UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

RAPHAEL MENEGHELLO

Bases estruturais e bioquímicas da interface dimérica essencial da enzima diadenilato ciclase CdaA de *Staphylococcus aureus* como um novo sítio alostérico de inibição

São Carlos
2021

RAPHAEL MENEGHELLO

Bases estruturais e bioquímicas da interface dimérica essencial da enzima diadenilato ciclase CdaA de *Staphylococcus aureus* como um novo sítio alostérico de inibição

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
2021

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.

Meneghello, Raphael

Bases estruturais e bioquímicas da interface dimérica essencial da enzima diadenilato ciclase CdaA de *Staphylococcus aureus* como um novo sítio alostérico de inibição / Raphael Meneghello; orientador Marcos Vicente de Albuquerque Salles Navarro - versão corrigida -- São Carlos, 2021.

143 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2021.

1. Diadenilato ciclase. 2. Interface dimérica. 3. Sítio alostérico. 4. c-di-AMP. 5. *S. aureus*. I. Navarro, Marcos Vicente de Albuquerque Salles, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

À minha namorada, Marina, pelo amor, carinho e cuidado em todos os momentos. À minha família pela ajuda sempre incondicional em todos os sentidos... Amo todos vocês.

Aos amigos Wesley, Luiza, André, Diogo, Paty, Ana Elisa e Militar, que tive a sorte de conhecer e conviver durante todos esses anos de estudos, pelas conversas e momentos descontraídos...

Aos amigos Camila e Guto pelas partidas sempre animadas de vôlei de areia...

Aos amigos e técnicos do Laboratório de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas”, Ton, Higor, Jake, Léo, Marcela, Deborah, Bel, Andressa, Fernando e Rafael...

À Nathy e ao Helton, que me ajudaram desde o começo...

Ao Marcos Navarro, pela oportunidade do doutorado e orientação...

A todos os professores, técnicos, pessoal da secretaria e biblioteca e funcionários, que contribuíram direta e indiretamente para a conclusão desse trabalho...

Ao IFSC e USP, pela ótima estrutura no ensino e pesquisa...

À CAPES, pela bolsa concedida...

Meu muito obrigado!

“O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) Código de financiamento 001”.

RESUMO

MENEGHELLO, R. **Bases estruturais e bioquímicas da interface dimérica essencial da enzima diadenilato ciclase CdaA de *Staphylococcus aureus* como um novo sítio alostérico de inibição**. 2021. 143 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

Todos os organismos usam segundos-mensageiros para desencadear cascatas de processos moleculares e responder adequadamente aos sinais do ambiente. Especialmente em bactérias, os segundos-mensageiros mais comuns são baseados em nucleotídeos, cAMP, (p)ppGpp e c-di-GMP. Recentemente, o monofosfato de adenosina dimérico cíclico, c-di-AMP, surgiu como um novo e único segundo-mensageiro essencial, especialmente em bactérias Gram-positivas, controlando diferentes processos fisiológicos como homeostase da parede celular, reparo do DNA, transporte e homeostase de íons, regulação da expressão gênica e metabolismo. Sintetizada a partir de duas moléculas de ATP, a maioria das bactérias codifica apenas uma enzima produtora de c-di-AMP, a CdaA, incluindo *Staphylococcus aureus*, um conhecido patógeno humano importante capaz de adquirir facilmente resistência a antibióticos. Isso coloca a CdaA como um potencial alvo molecular para o desenvolvimento de novos medicamentos. Mais recentemente, estudos estruturais da CdaA revelaram um dímero cataliticamente incompetente, em que os sítios de ligação ao ATP de cada protômero se encontram em direções opostas. Essa organização oligomérica é completamente diferente da competente diadenilato ciclase octamérica, DisA, a primeira enzima DAC estudada. Apesar dos avanços recentes, os mecanismos aprofundados da síntese de c-di-AMP, especialmente pela CdaA, são pouco conhecidos e até o momento, nenhum estudo anterior explorou seu potencial como um novo alvo molecular. Aqui, é mostrado um ensaio cristalográfico em larga escala com a CdaA de *S. aureus* (SaCdaA) em que foram identificados alguns sítios de interação, incluindo um bolsão na interface dimérica essencial. Estudos biofísicos revelaram que a ligação do ATP+Mn²⁺ induz uma mudança conformacional no β 2- α 3-loop presente na interface dimérica, possibilitando o encontro produtivo face-a-face de dois dímeros diferentes para a síntese de c-di-AMP. Ainda, resultados cinéticos mostram que a SaCdaA exibe uma atividade cooperativa e de inibição por substrato. Em conjunto, os resultados cristalográficos e biofísicos colocam a interface dimérica como um potencial sítio

alostérico de inibição nunca explorado antes, e avançam no entendimento dos mecanismos de síntese do c-di-AMP, confirmando a CdaA como um interessante alvo molecular para o desenvolvimento de novos antibióticos e terapias até para as infecções causadas por cepas multirresistentes de *S. aureus*.

Palavras-chave: Diadenilato ciclase. Interface dimérica. Sítio alostérico. c-di-AMP. *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

MENEGHELLO, R **Structural and biochemical bases of the essential dimeric interface of the diadenylate cyclase enzyme CdaA from *Staphylococcus aureus* as a new allosteric site of inhibition**. 2021. 143 p. Thesis (Doctor in Science) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

All organisms employ second messengers to trigger cascades of molecular processes to properly respond to environmental cues. Especially in bacteria, the most common second messengers are based in nucleotides, e.g., cAMP, (p)ppGpp and c-di-GMP. Recently, the cyclic dimeric adenosine monophosphate, c-di-AMP, emerged as a novel and essential second messenger, especially in Gram-positive bacteria, controlling a variety of physiological processes such as cell wall homeostasis, DNA repair, ion transport and homeostasis, regulation of gene expression and metabolism. Synthesized from two ATP molecules, most bacteria encode only one c-di-AMP-producing enzyme, CdaA, including *Staphylococcus aureus*, a well-known important human pathogen capable of easily acquiring antibiotic resistance. This puts the CdaA as a potential molecular target for new drug development. More recently, structural studies of CdaA revealed a catalytically incompetent dimer, where the ATP binding sites of each protomer faces opposite directions. This assembly is completely different from the competent octameric diadenylate cyclase DisA, the first DAC-enzyme studied. Despite recent advances, the in-depth mechanisms of c-di-AMP synthesis, especially by the CdaA, are poorly known and to date, no previous studies have explored its potential as a new molecular target. Here we report a high-throughput crystallographic assay with *S. aureus* CdaA (SaCdaA) in which were identified several interaction sites, including a pocket at the essential dimeric interface. Biophysical studies revealed that ATP+Mn²⁺ binding induces a conformational change at the β 2- α 3-loop present at the dimeric interface, enabling the productive face-to-face encounter of two different dimers for c-di-AMP synthesis. Furthermore, kinetic results show that SaCdaA exhibits a cooperative and substrate-inhibiting activity. Together, the crystallographic and biophysical results place the dimeric interface as a potential allosteric site of inhibition never explored before, and sheds light on the mechanisms underlying c-di-AMP synthesis, confirming CdaA as an interesting molecular target for the development of

new antibiotics and therapies even for infections caused by multiresistant strains of *S. aureus*.

Keywords: Diadenylate cyclase. Dimeric interface. Allosteric site. c-di-AMP. *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Esquema ilustrativo da reação de síntese do c-di-AMP por meio de diadenilato ciclases, e sua degradação por fosfodiesterases.27
- Figura 2 – Organização e estrutura das três principais classes de diadenilato ciclases. (A) Esquema dos domínios das diferentes diadenilato ciclases. DAC, diadenilato ciclase; HhH, domínio helix-hairpin-helix; TM, hélices transmembranas. (B) Estrutura da DisA (PDB 3C1Z), enfatizado o domínio DAC (vermelho) e a interface dimérica (amarelo). (C) Estrutura da CdaS (PDB 2FB5), enfatizando o domínio DAC (verde) e a interface dimérica (azul). (D) Estrutura da CdaA (PDB 6GYW), enfatizando o domínio DAC (bege) e a interface dimérica (rosa).....28
- Figura 3– Esquema da conversão enzimática performada pela purina ribonucleosídeo fosforilase (PNP) do 2-amino-6-mercapto-7-metilpurina-ribonucleosídeo (MESG) em ribose-1-fosfato e 2-amino-6-mercapto-7-metilpurina. A conversão resulta em uma mudança no máximo de absorbância de 330 nm para 360 nm. Ao acoplar essa reação com a reação da SaCdaA, é possível relacionar a quantidade de pirofosfatos produzido pela SaCdaA, com a quantidade de MESG convertido e portanto, com o aumento da absorbância em 360 nm.....37
- Figura 4 – (A) Mapas $2mF_o-DF_c$ contornado a $1,5\sigma$ (em azul) e mF_o-DF_c contornado em $\pm 3\sigma$ (verde/vermelho) referentes ao estado não ligado. (B) Mapas de evento do panDDA contornado a 1σ (em rosa) referentes ao estado ligado. O mapa de evento calculado pelo panDDA mostra claramente a densidade eletrônica do ligante presente, inclusive a mudança conformacional de resíduos próximos ao ligante.42
- Figura 5 – Todos os mapas estão com contorno equivalente a $0,4\sigma$ do mapa $2mF_o-DF_c$, referente ao refinamento do Dimple. Na medida em que mais frações do mapa médio são subtraídas do mapa $2mF_o-DF_c$ (BDC aumenta), a densidade do ligante vai ficando mais clara. Para esse exemplo, o mapa de evento foi calculado com BDC=0.88.....43
- Figura 6 – Após a adição da mistura do *kit Kinase-Glo® Luminescent Assay*, o ATP não consumido é utilizado pela luciferase para catalisar a reação de mono-oxigenação da luciferina. A reação produz um fóton de luz por ciclo de conversão. Portanto, o sinal de luminescência será inversamente à reação da SaCdaA.....45
- Figura 7 – (A) Esquematização dos domínios presentes na SaCdaA. Possui três hélices transmembranas (TM) presentes no N-terminal, seguido do domínio DAC responsável pela síntese do c-di-AMP. (B) Estrutura cristalográfica da porção citoplasmática da SaCdaA.

Os principais motivos conservados estão explicitados: HDGA e TRHR (em azul) são responsáveis pela interação com a adenosina do ATP, e EE (vermelho) pela interação com os fosfatos. A interface dimérica composta pela fita $\beta 2$, hélice $\alpha 3$ e o $\beta 2$ - $\alpha 3$ -loop está explicitada em roxo. 48

Figura 8 – (A) Análise em SDS-PAGE 15% da purificação da SaCdaA: MW-padrão de massas moleculares; S-sobrenadante; F-flow-through da coluna; I1-1ª lavagem com imidazol 10 mM; I2-2ª lavagem com imidazol 10 mM; I3-3ª lavagem com imidazol 10 mM; L1-1ª lavagem sem imidazol; L2-2ª lavagem sem imidazol; E1-Eluição com 200 mM imidazol; C-clivagem com SUMO protease; F_{cliv}-Flow-through da coluna após clivagem; 500- lavagem com 500 mM imidazol; GF-gel-filtração. A seta indica a banda da SaCdaA após sua purificação por exclusão molecular. Observa-se uma banda única, mostrando que a proteína foi bem purificada. (B) Cromatograma resultante da purificação por exclusão molecular em coluna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare). Os tempos de eluição de das proteínas purificadas se mostraram compatíveis com a curva de calibração, permitindo uma boa estimativa da massa molecular..... 49

Figura 9 – (A) Histograma resultando das análises panDDA referentes aos conjuntos processados. Observa-se que alguns poucos conjuntos possuem valores de tamanho de célula unitária diferentes da maioria dos conjuntos, especialmente no eixo 'B' (74,5-76 Å) e 'C' (96-97,3 Å). (B) A diferença nos eixos acarreta em um modelo estrutural com posições atômicos ligeiramente diferentes com relação à estrutura referência, resultando em um RMSD mais alto (em zÅ)..... 53

Figura 10 – (A) Os conjuntos com alto valor de RMSD (em roxo) relativo aos outros conjuntos (em vermelho) apresenta uma cadeia proteica ligeiramente mais compacta, como se sofresse um movimento *scissor-like*. (B) Esses conjuntos possuem valores dos eixos 'b' e 'c' da célula unitária diferentes do resto dos conjuntos, o que resulta em um volume menor da célula unitária. (C) Análises do Cluster4x comparando as posições dos C α mostraram que os conjuntos diferentes se agrupam em um cluster 'A'. Análise dos conjuntos restantes revelou pequenos clusters de estruturas isomórficas, formando outros grupos 'B-G'..... 54

Figura 11 – Janela de controle do *pandda.inspect* acoplada ao Coot para manipulação da estrutura. Aqui é possível inserir a estrutura do ligante e modelar os resíduos ao redor que potencialmente sofreram alguma alteração conformacional devido à presença do ligante. Os mapas mostrados são referentes ao mapa de evento (em azul, 2 σ) e o *z-map* (em verde/vermelho, $\pm 3\sigma$)..... 56

Figura 12 – Exemplo comparativo para ilustrar a capacidade da análise panDDA em identificar potenciais sítios de ligação. No mapa *input*,

resultante da substituição molecular, é impossível identificar algum ligante presente. No entanto, após cálculo do mapa médio e subtração do BDC, os mapas de evento e *z-map* mostram claramente a densidade eletrônica referente ao ligante. Ao final, é possível modelar com clareza o ligante e as potenciais alterações conformacionais causadas pela interação enzima-ligante.57

Figura 13 – A correlação entre a ocupância refinada e o valor de 1-BDC obtida nos conjuntos analisados pelo panDDA resulta em um valor de 2,6.....59

Figura 14 – Relação entre a ocupância refinada e o coeficiente de correlação no espaço real (RSCC). Embora a maioria dos ligantes possuam ocupância baixa, a qualidade do modelo dos ligantes são altas, com $RSCC > 0,7$. Apenas 14 modelos (em vermelho) não alcançaram o limiar mínimo. A validação completa de cada modelo estão listadas nos apêndices B,C,D e E.61

Figura 15 – Conjuntos modelados com eventos encontrados no sítio ativo. Os mapas de evento (em azul, $1,5\sigma$) e *z-map* (em verde/vermelho, $\pm 3\sigma$) mostram com clareza os ligantes. Os nomes dos conjuntos em verde foram encontrados na primeira análise, panDDA-1; os nomes em vermelho, são aqueles encontrados na segunda análise, panDDA-2; e em azul, são os nomes dos conjuntos cujos *hits* foram encontrados na análise dos *clusters* após agrupamento dos conjuntos mais isomórficos.62

Figura 16 – Conjuntos modelados com eventos encontrados na interface dimérica. Os mapas de evento (em azul, $1,5\sigma$) e *z-map* (em verde/vermelho, $\pm 3\sigma$) mostram com clareza os ligantes. Os nomes dos conjuntos em verde foram encontrados na primeira análise, panDDA-1; os nomes em vermelho, são aqueles encontrados na segunda análise, panDDA-2; e em azul, são os nomes dos conjuntos cujos *hits* foram encontrados na análise dos *clusters* após agrupamento dos conjuntos mais isomórficos.....64

Figura 17 – Conjuntos modelados com eventos encontrados em outros sítios. Os mapas de evento (em azul, $1,5\sigma$) e *z-map* (em verde/vermelho, $\pm 3\sigma$) mostram com clareza os ligantes. Os nomes dos conjuntos em verde foram encontrados na primeira análise, panDDA-1; os nomes em vermelho, são aqueles encontrados na segunda análise, panDDA-2; e em azul, são os nomes dos conjuntos cujos *hits* foram encontrados na análise dos *clusters* após agrupamento dos conjuntos mais isomórficos.65

Figura 18 – Análises panDDA identificou vários sítios de interação entre a SaCdaA e os fragmentos. A maioria deles foram encontrados nos sítios-ativos (A/A'), com 31 fragmentos; a interface dimérica abriga 17 fragmentos (sítios B/B'); outros sítios secundários identificados, C e D, interagem com 21 e 3 fragmentos, respectivamente.66

- Figura 19 – (A) Principais resíduos responsáveis pela interação da SaCdaA com a adenosina do ATP (em azul). Ênfase para Y192, que sofre uma mudança conformacional para se posicionar de maneira apropriada para interagir com os anéis aromáticos da adenina via π -stacking. (B) Os fragmentos encontrados no sítio ativo (em verde) estão interagindo com a SaCdaA através dos mesmos resíduos. Muitos fragmentos contêm anéis aromáticos presentes na mesma posição da adenina, e nesse caso, o resíduo Y192 também altera seu rotâmero para possibilitar a interação via π -stacking..... 67
- Figura 20 – (A) Os fragmentos interagentes na interface dimérica se dispõem em três principais bolsões, S1 (verde claro), S2 (ciano) e S3 (rosa). Alguns fragmentos, no entanto, interagiram nos bolsões simétricos correspondentes, S1' (verde escuro) e S2' (azul). (B) Exemplos dos fragmentos x1254 (em S1, verde), x621 (em S2, ciano) e x1168 (em S3, rosa) podem indicar diferentes direções para o desenvolvimento racional de novas moléculas..... 68
- Figura 21 – (A) Mapas de evento (azul, $1,5\sigma$) e *z-map* (verde/vermelho, $\pm 3\sigma$) mostram claramente a posição do ligante x1254. (B) Gráfico radial com os parâmetros de validação indicam uma boa modelagem do ligante, levando em conta a ocupância e B-fator refinados. (C) Modelo estrutural final revela as interações do ligante com a SaCdaA, por meio de interações de hidrogênio com o resíduo Q161 e π -stacking com Y127. O ligante está posicionado no bolsão S1 da interface dimérica, próximo ao $\beta 2$ - $\alpha 3$ -loop. 69
- Figura 22 – A interação do ligante no bolsão da interface dimérica (estrutura em azul) deslocou o $\beta 2$ - $\alpha 3$ -loop em direção ao sítio ativo, acarretando uma nova conformação da H175, que é incompatível com a coordenação do Mn^{2+} observada na estrutura ligada ao ATP (em verde). Esse deslocamento do $\beta 2$ - $\alpha 3$ -loop potencialmente impede a entrada do ATP+ Mn^{2+} no sítio ativo..... 70
- Figura 23 – Sobreposição dos 21 fragmentos observados no sítio C, interagindo num bolsão do C-terminal da cadeia B. Os principais resíduos interagentes estão explicitados. Destaque para a F237, que sofreu uma mudança conformacional (*stick* vermelho) para possibilitar interações do tipo π -stacking com fragmentos com anéis aromáticos próximos. 71
- Figura 24 – Exemplo de interações do conjunto x836. A presença desse ligante pode ser devida a interações com moléculas de SaCdaA simétricas (estrutura em cinza escuro) presentes no cristal devido ao empacotamento cristalino. 72
- Figura 25 – Modelo estrutural dos conjuntos x1219 e x1127 e os principais resíduos próximos ao sítio de interação. 73
- Figura 26 – (A) Medidas de DLS com a SaCdaA na presença de diferentes componentes. As médias (bola) de cada amostra resultam de seis

diferentes replicatas (losangos). As barras de erros representam o desvio-padrão das seis replicatas. O raio hidrodinâmico calculado é aumentado somente na presença de ATP e Mn^{2+} , substratos da SaCdaA. Testes com outros metais não mostraram capacidade da proteína de formar estados oligoméricos mais complexos. (B) Histograma das atividades enzimáticas obtidas por HPLC da SaCdaA na presença de diferentes íons divalentes. Os valores foram normalizados com relação à atividade na presença de Mn^{2+} 74

Figura 27 – (A) Ensaios de DLS de mutantes da SaCdaA na presença de ATP+ Mn^{2+} mostram que mutações nos resíduos conservados responsáveis por interações com o ATP perdem a capacidade de formar oligômeros mais complexos. (B) Ensaio de atividade por HPLC indicam que os mutantes têm sua capacidade catalítica muito reduzida, com relação à SaCdaA nativa (WT)..... 75

Figura 28 – Cromatogramas resultantes das corridas de SEC-MALS com amostras da (A) SaCdaA nativa (WT) e mutantes (B) H175A, (C) T207E e (D) E229A na presença e ausência do substrato ATP+ Mn^{2+} não mostraram diferenças significativas no estado oligomérico da proteína, indicando que esse estado ocorra de forma transiente em solução. As amostras com adição do substrato foram corridas em tampão suplementado com ATP e $MnCl_2$ 77

Figura 29 – Acompanhamento em tempo real do sinal de absorvância em 360 nm das curvas-padrão de PP_i (A) em tampão 50 mM Tris, pH7,5; (B) em tampão 50 mM Tris, pH7,5, com adição de 100 μM $MnCl_2$; (C) em tampão 50 mM Tris, pH7,5, com adição de 100 μM $MnCl_2$ e 10 mM $MgCl_2$. A presença de pequenas concentrações de íons manganês é suficiente para inibir fortemente a atividade da enzima pirofosfatase inorgânica (IP) dependente de magnésio. Mesmo após suplementação com 10 mM de íons Mg^{2+} , a atividade não foi totalmente recuperada. 79

Figura 30 – (A) Diferentes testes com tampões, variando as condições de íons manganês, magnésio e concentração salina resultaram e perdas de atividade da IP. Na presença de EDTA, no entanto, em concentração próxima à concentração de $MnCl_2$, a IP conseguiu recuperar sua atividade. (B) Curva-padrão controle, em tampão 50 mM Tris, pH 7,5. (C) Curva-padrão otimizada, em tapão 50 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 2mM $MnCl_2$, 3 mM EDTA, 5 mM $MgCl_2$ 80

Figura 31 – Curva-padrão nas condições otimizadas de reação mostra que a capacidade do *kit* em detectar a presença de PP_i foi reestabelecida. Os valores obtidos na equação da reta ajustada são compatíveis com a curva-padrão presente no *kit*.⁶⁵ 81

Figura 32 –(A) Gráfico resultante dos sinais de absorvância em 360 nm referentes à cada concentração de ATP testada em função do tempo de reação (como exemplo e clareza, somente quatro concentrações de ATP foram ilustradas, foram testadas 12

concentrações diferentes). A partir das retas ajustadas, os coeficientes angulares foram calculados para obtenção dos valores de velocidade de reação (B) Gráfico de cinética enzimática relacionando as concentrações de ATP com a velocidade de reação. Claramente observa-se um comportamento de atividade inibida pelo substrato, resultando em duas curvas ajustadas, com o fator cooperativo (linha contínua) e sem cooperação (linha tracejada)..... 82

Figura 33 – Cromatograma (em preto) resultante da corrida de purificação do c-di-AMP em coluna C18 (Gemini 5 μ M, 250x10mm). O pico do c-di-AMP indicado foi coletado e uma alíquota foi analisada em espectrômetro de massas para confirmar a massa do c-di-AMP. O gradiente utilizado está mostrado em vermelho no gráfico, referente à porcentagem da mistura de tampão B (metanol 100%) e tampão A (100 mM acetato de amônio, pH 5,5). 85

Figura 34 – Análise em coluna de troca iônica Mono-Q 5/50 GL (GE Healthcare) dos picos referentes à mistura de nucleotídeos para verificar a capacidade da coluna em resolver os diferentes componentes. O pico referente ao c-di-AMP (10 μ M), ADP (50 μ M), ATP (50 μ M) e SaCdaA (10 μ M) eluem em 3,8 min, 5,3 min, 7,2 min e 9,8 min, respectivamente. A curva em vermelho indica a porcentagem da mistura de tampão B (25 mM Tris, pH 8,0, 1 mM NaCl) e tampão A (25 mM Tris, pH 8,0)..... 86

Figura 35 – (A) Sobreposição de diferentes corridas contendo concentrações de c-di-AMP que variam de 1 μ M a 50 μ M. As áreas sob os picos foram integradas e utilizadas para montar a curva-padrão (B) relacionando, portanto, a área calculada com a concentração de c-di-AMP testada. 87

Figura 36 – (A) Exemplo dos cromatogramas referentes à concentração de ATP igual a 300 μ M. Para cada concentração de ATP, a reação foi parada em tempos que variaram de 0 h a 3 h com a adição de EDTA e injetadas no HPLC para análise. A área abaixo do pico referente ao c-di-AMP foi calculada, convertida em concentração de c-di-AMP produzido, e relacionada com os tempos de reação. A partir da reta ajustada, foram obtidos os valores de velocidade de reação. (B) Curva de cinética enzimática indica novamente uma característica de atividade inibida por substrato. A curva ajustada com o fator de cooperatividade (linha cheia) se mostra mais bem ajustada com relação à curva sem o fator de cooperatividade (curva tracejada)..... 88

Figura 37 – Uma típica curva de MST é dividida em quatro fases: a primeira fase (I) se relaciona com a fluorescência “fria” (Fc), anterior à ligação do laser, e representa a fluorescência inicial da amostra. Em seguida (II), o laser infravermelho (IR) é ligado e rapidamente inicia-se a termoforese. Esse rápido processo é chamado de T-jump, e ocorre na escala de tempo de ms. A terceira fase (III) é o

processo de termoforese dependente da difusão das moléculas em solução. É um processo mais lento, durando alguns segundos. Os processos de T-jump e da termoforese de difusão são influenciados por um evento de ligação/interação. A última fase (IV) ocorre após o desligamento do laser infravermelho, numa espécie de T-jump inve as moléculas voltam a se mover para a região previamente aquecida, e, portanto, a fluorescência naquela região volta a ser mais intensa. A fluorescência “quente” (F_h), após a termodifusão (III), é normalizada com relação à fluorescência inicial (F_c), resultando no sinal de F_{norm}90

Figura 38 – (A) Curvas de MST das amostras de SaCdaA e ATP na presença (verde) e ausência (marrom) do cofator metálico Mn^{2+} . As barras azul e vermelha representam os valores de fluorescência “fria” e “quente”, respectivamente. Esses valores foram escolhidos de modo a prover o melhor valor de sinal/ruído. No caso da amostra com Mn^{2+} , esse valor foi de 28,2; na amostra sem Mn^{2+} , o valor foi de 30,4. (B) Curvas de dose-resposta ajustadas utilizando o modelo cooperativo de Hill. Os valores da fluorescência para cada concentração de ATP foram convertidos em fração de SaCdaA ligada ao ATP. Os valores de EC_{50} calculados foram de $2,5 \pm 0,2 \mu M$ para as amostras contendo o cofator metálico; e $800 \pm 100 \mu M$ nas condições sem Mn^{2+} . Os pontos representam médias e as barras de erros representam o desvio-padrão de três ensaios independente.....91

Figura 39 – (A) Embora sequencialmente a interface dimérica seja conservada apenas entre as classes CdaA (PDB 6GYW) e CdaS (PDB 2FB5) das enzimas-DAC, (B) estruturalmente observa-se a presença da interface dimérica também na DisA (PDB 3C1Z). (C) A maior diferença estrutural está na ausência do $\beta 2$ - $\alpha 3$ -loop. (D) A ausência do loop permite uma organização mais compacta do domínio DAC da DisA, que resulta em uma torção quando sobreposta com a estrutura do domínio DAC da CdaA. Essa organização talvez seja a responsável pelo estado octamérico e ativo da DisA, enquanto os domínios DAC da CdaA e CdaS são organizados em dímeros e hexâmeros inativos, respectivamente.93

Figura 40 – (A) Mapa de Van der Waals dos principais resíduos do $\beta 2$ - $\alpha 3$ -loop interagentes na face do protômero vizinho. A partir da interação da SaCdaA com seu substrato, $ATP+Mn^{2+}$, o $\beta 2$ - $\alpha 3$ -loop é fixado na conformação aberta, aumentando suas interações na interface dimérica. (B) A conformação alternada possibilita que a H175 também movimente, para uma posição compatível com a correta coordenação do cofator metálico. (C) A nova posição da H175 é mantida por interações com a cadeia principal da T172, por meio de ligações de hidrogênio a 2,6 Å. Quando o $\beta 2$ - $\alpha 3$ -loop está na posição fechada, a posição da H175 permite interações com a cadeia principal de G134, com ligações de hidrogênio a 3,1 Å.95

Figura 41 – (A) Visão geral da SaCdaA com as principais regiões flexíveis encontradas no CABS-flex.¹²⁴ As principais regiões flexíveis são 2 e 4. No gráfico, as curvas representam a flutuação de cada resíduo presente na proteína. Dinâmicas com o monômero (preto), das cadeias A e B do dímero incompetente (bege e vermelho, respectivamente) e das interfaces catalíticas A e B (azul e verde, respectivamente), foram realizadas. (B) Poses estruturais resultantes da dinâmica do dímero incompetente. De forma geral, não há muita variação na posição dos resíduos. A maior região flexível é a 4. (C) Poses estruturais da dinâmica usando somente o monômero da SaCdaA. Observa-se aqui, uma grande flutuação nos resíduos que compõem a o $\beta 2$ - $\alpha 3$ -loop (região 2), mostrando que esse loop é de fato capaz de sofrer mudanças conformacionais. (D) O encontro de dois dímeros de SaCdaA diferentes para a formação da interface catalítica, responsável pela síntese do c-di-AMP, restringe bastante a flexibilidade da região 4, que passa a fazer interações inter-dímeros, possibilitando a manutenção da interface catalítica. 96

Figura 42 – Sobreposição da estrutura SaCdaA e LmCdaA (PDB 6HVL). Os resíduos do $\beta 2$ - $\alpha 3$ -loop apresentam as mesmas conformações, assim como os principais resíduos responsáveis pela interação com o ATP. A numeração dos resíduos está de acordo com a sequência da SaCdaA. O estado pós-catalítico mostrado na LmCdaA não possui alterações conformacionais significativas comparado com o estado pré-catalítico da SaCdaA. A estrutura da LmCdaA (em azul) foi cristalizada com Co^{2+} , embora seja mais ativa com Mn^{2+} .⁵² 98

Figura 43 – Modelo da interface catalítica formada entre dois dímeros da SaCdaA. (A) Os íons manganês são coordenados pelos fosfatos do ATP e pelos resíduos E229 do protômero 1 (em bege claro) e pela H175 do protômero 2 (em bege escuro). (B) Esquema da reação catalisada pela SaCdaA para a síntese do c-di-AMP. Inicialmente, o resíduo D176 deve agir como base geral, desprotonando o grupo 3'OH do ATP, facilitando o ataque nucleofílico sobre o α -fosfato do ATP vizinho. (C) O intermediário pentacoordenado formado é possivelmente estabilizado pelas interações dos resíduos T207, R208 e H209 e pelo dipolo positivo da hélice $\alpha 4$ 100

Figura 44 – (A) Olhando através da intersecção da DisA (PDB 4YXM), para ser liberado, o c-di-AMP deve passar por túneis de argininas (indicado pelas setas) e só então estará disponível para atuar no meio celular. (B) Sobrepondo a estrutura da SaCdaA ligada ao ATP na DisA, as argininas R128-130 (em asterisco) conservadas nas DisA dão lugar aos resíduos E228-229, conservados nas CdaA e CdaS. Ainda, a presença do $\beta 2$ - $\alpha 3$ -loop (ausente nas enzimas da classe DisA) pode restringir essa possível rota de saída do c-di-AMP nas CdaA. 101

- Figura 45 – Fragmentos identificados na campanha cristalográfica em larga escala que se ligaram nos bolsões da interface dimérica. 102
- Figura 46 – Cinco dos 17 fragmentos identificados no sítio da interface dimérica são análogos, sendo que quatro se ligaram à SaCdaA de forma bastante similar, tendo o resíduo de Y127 responsável pela interação via π -stacking com os anéis aromáticos dos ligantes..... 103
- Figura 47 – Embora muitos dos mapas input (2mFO-DFC em azul a 1σ ; mFO-DFC, em verde/vermelho a $\pm 3\sigma$), resultantes da substituição molecular, indicassem a presença do ligante, os mapas de evento (rosa, $1,5\sigma$) e *z-map* (verde/vermelho, $\pm 3\sigma$) permitem a modelagem tanto do *ground-state* quanto do estado ligado. Nesses conjuntos, é possível observar que o *ground-state* possui uma molécula de DMSO (proveniente do solvente das moléculas) que se liga também na interface. A análise panDDA permite, portanto, ponderar a ocupância do DMSO e dos ligantes. Os gráficos de validação mostram que a modelagem dos ligantes estão de acordo com os parâmetros analisados..... 104
- Figura 48 – (A) As moléculas análogas testadas se ligaram nos mesmos bolsões da interface dimérica identificados na campanha cristalográfica em larga escala. (B) Como resultado da interação das moléculas na interface dimérica (estrutura em cinza), o $\beta 2$ - $\alpha 3$ -loop é deslocado para a conformação fechada, jogando a H175 em direção ao sítio ativo, impedindo sua conformação ótima para a coordenação do metal na estrutura ligada ao ATP (em verde). Ainda, o deslocamento do $\beta 2$ - $\alpha 3$ -loop permite a entrada de uma água estrutural, permitindo a interação com o grupo carbonila dos ligantes. (C) Dois diferentes compostos (x1001 e X1006) exploraram de forma diferente o bolsão S3, posição ocupada pelo grupo sulfonamida, permitindo potenciais crescimentos das moléculas em direção aos bolsões S2 e seu simétrico S2'..... 106
- Figura 49 – Os mapas input (1σ) e de eventos ($1,5\sigma$) mostram sem dúvidas a presença dos ligantes no sítio ativo de ambas cadeias da SaCdaA. A vantagem das análises panDDA é a modelagem do *ensemble* que engloba tanto o estado não-ligado quanto o estado ligado, permitindo um ponderamento das ocupâncias dos ligantes (no estado ligado) e das águas (no estado não-ligado). Os gráficos radiais validação mostram uma boa modelagem. 107
- Figura 50 – De forma similar ao (A) ATP, os ligantes (B) x7003, (C) x7004 e (D) x7009 se ligaram também no sítio ativo. Os principais resíduos que interagem com a adenosina do ATP também fazem interações com os ligantes. (E) Todos os ligantes possuem um *scaffold* em comum, o 6-metiltieno-pirimidina, variando nas posições R1 e R2. (F) Em todas as estruturas, o resíduo Y192 alterna sua conformação para realizar interações do tipo π -stacking com os anéis aromáticos da 6-metiltieno-pirimidina da mesma forma encontrada na estrutura

com ATP. Na estrutura APO (em rosa), os resíduos Y192 e H175 ocupam outras conformações.....	109
Figura 51 – Cada ponto representa a fração de atividade remanescente da SaCdaA relativa ao controle negativo (de inibição), em que a reação de diadenilato ciclase ocorreu na ausência de qualquer composto. A linha cheia (preta) representa a atividade média do controle negativo, e as linhas tracejadas em vermelho, amarelo e verde representam os valores da média $\pm 3SD$, $\pm 4SD$ e $\pm 5SD$, respectivamente. O valor de Z' para o ensaio foi de 0,67, o que representa um bom ensaio. As estruturas químicas dos compostos que resultaram em uma atividade remanescente abaixo da linha de $\pm 3SD$ estão representadas.	111
Figura 52 – Ensaio de atividade em HPLC com moléculas análogas àquelas identificadas na campanha cristalográfica em larga escala. Os valores estão normalizados relativo à atividade da SaCdaA na ausência do ligante.....	112
Figura 53 – Gráficos radiais de validação dos fragmentos encontrados no sítio ativo identificados na campanha cristalográfica em larga escala.	131
Figura 54 – Gráficos radiais de validação dos fragmentos encontrados na interface dimérica identificados na campanha cristalográfica em larga escala.	135
Figura 55 – Gráficos radiais de validação dos fragmentos encontrados em outros sítios identificados na campanha cristalográfica em larga escala.	137
Figura 56 – Estrutura molecular dos compostos análogos aos fragmentos identificados na campanha cristalográfica em larga escala. As moléculas numeradas foram adquiridas na MolPort. As últimas seis moléculas foram adquiridas na Specs, e nomeadas segundo seus respectivos códigos.	143

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média dos parâmetros cristalográficos dos 434 conjuntos analisados pelo panDDA e dos agrupamentos	55
Tabela 2 – Parâmetros cinéticos das curvas ajustadas relativas ao ensaio de absorbância (Enzchek) sem levar em conta o fator de cooperatividade (Equação 1) ou adicionando o fator cooperativo (Equação 2).....	84
Tabela 3 – Parâmetros cinéticos das curvas ajustadas relativas ao ensaio de HPLC sem levar em conta o fator de cooperatividade (Equação 1) ou adicionando o fator cooperativo (Equação 2)	88
Tabela 4 – Tabela resumizando os parâmetros de validação dos <i>datasets</i> com ligantes identificados na campanha cristalográfica em larga escala. Os valores marcados são aqueles que estão abaixo do <i>threshold</i> mínimo que indica uma boa modelagem.....	139

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BDC	<i>Background density correction</i>
c-di-AMP	Adenosina monofosfato dimérica cíclica
c-di-GMP	Guanosina monofosfato dimérica cíclica
DAC	Diadenilato ciclase
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DMSO	Dimetil sufóxido
Do _{600nm}	Densidade óptica em 600 nm
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HTS	<i>High throughput screening</i>
IMAC	Cromatografia de afinidade por metal imobilizado
IP	Pirofosfatase inorgânica
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
LB	<i>Luria-Broth</i>
LNBio	Laboratório Nacional de Biociências
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
MST	Termoforese em microescala
PEG	Polietilenoglicol
P _i	Fosfato inorgânico
PP _i	Pirofosfato inorgânico
SD	Desvio-padrão
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecilsulfato de sódio
SEC-MALS	Cromatografia de exclusão molecular-espalhamento de luz a multi-ângulo
SUMO	<i>Small ubiquitin-like modifier</i>
Tris	Trisaminometano
VC	Volume de coluna
V _{máx}	Velocidade enzimática máxima

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	25
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
2.1	<i>Transformação, expressão e purificação da SaCdaA</i>	<i>33</i>
2.2	<i>Purificação do c-di-AMP.....</i>	<i>34</i>
2.3	<i>Curva de calibração para detecção do c-di-AMP e testes de atividade enzimática em HPLC</i>	<i>34</i>
2.3.1	Desenvolvimento do protocolo de corrida	34
2.3.2	Curva de calibração	35
2.3.3	Atividade enzimática	35
2.4	<i>Cinética enzimática (HPLC e EnzChek™)</i>	<i>36</i>
2.4.1	Determinação dos parâmetros cinéticos por HPLC	36
2.4.2	Determinação dos parâmetros cinéticos por Enzchek™	37
2.5	<i>Termoforese em microescala (MST).....</i>	<i>39</i>
2.6	<i>DLS</i>	<i>40</i>
2.7	<i>SEC-MALS.....</i>	<i>40</i>
2.8	<i>Cristalografia em larga escala com fragmentos</i>	<i>40</i>
2.9	<i>Cristalografia com análogos.....</i>	<i>44</i>
2.10	<i>Ensaio de luminescência – Kinase-Glo® Luminescent Assay</i>	<i>45</i>
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
3.1	<i>Expressão e purificação da CdaA</i>	<i>47</i>
3.2	<i>Cristalografia em larga escala.....</i>	<i>50</i>
3.2.1	Fragmentos no sítio ativo.....	66
3.2.2	Fragmentos na interface dimérica.....	68
3.2.3	Outros Sítios	70
3.3	<i>Estudos bioquímicos e biofísicos</i>	<i>73</i>
3.3.1	Atividade catalítica induz a formação de complexos transientes de alta massa molecular.....	73
3.3.2	Cinética enzimática da SaCdaA mistura cooperatividade e inibição por substrato	77
3.3.3	O papel do β 2- α 3-loop da interface dimérica incompetente na atividade enzimática e inibição da SaCdaA.....	92
3.3.4	Mecanismo de atividade da SaCdaA	97
3.4	<i>Interface dimérica como sítio alostérico</i>	<i>102</i>

4	CONCLUSÃO	115
	REFERÊNCIAS.....	119
	APÊNDICE A – DEDUÇÃO DA EQUAÇÃO DE CINÉTICA ENZIMÁTICA	127
	APÊNDICE B – VALIDAÇÃO DOS FRAGMENTOS MODELADOS NO SÍTIO ATIVO	131
	APÊNDICE C – VALIDAÇÃO DOS FRAGMENTOS MODELADOS NA INTERFACE DIMÉRICA.....	135
	APÊNDICE D – VALIDAÇÃO DOS FRAGMENTOS MODELADOS NOS OUTROS SÍTIOS.....	137
	APÊNDICE E – TABELA COM DADOS CRISTALOGRAFICOS E DE VALIDAÇÃO DOS MODELOS REFINADOS.....	139
	APÊNDICE F – ESTRUTURA MOLECULAR DOS COMPOSTOS ANÁLOGOS AOS FRAGMENTOS IDENTIFICADOS NA CAMPANHA CRISTALOGRAFICA EM LARGA ESCALA.....	143

1 INTRODUÇÃO

Para sobreviver e se adaptar, os organismos precisam se ajustar e responder de uma maneira apropriada aos sinais externos e mudanças do ambiente. Essas respostas podem envolver, por exemplo, ajustes na atividade de proteínas e na expressão gênica para assegurar que apenas aqueles determinados genes que são requeridos sob condições particulares sejam expressos. O sistema de transdução de sinais desencadeia uma série de processos moleculares que se baseia majoritariamente em segundos-mensageiros. Em bactérias, os segundos-mensageiros mais comum são baseados em nucleotídeos.¹ O cAMP, talvez o mais estudado, está envolvido na repressão catabólica, virulência e uso de nitrogênio, por exemplo.²⁻⁵ No caso de segundos-mensageiros baseados em dinucleotídeos cíclicos, já foram descobertos o c-di-GMP, envolvido principalmente na sinalização para mudança entre o estilo de vida sésil em biofilmes e móvel em célula única;⁶ o c-GMP-AMP, envolvido nas funções de quimiotaxia e respiração anaeróbica;⁷⁻⁸ e o c-di-AMP.

Até mesmo antes da descoberta do c-di-AMP, em 2008,⁹ esse novo segundo-mensageiro viria a conquistar uma posição privilegiada entre as moléculas sinalizadoras baseadas em nucleotídeos. Estudos genéticos com *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium* e *Streptococcus pneumoniae* demonstraram a existência de genes essenciais para a viabilidade desses organismos. Entre esses genes, estavam aqueles que codificam para as proteínas envolvidas na síntese do c-di-AMP, até então com funções ainda desconhecidas.¹⁰⁻¹³ Somente após a caracterização do domínio diadenilato ciclase (DAC), responsável pela síntese do c-di-AMP, novos estudos demonstraram que o c-di-AMP é, de fato, o único segundo-mensageiro essencial dentre aqueles baseados em nucleotídeo. Tentativas de deletar o gene codificante para as diadenilato ciclases não geravam bactérias viáveis,¹⁴⁻¹⁸ especialmente em *Listeria monocytogenes* e *S. aureus*, cuja síntese do c-di-AMP é realizada por somente uma proteína-DAC. Em *Bacillus subtilis*, que codifica três proteínas-DAC diferentes (CdaA, DisA e CdaS), cepas mutantes em que os três genes foram deletados não são viáveis.¹⁶⁻¹⁷ Ainda, mutantes Δ cdaA eram viáveis, mas apresentaram mais sensibilidade à antibióticos β -lactâmicos. Mutante Δ disA/ Δ cdaS e Δ cdaA/ Δ cdaS eram viáveis. De fato, sabe-se

que a CdaS é expressa somente durante o processo de esporulação, e, portanto, não contribui para a síntese de c-di-AMP na sua forma vegetativa.^{17,19-20} No entanto, mutante Δ disA/ Δ cdaA não foram obtidos. Esses resultados indicam que o c-di-AMP é essencial para a viabilidade e que o nível basal de expressão da CdaA e DisA é suficiente para viabilizar o crescimento bacteriano. Ainda, a CdaA parece ser a maior contribuinte para a resistência intrínseca à β -lactâmicos. Cepas mutantes de Δ cdaA/ Δ disA só são viáveis quando crescidas em meio suplementado com sacarose, MgSO₄ e ácido maleico (SMM).¹⁶⁻¹⁷ Esses suplementos são usados para estabilizar o crescimento de células deficientes na parede celular.²¹⁻²² Em conjuntos com os resultados de sensibilidade aos antibióticos β -lactâmicos, o c-di-AMP parece ter uma relação bastante próxima com a maquinaria responsável pela síntese da parede celular e do peptidoglicano, colocando o c-di-AMP como o único segundo-mensageiro essencial até o momento.^{16-17,23-26}

Além da relação com a homeostase da parede celular, novos estudos mostraram que o c-di-AMP está envolvido na regulação de várias outras funções: metabolismo, esporulação, formação de biofilme, susceptibilidade a antibióticos e homeostase osmótica para citar algumas.^{15-16,27-36}

A concentração intracelular de c-di-AMP deve ser bem controlada. O acúmulo de c-di-AMP, em cepas mutantes que super-expressam as diadenilato ciclases ou em cepas com a deleção de fosfodiesterases (que degradam o c-di-AMP), resulta em defeitos na morfologia e na divisão celular, aumento na sensibilidade ao estresse salino, diminuição da sensibilidade aos antibióticos, e invariavelmente, surgem cepas com mutações proteicas para reduzir a produção de c-di-AMP.^{16-18,37-39} A baixa concentração de c-di-AMP, por outro lado, pode provocar, por exemplo, o acúmulo de (p)ppGpp (que resulta em uma redução na taxa de crescimento bacteriano),⁴⁰⁻⁴¹ e na maior sensibilidade aos antibióticos, especialmente os β -lactâmicos.^{16,18} A viabilidade bacteriana em baixas concentrações intracelulares de c-di-AMP só foi alcançada em condições de crescimento específicas, condições anaeróbicas, baixas concentrações de potássio e uso de meio mínimo.^{40,42-43}

O nível intracelular de c-di-AMP, portanto, depende de proteínas que o sintetizem e façam sua degradação, diadenilato ciclases e fosfodiesterases, respectivamente, ou de proteínas que as regulem. Até então, somente um domínio

foi identificado capaz de sintetizar o c-di-AMP. O domínio DAC (diadenilato ciclase) é responsável por catalisar a reação de condensação de duas moléculas de ATP para formar o c-di-AMP (Figura 1), liberando como produto secundário, duas moléculas de pirofosfatos (PP_i).⁹ As diadenilato ciclases estão presentes principalmente em bactérias Gram-positivas dos filos Firmicutes e Actinobacteria. Mas podem ser encontradas em algumas bactérias Gram-negativas dos filos Deltaproteobacteria, Chlamydiae e Cyanobacteria. Mais recentemente, também foram encontradas no domínio Archaea.⁴⁴⁻⁴⁵

Figura 1 – Esquema ilustrativo da reação de síntese do c-di-AMP por meio de diadenilato ciclases, e sua degradação por fosfodiesterases.

Fonte: Adaptada de CORRIGAN.¹⁸

O domínio DAC aparece acompanhado de diversos outros domínios, por exemplo, domínios transmembranas e domínios de interação com outras moléculas. Baseado nessa combinação, as diadenilato ciclases são divididas em classes, ou subfamílias (Figura 2). Três subfamílias são as mais bem estudadas até o momento.

Figura 2 – Organização e estrutura das três principais classes de diadenilato ciclases. (A) Esquema dos domínios das diferentes diadenilato ciclases. DAC, diadenilato ciclase; HhH, domínio helix-hairpin-helix; TM, hélices transmembranas. (B) Estrutura da DisA (PDB 3C1Z), enfatizando o domínio DAC (vermelho) e a interface dimérica (amarelo). (C) Estrutura da CdaS (PDB 2FB5), enfatizando o domínio DAC (verde) e a interface dimérica (azul). (D) Estrutura da CdaA (PDB 6GYW), enfatizando o domínio DAC (bege) e a interface dimérica (rosa).

Fonte: Elaborada pelo autor

A DisA, a primeira classe de diadenilato ciclases descoberta, geralmente está presente junto com outras classes de diadenilato ciclases em bactérias do gênero *Bacillus* e *Clostridium*. Possui o domínio DAC acompanhado de um domínio de ligação ao DNA,^{9,46} cuja função é verificar a integridade do DNA e controlar seu reparo.^{35,47} Ao encontrar alguma lesão no DNA, a síntese de c-di-AMP é diminuída, o que resulta em um adiamento do processo de divisão celular ou de esporulação.^{28,32,48} A DisA está organizada em octâmeros, e é constitutivamente ativa nessa conformação, dado que a orientação dos sítios-ativo dos domínios DAC permite a produção de c-di-AMP.⁹

A segunda classe de diadenilato ciclases, CdaS, está presente somente em espécies bacterianas que formam esporos do gênero *Bacillus* e em uma espécie do gênero *Clostridium*.³³ O gene codificante para a CdaS é expresso somente durante o processo de esporulação, o que sugere que essa diadenilato ciclase possua alguma função no desenvolvimento ou germinação dos esporos.^{19-20,49} As bactérias que possuem a CdaS sempre expressarão outro tipo de diadenilato ciclase (CdaA ou DisA) durante sua forma vegetativa, para suprir a necessidade de c-di-AMP. A CdaS forma hexâmeros em solução, porém essa organização oligomérica não permite a síntese do c-di-AMP por si, já que os domínios DAC não estão posicionados da maneira correta para a síntese do c-di-AMP. É hipotetizado que sua atividade seja controlada por meio do domínio auto-inibitório, YojJ, que está associado ao domínio DAC. Portanto alguma alteração conformacional dos hexâmetros deve acontecer para ocorra, de fato, a síntese do segundo-mensageiro.¹⁹⁻²⁰

A subfamília mais abundante das diadenilato ciclases são as CdaA. Presente em todo o filo Firmicutes, essas proteínas possuem anexado ao domínio DAC citoplasmático, um domínio transmembranar que a ancora na membrana.⁵⁰⁻⁵² Em praticamente todas as bactérias dependentes da via de sinalização do c-di-AMP, a CdaA é a única diadenilato ciclase disponível. Ainda, nas bactérias que expressam mais do que uma diadenilato, a CdaA está quase sempre presente. Estudos *in vitro*, que envolvem somente a porção citoplasmática, mostram que a CdaA se organiza em dímeros, e seus sítios-ativos não estão posicionados da maneira correta para a síntese do c-di-AMP. É sugerido, portanto, que múltiplos dímeros devem se organizar em estruturas oligoméricas mais complexas para posicionar corretamente os sítios-ativos para que a produção do segundo-mensageiro aconteça.⁵⁰⁻⁵² A CdaA é responsável por manter o nível basal de c-di-AMP intracelular, e, estudos recentes, mostraram a direta interação entre a CdaA com uma enzima reguladora de sua função, a CdaR,^{17,53} e com a enzima GlmM,^{38-39,52,54} uma proteína essencial envolvida na síntese do peptidoglicano. Expressão da CdaA e CdaR em *E. coli* (que não possui a via de sinalização baseada em c-di-AMP), a quantidade de c-di-AMP formado foi cerca de 20x maior quando comparada com a cepa de *E. coli* que expressa só a CdaA. Isso mostra que a atividade da CdaA é regulada pela CdaR, mas a CdaR não é necessária para a CdaA ser ativa.¹⁷ Em cepas com expressão da DisA/CdaR-DisA e CdaS/CdaR-CdaS, a quantidade de c-di-AMP produzidos foram

similares, mostrando que a CdaA não afeta a atividade nem da DisA nem da CdaS. Portanto, a CdaR, especificamente, estimula a atividade enzimática da CdaA.¹⁷

Interessantemente, alguns patógenos importantes humanos possuem a via de sinalização baseada no c-di-AMP, como é o caso, por exemplo, da bactéria Gram-positivas *S. aureus*, sendo a CdaA sua única fonte de c-di-AMP. Esse patógeno está presente na microbiota do corpo humano, porém pode causar infecções de pele, respiratórias e intoxicação alimentar.⁵⁵ Tem grande capacidade de produzir fatores de virulência e adquirir resistência a antibióticos, sendo uma das principais causas de infecções hospitalares.⁵⁶⁻⁵⁷ Atualmente, há poucos tratamentos disponíveis para tratar infecções causadas por *S. aureus* resistentes, MRSA (*methicillin-resistant S. aureus*) e VRSA (*vancomycin-resistant S. aureus*). Antimicrobianos como daptomicina e linezolida são os últimos recursos, porém, já existem relatos de cepas isoladas resistentes a esses tratamentos.⁵⁸⁻⁵⁹ Dessa forma, a busca por agentes terapêuticos capazes de tratar até as cepas mais resistentes são essências. Sendo assim, a CdaA se apresenta como um potencial alvo molecular, dada sua importância e essencialidade como única fonte de c-di-AMP.

Esse trabalho tem, portanto, o objetivo de explorar a CdaA de *S. aureus* (SaCdaA) a fim de contribuir para os estudos de desenvolvimento de novos antibióticos/bacteriostáticos capazes de inibir a CdaA, colocando-a, de vez, como um importante alvo molecular. Estudos biofísicos e cristalográficos mostram que a organização dimérica da SaCdaA é essencial para a ligação do ATP e de seu cofator metálico, Mn^{2+} . Ainda, a ligação do substrato induz a formação de estruturas oligoméricas mais complexas, possibilitando o encontro correto dos domínios DAC entre dois dímeros diferentes, o que permite a síntese do c-di-AMP. Uma busca cristalográfica em biblioteca de fragmentos revelou um sítio de ligação interessante localizado na interface dimérica, além de fragmentos localizados nos sítios-ativos. Comparando as estruturas modeladas, observou-se que ligantes presentes na interface provocavam mudanças conformacionais que colocam a interface dimérica como um potencial inédito sítio alostérico de inibição. Ainda, estudos cinéticos mostram que a atividade da SaCdaA possui um fator cooperativo além de uma auto-regulação, sendo inibida em altas concentrações de substrato. Em conjuntos com os dados cristalográficos, sugere-se que a cooperatividade ocorra através da interação entre os $\beta 2$ - $\alpha 3$ -loops presentes na interface dimérica com o protômero vizinho.

Portanto, nosso estudo fornece uma visão mais aprofundada do mecanismo catalítico da SaCdaA, o que pode contribuir para estudos adicionais sobre o desenvolvimento racional de drogas capazes de interferir na síntese de c-di-AMP em patógenos humanos importantes, como a *S. aureus*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Transformação, expressão e purificação da SaCdaA

Cepas de *E. coli* BL21(DE3) foram transformadas via choque-térmico para inserção do vetor petSUMO contendo o gene codificante da porção citoplasmática da SaCdaA (resíduos 109-261, petSUMO-6xHis-SaCdaA₁₀₉) e plaqueadas em meio LB/ágar suplementado com canamicina na concentração final de 50 µg/ml e incubadas *overnight*. Os transformantes foram pré-inoculados em 100ml de meio LB líquido com canamicina (50 µg/ml, LB+can) e incubados sob agitação (150 rpm) por 3 h a 37 °C. O caldo bacteriano foi transferido para 900 ml de meio LB+can líquido e incubado por mais 2 h a 37 °C sob agitação de 150 rpm. Após a cultura alcançar a $DO_{600nm}=0,5-0,6$, a expressão proteica foi induzida pela adição de IPTG (concentração final de 100 µM) e incubada *overnight* sob agitação a 18 °C. As células foram colhidas via centrifugação e o *pellet* ressuscitado em 20 ml de tampão de lise (20 mM TRIS, 300 mM NaCl, 5 mM imidazol, pH 8,0). O caldo celular foi lisado via sonicação (12 min, pulsos de 30 s, amplitude 20%). Em seguida, o lisado foi clarificado por centrifugação (40 min, 12000 x g, 4 °C) e a porção sobrenadante foi carregada na coluna de cromatografia de afinidade contendo 5 ml de resina carregada com cobalto (IMAC, TALON) previamente equilibrada com o tampão de lise. A coluna foi lavada com 3x15ml de tampão de lise e 2x15 ml em tampão A (20 mM TRIS, 300 mM NaCl, pH 8,0). Então a proteína foi eluída com 2x10 ml de tampão de eluição (20 mM TRIS, 300 mM NaCl, 200 mM imidazol, pH 8,0). À solução de proteína purificada eluída foi adicionado SUMO protease (*Ubl-specific protease 1*) para clivagem da cauda de histidina, e incubado por 3 h em temperatura ambiente sob leve agitação. O clivado foi passado por uma coluna Hiprep 26/10 *desalting* (GE Healthcare) para retirada do imidazol e passada novamente pela IMAC pré-equilibrada com tampão A. A eluição da proteína purificada sem a cauda de histidina foi feita em tampão A. As frações eluídas de SaCdaA purificadas foram passadas na Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare), concentradas em concentradores 3 kDa (Millipore) até 1 mM, aliquotadas e estocadas em -80 °C após rápido congelamento em nitrogênio líquido. Em todas as etapas de purificação, foram coletadas amostras para análise em SDS-PAGE. Para

todos os mutantes, o protocolo de transformação, expressão e purificação foram os mesmos.

2.2 Purificação do c-di-AMP

Um volume de reação de 5 ml contendo 5 μM SaCdaA, 400 μM ATP e 10 mM MnCl_2 foi preparada em tampão 20 mM Tris, pH 8,0, 300 mM NaCl e mantida sob agitação em plataforma oscilante em temperatura ambiente *overnight*. Após a reação, a amostra foi aquecida a 95 °C em banho quente por 10 min para desnaturação proteica. Após resfriar até a temperatura ambiente, a amostra foi centrifugada por 20 min a 16000 x g. O sobrenadante foi separado do *pellet* e aplicado em coluna C18 (Gemini 5 μ 10x250 mm, Phenomenex) no AKTA. O sistema foi previamente equilibrado com tampão A (acetato de amônio 100 mM, pH 5,5). O método da corrida consiste em uma fase de lavagem do loop com 100% tampão A em 0,35 VC, seguido por um gradiente de 0-70% de tampão B (metanol 100%) em 1,8 VC e uma fase de equilíbrio em 0,4 VC, com fluxo a 1,25 ml/min. O pico referente ao c-di-AMP foi coletado e uma amostra aplicada no espectrômetro de massas micrOTOF-Q (Bruker) com ionizador ESI. A aquisição dos dados do massas foi feita pelo Dr. Rafael Spadaccia Panhota. Após confirmação do pico através do espectrômetro de massas, a amostra de c-di-AMP purificada foi secada em *Speedvac*. A concentração de c-di-AMP purificado foi determinada por absorbância, após ressuspensão em tampão 25 mM Tris pH 8,0 e 50 mM NaCl. O coeficiente de extinção do c-di-AMP a 259 nm é de 27000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

2.3 Curva de calibração para detecção do c-di-AMP e testes de atividade enzimática em HPLC

2.3.1 Desenvolvimento do protocolo de corrida

Inicialmente, foram determinadas as condições ótimas para a cromatografia, de modo que fosse possível resolver todos os picos referentes ao conteúdo das amostras, ATP, c-di-AMP e proteína. Foi utilizada uma coluna de troca iônica Mono-Q 5/50 GL (GE Healthcare) com dois tampões: A (25 mM Tris, pH 8,0) e B (25 mM

Tris, pH 8,0, 1 mM NaCl). Diferentes amostras contendo padrões de ATP (50 μ M, Sigma-Aldrich), c-di-AMP (10 μ M), proteína (10 μ M) e ADP (50 μ M, para verificar qualquer degradação do ATP em ADP, Sigma-Aldrich) foram injetadas em diferentes métodos. Ao final o método determinado em que todos os picos aparecem resolvidos é: 0,7 min com 5% de tampão B; gradiente linear até 30 % de tampão B em 7,7 min; isocrático com 80% de tampão B por 2 min; e 5% de tampão B por 3,3 min. Ao total, a corrida possui 15 min em fluxo de 1,2 ml/min. O sinal de absorbância foi medido em dois canais diferentes, a 259 nm, para detecção dos nucleotídeos e 280 nm para a proteína. As amostras foram injetadas com 100 μ L e foram mantidas a 4 °C.

2.3.2 Curva de calibração

A curva de calibração foi realizada aplicando concentrações em triplicatas do c-di-AMP purificado em sete concentrações, variando de 1 μ M até 50 μ M, utilizando o método determinado. Os dados dos cromatogramas foram exportados e analisados no Origin 2020, por meio da integração dos picos referentes ao c-di-AMP. Um gráfico da área integrada versus concentração de c-di-AMP injetado foi plotado e ajustado uma reta, cuja equação será utilizada nos experimentos posteriores para transformar a área do pico referente ao c-di-AMP em concentração produzida.

2.3.3 Atividade enzimática

Para testar a atividade enzimática da SaCdaA através da detecção da quantidade de c-di-AMP produzido, amostras contendo a proteína (1 μ M), ATP (100 μ M) e metais (2 mM) foram preparadas em tampão 50 mM Tris, pH 8,0, 50 mM NaCl. Foram testadas a SaCdaA nativa e os mutantes N166E, H175A, T207E e E229E na presença de Mn^{2+} . Ainda, a atividade enzimática da SaCdaA nativa foi avaliada em diferentes metais, Mn^{2+} , Mg^{2+} e Co^{2+} . As amostras foram preparadas em 600 μ L, incubadas a 25 °C e alíquotas no tempo 0 h e após 3 h de reação foram retiradas. A atividade enzimática em cada alíquota foi parada através da adição de EDTA (3 mM) e aplicadas no HPLC (Waters). Os dados foram exportados e analisados no Origin 2020, calculando a concentração produzida de c-di-AMP por meio da conversão da área do pico utilizando a equação da curva-padrão após

subtração do cromatograma no tempo $t=0$ h. Ao final, os dados tratados foram graficados em forma de histograma, e a quantidade de c-di-AMP produzido em cada amostra foi normalizada com relação à amostra da SaCdaA nativa na presença de Mn^{2+} .

Testes de atividade enzimática também foram realizados na presença de potenciais inibidores para verificar seus efeitos sobre a quantidade de c-di-AMP produzida. Nesse caso, as condições de reação e a análise dos dados foram as mesmas, apenas foi adicionado 2 mM de compostos. Todos os testes foram executados em triplicatas.

2.4 Cinética enzimática (HPLC e EnzChek™)

2.4.1 Determinação dos parâmetros cinéticos por HPLC

Amostras em triplicata, contendo SaCdaA (2 μ M), $MnCl_2$ (2 mM) e 12 diferentes concentrações de ATP (800 μ M – 12,5 μ M), foram incubadas a 25 °C. Alíquotas nos tempos $t = 0, 1, 2$ e 3 h foram retiradas e as reações paradas com a adição de EDTA (3 mM). As amostras foram injetadas no HPLC (Waters) nas mesmas condições descritas na seção 2.3.1. Os cromatogramas foram exportados e a área dos picos referente ao c-di-AMP foi integrada e transformada em concentração de c-di-AMP produzido por meio da equação da curva de calibração. Gráficos da quantidade de produto sintetizado relativo ao tempo de reação foram plotados para cada concentração de ATP. Uma reta foi ajustada para determinação das velocidades iniciais de reação na porção linear do gráfico. Ao final, obtém-se a curva de cinética enzimática, relacionando a velocidade de reação x concentração de ATP. A equação que se ajustou melhor aos dados é baseada na cinética inibida pelo substrato, porém modificada para incluir o componente de cooperatividade (Apêndice A). Essa equação foi adicionada à biblioteca de equações no Origin 2020, onde toda a análise e tratamento dos dados foram realizados.

2.4.2 Determinação dos parâmetros cinéticos por Enzchek™

A atividade da SaCdaA produz, além do c-di-AMP, pirofosfatos inorgânicos (PP_i). Dessa forma, é possível determinar sua cinética através da formação desse produto secundário. Para isso, foi utilizado o *kit* comercial *Enzchek™ Pyrophosphate Assay* (Molecular Probes).⁶⁰ Esse *kit* acopla à reação da SaCdaA uma pirofosfatase inorgânica (IP), que faz a quebra dos PP_i em fosfatos inorgânicos (P_i). A partir daí, esses fosfatos são usados pela nucleosídeo fosforilase (PNP) para converter 2-amino-6-mercapto-7-metilpurina ribonucleosídeo (MESG) em ribose-1-fosfato e 2-amino-6-mercapto-7-metilpurina. Essa conversão resulta em uma mudança no máximo de absorvância de 300 nm para 360 nm (Figura 3). Dessa forma, é possível relacionar a variação de absorvância com a quantidade de PP_i produzido.

Figura 3 – Esquema da conversão enzimática performada pela purina ribonucleosídeo fosforilase (PNP) do 2-amino-6-mercapto-7-metilpurina-ribonucleosídeo (MESG) em ribose-1-fosfato e 2-amino-6-mercapto-7-metilpurina. A conversão resulta em uma mudança no máximo de absorvância de 300 nm para 360 nm. Ao acoplar essa reação com a reação da SaCdaA, é possível relacionar a quantidade de pirofosfatos produzido pela SaCdaA, com a quantidade de MESG convertido e portanto, com o aumento da absorvância em 360 nm.

Fonte: Adaptada de ENZCHEK.⁶⁰

Embora o *kit* seja desenhado para que o acompanhamento da síntese de pirofosfatos seja feito em tempo real, foi identificada uma limitação do *kit* nos nossos testes. A enzima IP utiliza magnésio como cofator metálico para realizar corretamente sua atividade. No entanto, durante as etapas de otimização das concentrações para a cinética, foi identificado que a IP é fortemente inibida por íons manganês, justamente o cofator metálico da SaCdaA.

Etapas de otimização foram realizadas variando as concentrações de íons manganês e magnésio, concentração salina, e presença de EDTA para sequestrar os íons manganês na amostra, a fim de não afetar a atividade da IP. Essas variações foram testadas contra concentrações definidas de PP_i, e após determinadas as condições ótimas, uma curva-padrão com diferentes concentrações de PP_i foi feita, comparando com a curva-padrão controle.⁶⁰

O *kit* foi adaptado, portanto, para ser utilizado em ensaios de ponto único, e não em tempo real. As amostras em triplicatas foram preparadas em placas de 96 poços transparentes exatamente como descritas na cinética por HPLC, e as reações paradas pela adição de EDTA. A adição do agente quelante, nesse caso, não só contribuiu para cessar a reação da SaCdaA. O sequestro dos íons manganês pelo EDTA permitiu o funcionamento correto das enzimas do *kit*. A partir daí, foi adicionada a mistura do *kit* e iniciou-se a leitura da absorbância em 360 nm no leitor de placas SpectraMax I3. Embora não houvesse mais produção de PP_i por parte da SaCdaA, a leitura do sinal de absorbância se deu por 2 h, para acompanhar o crescimento do sinal de absorbância até chegar no platô. Uma média dos valores dos platôs de cada tempo, e de cada concentração de ATP diferentes resultou no gráfico em que se relaciona o sinal de absorbância x tempo de reação, para cada concentração de ATP. O sinal de absorbância foi transformado em quantidade de PP_i produzido a partir da curva-padrão determinada nas condições adaptadas do *kit*, utilizando a solução de PP_i do próprio *kit*. Com isso, retas ajustadas permitiram o cálculo da velocidade de reação, e o gráfico de cinética foi plotado, relacionando, portanto, as velocidades de reação com a concentração de ATP. Todas as análises foram feitas no Origin 2020, utilizando novamente a equação da cinética inibida por substrato com o fator cooperativo deduzida no Apêndice A.

2.5 Termoforese em microescala (MST)

A marcação da SaCdaA foi realizada com o fluoróforo NT-647-NHS⁶¹ (presente no Monolith NT™ Protein Labeling Kit RED-NHS), que reage eficientemente com as aminas primárias presentes na proteína. Portanto, é necessário que a marcação seja feita em um tampão adequado (livre de aminas primárias). O tampão foi trocado para o tampão de marcação (Hepes 50 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM) por meio de lavagens e centrifugações. Para a marcação da proteína, a concentração de SaCdaA foi ajustada para 20 μ M. O fluoróforo foi dissolvido em 100% DMSO a uma concentração de aproximadamente 435 μ M e homogeneizado. Antes de misturar a proteína e o fluoróforo, a concentração do fluoróforo foi corrigida para aproximadamente 2~3 vezes a concentração de proteína, portanto, para 60 μ M, diluindo em tampão de marcação. A mistura de proteína e fluoróforo (200 μ L, 1:1) foi então encubado em temperatura ambiente, no escuro, por 30 min. Para otimizar os resultados do MST, é necessária uma etapa de purificação da solução marcada, para eliminar o excesso de marcador que não reagiu. A solução de marcação (200 μ L) foi colocada em uma coluna pré equilibrada com tampão A (20 mM TRIS, 300 mM NaCl, pH 8,0). A eluição por gravidade foi realizada adicionando 600 μ L de tampão A. Alíquotas de aproximadamente 10 μ L foram coletadas. A pureza das alíquotas foi determinada através da medição da razão de proteína e fluoróforo (absorbância molar: 250000 M⁻¹ cm⁻¹), a partir da absorção em 280 nm e 650 nm, respectivamente.

Amostras foram preparadas em tampão A com 0,01% Tween20, para evitar qualquer tipo de interação com os capilares. As soluções-estoque de ATP/Mn²⁺ foram preparadas anteriormente e incubadas a 17°C *overnight*. Anteriormente às leituras, amostras contendo 80 nM de SaCdaA, e diluições seriadas de ATP, com concentração de Mn²⁺ constante em 2 mM, foram preparadas e centrifugadas a 13000 x g, a 25 °C por 5 min. A leitura do sinal de MST foi feita no equipamento Monolith NT.115 (NanoTemper), e as condições das medições foram ajustadas para a potência do laser de excitação em 40%, a potência do MST em 60% e temperatura de leitura a 25 °C. As análises dos dados foram realizadas no *software* próprio do equipamento (MO.Affinity Analysis – NanoTemper).

2.6 DLS

Amostras em triplicatas da SaCdaA nativa e de mutantes N166E, T207E e E229A foram analisadas em cinco condições diferentes: amostra contendo somente proteína; proteína + ATP; proteína + ATP + MnCl_2 ; proteína + ATP + MnCl_2 + EDTA; e proteína + c-di-AMP + MnCl_2 . As concentrações finais nas amostras são de 100 μM para a proteína, 300 μM para o ATP e c-di-AMP, 2 mM para o MnCl_2 e 3 mM EDTA. As amostras foram preparadas em 10 μL , imediatamente antes de cada medida e centrifugadas por 5 min a 16000 rpm. A medição foi realizada em um Zetasizer μV (Malvern Instruments Ltd.), à temperatura de 20°C com tempo de equilíbrio térmico de 180 s. Os dados foram analisados no Origin 2020.

2.7 SEC-MALS

Uma amostra de 100 μL da SaCdaA a 2mg/ml foi injetada na Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare) em sistema HPLC (Waters). Todo o sistema foi pré-equilibrado *overnight* com tampão 50mM Tris pH 8,0, 300 mM NaCl. A corrida se deu a um fluxo de 0,5 ml/min no mesmo tampão. A coluna estava acoplada a um detector de espalhamento de luz em multi-ângulos (MALS) e um detector de índice de refração. Os dados foram visualizados e analisados no *software* ASTRA 7.0.1 (Wyatt Technology). Os valores de concentração e massa moleculares foram calculados com base na calibração feita previamente com albumina de soro bovino (BSA). Amostras de mutantes e na presença de ATP (500 μM) e MnCl_2 (2 mM) se deram nas mesmas condições.

2.8 Cristalografia em larga escala com fragmentos

As etapas de cristalização e coleta dos dados de difração do complexo SaCdaA/ligante foram realizadas pelo Dr. Helton J. Wiggers durante seu BEPE, sob supervisão do Dr. Frank von Delft no SGC, Oxford. Após otimização das condições de cristalização usando quatro *kits*, JBScreen (Mitegen), LFScreen (Hampton), HIN (Hampton) e HCS (Hampton), cristais de SaCdaA (9 mg/ml) foram obtidos em tampão 19-22% PEG3350, 0,1 M Tris pH 8,0 e 0,2 M LiSO_4 , em três proporções de

proteína/líquido mãe, 1:2, 1:1 e 2:1. Os cristais cresceram por difusão de vapor a 20°C em gomas sentadas.

Para a busca de fragmentos, foi utilizada a biblioteca de fragmentos MayBridge, que consiste em 1000 compostos dissolvidos em DMSO na concentração de 100 mM. Os cristais foram mergulhados em solução contendo os fragmentos na concentração final de 20 mM (20% DMSO), por 2h e congelados.

Os dados de difração foram coletados no *Diamond beamline I04-1* com um detector Pilatus 2M CCD a 0,9173Å. A plataforma utilizada possui toda a análise dos dados de difração totalmente automatizada. Portanto, após a coleta de cada conjunto de dados, um arquivo MTZ respectivo era gerado.

Para análise dos quase 500 conjuntos de dados difratados, foi utilizado um pacote de programas desenvolvido pelo grupo do Dr. Frank von Delft. O pacote panDDA⁶²⁻⁶³ (*pan-Dataset Density Analysis*) é composto por três programas: *pandda.analyse* para processamento dos dados; *pandda.inspect*, que permite o usuário a inspecionar e modelar de forma manual os conjuntos processados; e o *pandda.export*, que gera os conjuntos modelados ligados (*bound state*) e não-ligados (*ground state*). Um maior detalhamento dos métodos usados pelo panDDA podem ser encontrados no site: <https://pandda.bitbucket.io/pandda/index.html>.

De forma resumida, o algoritmo panDDA se aproveita da grande quantidade de dados de conjuntos coletados para analisar e detectar ligantes cuja ocupância seja parcial e geralmente não é visível nos mapas cristalográficos normais (Figura 4).

Figura 4 – (A) Mapas $2mF_O-DF_C$ contornado a $1,5\sigma$ (em azul) e mF_O-DF_C contornado em $\pm 3\sigma$ (verde/vermelhor) referentes ao estado não ligado. (B) Mapas de evento do panDDA contornado a 1σ (em rosa) referentes ao estado ligado. O mapa de evento calculado pelo panDDA mostra claramente a densidade eletrônica do ligante presente, inclusive a mudança conformacional de resíduos próximos ao ligante.

Fonte: PEARCE *et al.*⁶³

O algoritmo do panDDA utiliza análises estatísticas de vários conjuntos para calcular um mapa médio do *ground state*. A partir daí, dois mapas são derivados, o *Z-map* e o mapa de evento. Para cada conjunto, é calculado um valor de Z-score⁶² que identifica áreas (eventos) que desviam significativamente do mapa médio, formando o *z-map* que se relaciona com o mapa mF_O-DF_C . Para os eventos identificados, diferentes frações do mapa médio (BDC) são subtraídas do mapa do conjunto, até maximizar a diferença entre a correlação local (ao redor do evento) e a correlação global, ou seja, maximizar o contraste entre o mapa do estado ligado e o mapa de evento. O mapa de evento, portanto, se relaciona com o $2mF_O-DF_C$ (Figura 5). No caso de busca por ligantes, são aproximações do que seria observado caso ligantes fossem observados com uma ocupância total.

Figura 5 – Todos os mapas estão com contorno equivalente a $0,4\sigma$ do mapa $2mF_O-DF_C$, referente ao refinamento do Dimple. Na medida em que mais frações do mapa médio são subtraídas do mapa $2mF_O-DF_C$ (BDC aumenta), a densidade do ligante vai ficando mais clara. Para esse exemplo, o mapa de evento foi calculado com BDC=0.88.
Fonte: PEARCE *et al.*⁶²

Para o processamento correto dos dados pelo panDDA, todos os arquivos PDB refinados devem conter o mesmo modelo proteico (mesmo número e ordem das cadeias). Para isso, foi usado o *pipeline* de refinamento *Dimple*,⁶⁴ que permite que um modelo estrutural de referência seja refinado contra cada conjunto de dados de difração. Ou seja, um mesmo modelo da proteína é refinado contra o arquivo MTZ de cada conjunto coletado. Uma vez obtidos os modelos refinados e os arquivos MTZ para cada conjunto de dados, o *pandda.analysis* está pronto para ser usado. No caso dos conjuntos de SaCdaA coletados, não se sabe *a priori* quais conjuntos possuem ligantes ou não. Caso muitos conjuntos possuíssem ligantes, a inclusão desses conjuntos no cálculo do mapa médio prejudicaria a análise global de todos os conjuntos. Portanto, uma *flag*, *z_map_type="uncertainty"*, no *pandda.analyse* foi utilizada. Isso possivelmente resulta em maior número de eventos falsos-positivos, porém, permite que a caracterização do mapa médio seja feita somente com conjuntos não-ligados. Os resultados, então, são analisados visualmente com o *pandda.inspect*, e os conjuntos com alguma característica interessante (mudanças conformacionais ou ligantes, por exemplo) são excluídos da próxima rodada de análise. Esse ciclo é repetido até que nenhum conjunto mais seja identificado. Ao final, uma última rodada de análise é realizada, sem a *flag*, somente excluindo os conjuntos ligados da caracterização do mapa médio. Com isso, os

mapas de eventos são melhores calculados, permitindo uma melhor definição das mudanças estruturas causadas pela interação dos ligantes.

Os resultados então são inspecionados no *pandda.inspect*, e uma modelagem inicial é feita. Inicialmente, são alternadas possíveis conformações da cadeia proteica, e deletadas moléculas de solvente que não estão presentes no mapa de evento. Em seguida, é adicionado os ligantes nas respectivas densidades, e adicionadas novas moléculas de solvente. O modelo do estado ligado, então, está pronto para ser refinado. Todo esse processo é realizado no Coot,⁶⁵ que é integrado com o *pandda.inspect*.

Por fim, os modelos são exportados pelo *pandda.export*, em que é gerado um modelo completo, multi-estado (*ensemble*), que representa tanto o estado ligado quanto o não-ligado. Ao estado ligado é dado uma conformação alternativa da proteína (conformação B, por exemplo), de modo que a conformação A, representa o estado não-ligado. Portanto, nesse modelo completo, é possível observar tanto as moléculas de solvente sobrepostas ao ligante, de modo que a ocupação total seja unitária. Além do modelo multi-estado, são gerados arquivos de restrições para o refinamento, para manter consistente todas as diferentes conformações e ocupâncias. Com isso, o modelo completo foi refinado com o Phenix.⁶⁶ Caso fosse necessária alguma correção do modelo refinado, os estados ligados e não-ligados foram separados, e corrigidos utilizando os mapas de evento e médio, respectivamente. Após as correções, os modelos foram mergeados, geradas novas restrições e refinados. Uma vez satisfeito com o modelo refinado completo, os ligantes foram validados através de cinco critérios, RSCC (*real-space correlation coefficient*), RSZD (*real-space difference Z-score*), RSZO (*real-space observed Z-score*), B-ratio (razão entre os B-fatores do ligante/proteína) e RMSD (movimento do ligante após refinamento).

2.9 Cristalografia com análogos

Após identificação dos fragmentos ligados na cristalografia em larga escala, alguns compostos análogos foram comprados e testados cristalograficamente. As condições de cristalização foram as mesmas utilizadas na campanha em larga

escala. A aquisição dos dados foi realizada na linha MX-2 do LNLS (Laboratório Nacional de Luz Sincrotron, CNPEM, Campinas) e processados no XDS⁶⁷. A resolução das estruturas foi feita através da substituição molecular, e refinadas por meio de ciclos iterativos no COOT⁶⁵ e Phenix.⁶⁶ Análises panDDA, utilizando a metodologia descrita anteriormente, também foram realizadas com o objetivo de facilitar a determinação da posição dos ligantes e posterior validação.

2.10 Ensaio de luminescência – *Kinase-Glo® Luminescent Assay*

Como forma de testar em larga escala os compostos análogos, um ensaio de luminescência foi proposto. O *kit* utilizado foi o *Kinase-Glo® Luminescent Assay*, que foi desenvolvido e otimizado para uso em proteínas quinases, utilizando o ATP não consumido na reação. O ATP remanescente é, então, usado pela luciferase para catalisar a mono-oxigenação da luciferina, resultando na emissão de um fóton por conversão da luciferina em oxi-luciferina (Figura 6).^{68–71} Como a reação catalisada pela luciferase depende somente do ATP não consumido, é possível adaptar para a reação da CdaA. Dessa maneira, o sinal luminescente resultante da reação da SaCdaA será proporcional à quantidade de ATP não convertido em c-di-AMP. Isso permite, portanto, determinar a capacidade de um composto em inibir a produção de c-di-AMP.⁷² Se a atividade da SaCdaA é inibida, haverá uma maior quantidade de ATP não consumido, o que resultará em um maior sinal luminescente. Portanto, o sinal de luminescência é inversamente proporcional à atividade enzimática.

Figura 6 – Após a adição da mistura do *kit Kinase-Glo® Luminescent Assay*, o ATP não consumido é utilizado pela luciferase para catalisar a reação de mono-oxigenação da luciferina. A reação produz um fóton de luz por ciclo de conversão. Portanto, o sinal de luminescência será inversamente à reação da SaCdaA.

Fonte: Elaborada pelo autor

Para avaliar a capacidade inibitória dos compostos, reações de diadenilato ciclase foram preparadas em placas de 96 poços branca, misturando 1 µM de SaCdaA, 100 µM ATP e 2 mM de Mn²⁺. A concentração reacional de cada composto testado foi de 2 mM (10% DMSO). Após 3 h de reação, a mistura do *kit* foi

adicionada (V:V = 1:1), incubado por 30 min para estabilização do sinal de luminescência e, então, o sinal de luminescência foi medido no equipamento SpectraMax I3 (molecular Devices), usando as configurações *default*.

Os controles de inibição positivo (ausência de SaCdaA, simulando a inibição total da enzima) e negativo (reação somente com 10% DMSO) foram utilizados para cálculo da estatística do ensaio, através da avaliação do fator-Z. O fator-Z (Z') é bastante utilizado em ensaios em larga escala para avaliar a capacidade do ensaio em identificar *hits*, através da comparação do sinal de muitas medidas únicas com relação às médias (μ) e desvios-padrão (σ) dos controles positivo (p) e negativo (n).⁷³⁻⁷⁵ É definido como:

$$Z' = 1 - \frac{3(\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|}$$

Valores de $Z' > 0,5$ indicam que o ensaio é adequado e capaz de identificar *hits* que são estatisticamente diferentes dos controles. Valores de Z' que se aproximam de 1 são considerados ótimos.

Os resultados do ensaio foram graficados no Origin 2020, convertendo o sinal de luminescência em porcentagem de atividade diadenilato ciclase remanescente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Expressão e purificação da CdaA

A clonagem, transformação em *E. coli* e testes de expressão e purificação foram conduzidos pela Dr. Nathalya C. M. R. Mesquita⁷⁶ com uma construção que inicialmente compreendia toda a poção citoplasmática da CdaA (resíduos 86-269), SaCdaA₈₆ (Figura 7A). Entretanto, essa construção resultava em dados de difração em baixa resolução (2,5 Å). Uma nova construção foi desenhada pelo Dr. Helton Wiggers durante seu BEPE no laboratório do Dr. Frank von Delft, que compreendia os resíduos 109-261, referentes somente ao domínio DAC (Figura 7A). Essa nova construção (SaCdaA₁₀₉) permitiu dados cristalográficos de alta resolução (até 1,1 Å). Portanto, todos os estudos presentes nesse trabalho foram realizados utilizando essa nova construção, doravante denominada somente de SaCdaA.

Figura 7 – (A) Esquemática dos domínios presentes na SaCdaA. Possui três hélices transmembranas (TM) presentes no N-terminal, seguido do domínio DAC responsável pela síntese do c-di-AMP. (B) Estrutura cristalográfica da porção citoplasmática da SaCdaA. Os principais motivos conservados estão explicitados: HDGA e TRHR (em azul) são responsáveis pela interação com a adenosina do ATP, e EE (vermelho) pela interação com os fosfatos. A interface dimérica composta pela fita $\beta 2$, hélice $\alpha 3$ e o $\beta 2$ - $\alpha 3$ -loop está explicitada em roxo.

Fonte: Elaborada pelo autor

Os mutantes utilizados nesse trabalho também são decorrentes dos estudos da Dr. Nathalya C. M. R. Mesquita,⁷⁶ derivados da construção referente à poção citoplasmática integral (SaCdaA₈₆). Todos os vetores clonados foram gentilmente cedidos pela Dr. Nathalya Mesquita e pelo Dr. Helton J. Wiggers para a realização desse trabalho.

O protocolo para expressão e purificação de todas as construções (seja nativa ou mutantes) são os mesmos, conforme descrito na metodologia (sessão 2.1). As etapas de purificação (por afinidade e exclusão molecular) foram acompanhadas

através de eletroforese em gel de poliacrílamida SDS 20% (Figura 8A). Todas as construções se mostram bem purificadas, com banda única e diméricas em solução,^{52,72,76} exceto o mutante N166E, que se mostrou ser um monômero (Figura 8B). O resíduo N166 é um resíduo chave para a rede de interações da interface dimérica. De fato, um estudo recente com mutantes desenhados para impedir essa interação levou à quebra do dímero e, consequentemente, a perda da atividade do monômero de CdaA (N166K).⁵² Um outro mutante desse mesmo estudo, desenhado para ligar covalentemente os protômeros, através de pontes dissulfeto (N166C), mostrou que o dímero mutante ainda tinha atividade.⁵²

Figura 8 – (A) Análise em SDS-PAGE 15% da purificação da SaCdaA: MW-padrão de massas moleculares; S-sobrenadante; F-flow-through da coluna; I1-1ª lavagem com imidazol 10 mM; I2-2ª lavagem com imidazol 10 mM; I3-3ª lavagem com imidazol 10 mM; L1-1ª lavagem sem imidazol; L2-2ª lavagem sem imidazol; E1-Eluição com 200 mM imidazol; C-clivagem com SUMO protease; F_{cliv}-Flow-through da coluna após clivagem; 500-lavagem com 500 mM imidazol; GF-gel-filtração. A seta indica a banda da SaCdaA após sua purificação por exclusão molecular. Observa-se uma banda única, mostrando que a proteína foi bem purificada. (B) Cromatograma resultante da purificação por exclusão molecular em coluna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare). Os tempos de eluição de das proteínas purificadas se mostraram compatíveis com a curva de calibração, permitindo uma boa estimativa da massa molecular.

Fonte: Elaborada pelo autor

3.2 Cristalografia em larga escala

A partir da testagem com a biblioteca de fragmentos MayBridge, com cerca de 1000 compostos dissolvidos em DMSO, utilizando a técnica de *soaking* para investigar potenciais interações desses compostos com a CdaA, 434 conjuntos de dados e difração foram obtidos, com resoluções que variam de 2.00-1,07 Å. Esses conjuntos foram inicialmente processados de forma automática pelo *pipeline* presente no Diamond. Esses conjuntos foram preparados a partir de um refinamento automático utilizando uma estrutura APO da CdaA previamente bem modelada ($R_{\text{free}}=19,66$; $R_{\text{work}}=17,65$) e o arquivo .mtz proveniente do processamento automático de cada conjunto, uma vez que foi observada um erro na indexação do grupo espacial em 16 conjuntos, indexados ou no grupo $P2_12_12$ ou $P2_12_12_1$ mas com permutações nos eixos da cela unitária. O refinamento automático foi feito utilizando o DIMPLE. A estrutura APO utilizada aqui continha uma dupla conformação no $\beta 2$ - $\alpha 3$ -loop presente na interface dimérica, já que estudos anteriores mostraram a mudança conformacional desse loop na presença de ligantes semelhantes na interface.⁷² Portanto, ao final do processo de refinamento automático, os 434 conjuntos estavam prontos para serem analisados, cada um contendo um arquivo .pdb com o modelo de estrutura refinado em dupla conformação, e o arquivo .mtz correspondente. Vale destacar que o uso de bibliotecas de fragmentos e/ou bibliotecas não-direcionadas para um determinado alvo, como a utilizada aqui, é esperada a observação de interações em sítios não-reais, fruto de artefatos da cristalização. Entretanto, nos sítios em que se observa diversos ligantes, é mais provável que seja, de fato, um sítio relevante de interação enzima-inibidor. Porém, é esperado que a afinidade desses ligantes seja baixa, refletindo em uma baixa ocupância quando observado o mapa de densidade eletrônica. Dessa forma, dada a grande quantidade de conjuntos de difração coletados resultados da triagem cristalográfica em larga escala e a potencial interação fraca entre proteína-ligante, é inviável a observação e modelagem manual. Portanto, foi utilizado o PanDDA (Pan-Dataset Density Analysis), um método desenvolvido pelo grupo do Dr. Frank von Delft para análise semiautomática dos dados coletados⁶² O método consiste na caracterização de um mapa de densidade médio APO (*ground-state*) a partir de múltiplos *datasets* isomórficos (em termos de indexação do grupo, parâmetros de cela e conformação geral da macromolécula); identificação de eventos de ligação,

baseados no cálculo de mapas de diferença isomórfica,⁷⁷ e subtração do mapa *ground-state* (chamado de BDC, *background density correction*), calculado nos conjuntos com eventos detectados, gerando um mapa de densidade eletrônica do evento. O evento nesse caso, é qualquer fator de estrutura que devia de forma estatisticamente relevante do *ground-state*. No final da análise, os resultados dos mapas de evento mostram as possíveis alterações conformacionais, tanto do *backbone* da proteína, quanto das cadeias laterais, induzidas pela ligação de compostos.

O pacote PanDDA possui três protocolos, o *pandda.analyse* para processamento dos dados; o *pandda.inspect* para inspeção dos resultados; e o *pandda.export* para refinamento e depósito das estruturas. Os 434 conjuntos foram então analisados usando o *pandda.analyse*, seguindo as instruções presentes no site <https://pandda.bitbucket.io/pandda/tutorials.html>. Após preparação dos conjuntos, através do refinamento automático do DIMPLE e povoamento de possíveis reflexões inválidas ou ausentes nos arquivos .mtz que contém dos dados das reflexões, os conjuntos estavam prontos para análise. Como não se sabia previamente quais conjuntos continha ou não ligantes para o cálculo do mapa médio, uma *tag* (*z-map_type="uncertainty"*) foi adicionada à linha de comando para que até pequenas diferenças nos fatores de estruturas observados no mapa médio relativo à cada conjunto fosse interpretado como um evento. Isso resulta em mais falsos-positivos, mas não rejeita *datasets* com ligantes. Após o processamento dos dados com essa *tag* (*pandda.analyse*), os *datasets* com eventos foram analisados visualmente de forma manual. Os conjuntos em que se observou claramente a densidade do ligante foram então excluídos da etapa de caracterização e do cálculo do *ground-state*. Rodadas subsequentes de análise e inspeção foram repetidas até que nenhum novo conjunto com eventos fosse identificado. Ao final, uma última análise foi feita, em que foram excluídos do cálculo do mapa médio), sem a *tag*, de modo que os mapas diferença refletissem somente as densidades relativas aos ligantes. Ao final das iterações, foram observados 51 conjuntos com ligantes, de um total de 415 conjuntos (alguns conjuntos foram rejeitados das análises por possuir $R_{\text{free}} > 40$). Entretanto, durante as inspeções manuais entre as rodadas de análise, alguns conjuntos pareciam possuir ligantes (em outras cadeias da proteína), mas não foram considerados como eventos na rodada final. Isso motivou uma nova

rodada de refinamentos automáticos com o DIMPLE, mas agora usando uma estrutura mais bem refinada ($R_{\text{free}}=17,59$; $R_{\text{work}}=16,86$) a partir do mapa médio calculado nesse primeiro ciclo do PanDDA (especificado no texto doravante como panDDA-1). Então, realizou-se um segundo ciclo de iterações de análise e inspeção (panDDA-2), seguindo a mesma metodologia, até que todos os conjuntos que apresentassem algum evento tivessem sido excluídos do cálculo do mapa médio, incluindo todos os conjuntos observados no primeiro ciclo. Ao final das iterações, oito novos conjuntos foram identificados (de um total de 428 analisados), além dos 51 previamente encontrados no panDDA-1, totalizando 59 *hits*.

A partir das estatísticas dos protocolos do panDDA, observou-se que alguns conjuntos possuíam parâmetros de rede ligeiramente diferentes da média dos conjuntos, principalmente nos valores dos eixos b e c. Ainda, a posição atômica dos modelos desses conjuntos deveria possuir um pequeno deslocamento com relação à estrutura média, já que, com relação à estrutura média, tinha valor de RMSD > 0.6 (Figura 9). Essas pequenas alterações podem ser oriundas de uma possível interação entre proteína-ligante, resultando em uma alteração no arranjo cristalino. Um estudo mostrou que o método panDDA é mais eficiente quando existe uma coleção de *datasets* com modelos isomórficos. O estudo usou quatro grandes conjuntos da literatura e comparou os resultados antes e depois do agrupamento em *clusters* dos conjuntos. Em todos os quatro *datasets* analisados, a divisão em *clusters* resultou em maior taxa de *hits*, ou seja, novas estruturas com ligantes foram encontradas⁷⁸ Isso nos motivou, portanto, a realizar uma análise mais profunda dos nossos conjuntos. O método utilizado no estudo é baseado na correlação entre as posições atômicas dos C α (análise no espaço real) e na correlação entre as amplitudes F das reflexões (espaço recíproco) entre dois conjuntos. Essas análises foram realizadas através do programa Cluster4X.⁷⁸

Figura 9 – (A) Histograma resultando das análises panDDA referentes aos conjuntos processados. Observa-se que alguns poucos conjuntos possuem valores de tamanho de célula unitária diferentes da maioria dos conjuntos, especialmente no eixo 'B' (74,5-76 Å) e 'C' (96-97,3 Å). (B) A diferença nos eixos acarreta em um modelo estrutural com posições atômicas ligeiramente diferentes com relação à estrutura referência, resultando em um RMSD mais alto (em Å).

Fonte: Elaborada pelo autor

A partir de uma análise de C α de todos os 428 *datasets* coletados, um conjunto de 37 *datasets* confirmou o observado nas estatísticas do panDDA. Esses 37 *datasets* realmente continham parâmetros de rede muito diferentes da média, especialmente nos eixos b e c, e então, foram agrupados no grupo A. Os modelos refinados desse grupo revelaram que as cadeias proteicas sofreram um movimento *scissor-like*, quando sobrepostas às estruturas de todos os outros conjuntos (Figura 10A). Os protômeros observados estão mais compactos, de modo que o volume da cela unitária é ligeiramente menor (Figura 10B). Portanto, uma estrutura representativa desse grupo foi bem refinada e um auto-processamento do DIMPLE foi feito para todas as estruturas desse grupo. Uma nova rodada do panDDA somente com o grupo A foi feita, seguindo a mesma metodologia anterior, e foi encontrado 1 novo *hit*. Isso mostra a importância de se ter um conjunto de estruturas o mais isomorfo possível, sendo possível identificar fragmentos ligados mesmo que em baixa ocupância. Esse resultado incentivou uma análise maior das outras 391 estruturas restantes, em busca de isomorfismos mais sutis, ainda que os conjuntos se mostrassem relativamente homogêneos. A análise adicional resultou em 6 novos grupos (B->G) (Figura 10C).

Figura 10 – (A) Os conjuntos com alto valor de RMSD (em roxo) relativo aos outros conjuntos (em vermelho) apresenta uma cadeia proteica ligeiramente mais compacta, como se sofresse um movimento *scissor-like*. (B) Esses conjuntos possuem valores dos eixos 'b' e 'c' da célula unitária diferentes do resto dos conjuntos, o que resulta em um volume menor da célula unitária. (C) Análises do Cluster4x comparando as posições dos Ca mostraram que os conjuntos diferentes se agrupam em um cluster 'A'. Análise dos conjuntos restantes revelou pequenos clusters de estruturas isomórficas, formando outros grupos 'B-G'.

Fonte: Elaborada pelo autor

Para uma boa análise do panDDA, é necessário um número mínimo de 40 conjuntos para a caracterização e cálculo do mapa médio. Portanto, os grupos foram divididos até um limite de *datasets* de cerca de 60 ou até que as *datasets* restantes se mostrassem homogêneas o suficiente de modo a não ser possível a visualização de novos agrupamentos. Então, fez-se novos ciclos de análise do panDDA dentro de cada grupo, seguindo a metodologia anterior, que resultaram, surpreendentemente, em mais 8 novas estruturas ligadas. A tabela 1 sumariza todas as etapas de cada ciclo de análise do panDDA.

Tabela 1 – Média dos parâmetros cristalográficos dos 434 conjuntos analisados pelo panDDA e dos agrupamentos

Cluster (datasets)	R_{work} médio	R_{free} médio	Cela unitária			Resolução média (Å)	Hits
	(%)	(%)	a (Å)	b (Å)	c (Å)		
PanDDA-1 (415)	20 ± 3	21 ± 4	42,1 ± 0,3	79 ± 1	95 ± 1	1,3 ± 0,2	51
PanDDA-2 (428)	19 ± 3	21 ± 4	42,1 ± 0,4	79 ± 1	95 ± 2	1,3 ± 0,2	8
Grupo A (37)	21 ± 2	25 ± 3	42,2 ± 0,5	75,1 ± 0,5	96,5 ± 0,5	1,6 ± 0,2	1
Grupo B (57)	20 ± 2	22 ± 3	42,0 ± 0,2	79,4 ± 0,4	95,2 ± 0,4	1,4 ± 0,2	0
Grupo C (74)	19 ± 2	21 ± 3	41,8 ± 0,3	79,3 ± 0,2	94,9 ± 0,2	1,4 ± 0,2	1
Grupo D (63)	19 ± 1	20 ± 2	41,9 ± 0,1	79,4 ± 0,1	94,8 ± 0,2	1,3 ± 0,1	1
Grupo E (83)	19 ± 2	21 ± 3	42,3 ± 0,2	79,6 ± 0,4	94,6 ± 0,5	1,4 ± 0,2	3
Grupo F (58)	18 ± 1	19 ± 1	42,1 ± 0,1	79,4 ± 0,1	94,7 ± 0,2	1,2 ± 0,1	2
Grupo G (56)	18 ± 2	19 ± 2	42,2 ± 0,1	79,51 ± 0,07	94,73 ± 0,09	1,19 ± 0,08	0

Fonte: Elaborada pelo autor

Após a finalização de cada ciclo iterativo do panDDA (panDDA-1, panDDA-2, e os grupos), os resultados de cada processamento são inspecionados no *pandda.inspect*. Aqui, é utilizado uma versão customizada do *coot* em conjunto com uma janela de controle do panDDA. Dois mapas de densidade eletrônica são mostrados para cada evento detectado. O mapa de evento mostra a densidade corrigida pela subtração da fração do mapa médio dos conjuntos de dados (1-BDC). Esse mapa é similar aos mapas $2mF_o - DF_c$. O segundo mapa de densidade (*Z-map*) mostra os desvios relacionados à média dos conjuntos (*Z-score*). Desvios maiores que ± 3 do *Z-score* pode ser um indicativo de características únicas de cada

Fonte: Elaborada pelo autor

Fonte: Elaborada pelo autor

A modelagem da estrutura ligada deve seguir alguns parâmetros.⁶³ É recomendado que seja feita a correção das alterações conformacionais que são mostradas no mapa de eventos, e em regiões com valores de *Z-score* maiores que ± 3 . Inicialmente, deve-se deletar e/ou corrigir as moléculas de solvente e as conformações do modelo inicial que não se relacionam com o mapa de eventos. Em seguida, são corrigidos eventuais posicionamento dos rotâmeros que sofreram algum tipo de movimento. Por fim, deve-se modelar o ligante em sua densidade correspondente. Esse protocolo deve ser seguido para cada evento encontrado.

Uma vez finalizada a modelagem de todos os *datasets*, os modelos são exportados para refinamento, utilizando o *pandda-export* (Figura 12).

Figura 12 – Exemplo comparativo para ilustrar a capacidade da análise panDDA em identificar potenciais sítios de ligação. No mapa *input*, resultante da substituição molecular, é impossível identificar algum ligante presente. No entanto, após cálculo do mapa médio e subtração do BDC, os mapas de evento e *z-map* mostram claramente a densidade eletrônica referente ao ligante. Ao final, é possível modelar com clareza o ligante e as potenciais alterações conformacionais causadas pela interação enzima-ligante.

Fonte: Elaborada pelo autor

Os arquivos exportados para refinamento são os pdb's e mtz's iniciais, o arquivo pdb modelado, os mapas de evento e *Z-map*, os arquivos referentes aos ligantes, e um arquivo pdb *ensemble*. Esse último arquivo é uma fusão entre os modelos iniciais (pré-modelagem) e as estruturas modeladas. Ou seja, qualquer alteração feita no modelo inicial, como as descritas acima, é tratada como uma conformação alternativa da macromolécula. Dessa maneira, existe um estado não-ligado, proveniente dos modelos iniciais, e o estado ligado, resultado das mudanças conformacionais e alterações do solvente devido à presença do ligante. Essa forma de tratar os diferentes modelos é especialmente necessária quando se trata de ligantes com baixa ocupação. Esses ligantes aparecem em poucas células unitárias do cristal, e, portanto, os mapas devem refletir, além da densidade dos ligantes, a presença do solvente (que estão em maior quantidade em cada molécula do cristal).⁶³ A vantagem de usar a metodologia do panDDA é justamente a capacidade de verificar e refinar os estados não-ligados e ligados presentes em um mesmo cristal, expondo as alterações que ocorrem na proteína resultantes da ligação de pequenas moléculas.

Dessa forma, as etapas de refinamento também devem seguir alguns protocolos.⁶³ Os estados não-ligado e ligado são separados durante a etapa de remodelagem no *coot*. Para o estado não-ligado, deve-se utilizar o mapa médio, que representa a estrutura APO. No caso do estado ligado, os mapas utilizados são os de evento e o *Z-map*. Após inspeção no *coot*, os estados são novamente fundidos no arquivo *ensemble*. Nesse arquivo, os diferentes estados são tratados como conformações alternativas, ou seja, a conformação A se refere ao estado não-ligado, e a conformação B, o estado ligado, por exemplo. Dessa forma, os estados presentes no *ensemble* são cristalograficamente corretos. Ou seja, o confômero A “enxerga” somente átomos do confômero A, de modo que nenhum resíduo da conformação A está ligado ou interage com um resíduo da conformação B.

Para o refinamento, foi usado o pacote *phenix.refine*. Porém, aqueles resíduos em que não tiveram sua conformação alterada pela presença do ligante devem ter restrições quanto aos graus de liberdade, para que o modelo refinado não sofra um *overfitting*. As ocupâncias também devem ser normalizadas e cada confômero deve contribuir para que o modelo final tenha ocupância igual a 1. Essas restrições são geradas a partir de *scripts* embutidos no pacote do panDDA. Dessa maneira, alguns ciclos de divisão do *ensemble*, remodelagem no *coot*, fusão do *ensemble* e refinamento (*phenix.refine*) são suficientes para resultar em um modelo final que contém os estados não-ligado e ligado bem refinados.

Os fragmentos identificados através pelo panDDA, a partir de um ensaio em larga escala com uma biblioteca com alta variabilidade de espaço químico, não é esperado que se encontre ligantes com alta afinidade, especialmente que o *soaking* foi feito com 40 mM dos compostos. Dessa forma, espera-se que a ocupância dos *hits* seja baixa. Para se determinar a ocupância dos ligantes encontrados, foi utilizado inicialmente o valor de $2 \times (1 - \text{BDC})$. Lembrando, o valor de 1-BDC é a fração do mapa médio (valor diferente para cada evento) que representa o estado ligado, e, portanto, deve estar relacionado com a ocupância. Empiricamente, o valor a ocupância se relaciona com o valor de 1-BDC por um fator de 2.2.⁶² Ou seja, durante o processo de refinamento, as ocupâncias iniciais de cada ligante são escolhidas como sendo $2,2 \times (1 - \text{BDC})$. Analisando os dados obtidos pelo panDDA, os valores calculados de 1-BDC para os fragmentos encontrados variam, majoritariamente, entre 5-20%. Isso mostra que houve uma grande subtração do mapa médio (entre

80-95%) para que fosse possível observar a densidade relativa ao ligante, evidenciando a baixa contagem desses compostos nas moléculas de proteína que compõem o cristal. Nos modelos refinados finais, grande parte dos ligantes foram refinados com ocupância entre 20-50%. (Figura 13). Portanto, nossos resultados confirmam a observação empírica da relação entre a ocupância refinada com o valor de 1-BDC, porém por de um fator de $2,60 \pm 0,09x$. Essa baixa ocupância é parcialmente decorrente da baixa afinidade dos compostos pela CdaA.

Figura 13 – A correlação entre a ocupância refinada e o valor de 1-BDC obtida nos conjuntos analisados pelo panDDA resulta em um valor de 2,6.

Fonte: Elaborada pelo autor

Os modelos atômicos refinados dos estados ligados foram validados a partir de cinco parâmetros.^{62-63,79} Três parâmetros dizem respeito à densidade eletrônica: RSCC (*real-space correlation coefficient*), que reflete o *fit* dos átomos do fragmento dentro da densidade eletrônica observada. A correlação entre as densidades observadas e do modelo deve ser tipicamente > 0.7 ; o valor de RSZD (*real-space Z*-

difference score) avalia a significância estatística (acurácia) da densidade do mapa diferença (*Z-score*) que é encontrada em torno desses átomos, e tipicamente tem seu valor $RSZD < 3$; o valor de RSZO (*real-space Z-observed*) avalia a precisão da densidade do modelo com relação ao ruído do mapa. Como a densidade observada de um átomo é diretamente relacionada com sua ocupância, o valor normalizado de RSZO/OCC pode ser utilizado para indicar erros no valor da ocupância do modelo ou erros no posicionamento dos átomos na densidade. Tipicamente, seu valor é $RSZO/OCC > 2$. Outros dois parâmetros que não tem relação direta com a densidade eletrônica observada são *B-factor ratio*, que avalia a consistência dos valores de *B-factor* do ligante com relação aos *B-factors* dos resíduos ao redor, valores esperados são tipicamente ~ 1 ; e o valor de RMSD (*coordinate root-mean square deviation*) compara a posição dos átomos do fragmento inicialmente modelado relativo à posição dos átomos do fragmento ao final do refinamento. Valores $< 1 \text{ \AA}$ são esperados. Um gráfico do tipo radar é gerado ao final da validação para cada evento modelado. No Apêndice B, C e D, os gráficos-radar correspondentes aos fragmentos do sítio ativo, interface dimérica e outros sítios são mostrados, respectivamente. No Apêndice E, é mostrada uma tabela que sumariza todos os valores da validação para cada evento modelado, juntamente com dados de resolução e valores de R_{free} e R_{work} dos modelos finais refinados.

Foram modelados fragmentos em 95 eventos no total. Em 81 eventos, todos os valores dos parâmetros de validação se apresentaram ótimos. Embora todos os ligantes tenham sido refinados com ocupância abaixo da unitária, a qualidade dos ligantes se manteve alta, com valores de RSCC maiores que 0.7 (Figura 14). Apenas 14 ligantes modelados tiveram valores entre $0,55 < RSCC < 0,7$.

Figura 14 – Relação entre a ocupância refinada e o coeficiente de correlação no espaço real (RSCC). Embora a maioria dos ligantes possuam ocupância baixa, a qualidade do modelo dos ligantes são altas, com $RSCC > 0,7$. Apenas 14 modelos (em vermelho) não alcançaram o limiar mínimo. A validação completa de cada modelo estão listadas nos apêndices B,C,D e E.

Fonte: Elaborada pelo autor

Ao final de todo o processo de análise, inspeção e modelagem e refinamento, nos vários ciclos de panDDA testados, encontrou-se 72 fragmentos localizados, sendo que cinco conjuntos continham os mesmos fragmentos ligados em dois sítios distintos. Portanto, 67 estruturas diferentes foram modeladas (Figuras 15, 16 e 17). Isso representa uma taxa de *hit* de aproximadamente 16,6%. Na inspeção manual realizada em estudo anterior, sem o uso da metodologia do panDDA, em apenas 11 *datasets* foram observados ligantes, uma taxa de *hit* de apenas 2,5%.⁷²

Figura 15 – Conjuntos modelados com eventos encontrados no sítio ativo. Os mapas de evento (em azul, $1,5\sigma$) e *z-map* (em verde/vermelho, $\pm 3\sigma$) mostram com clareza os ligantes. Os nomes dos conjuntos em verde foram encontrados na primeira análise, panDDA-1; os nomes em vermelho, são aqueles encontrados na segunda análise, panDDA-2; e em azul, são os nomes dos conjuntos cujos *hits* foram encontrados na análise dos *clusters* após agrupamento dos conjuntos mais isomórficos.

Fonte: Elaborada pelo autor

(continua)

(conclusão)

Figura 15 – Conjuntos modelados com eventos encontrados no sítio ativo. Os mapas de evento (em azul, $1,5\sigma$) e *z-map* (em verde/vermelho, $\pm 3\sigma$) mostram com clareza os ligantes. Os nomes dos conjuntos em verde foram encontrados na primeira análise, panDDA-1; os nomes em vermelho, são aqueles encontrados na segunda análise, panDDA-2; e em azul, são os nomes dos conjuntos cujos *hits* foram encontrados na análise dos *clusters* após agrupamento dos conjuntos mais isomórficos.

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 16 – Conjuntos modelados com eventos encontrados na interface diméria. Os mapas de evento (em azul, $1,5\sigma$) e *z-map* (em verde/vermelho, $\pm 3\sigma$) mostram com clareza os ligantes. Os nomes dos conjuntos em verde foram encontrados na primeira análise, panDDA-1; os nomes em vermelho, são aqueles encontrados na segunda análise, panDDA-2; e em azul, são os nomes dos conjuntos cujos *hits* foram encontrados na análise dos *clusters* após agrupamento dos conjuntos mais isomórficos.

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 17 – Conjuntos modelados com eventos encontrados em outros sítios. Os mapas de evento (em azul, $1,5\sigma$) e z -map (em verde/vermelho, $\pm 3\sigma$) mostram com clareza os ligantes. Os nomes dos conjuntos em verde foram encontrados na primeira análise, panDDA-1; os nomes em vermelho, são aqueles encontrados na segunda análise, panDDA-2; e em azul, são os nomes dos conjuntos cujos *hits* foram encontrados na análise dos *clusters* após agrupamento dos conjuntos mais isomórficos.

Fonte: Elaborada pelo autor

Os ligantes se distribuem em três principais sítios de interação: o sítio ativo, a interface dimérica e outros sítios. No sítio ativo, foram encontrados 31 fragmentos. Curiosamente, 17 fragmentos apareceram ligados em um bolsão na interface dimérica essencial. E outros 24 fragmentos se encontram distribuídos em outros locais de interação, majoritariamente, na hélice do C-terminal, aparentemente sem relação com o sítio ativo, provavelmente resultado de artefatos devido ao arranjo cristalino (Figura 18).

Figura 18 – Análises panDDA identificou vários sítios de interação entre a SaCdaA e os fragmentos. A maioria deles foram encontrados nos sítios-ativos (A/A'), com 31 fragmentos; a interface dimérica abriga 17 fragmentos (sítios B/B'); outros sítios secundários identificados, C e D, interagem com 21 e 3 fragmentos, respectivamente.

Fonte: Elaborada pelo autor

3.2.1 Fragmentos no sítio ativo

Dentre os 31 fragmentos encontrados no sítio ativo, 10 deles estão presentes somente em uma das cadeias do dímero da CdaA, sendo 2 presentes na cadeia B e 8 na cadeia A. Os outros 21 fragmentos estão presentes nos sítios dos dois protômeros. Os fragmentos encontrados nos sítios estão localizados principalmente no bolsão de interação da adenosina do ATP (Figura 19A). Na estrutura ligada ao ATP, os principais resíduos responsáveis pela interação com a adenosina são

Leu193 e Tyr192, responsáveis pelo reconhecimento da adenina, e o Asp176, que forma ligações de hidrogênio com a ribose. Nas estruturas do complexo enzima-ligante, esses mesmos resíduos se mostraram importantes na interação com os fragmentos (Figura 19B).

Figura 19 – (A) Principais resíduos responsáveis pela interação da SaCdaA com a adenosina do ATP (em azul). Ênfase para Y192, que sofre uma mudança conformacional para se posicionar de maneira apropriada para interagir com os anéis aromáticos da adenina via π -stacking. (B) Os fragmentos encontrados no sítio ativo (em verde) estão interagindo com a SaCdaA através dos mesmos resíduos. Muitos fragmentos contém anéis aromáticos presentes na mesma posição da adenina, e nesse caso, o resíduo Y192 também altera seu rotâmetro para possibilitar a interação via π -stacking.

Fonte: Elaborada pelo autor

Existe uma alta ocorrência de fragmentos com anéis aromáticos nitrogênio-substituídos exatamente na posição da adenina do ATP, cuja principal interação é via ligações de hidrogênio com o nitrogênio da cadeia principal da Leu193. Ainda, o resíduo Tyr192 tem sua conformação alterada em várias estruturas do complexo enzima-ligante, permitindo a interação com esses anéis aromáticos via π -stacking. Essa mesma mudança conformacional é encontrada nas estruturas da CdaA ligada ao ATP, permitindo a interação com a adenina do ATP, via interação π -stacking. Ainda, uma mutação nesse resíduo resultou em uma perda significativa da atividade em *L. monocytogenes*.⁵² Portanto, esse resíduo possui um papel significativo no reconhecimento de anéis aromáticos de ligantes no sítio ativo da CdaA. Outro resíduo importante na interação com os fragmentos encontrados é o Asp176, via ligações de hidrogênio com os oxigênios da carboxila da cadeia lateral. Outros resíduos responsáveis pela interação de alguns fragmentos são Thr207 e Arg208. Mutações nesses resíduos também resultaram em perda significativa da atividade diadenilato ciclase da CdaA de *L. monocytogenes*⁵¹ e DisA de *Thermotoga marítima*.⁸⁰ Esses resíduos, juntamente com His209, Glu228 e Glu229, que são

altamente conservados nas CdaA, são os responsáveis pela estabilização dos fosfatos na estrutura ligada ao ATP. Dessa forma, o bolsão de interação dos fosfatos pode indicar uma potencial direção de crescimento das moléculas que pode ser explorado para desenhar inibidores mais potentes. Outros resíduos, como Tyr148 e Gly177, também fazem interações com alguns fragmentos, podendo contribuir para o desenho baseado em estrutura de futuros inibidores.

3.2.2 Fragmentos na interface dimérica

Os 17 fragmentos encontrados na interface dimérica essencial se dividem em três bolsões principais. Majoritariamente, 9 fragmentos se ligam no bolsão S1, entre o β 2- α 3-loop (Pro170-Leu174) da cadeia A e os resíduos Tyr127, Gln161 e Asn166 da cadeia B (Figura 20A). Os fragmentos x1259 e x870 também se ligaram no bolsão simétrico S1' (com interação dos mesmos resíduos, mas de cadeias diferentes) e o x1113 se ligou somente no S1'. No bolsão S2, foram encontrados dois fragmentos (x621 e x1029), próximos aos resíduos Arg131, Arg132 e Ile133 da cadeia A e Pro170 da cadeia B, além do fragmento x1177, que foi encontrado no bolsão simétrico S2'. Quatro fragmentos (x858, x1107, x1143 e x1168), no entanto, se ligaram em uma posição ligeiramente deslocada, explorando um sítio intermediário (S3) entre os bolsões S1 e S2. Essas posições podem indicar um possível sítio de exploração para o desenvolvimento racional de inibidores mais potentes (Figura 20B).

Figura 20 – (A) Os fragmentos interagentes na interface dimérica se dispõem em três principais bolsões, S1 (verde claro), S2 (ciano) e S3 (rosa). Alguns fragmentos, no entanto, interagiram nos bolsões simétricos correspondentes, S1' (verde escuro) e S2' (azul). (B) Exemplos dos fragmentos x1254 (em S1, verde), x621 (em S2, ciano) e x1168 (em S3, rosa) podem indicar diferentes direções para o desenvolvimento racional de novas moléculas.

Fonte: Elaborada pelo autor

É interessante notar que existem diversos fragmentos (11 dos 17) com anéis aromáticos encontrados em uma posição favorável para interações do tipo π -stacking com o resíduo Tyr127. Ainda, outro resíduo importante na interação com os fragmentos é Gln161, formando ligações de hidrogênio (Figura 21).

Figura 21 – (A) Mapas de evento (azul, $1,5\sigma$) e z -map (verde/vermelho, $\pm 3\sigma$) mostram claramente a posição do ligante x1254. (B) Gráfico radial com os parâmetros de validação indicam uma boa modelagem do ligante, levando em conta a ocupância e B-fator refinados. (C) Modelo estrutural final revela as interações do ligante com a SaCdaA, por meio de interações de hidrogênio com o resíduo Q161 e π -stacking com Y127. O ligante está posicionado no bolsão S1 da interface dimérica, próximo ao β 2- α 3-loop.

Fonte: Elaborada pelo autor

Curiosamente, a interação dos fragmentos resultou em um deslocamento de todo o β 2- α 3-loop em direção ao sítio ativo, afastando-os da interface dimérica. Como resultado disso, o resíduo His175 teve sua conformação alterada (Figura 22). Comparando com a estrutura ligada ao ATP, o novo rotâmero da His175 é incompatível com a conformação necessária para a correta coordenação do metal divalente. Portanto, uma possível consequência de todo esse rearranjo estrutural provocado pela presença do ligante na interface seja uma interferência na atividade enzimática, já que a coordenação do metal fica prejudicada. Dessa maneira, a interface dimérica essencial pode servir como um novo sítio alostérico de inibição.

Figura 22 – A interação do ligante no bolsão da interface dimérica (estrutura em azul) deslocou o $\beta 2$ - $\alpha 3$ -loop em direção ao sítio ativo, acarretando uma nova conformação da H175, que é incompatível com a coordenação do Mn^{2+} observada na estrutura ligada ao ATP (em verde). Esse deslocamento do $\beta 2$ - $\alpha 3$ -loop potencialmente impede a entrada do $ATP+Mn^{2+}$ no sítio ativo.

Fonte: Elaborada pelo autor

3.2.3 Outros Sítios

Outros 24 fragmentos (Sítios C/D - Figura 18) foram encontrados interagindo principalmente em um bolsão no C-terminal da cadeia B (21 fragmentos), entre a hélice $\alpha 5$ e as fitas $\beta 6$ e $\beta 7$ (Figura 23). Não foi observado nenhum fragmento no bolsão simétrico correspondente (na cadeia A), possivelmente devido às interações mais próximas entre as moléculas simétricas da rede cristalina. Os principais resíduos de interação com os fragmentos nesse bolsão são Phe237, His257, Glu256, Arg242 e Lys240, através de uma combinação de interações hidrofóbicas, π -stacking e ligações de hidrogênio. Especificamente o resíduo Phe237 tem sua conformação bastante alterada devido à presença dos ligantes, com relação à CdaA APO (Figura 23).

Figura 23 – Sobreposição dos 21 fragmentos observados no sítio C, interagindo num bolsão do C-terminal da cadeia B. Os principais resíduos interagentes estão explicitados. Destaque para a F237, que sofreu uma mudança conformacional (*stick* vermelho) para possibilitar interações do tipo π -*stacking* com fragmentos com anéis aromáticos próximos.

Fonte: Elaborada pelo autor

Os outros três fragmentos se ligaram na cadeia A (Sítio D - Figura 18). Um único fragmento (x836) se ligou em um sítio que compreende a hélice $\alpha 5$, e as fitas $\beta 7$ e $\beta 6$. Quando se observa os pares simétricos, observa-se a presença do Asp147 (da cadeia B) fazendo uma ligação de hidrogênio. Portanto, a presença do fragmento nesse sítio, possivelmente, se deve ao arranjo cristalino e não um sítio verdadeiro de interação (Figura 24).

Figura 24 – Exemplo de interações do conjunto x836. A presença desse ligante pode ser devida a interações com moléculas de SaCdaA simétricas (estrutura em cinza escuro) presentes no cristal devido ao empacotamento cristalino.
Fonte: Elaborada pelo autor

Os últimos dois fragmentos, x1219 e x1127, se ligaram a um outro sítio na superfície da CdaA, entre o loop que liga a hélice $\alpha 4$ à fita $\beta 5$ e o loop que liga as fitas $\beta 6$ e $\beta 7$ (Figura 25). É improvável que a ligação desses fragmentos seja devido ao arranjo cristalino, uma vez que não existe uma molécula simétrica próxima nesta região. Portanto, apesar de estar relativamente longe do sítio ativo, não se pode descartar a hipótese de que a presença de um ligante nesse bolsão afete a atividade. Ainda, o fragmento x1127 também se ligou ao sítio ativo (cadeia A).

Figura 25 – Modelo estrutural dos conjuntos x1219 e x1127 e os principais resíduos próximos ao sítio de interação.

Fonte: Elaborada pelo autor

3.3 Estudos bioquímicos e biofísicos

3.3.1 Atividade catalítica induz a formação de complexos transientes de alta massa molecular

Estudos recentes envolvendo as diadenilatos ciclases das três maiores subfamílias, DisA, CdaS e CdaA, mostram que existe uma variabilidade de estados oligoméricos, dependendo da subfamília. Enquanto a CdaA se mostra dimérica,^{50–52,76} as DisA^{9,80} e CdaS^{17,19} se mostram octaméricas e hexaméricas, respectivamente. Entretanto, somente a DisA apresenta a conformação face-a-face correta para a atividade catalítica, em decorrência justamente da sua organização em octômeros.⁹ Tosi *et al.* (2020) propõe que múltiplos dímeros de CdaA são necessários para a formação de complexos ativos, através da formação de oligômeros mais complexos, já que, apesar da sua organização dimérica não ser compatível com a conformação ativa correta, a CdaA se mostra ativa em solução.

Essa hipótese foi testada a partir de alguns experimentos, como DLS, e por ensaios de atividade em HPLC.

A formação de complexos de SaCdaA de alta massa molecular foi observada apenas na presença de ATP+Mn²⁺. Na ausência de algum desses componentes, o raio hidrodinâmico medido no DLS se mostrou comparável ao raio observado com a CdaA apenas (Figura 26A). Ao adicionar EDTA com a finalidade de sequestrar os íons Mn²⁺ na amostra (1,5:1 EDTA:Mn²⁺), no entanto, a formação dos complexos foi totalmente inibida. Portanto, embora presente na solução, o Mn²⁺ não é mais capaz de se ligar à SaCdaA. Ainda, amostras contendo apenas o c-di-AMP e c-di-AMP+Mn²⁺ se mostraram também incapazes de formar clusters (Figura 26A). Esses resultados demonstram que a SaCdaA é capaz de se organizar em oligômeros mais complexos somente na presença do ATP e Mn²⁺. Teste de atividade em HPLC mostrou que, de fato, a SaCdaA é ativa somente na presença do complexo ATP+Mn²⁺ (Figura 26B).

Figura 26 – (A) Medidas de DLS com a SaCdaA na presença de diferentes componentes. As médias (bola) de cada amostra resultam de seis diferentes replicatas (losangos). As barras de erros representam o desvio-padrão das seis replicatas. O raio hidrodinâmico calculado é aumentado somente na presença de ATP e Mn²⁺, substratos da SaCdaA. Testes com outros metais não mostraram capacidade da proteína de formar estados oligoméricos mais complexos. (B) Histograma das atividades enzimáticas obtidas por HPLC da SaCdaA na presença de diferentes íons divalentes. Os valores foram normalizados com relação à atividade na presença de Mn²⁺.

Fonte: Elaborada pelo autor

Assim como o estado oligomérico, os íons divalentes utilizados como cofator possuem diferenças entre as diadenilato ciclases. Estudos com a DisA^{9,80,81} de *T. maritima*, *Bacillus thuringiensis* e *B. subtilis*, e com a CdaS de *B. thuringiensis*¹⁹ mostram uma preferência por íons Mg^{2+} . A classe das CdaA, no entanto, tem preferência por íons Mn^{2+} .⁵⁰⁻⁵¹ Muito embora existam essas preferências, a disponibilidade por esses metais no habitat das bactérias produtoras de c-di-AMP deve ser um fator relevante, já que um estudo mostrou que a DisA de *Mycobacterium tuberculosis* tem maior atividade com Mn^{2+} .⁴⁶ Os ensaios realizados com diferentes íons divalentes mostrou que a CdaA de *S. aureus* tem preferência por íons Mn^{2+} , sendo capaz de formar complexos ativos de alta massa molecular somente na presença desse cofator (Figura 26A).

Ensaio com os mutantes H175A, T207E e E229A, desenhados para quebrar as interações entre SaCdaA e o substrato binário ATP/ Mn^{2+} , mostram que a formação de clusters ocorre, especificamente, devido à interação entre a proteína e o substrato (Figura 27A). Portanto, a clusterização em oligômeros mais complexos ocorre devido à atividade catalítica de conversão do ATP em c-di-AMP (Figura 27B).

Figura 27 – (A) Ensaio de DLS de mutantes da SaCdaA na presença de ATP+ Mn^{2+} mostram que mutações nos resíduos conservados responsáveis por interações com o ATP perdem a capacidade de formar oligômeros mais complexos. (B) Ensaio de atividade por HPLC indicam que os mutantes têm sua capacidade catalítica muito reduzida, com relação à SaCdaA nativa (WT).

Fonte: Elaborada pelo autor

Na tentativa de visualizar o estado de alta massa molecular provocado pela interação entre a SaCdaA e ATP/Mn²⁺, as amostras foram submetidas à uma cromatografia por exclusão molecular (SEC) combinada com um detector de espalhamento de luz em multi-ângulos (MALS) e outro de índice de refração. Uma boa cromatografia por exclusão molecular depende dois conceitos-chave: comparado com os padrões, as amostras devem possuir a mesma relação entre difusão e massa molecular; e interação com a coluna devido apenas às propriedades estéricas.⁸² Análises com proteínas que possuem modificações pós-traducionais; complexos não-globulares; ou superfícies carregadas são alguns exemplos de amostras que não preenchem esses dois requisitos. No SEC-MALS, a exclusão molecular tem a função apenas de separar as diferentes populações, enquanto que a combinação dos detectores de espalhamento de luz e índice de refração permite a determinação da massa molecular e concentração, respectivamente.⁸³

Apesar da clara observação de complexos de alta massa molecular nas amostras contendo SaCdaA + ATP/Mn²⁺ nos experimentos de DLS, os resultados da SEC-MALS não mostram nenhum pico referente a oligômeros mais complexos (Figura 28A), mesmo utilizando tampão suplementado com ATP+Mn²⁺. Embora a formação de clusters de alta massa molecular seja fisiologicamente improvável *in vivo*, devido ao domínio transmembranar N-terminal, sua formação *in vitro*, quando testado somente o domínio DAC da SaCdaA, pode indicar que alguns oligômeros superiores (tetrâmeros, por exemplo), induzidos pela ligação do ATP/Mn²⁺ durante a atividade, podem ocorrer de forma transiente *in vivo*.

As massas moleculares calculadas para as amostras de SaCdaA na ausência e na presença de ATP+Mn²⁺ são de 32±1 e 31,8±0,9 kDa, respectivamente. Essas massas indicam uma organização dimérica e confirmam os resultados obtidos na gel-filtração (Figura 8) e dos ensaios cristalográficos.^{72,76} Testes realizados com os mutantes, nas mesmas condições, também não mostraram nenhuma alteração no padrão de populações, assim como os experimentos de DLS anteriores (Figura 28B,C,D).

Figura 28 –Cromatogramas resultantes das corridas de SEC-MALS com amostras da (A) SaCdaA nativa (WT) e mutantes (B) H175A, (C) T207E e (D) E229A na presença e ausência do substrato ATP+Mn²⁺ não mostraram diferenças significativas no estado oligomérico da proteína, indicando que esse estado ocorra de forma transiente em solução. As amostras com adição do substrato foram corridas em tampão suplementado com ATP e MnCl₂.

Fonte: Elaborada pelo autor

3.3.2 Cinética enzimática da SaCdaA mistura cooperatividade e inibição por substrato

Embora os estudos acerca das diadenilato ciclases tenha avançado muito desde sua descoberta por Witte *et al.* (2008), demonstrando as diferentes necessidades de cofatores divalentes e estados oligoméricos para cada subfamília, pouco se sabe a respeito dos mecanismos catalíticos dessas enzimas.

Especificamente no caso das CdaA, é sabido que sua organização dimérica é incapaz de transformar o ATP em c-di-AMP,^{50,52} sendo necessário o encontro de outras unidades diméricas para a correta orientação dos sítios ativos face-a-face, como mostrado nesse trabalho. De fato, por meio de dados de difração de raios-x

com a CdaA de *L. monocytogenes*, foi observado o estado pós-catalítico.⁵⁰ O homodímero presente no modelo cristalográfico mostra que um protômero e seu simétrico corresponde ao homodímero catalítico observado no octâmero da DisA.^{9,80} Esse resultado corrobora com os dados observados nesse trabalho, porém, o mecanismo catalítico da CdaA e seus parâmetros cinéticos ainda é desconhecido.

Ensaio utilizando o *kit* Enzchek™ *Pyrophosphate Assay*⁶⁰ (Molecular Probes) foram realizados para a determinação das constantes cinéticas. Esse *kit* se baseia na quebra dos pirofosfatos (PP_i) em fosfatos inorgânicos pela pirofosfatase inorgânica, que são usados para converter 2-amino-6-mercapto-7-metilpurina ribonucleosídeo (MESG) em ribose-1-fosfato e 2-amino-6-mercapto-7-metilpurina pela enzima purina nucleosídeo fosforilase (PNP). Dessa forma é possível determinar, indiretamente, a formação de c-di-AMP através dos pirofosfatos resultantes da reação da diadenilato ciclase.

Durante as otimizações das condições do ensaio, observou-se que a presença de íons Mn²⁺, que são necessários para a reação da SaCdaA, inibia fortemente as enzimas do *kit* (Figura 29B). As reações do *kit* são realizadas em tampão contendo 1mM MgCl₂. Mesmo após suplementação com mais 10mM MgCl₂, a cinética observada do *kit* ainda estava muito inibida (Figura 29C).

Figura 29 – Acompanhamento em tempo real do sinal de absorbância em 360 nm das curvas-padrão de PP_i (A) em tampão 50 mM Tris, pH7,5; (B) em tampão 50 mM Tris, pH7,5, com adição de 100 μM $MnCl_2$; (C) em tampão 50 mM Tris, pH7,5, com adição de 100 μM $MnCl_2$ e 10 mM $MgCl_2$. A presença de pequenas concentrações de íons manganês é suficiente para inibir fortemente a atividade da enzima pirofosfatase inorgânica (IP) dependente de magnésio. Mesmo após suplementação com 10 mM de íons Mg^{2+} , a atividade não foi totalmente recuperada.

Fonte: Elaborada pelo autor

Essa observação da inibição do *kit* por íons manganês inviabiliza ao acompanhamento da reação de diadenilato ciclase em tempo real, uma vez que a produção de PP_i poderia ser maior do que a capacidade do *kit* em consumi-lo em suas reações acopladas. Dessa maneira, o observado no experimento seria a cinética da reação inibida do *kit*, e não a cinética da SaCdaA. Variações de tampões, concentrações de magnésio e manganês foram testadas, mas sem sucesso. Somente com a adição de EDTA e suplementação adicional de magnésio foi restaurada a condição normal das enzimas do *kit* (Figura 30).

Figura 30 – (A) Diferentes testes com tampões, variando as condições de íons manganês, magnésio e concentração salina resultaram em perdas de atividade da IP. Na presença de EDTA, no entanto, em concentração próxima à concentração de MnCl₂, a IP conseguiu recuperar sua atividade. (B) Curva-padrão controle, em tampão 50 mM Tris, pH 7,5. (C) Curva-padrão otimizada, em tampão 50 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 2 mM MnCl₂, 3 mM EDTA, 5 mM MgCl₂.

Fonte: Elaborada pelo autor

Avaliando as condições de poder dos quelantes com relação aos íons Mg²⁺ e Mn²⁺, observou-se que, em pH próximo à 8 (utilizado nas reações da SaCdaA), a potência do EDTA em sequestrar íons Mn²⁺ é muito maior comparado aos íons Mg²⁺. A constante de estabilidade condicional do EDTA para o Mn²⁺ é de 11,7, enquanto para o Mg²⁺ é 6,4.⁸⁴ A constante de estabilidade condicional indica a capacidade do agente quelante de formar complexo com um íon em um determinado pH e é similar à constante de associação química. Ou seja, dado o equilíbrio $M + L \rightleftharpoons ML$, a constante de estabilidade condicional é dada por $K_{M,L,ML} = [ML] / [M][L]$, em que M indica a concentração de íons livre em solução, L indica a concentração do agente quelante livre em solução, e ML é a concentração do complexo.

Portanto, foi adicionado uma concentração de EDTA na razão 1,5:1 com relação à concentração de Mn^{2+} . Dessa forma, a maioria dos íons manganês estaria sequestrados pelo EDTA, não afetando, portanto, as enzimas do *kit*. Dessa maneira, a forma encontrada para determinar as constantes cinéticas da SaCdaA com o Enzchek foi desacoplar a reação da SaCdaA das enzimas do *kit*. A atividade da SaCdaA era parada em tempos específicos, pela adição de EDTA e só então era misturado o *kit* para medir a quantidade de PP_i formado através das medidas de absorbância.

Um curva-padrão, relacionando a concentração de PP_i e absorbância, foi inicialmente determinada seguindo o protocolo adaptado do *kit* (veja metodologia 2.4.2). As concentrações de PP_i (fornecido pelo *kit*) variaram de $1\mu M$ até $40\mu M$, e a medição da absorbância foi iniciada imediatamente após adição das enzimas do *kit*, e acompanhada por 35 minutos (Figura 31). A absorbância relativa à concentração de PP_i é a média dos valores entre 1500s e 1800s.

Figura 31 – Curva-padrão nas condições otimizadas de reação mostra que a capacidade do *kit* em detectar a presença de PP_i foi reestabelecida. Os valores obtidos na equação da reta ajustada são compatíveis com a curva-padrão presente no *kit*.⁶⁰

Fonte: Elaborada pelo autor

Determinada as condições-ótima para o ensaio de absorbância, as amostras contendo diferentes concentrações de substratos foram preparadas e a reação foi

iniciada pela adição da SaCdaA, conforme descrito em Metodologia 2.4.2. Após diferentes tempos de reação (0, 30, 90 e 180 min), as reações foram paradas pela adição de EDTA e foi adicionado a mistura do *kit* e a leitura do sinal de absorbância foi aferida. Para cada concentração de substrato diferente, quatro pontos referentes aos tempos de reação foram obtidos. O sinal de absorbância foi convertido em concentração de PP_i e colocado em um gráfico que relaciona a concentração de PP_i formado por tempo. Um ajuste linear foi feito, e o coeficiente angular, que no caso é a velocidade inicial de reação da SaCdaA, foi determinado (Figura 32A). Por fim, um gráfico relacionando a velocidade de reação com a concentração de substrato foi plotado (Figura 32B).

Figura 32 –(A) Gráfico resultante dos sinais de absorbância em 360 nm referentes à cada concentração de ATP testada em função do tempo de reação (como exemplo e clareza, somente quatro concentrações de ATP foram ilustradas, foram testadas 12 concentrações diferentes). A partir das retas ajustadas, os coeficientes angulares foram calculados para obtenção dos valores de velocidade de reação (B) Gráfico de cinética enzimática relacionando as concentrações de ATP com a velocidade de reação. Claramente observa-se um comportamento de atividade inibida pelo substrato, resultando em duas curvas ajustadas, com o fator cooperativo (linha contínua) e sem cooperação (linha tracejada).

Fonte: Elaborada pelo autor

Claramente, a cinética da SaCdaA não segue as condições de uma cinética de Michaelis-Menten. A curva obtida se assemelha bastante com reações que são inibidas pelo substrato (Figura 32B). Em altas concentrações, a abundância de substrato forma um complexo enzima-substrato improdutivo, seja pela ocupação de um sítio alostérico, seja pela interação de mais de uma molécula do substrato. Entretanto, a curva de cinética inibida por substrato (Equação 1) ainda não se ajusta aos pontos experimentais, especialmente nas altas concentrações de ATP. É sabido

que as CdaA são dímeros incompetentes, de forma que é necessária uma interação entre, pelo menos, dois dímeros para a formação da interface catalítica. No entanto, como mostrado nos modelos cristalográficos, o $\beta 2$ - $\alpha 3$ -loop da interface dimérica deve ter um papel fundamental na interação do ATP/Mn²⁺ com a CdaA. A presença do substrato fixa o $\beta 2$ - $\alpha 3$ -loop na posição aberta, interagindo de forma mais intensa com o protômero vizinho (Figura 22). Dessa forma, pode haver uma cooperação entre os sítios ativos, por meio dos loops da interface dimérica. A partir do esquema de reação abaixo, que descreve de modo simplificado a reação da CdaA, foi obtida a equação 2, que relaciona a cooperatividade com a inibição do substrato. A dedução da equação 2 está descrita no Apêndice A.

A primeira parte da reação enzimática representa a cooperatividade dada pela equação de Hill, que assume o equilíbrio da ligação de h moléculas do substrato S à proteína E (independentemente da organização oligomérica), formando o complexo enzima-substrato ES_h , resultando no produto P com a constante catalítica k_{cat} . No entanto, m moléculas de substrato S podem também interagir com o complexo ES_h , formando o complexo inibitório ES_{h+m} , cuja constante catalítica é $k_{cat,i}$, formando o produto P de maneira mais lenta que a reação inicial.

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x} S}{S_{50} + S \left(1 + S/I_{50} \right)} \quad (1)$$

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x} + V_{inib} (S/I_{50})^m}{1 + (S_{50}/S)^h + (S/I_{50})^m} \quad (2)$$

Os parâmetros $V_{m\acute{a}x}$ e V_{inib} correspondem às velocidades máximas da reação não-inibida e inibida, respectivamente; S_{50} e I_{50} são constantes similares à K_M e K_i ; h e m correspondem aos primeiro e segundo coeficientes de Hill, respectivamente; v e S são as velocidades de reação e concentrações de substrato, respectivamente. A curva de cinética que engloba cooperatividade e inibição por substrato se ajustou

melhor aos pontos experimentais (Figura 32B). Os parâmetros cinéticos obtidos com os diferentes ajustes estão mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros cinéticos das curvas ajustadas relativas ao ensaio de absorvância (Enzchek) sem levar em conta o fator de cooperatividade (Equação 1) ou adicionando o fator cooperativo (Equação 2)

	$V_{\text{máx}}$ (μM PP _i /min)	V_{inib} (μM PP _i /min)	S_{50} (μM)	I_{50} (μM)	h	R^2
Equação 1	$1,6 \pm 0,1$	-	290 ± 30	400 ± 40	-	0,9984
Equação 2	$0,79 \pm 0,05$	$0,30 \pm 0,07$	100 ± 10	600 ± 100	$1,24 \pm 0,08$	0,9990

Fonte: Elaborada pelo autor

Embora a equação 2 represente a forma geral de cooperatividade e inibição por substrato, existe uma restrição nos valores de m . Para a convergência dos parâmetros da curva, os valores de m devem variar entre 1,5 e 3.⁸⁵⁻⁸⁶ O melhor ajuste, que resulta na menor variância dos parâmetros é obtido com $m=2$.⁸⁵⁻⁸⁶ Dessa maneira, todas as análises realizadas aqui consideram $m=2$. Os resultados mostram que, de fato, existe uma certa cooperatividade entre os sítios ativos, e que a maior velocidade de reação é observada quando a concentração de ATP é próxima de 100 μM . No entanto, com valores de substrato próximos de 630 μM , a velocidade é cerca de 2,6 vezes menor.

Esse modelo de cinética proposto, que envolve cooperatividade e inibição por substrato, já foi descrito em outras enzimas, como a aspartato transcarbamilase^{85,86} e o citocromo P450 3A4.⁸⁷ Com relação à estudos cinéticos da SaCdaA, há somente um ensaio demonstrando a porcentagem de conversão do ATP em c-di-AMP por tempo. No entanto, até a finalização desse trabalho, não há nenhuma caracterização da SaCdaA, ou de nenhuma outra diadenilato ciclase, em termos de parâmetros de cinética enzimática.

Devido à essa falta de estudos para comparação, uma cinética baseada em HPLC foi conduzida, sem a adição de qualquer *kit* comercial, e sem acoplamento de qualquer cascata enzimática. Para isso, inicialmente foi obtida amostras de c-di-AMP provenientes da reação da SaCdaA, que foram purificadas por meio de

cromatografia em coluna de fase reversa C18 (Gemini 5 μ M, 250x10mm).⁸⁰ O pico referente ao c-di-AMP foi coletado e uma alíquota foi analisada por meio de espectrometria de massas (Figura 33).¹

Figura 33 – Cromatograma (em preto) resultante da corrida de purificação do c-di-AMP em coluna C18 (Gemini 5 μ M, 250x10mm). O pico do c-di-AMP indicado foi coletado e uma alíquota foi analisada em espectrômetro de massas para confirmar a massa do c-di-AMP. O gradiente utilizado está mostrado em vermelho no gráfico, referente à porcentagem da mistura de tampão B (metanol 100%) e tampão A (100 mM acetato de amônio, pH 5,5).

Fonte: Elaborada pelo autor

Amostras do c-di-AMP purificado, ATP e ADP, foram utilizadas para otimização da cromatografia em coluna de troca iônica. O método otimizado permitiu a identificação clara de todos os picos correspondentes aos principais componentes da reação de diadenilato ciclase. A proteína SaCdaA elui em torno de 9,8 min; o ATP eluiu em 7,2 min. Ainda, para identificação de uma possível degradação do ATP

¹ Conduzida pelo técnico Dr. Rafael Spadaccia Panhota

em ADP + P_i, o pico referente ao ADP se mostrou bem resolvido em relação ao pico do c-di-AMP, eluindo em 5,3 min e 3,8 min, respectivamente. (Figura 34).

Figura 34 – Análise em coluna de troca iônica Mono-Q 5/50 GL (GE Healthcare) dos picos referentes à mistura de nucleotídeos para verificar a capacidade da coluna em resolver os diferentes componentes. O pico referente ao c-di-AMP (10 μM), ADP (50 μM), ATP (50 μM) e SaCdaA (10 μM) eluem em 3,8 min, 5,3 min, 7,2 min e 9,8 min, respectivamente. A curva em vermelho indica a porcentagem da mistura de tampão B (25 mM Tris, pH 8,0, 1 mM NaCl) e tampão A (25 mM Tris, pH 8,0).

Fonte: Elaborada pelo autor

O pico referente ao c-di-AMP se mostrou arrastado. Isso leva ao deslocamento do pico com relação à concentração injetada, como na curva-padrão (Figura 35A). Esse mesmo comportamento foi observado em um protocolo de avaliação da atividade de diadenilato ciclases e fosfodiesterases por meio de HPLC em coluna de troca iônica.⁸⁸

Figura 35 – (A) Sobreposição de diferentes corridas contendo concentrações de c-di-AMP que variam de 1 μ M a 50 μ M. As áreas sob os picos foram integradas e utilizadas para montar a curva-padrão (B) relacionando, portanto, a área calculada com a concentração de c-di-AMP testada.

Fonte: Elaborada pelo autor

O pico referente às concentrações de c-di-AMP foi integrado e sua área foi relacionada com a concentração de c-di-AMP (Figura 35B). O ajuste linear dos dados permite, então, calcularmos a concentração de c-di-AMP produzida nas reações de cinética a seguir mostradas.

A reação da SaCdaA foi conduzida da mesma maneira, retirando alíquotas em determinados tempos para cada concentração de ATP testada, seguindo da adição de EDTA proporcional à concentração de Mn^{2+} (1,5:1) para parar a reação. O tratamento dos dados está descrito na Metodologia 2.4.1. A curva de cinética (Figura 36B) segue a mesma tendência que a curva obtida quando usado o *kit* Enzchek (Figura 32). A curva ajustada utilizando o modelo que envolve somente a inibição por substrato possui um valor de R^2 muito baixo. No entanto, ao aplicar o modelo mostrado anteriormente, que associa cooperatividade com a inibição por substrato, observa-se um ajuste muito melhor.

Figura 36 – (A) Exemplo dos cromatogramas referentes à concentração de ATP igual a 300 μM. Para cada concentração de ATP, a reação foi parada em tempos que variaram de 0 h a 3 h com a adição de EDTA e injetadas no HPLC para análise. A área abaixo do pico referente ao c-di-AMP foi calculada, convertida em concentração de c-di-AMP produzido, e relacionada com os tempos de reação. A partir da reta ajustada, foram obtidos os valores de velocidade de reação. (B) Curva de cinética enzimática indica novamente uma característica de atividade inibida por substrato. A curva ajustada com o fator de cooperatividade (linha cheia) se mostra mais bem ajustada com relação à curva sem o fator de cooperatividade (curva tracejada).

Fonte: Elaborada pelo autor

Os parâmetros calculados, para os dois modelos, estão mostrados na Tabela

3.

Tabela 3 – Parâmetros cinéticos das curvas ajustadas relativas ao ensaio de HPLC sem levar em conta o fator de cooperatividade (Equação 1) ou adicionando o fator cooperativo (Equação 2)

	$V_{\text{máx}}$ (μM c-di-AMP/min)	V_{inib} (μM c-di-AMP/min)	S_{50} (μM)	I_{50} (μM)	h	R^2
Equação 1	40 ± 10000	-	$(1 \pm 600) 10^5$	0 ± 80	-	0,87982
Equação 2	$0,041 \pm 0,007$	$0,0005 \pm 0,0008$	90 ± 20	340 ± 50	$1,42 \pm 0,2$	0,98852

Fonte: Elaborada pelo autor

Claramente, os parâmetros calculados no modelo que envolve somente a inibição pelo substrato se mostraram fora da realidade. No entanto, os parâmetros ajustados no modelo de cinética proposto nesse trabalho se mostraram bastante similares aos calculados anteriormente (Tabela 2), com exceção das velocidades de reação máxima no estado não-inibido ($V_{\text{máx}}$) e inibido (V_{inib}). A diferença observada

nesses valores pode estar relacionada no modo como são observados os produtos da reação. Vale lembrar que a conversão do ATP em c-di-AMP pela CdaA resulta na liberação de 2 moléculas de PP_i para cada molécula de c-di-AMP sintetizado. Esse PP_i será quebrado em fosfato inorgânico (P_i) por uma pirofosfatase inorgânica presente no *kit*. Ainda, o P_i pode ser formado através da degradação do ATP em $ADP+P_i$ em solução. Dessa forma, parte do sinal observado do P_i no ensaio do Enzchek provém da degradação do ATP, e não somente da catálise da SaCdaA. No caso do ensaio direto, por HPLC, mesmo que haja essa degradação, é analisado somente o pico referente ao c-di-AMP, sem interferência do PP_i ou P_i resultado, seja da degradação do ATP, ou da reação da diadenilato ciclase. E de fato, parte do ATP sofre hidrólise, formando ADP, já que é possível observar o pico referente ao ADP nos cromatogramas do HPLC em coluna de troca iônica (Figura 36A). Entretanto, apesar da diferença nos valores das velocidades de reação provenientes, provavelmente por conta das características intrínsecas de cada ensaio utilizado, os valores de S_{50} , I_{50} e o h são similares e equivalentes.

Para reforçar a questão da cooperatividade encontrada nos resultados de cinética, experimentos de termoforese em microescala (MST) foram realizados. O MST permite realizar uma análise quantitativa de interações de diferentes tipos de moléculas com proteínas, sendo bastante sensível a alterações provocadas pela interação, seja em tamanho, carga, solvatação, conformação etc.^{89,90} Para analisar essas interações, utiliza-se usualmente o sinal de fluorescência de marcadores conjugados com proteínas, ou através da fluorescência intrínseca.⁹¹ Amostras são colocadas em capilares e uma pequena região é aquecida por meio de um laser infravermelho. O gradiente de temperatura resultante do aquecimento causa um movimento das moléculas marcadas, geralmente para longe da região quente, diminuindo, portanto, o sinal de fluorescências naquela região (Figura 37). A termoforese depende de características das moléculas, como tamanho, carga e hidratação⁹⁶ e, então, quaisquer alterações nessas características, causadas pela interação da molécula marcada com outra molécula, altera de forma diferente o sinal de fluorescência observado, permitindo quantificar a interação entre moléculas.

Figura 37 – Uma típica curva de MST é dividida em quatro fases: a primeira fase (I) se relaciona com a fluorescência “fria” (F_c), anterior à ligação do laser, e representa a fluorescência inicial da amostra. Em seguida (II), o laser infravermelho (IR) é ligado e rapidamente inicia-se a termoforese. Esse rápido processo é chamado de T-jump, e ocorre na escala de tempo de ms. A terceira fase (III) é o processo de termoforese dependente da difusão das moléculas em solução. É um processo mais lento, durando alguns segundos. Os processos de T-jump e da termoforese de difusão são influenciados por um evento de ligação/interação. A última fase (IV) ocorre após o desligamento do laser infravermelho, numa espécie de T-jump invertido, de modo que as moléculas voltam a se mover para a região previamente aquecida, e, portanto, a fluorescência naquela região volta a ser mais intensa. A fluorescência “quente” (F_h), após a termodifusão (III), é normalizada com relação à fluorescência inicial (F_c), resultando no sinal de F_{norm} .

Fonte: Elaborada pelo autor

Portanto, amostras contendo SaCdaA e diluições do complexo ATP/Mn^{2+} (mantendo a concentração de Mn^{2+} constante) tiveram suas curvas de MST determinadas. Como forma de controle, amostras preparadas sem o cofator metálico também foram testadas, já que os resultados de atividade mostram que a SaCdaA tem sua capacidade de produzir c-di-AMP muito reduzida na ausência do cofator (Figura 38A). Os sinais de fluorescência F_c e F_h foram escolhidos de modo a obter a melhor relação sinal/ruído. Após análise dos dados no *software* MO.Affinity Analysis (NanoTemper), curvas de dose-resposta foram ajustadas utilizando o modelo de Hill, permitindo o cálculo do coeficiente de cooperatividade (Figura 38B).

Figura 38 – (A) Curvas de MST das amostras de SaCdaA e ATP na presença (verde) e ausência (marrom) do cofator metálico Mn^{2+} . As barras azul e vermelha representam os valores de fluorescência “fria” e “quente”, respectivamente. Esses valores foram escolhidos de modo a prover o melhor valor de sinal/ruído. No caso da amostra com Mn^{2+} , esse valor foi de 28,2; na amostra sem Mn^{2+} , o valor foi de 30,4. (B) Curvas de dose-resposta ajustadas utilizando o modelo cooperativo de Hill. Os valores da fluorescência para cada concentração de ATP foram convertidos em fração de SaCdaA ligada ao ATP. Os valores de EC_{50} calculados foram de $2,5 \pm 0,2 \mu\text{M}$ para as amostras contendo o cofator metálico; e $800 \pm 100 \mu\text{M}$ nas condições sem Mn^{2+} . Os pontos representam médias e as barras de erros representam o desvio-padrão de três ensaios independente.

Fonte: Elaborada pelo autor

Os valores calculados de EC_{50} para as amostras com e sem o cofator metálico é de $25 \pm 2 \mu\text{M}$ e $800 \pm 100 \mu\text{M}$, respectivamente. De fato, esse resultado reforça os dados obtidos anteriormente nos ensaios em que foi explorada a interação do cofator metálico com a SaCdaA. Aqui, a SaCdaA tem uma afinidade muito menor pelo ATP na ausência do Mn^{2+} . Os resultados dos ensaios de DLS mostrou que a formação de estados oligoméricos mais complexos é bastante dificultada pela ausência do cofator metálico, o que refletiu na baixa atividade catalítica em produzir c-di-AMP. Por outro lado, quando o cofator está presente, a afinidade da SaCdaA pelo ATP é cerca de 320 vezes maior, corroborando os resultados anteriores.

Ainda, o ajuste da curva de dose-resposta no modelo cooperativo de Hill revelou que a interação entre o complexo ATP/Mn^{2+} ocorre de forma cooperativa. O valor calculado para o coeficiente de Hill (h) foi de 1,7. Em conjunto com os dados cinéticos obtidos tanto nos ensaios de absorvância utilizando o *kit* Enzcheck, quanto nos ensaios de HPLC, os resultados observados no MST demonstram que a cinética da SaCdaA tem, de fato, um componente cooperativo.

Diversos estudos envolvendo diadenilatos ciclases e c-di-AMP já mostraram que a concentração de c-di-AMP intracelular é estritamente controlada. O desbalanço da concentração de c-di-AMP pode afetar a homeostase de íons potássio^{17,39,82,92}, a síntese da parede celular^{15,17} e a resistência por antibióticos β -lactâmicos.^{16,93,94} Mais recentemente, observou-se que a GlmM, uma proteína envolvida na biossíntese da parede celular interage com a CdaA de forma a regulá-la negativamente.⁵² Portanto, os resultados cinéticos e de MST apresentados mostram, de certa forma, um mecanismo intrínseco da SaCdaA de auto-regulação. Na medida em que ocorre um aumento da concentração de ATP intracelular, a velocidade de conversão em c-di-AMP é diminuída, impedindo uma síntese excessiva do segundo-mensageiro que pode ser potencialmente maléfica para a célula.

3.3.3 O papel do β 2- α 3-loop da interface dimérica incompetente na atividade enzimática e inibição da SaCdaA

Embora a interface dimérica não seja conservada entre as subfamílias das enzimas-DAC com relação aos resíduos que a compõe (Figura 39A), ela é estruturalmente conservada entre todas as principais classes de diadenilato ciclases, independentemente de sua organização oligomérica. O dímero da CdaA observado cristalograficamente, é também observado no hexâmero da CdaS e no octâmero da DisA (Figura 39B). Apesar dos principais motivos conservados das diadenilato ciclases estarem presentes nessas três famílias, existem algumas diferenças significativas, que podem estar relacionadas com o modo de catálise enzimática e organização oligomérica de cada família. A principal diferença está no β 2- α 3-loop da interface dimérica (Figura 39C) e nos resíduos que interagem com os cofatores divalentes. No caso da DisA, a ausência do loop da interface parece ser a razão de sua organização octamérica ativa, na medida em que permite uma ligeira rotação do dímero, facilitando o acomodamento no octâmero (Figura 39D).

Figura 39 – (A) Embora sequencialmente a interface dimérica seja conservada apenas entre as classes CdaA (PDB 6GYW) e CdaS (PDB 2FB5) das enzimas-DAC, (B) estruturalmente observa-se a presença da interface dimérica também na DisA (PDB 3C1Z). (C) A maior diferença estrutural está na ausência do $\beta 2$ - $\alpha 3$ -loop. (D) A ausência do loop permite uma organização mais compacta do domínio DAC da DisA, que resulta em uma torção quando sobreposta com a estrutura do domínio DAC da CdaA. Essa organização talvez seja a responsável pelo estado octamérico e ativo da DisA, enquanto os domínios DAC da CdaA e CdaS são organizados em dímeros e hexâmeros inativos, respectivamente.

Fonte: Elaborada pelo autor

Na CdaA e CdaS, a presença do loop restringe essa torção, o que impede que dímeros vizinhos se acomodem de uma maneira cataliticamente competente. De fato, o domínio YojJ presente no N-terminal funciona como um domínio auto-inibitório, e possivelmente se rearranja estruturalmente para permitir o encontro catalítico de dois dímeros do domínio DAC.^{19,20} Ainda, o resíduo de His encontrado nas CdaS e CdaA, que está imediatamente anterior ao motivo DGA, é responsável pela coordenação do manganês na SaCdaA⁷⁶ quando a interface cataliticamente está formada. No caso da DisA, esse resíduo é alterado por um resíduo de Met, incapaz de coordenar o cofator metálico divalente.⁹ A coordenação é feita, portanto, pelo Asp do domínio DGA,⁸⁰ possivelmente devido à ausência do loop, que permite

a posição ótima para a coordenação octaédrica do metal, sendo o resíduo Asp responsável por uma das seis coordenações.

Especificamente no caso da SaCdaA, nossos resultados sugerem que o β 2- α 3-loop da interface dimérica tem uma importância crucial na atividade enzimática. Os resultados dos modelos cristalográficos mostram uma certa flexibilidade do loop, a depender da interação com ligantes presentes no sítio ativo e no bolsão da interface dimérica. Ligantes presentes no sítio ativo fixam o loop em uma conformação mais aberta, que é estabilizada por meio de interações principalmente hidrofóbicas com resíduos da interface (Figura 40A). No caso de ligantes presentes no bolsão da interface, o loop aparece em uma conformação mais fechada, de modo que os resíduos não estão nas suas posições ótimas para as corretas interações com o substrato, principalmente a His175 (Figura 40B,C).

Figura 40 – (A) Mapa de Van der Waals dos principais resíduos do $\beta 2$ - $\alpha 3$ -loop interagentes na face do protômero vizinho. A partir da interação da SaCdaA com seu substrato, ATP+Mn²⁺, o $\beta 2$ - $\alpha 3$ -loop é fixado na conformação aberta, aumentando suas interações na interface dimérica. (B) A conformação alternada possibilita que a H175 também movimente, para uma posição compatível com a correta coordenação do cofator metálico. (C) A nova posição da H175 é mantida por interações com a cadeia principal da T172, por meio de ligações de hidrogênio a 2,6 Å. Quando o $\beta 2$ - $\alpha 3$ -loop está na posição fechada, a posição da H175 permite interações com a cadeia principal de G134, com ligações de hidrogênio a 3,1 Å.

Fonte: Elaborada pelo autor

Na tentativa de ilustrar essa flexibilidade, especificamente do $\beta 2$ - $\alpha 3$ -loop, foi calculada uma simulação da flutuação da estrutura da proteína através do servidor CABS-flex.⁹⁵⁻⁹⁶ A simulação foi feita com o monômero da SaCdaA e com o dímero encontrado em solução e nos modelos cristalográficos. Observa-se uma alta flexibilidade do $\beta 2$ - $\alpha 3$ -loop, região 2, apenas no modelo monomérico da SaCdaA (Figura 41A,B,C).

Figura 41 – (A) Visão geral da SaCdaA com as principais regiões flexíveis encontradas no CABS-flex.124 As principais regiões flexíveis são 2 e 4. No gráfico, as curvas representam a flutuação de cada resíduo presente na proteína. Dinâmicas com o monômero (preto), das cadeias A e B do dímero incompetente (bege e vermelho, respectivamente) e das interfaces catalíticas A e B (azul e verde, respectivamente), foram realizadas. (B) Poses estruturais resultantes da dinâmica do dímero incompetente. De forma geral, não há muita variação na posição dos resíduos. A maior região flexível é a 4. (C) Poses estruturais da dinâmica usando somente o monômero da SaCdaA. Observa-se aqui, uma grande flutuação nos resíduos que compõem o $\beta 2$ - $\alpha 3$ -loop (região 2), mostrando que esse loop é de fato capaz de sofrer mudanças conformacionais. (D) O encontro de dois dímeros de SaCdaA diferentes para a formação da interface catalítica, responsável pela síntese do c-di-AMP, restringe bastante a flexibilidade da região 4, que passa a fazer interações inter-dímeros, possibilitando a manutenção da interface catalítica.

Fonte: Elaborada pelo autor

Isso indica a importância da interface dimérica na estabilidade do loop. Possivelmente, a incapacidade do monômero de realizar a síntese do c-di-AMP provém da falta de interações intra-moleculares do loop, dificultando a manutenção da posição correta dos resíduos essenciais para a atividade, especialmente da His175, responsável pela coordenação do manganês proveniente do sítio ativo vizinho. No dímero, no entanto, o loop está mais restrito, porém ainda apresenta um certo grau de flexibilidade. Essa flexibilidade foi observada também nos dados cristalográficos quando se compara as estruturas modeladas com ligantes presentes no sítio ativo (que fixam o loop na posição aberta) e com ligantes presentes na interface dimérica (que fixam o loop na posição fechada).

Simulações com o modelo catalítico também foram realizadas e mostraram que o loop da região 4 (Figura 41D), formado pelos resíduos Tyr192-Gly206 tem sua flexibilidade bastante diminuída. Nesse modelo catalítico, esse loop de dois protômeros vizinhos sem emparelham, possivelmente através de interações hidrofóbicas, o que mantém a interação da interface catalítica, em adição às interações dos sítios ativos para com o ATP/Mn²⁺. Interessantemente, esse mesmo loop se mostra bastante flexível nos dados cristalográficos, na medida em que a densidade eletrônica é ausente, ou se mostra em várias conformações diferentes. Isso ocorre em um dos protômeros do dímero. No outro protômero, o arranjo cristalino proporciona interações suficientes entre duas moléculas do cristal para que o loop seja menos flexível, facilitando a interpretação das densidades. No entanto, essas interações intermoleculares no cristal são artificialmente criadas. Em solução, esse loop deve se mostrar bastante flexível de fato, como mostram as dinâmicas no monômero e do dímero.

Em conjunto, os resultados obtidos nas análises cristalográficas, bioquímicas e computacionais indicam um papel essencial da organização dimérica para a atividade da SaCdaA, especialmente do loop presente na interface do dímero. Sua flexibilidade e mudança conformacional devido à interação do substrato no sítio ativo, além de alterar a conformação da His175 para a posição ótima para coordenar o cofator, pode servir de ponte de comunicação entre os sítios dos protômeros, resultando na cooperatividade entre os sítios.

3.3.4 Mecanismo de atividade da SaCdaA

Muitas estruturas da DisA foram reportadas desde a descoberta do c-di-AMP. Essas estruturas incluem sua forma apo, ligada ao ATP e ligada ao c-di-AMP. A variedade das estruturas permitiu elucidar o mecanismo catalítico da biossíntese do c-di-AMP que ocorre nos homólogos de DisA, desde a ligação do substrato, até a liberação do produto. No entanto, em homólogos da CdaA, embora já se saiba as estruturas da forma apo e ligada ao c-di-AMP (estado pós-catalítico), as estruturas ligadas ao ATP, incluindo a modelada nesse trabalho, não representa o estado pré-catalítico, já que em nenhuma estrutura de CdaA ligada ao ATP mostra a interface

catalítica formada. Tentativas de observar o estado pré-catalítico cristalograficamente usando um análogo não-hidrolisável do ATP (α,β -Met-ATP) não foram bem sucedidas. Todos os cristais difratados exibiam somente o dímero incompetente. Então, para obtermos uma melhor compreensão da biossíntese do c-di-AMP por homólogos da CdaA, o estado pré-catalítico foi modelado por meio da sobreposição da nossa estrutura de alta resolução (1,1 Å) ligada ao ATP com relação ao modelo ligado ao c-di-AMP observado na estrutura da CdaA de *L. monocytogenes*.⁵⁰ Comparando as duas estruturas, todos os resíduos essenciais, incluindo His175, Glu229 e Thr207 não mostraram nenhuma mudança conformacional e o $\beta 2$ - $\alpha 3$ -loop da interface dimérica exibe a esperada conformação aberta em ambas as estruturas, dada a presença do ATP e do c-di-AMP nas estruturas sobrepostas (Figura 42). A sobreposição, portanto, não mostra nenhuma mudança conformacional muito aparente entre os estados pré-catalítico e pós-catalítico. Dessa maneira, é provável que toda e qualquer alteração conformacional deve acontecer em um momento anterior à formação da interface catalítica transiente.

Figura 42 – Sobreposição da estrutura SaCdaA e LmCdaA (PDB 6HVL). Os resíduos do $\beta 2$ - $\alpha 3$ -loop apresentam as mesmas conformações, assim como os principais resíduos responsáveis pela interação com o ATP. A numeração dos resíduos está de acordo com a sequência da SaCdaA. O estado pós-catalítico mostrado na LmCdaA não possui alterações conformacionais significativas comparado com o estado pré-catalítico da SaCdaA. A estrutura da LmCdaA (em azul) foi cristalizada com Co^{2+} , embora seja mais ativa com Mn^{2+} .⁵⁰

Fonte: Elaborada pelo autor

Com base nos nossos resultados, que demonstram a capacidade da SaCdaA de se organizar em oligômeros mais complexos, a capacidade de cooperação e autorregulação em termos cinéticos, e as observações das estruturas sobrepostas do estado pré-catalítico modelado e pós-catalítico observado, nós propomos o seguinte mecanismo enzimático para a SaCdaA. Inicialmente, a interação do substrato ATP+Mn²⁺ estabiliza o β 2- α 3-loop da interface dimérica na conformação aberta, podendo, portanto, facilitar a interação no sítio do outro protômero (Figura 40A). O Mn²⁺ é fortemente coordenado pelos fosfatos do ATP e pelo resíduo Glu229 por uma distância de 2,3Å (Figura 43A). Essa distância também é observada em outras proteínas que contêm o Mn²⁺ como cofator. A interface transiente entre dois dímeros, então, é formada, e a coordenação do cofator é completada através da interação com o resíduo His175 proveniente do segundo dímero (Figura 43A). A posição ótima para a coordenação da His175 se deu por conta da abertura do loop da interface dimérica. Comparando o sítio ativo catalítico formado na SaCdaA com o sítio do octâmero da DisA, percebe-se que os resíduos Glu229 e His175 não são conservados. O resíduo Asp75 (Asp176 na SaCdaA) é quem faz a coordenação com o íon divalente (Mg²⁺ no caso da DisA). Apesar dessas diferenças, a biossíntese do c-di-AMP catalisada pela SaCdaA acontece de maneira similar que a observada na DisA. O resíduo Asp176 possivelmente age como uma base geral, desprotonando o grupo 3'OH do ATP, o que facilita seu ataque nucleofílico contra o α -fosfato positivamente carregado do ATP vizinho. O intermediário de fosfato pentacoordenado e, então, o pirofosfato formado é provavelmente estabilizado pelos resíduos Thr207, Arg208, His209, pelo dipolo positivo da hélice α 4 e pelo cofator divalente (Figura 43B). Após a reação, o metal possivelmente se desloca em direção à His175 do segundo protômero, perdendo a coordenação com o Glu229 do primeiro protômero. De forma interessante, a menor distância (3,1Å) entre o metal e o anel imidazólico da histidina observada no estado pós-catalítico da estrutura da LmCdaA, comparada com a maior distância (3,5Å) do estado pré-catalítico modelado da SaCdaA, suporta a provável translação do metal durante a catálise.⁵⁰ Dessa forma, o movimento do metal divalente dentro do sítio ativo após a reação enzimática pode induzir a ruptura da interface catalítica, e então liberar os produtos da reação.

Figura 43 – Modelo da interface catalítica formada entre dois dímeros da SaCdaA. (A) Os íons manganês são coordenados pelos fosfatos do ATP e pelos resíduos E229 do protômero 1 (em bege claro) e pela H175 do protômero 2 (em bege escuro). (B) Esquema da reação catalisada pela SaCdaA para a síntese do c-di-AMP. Inicialmente, o resíduo D176 deve agir como base geral, desprotonando o grupo 3'OH do ATP, facilitando o ataque nucleofílico sobre o α-fosfato do ATP vizinho. (C) O intermediário pentacoordenado formado é possivelmente estabilizado pelas interações dos resíduos T207, R208 e H209 e pelo dipolo positivo da hélice α4.

Fonte: Elaborada pelo autor

Esse mecanismo de saída dos produtos é diferente do observado nos octâmeros de DisA. O recém-sintetizado c-di-AMP deve passar por túneis de argininas para poder sair do sítio ativo (Figura 44A).⁸⁰ Mutações nessas argininas para resíduos menos volumosos mostraram uma taxa de catálise da DisA duas vezes maior comprada com a nativa. Sobrepondo nossa estrutura da SaCdaA ligada ao ATP com o octâmero da DisA, é observada a presença dos resíduos altamente conservados nas CdaA e CdaS Glu228/Glu229, no lugar das argininas conservadas nas DisA (Figura 44B). Ainda, observa-se a presença do loop da interface dimérica no caminho dos túneis de arginina, “bloqueando” essa possível rota de saída do c-di-AMP. Esse loop é ausente nas diadenilato ciclases homólogas à DisA (Figura 39). Portanto, a liberação dos produtos da reação deve ocorrer através da quebra da

interface catalítica entre dois dímeros, e não por meio de túneis, como o observado na DisA (Figura 44).⁸⁰

Figura 44 – (A) Olhando através da intersecção da DisA (PDB 4YXM), para ser liberado, o c-di-AMP deve passar por túneis de argininas (indicado pelas setas) e só então estará disponível para atuar no meio celular. (B) Sobrepondo a estrutura da SaCdaA ligada ao ATP na DisA, as argininas R128-130 (em asterisco) conservadas nas DisA dão lugar aos resíduos E228-229, conservados nas CdaA e CdaS. Ainda, a presença do $\beta 2$ - $\alpha 3$ -loop (ausente nas enzimas da classe DisA) pode restringir essa possível rota de saída do c-di-AMP nas CdaA.

Fonte: Elaborada pelo autor

3.4 Interface dimérica como sítio alostérico

Os dados resultantes do *fragment screening* cristalográfico mostrados na seção 3.2 demonstraram a potência do uso desse tipo de ensaio, aliado ao uso de bibliotecas de fragmentos, na descoberta de bolsões de interação entre enzima-ligante, mostrando ser uma ferramenta indispensável nos estágios iniciais da descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. Apesar da baixa afinidade nesse tipo de interação, devido à baixa funcionalização, a variabilidade das interações dos fragmentos com a enzima em diferentes sítios, resultante da baixa complexidade molecular, permite a observação de interações específicas.⁹⁷⁻⁹⁹ Em conjunto, os diferentes tipos de interações observadas nos diferentes sítios permitem um desenvolvimento mais racional dos fragmentos em moléculas *hit-to-lead*.

Analisando os sítios de ligação dos fragmentos no bolsão da interface dimérica, especialmente os bolsões S1, S2 e S3 (Figura 45), em que se observou a maior parte dos fragmentos ligados, e ainda, comparando os fragmentos com base na sua estrutura molecular, percebe-se que existe uma similaridade estrutural grande entre 5 dos 17 ligantes (Figura 46).

Figura 45 – Fragmentos identificados na campanha cristalográfica em larga escala que se ligaram nos bolsões da interface dimérica.

Fonte: Elaborada pelo autor

Uma das moléculas que contém o *scaffold* em comum é a x1254. De forma interessante, esse conjunto é o que possui melhores dados cristalográficos e foi o único conjunto com ligante na interface dimérica que foi observado mesmo sem as análises do panDDA, a partir da substituição molecular usando modelos cristalográficos anteriormente resolvidos.

Figura 46 – Cinco dos 17 fragmentos identificados no sítio da interface dimérica são análogos, sendo que quatro se ligaram à SaCdaA de forma bastante similar, tendo o resíduo de Y127 responsável pela interação via π -stacking com os anéis aromáticos dos ligantes.

Fonte: Elaborada pelo autor

Dessa maneira, algumas moléculas análogas aos 5 fragmentos similares encontrados na interface dimérica foram compradas. As moléculas escolhidas seguem as regras de Lipinski,¹⁰⁰ possuem uma estrutura central similar aos fragmentos acima (que se ligaram no bolsão S1), mas com substituintes que possibilitam a exploração dos sítios S2 e S3.

Soaking dessas moléculas em cristais de SaCdaA resultaram em modelos cristalográficos do complexo enzima-ligante, e testes de atividade em HPLC foram realizados para avaliar a capacidade de inibição.

Os dados cristalográficos foram obtidos no LNLS, com resolução que variaram desde 1,2Å a 2,2Å. Os dados cristalográficos foram resolvidos por meio da substituição molecular. Embora alguns dos modelos cristalográficos resolvidos mostrassem indubitavelmente a densidade eletrônica dos ligantes, alguns modelos não deixavam muito claro sua real posição no bolsão da interface dimérica. Portanto, como forma de confirmar os dados resolvidos pela substituição molecular, uma análise panDDA também foi realizada. A quantidade de conjuntos coletados se mostrou suficiente para estabelecer um modelo apo (*ground state*) e, portanto, possibilitaram a correção do *background* para cálculo dos mapas de evento. A Figura 47 mostra um comparativo entre os mapas $2mF_o-DF_c$ obtidos na substituição molecular a 1σ e os mapas de evento resultantes da análise panDDA a $1,5\sigma$.

Conjunto	Mapa input (1σ)	Mapa de eventos ($1,5\sigma$)	Validação
x1001
x1006
x1007
x1010
x2016

Figura 47 – Embora muitos dos mapas input (2mFO-DFC em azul a 1σ ; mFO-DFC, em verde/vermelho a $\pm 3\sigma$), resultantes da substituição molecular, indicassem a presença do ligante, os mapas de evento (rosa, $1,5\sigma$) e z-map (verde/vermelho, $\pm 3\sigma$) permitem a modelagem tanto do *ground-state* quanto do estado ligado. Nesses conjuntos, é possível observar que o *ground-state* possui uma molécula de DMSO (proveniente do solvente das moléculas) que se liga também na interface. A análise panDDA permite, portanto, ponderar a ocupância do DMSO e dos ligantes. Os gráficos de validação mostram que a modelagem dos ligantes estão de acordo com os parâmetros analisados.

Fonte: Elaborada pelo autor

(continua)

(conclusão)

Figura 47 – Embora muitos dos mapas input (2mF_O-DF_C em azul a 1 σ ; mF_O-DF_C, em verde/vermelho a $\pm 3\sigma$), resultantes da substituição molecular, indicassem a presença do ligante, os mapas de evento (rosa, 1,5 σ) e z-map (verde/vermelho, $\pm 3\sigma$) permitem a modelagem tanto do *ground-state* quanto do estado ligado. Nesses conjuntos, é possível observar que o *ground-state* possui uma molécula de DMSO (proveniente do solvente das moléculas) que se liga também na interface. A análise panDDA permite, portanto, ponderar a ocupância do DMSO e dos ligantes. Os gráficos de validação mostram que a modelagem dos ligantes estão de acordo com os parâmetros analisados.

Fonte: Elaborada pelo autor

Novamente, os modelos resultantes das análises panDDA deixam evidentes a presença dos ligantes no bolsão da interface dimérica da SaCdaA (Figura 48A) e mais ainda, deixam claro o movimento do $\beta 2$ - $\alpha 3$ -loop e, especialmente, da His175 (Figura 48B). Aqui, observa-se também o papel da Tyr127 na interação π -*stacking* com os anéis aromáticos dos ligantes, e a potencial ligação de hidrogênio entre a Gln161 com grupos N- ou O-substituídos dos ligantes. O rearranjo do loop para a posição fechada permite a entrada de uma molécula de água (onde antes ficava a Pro173) interagente com o grupo carbonila dos ligantes (Figura 48B). Os diferentes grupos substituintes, principalmente do anel aromático dos ligantes, exploraram especialmente o bolsão S3 de diferentes formas, podendo ainda crescer em direção ao S2 ou S2' (posição simétrica) (Figura 48C). Moléculas com substituintes anfipáticos poderiam explorar tanto a parte hidrofóbica enterrada da interface dimérica, quanto a parte voltada para o solvente.

Figura 48 – (A) As moléculas análogas testadas se ligaram nos mesmos bolsões da interface dimérica identificados na campanha cristalográfica em larga escala. (B) Como resultado da interação das moléculas na interface dimérica (estrutura em cinza), o $\beta 2$ - $\alpha 3$ -loop é deslocado para a conformação fechada, jogando a H175 em direção ao sítio ativo, impedindo sua conformação ótima para a coordenação do metal na estrutura ligada ao ATP (em verde). Ainda, o deslocamento do $\beta 2$ - $\alpha 3$ -loop permite a entrada de uma água estrutural, permitindo a interação com o grupo carbonila dos ligantes. (C) Dois diferentes compostos (x1001 e X1006) exploraram de forma diferente o bolsão S3, posição ocupada pelo grupo sulfonamida, permitindo potenciais crescimentos das moléculas em direção aos bolsões S2 e seu simétrico S2'.

Fonte: Elaborada pelo autor

Além de moléculas análogas àquelas encontradas no bolsão da interface dimérica, alguns análogos às moléculas modeladas no sítio ativo também foram adquiridos. Três conjuntos do complexo enzima-ligante foram difratados e analisados com o panDDA (Figura 49).

Figura 49 – Os mapas input (1σ) e de eventos ($1,5\sigma$) mostram sem dúvidas a presença dos ligantes no sítio ativo de ambas cadeias da SaCdaA. A vantagem das análises panDDA é a modelagem do *ensemble* que engloba tanto o estado não-ligado quanto o estado ligado, permitindo um ponderamento das ocupâncias dos ligantes (no estado ligado) e das águas (no estado não-ligado). Os gráficos radiais validação mostram uma boa modelagem.

Fonte: Elaborada pelo autor

Eventos nos sítios-ativos de cada protômero revelaram que as moléculas se ligaram de um modo similar ao ATP (Figura 50). As três moléculas possuem uma estrutura em comum, 6-metiltieno-pirimidina, diferindo no substituinte R_1 na posição 4 e R_2 , que é -H nos modelos x7003 e x7004, e -CH₃ no modelo x7009 (Figura 50E). Os anéis 6-metiltieno-pirimidina estão ocupando a mesma posição da adenina do ATP. Ao redor dos ligantes, se encontram os motivos altamente conservados nas CdaA, HDGA e TRHR. Ainda, o resíduo Tyr192 sofre uma mudança conformacional. O novo rotâmero permite uma interação do tipo π -*staking*, principalmente com o anel pirimidina dos ligantes. Essa mesma alteração de rotâmero acontece nas estruturas ligadas ao ATP e nos complexos encontrados na cristalografia em larga escala (seção 3.2.1) (Figura 50F).

Comparando as estruturas cujos ligantes estão no sítio-ativo com aquelas em que os ligantes estão na interface dimérica, percebe-se claramente a posição do loop. De fato, moléculas ligadas no sítio ativo fixam o loop na conformação aberta, aumentando as interações na interface dimérica. Por outro lado, quando os ligantes estão no bolsão da interface dimérica, a posição do loop é alterada para uma conformação fechada. Consequentemente, o resíduo de His175 também sofre uma mudança conformacional, para uma posição diferente daquela necessária para a correta coordenação do cofator metálico necessário (Figura 50F). Portanto, os modelos estruturais dos complexos enzima-ligante mostram duas conformações possíveis da SaCdaA, a depender da posição do ligante. Enzimaticamente, porém, a conformação com ligante na interface dimérica deve ser inativa, pelas razões já discutidas anteriormente. Para testar a capacidade enzimática da SaCdaA na presença desses ligantes, foram propostos dois ensaios. Um baseado em luminescência, em que foi testado, em larga escala, todos os análogos adquiridos da interface dimérica, através da detecção da quantidade de ATP restante da reação da SaCdaA na presença dos compostos. O segundo teste foi realizado com os compostos obtidos na cristalografia dos análogos e de alguns muito similares, por meio da detecção direta da quantidade de c-di-AMP produzido em HPLC.

Figura 50 – De forma similar ao (A) ATP, os ligantes (B) x7003, (C) x7004 e (D) x7009 se ligaram também no sítio ativo. Os principais resíduos que interagem com a adenosina do ATP também fazem interações com os ligantes. (E) Todos os ligantes possuem um *scaffold* em comum, o 6-metiltieno-pirimidina, variando nas posições R1 e R2. (F) Em todas as estruturas, o resíduo Y192 alterna sua conformação para realizar interações do tipo *π-stacking* com os anéis aromáticos da 6-metiltieno-pirimidina da mesma forma encontrada na estrutura com ATP. Na estrutura APO (em rosa), os resíduos Y192 e H175 ocupam outras conformações.

Fonte: Elaborada pelo autor

Na tentativa de observar de modo geral o efeito dos compostos na atividade da SaCdaA, um ensaio em larga escala foi desenhado em que se mediu o sinal de luminescência a partir do acoplamento das reações do kit *Kinase-Glo® Luminescent Assay* (Promega), que utiliza o sistema luciferase/luciferina para realizar a mono-oxigenação da luciferina em oxi-luciferina a partir do ATP restante da reação de diadenilato ciclase, resultando em um fóton por conversão. Dessa maneira, é possível acompanhar, de forma indireta, a reação da SaCdaA na presença de compostos potencialmente inibidores. Embora esse tipo de ensaio em larga escala seja muito utilizado como um *screening* primário, utilizando grandes bibliotecas de compostos, não se deve afirmar que o *hit* encontrado seja um inibidor. Deve-se realizar uma validação dos *hits* para, de fato, colocá-lo como um inibidor da enzima. No entanto, esse ensaio nos dá uma indicação de potenciais inibidores.

Amostras reacionais da SaCdaA na presença de cada um dos 79 compostos análogos aos fragmentos da figura 46 adquiridos na Molport foram preparadas e, ao final do tempo de reação, o *kit* luminescente foi adicionado e o sinal e luminescência foi adquirido (Figura 51). A partir dos controles positivos e negativos de inibição, o valor determinado para o fator Z foi de 0,67, que indica uma boa qualidade do ensaio. Após a conversão do sinal luminescente em fração de atividade remanescente, os compostos cujo valor de atividade remanescente calculado está abaixo da média - 3SD foram considerados *hits*, e suas estruturas químicas estão explicitadas na figura 51.

Comparando com os dados cristalográficos, embora as condições nos cristais sejam bem diferentes das condições em solução, nenhum dos compostos observados nos modelos cristalográficos foi considerado *hit* no ensaio em larga escala. Ainda, foram coletados dados cristalográficos da SaCdaA na presença das moléculas 27, 32 e 48, mas não foi observado nenhum ligante presente na estrutura modelada. Isso nos levou a tentar verificar a potencial inibição dos compostos encontrados nos modelos cristalográficos de forma mais direta, através da observação da quantidade de c-di-AMP produzido. Para isso, foi proposto um ensaio baseado na detecção cromatográfica do pico de c-di-AMP em HPLC.

Figura 51 – Cada ponto representa a fração de atividade remanescente da SaCdaA relativa ao controle negativo (de inibição), em que a reação de diadenilato ciclase ocorreu na ausência de qualquer composto. A linha cheia (preta) representa a atividade média do controle negativo, e as linhas tracejadas em vermelho, amarelo e verde representam os valores da média $\pm 3SD$, $\pm 4SD$ e $\pm 5SD$, respectivamente. O valor de Z' para o ensaio foi de 0,67, o que representa um bom ensaio. As estruturas químicas dos compostos que resultaram em uma atividade remanescente abaixo da linha de $\pm 3SD$ estão representadas.

Fonte: Elaborada pelo autor

Os testes de atividade enzimática foram feitos com as moléculas observadas na interface dimérica nos modelos cristalográficos dos análogos, além de algumas outras moléculas bastante similares. Também foram testados alguns ligantes no sítio-ativo que são análogos aos fragmentos observados no ensaio cristalográfico em larga escala. Os ensaios foram conduzidos com a SaCdaA na presença de ATP, $MnCl_2$ e dos ligantes. Após 3h de reação, a quantidade de c-di-AMP produzido foi determinada por meio de corrida em coluna de troca iônica em HPLC, e os resultados foram comparados com o controle (em DMSO). Os resultados estão mostrados na Figura 52. A estrutura das moléculas testadas está apresentada no Apêndice F.

Figura 52 – Ensaio de atividade em HPLC com moléculas análogas àquelas identificadas na campanha cristalográfica em larga escala. Os valores estão normalizados relativo à atividade da SaCdaA na ausência do ligante.

Fonte: Elaborada pelo autor

Embora a concentração de ligantes utilizados seja alta (2 mM), esses resultados preliminares indicam que as moléculas encontradas no bolsão da interface dimérica dos modelos cristalográficos inibem a atividade da SaCdaA, e podem servir de base para estudos futuros para o desenho e desenvolvimento de compostos mais potentes, explorando a compatibilidade dos grupos funcionais e dos resíduos envolvidos na ligação. Embora nem todos os *hits* do ensaio de luminescência foram testados no ensaio em HPLC, observa-se que as moléculas 27, 48 e 65 mostraram que, de fato, em ambos os ensaios foram capazes de inibir a

atividade da SaCdaA. No entanto, a difração dos cristais de SaCdaA com as moléculas 27 e 48 não resultaram em modelos cristalográficos da enzima+ligante.

Apesar do ensaio em HPLC e baseado em luminescência mostrarem a inibição de alguns compostos, não é correto assumir que esses compostos se ligaram exatamente no sítio da interface dimérica, como observado nos modelos cristalográficos. Lá, as condições de saturação do ligante eram muito mais altas (40 mM), e a interação pode não acontecer da mesma forma em solução. Seria preciso, portanto, confirmar a ligação desses compostos em um sítio alostérico por meio de ensaios com diferentes concentrações de substrato na presença de diferentes concentrações de composto, para mostrar que o tipo de inibição é não-competitiva ou incompetitiva. Porém, é razoável de se pensar que, em conjunto com todos os resultados mostrados e discutidos nesse trabalho, a interface dimérica essencial para a atividade diadenilato ciclase da SaCdaA pode servir como um sítio de inibição alostérica, que até o momento desse trabalho, é relatada pela primeira vez. Da mesma forma, os compostos testados que foram modelados no sítio ativo, devem ser confirmados como inibidores competitivos por meio de ensaios de atividade enzimática com diferentes concentrações de substrato para cada concentração de composto testada.

4 CONCLUSÃO

O segundo-mensageiro c-di-AMP foi identificado em importantes patógenos Gram-positivos humanos, incluindo *L. monocytogenes*¹⁴, *B. subtilis*³⁹ e *S. aureus*¹⁵, e em alguns Gram-negativos, como a *Chlamydia trachomatis*.¹⁰¹ Os papéis do c-di-AMP nos processos celulares são inúmeros. Está envolvido no escaneamento da integridade do DNA, homeostase da parede celular, metabolismo celular, homeostase de íons, formação de biofilme e virulência.^{17,23,26,28–30,33,102,103} Por conta do c-di-AMP ser o único segundo-mensageiro que é essencial para as bactérias que possuem sua via de sinalização,^{18,40} as enzimas que o sintetizam se tornaram alvos moleculares atrativos para o estudo e desenvolvimento de antibióticos e/ou bacteriostáticos. Esse é o caso da CdaA, a subfamília de diadenilato ciclases mais abundante e, na maioria das bactérias, a única diadenilato ciclase presente.¹⁰⁴ Nossos resultados mostraram a interação de 72 ligantes presentes em 4 sítios espalhados pela superfície da SaCdaA. A utilização da ferramenta PanDDA aliada à clusterização dos conjuntos de dados de difração em grupos mais homogêneos se mostrou muito eficiente na identificação até de fragmentos com baixíssima ocupância. Isso se revelou também nos estudos de atividade na presença de análogos aos fragmentos identificados. Diversas moléculas mostraram uma baixa capacidade de inibição mesmo em altas concentrações. Entretanto, a identificação desses fragmentos contribui para o desenho racional de inibidores mais potentes, na medida em que a interação desses fragmentos revelou potenciais vetores de crescimento dos compostos nos sítios de interação identificados. De forma interessante, 26% dos fragmentos encontrados estavam ligados na interface dimérica essencial, mostrando seu potencial como um sítio alostérico, o primeiro descrito para as diadenilato ciclases.

Baseado em estudos anteriores com as diadenilato ciclases DisA, CdaS e CdaA, tanto na sua forma ligada ao ATP, quanto na sua forma apo, a organização dimérica das CdaA não é suficiente para a produção do c-di-AMP.^{9,17,19,50,52} Dessa forma, pelo menos dois dímeros diferentes de CdaA devem se encontrar para formar a mesma interface cataliticamente competente encontrada nos octâmeros da DisA.^{9,80} De fato, nossos estudos mostraram que a SaCdaA é capaz de se organizar, de forma transiente, em clusters de alta massa molecular somente na presença do substrato ATP e do cofator divalente Mn^{2+} . Embora seja muito improvável esse

mesmo tipo de organização *in vivo*, devido a presença das hélices transmembranares que ancoram a CdaA na membrana plasmática das bactérias, deve ocorrer algum tipo de interação de mesma natureza entre dímeros de CdaA para a síntese do c-di-AMP. Ainda, a organização em clusters de alta massa molecular é completamente abolida após a reação enzimática, uma vez que não foi observada a clusterização na presença do c-di-AMP. O mesmo ocorre nos mutantes de SaCdaA desenhados para interferir ou na ligação do ATP/Mn²⁺ (H175A, T207E, E229A), ou no estado oligomérico (N166E). Em todos os mutantes, não houve formação dos clusters catalíticos e a atividade enzimática foi bastante reduzida, mostrando que a formação desses clusters é, de fato, induzida pela interação do complexo enzima+substrato.

A partir dos nossos dados cristalográficos da SaCdaA em alta resolução, observou-se que a interação entre a CdaA e o ATP/Mn²⁺ no sítio ativo, induziu pequenas mudanças conformacionais no loop da interface dimérica. No modelo não-ligado, observa-se duas conformações para o loop, uma fechada e outra aberta. No entanto, no modelo ligado ao ATP, o loop é fixado na conformação aberta. A partir da interação com o substrato, portanto, o loop escancara o sítio ativo e sua nova conformação é estabilizada pela interface dimérica, por meio de interações hidrofóbicas. Como consequência desse movimento do loop, o resíduo His175 se reorienta em uma posição ótima para coordenar corretamente o cofator metálico divalente do protômero vizinho. Essa nova posição promove a correta acomodação do ATP/Mn²⁺ no sítio ativo e permite a formação correta da interface transiente cataliticamente competente. De forma interessante, os compostos encontrados na interface dimérica da SaCdaA por meio do ensaio cristalográfico em larga escala fixaram o loop na conformação fechada. Sobrepondo os modelos apo, ATP-ligado e composto-ligado, a conformação fechada do loop impede a correta interação da SaCdaA com o ATP. Ainda, os estudos estruturais com moléculas análogas encontradas na interface e os dados de atividade da SaCdaA na presença desses compostos sugerem que, de fato, a interface dimérica pode servir como um sítio alostérico de inibição.

Essa mesma movimentação do loop pode explicar a cooperatividade observada nos ensaios de cinética enzimática e MST. A partir da abertura do loop devido a interação da enzima com o substrato em um dos sítios do dímero, e sua

estabilização por meio de interações hidrofóbicas na interface dimérica, deve facilitar a abertura do loop do outro protômero, promovendo, portanto, uma ligação facilitada do ATP/Mn²⁺ no outro sítio ativo. Isso torna a interface dimérica um alvo bastante interessante de ser explorado para a busca de potenciais inibidores da CdaA.

A atividade da CdaA, entretanto, deve ser devidamente regulada, na medida em que a concentração intracelular do segundo-mensageiro é bastante controlada. Diminuições ou aumentos da concentração basal é extremamente prejudicial à bactéria, podendo levar à lise celular, sensibilidade à antibióticos e desbalanço iônico, por exemplo.^{15–17,39,82,92–94} Nossos resultados cinéticos mostraram que a atividade da CdaA é inibida pelo substrato. Isso mostra um mecanismo intrínseco da enzima em manter o equilíbrio na concentração intracelular do segundo-mensageiro. Em uma situação com abundância de ATP, a CdaA diminui sua velocidade de síntese de c-di-AMP. Além desse mecanismo, outras enzimas também regulam a atividade da CdaA. A CdaR, cujo domínio YBBR interage diretamente com o domínio transmembranar da CdaA.^{17,82} De forma interessante, em bactérias que possuem a CdaA como única fonte produtora de c-di-AMP, como é o caso da *L. monocytogenes* e *S. aureus*, a CdaA é negativamente regulada pela CdaR.^{38,53,105} Em *B. subtilis*, que possui a DisA e a CdaS, além da CdaA, a regulação da CdaR é positiva.¹⁷ Outra enzima que interage e regula negativamente a atividade da CdaA é a GlmM, uma enzima envolvida na biossíntese da parede celular.^{38,52} É sugerido que essas três enzimas, CdaR, CdaA e GlmM, formem um complexo em que a CdaA atua como um componente central, tendo sua atividade regulada pelas outras duas enzimas diretamente.³⁹ De fato, essas enzimas estão codificadas em um operon bastante conservado dentre as bactérias Gram-positivas.^{17,39}

Nos últimos anos, o surgimento de cepas multirresistentes de *S. aureus* é um problema mundial, dada sua facilidade em adquirir mecanismos de resistência aos antibióticos.^{106–108} Pode causar desde infecções leves na pele até doenças que podem levar à morte, como endocardite.¹⁰⁹ O tratamento atual para infecções causadas por *S. aureus* resistentes à metilicina (MRSA) inclui a administração de vancomicina, daptomicina e linezolida.^{58,59} Porém, alguns isolados resistentes a esses antibióticos já foram reportados.^{110–113} Portanto, há uma demanda urgente para o desenvolvimento e busca de novos antibióticos.¹¹⁴ Nessa direção, dado o status essencial que o c-di-AMP possui para as bactérias que possuem sua via de

sinalização, e por consequência, as proteínas que o sintetizam, especialmente a CdaA, que é, na maioria dos organismos, a única fonte produtora do segundo-mensageiro, nossos resultados contribuem para dar início aos estudos de inibição da CdaA. A descoberta de um potencial sítio alostérico e do potencial mecanismo de inibição mostrados aqui podem contribuir para o desenvolvimento futuro de bactericidas/bacteriostáticos para até as cepas mais resistentes de *S. aureus*.

REFERÊNCIAS

- 1 GOMELSKY, M. cAMP, c-di-GMP, c-di-AMP and now cGMP: bacteria use them all! **Molecular Microbiology**, v. 79, n. 3, p. 562–565, fev. 2011.
- 2 FEUCHT, B. U.; SAIER, M. H. Fine control of adenylate cyclase by the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase systems in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**, v. 141, n. 2, p. 603–610, fev. 1980.
- 3 GÖRKE, B.; STÜLKE, J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 8, p. 613–624, ago. 2008.
- 4 GREEN, J. *et al.* Cyclic-AMP and bacterial cyclic-AMP receptor proteins revisited: adaptation for different ecological niches. **Current Opinion in Microbiology**, v. 18, n. 100, p. 1, abr. 2014.
- 5 MCDONOUGH, K. A.; RODRIGUEZ, A. The myriad roles of cyclic AMP in microbial pathogens, from signal to sword. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 27, jan. 2012.
- 6 JENAL, U.; REINDERS, A.; LORI, C. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 271–284, maio 2017.
- 7 DAVIES, B. W. *et al.* Coordinated regulation of accessory genetic elements produces cyclic di-nucleotides for *Vibrio cholerae* virulence. **Cell**, v. 149, n. 2, p. 358, abr. 2012.
- 8 NELSON, J. W. *et al.* Control of bacterial exoelectrogenesis by c-AMP-GMP. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 17, p. 5389–5394, abr. 2015.
- 9 WITTE, G. *et al.* Structural biochemistry of a bacterial checkpoint protein reveals diadenylate cyclase activity regulated by DNA recombination intermediates. **Molecular Cell**, v. 30, n. 2, p. 167–178, abr. 2008.
- 10 SONG, J.-H. *et al.* Identification of essential genes in *Streptococcus pneumoniae* by allelic replacement mutagenesis. **Molecules and cells**, v. 19, n. 3, p. 365–74, jun. 2005.
- 11 GLASS, J. I. *et al.* Essential genes of a minimal bacterium. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 2, p. 425–430, jan. 2006.
- 12 FRENCH, C. T. *et al.* Large-scale transposon mutagenesis of *Mycoplasma pulmonis*. **Molecular Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 67–76, jul. 2008.
- 13 CHAUDHURI, R. R. *et al.* Comprehensive identification of essential *Staphylococcus aureus* genes using Transposon-Mediated Differential Hybridisation (TMDH). **BMC Genomics**, v. 10, n. 1, p. 291, dez. 2009.
- 14 WOODWARD, J. J.; IAVARONE, A. T.; PORTNOY, D. A. c-di-AMP secreted by intracellular *Listeria monocytogenes* activates a host type I interferon response. **Science**, v. 328, n. 5986, p. 1703–1705, jun. 2010.
- 15 CORRIGAN, R. M. *et al.* c-di-AMP Is a new second messenger in *Staphylococcus aureus* with a role in controlling cell size and envelope stress. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 9, p. e1002217, set. 2011.
- 16 LUO, Y.; HELMANN, J. D. Analysis of the role of *Bacillus subtilis* σ^M in β -lactam resistance reveals an essential role for c-di-AMP in peptidoglycan homeostasis. **Molecular**

Microbiology, v. 83, n. 3, p. 623–639, fev. 2012.

17 MEHNE, F. M. P. *et al.* Cyclic di-AMP homeostasis in *Bacillus subtilis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 3, p. 2004–2017, jan. 2013.

18 CORRIGAN, R. M.; GRÜNDLING, A. Cyclic di-AMP: another second messenger enters the fray. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 8, p. 513–524, ago. 2013.

19 ZHENG, C. *et al.* Functional analysis of the sporulation-specific diadenylate cyclase CdaS in *Bacillus thuringiensis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 908, 2015.

20 MEHNE, F. M. P. *et al.* Control of the diadenylate cyclase CdaS in *Bacillus subtilis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 30, p. 21098–21107, jul. 2014.

21 LEAVER, M.; ERRINGTON, J. Roles for MreC and MreD proteins in helical growth of the cylindrical cell wall in *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 1196–1209, set. 2005.

22 CHANG, S.; COHEN, S. N. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. **Molecular and General Genetics**, v. 168, n. 1, p. 111–115, jan. 1979.

23 BLÖTZ, C. *et al.* Identification of the components involved in cyclic di-AMP signaling in *Mycoplasma pneumoniae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1328, jul. 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01328.

24 CORRIGAN, R. M. *et al.* Cross-talk between two nucleotide-signaling pathways in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 9, p. 5826–5839, fev. 2015.

25 DEVAUX, L. *et al.* Cyclic di-AMP regulation of osmotic homeostasis is essential in Group B Streptococcus. **PLOS Genetics**, v. 14, n. 4, p. e1007342, abr. 2018.

26 WITTE, C. E. *et al.* Cyclic di-AMP is critical for *Listeria monocytogenes* growth, cell wall homeostasis, and establishment of infection. **mBio**, v. 4, n. 3, p. e00282, jul. 2013.

27 GUNDLACH, J. *et al.* Second messenger signaling in *Bacillus subtilis*: accumulation of cyclic di-AMP inhibits biofilm formation. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 804, maio 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00804.

28 OPPENHEIMER-SHAANAN, Y. *et al.* C-di-AMP reports DNA integrity during sporulation in *Bacillus subtilis*. **EMBO Reports**, v. 12, n. 6, p. 594–601, jun. 2011.

29 PENG, X. *et al.* Cyclic di-AMP mediates biofilm formation. **Molecular Microbiology**, v. 99, n. 5, p. 945–959, mar. 2016.

30 CHO, K. H.; KANG, S. O. *Streptococcus pyogenes* c-di-AMP phosphodiesterase, GdpP, influences SpeB processing and virulence. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e69425, jul. 2013.

31 TORRES, R. *et al.* *Bacillus subtilis* DisA regulates RecA-mediated DNA strand exchange. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. 10, p. 5141–5154, jun. 2019.

32 BEJERANO-SAGIE, M. *et al.* A Checkpoint protein that scans the chromosome for damage at the start of sporulation in *Bacillus subtilis*. **Cell**, v. 125, n. 4, p. 679–690, maio 2006.

33 CORRIGAN, R. M. *et al.* Systematic identification of conserved bacterial c-di-AMP receptor proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 22, p. 9084–9089, maio 2013.

- 34 DENGLER, V. *et al.* Mutation in the c-di-AMP cyclase *dacA* affects fitness and resistance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e73512, ago. 2013.
- 35 GÁNDARA, C.; ALONSO, J. C. DisA and c-di-AMP act at the intersection between DNA-damage response and stress homeostasis in exponentially growing *Bacillus subtilis* cells. **DNA Repair**, v. 27, p. 1–8, mar. 2015. DOI: 10.1016/j.dnarep.2014.12.007.
- 36 GUNDLACH, J. *et al.* Sustained sensing in potassium homeostasis: Cyclic di-AMP controls potassium uptake by KimA at the levels of expression and activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 24, p. 9605–9614, jun. 2019.
- 37 SMITH, W. M. *et al.* Heat resistance and salt hypersensitivity in *Lactococcus lactis* due to spontaneous mutation of *llmg_1816* (*gdpP*) induced by high-temperature growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 21, p. 7753–7759, nov. 2012.
- 38 ZHU, Y. *et al.* Cyclic-di-AMP synthesis by the diadenylate cyclase *CdaA* is modulated by the peptidoglycan biosynthesis enzyme *GlmM* in *Lactococcus lactis*. **Molecular Microbiology**, v. 99, n. 6, p. 1015–1027, mar. 2016.
- 39 GUNDLACH, J. *et al.* An essential poison: synthesis and degradation of cyclic di-AMP in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 197, n. 20, p. 3265–3274, 15 out. 2015.
- 40 WHITELEY, A. T.; POLLOCK, A. J.; PORTNOY, D. A. The PAMP c-di-AMP is essential for *Listeria monocytogenes* growth in rich but not minimal media due to a toxic increase in (p)ppGpp. **Cell Host & Microbe**, v. 17, n. 6, p. 788–798, jun. 2015.
- 41 SRIVATSAN, A.; WANG, J. D. Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 100–105, abr. 2008.
- 42 ZEDEN, M. S. *et al.* Cyclic di-adenosine monophosphate (c-di-AMP) is required for osmotic regulation in *Staphylococcus aureus* but dispensable for viability in anaerobic conditions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 9, p. 3180–3200, mar. 2018.
- 43 GUNDLACH, J. *et al.* Control of potassium homeostasis is an essential function of the second messenger cyclic di-AMP in *Bacillus subtilis*. **Science Signaling**, v. 10, n. 475, p. eaal3011, abr. 2017.
- 44 BRAUN, F. *et al.* Cyclic nucleotides in archaea: Cyclic di-AMP in the archaeon *Haloferax volcanii* and its putative role. **MicrobiologyOpen**, v. 8, n. 9, p. e00829, set. 2019.
- 45 RÖMLING, U. Great times for small molecules: C-di-AMP, a second messenger candidate in bacteria and archaea. **Science signaling**, v. 1, n. 33, p. pe39–pe39, ago. 2008.
- 46 BAI, Y. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* Rv3586 (*DacA*) is a diadenylate cyclase that converts ATP or ADP into c-di-AMP. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35206, abr. 2012.
- 47 GÁNDARA, C. *et al.* Activity and in vivo dynamics of *Bacillus subtilis* DisA are affected by RadA/Sms and by Holliday junction-processing proteins. **DNA Repair**, v. 55, p. 17–30, jul. 2017.
- 48 CAMPOS, S. S. *et al.* Interaction of apurinic/aprimidinic endonucleases Nfo and ExoA with the DNA integrity scanning protein DisA in the processing of oxidative DNA damage during *Bacillus subtilis* spore outgrowth. **Journal of Bacteriology**, v. 196, n. 3, p. 568–578, fev. 2014.
- 49 NICOLAS, P. *et al.* Condition-dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in *Bacillus subtilis*. **Science**, v. 335, n. 6072, p. 1103–1106, mar. 2012.

- 50 HEIDEMANN, J. L. *et al.* Crystal structures of the c-di-AMP-synthesizing enzyme CdaA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 27, p. 10463–10470, jul. 2019.
- 51 ROSENBERG, J. *et al.* Structural and biochemical analysis of the essential diadenylate cyclase CdaA from *Listeria monocytogenes*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 10, p. 6596–6606, mar. 2015.
- 52 TOSI, T. *et al.* Inhibition of the *Staphylococcus aureus* c-di-AMP cyclase DacA by direct interaction with the phosphoglucosamine mutase GlmM. **PLoS Pathogens**, v. 15, n. 1, p. e1007537, jan. 2019.
- 53 RISMONDO, J. *et al.* Phenotypes associated with the essential diadenylate cyclase CdaA and its potential regulator CdaR in the human pathogen *Listeria monocytogenes*. **Journal of Bacteriology**, v. 198, n. 3, p. 416–426, fev. 2016.
- 54 PHAM, T. H. *et al.* Replenishing the cyclic-di-AMP pool: regulation of diadenylate cyclase activity in bacteria. **Current Genetics**, v. 62, n. 4, p. 731–738, nov. 2016.
- 55 TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology**: an introduction. 12th ed. San Francisco: Pearson, 2015.
- 56 LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 9, p. 1265–1273, maio 2003.
- 57 SKINNER, D. Significance of bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*. **Archives of Internal Medicine**, v. 68, n. 5, p. 851, nov. 1941.
- 58 TSIODRAS, S. *et al.* Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. **Lancet**, v. 358, n. 9277, p. 207–208, jul. 2001.
- 59 HUSAIN, A. *et al.* Vancomycin, linezolid and daptomycin susceptibility pattern among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from Sub-Himalayan Center. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 10, n. 02, p. 145–148, abr. 2018.
- 60 ENZCHEK pyrophosphate assay kit. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FSLSG%2Fmanuals%2Fmp06645.pdf>. Acesso em: 19 ago. 2021.
- 61 PROTEIN labeling kit RED-NHS. Disponível em: <https://shop.nanotempertech.com/en/protein-labeling-kit-red-nhs-19>. Acesso em: 6 set. 2021.
- 62 PEARCE, N. M. *et al.* A multi-crystal method for extracting obscured crystallographic states from conventionally uninterpretable electron density. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 15123, abr. 2017.
- 63 PEARCE, N. M.; KROJER, T.; VON DELFT, F. Proper modelling of ligand binding requires an ensemble of bound and unbound states. **Acta Crystallographica Section D - structural biology**, v. 73, n. 3, p. 256–266, mar. 2017.
- 64 WOJDYR, M. *et al.* DIMPLE - a pipeline for the rapid generation of difference maps from protein crystals with putatively bound ligands. **Acta Crystallographica Section A - foundations of crystallography**, v. 69, n. a1, p. s299–s299, ago. 2013.
- 65 EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica Section D - biological crystallography**, v. 60, n. 12, p. 2126–2132, dez. 2004.

- 66 ADAMS, P. D. *et al.* PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallographica Section D - biological crystallography**, v. 66, n. 2, p. 213–221, fev. 2010.
- 67 KABSCH, W. XDS. **Acta Crystallographica Section D - biological crystallography**, v. 66, n. 2, p. 125–132, fev. 2010.
- 68 KORESAWA, M.; OKABE, T. High-throughput screening with quantitation of ATP consumption: a universal non-radioisotope, homogeneous assay for protein kinase. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 2, n. 2, p. 153–160, abr. 2004.
- 69 BAKI, A. *et al.* A high throughput luminescent assay for glycogen synthase kinase-3 β inhibitors. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 5, n. 1, p. 75–84, fev. 2007.
- 70 KASHEM, M. A. *et al.* Three mechanistically distinct kinase assays compared: measurement of intrinsic ATPase activity identified the most comprehensive set of ITK inhibitors. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 12, n. 1, p. 70–83, 12 fev. 2007.
- 71 AWALSH, D.; GLASS, D. B. Utilization of the inhibitor protein of adenosine cyclic monophosphate-dependent protein kinase, and peptides derived from it, as tools to study adenosine cyclic monophosphate-mediated cellular processes. **Methods in Enzymology**, v. 201, p. 304–316, 1991.
- 72 MENEGHELLO, R. **Busca e caracterização de inibidores da enzima DacA de *Staphylococcus aureus***. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.
- 73 ZHANG, J.-H.; CHUNG, T. D. Y.; OLDENBURG, K. R. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 4, n. 2, p. 67–73, abr. 1999.
- 74 BIRMINGHAM, A. *et al.* Statistical methods for analysis of high-throughput RNA interference screens. **Nature Methods**, v. 6, n. 8, p. 569–575, ago. 2009.
- 75 SUI, Y.; WU, Z. Alternative statistical parameter for high-throughput screening assay quality assessment. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 12, n. 2, p. 229–234, mar. 2007.
- 76 MESQUITA, N. C. DE M. R. **Estudos estruturais e funcionais da única enzima diadenilato ciclase e da única YbbR-like: proteínas envolvidas na biossíntese de c-di-AMP em *Staphylococcus aureus***. 2016. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.
- 77 ROULD, M. A.; CARTER, C. W. Isomorphous difference methods. **Methods in Enzymology**, v. 374, p. 145–163, 2003.
- 78 GINN, H. M. Pre-clustering data sets using cluster4x improves the signal-to-noise ratio of high-throughput crystallography drug-screening analysis. **Acta Crystallographica Section D - structural biology**, v. 76, n. 11, p. 1134–1144, nov. 2020.
- 79 TICKLE, I. J. Statistical quality indicators for electron-density maps. **Acta Crystallographica Section D - biological crystallography**, v. 68, n. 4, p. 454–467, abr. 2012.
- 80 MÜLLER, M. *et al.* Structural analysis of the diadenylate cyclase reaction of DNA-integrity scanning protein A (DisA) and its inhibition by 3'-dATP. **Biochemical Journal**, v. 469, n. 3, p. 367–374, ago. 2015.
- 81 ZHENG, C. *et al.* Highly efficient enzymatic preparation of c-di-AMP using the diadenylate

cyclase DisA from *Bacillus thuringiensis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, n. 6–7, p. 319–324, maio 2013.

82 COMMICHAU, F. M. *et al.* Making and breaking of an essential poison: the cyclases and phosphodiesterases that produce and degrade the essential second messenger cyclic di-AMP in Bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 201, n. 1, set. 2018.

83 SOME, D. *et al.* Characterization of proteins by size-exclusion chromatography coupled to multi-angle light scattering (SEC-MALS). **Journal of Visualized Experiments**, v. 2019, n. 148, 20 jun. 2019.

84 THE DOW CHEMICAL COMPANY. **Chelation chemistry**: general concepts of the chemistry of chelation. Disponível em: <https://www.dow.com/content/dam/dcc/documents/en-us/mark-prod-info/113/113-01388-01-chelation-chemistry-general-concepts-of-the-chemistry-of-chelation.pdf?iframe=true>. Acesso em: 25 Ago. 2021.

85 LICATA, V. J.; ALLEWELL, N. M. Is substrate inhibition a consequence of allostery in aspartate transcarbamylase? **Biophysical Chemistry**, v. 64, n. 1–3, p. 225–234, fev. 1997.

86 PASTRA-LANDIS, S. C.; EVANS, D. R.; LIPSCOMB, W. N. The effect of pH on the cooperative behavior of aspartate transcarbamylase from *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 253, n. 13, p. 4624–4630, jul. 1978.

87 MÜLLER, C. S. *et al.* Concurrent cooperativity and substrate inhibition in the epoxidation of carbamazepine by cytochrome P450 3A4 active site mutants inspired by molecular dynamics simulations. **Biochemistry**, v. 54, n. 3, p. 711–721, jan. 2015.

88 LATOSCHA, A. *et al.* Assessment of diadenylate cyclase and c-di-AMP-phosphodiesterase activities using thin-layer and ion exchange chromatography. **Bio-Protocol**, v. 11, n. 1, p. e3870, 2021.

89 JERABEK-WILLEMSSEN, M. *et al.* Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 9, n. 4, p. 342–353, ago. 2011.

90 SEIDEL, S. A. I. *et al.* Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions. **Methods**, v. 59, n. 3, p. 301–315, mar. 2013.

91 CORBESKI, I. *et al.* Microscale thermophoresis analysis of chromatin interactions. In: DAME, R. T. (ed.). **Bacterial chromatin: methods and protocols**. New York: Humana Press, 2018. p. 177–197.

92 COMMICHAU, F. M. *et al.* A delicate connection: c-di-AMP affects cell integrity by controlling osmolyte transport. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 175–185, mar. 2018.

93 WANG, X. *et al.* A Novel phosphodiesterase of the GdpP family modulates cyclic di-AMP levels in response to cell membrane stress in daptomycin-resistant enterococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 3, mar. 2017.

94 GRIFFITHS, J. M.; O'NEILL, A. J. Loss of function of the GdpP protein leads to joint β -lactam/glycopeptide tolerance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 579–581, jan. 2012.

95 JAMROZ, M.; KOLINSKI, A.; KMIECIK, S. CABS-flex: server for fast simulation of protein structure fluctuations. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. W1, p. W427–W431, jul. 2013.

96 KMIECIK, S. *et al.* Coarse-grained protein models and their applications. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 14, p. 7898–7936, jul. 2016.

- 97 SCOTT, D. E. *et al.* Fragment-based approaches in drug discovery and chemical biology. **Biochemistry**, v. 51, n. 25, p. 4990–5003, jun. 2012.
- 98 ERLANSON, D. A. *et al.* Twenty years on: the impact of fragments on drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 9, p. 605–619, 15 set. 2016.
- 99 LAMOREE, B.; HUBBARD, R. E. Current perspectives in fragment-based lead discovery (FBLD). **Essays in Biochemistry**, v. 61, n. 5, p. 453–464, 8 nov. 2017.
- 100 LIPINSKI, C. A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings 1PII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3–25. 1. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1–3, p. 3–26, mar. 2001.
- 101 BARKER, J. R. *et al.* STING-dependent recognition of cyclic di-AMP mediates type I interferon responses during *Chlamydia trachomatis* infection. **mBio**, v. 4, n. 3, p. e00018-13, abr. 2013.
- 102 CHENG, X. *et al.* Regulation of oxidative response and extracellular polysaccharide synthesis by a diadenylate cyclase in *Streptococcus mutans*. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 904–922, mar. 2016.
- 103 BAI, Y. *et al.* Cyclic di-AMP impairs potassium uptake mediated by a cyclic di-AMP binding protein in *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, v. 196, n. 3, p. 614–623, fev. 2014.
- 104 COMMICHAU, F. M. *et al.* A jack of all trades: the multiple roles of the unique essential second messenger cyclic di-AMP. **Molecular Microbiology**, v. 97, n. 2, p. 189–204, jul. 2015.
- 105 BOWMAN, L. *et al.* New insights into the cyclic di-adenosine monophosphate (c-di-AMP) degradation pathway and the requirement of the cyclic dinucleotide for acid stress resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 53, p. 26970–26986, dez. 2016.
- 106 HIRAMATSU, K. *et al.* Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 20, n. 10, p. 593–601, out. 2014.
- 107 LEE, A. S. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 18033, jun. 2018.
- 108 CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 629–641, set. 2009.
- 109 TURNER, N. A. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 203–218, abr. 2019.
- 110 NIVEDITHA, N.; SUJATHA, S. Worrisome trends in rising minimum inhibitory concentration values of antibiotics against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* – insights from a tertiary care center, South India. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 6, p. 585–589, nov. 2015.
- 111 DHAND, A.; SAKOULAS, G. Reduced vancomycin susceptibility among clinical *Staphylococcus aureus* isolates ('the MIC Creep'): implications for therapy. **F1000 Medicine Reports**, v. 4, n. 1, fev. 2012.
- 112 CHANG, W. *et al.* Vancomycin MIC creep in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

(MRSA) isolates from 2006 to 2010 in a hospital in China. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 262–266, abr. 2015.

113 DORTET, L. *et al.* *In vivo* acquired daptomycin resistance during treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. e1076–e1077, nov. 2013.

114 TATARKIEWICZ, J.; STANISZEWSKA, A.; BUJALSKA-ZADROŻNY, M. New agents approved for treatment of acute staphylococcal skin infections. **Archives of Medical Science**, v. 6, n. 6, p. 1327–1336, dez. 2016.

APÊNDICE A – Dedução da equação de cinética enzimática

A partir dos dados coletados nos diferentes ensaios cinéticos, os dados sugerem que a SaCdaA possui uma cinética inibida por substrato. Entretanto, esse modelo não se ajustou muito bem aos dados coletados. Ainda, os resultados cristalográficos permitiram observar uma possibilidade de comunicação entre os sítios ativos do dímero, através da interface dimérica, o que permitiria uma possível cooperatividade. Como somente a equação de Hill não se ajusta aos pontos, foi incorporada à equação de inibição por substrato um fator de cooperatividade. Essa nova equação é deduzida a seguir, onde **E** = enzima; **S** = substrato; **h** e **m** são os coeficientes de Hill principal e secundário, respectivamente; **K_d** e **K_i** são as constantes de dissociação e inibição, respectivamente; **k_{cat}** e **k_{cat,i}** são as taxas de *turnover* da enzima no complexo não-inibido e inibido, respectivamente; **P** = produto.

De (1) deriva que:

$$K_d = \frac{E S^h}{ES_h} = \frac{(E_0 - ES_h - ES_{h+m}) S^h}{ES_h}$$

$$ES_h = \frac{(E_0 - ES_{h+m}) S^h}{K_d + S^h} \quad (3)$$

De forma similar, a partir de (2):

$$K_i = \frac{ES_h + S^m}{ES_{h+m}}$$

$$ES_{h+m} = \frac{ES_h + S^m}{K_i} \quad (4)$$

Resolvendo o sistema de equações (3) e (4):

$$\begin{cases} ES_h = \frac{(E_0 - ES_{h+m}) S^h}{K_d + S^h} \\ ES_{h+m} = \frac{ES_h + S^m}{K_i} \end{cases} \Rightarrow \begin{cases} ES_h = \frac{E_0 S^h K_i}{(K_i K_d) + (K_i S^h) + S^{h+m}} \\ ES_{h+m} = \frac{E_0 S^{h+m}}{(K_i K_d) + (K_i S^h) + S^{h+m}} \end{cases}$$

A velocidade total de reação será dada por:

$$v = k_{cat} ES_h + k_{cat,i} ES_{h+m}$$

Portanto:

$$v = k_{cat} \left[\frac{E_0 S^h K_i}{(K_i K_d) + (K_i S^h) + S^{h+m}} \right] + k_{cat,i} \left[\frac{E_0 S^{h+m}}{(K_i K_d) + (K_i S^h) + S^{h+m}} \right]$$

Rearranjando os termos, obtém-se:

$$\begin{aligned} v &= \frac{V_{m\acute{a}x} S^h K_i}{(K_i K_d) + (K_i S^h) + S^{h+m}} + \frac{V_{inib} S^{h+m}}{(K_i K_d) + (K_i S^h) + S^{h+m}} \\ v &= \frac{V_{m\acute{a}x} S^h K_i + V_{inib} S^{h+m}}{(K_i K_d) + (K_i S^h) + S^{h+m}} \\ v &= \frac{V_{m\acute{a}x} K_i + V_{inib} S^m}{\left(\frac{K_i K_d}{S^h}\right) + (K_i) + S^m} \\ v &= \frac{V_{m\acute{a}x} + V_{inib} S^m / K_i}{1 + K_d / S^h + S^m / K_i} \end{aligned} \quad (5)$$

Os valores de K_d e K_i são definidos como a concentração de substrato para que haja 50% dos sítios ocupados. A fração ligada (θ) em função do K_d pode ser deduzida de (I) como:

$$\theta = \frac{ES_h}{E_0 + ES_h} = \frac{1}{\frac{E_0}{ES_h} + 1} = \frac{1}{\frac{K_d}{S^h} + 1}$$

Portanto:

$$\frac{1}{2} = \frac{1}{\frac{K_d}{S_{50}^h} + 1} \Rightarrow K_d = S_{50}^h \quad (6)$$

De forma análoga, de (2) obtém-se o valor de K_i como:

$$\theta = \frac{ES_{h+m}}{ES_h + ES_{h+m}} = \frac{1}{\frac{ES_h}{ES_{h+m}} + 1} = \frac{1}{\frac{K_i}{S^m} + 1}$$

$$\frac{1}{2} = \frac{1}{\frac{K_i}{I_{50}^m} + 1} \Rightarrow K_i = I_{50}^m \quad (7)$$

Substituindo (6) e (7) em (5), obtém-se a equação final utilizada:

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x} + V_{inib} \frac{S^m}{K_i}}{1 + \frac{K_d}{S^h} + \frac{S^m}{K_i}} \Rightarrow v = \frac{V_{m\acute{a}x} + V_{inib} \left(\frac{S}{I_{50}}\right)^m}{1 + \left(\frac{S_{50}}{S}\right)^h + \left(\frac{S}{I_{50}}\right)^m}$$

APÊNDICE B – Validação dos fragmentos modelados no sítio ativo

Figura 53 – Gráficos radiais de validação dos fragmentos encontrados no sítio ativo identificados na campanha cristalográfica em larga escala.

Fonte: Elaborada pelo autor

(continua)

(continuação)

Figura 53 – Gráficos radiais de validação dos fragmentos encontrados no sítio ativo identificados na campanha cristalográfica em larga escala.

Fonte: Elaborada pelo autor

(continua)

(conclusão)

Figura 53 – Gráficos radiais de validação dos fragmentos encontrados no sítio ativo identificados na campanha cristalográfica em larga escala.

Fonte: Elaborada pelo autor

APÊNDICE C – Validação dos fragmentos modelados na interface dimérica

Figura 54 – Gráficos radiais de validação dos fragmentos encontrados na interface dimérica identificados na campanha cristalográfica em larga escala.

Fonte: Elaborada pelo autor

APÊNDICE D – Validação dos fragmentos modelados nos outros sítios

Figura 55 – Gráficos radiais de validação dos fragmentos encontrados em outros sítios identificados na campanha cristalográfica em larga escala.

Fonte: Elaborada pelo autor

(continua)

(conclusão)

Figura 55 - Gráficos radiais de validação dos fragmentos encontrados em outros sítios identificados na campanha cristalográfica em larga escala.

Fonte: Elaborada pelo autor

APÊNDICE E – Tabela com dados cristalográficos e de validação dos modelos refinados

Tabela 4 – Tabela resumando os parâmetros de validação dos *datasets* com ligantes identificados na campanha cristalográfica em larga escala. Os valores marcados são aqueles que estão abaixo do *threshold* mínimo que indica uma boa modelagem

Dataset	Resíduo	Resolução (Å)	RSZO/ OCC	RSCC	RSZD	B ratio	RMSD (Å)	1-BDC	Occ refinada	R-work / R-free (%)
Sítio ativo										
x1039	L-1	1,27	2,73	0,91	0,10	0,82	0,07	0,21	0,61	15,99 / 18,76
x1039	L-2	1,27	2,63	0,73	0,00	0,77	0,12	0,21	0,35	15,99 / 18,76
x1051	L-1	1,20	5,28	0,91	2,40	0,74	0,15	0,30	0,53	15,40 / 17,69
x1051	L-2	1,20	3,17	0,94	1,70	0,73	0,16	0,22	0,63	15,40 / 17,69
x1053	L-1	1,21	2,67	0,85	1,10	1,55	0,48	0,15	0,60	15,80 / 17,49
x1063	L-1	1,16	1,79	0,71	0,00	0,82	0,11	0,11	0,28	16,48 / 17,81
x1081	L-1	1,20	2,58	0,81	0,50	1,40	0,24	0,13	0,31	14,69 / 17,42
x1095	L-1	1,15	5,67	0,97	1,20	0,70	0,05	0,20	0,67	15,07 / 17,55
x1095	L-2	1,15	3,18	0,92	1,40	0,78	0,14	0,14	0,44	15,07 / 17,55
x1107	L-1	1,18	2,43	0,74	0,10	1,07	0,06	0,08	0,37	14,99 / 17,29
x1112	L-1	1,15	1,80	0,73	0,60	1,24	0,09	0,12	0,50	15,84 / 17,43
x1127	L-2	1,25	2,86	0,60	0,10	0,97	0,04	0,08	0,28	14,68 / 16,93
x1129	L-1	1,20	1,61	0,78	0,20	1,16	0,17	0,08	0,31	14,95 / 17,16
x1129	L-2	1,20	1,67	0,70	1,60	0,98	0,16	0,08	0,12	14,95 / 17,16
x1133	L-1	1,19	2,50	0,74	0,80	0,87	0,22	0,14	0,40	17,18 / 18,55
x1133	L-2	1,19	2,79	0,78	0,50	0,77	0,20	0,13	0,43	17,18 / 18,55
x1145	L-1	1,40	2,42	0,74	0,20	0,87	0,16	0,17	0,33	17,54 / 19,36
x1145	L-2	1,40	2,79	0,75	1,40	0,73	0,16	0,17	0,43	17,54 / 19,36
x1147	L-1	1,14	1,94	0,64	0,60	1,28	0,43	0,09	0,36	15,10 / 17,69
x1147	L-2	1,14	1,75	0,67	1,40	1,25	0,13	0,08	0,40	15,10 / 17,69
x1177	L-1	1,33	2,68	0,84	1,10	1,02	0,24	0,16	0,41	16,76 / 19,40
x1182	L-1	1,11	2,59	0,73	0,20	1,04	0,41	0,08	0,27	15,49 / 17,23
x1186	L-1	1,09	2,35	0,84	0,30	1,11	0,22	0,16	0,51	15,99 / 18,23
x1186	L-2	1,09	2,38	0,81	1,10	1,02	0,26	0,12	0,42	15,99 / 18,23
x1204	L-1	1,19	2,50	0,79	2,10	0,88	0,12	0,17	0,40	17,41 / 18,63
x1204	L-2	1,19	2,82	0,75	1,00	0,79	0,20	0,16	0,39	17,41 / 18,63
x1210	L-1	1,19	2,86	0,83	0,30	0,94	0,16	0,16	0,42	15,18 / 17,73
x1210	L-2	1,19	3,18	0,87	0,60	0,80	0,15	0,15	0,44	15,18 / 17,73
x1213	L-1	1,16	2,39	0,77	0,10	1,00	0,14	0,17	0,46	15,86 / 17,88
x1213	L-2	1,16	2,29	0,75	0,60	0,81	0,21	0,13	0,35	15,86 / 17,88
x1252	L-1	1,22	2,50	0,77	0,30	0,92	0,16	0,18	0,48	17,56 / 18,81
x1252	L-2	1,22	2,63	0,73	1,10	0,89	0,19	0,16	0,38	17,56 / 18,81
x1268	L-1	1,43	2,78	0,81	0,30	0,83	0,17	0,16	0,36	17,97 / 21,42
x1268	L-2	1,43	2,50	0,73	0,70	0,90	0,31	0,16	0,28	17,97 / 21,42
x1272	L-1	1,47	2,12	0,82	0,00	0,96	0,00	0,24	0,33	17,79 / 19,98
x676	L-1	1,39	2,12	0,72	0,10	1,16	0,35	0,12	0,33	16,78 / 19,41

(continua)

(continuação)

Tabela 4 – Tabela resumando os parâmetros de validação dos *datasets* com ligantes identificados na campanha cristalográfica em larga escala. Os valores marcados são aqueles que estão abaixo do *threshold* mínimo que indica uma boa modelagem

x676	L-2	1,39	1,63	0,81	0,60	1,52	0,11	0,12	0,43	16,78 / 19,41
x725	L-1	1,25	3,02	0,82	0,70	1,26	0,23	0,13	0,43	15,17 / 17,79
x725	L-2	1,25	3,02	0,88	0,00	1,11	0,28	0,13	0,43	15,17 / 17,79
x757	L-1	1,14	2,00	0,67	0,00	1,41	0,20	0,09	0,35	15,90 / 17,93
x757	L-2	1,14	2,22	0,76	0,00	0,99	0,10	0,09	0,45	15,90 / 17,93
x771	L-1	1,30	1,71	0,70	0,40	1,41	0,27	0,11	0,41	14,31 / 16,46
x771	L-2	1,30	2,05	0,65	0,10	1,02	0,37	0,10	0,44	14,31 / 16,46
x777	L-1	1,44	3,33	0,74	1,20	1,01	0,20	0,14	0,27	18,37 / 19,72
x777	L-2	1,44	2,59	0,78	0,40	0,97	0,17	0,14	0,27	18,37 / 19,72
x788	L-1	1,34	2,29	0,79	0,60	1,30	0,12	0,14	0,48	16,02 / 19,16
x788	L-2	1,34	2,22	0,75	2,30	1,00	0,19	0,13	0,45	16,02 / 19,16
x789	L-1	1,14	3,23	0,77	0,30	0,86	0,21	0,10	0,31	14,42 / 17,39
x789	L-2	1,14	2,76	0,80	1,30	1,24	0,43	0,10	0,29	14,42 / 17,39
x843	L-1	1,28	2,76	0,71	0,10	1,12	0,21	0,10	0,29	15,09 / 16,97
x859	L-1	1,31	2,82	0,79	0,60	1,04	0,28	0,17	0,39	16,49 / 19,72
x859	L-2	1,31	2,79	0,89	0,00	0,91	0,10	0,17	0,43	16,49 / 19,72
Interface dimérica										
x1029	L-1	1,27	2,56	0,72	0,90	1,28	0,16	0,12	0,39	16,32 / 17,96
x1107	L-2	1,18	2,76	0,63	1,30	1,32	0,10	0,09	0,29	14,99 / 17,29
x1113	L-1	1,13	3,18	0,70	0,60	1,43	0,41	0,06	0,22	15,55 / 17,69
x1143	L-1	1,20	1,94	0,61	0,30	1,31	0,10	0,08	0,31	14,19 / 16,08
x1168	L-1	1,11	2,80	0,66	0,90	1,29	0,12	0,07	0,25	15,20 / 16,94
x1177	L-2	1,33	4,00	0,71	2,10	0,84	0,22	0,19	0,30	16,76 / 19,40
x1179	L-1	1,13	2,97	0,76	1,40	1,56	0,21	0,10	0,37	15,29 / 17,52
x1219	L-2	1,33	2,65	0,80	0,10	1,47	0,09	0,11	0,34	16,28 / 19,09
x1240	L-1	1,32	2,31	0,69	0,50	1,64	0,52	0,16	0,39	16,70 / 19,74
x1254	L-1	1,33	4,21	0,93	1,40	1,19	0,18	0,30	0,76	16,01 / 18,90
x1259	L-1	1,35	2,82	0,83	1,70	1,30	0,18	0,15	0,39	17,02 / 18,92
x1259	L-2	1,35	3,13	0,78	0,20	1,52	0,13	0,14	0,32	17,02 / 18,92
x621	L-1	1,67	3,55	0,92	0,70	1,18	0,14	0,34	0,76	19,15 / 22,92
x725	L-3	1,25	7,00	0,95	0,00	1,17	0,42	0,15	0,30	15,17 / 17,79
x751	L-1	1,20	5,37	0,95	0,00	1,15	0,17	0,14	0,41	14,47 / 16,04
x799	L-1	1,55	5,13	0,84	1,60	0,95	0,13	0,24	0,39	18,49 / 22,83
x858	L-1	1,22	1,43	0,58	1,20	1,35	0,19	0,09	0,35	14,89 / 17,45
x870	L-1	1,27	4,00	0,70	0,30	1,38	0,38	0,06	0,20	14,56 / 16,54
x870	L-2	1,27	2,73	0,71	0,40	1,33	0,62	0,06	0,22	14,56 / 16,54
Outros sítios										
x1042	L-1	1,25	2,00	0,75	0,00	0,93	0,18	0,11	0,35	16,10 / 18,94
x1047	L-1	1,22	1,82	0,63	0,50	0,85	0,22	0,12	0,22	15,43 / 16,88
x1065	L-1	1,31	3,85	0,80	0,40	1,51	0,19	0,14	0,26	17,44 / 19,49
x1116	L-1	1,12	2,57	0,75	1,40	1,00	0,16	0,09	0,35	14,70 / 16,26
x1119	L-1	1,23	3,88	0,94	0,80	1,12	0,16	0,15	0,67	15,96 / 17,47
x1127	L-1	1,25	1,91	0,72	0,10	1,95	0,09	0,11	0,47	14,68 / 16,93
x1197	L-1	1,27	2,50	0,70	2,00	1,39	0,11	0,10	0,24	16,12 / 18,74
x1201	L-1	1,07	2,98	0,80	0,60	1,36	0,41	0,12	0,57	13,65 / 15,79
x1207	L-1	1,34	2,81	0,73	1,00	0,86	0,14	0,22	0,32	16,71 / 17,87

(continua)

(conclusão)

Tabela 4 – Tabela resumindo os parâmetros de validação dos *datasets* com ligantes identificados na campanha cristalográfica em larga escala. Os valores marcados são aqueles que estão abaixo do *threshold* mínimo que indica uma boa modelagem

x1211	L-1	1,25	3,60	0,73	1,80	0,73	0,17	0,17	0,25	16,63 / 19,07
x1219	L-1	1,33	3,44	0,70	2,20	1,03	0,07	0,12	0,32	16,28 / 19,09
x1221	L-1	1,39	2,67	0,78	0,10	0,96	0,27	0,21	0,30	17,91 / 19,78
x1229	L-1	1,40	1,61	0,75	0,00	1,00	0,36	0,19	0,31	16,34 / 17,76
x1251	L-1	1,32	2,71	0,77	0,30	1,06	0,13	0,18	0,48	16,50 / 18,31
x672	L-1	1,21	1,43	0,70	0,00	1,20	0,40	0,10	0,35	14,89 / 17,15
x719	L-1	1,14	2,11	0,77	0,60	0,90	0,14	0,07	0,19	14,41 / 15,70
x762	L-1	1,21	2,65	0,82	0,90	0,87	0,18	0,12	0,34	14,94 / 17,77
x773	L-1	1,14	3,04	0,61	1,10	1,00	0,19	0,09	0,23	15,07 / 16,13
x787	L-1	1,20	2,17	0,67	0,40	1,11	0,32	0,06	0,23	13,28 / 15,20
x836	L-1	1,14	1,07	0,64	1,50	1,37	0,13	0,08	0,28	13,19 / 15,71
x837	L-1	1,14	2,83	0,86	1,90	1,30	0,15	0,13	0,46	13,74 / 15,91
x844	L-1	1,25	4,00	0,75	0,30	0,96	0,11	0,08	0,25	14,15 / 16,10
x847	L-1	1,56	1,74	0,86	0,10	1,40	0,29	0,19	0,46	17,23 / 20,57
x852	L-1	1,20	1,92	0,77	0,00	1,17	0,31	0,11	0,26	14,12 / 15,40

Fonte: Elaborada pelo autor

APÊNDICE F – Estrutura molecular dos compostos análogos aos fragmentos identificados na campanha cristalográfica em larga escala

Figura 56 – Estrutura molecular dos compostos análogos aos fragmentos identificados na campanha cristalográfica em larga escala. As moléculas numeradas foram adquiridas na MolPort. As últimas seis moléculas foram adquiridas na Specs, e nomeadas segundo seus respectivos códigos.

Fonte: Elaborada pelo autor