparação**

Nicastro, G.G.; Kaihami, G.H.; Pulschen, A.A.; Hernandez-Montelongo, J., Pereira, T.O.; Bordi, C.; Baldini, R.L. (2017). FimV localizes the diguanylate cyclase DgcP at the cell poles in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* (**Em revisão**).

Pulschen, A.A.; Sastre, D.E.; Gueiros-Filho, F.J (2017). Brake or Die: Metabolic disorders in the absence of ppGpp and its implications towards bacterial viability. *Current Genetics*, (**Em preparação**).

Sastre, D.E.; Pulschen, A.A.; Mansor, L.B.; Pariente, J.S.B.; Marques Netto, C.G.C.; Navarro, M.V.A.S.; de Mendoza, D.; Gueiros-Filho, F.J. (2017) Coupling site-specific mutagenesis and functional analysis to elucidate the membrane targeting region of the acyl-ACP:phosphate transacylase PlsX from *Bacillus subtilis*. (**Em preparação**)

- **Participação de congressos e apresentação de painéis**

Pulschen, A. A.; Sastre, D. E.; Gueiros-Filho, F. J. The stringent response plays a key role in *Bacillus subtilis* survival of fatty acid starvation. **Apresentação de pôster na XLVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2016.**

Pulschen, A. A.; Sastre, D. E.; Gueiros-Filho, F. J. Stringent response and fatty acid starvation: Importance and implications towards drug development. **Apresentação de pôster no VIII Simpósio de Microbiologia Aplicada (SMA) UNESP, 2017.**