UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

BRUNO YASUI MATSUYAMA

Caracterização estrutural e funcional de FleQ, fator de transcrição
envolvido na expressão de genes flagelares e de formação de
biofilme

São Carlos

2016

BRUNO YASUI MATSUYAMA

Caracterização estrutural e funcional de FleQ, fator de transcrição envolvido na expressão de genes flagelares e de formação de biofilme

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Marcos Vicente de Albuquerque Salles Navarro

Versão Corrigida
(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica revisada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Matsuyama, Bruno Yasui

Caracterização estrutural e funcional de FleQ,
fator de transcrição envolvido na expressão de genes
flagelares e de formação de biofilme / Bruno Yasui
Matsuyama; orientador Marcos Vicente de Albuquerque
Salles Navarro - versão corrigida - São Carlos,
2016.

113 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São
Carlos, Universidade de São Paulo, 2016.

1. Biofilme. 2. c-di-GMP. 3. FleQ. I. Navarro,
Marcos Vicente de Albuquerque Salles, orient. II.
Título.

Dedico este trabalho aos meus pais, Ataide e Luzia, que me criaram com todo amor e carinho que eu poderia desejar e se sacrificaram para que nunca me faltasse nada. Aos meus irmãos por terem cuidado de mim e a minha noiva Larissa, por ter me apoiado em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus colegas de laboratório pelas inúmeras dicas e conselhos a respeito de tudo.

À Prof.^a Dr.^a Ana Paula Ulian de Araújo, que me fez interessar pela área e me deu a oportunidade de fazer iniciação científica em 2007 no grupo de biofísica, onde continuei até a presente data.

Ao Prof. Richard Garrat que através de suas palestras e aulas, me fez me interessar por biologia estrutural.

Ao Prof. Dr. Marcos V. A. S. Navarro, por ter me orientado e me ensinado durante o doutorado.

Ao Instituto de Física de São Carlos, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Aos meus pais e irmãos pelo apoio e amor incondicional, e por terem trabalhado duro ao longo de anos para que eu pudesse continuar estudando,

À minha querida noiva Larissa, que me acompanhou durante toda essa jornada e esteve ao meu lado em todos os meus momentos de dúvida, sempre me aconselhando e incentivando.

“Em algum lugar, algo incrível está esperando ser descoberto.”

- Carl Sagan

RESUMO

MATSUYAMA, B.Y. **Caracterização estrutural e funcional de FleQ, fator de transcrição envolvido na expressão de genes flagelares e de formação do biofilme.** 2016. 113 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Bactérias podem formar comunidades bacterianas sésseis, conhecidas como biofilmes, os quais possuem um grande impacto tanto na indústria, por serem responsáveis pelo entupimento e corrosão de tubulações, quanto na saúde, por serem resistentes ao tratamento com antibióticos. Nos últimos anos, o mensageiro secundário c-di-GMP foi descoberto como um importante regulador nas vias de sinalização envolvidas na capacidade da bactéria alternar entre esses dois fenótipos: livre nadante ou em biofilme. Um dos alvos moleculares de c-di-GMP é FleQ, uma *Enhancer binding protein* bacteriana (bEBP), que regula a expressão dos genes flagelares de forma dependente do fator σ^{54} , em um processo dependente de ATP. FleQ também atua no controle da transcrição dos genes envolvidos na síntese do exopolissacarídeo PEL, principal constituinte da matriz protetora que reveste o biofilme bacteriano em *Pseudomonas aeruginosa*, possivelmente em um processo dependente do fator σ^{70} . A atividade de FleQ é regulada pelos níveis de c-di-GMP e por uma segunda proteína, FleN, que se liga diretamente à FleQ. Apesar do papel do complexo FleQ:FleN na regulação do operon *pel* ter sido estudado, seu efeito na transcrição dos genes flagelares ainda é desconhecido. Para um melhor entendimento do mecanismo regulatório de FleQ, foram resolvidas as estruturas cristalográficas do domínio REC e do domínio AAA+ em seu estado apo e em complexo com ADP, ATP γ S e c-di-GMP. Também foi identificado e confirmado o sítio ativo da proteína, as diferentes formas oligoméricas de FleQ, além da proposição de como a atividade da proteína é controlada por FleN. Esses resultados sugerem um mecanismo único na transcrição mediada por uma bEBP não convencional que atua tanto com o fator σ^{54} e σ^{70} , no qual a oligomerização do complexo FleQ:FleN possui um papel essencial na regulação dos genes flagelares e de formação do biofilme. Estes estudos também levam à hipótese que outras bEBPs, associadas a diferentes fenótipos, podem ser reguladas por c-di-GMP.

Palavras-chave: Biofilme. C-di-GMP. FleQ.

ABSTRACT

MATSUYAMA, B.Y. **Structural and functional characterization of FleQ, a transcriptional factor related to flagellar gene expression and biofilm formation.** 2016. 113 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Bacteria can form sessile communities known as biofilm, which has a major industrial impact, causing tubing obstruction and corrosion, and in the health, due to its resistance against antibiotic treatment. In recent years, a novel secondary messenger molecule named c-di-GMP has been discovered as a key regulator in signaling pathways related to the bacteria capacity to alternate between two distinct phenotypes: free-swimming cells and biofilm community. One of the molecular targets of c-di-GMP so far identified is FleQ, a bacterial enhancer binding protein (bEBP), which regulates flagellar gene expression in a σ^{54} dependent mechanism. FleQ acts also controlling transcription of genes involved in PEL exopolysaccharide synthesis, main component of the protective matrix, possibly in a σ^{70} dependent process. FleQ activity is regulated by a second protein, FleN, which directly interacts with FleQ. Although the role of FleQ:FleN complex in regulating *pel* operon has been studied, its effect in flagellar gene transcription has not. For a better understanding of FleQ regulatory mechanism, we obtained the crystallographic structure of the REC domain and the AAA+ domain in its apo state and bound to ADP, ATP γ S and c-di-GMP. It has also been identified and confirmed c-di-GMP binding site, the distinct oligomers of FleQ, and also proposed a mechanism by which FleN regulates FleQ. These results suggest an unique mechanism in the transcription mediated by an unusual bEBP that acts in conjunction with both σ^{54} and σ^{70} factors, in which oligomerization of FleQ:FleN complex has a crucial role in the regulation of flagellar and biofilm formation genes. These studies also lead to the hypothesis that others bEBP, related to distinct phenotypes, may be regulated by c-di-GMP.

Keywords: Biofilm. C-di-GMP. FleQ.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Representação do ciclo de formação do biofilme. Bactérias podem aderir à superfície de forma reversível. As células, inicialmente aderidas à uma superfície, passam a se multiplicar e a secretar uma matriz exopolissacarídica que as revestem e as protegem. Em seguida, células podem ser dispersadas do biofilme, em sua forma unicelular nadante.....25
- Figura 2 – Níveis de c-di-GMP durante ciclo celular bacteriano. Distribuição assimétrica de c-di-GMP entre células mãe e filha afeta o comportamento da bactéria. Enquanto que as células jovens de *Caulobacter crescentus* são liberadas para colonizar novas regiões, as de *Pseudomonas aeruginosa* se mantêm fixas nos biofilmes, para garantir sua sobrevivência.28
- Figura 3 – Molécula sinalizadora bacteriana, c-di-GMP. Domínios GGDEF promovem a síntese de c-di-GMP a partir de duas moléculas de GTP, enquanto que domínios EAL e HD-GYP hidrolisam o nucleotídeo. Os quadros em verde indicam o efeito de altos níveis de c-di-GMP, enquanto que em vermelho, corresponde aos baixos níveis. Esses domínios costumam estar presentes em proteínas modulares, onde X indica domínios REC, GAF, HAMP, ou PAS, por exemplo.29
- Figura 4 – Diferentes formas de c-di-GMP reconhecidas por seus receptores. Abaixo das figuras estão listados alguns exemplos de proteínas que interagem com a respectiva forma de c-di-GMP.30
- Figura 5 – Diferenças entre fatores σ^{70} e σ^{54} . O fator σ^{70} interage nas regiões -35 e -10 do sítio de início de transcrição, e é reconhecido por uma RNAP, formando um CF inativo, cuja ativação para o CA ocorre espontaneamente. Em contrapartida o fator σ^{54} se liga nas regiões -24 e -12 do sítio de início de transcrição, e seu complexo com a RNAP precisa de uma bEBP para ser ativado, em um processo dependente da hidrólise de ATP.....33
- Figura 6 – Esquema de ativação dos CF RNAP- σ^{54} por meio de bEBPs. A) O fator σ^{54} se liga na região -12 e -24 do DNA e forma um complexo inativo com a RNA polimerase, enquanto que bEBPs se ligam à uma distância de -80pb a -150pb, nas UAS. B) Proteínas IHF promovem a dobra do DNA, o que permite que a bEBP entre em contato com CF RNAP- σ^{54} . C) Por fim, a hidrólise de ATP pela bEBP fornece a energia necessária para converter o CF RNAP- σ^{54} para sua forma ativa, além de promover a abertura da dupla fita de DNA.34

- Figura 7 – Estrutura do domínio AAA+ de NtrC1 de *Aquifex aeolicus* (PDB = 3M0E). A) Representação de um protômeros, que pode ser dividido em um subdomínio α/β e um subdomínio α -hélice. No quadro em destaque, ilustração do sítio catalítico do ATP. *Walker A* em marrom (WA), “*walker B*” em ciano (WB), sensor I em laranja (SI), sensor II em vermelho (SII), N¹⁹⁵ “*switch*” em amarelo e o R *finger* R²⁹³ e R²⁹⁹ em roxo. O “*” indica que os resíduos são provenientes do protômeros adjacente. B) Anel oligomérico de NtrC1 ligada à ATP, com destaque para o motivo GAFTGA, em azul, localizado no centro do anel..... 36
- Figura 8 – Modelo atual do mecanismo de regulação do operon *pel* por FleQ. A) FleQ se liga em dois sítios distintos, “*box*” 1 e “*box*” 2 do promotor *pel*. B) Ligação de FleN em FleQ. C) ATP promove dimerização de FleQ, causando uma dobra do DNA que impede a transcrição. D) c-di-GMP alivia a interação entre FleQ e o *box* 2, o que afrouxa a dobra de DNA e permite o acesso da RNA polimerase ao promotor *pel*. 38
- Figura 9 - Arquitetura de domínios de FleQ e FleN. Arranjo característico dos domínios encontrados em FleQ e FleN de diferentes organismos. Os números abaixo do esquema identificam os resíduos que delimitam os domínios encontrados nas proteínas de PA e XAC. Domínios identificados no site PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) através da sequência primária. 43
- Figura 10 - Métodos de gota suspensa (A) e de gota sentada (B) para cristalização de proteínas. A solução precipitante do reservatório é diluída na solução de proteína. Como a solução do reservatório está mais concentrada, ocorre uma difusão de vapor entre a gota suspensa ou sentada para o reservatório, e consequentemente, a proteína vai sendo concentrada gradativamente. 49
- Figura 11 - Esquema de um equipamento de calorimetria de titulação isotérmica. A seringa de injeção titula a amostra A na cela, contendo a amostra B. A interação entre as duas amostras troca calor com o meio causando uma diferença de temperatura em relação a cela de referência. As pilhas térmicas mantêm o equilíbrio térmico entre as duas celas, fornecendo ou absorvendo calor. O computador, com base nas concentrações de A e B, e pelo calor de interação registrado, calcula os parâmetros termodinâmicos da interação entre A e B. 53
- Figura 12 - Mecanismo de reação de *cross linking* químico por NHS éster. A) Etileno glicolbis(succinimidilsuccinato), EGS, com tamanho de

16Å. A estrutura destacada dentro do retângulo constitui na cadeia R do NHS éster. B) NHS éster interage com as aminas primárias da extremidade N-terminal da proteína e das lisinas da proteína e as conecta covalentemente através da cadeia R..... 55

Figura 13 - Monitoramento da atividade ATPase pelo kit *EnzChek Phosphate assay* (Invitrogen). O fosfato inorgânico liberado da atividade ATPase da amostra interage com 2-amino-6-mercaptopurina ribosida e é convertido por PNP para ribose 1-fosfato e 2-amino-6-mercaptopurina que absorve em 360nm..... 56

Figura 14 - Predição dos domínios de PA FleQ pelo BLASTP (A) e predição de estrutura secundária pelo PSIPRED (B). Em amarelo regiões com possível formação de fita β e em rosa, de hélices α 60

Figura 15 - Amplificação das construções das regiões codificantes (RC) de FleQ e FleN e de suas diferentes construções. A) Análise eletroforética do produto de PCR em gel de agarose 0,8%. A-1) RC PA FleQ (1467 pb), A-2) RC PA FleN (837 pb), A-3) RC XAC FleQ (1479 pb) e A-4) RC XAC FleN (954 pb), B-1) RC PA FleQ¹⁻⁴³⁰ (1290 pb), B-2) RC PA FleQ¹⁻³²⁰ (963 pb), B-3) RC PA FleQ¹⁴⁴⁻³¹⁵ (519 pb), B-4) RC PA FleQ¹⁻¹³⁹ (420 pb), B-5) RC PA FleN⁶⁻²²⁷ (669pb), C-1) RC XAC FleQ¹⁻⁴³⁶ (1311pb), C-2) RC XAC FleQ¹⁻³⁰⁸ (927 pb), C-3) RC XAC FleQ¹³⁷⁻³⁰⁸ (519 pb), C-4) RC XAC FleQ¹⁻¹³⁴ (405 pb) e C-5) RC XAC FleN⁴⁹⁻²⁷⁰ (669 pb). 60

Figura 16 - Amostras da purificação de PA FleQ, PA FleN e XAC FleQ. Análise em SDS-PAGE: A-1) PA FleQ (55,3kDa), A-2) PA FleN (30kDa), A-3) XAC FleQ (54,3 kDa). B) Exemplo de purificação da XAC FleQ¹⁻¹³⁴ (15kDa): B-1) SUMO+XAC FleQ¹⁻¹³⁴ após primeira IMAC, B-2) XAC FleQ¹⁻¹³⁴ após clivagem do 6xHisSUMO-tag overnight na geladeira com Ulp-1, B-3) XAC FleQ após segunda IMAC para remover o tag 6xHisSUMO. C1) XAC FleQ¹⁻¹³⁴ após gel filtração em coluna HiLoad 16/60 Superdex 75, cujo cromatograma está apresentado em D. 61

Figura 17 - Cristais da XAC FleQ^{N-term} (A) e PA FleQ^{AAA} (B). A condição de cristalização da XAC FleQ^{N-term} foi 0,1M Bis-Tris pH 6,5 25% w/v PEG3350 e para a PA FleQ^{AAA}, 0,1 M Bis-Tris pH6, 5 0,2M Sulfato de Amônio 25%w/v PEG3350. 65

Figura 18 - Estrutura cristalográfica de PA FleQ^{AAA}, A) Esquematização dos domínios de FleQ assim como motivos estruturais conservados. B) Estrutura do domínio AAA+ de PA FleQ ligada a ATPγS e seus subdomínios SD1 e SD2. C) Hexâmero cristalográfico observado para PA FleQ^{AAA} que cristalizou no grupo espacial P6₅, as

estruturas em preto indicam os protômeros gerados pelas operações de simetria. Uma visão lateral do eixo também está indicada, com protômeros intercalados, preto e branco. A leve abertura do anel hexamérico, aliada as operações de simetria, gera uma espécie de filamento de PA FleQ^{AAA} 71

Figura 19 - Imagens de microscopia eletrônica por *negative stain* de PA FleQ. A) Micrografia de PA FleQ mostrando as partículas únicas em condição saturada de ATP não hidrolisável. Não é observado formações de filamentos de PA FleQ. B) Função de auto-rotação da média das imagens, destacando o a presença de um eixo de rotação de sexta ordem. 72

Figura 20 - Estrutura cristalográfica do complexo PA FleQ:c-di-GMP. A) Em destaque, está representado o sítio de ligação de c-di-GMP na sua forma dimérica, entre os subdomínios D1 e D2. B) Conservação dos resíduos envolvidos na interação com o c-di-GMP entre as sequências de proteínas homólogas a FleQ e a NtrC. Os organismos de origem seguem a seguinte abreviação: Pa – *Pseudomonas aeruginosa*, Vc – *Vibrio cholerae*, Xc – *Xanthomonas citri*, Aa – *Aquifex aeolicus*, Gs – *Geobacter sulfurreducens*. 73

Figura 21 - Ensaios de calorimetria de titulação isotérmica de c-di-GMP. A) Titulação de c-di-GMP em PA FleQ, com uma estequiometria de duas moléculas de ligante por molécula de proteína e uma constante de dissociação de $4,1 \pm 0,5 \mu\text{M}$. B) Titulação de c-di-GMP nos mutantes PA FleQ R¹⁸⁵E e PA FleQ R³³⁴E, com uma troca de calor semelhante a apresentada pela diluição de c-di-GMP em tampão, o que indica que não houve interação entre proteína e ligante. C) Titulação de c-di-GMP em XAC FleQ indica que XAC FleQ não é um receptor para o nucleotídeo. 74

Figura 22 - Sobreposição estrutural do complexo PA FleQ^{AAA} : c-di-GMP e PA FleQ : ATPγS. Ao fixar SD1 como molde, observa-se uma diferença angular de 9° na posição de SD2 e o deslocamento do N-terminal para dentro do sítio de ATP, na estrutura ligada à c-di-GMP. Em destaque, está o sítio de ligação de ambos os nucleotídeos. Representação como superfície sólida da cadeia lateral de S¹⁴⁵ e da cadeia principal de G¹⁷⁹, indica uma ocupação parcial do sítio de ATP, promovida pela ligação de c-di-GMP..... 76

Figura 23 - Oligômero de PA FleQ^{AAA} mediado por c-di-GMP. A) Hexâmero formado por um dímero de trímeros, obtido através das operações do grupo espacial P₆₃22 em duas visões ortogonais. B) Análises das energias de solvatação das interfaces envolvidas no hexâmero do complexo PA FleQ^{AAA}:c-di-GMP. 78

- Figura 24 - Contribuição dos diferentes domínios de FleQ, e seus ligantes, em sua oligomerização. SDS PAGE das reações de “cross linking” químico em gel 10% acrilamida. A) Reação de *cross linking* de PA FleQ (55kDa) ao longo do tempo e na presença de ATPγS e/ou c-di-GMP. Também foi analisado os efeitos dos diferentes nucleotídeos na oligomerização de PA FleQ^{N-tem} (16kDa) em (B), PA FleQ^{AAA} (29kDa) em (C) e PA FleQ^{AAA+HTH} (38kDa) em (D). 80
- Figura 25 - Diagrama das mutações de PA FleQ. Mutações pontuais foram conduzidas a fim de estudar o impacto da oligomerização na atividade da proteína. Entre parênteses, está indicado o comportamento esperado para as mutações: indiferente (=), aumento ou diminuição. Os números em vermelho indicam a localização das mutações no hexâmero em anel de FleQ ou no mediado por c-di-GMP. 81
- Figura 26 - Experimentos de “cross linking” de diferentes mutantes de PA FleQ. O número em vermelho, indica a região afetada pela mutação, de acordo com o diagrama da figura 29. A) Análise de oligomerização dos mutantes de PA FleQ. B) Efeito de diferentes concentrações de ATPγS no equilíbrio das diferentes populações oligoméricas. C) Impacto de ATPγS e c-di-GMP na oligomerização de FleQ. 82
- Figura 27 - Espectros de dicroísmo circular de FleQ e seus mutantes. A) Varredura do espectro entre 200 e 260nm, a temperatura ambiente. B) Desnaturação térmica de FleQ e seus mutantes, com acompanhamento da intensidade do espectro em 222nm ao longo da variação de temperatura entre 10 e 90°C. WT indica a PA FleQ nativa. 83
- Figura 28 - Ensaios de atividade de PA FleQ e seus mutantes. A) Velocidade inicial de hidrólise de ATP por PA FleQ e seus variantes, expressas como percentual em relação à proteína nativa. B) Efeito do c-di-GMP na atividade ATPase de FleQ e seus mutantes. Os valores estão apresentados como percentual da velocidade inicial das proteínas sem incubação com c-di-GMP. C) Experimentos de ITC, com titulação de c-di-GMP em FleQ e nos mutantes das interfaces oligoméricas, I³⁷⁴E e T¹⁴⁹E. 84
- Figura 29 - Ensaios de RT-PCR para medição da taxa de transcrição do operon pel, de FleQ e seus diferentes mutantes. Os experimentos foram realizados em cepas deletadas de fleN. Os experimentos foram conduzidos em cepas com baixos (em cinza) e altos (azul) índices de c-di-GMP. Os números em vermelho indicam a localização dos resíduos mutados de acordo com o diagrama da

figura 25. Os resultados foram normalizados em relação a atividade de FleQ nativa em ausência de c-di-GMP..... 86

Figura 30 - Mecanismo de regulação do operon pel. FleQ, na sua forma em anel hexamérico se liga ao promotor pel nos *boxes* 1 e 2, causando uma dobra do DNA entre essas duas regiões e reprimindo sua transcrição. A ligação de c-di-GMP promove uma mudança na oligomerização de FleQ, liberando o *box* 2, e que consequentemente, permite a transcrição do operon..... 87

Figura 31 - Estrutura de XAC FleQ^{N-term}. A) Estrutura do domínio FleQ de *Xanthomonas citri*. B) Alinhamento estrutural entre XAC FleQ^{N-term} (verde) e PAO1 FleQ^{N-term} (rosa), com um rmsd de 2,3Å. Em (B), a numeração com asterisco é referente a PAO1 FleQ. 88

Figura 32 - Diferenças entre FleQ^{N-term} e domínios REC. A) Sobreposição estrutural do domínio N-terminal de FleQ com o domínio REC. Em destaque os principais resíduos envolvidos na fosforilação dos domínios REC (roxo) e os resíduos equivalentes no domínio N-term (laranja). B) Conservação dos resíduos do domínio N-terminal de FleQ e dos domínios REC. Em roxo são os principais resíduos envolvidos na coordenação do Mg⁺ e do fosfato, e em ativar a mudança conformacional mediada pela fosforilação, enquanto que em laranja são os resíduos correspondentes do domínio N-term de FleQ. Sequencias representativas de cada domínio estão indicadas abaixo do logo: *Xanthomonas citri* (XAC) FleQ, *Pseudomonas aeruginosa* (PA) FleQ, *Vibrio cholerae* (VC) FlrA, *Aquifex aeolicus* (AA) NtrC1 e *Geobacter sulfurreducens* (GS) NtrC. FlrA é o homólogo de FleQ em VC e também foi identificado como um receptor de c-di-GMP..... 90

Figura 33 - FleQ^{N-term} forma dímeros distintos dos observados em NtrC. A) Mapeamento da conservação dos resíduos dos domínios REC e FleQ nas superfícies de NtrC e XAC FleQ, respectivamente. B) Dímero de NtrC1 mediado pela interface $\alpha 4$ - $\beta 5$ - $\alpha 5$. C) Dímero de FleQ^{N-term}, com formação de uma interface hidrofóbica, $\alpha 1$ - $\alpha 5$. Destaque dos principais resíduos que formam esse núcleo hidrofóbico entre os dois protômeros..... 92

Figura 34 - Estudos de interação entre FleQ e FleN por “cross linking” químico. A) FleN (30kDa) forma uma pequena população dimérica e tetramérica em solução, independente da presença de ATPγS. B) FleN pode ser capaz de interagir com FleQ^{N-term} (16kDa), indicado pela banda (i). C) Interação entre FleN e FleQ^{AAA} (29kDa). Na presença de ATPγS, há formação de bandas adicionais indicadas por (i) que podem ser correspondentes a um

hetero-oligômero FleN:FleQ^{AAA}, o qual é dissociado com adição de c-di-GMP. D) Interação entre FleN e FleQ nativa (55kDa). Acredita-se que a banda indicada por (i) seja referente ao dímero de trímeros mediado por c-di-GMP de FleQ, estabilizado por sua interação com FleN, enquanto que (ii) corresponderia apenas ao trímero. As bandas indicadas em (iii) podem ser devido a formação de hetero-oligômeros menores entre as duas proteínas. As letras M, D, Tr, Te e H, na figura, indicam monômero, dímero, trímero, tetrâmero e hexâmero, respectivamente. Além disso as letras em azul correspondem ao oligômero apresentado por FleN enquanto que, em marrom, se trataria da construção de FleQ. 94

Figura 35 – Termoforese em microescala da interação entre FleN e FleQ na ausência (em vermelho) e na presença (em preto) de ATP indicam constantes de dissociação de $3,8 \pm 0,5 \mu\text{M}$ e $18,9 \pm 0,6 \mu\text{M}$, respectivamente. 96

Figura 36 – Sobreposição estrutural do domínio AAA+ de FleQ ligado à ATPγS, ADP e em seu estado apo. A) Em destaque, os loops 1 e 2, responsáveis pela interação com o fator σ^{54} . B) Comparação do glutamato *switch* de FleQ e de PspF, (C) e do R *finger* de FleQ e NtrC1. 97

Figura 37 – Mecanismo de atividade de FleQ regulado por FleN. A) Complexo FleQ:FleN ligado à ATP na sua forma incompetente para transcrição dos genes flagelares e do *pel*. B) FleN hidrolisa ATP e expõe o motivo GAFTGA para interação com a RNAP- σ^{54} (C), permitindo que haja a transcrição dos genes flagelares. Em seguida, o ATP volta a se ligar em FleN e o complexo retorna ao seu estado inativo (A). A ligação de c-di-GMP no complexo promove um rearranjo estrutural do complexo FleQ:FleN, de forma que FleQ perde sua capacidade de reprimir a transcrição do operon *pel* e passe a ser um ativador. 102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Diferentes construções com os domínios de FleQ e FleN. Construções com “*” se referem as fornecidas pelo Prof. Dr. Holger Sondermann. WT e HTH se referem, respectivamente, a proteína nativa e ao domínio hélice volta hélice. Nucleotídeos marcados em vermelho indicam sítio de restrição da BamHI, em azul da HindIII e em verde da XhoI. Os números em sobrescrito, na construção, indicam o intervalo de aminoácidos que ela abrange.....	44
Tabela 2 -	Etapas da reação de PCR para o isolamento e amplificação dos fragmentos de interesse. Cada etapa do ciclo de PCR está descrita com a temperatura e o intervalo de tempo utilizado. A etapa de desnaturação, hibridização e extensão foram repetidas 30 vezes.....	45
Tabela 3 -	Condições de tampões testadas para otimizar a solubilidade das proteínas de estudo.....	48
Tabela 4 -	Aditivos selecionados para otimização de solubilidade.....	48
Tabela 5 -	Mutações sítio dirigidas do gene PA <i>fleQ</i> e seus respectivos <i>primers</i> . A nomenclatura AxxxB, indica que o aminoácido A, número xxx, foi mutado para o aminoácido B. Por exemplo, R334A indica que a arginina (R) na posição 334 foi mutada para uma alanina (A).	51
Tabela 6 -	Etapas da reação de PCR para a mutação sítio dirigida de PA <i>fleQ</i> . Cada etapa do ciclo de PCR está descrita com a temperatura e o intervalo de tempo utilizado. A etapa de desnaturação, hibridização e extensão foram repetidas 18 vezes. ...	52
Tabela 7 -	Resultados das medidas de DLS de XAC FleQ em diferentes tampões. A coluna pico indica as diferentes populações encontradas na amostra, sendo %Massa a quantidade de proteína encontrada naquela forma. O DLS também fornece informações como o raio hidrodinâmico (RH), a polidispersividade (PD) e a massa molecular (MM) estimada, considerando uma proteína globular.	62
Tabela 8 -	Resultados das medidas de DLS de XAC FleQ em 25 mM MES pH 6,2 e diferentes aditivos. A coluna pico indica as diferentes populações encontradas na amostra, sendo % Massa a quantidade de proteína encontrada naquela forma. O DLS também fornece informações como o raio hidrodinâmico (RH), a polidispersividade (PD) e a massa molecular (MM) estimada, considerando uma proteína globular.	63

Tabela 9 -	Resumo do progresso da clonagem, expressão e purificação da FleQ e FleN e suas construções, assim como o tampão de eluição na gel filtração.....	64
Tabela 10 -	Nomenclatura utilizada para as construções que apresentaram os principais resultados descritos neste trabalho. HTH representa o motivo de ligação a DNA hélice-volta-hélice.....	64
Tabela 11 -	Condições de cristalização e concentração das proteínas em estudo.....	65
Tabela 12 -	Dados do processamento e refinamento dos dados de difração de raios X da XAC FleQ ^{N-term} e PA FleQ ^{AAA} na sua forma apo e ligada com ADP e ATPγS e PA FleQ ^{AAA} com c-di-GMP. Entre parênteses são os dados referentes a camada de maior resolução.	68
Tabela 13 -	Estatísticas de sequências de bEBPs que possuem o sítio de ligação à c-di-GMP conservado.	75
Tabela 14 -	Alinhamento estrutural da XAC FleQ ¹⁻¹³⁹ realizado pelo servidor DALI. Descrições dos melhores alinhamentos. O Z-score por volta de 13,0 indica que XAC FleQ ¹⁻¹³⁹ é provavelmente homóloga dos domínios receptores de resposta TCS.	89

Sumário

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	Biofilme bacteriano e suas vantagens em relação a células livres.....	25
1.2	Vias de sinalização mediadas por c-di-GMP	27
1.3	<i>Enhancer Binding Proteins</i> bacterianas.....	32
1.3.1	Fatores σ e mecanismo de ação das bEBP	32
1.3.2	Arquitetura das bEBPs.....	34
1.4	FleQ: fator de transcrição envolvido na regulação dos genes flagelares e de formação de biofilme	37
2	OBJETIVOS	41
3	MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1	Estratégia de estudo e delimitação dos domínios	43
3.2	Clonagem em vetores de expressão.....	44
3.3	Expressão recombinante e purificação	46
3.4	Otimização de tampão por espalhamento dinâmico de luz	47
3.5	Ensaio cristalográfico	48
3.6	Coleta de dados de difração de raios X e resolução estrutural.....	50
3.7	Mutação sítio dirigida da região codificante de PA FleQ.....	51
3.8	Caracterização termodinâmica da interação entre PA FleQ e c-di-GMP	53
3.9	Caracterização oligomérica da PA FleQ através de <i>cross linking</i> químico	54
3.10	Ensaio de atividade ATPase.....	55
3.11	Estudos de dicroísmo circular.....	56
3.12	Ensaio de termoforese em microescala.....	57
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1	Produção heteróloga, caracterização inicial e cristalização das amostras de estudo.....	59
4.1.1	Clonagem das regiões codificantes de <i>fleQ</i> e <i>fleN</i> e de suas diferentes construções.....	59
4.1.2	Purificação e otimização de tampão de FleQ, FleN e suas construções	61
4.1.3	Ensaio cristalográfico	65
4.1.4	Coleta e processamento dos dados cristalográficos	66
4.2	Regulação da transcrição do operon <i>pel</i> por FleQ.....	69
4.2.1	PA FleQ forma anéis hexaméricos típicos de bEBPs.....	69
4.2.2	Domínios AAA+ possivelmente constituem novos alvos de ligação à c-di-GMP	72
4.2.3	c-di-GMP não compete com ATP pelo mesmo sítio de ligação em PA FleQ	75
4.2.4	Ligação à c-di-GMP promove um rearranjo oligomérico de PA FleQ	77

4.2.5	Oligomerização de PA FleQ possui um papel essencial na atividade da proteína	79
4.2.6	Oligomerização de FleQ, na sua forma de anéis hexaméricos, é essencial para repressão do operon <i>pel</i>	85
4.3	Mecanismo regulatórios da atividade de FleQ.....	87
4.3.1	Domínio N-terminal de FleQ é estruturalmente semelhante a domínios reguladores de resposta, mas funcionalmente diferente	88
4.3.2	FleN é essencial para estabilizar os oligômeros mediados por c-di-GMP	93
4.3.3	Hidrólise de ATP não promove rearranjo do GAFTGA.....	96
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	99
	REFERÊNCIAS.....	103

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biofilme bacteriano e suas vantagens em relação a células livres

Bactérias podem formar comunidades bacterianas sésseis conhecidas como biofilmes.¹⁻² Inicialmente, as bactérias utilizam o flagelo para se locomover no meio em que se encontram, até o momento em que um sinal externo ou condições adversas fazem com que elas utilizem adesinas e estruturas como o pilus para se aderirem a uma superfície.³ Em seguida, as bactérias perdem o flagelo, e começam a se multiplicar e secretar uma matriz extracelular que as revestem e as protegem das condições hostis do meio.¹ Por fim, quando as condições se tornam favoráveis novamente, as bactérias podem se desprender da matriz, para que elas possam colonizar novos locais, fechando o ciclo celular representado na figura 1.⁴⁻⁵ Cada estágio da formação e desprendimento do biofilme bacteriano é um processo fortemente regulado através da expressão de conjuntos distintos de genes.²

Figura 1 – Representação do ciclo de formação do biofilme. Bactérias podem aderir à superfície de forma reversível. As células, inicialmente aderidas à uma superfície, passam a se multiplicar e a secretar uma matriz exopolissacarídica que as revestem e as protegem. Em seguida, células podem ser dispersadas do biofilme, em sua forma unicelular nadante.

Fonte: Adaptada de O' TOOLE et al.²

Os biofilmes podem ser constituídos por uma única espécie bacteriana, mas normalmente são formados por uma variedade de microorganismos, o que confere maior complexidade ao sistema.^{1,6-7} As bactérias são encontradas no meio ambiente, principalmente na sua forma de biofilme, pois isso lhes garante

características únicas que são essenciais para sua sobrevivência em ambientes hostis.^{1,8}

A matriz extracelular, composta por exopolissacarídeos, proteínas e DNA, também constitui um mecanismo de defesa do biofilme, pois retarda a difusão de antibióticos e outros solutos.⁹⁻¹⁰ O DNA extracelular possui um papel estrutural importante para manter o biofilme coeso, e seu acúmulo facilita a transferência horizontal de genes. Além disso, a elevada densidade celular imobilizada nos biofilmes também facilita processos como a conjugação, em que ocorre a transferência de plasmídeos entre as bactérias, as quais podem adquirir resistência contra agentes bactericidas.¹¹⁻¹² Por fim, as células que constituem o biofilme também podem entrar em um estado de dormência caso haja falta de nutrientes no ambiente em que se encontram, o que também favorece sua sobrevivência contra qualquer fármaco que se utilize de suas vias metabólicas.¹³⁻¹⁴

A densidade de células que constituem um biofilme é muito maior do que a quantidade de células livres em um dado ambiente, de forma que o desprendimento das células de um biofilme podem promover infecções bacterianas agudas de difícil tratamento, pois como mencionado, os biofilmes que são a fonte da infecção, possuem diversas características que os tornam resistentes contra antibióticos.^{12,14} Além disso, é comum bactérias patogênicas oportunistas se integrarem a essas comunidades bacterianas para sobreviverem, o que dificulta sua identificação. Dessa forma, os biofilmes são responsáveis por uma série de doenças infecciosas, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, tais como endocardite bacteriana, fibrose cística e infecções agudas de ouvido.^{12,14}

Os biofilmes bacterianos também possuem impacto no ramo industrial, sendo responsáveis pelo entupimento e corrosões de tubulações, e contaminação de reservatórios de água e alimentos.¹⁵⁻¹⁶ Por outro lado, biofilmes tem sido utilizado com sucesso para a biorremediação de hidrocarbonetos e metais pesados, na descontaminação por vazamentos químicos em larga escala, e na produção de produtos naturais usados na produção de aditivos alimentares, produtos de limpeza e medicamentos.¹⁷

Como os biofilmes possuem grande impacto na indústria, no meio ambiente e na saúde humana, o estudo dos processos moleculares que regem a formação do

biofilme se tornam de particular interesse para o desenvolvimento de novos fármacos contra infecções bacterianas, e o estudo de fatores que otimizem o crescimento controlado dos biofilmes mostram-se importantes para técnicas de biorremediação e produção de produtos naturais.

1.2 Vias de sinalização mediadas por c-di-GMP

Apesar da complexidade molecular e heterogeneidade do processo de formação de biofilme, nos últimos anos, tem sido obtido importantes avanços no entendimento a nível molecular desse processo, tendo o mensageiro secundário guanosina monofosfato (3'-5') cíclico dimérico, c-di-GMP, ocupado um papel de destaque, principalmente entre bactérias Gram negativas.¹⁸

Normalmente, altos níveis de c-di-GMP estão associados à formação de biofilme e levam a inibição da formação do flagelo e do pilus, estruturas envolvidas na mobilidade bacteriana.¹⁹⁻²⁰ Em contrapartida, a degradação do nucleotídeo reprime a síntese de exopolissacarídeos que compõe a matriz do biofilme, promovendo sua dispersão e aumento da virulência bacteriana.²¹ Os níveis intracelulares de c-di-GMP também estão associados aos diferentes estágios do ciclo celular. Estudos mostram que após a divisão celular há uma distribuição assimétrica dos níveis de c-di-GMP entre as células filhas e a mãe e, conseqüentemente, uma mudança de comportamento entre elas (Figura 2).²²⁻²³ Por exemplo, em *Caulobacter crescentus*, as células filhas apresentam baixos níveis de c-di-GMP intracelular e são liberadas do biofilme para colonizar novas regiões, enquanto que as células mães permanecem protegidas nos biofilmes, e continuam a se dividir.²³ Por outro lado, *Pseudomonas aeruginosa* adota uma estratégia diferente, enquanto que as células mães colonizam novos ambientes, as células filhas mantêm altas concentrações de c-di-GMP intracelular e permanecem nos biofilmes para garantir sua sobrevivência.²³

Figura 2 – Níveis de c-di-GMP durante ciclo celular bacteriano. Distribuição assimétrica de c-di-GMP entre células mãe e filha afeta o comportamento da bactéria. Enquanto as células jovens de *Caulobacter crescentus* são liberadas para colonizar novas regiões, as de *Pseudomonas aeruginosa* se mantêm fixas nos biofilmes, para garantir sua sobrevivência.

Fonte: Adaptada de MILLS et al.²²

O c-di-GMP é formado a partir de duas moléculas de GTP pela ação de diguanilato ciclases, que possuem um domínio conservado GGDEF²⁴⁻²⁵, e é clivado para sua forma linear ou em duas moléculas de GMP pela ação de proteínas contendo os domínios fosfodiesterase, EAL²⁶⁻²⁷ ou HD-GYP²⁸, respectivamente (Figura 3). Os domínios GGDEF, EAL e HD-GYP recebem esse nome em função dos resíduos que compõem o motivo catalítico característico do domínio, por exemplo, “G” corresponde ao resíduo de guanina. Análises de bioinformática indicam que os genes, que codificam proteínas contendo esses domínios envolvidos na biossíntese de c-di-GMP, encontram-se entre os mais abundantes no genoma bacteriano.²⁹ Curiosamente, foi identificada uma correlação entre o número de proteínas que possuem esses domínios e a capacidade da bactéria de se adaptar a diferentes condições ambientais.^{18,29}

Figura 3 – Molécula sinalizadora bacteriana, c-di-GMP. Domínios GGDEF promovem a síntese de c-di-GMP a partir de duas moléculas de GTP, enquanto que domínios EAL e HD-GYP hidrolisam o nucleotídeo. Os quadros em verde indicam o efeito de altos níveis de c-di-GMP, enquanto que em vermelho, corresponde aos baixos níveis. Esses domínios costumam estar presentes em proteínas modulares, onde X indica domínios REC, GAF, HAMP, ou PAS, por exemplo.

Fonte: Adaptada de KRASTEVA et al.³⁰

Diguanilato ciclases contendo o domínio GGDEF ativo formam dímeros, tendo o sítio ativo localizado na interface entre as duas subunidades ligadas à GTP.³¹⁻³² Essas proteínas também costumam ser inibidas alostericamente pelo seu produto, o c-di-GMP, através de sua ligação ao sítio inibitório, caracterizado pelo motivo RxxD, que é separado do sítio ativo por um *linker* de 5 resíduos.³³ Quando o c-di-GMP se liga ao sítio inibitório (*I site*), ele impede o movimento do domínio GGDEF, necessário para formar o homodímero cataliticamente competente.³⁴⁻³⁵ Esse mecanismo impede consumo excessivo de GTP, além de limitar a quantidade intracelular de c-di-GMP.

Em contrapartida, fosfodiesterases contendo o domínio EAL são monômeros ativos que linearizam o c-di-GMP para 5'-pGpG, em um processo dependente de Mg^{2+} ou Mn^{2+} .³⁶ Apesar da oligomerização não ser necessária para esses domínios serem ativos, proteínas contendo o domínio EAL costumam ser encontradas *in vivo* como dímeros ou oligômeros de maior ordem, e esse estado é crucial para serem ativadas por estímulos ambientais.^{26,32} Em relação às proteínas com os domínios HD-GYP, até o momento sabe-se apenas que são fosfo-hidrolases dependentes de metais, capazes de degradar o c-di-GMP até duas moléculas de GMP.^{28,37}

Curiosamente, é comum as proteínas apresentarem os domínios GGDEF-EAL ou HD-GYP *in tandem*. Nesses casos, ambos os domínios podem ser ativos,

alternando entre síntese e degradação de c-di-GMP dependendo do tipo de estímulo externo que é recebido.³⁸ Contudo, normalmente um desses domínios é inativo, atuando apenas como receptor de c-di-GMP, em interações proteína-proteína ou proteína-RNA.^{27,32}

A maior parte das proteínas que contêm os domínios GGDEF, EAL ou HD-GYP, possuem uma ou mais hélices transmembranas para posicionar no periplasma, o domínio N-terminal que reconhecerá estímulos ambientais e celulares.³⁹⁻⁴⁰ Dessa forma, sinais como a oxigenação do meio, a luminosidade, a falta de nutrientes, antibióticos ou moléculas sinalizadoras, podem ativar diguanilato ciclases ou fosfodiesterases, que irão regular os níveis de c-di-GMP e, consequentemente, alterar a fisiologia e o comportamento bacteriano.⁴¹

A variedade de processos regulados por c-di-GMP se deve a diversidade de proteínas que possuem sua atividade controlada pelos níveis intracelulares desse mensageiro secundário. Análise de estruturas de proteínas ligadas à c-di-GMP mostram que ele costuma ser reconhecido em três diferentes formas: como monômero estendido, monômero fechado ou como um dímero intercalado (Figura 4).^{30,42} Além dos domínios GGDEF, EAL e HD-GYP envolvidos no metabolismo de c-di-GMP, foram identificados outros receptores dessa molécula, como domínios PilZ, *I sites*, *riboswitches*, fatores de transcrição, e os domínios GGDEF, EAL e HD-GYP inativos mencionados no tópico anterior.³²

Figura 4 – Diferentes formas de c-di-GMP reconhecidas por seus receptores. Abaixo das figuras estão listados alguns exemplos de proteínas que interagem com a respectiva forma de c-di-GMP.

Fonte: Adaptada de KRASTEVA et al.³⁰

Domínios PilZ possuem dois pequenos *loops* que interagem com o c-di-GMP. O primeira é um motivo RxxxR que ao se ligar com c-di-GMP, aproxima o segundo motivo de interação, (D/N)x(S/A)xxG, do sítio de ligação.⁴³ Dessa forma, o c-di-GMP faz com que a proteína assuma uma conformação mais fechada, com a aproximação de dois dos seus domínios e inicie seus eventos de sinalização.⁴⁴ Curiosamente, foi observado que os domínios PilZ são capazes de interagir com o c-di-GMP tanto na sua conformação dimérica intercalada ou como monômero fechado.^{43,45} Assim como os domínios PilZ, foi identificado que PelD de *Pseudomonas aeruginosa* também é capaz de reconhecer essas diferentes formas de c-di-GMP, que se ligam no I “*site*” do domínio GGDEF.⁴⁶⁻⁴⁷ PelD é uma proteína interna de membrana essencial na síntese do exopolissacarídeo PEL.⁴⁸⁻⁴⁹ Trabalhos realizados em nosso grupo, nos faz acreditar que a ligação do dímero intercalado fechado de c-di-GMP, causa uma mudança conformacional na proteína que é transmitida para o seu domínio interno da membrana, o que permite a síntese do *pel* e seu transporte até o periplasma. Esse rearranjo de PelD provoca a quebra do dímero de c-di-GMP, contudo, uma molécula do mensageiro secundário permanece ligada enquanto a proteína estiver ativa. A queda nos níveis intracelulares de c-di-GMP, faz com que PelD libere o monômero fechado de c-di-GMP, que permaneceu ligado, e retorne ao seu estado inativo, interrompendo a formação do exopolissacarídeo, *pel*, que constitui a matriz do biofilme.⁵⁰

Devido à variedade de processos regulados por c-di-GMP, como a mobilidade, o ciclo celular, a secreção de exopolissacarídeos e a formação do biofilme, é natural que fatores de transcrição também fossem um alvo importante dessa molécula. Por exemplo: Clp de *Xanthomonas campestris* que regula a fitopatogenicidade⁵¹, VpsT, de *Vibrio cholerae*, que controla a expressão de genes envolvidos na mobilidade e na produção da matriz extracelular⁵², e FleQ de *Pseudomonas aeruginosa* que ativa a formação do flagelo e regula formação de biofilme em um processo mediado por c-di-GMP.⁵³

1.3 *Enhancer Binding Proteins* bacterianas

O alvo de estudo do presente trabalho é FleQ, uma proteína modular, com arquitetura típica de *Enhancer Binding Proteins* bacterianas (bEBPs), e para melhor compreensão das características de FleQ⁵³, será dada uma breve introdução a respeito do que são, e como funcionam as bEBPs na regulação da expressão gênica.

1.3.1 Fatores σ e mecanismo de ação das bEBP

O controle da transcrição dos diferentes genes é essencial para as bactérias se adaptarem às distintas condições ambientais. A bactéria utiliza fatores σ que irão reconhecer os promotores de forma específica, permitindo a RNA polimerase (RNAP) diferenciá-los e formar a holoenzima que irá ativar a transcrição através de mecanismos distintos.⁵⁴⁻⁵⁵ As holoenzimas ligadas ao DNA formam complexos inativos também referidos como complexos fechados (CF). Dentre os diferentes fatores σ será dado destaque para os fatores σ^{54} e σ^{70} , cujos mecanismos de ativação do CF DNA-RNAP- σ para sua forma aberta ativa (CA), promovendo a abertura da dupla fita de DNA e seu posicionamento na RNAP para que ocorra a transcrição, acontecem de maneiras distintas.⁵⁴

Os fatores σ^{70} reconhecem as regiões -35 e -10 do sítio de início de transcrição e tem sua atividade regulada por proteínas que impedem sua ligação à RNAP.⁵⁶⁻⁵⁸ Ao formar a holoenzima RNAP- σ^{70} , ele é capaz de interagir com o DNA e o CF DNA-RNAP- σ^{70} é convertido espontaneamente para sua forma aberta ativa.⁵⁶ Em contrapartida, os fatores σ^{54} reconhecem as regiões -24 e -12 do sítio de início de transcrição e são incapazes de converter o CF DNA-RNAP- σ^{54} para sua forma ativa.⁵⁹ Essa isomerização em CA DNA-RNAP- σ^{54} , é mediada pelas bEBPs, que fornecem a energia necessária através da hidrólise de ATP.⁶⁰ As diferenças entre σ^{54} e σ^{70} estão ilustradas na Figura 5.

Figura 5 – Diferenças entre fatores σ^{70} e σ^{54} . A holoenzima RNAP- σ^{70} se liga às regiões -35 e -10 do sítio de início de transcrição, formando um CF DNA-RNAP- σ^{70} inativo, cuja ativação para o CA ocorre espontaneamente. Em contrapartida a RNAP- σ^{54} se liga nas regiões -24 e -12 do sítio de início de transcrição, e seu complexo com o DNA (CF), precisa de uma bEBP para ser ativado, em um processo dependente da hidrólise de ATP.

Fonte: Adaptada de BUSH et al.⁵⁷

bEBPs se ligam à uma distância de -80pb a -150pb do sítio de início da transcrição, em uma sequência de DNA ativadora na região *upstream* (UAS, do inglês *upstream activator sequences*).^{58,61} Devido à distância entre a bEBP e o CF DNA-RNAP- σ^{54} , para que a interação entre os dois ocorra é necessário que o DNA entre eles faça uma dobra.⁶¹ Esse processo conta com o auxílio de *integration host factors* (IHF), que são pequenas proteínas heterodiméricas capazes de se ligar entre o promotor e a UAS, e dobrar o DNA em até 180°.⁶² Em seguida, o motivo conservado GAFTGA da bEBP irá promover o contato direto com o fator σ^{54} , além de desempenhar um papel essencial na transferência de energia que irá converter o CF DNA-RNAP- σ^{54} para sua forma ativa (Figura 6).

Figura 6 – Esquema de ativação dos CF DNA-RNAP- σ^{54} por meio de bEBPs. A) O fator σ^{54} se liga na região -12 e -24 do DNA e forma um complexo inativo com a RNA polimerase, enquanto que bEBPs se ligam à uma distância de -80pb a -150pb, nas UAS. B) Proteínas IHF promovem a dobra do DNA, o que permite que a bEBP entre em contato com CF DNA-RNAP- σ^{54} . C) Por fim, a hidrólise de ATP pela bEBP fornece a energia necessária para converter o CF DNA-RNAP- σ^{54} para sua forma ativa, além de promover a abertura da dupla fita de DNA.

Fonte: Adaptada de BUSH et al.⁵⁷

1.3.2 Arquitetura das bEBPs

Em geral, bEBPs consistem de três domínios: um domínio regulatório N-terminal que irá modular a atividade da proteína, um domínio central AAA+ com atividade ATPase e um motivo hélice-volta-hélice de interação com DNA. Destes, apenas o domínio AAA+ é indispensável e normalmente suficiente para ativar o CF DNA-RNAP- σ^{54} .⁵⁸

O domínio N-terminal controla a atividade do domínio AAA+, positivamente ou negativamente, ao impedir o acesso do ATP ao sítio ativo, afetar na oligomerização do domínio AAA+, essencial para sua atividade, ou até mesmo atuar na interação entre o motivo GAFTGA e o fator σ^{54} .⁵⁷ A regulação do domínio N-terminal ocorre de três formas distintas: através da interação de um ligante, por interações proteína – proteína, ou pela sua fosforilação. Esse último modo se deve pelo fato de muitas bEBPs fazerem parte do sistema de sinalização de dois componentes, que acoplam estímulos externos a uma resposta interna.⁶³ Como o próprio nome sugere, esses sistemas são compostos por duas proteínas, uma histidina quinase e um regulador de resposta que possui um domínio regulatório conservado. Um estímulo externo

ativa a histidina quinase a fosforilar um resíduo de ácido aspártico conservado no domínio REC do regulador de resposta, que irá desencadear uma ação, como por exemplo, ativar a transcrição gênica.^{57,63}

Como mencionado anteriormente, a oligomerização dos domínios AAA+, e consequentemente das bEBPs, tem um papel essencial na atividade ATPase da proteína. Normalmente, as bEBPs são encontradas na sua forma dimérica inativa, e a partir de um estímulo externo, os domínios N-terminal e o motivo hélice-volta-hélice auxiliam o domínio AAA+ a formar oligômeros de maior ordem e aumentar a taxa de hidrólise de ATP^{57,64}. Estruturalmente, os domínios AAA+ formam anéis quando ativos, e os seus protômeros podem ser subdivididos em duas partes, uma sendo composta por hélices α e uma folha β central, seguida pelo outro subdomínio menor contendo apenas α -hélices. O sítio de ligação do ATP ocorre na região entre o subdomínio α/β e o subdomínio α -hélice e na interface entre dois protômeros (Figura 7A).⁶⁵

Os domínios AAA+ possuem vários elementos conservados essenciais para sua atividade e estão em destaque na Figura 7A, com a estrutura da NtrC1 de *Aquifex aeolicus* como molde (PDB = 3M0E). O motivo *walker A*, GxxxxGK(T/S), interage com os fosfatos β e γ do ATP enquanto o motivo *walker B*, hhhhDE (onde h corresponde a um resíduo de aminoácido hidrofóbico), é essencial para hidrólise do nucleotídeo ao coordenar um íon Mg^{2+} e uma molécula de água que irá realizar um ataque nucleofílico no fosfato γ do ATP. Nesse processo, o resíduo N¹⁹⁵ atua como um *switch* ao permitir a bEBP sentir as mudanças ocorridas no sítio catalítico e, o sensor I, T²⁷⁹, acopla a hidrólise do nucleotídeo com as mudanças conformacionais. Já o sensor II e o R *finger*, R²⁹³ e R²⁹⁹, estão localizados na interface entre os protômeros e permitem que a proteína sinta a presença do nucleotídeo e coordene as mudanças na oligomerização da proteína; por fim, também há conservação do motivo GAFTGA, responsável pela interação entre bEBP e o fator σ ⁵⁴, além de participar na transferência de energia para ativação do CF RNAP- σ ⁵⁴.^{57-58,65} Adicionalmente, é possível verificar na figura 7B em azul, que os motivos GAFTGA estão localizados no centro do anel das bEBPs, deixando-os de fácil acesso para interação com o fator σ ⁵⁴.

Figura 7 – Estrutura do domínio AAA+ de NtrC1 de *Aquifex aeolicus* (PDB = 3M0E). A) Representação de um protômeros, que pode ser dividido em um subdomínio α/β e um subdomínio α -hélice. No quadro em destaque, ilustração do sítio catalítico do ATP. Walker A em marrom (WA), "walker" B em ciano (WB), sensor I em laranja (SI), sensor II em vermelho (SII), N¹⁹⁵ "switch" em amarelo e o R finger R²⁹³ e R²⁹⁹ em roxo. O "*" indica que os resíduos são provenientes do protômeros adjacente. B) Anel oligomérico de NtrC1 ligada à ATP, com destaque para o motivo GAFTGA, em azul, localizado no centro do anel.

Fonte: Adaptada de BUSH et al.⁵⁷

1.4 FleQ: fator de transcrição envolvido na regulação dos genes flagelares e de formação de biofilme

FleQ é uma bEBP com um domínio N-terminal regulatório REC, um domínio AAA+ ATPase central e um motivo hélice-volta-hélice de ligação com o DNA. FleQ foi inicialmente caracterizada como uma ativadora da expressão dos genes flagelares dependentes do fator σ^{54} , através do controle dos genes regulatórios do sistema de dois componentes *fleSR*, assim como os necessários para a formação do flagelo e sua exportação.⁶⁶ Além disso, FleQ é uma proteína versátil, pois também possui papel central no controle da expressão de diferentes operons envolvidos na transição da bactéria de sua forma unicelular para seu fenótipo de biofilme, em conjuntura com o fator σ^{70} . Nesse processo, FleQ controla os operons *pel* e *psl*, responsáveis pela síntese dos exopolissacarídeos PEL e PSL, constituintes da matriz extracelular do biofilme e do operon *cdrAB*, o qual codifica uma adesina necessária para a bactéria se aderir à superfície, estágio inicial para a formação de biofilme.⁵³

Análise da sequência de FleQ indica uma grande homologia com a subfamília dos reguladores de resposta NtrC, que regulam a transcrição de forma dependente do fator σ^{54} . Contudo ao contrário das NtrC que são reguladas a partir da fosforilação do domínio REC, FleQ não possui os resíduos D⁵⁴ e K¹⁰⁴ essenciais para esse mecanismo, o que sugere que sua atividade seja regulada de forma distinta.⁶⁶ Nesse contexto, FleN é parceira de interação de FleQ. Inicialmente caracterizada por atuar no controle do número de flagelos em *Pseudomonas aeruginosa*, FleN é uma proteína que possui um *walker* A variante, com fraca atividade ATPase, e não apresenta motivos de interação com o DNA.⁶⁷ Acredita-se que FleQ e FleN utilizem um mecanismo de *feedback*, uma vez que FleQ controla a expressão de FleN, regulador de sua atividade.^{67,69} Contudo, ainda não se sabe se o mecanismo de regulação de FleQ por FleN se restringe à atividade ATPase de FleQ e nem como esse processo ocorre.

Outro fator que controla a atividade de FleQ, são os níveis intracelulares de c-di-GMP.⁵³ Foi observado que FleQ tem sua atividade como repressor ou ativador da transcrição dos genes do operon *pel*, envolvidos na síntese de exopolissacarídeos, modulada pela ligação de c-di-GMP, e de forma dependente do fator σ^{70} ao invés do

σ^{54} .⁶⁸ No modelo atual para esse mecanismo de regulação, ilustrado na Figura 8, acredita-se que FleQ se liga a dois sítios distintos do promotor *pel*, em uma região ativadora *box* 1 e repressora *box* 2. Em seguida, FleN interage com FleQ aumentando a sensibilidade desta última por c-di-GMP. Na presença de ATP, FleN se dimeriza, o que causa uma dobra do DNA ao aproximar os monômeros de FleQ, e impede a ligação da holoenzima RNAP- σ^{70} nessa região. A ligação de c-di-GMP promove um rearranjo conformacional que faz com que FleQ se ligue mais fracamente ao *box* 2 repressor e permaneça ligada ao *box* 1 ativador, o que alivia a dobra de DNA e permite o acesso e atividade da holoenzima RNAP- σ^{70} , independente do fator σ^{54} (figura 8), fazendo com que FleQ deixe de ser um repressor e assuma um papel de ativador da transcrição do operon *pel*.

Figura 8 – Modelo atual do mecanismo de regulação do operon *pel* por FleQ. A) FleQ se liga em dois sítios distintos, “*box*” 1 e “*box*” 2 do promotor *pel*. B) Ligação de FleN em FleQ. C) ATP promove dimerização de FleQ, causando uma dobra do DNA que impede a transcrição. D) c-di-GMP alivia a interação entre FleQ e o *box* 2, o que afrouxa a dobra de DNA e permite o acesso da RNA polimerase ao promotor *pel*.

Fonte: Adaptada de BARAQUET et al.⁶⁸

Até o momento, ainda há dúvidas quanto ao sítio de ligação de c-di-GMP. Estudos de Baraquet, C. e Harwood, C.S. propõe que o c-di-GMP se liga no *walker* A do domínio AAA+, uma vez que o mutante FleQ K¹⁸⁰A se mostrou incapaz de interagir com c-di-GMP.⁶⁹ Isso faria com que o c-di-GMP também afetasse na regulação dos genes flagelares, uma vez que foi comprovado que a ligação do mensageiro secundário em FleQ causa redução na atividade ATPase da proteína e, consequentemente, diminui a capacidade de FleQ de remodelar o CF DNA-RNAP- σ^{54} para sua forma ativa.⁶⁹ Contudo, foram observados que as argininas R¹⁴⁴ e R¹⁸⁵ não fazem parte do motivo *walker* A e também são essenciais para a interação FleQ:c-di-GMP.⁷⁰ Além do c-di-GMP, também foi verificado que FleN diminui a atividade ATPase de FleQ, e esse efeito é acentuado na presença do mensageiro secundário.⁶⁹ Por fim, também foi observado que FleQ na presença de FleN apresentou maior sensibilidade à c-di-GMP, o que ressalta a importância do complexo FleQ-FleN na regulação da formação do flagelo e do biofilme.⁶⁹

Proteínas homólogas a FleQ tem sido estudadas em outros organismos, demonstrando que os mecanismos de regulação transcricional mediados por FleQ não são característicos de *Pseudomonas aeruginosa*. Em *Vibrio cholerae*, FlrA um homólogo da FleQ também é o principal regulador da formação do flagelo, sendo regulado pelos níveis de c-di-GMP, o qual inibe a capacidade de FlrA de ativar a expressão do operon *flrBC*, e consequentemente a formação do flagelo.⁷¹ Contudo diferentemente da FleQ, FlrA aparentemente não participa do controle do operon *vps* responsável pela síntese da matriz exopolissacarídica e nem necessita de um parceiro de interação (no caso da FleQ, a FleN) para responder aos níveis de c-di-GMP. Estudos da FlrA em *Vibrio* indicam que o c-di-GMP interage na interface entre o domínio AAA+ e o domínio N-terminal, sendo os resíduos R¹³⁵ e R¹⁷⁶ essenciais para essa interação.⁷¹ Esse resultado está de acordo com o observado para *Pseudomonas aeruginosa*, uma vez que R¹³⁵ e R¹⁷⁶ de FlrA, são equivalentes a R¹⁴⁴ e R¹⁸⁵ de FleQ. Curiosamente, o homólogo de FleQ em *Xanthomonas campestris* (Xcc XC17) é um importante fator envolvido na formação do flagelo, contudo na cepa Xcc 8004, FleQ parece não ter um papel significativo, o que sugere que FleQ pode possuir funções distintas em diferentes bactérias.

Por fim, essa versatilidade da FleQ a torna interessante para elucidar novos mecanismos de interação entre fatores de transcrição e c-di-GMP, o que permitiria

confirmar se o c-di-GMP também consegue interagir com o sítio de hidrólise do ATP das proteínas AAA+ ou se, de alguma outra maneira, a interação com o nucleotídeo faria com que a proteína perdesse sua capacidade de hidrólise do ATP.

2 OBJETIVOS

O trabalho aqui descrito teve como objetivo geral desvendar os mecanismos moleculares do c-di-GMP no controle da expressão do operon *pel* e o papel de FleN na regulação da atividade de FleQ. Para isso, procurou-se estudar os seguintes aspectos:

- Impacto dos diferentes oligômeros de FleQ na regulação do operon *pel*;
- Efeito da ligação de c-di-GMP e ATP na estrutura e oligomerização de FleQ;
- Determinação do motivo de ligação de c-di-GMP em FleQ;
- Papel de FleN no controle de atividade de FleQ

A importância dos resultados gerados nesse trabalho se deve à relevância clínica e econômica dos organismos de estudo. *Pseudomonas aeruginosa* PA14 (PA) e *Xanthomonas citri* 306 (XAC). O primeiro é um organismo modelo no estudo de biofilme e que possui importância clínica, por ser responsável por infecções crônicas em pacientes que sofrem de fibrose cística ou que sejam imuno comprometidos. Já *Xanthomonas citri* é responsável pelo cancro cítrico, uma doença que afeta frutos cítricos e causa grandes perdas na lavoura. Nesse organismo, ainda não se sabe se o homólogo da FleQ interage com c-di-GMP.

Parte dos resultados descritos nesta tese de doutorado foram publicados na *Proceedings of the National Academy of Sciences*:

Mechanistic insights into c-di-GMP-dependent control of the biofilm regulator FleQ from Pseudomonas aeruginosa. Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America, v.113, n.2, E209-E218, Jan. 2016. ISSN 1091-6490.”

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Estratégia de estudo e delimitação dos domínios

As regiões codificantes de *Pseudomonas aeruginosa* (PA) e *Xanthomonas citri* (XAC) foram: *fleQ* (PA14_50220 e XAC1967), *fleN* (PA14_45640 e XAC1934). Através dos programas BLASTP⁷² e PSIPRED⁷³ foram feitas previsões dos domínios de ambas as proteínas dos dois organismos e de suas estruturas secundárias, respectivamente. As regiões codificantes das proteínas de interesse foram isoladas por PCR a partir do DNA genômico, utilizando *primers* específicos *forward* e *reverse*. Sendo FleQ uma proteína modular (Figura 9) e potencialmente flexível, construções contendo domínios isolados foram geradas visando um aumento na probabilidade de cristalização (Tabela 1). Cuidados foram tomados para que as construções não interrompessem a formação de estruturas secundárias, como hélices alfa ou folhas beta. Diferentemente de FleQ, FleN não é modular e possui somente um domínio CbiA. No entanto, construções excluindo resíduos tanto na extremidade carboxi quanto no amino terminal foram geradas com o mesmo intuito de aumentar a probabilidade de cristalização. Além destas, o Prof. Dr. Holger Sondermann da Universidade de Cornell (Ithaca - NY, Estados Unidos) forneceu construções de diferentes regiões da PA FleQ.

Figura 9 - Arquitetura de domínios de FleQ e FleN. Arranjo característico dos domínios encontrados em FleQ e FleN de diferentes organismos. Os números abaixo do esquema identificam os resíduos que delimitam os domínios encontrados nas proteínas de PA e XAC. Domínios identificados no site PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) através da sequência primária.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 1 - Diferentes construções com os domínios de FleQ e FleN. Construções com “*” se referem às fornecidas pelo Prof. Dr. Holger Sondermann. WT e HTH se referem, respectivamente, a proteína nativa e ao domínio hélice volta hélice. Nucleotídeos marcados em vermelho indicam sítio de restrição da BamHI, em azul da HindIII e em verde da XhoI. Os números em sobrescrito, na construção, indicam o intervalo de aminoácidos que ela abrange.

Construção	(Domínios)	Peso Molecular (kDa)	Primers
PA FleQ ¹⁻⁴⁹⁰	WT	55,3	5' CAGTGGATCCATGTGGCGCGAAACCAAAC 3' 5' CAGTAAGCTTCAATCATCCGACAGGTCGTC 3'
PA FleQ ¹⁻¹³⁹	REC	17,8	5' CAGTGGATCCATGTGGCGCGAAACCAAAC 3' 5' CAGTCTCGAGTCACTCGCGGGAGCG 3'
PA FleQ ¹⁻⁴³⁰	REC + AAA	48,5	5' CAGTGGATCCATGTGGCGCGAAACCAAAC 3' 5' CAGTAAGCTTCATTTCGGCCGGCAG 3'
*PA FleQ ¹⁻³⁹²	REC + AAA	44,5	-/-
*PA FleQ ¹⁻³⁹⁴	REC + AAA	44,7	-/-
*PA FleQ ¹⁻⁴⁷⁷	REC + AAA	53,7	-/-
*PA FleQ ¹⁰⁹⁻³⁹²	AAA	33,5	-/-
*PA FleQ ¹⁰⁹⁻³⁹⁴	AAA	33,7	-/-
*PA FleQ ¹⁰⁹⁻⁴⁷⁷	AAA + HTH	42,8	-/-
*PA FleQ ¹³⁰⁻³⁹²	AAA	29,8	-/-
*PA FleQ ¹³⁰⁻³⁹⁴	AAA	30,0	-/-
*PA FleQ ¹³⁰⁻⁴⁷⁷	AAA + HTH	39,8	-/-
*PA FleQ ¹³⁷⁻³⁹²	AAA	28,9	-/-
*PA FleQ ¹³⁷⁻³⁹⁴	AAA	29,1	-/-
*PA FleQ ¹³⁷⁻⁴⁷⁷	AAA + HTH	38,2	-/-
PA FleN ¹⁻²⁸⁰	WT	30,0	5'CAGTGGATCCATGAAGCAGATGGGTAGCATGC3' 5' CAGTCTCGAGTCATACGGCCGAACCTGTC 3'
PA FleN ⁶⁻²²⁷	CbiA	24,8	5' CAGTGGATCCAGCATGCATCCCGTACAG 3' 5' CAGTCTCGAGTCACTGTTTCTGCACGGC 3'
XAC FleQ ¹⁻⁴⁹⁴	WT	54,3	5' CAGTGGATCCATGAGTGAGTCCCGCATTCTG 3' 5' CAGTCTCGAGTCAGTTGGCCAGCTCGG 3'
XAC FleQ ¹⁻¹³⁴	REC	15,0	5' CAGTGGATCCATGAGTGAGTCCCGCATTCTG 3' 5' CAGTCTCGAGTCACTGCTGCACGCC 3'
XAC FleQ ¹⁻⁴³⁶	REC + AAA	47,8	5' CAGTGGATCCATGAGTGAGTCCCGCATTCTG 3' 5' CAGTCTCGAGTCAGCCGTCTGTCGG 3'
XAC FleQ ¹³⁷⁻⁴³⁶	AAA	32,6	5' CAGTGGATCCGGCCCAACCGGCAA 3' 5' CAGTCTCGAGTCAGCCGTCTGTCGG 3'
XAC FleQ ¹³⁷⁻⁴⁹⁴	AAA + HTH	39,1	5' CAGTGGATCCGGCCCAACCGGCAA 3' 5' CAGTCTCGAGTCAGTTGGCCAGCTCGG 3'
XAC FleN ¹⁻³¹⁹	WT	34,2	5' CAGTGGATCCATGCCGCCAGTCTCGTTTC 3' 5' CAGTCTCGAGTCATGCGGCCACTCCC 3'
XAC FleN ⁴⁹⁻²⁷⁰	CbiA	23,7	5' CAGTGGATCCGGCCCGGTGCGCA 3' 5' CAGTCTCGAGTCATTGCTGGCGCTGC 3'

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.2 Clonagem em vetores de expressão.

Para as reações de PCR foram utilizadas 200 ng de DNA genômico de *Pseudomonas aeruginosa* (PA14) e *Xanthomonas citri* como molde e 100 pmol de

cada primer descrito na Tabela 1, nos sentidos *forward* (FW) e *reverse* (REV) específicos para cada gene em reações de 50 µl, utilizando um *mix* de enzimas com alta fidelidade (*High Fidelity*), conforme protocolo do fabricante, Fermentas. O termociclador utilizado foi o Mastercycler (Eppendorf), o qual realizou o ciclo descrito na Tabela 2 para a amplificação dos fragmentos de interesse.

Tabela 2 - Etapas da reação de PCR para o isolamento e amplificação dos fragmentos de interesse. Cada etapa do ciclo de PCR está descrita com a temperatura e o intervalo de tempo utilizado. A etapa de desnaturação, hibridização e extensão foram repetidas 30 vezes.

Etapa do PCR	Desnaturação inicial	Desnaturação	Hibridização	Extensão	Extensão final
		(30 vezes)			
Temperatura – Tempo	94 °C – 3 m	94 °C – 30 s	60 °C – 30 s	72° C – 2m 10s	72 °C – 10 m

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os produtos de PCR foram digeridos para remoção das extremidades, utilizando as suas respectivas enzimas de digestão *Fast Digest* (Thermo Scientific) descritas na Tabela 1. Para as reações de digestão foram utilizados 1 µg do DNA amplificado e 1 unidade de cada enzima, as quais foram incubadas a 37 °C por 3 horas. Em seguida os fragmentos foram purificados por eletroforese em gel de agarose utilizando o kit “*Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*” (Promega), e subclonados em um vetor de expressão pET28a modificado (Novagen), no qual a proteína de interesse é expressa, em fusão na extremidade amino terminal, com a proteína modificada 6xHis-SUMO (*Small Ubiquitin Modifier*), que tem se mostrado muito eficiente na expressão de proteínas solúveis. Os genes foram clonados nesse vetor utilizando-se 50 ng do mesmo e seguindo protocolos convencionais de ligação usando T4 DNA ligase (relação molar inserto:vetor = 3:1 ou 6:1). Células de *Escherichia coli* DH5α, competentes por tratamento com cloreto de cálcio, foram transformadas com o plasmídeo proveniente das reações de ligação, para fins de propagação e extração de DNA plasmidial. As células transformadas foram plaqueadas em meio Lúria-Bertani (LB) contendo 50 µg/ml de canamicina. Os clones positivos foram confirmados por dupla digestão do DNA plasmidial e examinados por eletroforese em gel de agarose 0,8 %.

3.3 Expressão recombinante e purificação

Células de *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) foram transformadas com os plasmídeos de expressão e plaqueadas em ágar LB, suplementado com 50 µg/ml de canamicina. Colônias isoladas dos transformantes foram inoculadas em 2 L de LB líquido adicionado de canamicina a 50 µg/ml, sob agitação constante a 150 rpm e 37 °C. A cultura teve sua expressão recombinante induzida pela adição de 0,1 mM isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG), adicionado na fase mid-log de crescimento populacional bacteriano, densidade ótica a 600 nm (D.O._{600nm}) de aproximadamente 0,6. Por fim, a temperatura da cultura foi reduzida para 18 °C e incubada por 16 h mantendo a agitação constante.

A construção XAC FleQ, do resíduo 1 ao 139, correspondendo apenas ao domínio REC, XAC FleQ¹⁻¹³⁹, teve um protocolo de expressão diferenciado para que houvesse a incorporação de selênio metionina no lugar da metionina. O interesse em se realizar essa substituição foi para que, caso houvesse a cristalização da proteína e a consequente coleta de seus dados cristalográficos, fosse possível resolver o problema das fases, que é uma etapa essencial para resolução da estrutura cristalográfica da proteína e que será explicado mais adiante. Para a proteína incorporar selênio metionina, utilizou-se o meio mínimo M9 suplementado com 50 µg/ml de canamicina, 1 µg/ml de tiamina, 1 µg/ml de biotina, 0,4 % de glicose, 50 µg/ml de L-lisina, L-fenilalanina e treonina, 25 µg/ml de L-isoleucina, L-leucina, L-valina e 30 µg/ml de L-selênio metionina.

Ao final da indução, as células foram isoladas por centrifugação e ressuspendidas em tampão Tris-HCl 25 mM pH 8 NaCl 300 mM e lisadas por 12 pulsos de ultra-som sob banho de gelo de 30 s com amplitude de 20 % e intervalos de descanso de 35 s. A fração solúvel, isolada por centrifugação, foi filtrada e aplicada em 5 ml de resina TALON[®] (Clontech) previamente equilibrada no mesmo tampão, para imobilização por afinidade das proteínas produzidas em fusão com o 6xHis SUMO na extremidade amino terminal com o cobalto. A coluna foi então lavada com o equivalente a 20 volumes de coluna do tampão para eliminação dos contaminantes que tenham se ligado por interações inespecíficas, e então a proteína de interesse foi isolada após um gradiente de concentração crescente de imidazol

no mesmo tampão. Para clivagem do 6xHis SUMO, a proteína foi incubada com uma protease específica, ULP1, *overnight* a 10 °C e isolada através de uma segunda cromatografia por afinidade em resina TALON. O imidazol foi removido previamente, ao aplicar a amostra em uma coluna HiTrap Desalting (GE Healthcare). Dessa forma, a proteína clivada não iria se ligar à coluna, devido ausência do seu *tag*, enquanto que o 6xHis SUMO permaneceria retido.

Por fim uma etapa adicional de purificação foi realizada através de uma cromatografia de exclusão molecular (HiLoad 16/60 Superdex 75) para assegurar o alto grau de pureza necessário para os ensaios biofísicos. A qualidade do protocolo de purificação foi inferida por exame em SDS-PAGE.

3.4 Otimização de tampão por espalhamento dinâmico de luz

Partículas em solução se movimentam aleatoriamente, em um fenômeno conhecido como movimento Browniano, e sua velocidade de deslocamento é inversamente proporcional ao seu tamanho. O espalhamento dinâmico de luz (DLS) mede ao longo do tempo, oscilações na intensidade de luz espalhada, originadas do movimento browniano, permitindo calcular uma função de correlação com o tamanho das partículas, seus coeficientes hidrodinâmicos de difusão e a polidispersividade da amostra.⁷⁴ Este último parâmetro serve como indicativo da homogeneidade da amostra, quanto maior a polidispersividade mais heterogênea é a amostra, podendo conter diferentes populações ou a presença de agregados solúveis. Medidas de DLS foram conduzidas a fim de encontrar um tampão no qual a proteína apresentasse menor polidispersividade, tornando-a mais apta para cristalização. Dessa forma foi realizado uma diluição da proteína para uma concentração final de 1 mg/ml nos diferentes tampões listados na Tabela 3.⁷⁵ As medidas foram realizadas a 20 °C no Zetasizer μ V da Malvern.

Tabela 3 - Condições de tampões testadas para otimizar a solubilidade das proteínas de estudo.

Tampão (100mM)	pH	Tampão (100mM)	pH	Tampão (100mM)	pH
Ácido Cítrico	3,2	Bis-Tris	6,0	Tris	7,5
PIPPS	3,7	MES	6,2	Imidazol	8,0
Ácido Cítrico	4,0	Acetato de Amônio	7,0	Bicina	8,5
Acetato de Sódio	4,5	ADA	6,2	Tris	8,5
Fosfato de Sódio	5,0	Bis-Tris Propano	6,5	CHES	9,0
/Potássio					
Citrato de Sódio	5,5	Fosfato de Sódio /Potássio	7,0	CHES	9,5
Fosfato de Sódio	6,0	HEPES	7,5	CAPS	10,0
/Potássio					

Fonte: Adaptada de JANCARIK et al.⁷⁵

A amostra foi diluída em 50 mM do tampão em que apresentou menor polidispersividade, e os aditivos da Tabela 4 foram adicionados em diferentes concentrações a fim de otimizar o tampão obtido. Após duas horas de incubação a temperatura ambiente, novas medidas foram realizadas.

Tabela 4 - Aditivos selecionados para otimização de solubilidade.

Aditivo	Concentração da Solução Final	Aditivo	Concentração da Solução Final
Cloreto de Sódio	20 mM	OctilGlucopiranosídeo	1 %
Cloreto de Sódio	50 mM	DodecilMaltosídeo	0,1 %
Cloreto de Sódio	100 mM	DodecilMaltosídeo	1 %
Glicerol	5 %	BME	10 %
Glicerol	10 %	DTT	1 mM
CHAPS	2 mM	DTT	5 mM
OctilGlucopiranosídeo	0,1 %	TCEP	30 mM

Fonte: Adaptada de JANCARIK et al.⁷⁵

3.5 Ensaios cristalográficos

A resolução estrutural de proteínas por cristalografia é uma técnica, que a partir do padrão da difração de raios X por um cristal proteico, é possível calcular a densidade eletrônica da molécula de estudo. A cristalização de proteínas é uma etapa fundamental para esse processo e consiste na diminuição da solubilidade da

macromolécula de forma gradual e ordenada, para que ocorra a nucleação dos cristais seguida por seu crescimento.⁷⁶⁻⁷⁸

Triagens iniciais de cristalização foram realizadas para todas as construções através do método de gota sentada (*sitting drop*), no qual volumes iguais de proteína concentrada em diferentes concentrações são misturados com soluções precipitantes comerciais disponíveis (Hampton Research e Qiagen), em diferentes temperaturas de incubação (4 °C e 20 °C). Nesse método há uma difusão de vapor entre a gota sentada e a solução do poço, fazendo com que a amostra seja concentrada gradativamente até atingir o ponto de supersaturação e nucleação. A partir do crescimento desses núcleos é que se obtêm os cristais de proteínas, como esquematizado na Figura 10. Os kits de cristalização utilizados foram o Index HT, *crystal screen* Cryo e o PEG/Ion HT da Hampton.

Figura 10 - Métodos de gota suspensa (A) e de gota sentada (B) para cristalização de proteínas. A solução precipitante do reservatório é diluída na solução de proteína. Como a solução do reservatório está mais concentrada, ocorre uma difusão de vapor entre a gota suspensa ou sentada para o reservatório, e consequentemente, a proteína vai sendo concentrada gradativamente.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As condições que se apresentaram favoráveis à formação de cristais foram refinadas variando o pH, a concentração de sal e de agente precipitante, para que melhorasse o crescimento ordenado na formação dos cristais, tornando-os mais adequados para experimentos de difração de raios X, e novos ensaios de cristalização pelo método de gota suspensa, *hanging drop*, foram realizados. Para a cristalização dos complexos proteína:ATP / ATPγS, 25 μM de proteína foi incubada por 2 h a 10 °C, na presença de 125 μM do nucleotídeo antes da triagem. A

ausência de magnésio nas reações impede que haja a hidrólise do nucleotídeo pela proteína.

3.6 Coleta de dados de difração de raios X e resolução estrutural

A densidade eletrônica de uma proteína é descrita por um conjunto de amplitudes e fases, contudo, como os detectores permitem apenas medir a intensidade da difração, através da qual se determina a amplitude, perde-se a informação das fases, o que é conhecido como problema das fases. Vários métodos são utilizados para se resolver esse problema, como substituição molecular (MR), difração anômala única (SAD) ou por difração anômala em múltiplos comprimentos de onda (MAD). Basicamente esses métodos consistem em gerar um modelo a partir de: uma estrutura conhecida com alta similaridade a proteína de estudo (MR); em incorporar metais pesados no cristal e a partir da posição deles determinar a estrutura da proteína (SAD), ou observar o comportamento do padrão de difração de raios X em múltiplos comprimentos de onda e a partir deles encontrar uma solução única para o problema de fases (MAD).⁷⁶⁻⁷⁸

Dados de Se-MAD da construção sem o domínio REC de PA FleQ, resíduos 137 a 477 (PA FleQ^{AAA+HTH}) em complexo com c-di-GMP foram coletados no *Advanced Photon Source* (APS – Chicago, EUA), durante o pós doutorado do Prof. Dr. Marcos Vicente de Albuquerque Salles Navarro na Universidade de Cornell, Estados Unidos, em colaboração com o Prof. Dr. Holger Sondermann. No Brasil os dados dos cristais obtidos foram coletados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS – Campinas, SP) na linha MX2 e no ânodo rotatório do Instituto de Física de São Carlos (IFSC – São Carlos, SP).

A estratégia escolhida para a resolução estrutural do domínio REC (resíduos 1-130 ou XAC FleQ^{REC}) e o domínio AAA central de FleQ (resíduos 139-392 ou PA FleQ^{AAA}), foi pelo método de SAD, com a incorporação de Se e I, respectivamente. Para a incorporação do iodo foi feito uma incubação rápida, *quick-soaking*, dos cristais em solução 500 mM NaI adicionado na condição de cristalização com 10 %

de etilenoglicol. Os complexos PA FleQ^{AAA} com ATP ou ATPyS foram resolvidos por substituição molecular com a proteína apo como molde.

Os dados de difração de raios X coletados foram processados no pacote de programas XDS.⁷⁹ As determinações estruturais por substituição molecular e por SAD foram realizadas no PHENIX,⁸⁰ sendo que as posições dos átomos pesados foram encontradas com ShelXD.⁸¹ O refinamento do modelo foi feito através de ciclos iterativos usando o COOT⁸² e o PHENIX.

3.7 Mutação sítio dirigida da região codificante de PA FleQ

Para estudar a função de FleQ, vários mutantes sítio-dirigidos foram gerados baseados nas estruturas cristalográficas obtidas. Para as reações de mutação sítio dirigida do gene PA *fleQ*, utilizou-se 20 ng de DNA molde, 200 µM de dNTPs, 1,25 µM dos primers listados na Tabela 5, 1,5 µl de DMSO, 1 unidade de Phusion DNA polimerase a um volume final de 50 µl. As temperaturas de desnaturação, anelamento e extensão, assim como seus intervalos de tempo estão descritos na Tabela 6.

Tabela 5 - Mutações sítio dirigidas do gene PA *fleQ* e seus respectivos *primers*. A nomenclatura AxxxB, indica que o aminoácido A, número xxx, foi mutado para o aminoácido B. Por exemplo, R334A indica que a arginina (R) na posição 334 foi mutada para uma alanina (A).

(Continua)

Mutação	Primers
R334A	5' caacgaactgatctcggcgatggagcacgagaag 3' 5' cttctcgtgctccatcgccgagatcagttcgttg 3'
R334E	5' tcaacgaactgatctcggagatggagcacgagaagc 3' 5' gcttctcgtgctccatctccgagatcagttcgttga 3'
R185A	5' caaggaagtgggtggcgccaacctgcattaccat 3' 5' atggaatgcaggttgccgccaccacttccttg 3'
R185E	5' ggcaaggaagtgggtggcgagaacctgcattaccattcc 3' 5' ggaatggaatgcaggttctccgccaccacttccttgcc 3'
H337A	5' ctcgcgatggaggccgagaagcgcgagg 3' 5' cccgcgcttctcggcctccatccgcgag 3'
E330A	5' cctgctgctcaacgcactgatctcgcgga 3' 5' tccgcgagatcagtgcggtgagcagcagg 3'
N186A	5' ggaagtgggtggcgcgccctgcattaccattcc 3' 5' ggaatggaatgcagggcgcgccaccacttc 3'
Y189A	5' tggcgcgcaacctgcatgccattccaagcgc 3' 5' gcgcttgaatggcatgcaggttgcgcgcca 3'
S145A	5' gaacctgtccgcgccctggtcggcacc 3' 5' ggtgccgaccagggcgcggaacaggttc 3'

R340A	5' ggagcacgagaaggccgggtcgatccgc 3' 5' gcggatcgacccggccttctcgtgctcc 3'
R340E	5' gatggagcacgagaaggaggggtcgatccgcttca 3' 5' tgaagcggatcgacccctccttctcgtgctccatc 3'
I374A	5' tggagcgcctggcgccatgcatccctacg 3' 5' cgtagggatgcatggccgagcgctcca 3'
I374E	5' cccgtagggatgcatctccgagcgctccac 3' 5' gtggagcgcctggcgagatgcatccctacggg 3'
V256A	5' ctgccgatgcaggccaagctgctgcgc 3' 5' gcgcagcagctggcctgcatcggcag 3'
V256E	5' ctgccgatgcaggagaagctgctgcgcg 3' 5' cgcgagcagcttctcctgcatcggcag 3'
G379E	5' catgcatccctacgaggtgatcggggtcg 3' 5' cgaccccgatcacctcgtagggatgcatg 3'
V380E	5' atccctacggggagatcggggtcgg 3' 5' ccgaccccgatctcccgtagggat 3'
A325E	5' cgggtggaagacatcgagctgctgctcaacgaac 3' 5' gttcgttgagcagcagctcgatgtctccaccg 3'
T149E	5' gcagcctggtcggcgagagccgggcatcca 3' 5' tggatcgcccggctctcgccgaccaggctgc 3'

Fonte: Elaborado pelo autor.

(Conclusão)

Tabela 6 - Etapas da reação de PCR para a mutação sítio dirigida de PA fleQ. Cada etapa do ciclo de PCR está descrita com a temperatura e o intervalo de tempo utilizado. A etapa de desnaturação, hibridização e extensão foram repetidas 18 vezes.

Etapa do PCR	Desnaturação inicial	Desnaturação	Hibridização (18 vezes)	Extensão	Extensão final
Temperatura – Tempo	98 °C – 30 s	94 °C – 10 s	56 °C – 30 s	72 °C – 3 m 30 s	72 °C – 10 m

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em seguida, as reações de PCR foram tratadas com 20 unidades de DpnI (*New England Biolabs*) e incubadas por 3 horas à 37 °C para digestão do DNA molde metilado. Por fim, o DNA foi utilizado para transformar células de *E. coli* DH5α em placa LB ágar, e as colônias tiveram seu DNA extraído.

As mutações foram confirmadas pelo sequenciamento do DNA pelo método do didesoxinucleotídeo marcado em um sequenciador 3130 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*), segundo o protocolo do fabricante. Os protocolos de purificação dos mutantes foram os mesmos utilizados para as proteínas nativas.

3.8 Caracterização termodinâmica da interação entre PA FleQ e c-di-GMP

Para determinação dos parâmetros termodinâmicos da interação entre a PA FleQ com o mensageiro secundário, c-di-GMP, foram realizados estudos de calorimetria de titulação isotérmica (ITC). A técnica de ITC se baseia no princípio que toda interação molecular envolve troca de calor com o meio em que se encontra. O equipamento de ITC é constituído por duas celas que são mantidas a uma temperatura constante, esquematizado na Figura 11. A interação que ocorre quando se titula a amostra A na amostra B da cela libera ou absorve calor, causando uma diferença de temperatura em relação à cela de referência. O equipamento fornece energia para que não haja diferença de temperatura entre as duas celas, e a partir do calor que é fornecido ou absorvido pelo sistema, e as concentrações de A e B, é possível calcular os parâmetros termodinâmicos da interação.⁸³

Figura 11 - Esquema de um equipamento de calorimetria de titulação isotérmica. A seringa de injeção titula a amostra A na cela, contendo a amostra B. A interação entre as duas amostras troca calor com o meio causando uma diferença de temperatura em relação a cela de referência. As pilhas térmicas mantêm o equilíbrio térmico entre as duas celas, fornecendo ou absorvendo calor. O computador, com base nas concentrações de A e B, e pelo calor de interação registrado, calcula os parâmetros termodinâmicos da interação entre A e B.

Fonte: Adaptada de KABIRI et al.⁸³

O experimento de ITC foi realizado com a proteína nativa e alguns mutantes em tampão Tris-HCl 25 mM pH 8 NaCl 300 mM e $MgCl_2$ 5 mM. A proteína era depositada na cela do equipamento ITC (VP-ITC, Microcal, Northampton, USA) em uma concentração de 20 μ M. O c-di-GMP foi dissolvido exatamente no mesmo tampão da proteína em uma concentração de 600 μ M, sendo injetado sobre a proteína em 40 injeções de 7 μ l com intervalos de 2 minutos e 30 segundos. O calor liberado da interação pôde ser detectado e convertido nos parâmetros termodinâmicos e na constante de afinidade da interação.

3.9 Caracterização oligomérica da PA FleQ através de *cross linking* químico

O estudo do estado oligomérico da PA FleQ em solução foi verificado através de experimentos de *cross linking* químico, os quais permitiram observar como mutações nos aminoácidos das interfaces oligoméricas, assim como interação com diferentes nucleotídeos afetam na oligomerização da proteína. Nesses ensaios, utiliza-se um agente químico com duas extremidades reativas que interagem covalentemente com cadeias poliméricas distintas que estejam a uma distância determinada pelo tamanho do reagente. Optou-se por utilizar etileno glicolbis(succinimidilsuccinato), EGS, da Thermo Scientific, que é um éster N-hidroxisuccinimida (NHS éster). NHS éster interage covalentemente com grupos α -amino presente nas extremidades N-terminais das proteínas e com as ϵ -aminas das lisinas, liberando NHS e a proteína ligada ao *cross-linker*, representado na figura 12.⁸⁴

Figura 12 - Mecanismo de reação de *cross linking* químico por NHS éster. A) Etileno glicolbis(succinimidilsuccinato), EGS, com tamanho de 16Å. A estrutura destacada dentro do retângulo constitui na cadeia R do NHS éster. B) NHS éster interage com as aminas primárias da extremidade N-terminal da proteína e das lisinas da proteína e as conecta covalentemente através da cadeia R.
Fonte: Adaptada de CHEN et al.⁸⁴

Reações de *cross-linking* permitiram observar os diferentes oligômeros da PA FleQ e analisar como a mutação dos aminoácidos propostos afetam em sua formação. Nesse ensaio, a proteína a 5 μM foi incubada com 250 μM de EGS a temperatura ambiente e alíquotas foram retiradas ao longo do tempo. Para parar a reação adicionou-se a cada amostra Tris na concentração final de 50 mM, seguida de incubação a 97 °C por 10 minutos. Nos ensaios com presença de ligantes, foi utilizado um protocolo ligeiramente diferente para facilitar a visualização de eventuais mudanças oligoméricas. Nesses casos, utilizou-se 10 μM de proteína, 50 μM de ATP γ S e/ou ou c-di-GMP, 5 mM de MgCl_2 e 1 mM de EGS em 10 minutos de reação. A formação dos oligômeros foi observada por SDS PAGE 4-20 %.

3.10 Ensaio de atividade ATPase

Ensaio de atividade ATPase de mutantes das interfaces oligoméricas de PA FleQ permitiram verificar o impacto da oligomerização da FleQ em sua capacidade de hidrólise do ATP. Para esse experimento foi utilizado o kit *Enzchek Phosphate Assay* (Invitrogen), o qual se baseia no método proposto por Webb, M.R., 1992.⁸⁵

Uma purina nucleosídeo fosforilase (PNP) converte 2-amino-6-mercapto-7-metilpurina ribosida (MESG) para ribose 1-fosfato e 2-amino-6-mercapto-7-metilpurina (Figura 13). O produto dessa reação causa um deslocamento do máximo de absorção de 330 nm do MESG para 360 nm do produto.⁸⁵

Figura 13 - Monitoramento da atividade ATPase pelo kit *EnzChek Phosphate assay* (Invitrogen). O fosfato inorgânico liberado da atividade ATPase da amostra interage com 2-amino-6-mercapto-7-metilpurina ribosida e é convertido por PNP para ribose 1-fosfato e 2-amino-6-mercapto-7-metilpurina que absorve em 360 nm.

Fonte: Adaptada de WEBB.⁸⁵

Foram feitas reações de 200 μ l, em uma placa de 96 poços tratadas para ultra violeta de acordo com o protocolo do fabricante com a adição de 1 mM DTT, 10 mM KCl e aumento da concentração final de $MgCl_2$ para 2 mM na presença de 1 μ M de enzima e 1 mM de ATP. As reações foram monitoradas em 360 nm em um espectrofotômetro de placa DTX880 (Beckman Coulter) durante 30 minutos, com intervalos de 1 minuto. Antes de cada medida a placa era submetida a uma agitação constante por 10 segundos para homogeneização da amostra.

3.11 Estudos de dicroísmo circular

Estudos de dicroísmo circular (CD) foram realizados para verificar se as mutações na proteína nativa resultaram em alterações em seu enovelamento ou na estabilidade térmica das proteínas.

Espectros de dicroísmo circular foram registrados por um espectroscópio J-720 (JASCO). Foram utilizados 300 μ l de solução proteica a 5 μ M, em tampão 25

mM fosfato de sódio pH 7,2 em uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 0,1 cm, para a aquisição dos espectros iniciais de CD. As medidas apresentadas constituem em uma média de 16 varreduras coletadas entre 200-260 nm. Para eliminação de ruído, o mesmo procedimento foi utilizado para solução contendo apenas tampão, e feita a subtração do branco das medidas das amostras. Os dados foram convertidos para elipcidade molar (Θ). As análises de desnaturação térmica foram conduzidas pelo acompanhamento da elipcidade a 220 nm ao longo do intervalo de temperatura de 10 °C a 95 °C, com um aquecimento constante de 20 °C por hora. A fração de proteína desnaturada foi calculada pela relação $(\Theta_n - \Theta_{obs}) / (\Theta_n - \Theta_d)$, onde Θ_{obs} é a elipcidade da amostra a uma temperatura específica, e Θ_d e Θ_n são os valores de elipcidade característicos para os estados desnaturado e nativo, respectivamente.

3.12 Ensaios de termoforese em microescala

A termoforese em microescala (MTS) é uma técnica rápida e precisa que permite calcular parâmetros de interações biomoleculares com uma quantidade mínima de amostra. A MTS se baseia no movimento das moléculas ao longo de um gradiente de temperatura que pode ser quantificado pelo coeficiente de Soret, que tem relação com as características da amostra, como por exemplo, seu tamanho, sua carga e sua camada de solvatação. A interação entre a biomolécula e seu parceiro irá alterar uma dessas propriedades de modo que isso pode ser quantificado por MTS, através do monitoramento de uma sonda que é adicionada à proteína.⁸⁶

Para a realização dos experimentos, 10 μ M de FleN foi incubado com a sonda NT-647 (Nanotemper Technologies), que carrega um grupo maleimida que irá modificar as cisteínas da proteína, por 30 minutos a 4 °C e protegida de luz, em tampão 100 mM fosfato de sódio pH 7,0. Em seguida a proteína foi imobilizada em uma coluna Bio-Spin 6 (Bio-rad) para remover o excesso de sonda.

Os experimentos foram realizados com a incubação de FleN marcada com a sonda e diluição seriada de FleQ a 100 μ M em tampão 100 mM fosfato de sódio pH

7,0, utilizando os capilares hidrofóbicos NT.115 (Nanotemper Technologies), os quais são recomendados para amostras que tendem a se adsover nas superfícies do capilar. Além disso, também foi acrescentado soro albumina bovina a uma concentração final de 0,5 mg/ml para diminuir interações inespecíficas entre a proteína marcada com a sonda e a superfície do capilar. As reações foram feitas em triplicata, na ausência e presença de 1 mM de ATP γ S, em um Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies). A coleta e análise dos dados contou com a supervisão do Dr. Daniel Marutana da NanoTemper Technologies.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção heteróloga, caracterização inicial e cristalização das amostras de estudo

Nesta seção serão descritos os procedimentos de clonagem das regiões codificantes de interesse, assim como os protocolos de expressão heteróloga e purificação da amostra. Em seguida, serão apresentadas caracterizações iniciais das proteínas de interesse que consistiram em: otimização de tampão, com a finalidade de melhorar a solubilidade e a estabilidade das amostras; varredura por condições de cristalização, assim como a coleta e processamento dos dados de difração de raios X, dos cristais obtidos para a realização dos estudos estruturais.

4.1.1 Clonagem das regiões codificantes de *fleQ* e *fleN* e de suas diferentes construções

Para o estudo de FleQ e FleN de *Pseudomonas aeruginosa* e *Xanthomonas citri*, além da região codificante para a proteína inteira, também foram isoladas regiões codificantes para apenas certos domínios da proteína. Através do programa BLASTP, foram delimitados os domínios das proteínas de interesse, e com base na predição de estrutura secundária pelo PSIPRED, diferentes construções das proteínas de interesse, contendo um ou mais domínios, foram desenhadas de forma a não interromper a formação de hélices α ou folhas β . A figura 14 ilustra o resultado obtido nas predições estruturais e funcionais de PA FleQ, procedimento semelhante foi realizado para as demais proteínas.

Figura 14 - Predição dos domínios de PA FleQ pelo BLASTP (A) e predição de estrutura secundária pelo PSIPRED (B). Em amarelo, regiões com possível formação de fita β e em rosa, de hélices α .

Fonte: Elaborada pelo autor.

As regiões codificantes de interesse foram amplificadas por PCR a partir do DNA genômico dos respectivos organismos (Figura 15). Visando a sub-clonagem no vetor de expressão ppSUMO, sítios de restrição para as endonucleases BamHI, HindIII e XhoI foram introduzidos nos oligonucleotídeos, como descritos na Tabela 1. As regiões codificantes foram clonadas em vetor de expressão pET28aSUMO para melhorar a solubilidade das proteínas, devido adição de 6xHisSUMO-*tag*.

Figura 15 - Amplificação das construções das regiões codificantes (RC) de FleQ e FleN e de suas diferentes construções. A) Análise eletroforética do produto de PCR em gel de agarose 0,8%. A-1) RC PA FleQ (1467 pb), A-2) RC PA FleN (837 pb), A-3) RC XAC FleQ (1479 pb) e A-4) RC XAC FleN (954 pb), B-1) RC PA FleQ¹⁻⁴³⁰ (1290 pb), B-2) RC PA FleQ¹⁻³²⁰ (963 pb), B-3) RC PA FleQ¹⁴⁴⁻³¹⁵ (519 pb), B-4) RC PA FleQ¹⁻¹³⁹ (420 pb), B-5) RC PA FleN⁶⁻²²⁷ (669pb), C-1) RC XAC FleQ¹⁻⁴³⁶ (1311pb), C-2) RC XAC FleQ¹⁻³⁰⁸ (927 pb), C-3) RC XAC FleQ¹³⁷⁻³⁰⁸ (519 pb), C-4) RC XAC FleQ¹⁻¹³⁴ (405 pb) e C-5) RC XAC FleN⁴⁹⁻²⁷⁰ (669

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.2 Purificação e otimização de tampão de FleQ, FleN e suas construções

Diferentes construções de FleQ e FleN foram utilizadas para otimizar a probabilidade de cristalização das proteínas de estudo. Todas as regiões codificantes de interesse foram clonadas, expressas de forma heteróloga, e o produto de interesse isolado, conforme descrito na metodologia.

Para ilustrar o processo, a purificação da PA FleQ e XAC FleQ, em fusão com o SUMO, foi realizada inicialmente em uma cromatografia por afinidade em resina TALON seguida pela clivagem da proteína de fusão com a protease ULP1, e por fim, uma cromatografia de exclusão molecular em coluna HiLoad 16/60 Superdex 75 em tampão 25 mM Tris pH 8,0 300 mM NaCl. No caso das demais construções apresentadas na Tabela 1, o protocolo de purificação estabelecido foi semelhante com o da PA FleQ e XAC FleQ, contudo devido à massa molecular delas serem próximas a da ULP1, foi necessária uma etapa adicional de separação do SUMO e da protease em resina TALON antes da cromatografia por exclusão molecular (Figura 16). A XAC FleN se mostrou insolúvel nas condições testadas.

Figura 16 - Amostras da purificação de PA FleQ, PA FleN e XAC FleQ. Análise em SDS-PAGE: A-1) PA FleQ (55,3kDa), A-2) PA FleN (30kDa), A-3) XAC FleQ (54,3 kDa). B) Exemplo de purificação da XAC FleQ¹⁻¹³⁴ (15kDa): B-1) SUMO+XAC FleQ¹⁻¹³⁴ após primeira IMAC, B-2) XAC FleQ¹⁻¹³⁴ após clivagem do 6xHisSUMO-tag overnight na geladeira com Ulp-1, B-3) XAC FleQ após segunda IMAC para remover o tag 6xHisSUMO. C1) XAC FleQ¹⁻¹³⁴ após gel filtração em coluna HiLoad 16/60 Superdex 75, cujo cromatograma está apresentado em D.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Análises de espalhamento dinâmico de luz (DLS) mostraram que a XAC FleQ se encontrava polidispersa em 25 mM Tris pH 8,0 300 mM NaCl. Foi realizada uma varredura inicial em diferentes tampões, desde o pH 3,0 até o pH 11,0, os resultados estão descritos na Tabela 7. A proteína apresentou mais de uma população em algumas das condições avaliadas possivelmente devido à formação de agregados solúveis.

Tabela 7 - Resultados das medidas de DLS de XAC FleQ em diferentes tampões. A coluna pico indica as diferentes populações encontradas na amostra, sendo %Massa a quantidade de proteína encontrada naquela forma. O DLS também fornece informações como o raio hidrodinâmico (RH), a polidispersividade (PD) e a massa molecular (MM) estimada, considerando uma proteína globular.

Tampão	Pico	RH (nm)	%Pd	MM (kDa)	%Massa
25 mM Tris-HCl pH 8,0 500 mM NaCl	1	4,7±0,3	7,7	123,7±37,4	76,1
	2	6,7±1,0	15,2	293,6±40,2	23,9
50 mM Glicina pH 3,0	1	4,9±0,9	16,8	137,8±89,5	81,1
	2	18,6±14,3	59,7	3,2e+3±959,3	18,9
50 mM Ácido cítrico pH 3,2	1	1,6±0,4	21,6	10,3±8,9	29,2
	2	10,7±10,4	68,6	865,7±421,4	10,8
50 mM Fosfato de potássio pH 5,0	1	163,7±21,8	13,1	5,1e+5±7,0e+4	15,4
	2	259,8±35,4	13,3	1,5e+6±2,1e+5	45,9
50 mM Citrato de sódio pH 5,5	1	544,2±75,7	13,5	8,5e+6±1,2e+6	27,8
	2	992,3±307,9	26,9	3,5e+7±3,5e+6	62,7
50 mM Fosfato de potássio pH 6,0	1	5,8±6,0	66,4	212,3±392,8	100,0
50 mM Bis-Tris pH 6,0	1	71,3±10,6	14,7	7,3e+4±1,7e+4	20,8
	2	179,5±42,8	23,1	6,3e+5±1,0e+5	79,2
50 mM MES pH 6,2	1	5,4±1,2	21,1	171,0±41,9	100,0
50 mM Acetato de Amônio pH 7,0	1	6,2±5,1	53,9	236,5±349,6	100,0
50 mM MOPS pH 7,0	1	6,8±2,3	31,2	296,3±114,3	100,0
50 mM HEPES pH 7,5	1	7,4±4,4	48,1	364,5±292,6	100,0
50 mM Tris pH 7,5	1	7,0±3,7	42,0	327,2±226,6	100,0
50 mM EPPS pH 8,0	1	5,6±1,5	25,0	190,6±56,2	100,0
50 mM Imidazol pH 8,0	1	5,9±6,5	63,1	212,3±491,7	100,0
50 mM Bicina pH 8,5	1	2,2±0,2	11,0	21,9±8,2	17,2
	2	8,1±3,3	37,6	452,5±60,8	82,8
50 mM Tris pH 8,5	1	8,1±4,7	48,2	452,5±339,7	22,7
50 mM CHES pH 9,0	1	7,0±4,0	44,9	327,2±256,0	100,0
50 mM CHES pH 9,5	1	7,0±3,3	38,3	327,2±197,2	100,0
50 mM CAPS pH 10,0	1	7,8±2,7	32,3	406,1±159,2	99,7

Fonte: Elaborada pelo autor.

A melhor condição encontrada, em que a proteína teve uma maior monodispersidade, foi 50 mM MES pH 6,2, a qual foi otimizada com adição de diferentes aditivos nesse tampão (Tabela 8). Apesar da adição de 50 mM Arg e 50 mM Glu terem diminuído a polidispersividade da amostra consideravelmente, eles não foram utilizados no tampão final, pois ainda não foi confirmado se a presença

deles dificultaria a cristalização da proteína, conforme mencionado por Golovanov et al, 2004.⁸⁷ Dessa forma, o tampão final foi 25 mM pH 6,2 200 mM NaCl e 10% Glicerol, o qual além de melhorar a solubilidade da proteína também permitiu obter os primeiros cristais de XAC FleQ.

Tabela 8 - Resultados das medidas de DLS de XAC FleQ em 25 mM MES pH 6,2 e diferentes aditivos. A coluna pico indica as diferentes populações encontradas na amostra, sendo % Massa a quantidade de proteína encontrada naquela forma. O DLS também fornece informações como o raio hidrodinâmico (RH), a polidispersividade (PD) e a massa molecular (MM) estimada, considerando uma proteína globular.

Tampão	Pico	RH(nm)	%Pd	MM(kDa)	%Massa
25 mM MES pH 6,2 20 mM NaCl	1	5,6±1,4	24,2	190,6±90,4	9,6
	2	142,5±63,4	44,7	3,69e+5±8,83e+4	56,8
25 mM MES pH 6,2 50 mM NaCl	1	2,8±0,3	10,3	37,6±8,4	12,1
	2	6,5±1,4	20,9	263,6±175	87,9
25 mM MES pH 6,2 100 mM NaCl	1	6,7±1,9	27,7	293,6±89,9	100,0
25 mM MES pH 6,2 5% Glicerol	1	5,6±1,2	20,8	190,6±42,4	100,0
25 mM MES pH 6,2 10% Glicerol	1	5,6±1,2	20,5	190,6±46,0	100,0
25 mM MES pH 6,2 2 mM CHAPS	1	5,1±1,3	23,8	153,5±42,9	99,5
25 mM MES pH 6,2 2 mM DTT	1	5,4±1,5	26,0	171,0±52,9	100,0
25 mM MES pH 6,2 5 mM DTT	1	5,1±1,3	24,4	153,5±59,9	100,0
25 mM MES pH 6,2 10 mM BME	1	12,8±4,8	37,5	1,33e3±488,4	38,8
25 mM MES pH 6,2 50 mM Arg 50 mM Glu	1	4,45±0,9	19,8	111,0±27,8	100,0
25 mM MES pH 6,2 200 mM NaCl 10 % Glicerol	1	5,4±1,0	17,4	171,0±46,8	100

Fonte: Elaborada pelo autor.

O tampão de PA FleN não foi otimizado devido à instabilidade da proteína, o que não permitiu obter medidas satisfatórias de DLS. Em relação a PA FleQ, não houve mudanças significativas na polidispersividade da amostra nos diferentes tampões testados. A Tabela 9 descreve o progresso realizado com as demais construções.

Tabela 9 - Resumo do progresso da clonagem, expressão e purificação da FleQ e FleN e suas construções, assim como o tampão de eluição na gel filtração.

Construção (AA)	Clonagem no SUMO	Expressão	Purificação	Tampão de eluição
PA FleQ ¹⁻⁴⁹⁰	Sim	Sim	Sim (Solúvel)	25 mM Tris pH 8,0 0,3 M NaCl
PA FleQ ¹⁻¹³⁹	Sim	Sim	Sim (Solúvel)	25 mM Tris pH 8,0 0,3 M NaCl
PA FleQ ¹⁻⁴³⁰	Sim	Sim	Sim (Solúvel)	25 mM Tris pH 8,0 0,3 M NaCl
PA FleN ¹⁻²⁸⁰	Sim	Sim	Sim (Solúvel)	25 mM Tris pH 7,4 0,5 M NaCl 50 mM L-Arg 50 mM L-Glu 10% Glicerol
PA FleN ⁶⁻²²⁷	Sim	Sim	Sim (Solúvel)	25 mM Tris pH 7,4 0,5 M NaCl 50 mM L-Arg 50 mM L-Glu 10% Glicerol
XAC FleQ ¹⁻⁴⁹⁴	Sim	Sim	Sim (Solúvel)	50 mM MES pH 6,2 0,2 M NaCl 10% Glicerol
XAC FleQ ¹⁻¹³⁴	Sim	Sim	Sim (Solúvel)	50 mM MES pH 6,2 0,2 M NaCl 10% Glicerol
XAC FleQ ¹⁻⁴³⁶	Sim	Sim	Sim (Solúvel)	50 mM MES pH 6,2 0,2 M NaCl 10% Glicerol
XAC FleQ ¹³⁷⁻⁴³⁶	Sim	Sim	Sim (Solúvel)	50 mM MES pH 6,2 0,2 M NaCl 10% Glicerol
XAC FleQ ¹³⁷⁻⁴⁹⁴	Sim	Sim	Sim (Solúvel)	50 mM MES pH 6,2 0,2 M NaCl 10% Glicerol
XAC FleN ¹⁻³¹⁹	Sim	Sim	Não (Insolúvel)	-/-
XAC FleN ⁴⁹⁻²⁷⁰	Sim	Sim	Não (Insolúvel)	-/-

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para facilitar a compreensão dos resultados, a partir deste ponto, ao invés de se referir às construções mais utilizadas pelo intervalo dos aminoácidos que as constituem, serão usados os domínios que elas representam como descrito na Tabela 10.

Tabela 10 - Nomenclatura utilizada para as construções que apresentaram os principais resultados descritos neste trabalho. HTH representa o motivo de ligação a DNA hélice-volta-hélice.

Construção de FleQ	Resíduos	Domínios	Organismo de origem
XAC FleQ ^{WT}	1-494	REC+AAA+HTH	<i>Xanthomonas citri</i>
XAC FleQ ^{REC}	1-134	REC	<i>Xanthomonas citri</i>
PA FleQ ^{WT}	1-477	REC+AAA+HTH	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PA FleQ ^{REC}	1-139	REC	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PA FleQ ^{AAA}	137-394	AAA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PA FleQ ^{REC+AAA}	1-394	FleQ+AAA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PA FleQ ^{AAA+HTH}	137-477	FleQ+HTH	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PA FleN	1-319	CbiA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.3 Ensaios cristalográficos

As proteínas PA FleQ, XAC FleQ e PA FleN assim como suas construções foram submetidos a ensaios iniciais de cristalização com as condições dos kits Index HT, *crystal screen* Cryo, SaltRX e o PEG/Ion HT da Hampton em placas de 96 poços utilizando 70 μ l de solução no poço e 1 μ l dessa solução adicionado a 1 μ l de proteína.

As placas foram incubadas a 18 °C e os primeiros cristais apareceram cerca de 3 dias após a incubação (Figura 17). As construções que cristalizaram assim como suas melhores condições de cristalização estão resumidas na Tabela 11. Para a resolução estrutural da XAC FleQ^{REC} e da PA FleQ^{AAA+HTH}:c-di-GMP por Se-SAD ou Se-MAD, a proteína havia sido previamente incorporada com selenometionina durante sua expressão em meio mínimo.

Tabela 11 - Condições de cristalização e concentração das proteínas em estudo.

Construção	Concentração	Condição de cristalização
XAC FleQ ^{REC}	250 μ M	INDEX (D7) - 0,1 M Bis-Tris pH 6,5 25 % w/v PEG3350
PA FleQ ^{AAA+HTH}	25 μ M	INDEX (F7) - 0,1 M Bis-Tris pH6,5 0,2 M Sulfato de Amônio 25%w/v PEG3350
PA FleQ ^{AAA}	25 μ M	INDEX (F5) - 0,1 M Acetato de Amônio 0,1 M Bis-Tris pH 5,5 17% PEG 10000
PA FleQ ^{AAA} + ATP	25 μ M	INDEX (F5) - 0,1 M Acetato de Amônio 0,1 M Bis-Tris pH 5,5 17% PEG 10000
PA FleQ ^{AAA} + ATP γ S	25 μ M	INDEX (F5) - 0,1 M Acetato de Amônio 0,1 M Bis-Tris pH 5,5 17% PEG 10000

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 17 - Cristais da XAC FleQ^{REC} (A) e PA FleQ^{AAA} (B). A condição de cristalização da XAC FleQ^{N-term} foi 0,1 M Bis-Tris pH 6,5 25 % w/v PEG3350 e para a PA FleQ^{AAA}, 0,1 M Bis-Tris pH6, 5 0,2 M Sulfato de Amônio 25 % w/v PEG3350.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.4 Coleta e processamento dos dados cristalográficos

Os dados de difração de raios X da PA FleQ^{AAA+HTH} com c-di-GMP foram coletados no sincrotron *Advanced Photon Source*, APS (Chicago, EUA), pelo Prof. Dr. Marcos V.A.S. Navarro em colaboração com o Prof. Dr. Holger Sondermann e chegaram a uma resolução máxima de 3,3 Å. A proteína foi cristalizada no grupo espacial P6₃22 e apresentou 75,1 % de solvente (valor calculado pelo coeficiente de Matthews), o que provavelmente causou a baixa resolução dos dados.

Cristais da construção PA FleQ^{AAA} no grupo espacial P6₅ difrataram raios X na linha MX-2 no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron, LNLS (Campinas, Brasil), a uma resolução de 1,8 Å. Inicialmente procurou-se resolver os dados por substituição molecular usando a proteína PA FleQ^{AAA+HTH} com c-di-GMP como molde, contudo apesar de se utilizar um modelo com 100 % de identidade, não foi possível achar uma solução. Portanto os dados foram resolvidos por I-SAD a partir de *quick-cryo-soaking* dos cristais em condição de cristalização adicionados de 500 mM de NaI e 10% de etilenoglicol.

Depois de ter a estrutura resolvida foi observado que o modelo divergia da estrutura com c-di-GMP e por isso não era possível usar substituição molecular. A sobreposição entre a estrutura apo e a complexada com c-di-GMP revelou um rmsd de 3,5 Å, o que a princípio poderia ser devido à baixa resolução da estrutura com ligante ou desvio da cadeia principal. As estruturas apresentaram dois subdomínios, um composto por fitas β e hélices α e outro constituído apenas por hélices α , os quais serão descritos com mais detalhes na seção 4.2.1. Ao sobrepor cada um destes subdomínios individualmente, obteve-se valores de rmsd de 1 Å. Essa diminuição de aproximadamente 70 % nos valores de rmsd individuais em relação ao valor global indica que o c-di-GMP promoveu um rearranjo da posição desses subdomínios.

Além do domínio AAA+ da PA FleQ apo e em complexo com c-di-GMP, conjuntos de dados de difração de raios X da construção PA FleQ^{AAA}, co-cristalizado na presença de ATP ou ATP γ S, foram coletados na linha MX2 do LNLS (Campinas, SP) e no Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP, São Carlos), respectivamente. Ao contrário do observado com a estrutura em complexo com c-di-

GMP, a ligação dos nucleotídeos não promoveu nenhum rearranjo da estrutura apo (rmsd de 0,25 e 0,35, estruturas com ATP e ATPγS respectivamente) e ambos apresentaram o mesmo grupo espacial P6₅. Curiosamente, mesmo na ausência de Mg²⁺ foi modelado ADP no lugar do ATP, provavelmente devido à hidrólise do nucleotídeo.

Dados de difração de raios X do cristal da XAC FleQ^{REC} com selênio metionina incorporado também foram coletados na linha MX2 do LNLS e resolvidos por Se-SAD. Os dados de difração chegaram a uma resolução de 1,8 Å e cristalizou no grupo espacial C121. Essa construção corresponde somente a região do domínio REC.

Todos os dados foram processados com o XDS e nas determinações estruturais por substituição molecular foi utilizado o programa PHENIX. Para a resolução das estruturas utilizando sinal anômalo de selênio (PA FleQ^{AAA} e XAC FleQ^{REC}) ou iodo (PA FleQ^{AAA}), os sítios de átomos pesados foram encontrados com ShelXD e a estrutura teve sua fase calculada com o PHENIX. As estruturas finais foram encontradas automaticamente (PA FleQ^{AAA} e XAC FleQ^{REC}) ou manualmente (PA FleQ^{AAA+HTH} + c-di-GMP) e refinadas com COOT / PHENIX. Os resultados da coleta, processamento e refinamento dos dados estão resumidos na Tabela 12.

Tabela 12 - Processamento e refinamento dos dados de difração de raios X da XAC FleQ^{REC} e PA FleQ^{AAA} na sua forma apo e ligada com ADP e ATPγS e PA FleQ^{AAA} com c-di-GMP. Entre parênteses são os dados referentes à camada de maior resolução.

	XAC FleQ ^{REC}	PA FleQ ^{AAA}	PA FleQ ^{AAA} + ADP	PA FleQ ^{AAA} + ATPγS	PA FleQ ^{AAA+HTH} + c-di-GMP
COLETA DE DADOS					
Comprimento de onda (Å)	0,979	1,459	1,459	1,542	0,979
Grupo Espacial	C121	P6 ₅	P6 ₅	P6 ₅	P6 ₃ 22
Parâmetros da Cella Unitária					
a (Å)	43,9	104,9	104,9	105,2	137,9
b (Å)	50,2	104,9	104,9	105,2	137,9
c (Å)	106,8	42,7	42,7	42,8	172,8
α (°)	90,0	90,0	90,0	90	90
β (°)	94,0	90,0	90,0	90	90
γ (°)	90,0	120,0	120,0	120	120
Faixa de Resolução (Å)	35,5 – 1,8 (1,87-1,76)	45,4 - 1,8 (1,91-1,80)	45,4 - 2,4 (2,54-2,4)	52,6 – 2,5 (2,67-2,52)	43,6 – 3,3 (3,56-3,4)
Número de Reflexões					
Total	153108 (14194)	261119 (40636)	130070 (15867)	73821 (6398)	131292 (3251)
Única	41409 (5682)	25124 (4007)	10840 (1719)	9612 (1042)	24350 (650)
Completeza (%)	97,7 (78,9)	99,5 (98,8)	99,9 (99,4)	99,8 (98,8)	98,9 (97,3)
Redundância	3,7 (2,5)	10,4 (10,1)	12,0 (9,2)	11,3 (9,2)	7,1 (6,9)
I/σ (I)	12,6 (2,0)	14,7 (2,6)	16,3 (2,0)	21,6 (2,3)	8,1 (2,6)
R_{meas} (%)	12,9 (76)	13,8 (97)	15,5 (126,5)	10,1 (44,5)	12,8 (54,2)
REFINAMENTO					
R_{work} / R_{free}	16,3 / 21,8	16,8 / 21,0	18,1 / 25,2	17,8 / 22,9	26,2 / 28,2
R_{rmsd}					
Comprimento da ligação (Å)	0,008 1,030	0,007 1,004	0,007 1,144	0,009 1,195	0,022 1,724
Ângulo da ligação (°)					
Número de átomos					
Proteína	2050	2029	2022	2026	1936
Água	242	268	81	148	0
Ramachandran (%)					
Favoráveis	99,2	98,4	95,6	98,0	87,8
Permitidas	0,8	1,6	4,0	2,0	9,9
Não permitidas	0,0	0,0	0,4	0,0	2,4

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 Regulação da transcrição do operon *pel* por FleQ

FleQ é uma bEBP que regula a transcrição do operon *pel*, o qual é responsável pela formação do exopolissacarídeo PEL, principal constituinte da matriz que reveste o biofilme em *Pseudomonas aeruginosa* PA14. Até o momento, acredita-se que FleQ forma um complexo com FleN e, na presença de ATP, atua como um repressor do operon. Contudo, a ligação de c-di-GMP promoveria uma mudança no papel de FleQ, que passaria a ser um ativador da transcrição do operon *pel*. Nesta seção será apresentada a estrutura cristalográfica do domínio AAA+ de FleQ, em seu estado apo e ligado à ATPγS, ADP e c-di-GMP, assim como a determinação do sítio de ligação desses diferentes nucleotídeos. Análises das estruturas cristalográficas revelaram um rearranjo na oligomerização da proteína, o qual foi verificado ser crítico para a função de FleQ e levou a proposição de um modelo inicial para regulação do operon *pel*.

4.2.1 PA FleQ forma anéis hexaméricos típicos de bEBPs

Cristais adequados para coleta de dados de difração de raios X foram obtidos para a construção PA FleQ^{AAA}, que corresponde ao domínio AAA+ ATPase, e resolvidos por I-SAD. bEBPs dependentes do fator σ^{54} utilizam esse domínio, para fornecer a energia, através da hidrólise do ATP, para remodelar a holoenzima RNAP- σ^{54} para sua forma ativa.⁵⁷ Outra característica dessas bEBPs é a presença de *loops* específicos para interação com o fator σ^{54} , L1 e L2, sendo que o primeiro contém o motivo característico G²²¹AFTGA, conservado em PA FleQ, e o segundo possui o motivo V²⁷⁰GSNK (Figura 18A).

A estrutura de PA FleQ^{AAA} foi obtida inicialmente por I-SAD, sendo em seguida utilizada como modelo para substituição molecular em um conjunto de dados de difração de raios X de PA FleQ^{AAA} que foram coletados a uma melhor resolução de 1,8 Å. O domínio AAA+ de PA FleQ pode ser separado em dois subdomínios (Figura 18B). O maior (SD1), no N-terminal, possui um enovelamento α/β , sendo composto por uma folha β central de 5 fitas paralelas, com topologia 7-8-9-6-10 (as fitas β 1 a

β 5 correspondem ao domínio REC), e rodeado por 8 hélices α . Esse subdomínio é semelhante ao de P-loop NTPases, que são caracterizados pela presença de dois motivos: o *walker A* e o *walker B*.⁸⁸⁻⁸⁹ A sequência G¹⁷⁴xxGxGKE correspondente ao *walker A* interage com os fosfatos do ATP, enquanto que a região do *walker B*, T²⁴¹LFLDE, coordena o Mg²⁺ necessário para a hidrólise do ATP e por fim o R *finger*, R³⁰⁰xDL, aparentemente está envolvido na catálise entre os diferentes protômeros.⁵⁸ O menor subdomínio (SD2) é composto apenas por 6 hélices α que se empacotam na extremidade C-terminal da folha β de SD1.

Cristais de PA FleQ^{AAA} com ATP γ S ou ADP foram obtidos através da co-cristalização da proteína com o ligante, e os dados foram resolvidos por substituição molecular com a estrutura apo como molde. Sobreposição das estruturas apo, e ligadas a ADP ou ATP γ S revelaram um rmsd menor que 0,4, indicando que elas são praticamente idênticas, exceto por certos resíduos de aminoácidos envolvidos na interação com os nucleotídeos (Figura 18C). Observa-se que ATP γ S e ADP interagem no sulco formado entre os dois subdomínios (SD1 e SD2) através de interações com os resíduos S¹⁷⁶ e K¹⁸⁰ do *walker A*, e as argininas R³³⁴ e a R³⁶³ do motivo sensor II no SD2.⁵⁷

Membros da família de fatores de transcrição que contêm o domínio AAA+ ATPase, tipicamente, formam um anel quando ativos, geralmente por fosforilação do domínio REC presente no N-terminal.⁸⁹ A construção PA FleQ^{AAA} formou um hexâmero típico de domínios AAA, mas ao invés de ser um anel hexamérico fechado, ele é aberto e está centralizado no eixo de roto-translação do grupo espacial P6₅, de tal forma que ao longo do eixo é possível observar uma espécie de filamento contínuo formado por seus protômeros (Figura 18D).

Figura 18 - Estrutura cristalográfica de PA FleQ^{AAA}, A) Esquematização dos domínios de FleQ assim como motivos estruturais conservados. B) Estrutura do domínio AAA+ de PA FleQ ligada a ATPγS e seus subdomínios SD1 e SD2. C) Sítio de ligação do ADP e ATP em FleQ^{AAA}. D) Hexâmero cristalográfico observado para PA FleQ^{AAA} que cristalizou no grupo espacial P6₅, as estruturas em preto indicam os protômeros gerados pelas operações de simetria. Uma visão lateral do eixo também está indicada, com protômeros intercalados, preto e branco. A leve abertura do anel hexamérico, aliada às operações de simetria, gera uma espécie de filamento de PA FleQ^{AAA}.

Fonte: Adaptada de MATSUYAMA et al.⁹⁰

Curiosamente tal empacotamento espiralado também foi observado no empacotamento cristalino dos domínios AAA+ de outras proteínas como ClpX, RecA, Rho e PspF de *E. coli*.^{65,91} Os anéis oligoméricos de PspF hidrolisam o ATP de forma sequencial, e essa assimetria nas interações entre as subunidades conferem uma cooperatividade na ligação do nucleotídeo e sua catálise.⁹¹ Estudos estruturais de NtrC1, uma bEBP na qual não foi observada essas espirais, mostram que uma de suas subunidades é ligeiramente deslocada, levando a um modelo cujo anel planar de bEBP deve ser deslocado para direcionar as interações com o complexo σ^{54} -RNA polimerase e seu remodelamento dependente de ATP.⁹²

De acordo com a literatura PA FleQ forma hexâmeros, tetrâmeros e dímeros em solução, contudo, o empacotamento cristalino de PA FleQ^{AAA} levantou a possibilidade da proteína oligomerizar na forma de espirais. Para verificar essa hipótese, a Dra. Petya V. Krasteva do Instituto Pasteur (Paris, França) coletou imagens de PA FleQ por microscopia eletrônica por *negative stain* em condições saturadas de ADP-vanadato, um análogo não hidrolisável de ATP. Análises dessas partículas únicas (Figura 19A) não indicaram a presença de estruturas espiraladas,

mas apresentaram espécies hexaméricas condizentes com o anel típico de bEBPs (Figura 19B).

Figura 19 - Imagens de microscopia eletrônica por *negative stain* de PA FleQ. A) Micrografia de PA FleQ mostrando as partículas únicas em condição saturada de ATP não hidrolisável. Não é observado formações de filamentos de PA FleQ. B) Função de auto-rotação da média das imagens, destacando o a presença de um eixo de rotação de sexta ordem.

Fonte: Adaptada de MATSUYAMA et al.⁹⁰

4.2.2 Domínios AAA+ possivelmente constituem novos alvos de ligação à c-di-GMP

Em uma colaboração com o Prof. Dr. Holger Sondermann, uma construção da PA FleQ contendo os domínios AAA e HTH (resíduos 137 – 477) foi cristalizada no grupo espacial P6₃22 pela Dra. Petya V. Krasteva, e sua estrutura foi resolvida pelo Prof. Dr. Marcos V.A.S. Navarro por Se-SAD a 3,4 Å. Os dados de difração de raios X foram coletados no sincrotron *Advanced Photon Source* (APS – USA), e processados com o programa XDS.⁷⁹

O modelo final apresentou ótimas estatísticas de refinamento ($R_{\text{factor}}/R_{\text{free}}$ de 26,2/28,2%) e geometria (Tabela 12). O cristal apresentou apenas uma molécula por unidade assimétrica, com um conteúdo de solvente de aproximadamente 80%, um valor bem alto para cristais de proteínas. Apenas os resíduos 139 – 392 estavam visíveis no mapa de densidade eletrônica. Dessa forma, todo o motivo C-terminal de interação com o DNA, hélice-volta-hélice, e o *linker* que o conecta ao domínio AAA+ não foi construído no modelo final, indicando que essa parte da estrutura é flexível

Fonte: Adaptada de MATSUYAMA et al.⁹⁰

Análise do sítio ativo de PA FleQ revela três motivos de interação com c-di-GMP: o motivo R *switch* - LFR¹⁴⁴S, os resíduos R¹⁸⁵ e N¹⁸⁶ na região pós *walker* A no subdomínio D1 e um motivo de ligação de c-di-GMP ExxxR³³⁴ no subdomínio D2 (Figura 20B). Alguns desses resíduos já haviam sido confirmados experimentalmente, como no caso de FlrA, uma proteína homóloga de FleQ em *Vibrio cholerae*, em que estudos de modelagem identificaram, e em seguida confirmaram experimentalmente que os resíduos de arginina equivalentes a R¹⁸⁵ e R¹⁴⁴ de PA FleQ eram importantes para a interação com c-di-GMP.⁷¹

Dentre os resíduos conservados foram feitas as mutações R¹⁸⁵E e R³³⁴E e sua interação com c-di-GMP foi verificada por ITC. A troca de calor observada entre o ligante e os mutantes PA FleQ R¹⁸⁵E e R³³⁴E, tiveram um perfil semelhante à da diluição de c-di-GMP em tampão, indicando que de fato a mutação desses resíduos fez com que o c-di-GMP perdesse sua capacidade de interagir com FleQ. Além disso, os resultados de ITC confirmaram uma estequiometria de 2:1 (c-di-GMP:FleQ), compatível com a estrutura e uma constante de dissociação K_d em torno de 3,9 μ M (Figura 21).

Figura 21 - Ensaios de calorimetria de titulação isotérmica de c-di-GMP. A) Titulação de c-di-GMP em PA FleQ, com uma estequiometria de duas moléculas de ligante por molécula de proteína e uma constante de dissociação de $4,1 \pm 0,5 \mu\text{M}$. B) Titulação de c-di-GMP nos mutantes PA FleQ R¹⁸⁵E e PA FleQ R³³⁴E, com uma troca de calor semelhante a apresentada pela diluição de c-di-GMP em tampão, o que indica que não houve interação entre proteína e ligante. C) Titulação de c-di-GMP em XAC FleQ indica que XAC FleQ não é um receptor para o nucleotídeo.

Fonte: Adaptada de MATSUYAMA et al.⁹⁰

Estudos de alinhamento sequencial dos motivos propostos de interação com c-di-GMP, revelam uma alta conservação desses resíduos apenas nas proteínas homólogas de FleQ, sendo que isso não é observado entre as homólogas de NtrC (Figura 20B). É interessante notar que como XAC FleQ não possui os resíduos R¹⁴⁴, R¹⁸⁵ e R³³⁴ conservados, ela seria incapaz de interagir com o nucleotídeo. Para verificar tal hipótese, c-di-GMP foi titulado em XAC FleQ, e conforme esperado, não foi observada nenhuma interação entre o ligante e a proteína (Figura 21).

Por fim, a partir de um banco de dados representativos de proteoma foram separadas 4632 sequências de bEBPs, sendo que dentre elas, 142 sequências (3%) apresentaram os resíduos do sítio de ligação à c-di-GMP conservados, o que sugere que c-di-GMP deve estar regulando a atividade de outras bEBPs, as quais podem estar envolvidas em outros processos celulares, além de regulação do flagelo e da secreção do exopolissacarídeos (Tabela 13).⁹³

Tabela 13 -Estatísticas de sequências de bEBPs que possuem o sítio de ligação à c-di-GMP conservado.

Domínio regulatório N-terminal	Total de sequências representativas	Sequências com motivo de interação conservado a c-di-GMP
FleQ	90	67 (74,4 %)
GAF	238	5 (2,1 %)
-	1257	8 (0,6 %)
REC	3047	62 (2,0 %)

Fonte: Adaptada de MATSUYAMA et al.⁹⁰

4.2.3 c-di-GMP não compete com ATP pelo mesmo sítio de ligação em PA FleQ

Anteriormente, acreditava-se que c-di-GMP e ATP competiam pelo mesmo sítio de ligação no *walker A*, uma vez que c-di-GMP diminuía a atividade ATPase de FleQ e o mutante no *walker A*, PA FleQ K¹⁸⁰A, ser incapaz de interagir com ATP.⁶⁹ Contudo, recentemente foi demonstrado que mutações nos resíduos R¹⁴⁴ e R¹⁸⁵, que não fazem parte dos motivos de interação à ATP, também tornavam FleQ incapaz de se ligar a c-di-GMP, sendo um indício de que, na realidade, o sítio de ligação do

c-di-GMP seria próximo ao sítio de ATP e por causa disso poderia estar afetando a ligação com o outro nucleotídeo.⁹⁴ Com a resolução estrutural do complexo de PA FleQ com c-di-GMP ou com ATP, descritas neste trabalho, torna-se evidente como a ligação do primeiro afeta a atividade ATPase da proteína.

Como mencionado anteriormente, não foi possível melhorar a resolução de 3,3 Å da estrutura do complexo PA FleQ^{AAA}:c-di-GMP através do *soaking* dos cristais apo com o ligante. A sobreposição das estruturas apo e complexada com c-di-GMP, usando o subdomínio D1 como referência, revelaram um deslocamento de corpo rígido do subdomínio D2 de 9°, compactando a estrutura do protômero, o que não era observado nos complexos PA FleQ^{AAA}:ATPyS ou ADP (Figura 22). Esse rearranjo conformacional impedia que o ligante entrasse no cristal por *soaking* sem desestruturá-lo. Além disso, é possível observar que a ligação do c-di-GMP dimérico desloca e estabiliza a extremidade N-terminal do domínio AAA+ para dentro do sítio de ligação à ATP, o que inibe a atividade ATPase da proteína (Figura 22). De um ponto de vista geral, teríamos que a ligação do c-di-GMP promoveria o rearranjo do domínio REC de FleQ, e tal movimento contribuiria para a dissociação do anel hexamérico, observado por microscopia eletrônica na Figura 19.

Figura 22 - Sobreposição estrutural do complexo PA FleQ^{AAA} : c-di-GMP e PA FleQ : ATPγS. Ao fixar SD1 como molde, observa-se uma diferença angular de 9° na posição de SD2 e o deslocamento do N-terminal para dentro do sítio de ATP, na estrutura ligada à c-di-GMP. Em destaque, está o sítio de ligação de ambos os nucleotídeos. Representação como superfície sólida da cadeia lateral de S¹⁴⁵ e da cadeia principal de G¹⁷⁹, indica uma ocupação parcial do sítio de ATP, promovida pela ligação de c-di-GMP.

Fonte: Adaptada de MATSUYAMA et al.⁹⁰

Dessa forma, é possível explicar a incapacidade do mutante PA FleQ K¹⁸⁰A de interagir com c-di-GMP, como mencionado no trabalho de Baraquet, C. e Harwood, C.S., 2013,⁶⁹ pois há uma interferência no movimento entre os subdomínios D1 e D2, assim como no estado oligomérico da proteína, devido ao posicionamento privilegiado desse resíduo na cavidade entre SD1 e SD2, e sua proximidade no sítio de c-di-GMP.

PA FleQ regula a expressão dos genes flagelares de forma dependente do fator σ^{54} , ou seja, PA FleQ se liga ao fator σ^{54} e captura a RNA polimerase formando um complexo fechado inativo, CF RNAP- σ^{54} . Através da energia fornecida pela hidrólise de ATP por FleQ, há um remodelamento do complexo CF DNA-RNAP- σ^{54} para sua forma competente para transcrição dos genes flagelares. Contudo, ligação de c-di-GMP em FleQ, promove um rearranjo do domínio REC que bloqueia o acesso do ATP ao seu sítio de ligação. Essa diminuição na atividade ATPase de FleQ explica o papel do c-di-GMP na repressão dos genes flagelares observadas *in vivo*.

4.2.4 Ligação à c-di-GMP promove um rearranjo oligomérico de PA FleQ

Ao aplicar as operações de simetria do grupo espacial P6₃22, no qual o complexo PA FleQ^{AAA}:c-di-GMP foi cristalizado, é possível identificar um hexâmero formado por um dímero de trímeros (Figura 23). Nessa estrutura, o dímero é formado por interações entre SD1/SD2 e SD2/SD2 de diferentes protômeros, enquanto que o trímero é estabilizado pelo c-di-GMP encontrado no sítio de ligação de cada uma das unidades, e que também interage com os protômeros adjacentes, como observado através do resíduo K³³⁹, completando o sítio de ligação do nucleotídeo (Figura 20A). Apesar de FleQ formar um hexâmero, sua arquitetura na presença de c-di-GMP é completamente diferente do hexâmero observado por microscopia eletrônica (Figura 19). Análises realizadas no PISA server⁹⁵ para as energias de dissociação das interfaces proteína:proteína e proteína:c-di-GMP sugerem uma relevância biológica para esse hexâmero. A superfície total enterrada no trímero mediado por c-di-GMP é de aproximadamente 1400Å² e com um ganho na energia de solvatação de -14,4 kcal/mol. O hexâmero é, por fim, estabilizado por

interações entre SD1/SD2 e SD2/SD2, representadas na Figura 23B, que escondem uma superfície de 4300Å² e com um ganho na energia de solvatação -23,7kcal/mol. Até o momento, esse arranjo oligomérico não foi identificado em nenhuma outra bEBP, o que realça o mecanismo único que FleQ possui.

Figura 23 - Oligômero de PA FleQ^{AAA} mediado por c-di-GMP. A) Hexâmero formado por um dímero de trimeros, obtido através das operações do grupo espacial P6₃22 em duas visões ortogonais. B) Análises das energias de solvatação das interfaces envolvidas no hexâmero do complexo PA FleQ^{AAA}:c-di-GMP.

Fonte: Adaptada de MATSUYAMA et al.⁹⁰

4.2.5 Oligomerização de PA FleQ possui um papel essencial na atividade da proteína

O estado oligomérico possui um papel importante para a atividade de bEBPs. Normalmente, a partir de um estímulo externo, seja pela interação com um ligante ou fosforilação do domínio REC, os dímeros inativos de bEBPs são convertidos para sua forma de anéis hexamérico funcionais.^{94,96} Nesse sentido, FleQ já se diferencia das demais bEBPs, pois ela é encontrada como dímeros, tetrâmeros e hexâmeros em solução, além de não possuir sítio de fosforilação conservado em seu domínio REC.⁶⁹

FleQ é uma proteína modular, com um domínio N-terminal, semelhante aos domínios REC, um domínio AAA+ central e um motivo de interação com DNA, hélice-volta-hélice. Para analisar a contribuição de cada um dos domínios, e o efeito da interação com ATP e/ou c-di-GMP na oligomerização de PA FleQ, foram realizados ensaios de *cross linking* químico, com o reagente EGS (Figura 24). A técnica de *cross linking* foi escolhida para verificação de oligômeros em solução, pois ela permite a detecção das diferentes formas oligoméricas, mesmo em pequenas quantidades, além de permitir observar como o ATPγS e o c-di-GMP afetam esse processo. Outras técnicas como gel nativo e cromatografia de exclusão molecular poderiam resultar na difusão do ligante pela coluna ou gel, o que daria margem a interpretações erradas dos resultados.

Análise do *cross linking* de PA FleQ ao longo do tempo, indica um acúmulo gradual dos oligômeros de maior ordem, o que sugere que há um equilíbrio entre as diferentes espécies em solução. Também é possível confirmar o que foi observado anteriormente por Baraquet, C. e Harwood, C.S., 2013, de que ATPγS não favorece a formação de nenhuma espécie. Em contrapartida, a presença de c-di-GMP diminuiu consideravelmente a formação de tetrâmeros e hexâmeros, independentemente da presença de ATPγS. É interessante notar que apesar do c-di-GMP ter impedido a formação dos anéis hexaméricos, não foi possível observar nenhuma banda no gel de SDS PAGE na altura correspondente aos hexâmeros mediados por c-di-GMP. Provavelmente, isso é um indício de que devem existir outros fatores que estabilizem esse hexâmero não convencional, como por exemplo, a ligação de FleQ ao DNA ou sua interação com FleN. Tais resultados justificariam o

fato da inibição da atividade ATPase de FleQ, pela ligação do c-di-GMP, ter sido aumentada na presença de FleN.⁶⁹

Figura 24 - Contribuição dos diferentes domínios de FleQ, e seus ligantes, em sua oligomerização. SDS PAGE das reações de “cross linking” químico em gel 10% acrilamida. A) Reação de *cross linking* de PA FleQ (55kDa) ao longo do tempo e na presença de ATPγS e/ou c-di-GMP. Também foi analisado os efeitos dos diferentes nucleotídeos na oligomerização de PA FleQ^{REC} (16kDa) em (B), PA FleQ^{AAA} (29kDa) em (C) e PA FleQ^{AAA+HTH} (38kDa) em (D).

Fonte: Adaptada de MATSUYAMA et al.⁹⁰

Curiosamente, apesar de não ser possível observar bandas referentes aos trímeros e hexâmeros mediados por c-di-GMP nos experimentos de *cross linking* de PA FleQ, eles são visíveis nas construções sem o domínio REC. Esse resultado é condizente com estudos anteriores que mostraram que o domínio REC não é essencial para a interação entre PA FleQ e c-di-GMP.⁵³ Além disso, a oligomerização dos domínios isolados e combinados de PA FleQ revelam que o

domínio REC e o motivo hélice-volta-hélice são essenciais para oligomerização do domínio AAA+ e, consequentemente, pela formação espontânea do anel hexamérico em solução. Esse resultado confirma o que foi observado recentemente, onde foi demonstrado que o domínio REC de FleQ é essencial para a dimerização e funcionamento da proteína.⁷⁰

Para verificar a importância dos diferentes oligômeros na atividade de FleQ, foram feitas mutações pontuais em resíduos localizados nas interfaces do hexâmero em anel e do hexâmero mediado por c-di-GMP. A mutação I³⁷⁴E interfere a formação dos anéis hexaméricos, típicos de bEBPs, que FleQ apresenta no seu estado apo, quando em complexo com ATPγS e ADP, as mutações R¹⁸⁵E, N¹⁸⁶A, E³³⁰A e R³³⁴E afetam o sítio de ligação de c-di-GMP e, por fim, os mutantes T¹⁴⁹E e V³⁸⁰E, desestabilizaram o hexâmero mediado por c-di-GMP, por estarem localizados nas interfaces D1/D2 e D2/D2, respectivamente (Figura 23B). A Figura 25, mostra um diagrama indicando as posições dessas mutações nos hexâmeros e os seus efeitos esperados na oligomerização e atividade de FleQ.

Figura 25 - Diagrama das mutações de PA FleQ. Mutações pontuais foram conduzidas a fim de estudar o impacto da oligomerização na atividade da proteína. Entre parênteses, está indicado o comportamento esperado para as mutações: indiferente (=), aumento (↑) ou diminuição (↓). Os números em vermelho indicam a localização das mutações no hexâmero em anel de FleQ ou no mediado por c-di-GMP.

Experimentos de *cross linking* também foram realizados com os mutantes acima mencionados, na presença de c-di-GMP e ATP γ S (Figura 26A). Assim como a proteína nativa, os mutantes de FleQ não apresentaram nenhuma mudança no equilíbrio entre dímeros, tetrâmeros e hexâmeros com o aumento da concentração de ATP γ S (Figura 26B). O mutante I³⁷⁴E manteve sua capacidade de interagir com c-di-GMP e teve a formação de hexâmeros prejudicada, conforme o esperado, por ser um resíduo localizado na interface dos protômeros do anel. Aparentemente, os mutantes R¹⁸⁵E, V³⁸⁰E e T¹⁴⁹E são insensíveis à presença de c-di-GMP, mantendo a oligomerização da FleQ nativa (Figura 26C). Por outro lado, as mutações T¹⁴⁹E e V³⁸⁰E, baseadas no hexâmero de FleQ ligado à c-di-GMP e com o intuito de afetar as interfaces D1/D2 e D2/D2, respectivamente, acarretaram em um efeito positivo na estabilidade do anel hexamérico, confirmando a relevância biológica desse oligômero formado por um dímero de trímeros e estabilizado por c-di-GMP.

Figura 26 - Experimentos de “cross linking” de diferentes mutantes de PA FleQ. O número em vermelho, indica a região afetada pela mutação, de acordo com o diagrama da figura 29. A) Análise de oligomerização dos mutantes de PA FleQ. B) Efeito de diferentes concentrações de ATP γ S no equilíbrio das diferentes populações oligoméricas. C) Impacto de ATP γ S e c-di-GMP na oligomerização de FleQ.

Fonte: Adaptada de MATSUYAMA et al.⁹⁰

Normalmente, bEBPs são encontradas em sua forma dimérica inativa e mediante sua ativação, seja pela interação com outra proteína, pela fosforilação do domínio REC ou mesmo pela interação com ATP, elas sofrem um deslocamento no equilíbrio para sua forma de anel hexamérico ativo. Contudo, como FleQ é majoritariamente dimérica em solução, foi proposto que essa seria sua conformação cataliticamente ativa. Dessa forma, para verificar o efeito da oligomerização de FleQ em sua atividade ATPase, a velocidade inicial de hidrólise do ATP foi medida, para os diferentes mutantes, com o kit *EnzChek Phosphate Assay*. Para confirmar que as mutações não acarretaram alterações no enovelamento de FleQ nativa, e nem na sua estabilidade térmica, foram realizados experimentos de dicroísmo circular com todos os mutantes (Figura 27).

Figura 27 - Espectros de dicroísmo circular de FleQ e seus mutantes. A) Varredura do espectro entre 200 e 260nm, a temperatura ambiente. B) Desnaturação térmica de FleQ e seus mutantes, com acompanhamento da intensidade do espectro em 222nm ao longo da variação de temperatura entre 10 e 90°C. WT indica a PA FleQ nativa.

Fonte: Adaptada de MATSUYAMA et al.⁹⁰

Nota-se que o anel hexamérico é essencial para a atividade ATPase de FleQ, uma vez que o mutante I³⁷⁴E teve uma drástica redução na taxa de hidrólise do ATP, indicando que, ao contrário do que se suspeitava, essa seria a conformação ativa da proteína (Figura 28A). Anteriormente, acreditava-se que c-di-GMP e ATP competiam pelo mesmo sítio de ligação no *walker* A, pelo fato da mutação da K¹⁸⁰ tornar FleQ incapaz de se ligar à c-di-GMP. Através das estruturas cristalográficas apresentadas neste trabalho, foi verificado que K¹⁸⁰ ocupa uma posição privilegiada entre o SD1 e

o SD2, e, por isso, afetaria as interações envolvidas na ligação de ambos os nucleotídeos. Através dos ensaios de atividade ATPase, foi verificado mais uma vez esse acoplamento entre os sítios de ligação à ATP e à c-di-GMP, dado que mutações nas R¹⁸⁵ e R³³⁴ tornaram FleQ incapaz de reconhecer tanto c-di-GMP quanto ATP (Figura 28A). Análise estrutural das argininas R¹⁸⁵ e R³³⁴ indicam que elas estão envolvidas na coordenação de ambos os nucleotídeos. R¹⁸⁵ faz uma interação iônica com E¹⁸¹ do *walker* A, responsável pela ligação do ATP, enquanto que a R³³⁴ está em contato direto com a ribose do ATP, ao mesmo tempo que estabiliza a extremidade N-terminal do domínio AAA, através de interações com a R¹⁴⁴. Os mutantes V³⁸⁰E e T¹⁴⁹E apresentaram um aumento considerável na velocidade de hidrólise do ATP, cerca de 1,5x e 7,5x maior do que a proteína nativa, respectivamente; provavelmente por terem estabilizado o anel hexamérico ativo de FleQ. Em seguida, foi estudado o efeito do c-di-GMP na atividade ATPase de FleQ nativa e com as mutações únicas V³⁸⁰E e T¹⁴⁹E, verificou-se uma leve diminuição na sensibilidade por c-di-GMP no primeiro mutante enquanto que o segundo não teve nenhuma alteração na sua alta atividade ATPase (Figura 28B).

Figura 28 - Ensaios de atividade de PA FleQ e seus mutantes. A) Velocidade inicial de hidrólise de ATP por PA FleQ e seus variantes, expressas como percentual em relação à proteína nativa. B) Efeito do c-di-GMP na atividade ATPase de FleQ e seus mutantes. Os valores estão apresentados como percentual da velocidade inicial das proteínas sem incubação com c-di-GMP. C) Experimentos de ITC, com titulação de c-di-GMP em FleQ e nos mutantes das interfaces oligoméricas, I³⁷⁴E e T¹⁴⁹E.

Para avaliar o impacto dos dois diferentes hexâmeros de FleQ na ligação de c-di-GMP, foram realizados experimentos de ITC com titulação do ligante na FleQ nativa e nos mutantes I³⁷⁴E e T¹⁴⁹E, os quais afetam a formação do anel hexamérico e da interface SD1/SD2 do dímero de trímeros, respectivamente. O calor de reação liberado durante a titulação revela que ambas as mutações afetaram negativamente na interação entre FleQ e c-di-GMP, com uma mudança de estequiometria para $n=1$ e alterações nos valores da constante de dissociação, K_d , principalmente para T¹⁴⁹E (Figura 28C). Os resultados apresentados nessa seção colaboram para demonstrar a importância biológica do hexâmero mediado por c-di-GMP, e demonstram que a oligomerização de FleQ, possui um papel essencial para a sua atividade, como já havia sido apontado inicialmente, com estudos que demonstraram que a dimerização pelo domínio REC de FleQ era essencial para a função da proteína.⁷⁰

4.2.6 Oligomerização de FleQ na sua forma de anéis hexaméricos é essencial para repressão do operon *pel*

Em colaboração, a Prof^a. Dr^a. Caroline S. Harwood e a Dr^a. Claudine Baraquet, da Universidade de Washington (Seattle, EUA), realizaram experimentos de PCR em tempo real (RT-PCR) para verificar o impacto dos diferentes mutantes na regulação do operon *pel* *in vivo*.

Até o momento, o que se sabe do mecanismo de regulação do operon *pel* é que FleQ interage em dois sítios distintos, um ativador e outro repressor, chamados respectivamente *box* 1 e *box* 2, separados por 34 pares de bases na região do promotor *pelA*. FleN se liga à FleQ, e o complexo FleQ:FleN na presença de ATP promove uma dobra do DNA na região entre os dois *box* reprimindo a expressão desse operon. Na presença de c-di-GMP, a interação entre FleQ e o *box* 2 é aliviada, e consequentemente a dobra do DNA é desfeita, fazendo com que FleQ permaneça ligada ao sítio ativador, *box* 1, e deixe de ser um repressor e assuma um papel ativador do operon *pel* (Figura 8).⁶⁸

Os experimentos de RT-PCR foram realizados com linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* com deleção na região codificante de FleN, para assegurar que os efeitos observados na atividade de FleQ estariam apenas

associados ao papel direto da proteína na regulação do operon *pel*, independente da presença de ATP (Figura 29). Também foi induzido, nas cepas utilizadas, um cenário com alta concentração de c-di-GMP. Isso foi realizado através da co-expressão de uma diguanilato ciclase ativa YfiN/TpbB/PA1120, a qual aumentou os níveis internos de c-di-GMP.⁹⁷ Conforme esperado, para a proteína nativa foi observado que altos níveis de c-di-GMP fazem com que FleQ deixe de ser um repressor, para ser um ativador da expressão do operon *pel*. Os mutantes R¹⁸⁵E, N¹⁸⁶A, E³³⁰A e R³³⁴E mostraram uma insensibilidade quanto à presença de c-di-GMP, em sua atividade, o que era de se esperar, uma vez que essas mutações afetam o sítio de interação de FleQ com o nucleotídeo. O mesmo foi observado para o mutante T¹⁴⁹E, localizado na interface do dímero de trímeros. Em contrapartida, V³⁸⁰E assim como no ensaio ATPase, demonstrou uma pequena sensibilidade por c-di-GMP e apresentou um aumento nos transcritos do operon *pel*. Curiosamente, o mutante I³⁷⁴E, que possui a formação dos anéis hexaméricos prejudicada, apresentou constitutivamente uma alta taxa de expressão do operon *pel*, independentemente da presença de c-di-GMP, o que nos leva a crer que a oligomerização em anel de FleQ é essencial para sua repressão da transcrição do operon *pel*.

Figura 29 - Ensaio de RT-PCR para medição da taxa de transcrição do operon *pel*, de FleQ e seus diferentes mutantes. Os experimentos foram realizados em cepas deletadas de *fleN*. Os experimentos foram conduzidos em cepas com baixos (em cinza) e altos (azul) índices de c-di-GMP. Os números em vermelho indicam a localização dos resíduos mutados de acordo com o diagrama da figura 29. Os resultados foram normalizados em relação a atividade de FleQ nativa em ausência de c-di-GMP.

Fonte: Adaptada de MATSUYAMA et al.⁹⁰

Com base nos resultados obtidos é proposto um novo mecanismo de regulação do operon *pel* (Figura 30). O hexâmero em anel de FleQ se liga aos *boxes* 1 e 2 no promotor *pelA*, o que causa uma leve curvatura do DNA entre essas duas regiões que impede sua transcrição. A interação de FleQ com FleN ligada à ATP teria um efeito de acentuar essa curvatura, assim como aumentar a sensibilidade de FleQ por c-di-GMP, conforme descrito na literatura.⁶⁸⁻⁶⁹ A interação de FleQ com c-di-GMP causaria uma mudança na estrutura quaternária da proteína, diminuindo a afinidade pelo *box* 2, o que aliviaria a dobra do DNA e faria com que FleQ assumisse um papel de ativador da transcrição. Em nosso modelo, e com base nas estruturas obtidas, os *loops* 1 e 2 de interação com o fator σ^{54} não sofrem mudança conformacional e continuam acessíveis em ambos os hexâmeros, o que sugere um mecanismo distinto das bEBPs convencionais na regulação do *pel*.

Figura 30 - Mecanismo de regulação do operon *pel*. FleQ, na sua forma em anel hexamérico se liga ao promotor *pel* nos *boxes* 1 e 2, causando uma dobra do DNA entre essas duas regiões e reprimindo sua transcrição. A ligação de c-di-GMP promove uma mudança na oligomerização de FleQ, liberando o *box* 2, e que consequentemente, permite a transcrição do operon.

Fonte: Adaptada de MATSUYAMA et al.⁹⁰

4.3 Mecanismos regulatórios da atividade de FleQ

Normalmente, o controle da atividade das bEBPs se baseiam em mecanismos que regulam o acesso do ATP ao sítio ativo, afetam na oligomerização do domínio AAA+ essencial para sua atividade ou, até mesmo, que atuem na interação entre o motivo GAFTGA e o fator σ^{54} .^{54, 57} Apesar de ter sido apresentado um modelo para a regulação do operon *pel* dependente da oligomerização de FleQ, algumas questões

permanecem em aberto, como por exemplo, o papel do domínio REC de FleQ na regulação da mesma e como FleN controla a atividade de FleQ. Nessa seção serão apresentados estudos preliminares que buscam responder essas questões em aberto. Primeiro será apresentada a estrutura obtida do domínio REC de FleQ e como ele se diferencia dos domínios regulatórios das bEBPs convencionais. Em seguida, estudos da interação entre FleQ e FleN mostram a importância da formação desse complexo para o mecanismo de regulação proposto para FleQ. Por fim, será feita uma análise mais minuciosa a respeito do posicionamento do motivo GAFTGA nas diferentes estruturas obtidas do domínio AAA+, e como isso estaria relacionado com a capacidade da proteína em interagir com o fator σ^{54} para regular a formação do flagelo.

4.3.1 Domínio REC de FleQ é estruturalmente semelhante a domínios reguladores de resposta, mas funcionalmente diferente

A estrutura de XAC FleQ^{REC}, correspondente ao domínio REC, possui 5 fitas beta e 5 hélices alfa com um enovelamento α/β , e uma folha β central com topologia 21345, sendo que entre a fita β_3 e β_2 assim como entre as hélices α_3 e α_2 não há nenhum outro elemento de estrutura secundária (Figura 31A). Su e colaboradores publicaram recentemente a estrutura desse domínio de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, PDB = 4WXM.⁷⁰ A sobreposição das duas estruturas indica um rmsd de 2,7Å, principalmente devido a diferenças no posicionamento das hélices 2, 3 e 4 (Figura 31B).

Figura 31 - Estrutura de XAC FleQ^{REC}. A) Estrutura do domínio FleQ de *Xanthomonas citri*. B) Alinhamento estrutural entre XAC FleQ^{REC} (verde) e PAO1 FleQ^{REC} (rosa), com um rmsd de 2,3Å. Em (B), a numeração com asterisco é referente a PAO1 FleQ.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Apesar da baixa identidade sequencial, o alinhamento estrutural de XAC FleQ^{REC}, realizado pelo servidor DALI⁹⁸, indica que esse enovelamento é semelhante à dos domínios REC de receptores de resposta dos sistemas de sinalização de dois componentes (TCS), os principais resultados estão descritos tabela 14.

Tabela 14 – Alinhamento estrutural da XAC FleQ^{REC} realizado pelo servidor DALI. Descrições dos melhores alinhamentos. O Z-score por volta de 13,0 indica que a XAC FleQ^{REC} é provavelmente homóloga dos domínios receptores de resposta TCS.

PDB	Z-score	rmsd	lali	nres	%id	Descrição
1WXM-E	13,8	2,7	117	126	23	Regulador transcricional FleQ PAO1
3JTE-A	13,1	2,6	117	126	13	Receptor de regulador de resposta
3EQ2-B	13,1	2,4	115	372	18	Provável regulador de resposta TCS
3VIO-A	13,0	2,6	118	198	12	Regulador de resposta
3DQF-C	13,0	2,6	111	120	12	Regulador de resposta
3CRN-A	12,9	2,5	113	129	12	Domínio receptor de regulador de resposta, CHEY-
1ZY2-A	11,5	2,8	114	140	12	Regulador transcricional NTRC1

Fonte: Elaborada pelo autor.

No mecanismo TCS, os sinais são recebidos via um receptor histidina quinase que fosforila um resíduo de ácido aspártico do domínio fosfoceptor, REC, das proteínas reguladoras de resposta (RR). Os domínios REC apresentam uma topologia ($\beta\alpha$)₅, com uma folha beta central intercalada por duas hélices alfa de um lado e três no outro. O domínio REC apresenta uma arquitetura semelhante, contudo com enovelamento α/β (Figura 32A). Devido a diferente topologia de XAC FleQ^{REC}, o posicionamento da hélice α 2 impede o acesso à extremidade β 3, onde ocorre a fosforilação de um aspartato nos domínios reguladores de resposta (Figura 32A).

Os domínios REC também possuem vários resíduos bastante conservados: Asp 7 e Asp 8 responsáveis por coordenar o íon metálico, enquanto que o sítio de fosforilação é composto por Asp 51 e Thr/Ser 79 seguido por um resíduo pequeno (glicina ou alanina), que permite acesso ao sítio e por fim, a Lys/Phe 98 e a Lys 101, importantes para as mudanças conformacionais mediadas pela fosforilação (Figura 32B).⁹⁹ Contudo, os domínios FleQ não apresentam esses resíduos conservados e nem uma histidina quinase associada. Dessa forma, a XAC FleQ^{REC} é incapaz de

ser fosforilada e deve possuir um mecanismo de regulação distinto dos demais domínios REC.

Figura 32 - Diferenças entre FleQ^{REC} e domínios REC usuais. A) Sobreposição estrutural dos distintos domínios REC. Em destaque os principais resíduos envolvidos na fosforilação dos domínios REC convencionais (roxo) e os resíduos equivalentes no REC de FleQ (laranja). B) Conservação dos resíduos do domínio REC de FleQ e dos domínios REC usuais. Em roxo são os principais resíduos envolvidos na coordenação do Mg²⁺ e do fosfato, e em ativar a mudança conformacional mediada pela fosforilação, enquanto que em laranja são os resíduos correspondentes do domínio REC de FleQ. Sequências representativas de cada domínio estão indicadas abaixo do logo: *Xanthomonas citri* (XAC) FleQ, *Pseudomonas aeruginosa* (PA) FleQ, *Vibrio cholerae* (VC) FlrA, *Aquifex aeolicus* (AA) NtrC1 e *Geobacter sulfurreducens* (GS) NtrC. FlrA é o homólogo de FleQ em VC e também foi identificado como um receptor de c-di-GMP.

Fonte: Elaborada pelo autor.

No banco de dados do Pfam, constam 224 sequências pertencentes à família FleQ (PF06490); o alinhamento múltiplo dessas sequências gerou um score que foi utilizado pelo programa ConSurf para identificar regiões funcionais da proteína.¹⁰⁰⁻

¹⁰¹ De forma análoga, foi feito o mesmo para a família dos receptores de resposta (PF00072) e a estrutura da NtrC1 de *Aquifex aeolicus* (PDB: 1XY2) foi utilizada como molde. Esses alinhamentos possibilitaram a identificação de uma região conservada dos domínios REC, correspondente a extremidade das fitas betas centrais onde ocorre a fosforilação (Figura 33A), entretanto no caso da XAC FleQ foi verificado uma região de conservação distinta, na interface das hélices $\alpha 1$ - $\alpha 5$.

FleQ pertence à família de bEBP das NtrC,⁶⁶ na qual a fosforilação promove mudança conformacional do regulador de resposta para controlar a transcrição,¹⁰² contudo, FleQ não apresenta o sítio de fosforilação como foi constatado anteriormente. Os domínios reguladores de resposta NtrC costumam formar dímeros, no seu estado inativo, pela interface $\alpha 4$ - $\beta 5$ - $\alpha 5$.¹⁰³ Essa região é a que apresenta maior perturbação conformacional induzida pela fosforilação, de forma que se torna bastante utilizada pelos reguladores de resposta para interação com outras proteínas ou para formar oligômeros (Figura 33B).¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ Contudo, no caso de XAC FleQ^{REC}, a estrutura cristalográfica possuía duas moléculas na unidade assimétrica e análises pelo PISA server⁹⁵ indicaram uma possível região de oligomerização distinta, na interface hidrofóbica $\alpha 1$ - $\alpha 5$, com uma área de 440Å² e uma energia de solvatação de -6,8 kcal/mol (Figura 33C).

Figura 33 - FleQ^{REC} forma dímeros distintos dos observados em NtrC. A) Mapeamento da conservação dos resíduos dos domínios REC e FleQ nas superfícies de NtrC e XAC FleQ, respectivamente. B) Dímero de NtrC1 mediado pela interface $\alpha 4-\beta 5-\alpha 5$. C) Dímero de FleQ^{REC}, com formação de uma interface hidrofóbica, $\alpha 1-\alpha 5$. Destaque dos principais resíduos que formam esse núcleo hidrofóbico entre os dois protômeros.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Su et al, 2015 observaram que o domínio REC de PA FleQ é essencial para ativar a transcrição dos genes flagelares e para regular a expressão dos genes de formação da matrix exopolissacarídica. Além disso, eles também mostraram que mutações que inibiam a oligomerização desse domínio também afetavam a atividade da proteína, o que os levou a concluir que o estado oligomérico de FleQ deve desempenhar um papel importante em sua função.⁷⁰

Estudos anteriores propõe que a forma ativa de FleQ é a dimérica, contudo observamos que o hexâmero é a forma biologicamente competente. FleQ é uma bEBP dependente do fator σ^{54} e essas proteínas tendem a formar um anel hexamérico, o qual promove a hidrólise de ATP para gerar energia necessária para remodelar o complexo DNA-RNAP- σ^{54} para sua forma aberta, possibilitando a transcrição. Dessa forma, experimentos realizados por Su et al., 2015, no qual mutantes incapazes de formar dímeros pelo domínio REC tiveram uma menor

atividade poderiam estar associados à desestruturação do hexâmero, ao contrário do que se pensava.⁷⁰ Nesse contexto, o domínio REC de FleQ seria importante para estabilizar o hexâmero. Anteriormente, mostramos que o c-di-GMP promove um rearranjo do domínio REC de FleQ que desestrutura o hexâmero em prol da formação do dímero de trímeros mediado pelo nucleotídeo. Contudo, análises por SDS-PAGE dos experimentos de *cross linking* não permitiram observar nenhuma banda que pudesse ser referente a esse dímero de trímeros, o que levanta a hipótese de que é necessário algum fator que estabilize esse arranjo. Um possível candidato é FleN que regula a atividade de FleQ, e pode ser responsável por estabilizar esse deslocamento do domínio REC, promovido pela ligação de c-di-GMP no domínio AAA+ central.

4.3.2 FleN é essencial para estabilizar os oligômeros mediados por c-di-GMP

FleN é uma ATPase fraca com um *walker* A variante, e é antagonista de FleQ, controlando a atividade de FleQ na regulação da expressão dos genes flagelares e assegurando um fenótipo monoflagelar em *Pseudomonas aeruginosa*.⁶⁷ FleN, por não possuir nenhum motivo de interação com o DNA, se liga indiretamente ao promotor através de sua interação com FleQ, que tem sua própria atividade ATPase inibida pela formação do complexo.⁶⁸⁻⁶⁹ Apesar da interação FleQ:FleN ser independente da presença tanto de ATP quanto de c-di-GMP, sabe-se que esses cofatores possuem um papel importante no mecanismo de regulação da atividade de FleQ.⁶⁹

De forma a verificar a hipótese de que FleN é crítico para estabilizar o hexâmero mediado por c-di-GMP, foram feitos ensaios de *cross linking* químico para avaliar os efeitos da ligação de FleN em diferentes construções de FleQ e na presença de seus cofatores.

Os ensaios de oligomerização sugerem que FleN é capaz de se oligomerizar espontaneamente em solução para suas formas dimérica e tetramérica (Figura 34A), além formar o hetero-oligômero FleQ^{REC}:FleN, o qual é indiferente à presença de ATPγS (Figura 34B). Curiosamente, o domínio AAA+ isolado de FleQ também se mostrou capaz de interagir com FleN, como pode ser observado por um produto de alto peso molecular, apenas na presença de ATPγS, sendo que esse hetero-oligômero desaparece ao se adicionar c-di-GMP, provavelmente devido a mudanças conformacionais induzidas pelo mensageiro secundário (Figura 34C).

Figura 34 - Estudos de interação entre FleQ e FleN por “cross linking” químico. A) FleN (30kDa) forma uma pequena população dimérica e tetramérica em solução, independente da presença de ATPγS. B) FleN pode ser capaz de interagir com FleQ^{REC} (16kDa), indicado pela banda (i). C) Interação entre FleN e FleQ^{AAA} (29kDa). Na presença de ATPγS, há formação de bandas adicionais indicadas por (i) que podem ser correspondentes a um hetero-oligômero FleN:FleQ^{AAA}, o qual é dissociado com adição de c-di-GMP. D) Interação entre FleN e FleQ nativa (55kDa). Acredita-se que a banda indicada por (i) seja referente ao dímero de trimeros mediado por c-di-GMP de FleQ, estabilizado por sua interação com FleN, enquanto que (ii) corresponderia apenas ao trímero. As bandas indicadas em (iii) podem ser devido a formação de hetero-oligômeros menores entre as duas proteínas. As letras M, D, Tr, Te e H, na figura, indicam monômero, dímero, trímero, tetrâmero e hexâmero, respectivamente. Além disso as letras em azul correspondem ao oligômero apresentado por FleN enquanto que, em marrom, se trataria da construção de FleQ.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Experimentos com a FleQ nativa mostram a formação de complexos de alto peso molecular, como a formação do anel hexamérico de FleQ (aproximadamente 330 kDa) e o complexo FleQ-FleN, que é favorecido pela interação independente de ATP, FleQ^{REC}:FleN. A adição de c-di-GMP no sistema levou ao surgimento de um novo padrão de *cross linking*, no qual é possível verificar que a interação FleQ:FleN

persiste mesmo após a dissociação do anel hexamérico promovido pelo c-di-GMP. Especificamente, destaca-se na figura 34D, nas colunas 5 e 6, uma banda que é consistente com a formação do hetero trímero de FleQ:FleN (na proporção 3:3), o que suporta a estrutura do dímero de trímeros de FleQ mediado por c-di-GMP. Por fim, observa-se que a adição de c-di-GMP e ATPγS, favorece a formação de uma banda adicional de alto peso molecular (acima de 245kDa) que pode estar associada ao dímero de trímeros do complexo FleQ:FleN. (na proporção 6:6).

Dessa forma, pôde ser constatado que FleN interage com os domínios REC e AAA+ central de FleQ, e é essencial para estabilizar o dímero de trímeros, e apesar do ATP não afetar a oligomerização de FleQ ou FleN isoladamente, ele tem um papel importante na estrutura quaternária do complexo FleQ:FleN. Como os ensaios de *cross linking* realizados se baseiam em ligar covalentemente as aminas primárias (encontradas no resíduo N-terminal e nas cadeias laterais de resíduos de lisinas) que estejam a uma distância de até 16Å, pode ser que a ligação do ATP no complexo FleQ:FleN cause uma compactação de sua estrutura e aproxime regiões, antes distantes na estrutura sem o ligante, permitindo que o agente de *cross linking* interaja nesses resíduos. Se a ligação entre FleQ e FleN for mais forte na presença de ATP, teríamos que o nucleotídeo promoveria um aumento na constante de afinidade entre as duas proteínas.

Para verificar essa hipótese foram feitos ensaios de termoforese em microescala, para acompanhar a formação do complexo FleQ:FleN na presença e ausência de ATP (Figura 35). Mantendo a concentração fixa de FleN marcada com uma sonda específica, a proteína foi incubada com uma diluição seriada de FleQ, e a partir do coeficiente de Soret, pôde-se obter os valores de $3,8 \pm 0,5 \mu\text{M}$ e $18,9 \pm 0,6 \mu\text{M}$ para as constantes de dissociação na presença e ausência de ATP, respectivamente. Logo, o ATP aumenta a afinidade entre as duas proteínas.

Figura 35 – Termoforese em microescala da interação entre FleN e FleQ na ausência (em vermelho) e na presença (em preto) de ATP indicam constantes de dissociação de $3,8 \pm 0,5 \mu\text{M}$ e $18,9 \pm 0,6 \mu\text{M}$, respectivamente.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3.3 Hidrólise de ATP não promove rearranjo do GAFTGA

A sobreposição das estruturas de FleQ^{AAA} em seu estado apo, e em complexo com ADP e ATPγS, indicam que não há deslocamento do *loop* 1, G²²¹AFTGA, e do *loop* 2 entre as diferentes estruturas, o que é um resultado interessante e será abordado nesse tópico (Figura 36A).

Na estrutura ligada ao ATPγS, o fosfato γ é detectado pelo *walker* B, através dos resíduos D²⁴⁵ e E²⁴⁶, os quais por sua vez interagem com a N²⁰² na extremidade da fita β7. Os resíduos E²⁴⁶, N²⁰² e T²⁸⁶ correspondem ao glutamato *switch*, responsável por acoplar a hidrólise de ATP com a ativação do complexo RNAP-σ⁵⁴.⁵⁷

Figura 36 – Sobreposição estrutural do domínio AAA+ de FleQ ligado à ATP γ S, ADP e em seu estado apo. A) Em destaque, os loops 1 e 2, responsáveis pela interação com o fator σ^{54} . B) Comparação do glutamato switch de FleQ e de PspF, (C) e do R finger de FleQ e NtrC1.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Análises das estruturas dos domínios AAA+ das bEBPs, PspF e NtrC1, durante a hidrólise do ATP, revelam algumas características do mecanismo do glutamato *switch* e do R *finger*. No caso da PspF, a ligação de ATP é detectada pelo *walker* B, pois D¹⁰⁷ e E¹⁰⁸ interagem, respectivamente, com o fosfato γ e N⁶⁴. Durante a hidrólise de ATP, o resíduo D¹⁰⁷ coordena uma molécula de água que irá fazer um ataque nucleofílico no fosfato γ , causando uma rotação de 90° no E¹⁰⁸, que passa a interagir com a T¹⁴⁸ através de uma molécula de água, ao invés da N⁶⁴.⁵⁷ Essa mudança conformacional é propagada através do posicionamento da arginina do glutamato *switch* para o *loop* 1, que contém o motivo conservado GAFTGA para o reconhecimento do fator σ ⁵⁴, e o *loop* 2, que irá mediar essa interação.⁹⁸ No caso de FleQ, essa mudança é mais acentuada. A hidrólise de ATP promove uma rotação de 180° na E²⁴⁶, para que esta interaja diretamente com T²⁸⁶ e H²⁸⁷, sendo esse resíduo de histidina conservado especificamente entre bEBPs homólogas de FleQ. Curiosamente, após a hidrólise de ATP por FleQ, N²⁰² substitui a interação com D²⁴⁵ pelo resíduo seguinte do *walker* B, E²⁴⁶, compensando uma interação que deixa de ser observada para a N⁶⁴ de PspF (Figura 36B). Uma vez que, no caso de FleQ, a hidrólise de ATP não promove o reposicionamento da asparagina do glutamato *switch*, pode ser uma evidência que suporte a conformação dos *loops* 1 e 2 não terem sido alteradas com a hidrólise do ATP.

Outro mecanismo pelo qual as bEBPs detectam a hidrólise do ATP é pelo R *finger*. Como por exemplo, em NtrC1 o resíduo R²⁹⁹ do protômero adjacente, altamente conservado, entra em contato com o fosfato γ do ATP. A hidrólise do nucleotídeo provoca um rearranjo das interações do protômeros, no qual o resíduo R²⁹⁹ pertence, e leva a um reposicionamento dos *loops* 1 e 2.⁵⁷ Contudo em FleQ, só se observa interações em cis com o ATP, sendo que R³⁰⁰ do R *finger* auxilia a manter fixa a asparagina N²⁰² do glutamato *switch* após a hidrólise de ATP (Figura 24C). Esses resultados levam a hipótese de que a hidrólise de ATP não seja essencial para o rearranjo dos *loops* 1 e 2, e consequentemente para regular a acessibilidade do motivo GAFTGA para a interação entre FleQ e o fator σ ⁵⁴. Dessa forma, é possível que haja outro fator que controle a formação do complexo FleQ:fator σ ⁵⁴, o que pode estar relacionado à compactação do complexo FleQ:FleN observado na presença de ATP.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Usualmente, bEBPs da família das AAA+ são dependentes do fator σ^{54} e regulam a transcrição gênica em um processo dependente da hidrólise do ATP, que fornece a energia necessária para remodelar o complexo da RNA polimerase para sua conformação ativa. Até o momento foram identificadas poucas proteínas que possuem arquitetura semelhante às bEBPs tradicionais, mas que utilizam o fator σ^{70} ao invés de σ^{54} , como por exemplo, PhhR de *Pseudomonas putida*, TyrR de *Escherichia coli*, HupR de *Rhodobacter capsulatus* e HsfA de *Myxococcus xanthus*.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹

FleQ, de *Pseudomonas aeruginosa*, é um fator de transcrição versátil, regulando a transcrição dos genes flagelares através de um mecanismo semelhante às bEBPs usuais e dependente do fator σ^{54} , e ao mesmo tempo regula a transcrição do operon *pel* através do fator σ^{70} . Além disso, c-di-GMP possui um papel interessante na atividade de FleQ, sendo responsável por uma leve repressão indireta dos genes flagelares e por fazer com que FleQ deixe de ser um repressor, para ser um ativador da transcrição do operon *pel*. Todas essas características, levam FleQ a ser um importante alvo de estudo, não só pela proteína possuir um motivo de interação com c-di-GMP desconhecido, mas também por se tratar de uma proteína que possui atividade semelhante tanto às bEBPs canônicas quanto as não usuais.

Os estudos descritos nessa tese tinham como objetivo elucidar o mecanismo de regulação do operon *pel* e sua dependência com c-di-GMP. Foram obtidas estruturas cristalográficas do domínio REC e do domínio AAA+ central de FleQ, sendo esse último resolvido em seu estado apo e ligados à ADP e ATPγS. Comparação do glutamato *switch* e do R *finger* das estruturas obtidas com outras descritas na literatura, indicam que possivelmente a hidrólise de ATP não é essencial para a interação entre FleQ e o fator σ^{54} , uma vez que não há deslocamento dos *loops* 1 e 2, os quais estão constitutivamente acessíveis. Esses resultados aliados à estrutura do domínio AAA+ em complexo com c-di-GMP, previamente resolvida pelo Prof. Dr. Marcos V.A.S. Navarro, permitiu observar um grande rearranjo conformacional na oligomerização de FleQ. Além da identificação

de um motivo de ligação com c-di-GMP nos domínios AAA+, também foi observado que a ligação de c-di-GMP promove a quebra dos anéis hexaméricos, típicos de bEBPs, que FleQ assume em seu estado nativo, para um hexâmero constituído por um dímero de trímeros estabilizados por c-di-GMP. Esse processo também resulta na ocupação parcial do sítio de ligação à ATP, culminando em uma leve diminuição na atividade ATPase da proteína, e consequentemente na sua capacidade de regular a transcrição de genes flagelares. Além disso, também foi observado um acoplamento entre os sítios de ligação à ATP e c-di-GMP, uma vez que mutações em um dos sítios afetam a capacidade da proteína interagir com o outro nucleotídeo; isso poderia constituir em um mecanismo para rápida detecção e identificação do ligante.

Estrutura do domínio REC de FleQ, aliada a experimentos de *cross linking* químico, indicam que ele é essencial para oligomerização da proteína, e apesar de não possuir o sítio de fosforilação conservado, típico dos domínios REC, sua regulação deve ser através da interação com FleN. Em solução, FleQ assume diferentes populações oligoméricas, como dímeros, tetrâmeros e hexâmeros. Pelo fato de FleQ formar majoritariamente dímeros em solução, acreditava-se que essa seria sua forma ativa, contudo, neste trabalho foi identificado que sua forma ativa é o anel hexamérico, o qual se mostrou essencial para repressão da transcrição do operon *pel*, e para a atividade ATPase da proteína. Também foi observado que mutações no dímero de trímeros tornaram FleQ insensível à presença de c-di-GMP e causaram um aumento na capacidade de hidrólise de ATP da proteína. Por fim, foram realizados experimentos de ITC com titulação de c-di-GMP em FleQ e nos mutantes I³⁷⁴E e T¹⁴⁹E, os quais afetam a formação do anel hexamérico e do dímero de trímeros, respectivamente, e foi observado que ambos os mutantes tiveram sua interação com o nucleotídeo prejudicada em relação à proteína nativa, demonstrando a importância dos diferentes oligômeros de FleQ em sua atividade. Por fim, ensaios de interação entre FleQ e FleN mostram que a FleN é essencial para estabilizar os diferentes oligômeros de FleQ, e que apesar de ATP não ser necessário para a interação, ele aumenta a afinidade entre as duas proteínas.

Com base nos resultados obtidos e estudos descritos na literatura, é proposto um novo mecanismo para a atividade de FleQ na regulação tanto dos genes flagelares quanto na regulação do operon *pel*, e que leva em consideração o papel

de FleN nesse processo (Figura 37). FleQ se liga ao promotor do *pel* e do flagelo na sua forma hexamérica, e interage com FleN. Devido à presença de ATP, há um aumento na afinidade entre FleQ e FleN, fazendo com que haja um maior empacotamento do complexo e oculte o GAFTGA, de forma que nessa conformação FleQ é incapaz de promover tanto a síntese do flagelo quanto a formação do biofilme (Figura 37A). Como a atividade ATPase de FleN é baixa, na maior parte do tempo os loops 1 e 2 de FleQ permanecem inacessíveis, contudo, uma vez que o ATP é hidrolisado, a ligação entre FleQ e FleN é enfraquecida e o GAFTGA é exposto para interagir com o complexo RNAP- σ^{54} (Figura 37B). A formação do complexo FleQ:RNAP- σ^{54} possibilita a transcrição dos genes flagelares (Figura 37C) e uma vez que os níveis de ATP são restaurados, FleN volta a se ligar ao ATP, restaurando o estado inativo de FleQ. Por fim, a ligação de c-di-GMP promoveria o rearranjo estrutural do hetero-hexâmero FleQ:FleN para sua forma de dímero de trímeros, o que faria com que FleQ deixasse de ser um repressor para ser um ativador da expressão do operon *pel*.

Dessa forma, nosso modelo consegue aliar resultados descritos em trabalhos anteriores de FleQ com os obtidos nessa tese de forma coerente, além de descrever o papel de FleN na regulação de FleQ, o que até o momento pouco se sabia. Esses resultados permitiram uma melhor compreensão dos mecanismos não usuais de controle de fatores de transcrição dependentes não só do fator σ^{54} , como também do σ^{70} . Além da determinação de um novo motivo de interação com o c-di-GMP, também foram determinados os efeitos da ligação do nucleotídeo na oligomerização e atividade de FleQ e a proposição de que outras bEBPs também seriam reguladas por essa molécula.

Figura 37 – Mecanismo de atividade de FleQ regulado por FleN. A) Complexo FleQ:FleN ligado à ATP na sua forma incompetente para transcrição dos genes flagelares e do *pel*. B) FleN hidrolisa ATP e expõe o motivo GAFTGA para interação com a RNAP-σ⁵⁴ (C), permitindo que haja a transcrição dos genes flagelares. Em seguida, o ATP volta a se ligar em FleN e o complexo retorna ao seu estado inativo. D) A ligação de c-di-GMP no complexo FleQ:FleN, de forma que FleQ perde sua capacidade de reprimir a transcrição do operon *pel* e passe a ser um ativador.

Fonte: Elaborada pelo autor.

REFERÊNCIAS

- 1 COSTERTON, J. W.; GEESEY, G. G.; CHENG, K. J. How bacteria stick. **Scientific American**, v. 238, n. 1, p. 86-95, Jan. 1978. ISSN 0036-8733. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/635520> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

- 2 O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 49-79, 2000. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

- 3 O'TOOLE, G. A.; KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Molecular Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 295-304, 1998. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

- 4 ZIEBUHR, W. et al. A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. **Molecular Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 345-56, Apr. 1999. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10231490> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

- 5 LEE, S. F.; LI, Y. H.; BOWDEN, G. H. Detachment of *Streptococcus mutans* biofilm cells by an endogenous enzymatic activity. **Infection Immunity**, v. 64, n. 3, p. 1035-8, Mar. 1996. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8641755> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

- 6 BALCÁZAR, J. L.; SUBIRATS, J.; BORREGO, C. M. The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1216, 2015. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26583011> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

- 7 TESCHLER, J. K. et al. Living in the matrix: assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 255-68, May 2015. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25895940> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

- 8 HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 95-108, Feb. 2004. ISSN 1740-1526. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15040259> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

- 9 STEWART, P. S. A review of experimental measurements of effective diffusive permeabilities and effective diffusion coefficients in biofilms. **Biotechnology Bioengineering**, v. 59, n. 3, p. 261-72, Aug. 1998. ISSN 0006-3592. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10099336> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

- 10 GORDON, C. A.; HODGES, N. A.; MARRIOTT, C. Antibiotic interaction and diffusion through alginate and exopolysaccharide of cystic fibrosis-derived *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 22, n. 5, p. 667-74, Nov. 1988. ISSN 0305-7453. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3145268> >. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 11 HAUSNER, M.; WUERTZ, S. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3710-3, Aug. 1999. ISSN 0099-2240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10427070> >. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 12 PARSEK, M. R.; SINGH, P. K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, p. 677-701, 2003. ISSN 0066-4227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14527295> >. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 13 BROWN, M. R.; ALLISON, D. G.; GILBERT, P. Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 22, n. 6, p. 777-80, Dec. 1988. ISSN 0305-7453. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3072331> >. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 14 COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-22, May 1999. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10334980> >. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 15 PEYTON, B. M.; CHARACKLIS, W. G. Microbial biofilms and biofilm reactors. **Bioprocess Technology**, v. 20, p. 187-231, 1995. ISSN 0888-7470. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7765635> >. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 16 VAN HOUT, R.; MICHIELS, C. W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 4, p. 1117-31, Oct. 2010. ISSN 1365-2672. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20522145> >. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 17 SINGH, R.; PAUL, D.; JAIN, R. K. Biofilms: implications in bioremediation. **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 389-97, Sept. 2006. ISSN 0966-842X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16857359> >. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 18 RÖMLING, U.; GOMELSKY, M.; GALPERIN, M. Y. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. **Molecular Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 629-39, Aug. 2005. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16045609> >. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 19 RASHID, M. H. et al. Identification of genes involved in the switch between the smooth and rugose phenotypes of *Vibrio cholerae*. **FEMS Microbiology Letter**, v. 227, n. 1, p. 113-9, Oct. 2003. ISSN 0378-1097. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14568156> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

20 SIMM, R. et al. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. **Molecular Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 1123-34, Aug. 2004. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15306016> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

21 TISCHLER, A. D.; CAMILLI, A. Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. **Molecular Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 857-69, Aug. 2004. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15255898> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

22 MILLS, E. et al. The bacterial second messenger c-di-GMP: mechanisms of signalling. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 8, p. 1122-9, Aug. 2011. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21707905> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

23 CHRISTEN, M. et al. Asymmetrical distribution of the second messenger c-di-GMP upon bacterial cell division. **Science**, v. 328, n. 5983, p. 1295-7, June 2010. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20522779> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

24 RYJENKOV, D. A. et al. Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: insights into biochemistry of the GGDEF protein domain. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 5, p. 1792-8, Mar. 2005. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15716451> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

25 PAUL, R. et al. Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. **Genes & Development**, v. 18, n. 6, p. 715-27, Mar. 2004. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15075296> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

26 SCHMIDT, A. J.; RYJENKOV, D. A.; GOMELSKY, M. The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 14, p. 4774-81, July 2005. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15995192> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

27 CHRISTEN, M. et al. Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 35, p. 30829-37, Sept. 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15994307> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

28 RYAN, R. P. et al. Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 17, p. 6712-7, Apr. 2006. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16611728> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

29 GALPERIN, M. Y.; NIKOLSKAYA, A. N.; KOONIN, E. V. Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. **FEMS Microbiology Letter**, v. 203, n. 1, p. 11-21, Sept. 2001. ISSN 0378-1097. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11557134> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

30 KRASTEVA, P. V.; GIGLIO, K. M.; SONDERMANN, H. Sensing the messenger: the diverse ways that bacteria signal through c-di-GMP. **Protein Science**, v. 21, n. 7, p. 929-48, July 2012. ISSN 1469-896X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22593024> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

31 PAUL, R. et al. Activation of the diguanylate cyclase PleD by phosphorylation-mediated dimerization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 40, p. 29170-7, Oct. 2007. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17640875> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

32 RÖMLING, U.; GALPERIN, M. Y.; GOMELSKY, M. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 1, p. 1-52, Mar. 2013. ISSN 1098-5557. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23471616> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

33 CHAN, C. et al. Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 49, p. 17084-9, Dec. 2004. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15569936> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

34 WASSMANN, P. et al. Structure of BeF₃⁻-modified response regulator PleD: implications for diguanylate cyclase activation, catalysis, and feedback inhibition. **Structure**, v. 15, n. 8, p. 915-27, Aug. 2007. ISSN 0969-2126. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17697997> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

35 DE, N. et al. Determinants for the activation and autoinhibition of the diguanylate cyclase response regulator WspR. **Journal Molecular Biology**, v. 393, n. 3, p. 619-33, Oct. 2009. ISSN 1089-8638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19695263> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

36 ROSS, P. et al. An unusual guanyl oligonucleotide regulates cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. **FEBS Letters**, v. 186, n. 2, p. 191-6, July 1985. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19160595> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

37 GALPERIN, M. Y. et al. A specialized version of the HD hydrolase domain implicated in signal transduction. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 303-5, Nov. 1999. ISSN 1464-1801. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10943560> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

38 TARUTINA, M.; RYJENKOV, D. A.; GOMELSKY, M. An unorthodox bacteriophytochrome from *Rhodobacter sphaeroides* involved in turnover of the second messenger c-di-GMP. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 46, p. 34751-8, Nov. 2006. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16968704> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

39 JENAL, U.; MALONE, J. Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. **Annual Review of Genetics**, v. 40, p. 385-407, 2006. ISSN 0066-4197. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16895465> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

- 40 RYAN, R. P. et al. Cyclic di-GMP signaling in bacteria: recent advances and new puzzles. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 24, p. 8327-34, Dec. 2006. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17028282> >. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 41 HENGGE, R. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 263-73, Apr. 2009. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19287449> >. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 42 ZHANG, Z. et al. Polymorphism of the signaling molecule c-di-GMP. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 21, p. 7015-24, May 2006. ISSN 0002-7863. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16719482> >. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 43 RYJENKOV, D. A. et al. The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 41, p. 30310-4, Oct. 2006. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16920715> >. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 44 KO, J. et al. Structure of PP4397 reveals the molecular basis for different c-di-GMP binding modes by PilZ domain proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 398, n. 1, p. 97-110, Apr. 2010. ISSN 1089-8638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20226196> >. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 45 BENACH, J. et al. The structural basis of cyclic diguanylate signal transduction by PilZ domains. **EMBO Journal**, v. 26, n. 24, p. 5153-66, Dec. 2007. ISSN 1460-2075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18034161> >. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 46 LI, Z. et al. Structures of the PelD cyclic diguanylate effector involved in pellicle formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 36, p. 30191-204, Aug. 2012. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22810222> >. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 47 WHITNEY, J. C. et al. Structure of the cytoplasmic region of PelD, a degenerate diguanylate cyclase receptor that regulates exopolysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 28, p. 23582-93, July 2012. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22605337> >. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 48 FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 14, p. 4457-65, July 2004. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15231777> >. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 49 LEE, V. T. et al. A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. **Molecular Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 1474-84, Sept. 2007. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17824927> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

- 50 SILVA, S. S. **Estudos estruturais da proteína PelD de *Pseudomonas aeruginosa*: um receptor de c-di-GMP responsável pela produção de exopolissacarídeos e formação de biofilmes**. 2013. 132p. (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2013. <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/76/76132/tde-09042013-114356>. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 51 DE CRECY-LAGARD, V. et al. A *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* protein similar to catabolite activation factor is involved in regulation of phytopathogenicity. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 10, p. 5877-83, Oct. 1990. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2170330> >. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 52 CASPER-LINDLEY, C.; YILDIZ, F. H. VpsT is a transcriptional regulator required for expression of vps biosynthesis genes and the development of rugose colonial morphology in *Vibrio cholerae* O1 El Tor. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 5, p. 1574-8, Mar. 2004. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14973043> >. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 53 HICKMAN, J. W.; HARWOOD, C. S. Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. **Molecular Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 376-89, July 2008. ISSN 1365-2958. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18485075> >. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 54 BUCK, M. et al. The bacterial enhancer-dependent sigma(54) (sigma(N)) transcription factor. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 15, p. 4129-36, Aug. 2000. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10894718> >. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 55 ISHIHAMA, A. Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 499-518, 2000. ISSN 0066-4227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11018136> >. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 56 GUO, Y.; LEW, C. M.; GRALLA, J. D. Promoter opening by sigma(54) and sigma(70) RNA polymerases: sigma factor-directed alterations in the mechanism and tightness of control. **Genes & Development**, v. 14, n. 17, p. 2242-55, Sept. 2000. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10970887> >. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 57 BUSH, M.; DIXON, R. The role of bacterial enhancer binding proteins as specialized activators of σ 54-dependent transcription. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v. 76, n. 3, p. 497-529, Sept. 2012. ISSN 1098-5557. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22933558> >. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 58 SCHUMACHER, J. et al. Structures and organisation of AAA+ enhancer binding proteins in transcriptional activation. **Journal of Structural Biology**, v. 156, n. 1, p. 190-9, Oct. 2006. ISSN 1047-8477. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16531068> >. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 59 WIGNESHWERARAJ, S. R. et al. Conservation of sigma-core RNA polymerase proximity relationships between the enhancer-independent and enhancer-dependent sigma classes. **EMBO Journal**, v. 19, n.2, p.3038-48, 2000.

60 SCHUMACHER, J. et al. ATP-dependent transcriptional activation by bacterial PspF AAA+protein. **Journal of Molecular Biology**, v. 338, n. 5, p. 863-75, May 2004. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15111053> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

61 SU, W. et al. DNA-looping and enhancer activity: association between DNA-bound NtrC activator and RNA polymerase at the bacterial glnA promoter. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 14, p. 5504-8, July 1990. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2164685> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

62 CARMONA, M.; MAGASANIK, B. Activation of transcription at sigma 54-dependent promoters on linear templates requires intrinsic or induced bending of the DNA. **Journal of Molecular Biology**, v. 261, n. 3, p. 348-56, Aug. 1996. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8780778> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

63 STOCK, A. M.; ROBINSON, V. L.; GOUDREAU, P. N. Two-component signal transduction. **Annual Reviews of Biochemistry**, v. 69, p. 183-215, 2000. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10966457> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

64 MEYER, M. G. et al. A dimeric two-component receiver domain inhibits the sigma54-dependent ATPase in DctD. **FASEB Journal**, v. 15, n. 7, p. 1326-8, May 2001. ISSN 0892-6638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11344129> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

65 RAPPAS, M. et al. Structural insights into the activity of enhancer-binding proteins. **Science**, v. 307, n. 5717, p. 1972-5, Mar. 2005. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15790859> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

66 ARORA, S. K. et al. A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* in a cascade manner. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 17, p. 5574-81, Sept. 1997. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9287015> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

67 DASGUPTA, N.; RAMPHAL, R. Interaction of the antiactivator FleN with the transcriptional activator FleQ regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 22, p. 6636-44, Nov. 2001. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11673434> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

68 BARAQUET, C. et al. The FleQ protein from *Pseudomonas aeruginosa* functions as both a repressor and an activator to control gene expression from the pel operon promoter in response to c-di-GMP. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 15, p. 7207-18, Aug. 2012. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22581773> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

69 BARAQUET, C.; HARWOOD, C. S. Cyclic diguanosine monophosphate represses bacterial flagella synthesis by interacting with the Walker A motif of the enhancer-binding protein FleQ. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 46, p. 18478-83, Nov.

2013. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24167275> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

70 SU, T. et al. The REC domain mediated dimerization is critical for FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* to function as a c-di-GMP receptor and flagella gene regulator. **Journal of Structural Biology**, v. 192, n. 1, p. 1-13, Oct. 2015. ISSN 1095-8657. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26362077> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

71 SRIVASTAVA, D. et al. Cyclic di-GMP inhibits *Vibrio cholerae* motility by repressing induction of transcription and inducing extracellular polysaccharide production. **Molecular Microbiology**, v. 90, n. 6, p. 1262-76, Dec. 2013. ISSN 1365-2958. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24134710> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

72 ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-10, Oct. 1990. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2231712> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

73 JONES, D. T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. **Journal of Molecular Biology**, v. 292, n. 2, p. 195-202, Sept. 1999. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10493868> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

74 FANKHAUSER, F. [Application of static and dynamic light scattering--a review]. **Klin Monbl Augenheilkd**, v. 227, n. 3, p. 194-8, Mar. 2010. ISSN 1439-3999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20234983> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

75 JANCARIK, J. et al. Optimum solubility (OS) screening: an efficient method to optimize buffer conditions for homogeneity and crystallization of proteins. **Acta Crystallographica Section D: biological crystallography**, v. 60, n. Pt 9, p. 1670-3, Sept. 2004. ISSN 0907-4449. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15333951> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

76 GIACOVAZZO, C. **Fundamentals of crystallography**: Oxford : International Union Crystallography, c1992. 654 p.

77 MCPHERSON, A. **Introduction to macromolecular crystallography**. Hoboken, N. J. : Wiley-Liss,, c2003. 256p

78 LADD, M.; PALMER, R. **Structure determination by X-ray crystallography**. New York : Kluwer Academic/Plenum Publishers, c2003. 819p

79 KABSCH, W. XDS. **Acta Crystallographica Section D: biological crystallography**, v. 66, n. Pt 2, p. 125-32, Feb. 2010. ISSN 1399-0047. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20124692> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

80 ADAMS, P. D. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallographica Section D: biological crystallography**, v. 66, n. Pt 2, p. 213-21, Feb.

2010. ISSN 1399-0047. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20124702> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

81 SCHNEIDER, T. R.; SHELDRIK, G. M. Substructure solution with SHELXD. **Acta Crystallographica Section D: biological crystallography**, v. 58, p. 1772-9, Oct. 2002. ISSN 0907-4449. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12351820> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

82 EMSLEY, P. et al. Features and development of Coot. **Acta Crystallographica Section D: biological crystallography**, v. 66, n. Pt 4, p. 486-501, Apr. 2010. ISSN 1399-0047. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20383002> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

83 KABIRI, M.; UNSWORTH, L. D. Application of isothermal titration calorimetry for characterizing thermodynamic parameters of biomolecular interactions: peptide self-assembly and protein adsorption case studies. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 10, p. 3463-73, Oct. 2014. ISSN 1526-4602. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25131962> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

84 CHEN, F.; NIELSEN, S.; ZENOBI, R. Understanding chemical reactivity for homo- and heterobifunctional protein cross-linking agents. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 48, n. 7, p. 807-12, July 2013. ISSN 1096-9888. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23832936> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

85 WEBB, M. R. A continuous spectrophotometric assay for inorganic phosphate and for measuring phosphate release kinetics in biological systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 11, p. 4884-7, June 1992. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1534409> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

86 BREITSPRECHER, D. et al. Aptamer Binding Studies Using MicroScale Thermophoresis. **Methods in Molecular Biology**, v. 1380, p. 99-111, 2016. ISSN 1940-6029. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26552819> >. Acesso em: 25 jan. 2016.

87 GOLOVANOV, A. P. et al. A simple method for improving protein solubility and long-term stability. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 29, p. 8933-9, July 2004. ISSN 0002-7863. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15264823> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

88 LEE, S. Y. et al. Regulation of the transcriptional activator NtrC1: structural studies of the regulatory and AAA+ ATPase domains. **Genes & Development**, v. 17, n. 20, p. 2552-63, Oct. 2003. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14561776> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

89 WENDLER, P. et al. Structure and function of the AAA+ nucleotide binding pocket. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1823, n. 1, p. 2-14, Jan. 2012. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21839118> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

90 MATSUYAMA, B. Y. et al. Mechanistic insights into c-di-GMP-dependent control of the biofilm regulator FleQ from *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of National Academy of Sciences of the**

- United States of America**, v.113, n.2, E209-E218, Jan. 2016. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26712005> >. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 91 ZHANG, N. et al. Subunit dynamics and nucleotide-dependent asymmetry of an AAA(+) transcription complex. **Journal of Molecular Biology**, v. 426, n. 1, p. 71-83, Jan. 2014. ISSN 1089-8638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24055699> >. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 92 SYSOEVA, T. A. et al. Nucleotide-induced asymmetry within ATPase activator ring drives σ 54-RNAP interaction and ATP hydrolysis. **Genes & Development**, v. 27, n. 22, p. 2500-11, Nov. 2013. ISSN 1549-5477. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24240239> >. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 93 CHEN, C. et al. Representative proteomes: a stable, scalable and unbiased proteome set for sequence analysis and functional annotation. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e18910, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21556138> >. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 94 GAO, R.; STOCK, A. M. Molecular strategies for phosphorylation-mediated regulation of response regulator activity. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 160-7, Apr. 2010. ISSN 1879-0364. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20080056> >. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 95 KRISSINEL, E.; HENRICK, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. **Journal of Molecular Biology**, v. 372, n. 3, p. 774-97, Sept. 2007. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17681537> >. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 96 DE CARLO, S. et al. The structural basis for regulated assembly and function of the transcriptional activator NtrC. **Genes & Development**, v. 20, n. 11, p. 1485-95, June 2006. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16751184> >. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 97 MALONE, J. G. et al. YfiBNR mediates cyclic di-GMP dependent small colony variant formation and persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 3, p. e1000804, Mar. 2010. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20300602> >. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 98 HOLM, L.; ROSENSTRÖM, P. Dali server: conservation mapping in 3D. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. Web Server issue, p. W545-9, July 2010. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20457744> >. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 99 BOURRET, R. B. Receiver domain structure and function in response regulator proteins. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 142-9, Apr. 2010. ISSN 1879-0364. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20211578> >. Acesso em: 11 jan. 2016.
- 100 LANDAU, M. et al. ConSurf 2005: the projection of evolutionary conservation scores of residues on protein structures. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. Web Server issue, p. W299-302, July 2005. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15980475> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

101 GLASER, F. et al. ConSurf: identification of functional regions in proteins by surface-mapping of phylogenetic information. **Bioinformatics**, v. 19, n. 1, p. 163-4, Jan. 2003. ISSN 1367-4803. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12499312> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

102 GAO, R.; MACK, T. R.; STOCK, A. M. Bacterial response regulators: versatile regulatory strategies from common domains. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 5, p. 225-34, May 2007. ISSN 0968-0004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17433693> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

103 DOUCLEFF, M. et al. Negative regulation of AAA + ATPase assembly by two component receiver domains: a transcription activation mechanism that is conserved in mesophilic and extremely hyperthermophilic bacteria. **Journal of Molecular Biology**, v. 353, n. 2, p. 242-55, Oct. 2005. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16169010> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

104 BACHHAWAT, P. et al. Mechanism of activation for transcription factor PhoB suggested by different modes of dimerization in the inactive and active states. **Structure**, v. 13, n. 9, p. 1353-63, Sept. 2005. ISSN 0969-2126. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16154092> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

105 TORO-ROMAN, A.; WU, T.; STOCK, A. M. A common dimerization interface in bacterial response regulators KdpE and TorR. **Protein Science**, v. 14, n. 12, p. 3077-88, Dec. 2005. ISSN 0961-8368. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16322582> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

106 TORO-ROMAN, A.; MACK, T. R.; STOCK, A. M. Structural analysis and solution studies of the activated regulatory domain of the response regulator ArcA: a symmetric dimer mediated by the alpha4-beta5-alpha5 face. **Journal of Molecular Biology**, v. 349, n. 1, p. 11-26, May 2005. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15876365> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

107 HERRERA, M. C. et al. PhhR binds to target sequences at different distances with respect to RNA polymerase in order to activate transcription. **Journal of Molecular Biology**, v. 394, n. 3, p. 576-86, Dec. 2009. ISSN 1089-8638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19781550> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

108 PITTARD, J.; CAMAKARIS, H.; YANG, J. The TyrR regulon. **Molecular Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 16-26, Jan. 2005. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15612913> >. Acesso em: 11 jan. 2016.

109 UEKI, T.; INOUE, S. Transcriptional activation of a heat-shock gene, lonD, of *Myxococcus xanthus* by a two component histidine-aspartate phosphorelay system. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 8, p. 6170-7, Feb. 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11748231> >. Acesso em: 11 jan. 2016.