UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

NATHALYA CRISTINA DE MORAES ROSO MESQUITA

Estudos estruturais e funcionais da única enzima diadenilato ciclase e da única YbbR-like de *Staphylococcus aureus*: proteínas envolvidas na biossíntese de c-di-AMP.

São Carlos
2016

NATHALYA CRISTINA DE MORAES ROSO MESQUITA

Estudos estruturais e funcionais da única enzima diadenilato ciclase e da única YbbR-like de *Staphylococcus aureus*: proteínas envolvidas na biossíntese de c-di-AMP.

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 Doutora em Ciências.

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

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

São Carlos
2016

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

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

Mesquita, Nathalya Cristina de Moraes Roso
Estudos estruturais e funcionais da única enzima
diadenilato ciclase e da única YbbR-like de
Staphylococcus aureus: proteínas envolvidas na
biossíntese de c-di-AMP. / Nathalya Cristina de
Moraes Roso Mesquita; orientador Marcos Vicente de
Albuquerque Salles Navarro - versão corrigida --
São Carlos, 2016.
163 p.

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

1. Diadenilato ciclase. 2. C-di-AMP. 3. Interface
dimérica. I. Navarro, Marcos Vicente de Albuquerque
Salles, orient. II. Título.

À minha família com todo amor que posso doar e toda gratidão pelo apoio, compreensão, carinho. Especialmente: à minha mãe, meu marido, minha irmã e meu sobrinho, que sempre tiveram palavras de apoio no momento certo e nunca me deixaram desistir desse lindo caminho que o Universo me deu de presente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por ter me concedido o dom da vida, fé e perseverança para encarar uma carreira científica.

A minha mãe Rosane e a minha avó Onypha, responsáveis pela minha criação e por eu ser quem sou e estar aqui hoje, sem elas eu não sei o que seria de mim. Toda minha família, especialmente minha irmã Lynamara, meu cunhado Willian e meu sobrinho Ayron, por sempre fazerem meus finais de semana momentos únicos e felizes. Ao meu marido Valter, por me incentivar, compreender, aconselhar e acompanhar muitas vezes ao laboratório nos finais de semana e madrugadas. Todos vocês sempre me incentivaram e incentivam nos momentos de angústias, são àqueles com quem eu sei que posso contar a qualquer momento.

Agradeço a todos que passaram pela minha vida durante esses quatro anos de trabalho e que de alguma forma contribuíram para a realização do mesmo.

Sou especialmente grata:

ao meu orientador, Marcos V. A. S. Navarro, pelo crédito e confiança ao me receber em seu grupo de pesquisa e pelos ensinamentos;

ao Prof. Dr. Artur Cordeiro e ao Dr. Gustavo F. Mercaldi, pelas discussões e colaboração na elaboração dos ensaios de fluorescência polarizada;

ao Dr. Luis Guilherme Mansor Basso, Militar, pela colaboração nos ensaios de HYSCORE, pelas discussões dos resultados deste trabalho, por sempre me escutar e incentivar a seguir a carreira acadêmica, por ser um companheiro de laboratório desde a iniciação científica instigando meu pensamento crítico sob tudo;

ao Raphael Meneghello, pela companhia, pelas discussões, pela ajuda com purificação de proteínas e inúmeros ensaios realizados no laboratório, assim como, por ter me propiciado o prazer de passar o conhecimento que adquiri durante meu doutorado, ajudando no desenvolvimento de seus projetos de Iniciação Científica e Mestrado, além de contribuir para o início de um caminho a ser seguido no seu doutorado. Com toda certeza a sua formação contribuiu muito para a minha formação;

aos meus amigos orientados pelo Prof. Marcos: Andréia, Bruno, Diego, Everton, Flávio, Gustavo, Helton, Juliana, Naiara e Raphael, por todos os momentos científicos e não

científicos que tivemos juntos nesses quatro anos. Por me ensinarem muito e não apenas sobre ciência... e por sempre lembrarem da minha pessoa nos momentos de descontração e especialmente momentos de gordices!!!! Vocês foram imprescindíveis nesses anos, especialmente pela convivência;

aos meus colegas de laboratório e amigos do Grupo de Biofísica Sérgio Mascarenhas: Ana Eliza, Ana Felizati, Carla, Débora Órcia, Francesco, Ítalo, Karen, Joci, José Luís, Heline, Heloisa, Leandro Bardi, Marcela, Militar, Natália Alves, Patrícia Kumagai, Raissa, Sinara, Tati, Prof, Ana Paula, Prof Cláudia, Prof. Nelma, Prof Otaciro, Prof. Ricardo, pela colaboração durante o desenvolvimento desse projeto: pelos momentos de discussões por me ensinarem não apenas metodologias, procedimentos e técnicas de laboratório, mas também proporcionarem estímulo para a busca pelo conhecimento, pelas discussões sociais e comportamentais. Enfim, sou grata por serem pessoas que não só convivem comigo, mas que participam do meu dia-a-dia e me fazem enxergar as coisas que sozinha não consigo ver de dentro das minhas próprias perspectivas;

ao apoio técnico que temos no Grupo: Andressa, Bel, Patrícia, Rafael e Fernando. Obrigada por tudo, especialmente pela paciência! Agradeço a Bel e a Patrícia por, também, enriquecer meu caderninho de receitas, aprendi a fazer muitas gordices com vocês;

a Professora Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo e todo o grupo do Laboratório Epidemiologia e Microbiologia Molecular (LEMiMo) que contribuíram tanto para os ensaios com os insumos de *Staphylococcus aureus* quanto para momentos de discussão de resultados e especialmente como companhia das viagens realizadas para congressos;

as secretárias Regiane, Luciana, Lhais e Talilane pela ajuda com as partes burocráticas a serem resolvidas;

a secretaria de pós-graduação, as bibliotecárias e aos profissionais da gráfica do Instituto de Física de São Carlos;

aos Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) e ao National Synchrotron Light Source por disponibilizarem seus estabelecimentos para inúmeros ensaios realizados no presente trabalho.

Peço desculpas se esqueci de alguém, mas são muitos nomes e com certeza eu não me lembraria de todos.

Sou grata ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo por me conceder a honra de trabalhar durante aproximadamente oito anos, desde a iniciação científica, neste renomado instituto.

Sou, também, grata ao CNPq e a FAPESP pelo apoio financeiro fundamental para a realização do projeto.

“Andar com fé eu vou, que a fé não costuma faiá...”

(Gilberto Gil)

RESUMO

MESQUITA, N. C. M. R *Estudos estruturais e funcionais da única enzima diadenilato ciclase e da única YbbR-like de **Staphylococcus aureus**: proteínas envolvidas na biossíntese de c-di-AMP*. 2016. 163 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Recentemente, uma nova molécula de sinalização bacteriana, o AMP dimérico cíclico (c-di-AMP) emergiu como um regulador central dos processos fisiológicos essenciais, tais como a homeostase celular, verificação da integridade do DNA e virulência bacteriana, entre outros. O c-di-AMP é produzido a partir da condensação de duas moléculas de adenosina trifosfato (ATP) por proteínas denominadas diadenilato ciclases, que contém o domínio DisA_N, também denominado DAC. Existem 2842 sequências de proteínas que contém o domínio DAC, provenientes de 2386 organismos encontradas no banco de dados *Protein Families Database* (Pfam). Essas proteínas são divididas em subfamílias sendo as três subfamílias mais abundantes: DacA (69,1%), proteínas de membrana associadas a sinalização intracelular de alterações decorrentes do meio externo; DisA (24,1%), primeira diadenilato ciclase a ser amplamente estudada, é uma proteína intracelular encontrada na forma de octâmeros ativos em solução, a qual, indiretamente, controla a divisão celular através da verificação da integridade do DNA e DacB (5,5%), proteínas citoplasmáticas expressa, particularmente, durante a formação de esporos bacterianos. Uma característica interessante é que a maioria dos organismos contém uma única e essencial proteína com domínio DAC. Os organismos que contém duas ou mais proteínas-DAC, tais como *Clostridium* e *Bacillus* spp., são uma exceção. Em *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), um patógeno humano oportunista e responsável por inúmeras doenças infecciosas, uma única diadenilato ciclase é encontrada pendurada na porção interna da membrana celular (Sau_DacA). A atividade desta proteína é potencialmente regulada através da interação direta com uma proteína YbbR-like, que contém um domínio sensor extracelular. Sau_DacA conserva todos os elementos-chave de uma diadenilato ciclase bacteriana, e por ser a única presente em *S. aureus*, revela-se um excelente alvo de estudo para o desenvolvimento de novos fins terapêuticos. No entanto, até o presente momento, existem poucas informações em relação a estrutura proteica, ao mecanismo de síntese de c-di-AMP e regulação do mecanismo de síntese de nucleotídeo destas proteínas, sendo, portanto, neste aspectos que o presente trabalho pretendeu contribuir. Através de uma série de ensaios, estruturais, calorimétricos, espectroscópicos e bioquímicos, aliados a mutações sítio-dirigidas, identificou-se a relevância de uma conformação dimérica para a estabilidade conformacional e térmica para a proteína ser funcionalmente ativa, assim como a importância dos motivos conservados DGA (Aspartato-Glicina-Alanina) e RHR (Arginina-Histidina-Arginina) para a atividade da Sau_DacA. O loop L5 localizado entre o sítio ativo e a interface dimérica mostrou-se relevante, uma vez que nele é encontrado o motivo DGA - de ligação ao ATP - e o mesmo encontra-se estabilizado em uma posição favorável para ligação do ATP, apenas na conformação dimérica da proteína. Nossos resultados aliados a dados da literatura possibilitaram a proposição de um mecanismo de síntese de c-di-AMP que deve ocorrer via encontro face-a-face de dois sítios de ligação de ATP presentes em dímeros proteicos distintos, podendo a taxa de síntese de o nucleotídeo sofrer interferência via interação proteína-proteína com a proteína receptora de sinal Sau_YbbR. Desta forma, contribuímos para uma melhor compreensão da estrutura e função da Sau_DacA, possibilitando o uso desta como alvo para o desenvolvimento de novos fármacos, uma vez

que é sabido que a biossíntese de c-di-AMP é essencial para a maioria dos patógenos que o sintetizam.

Palavras-chave: Diadenilato ciclase. C-di-AMP. Interface dimérica.

ABSTRACT

MESQUITA, N. C. M. R. *Structural and functional studies of the unique diadenylate cyclase enzyme and the unique YbbR-like protein in **Staphylococcus aureus**: proteins involved in c-di-AMP biosynthesis*. 2016. 163 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Recently, a new bacterial signaling molecule, the dimeric cyclic AMP (c-di-AMP) has emerged as a central regulator of essential physiological processes, such as cell wall homeostasis, DNA integrity and bacterial virulence, among others. C-di-AMP is synthesized from two molecules of adenosine triphosphate (ATP) by proteins containing DisA_N domain, also called diadenylate cyclases (DACs). A survey in the Protein Families Database database (Pfam) found 2842 protein sequences containing the DAC domain, from 2386 different organisms. These proteins are divided into subfamilies and the three most abundant are: DacA (69,1%), a membrane protein associated with intracellular signaling resulting from an external environment change; DisA (24,1%), the first and most widely studied diadenylate cyclase, an intracellular protein found as active octamers in solution which indirectly controls cell division by DNA integrity verification; and DacB (5,5%), a cytoplasmic proteins, particularly expressed during bacterial spores formation. An interesting feature is that most organisms contain just a single and essential DAC-protein. Organisms containing two or more DAC-containing proteins, such as *Clostridium* and *Bacillus* spp., are exceptions. In *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), an opportunistic human pathogen responsible for some life-threatening diseases, there is a single membrane attached diadenylate cyclase, hanging in the inner portion of the cell membrane (Sau_DacA). The activity of this protein is potentially regulated through direct interaction with YbbR, which contains an extracellular sensor domain. Sau_DacA conserves all key elements of bacterial di-adenylate cyclase, and for being the only diadenylate cyclase from *S. aureus*, proves to be an excellent study target for new therapeutic purposes. However, to date, there is a lack of information about structure, c-di-AMP synthesis mechanism and regulation of nucleotide synthesis by Sau_DacA. Therefore, in this context the present work aims to contribute. Through a series of structural, calorimetric, spectroscopic and biochemical assays combined with site-directed mutations, we solved the structure of a soluble construct of Sau_DacA and identified a dimeric interface relevance for the conformational and thermal stability to the protein. This dimer is functionally active and highlights the importance of conserved motifs DGA (Aspartate-Glycine-Alanine) and RHR (Arginine-Histidine-Arginine) for the activity of Sau_DacA. The L5 loop, located between the active site and the dimer interface where is allocated the ATP binding motif (DGA), is stabilized in a favorable position for ATP binding, just in protein dimeric conformation. Our results combined with literary allowed us infer the synthesis of c-di-AMP occurs by face-to-face encounter of two distinct ATP binding site and its rate of synthesis could be regulated through direct protein interaction with. In this way, we contribute to a better understanding of Sau_DacA structure and function, assisting in its use as a target for new drugs development since it is known the biosynthesis of c-di-AMP is essential for most pathogens that synthesize.

Keywords: Diadenylate cyclase. C-di-AMP. Dimeric Interface.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Estrutura molecular das moléculas sinalizadoras baseadas em nucleotídeos cíclicos encontradas em bactérias e seus fenótipos ou processos celulares controlados por: (A) cGMP, (B) cAMP, (C) (p)ppGpp, (D) c-di-GMP e (E) c-di-AMP. 38
- Figura 2 -** Estrutura octamérica da DisA de *Thermotoga maritima*, com destaque para o sítio onde foi visualizada a densidade eletrônica compatível a uma molécula de c-di-AMP. 39
- Figura 3 -** **Síntese de c-di-AMP.** O c-di-AMP é sintetizado a partir da condensação de duas moléculas de ATP por diadenilato ciclases que contém o domínio DAC (em laranja), liberando duas moléculas de pirofosfato. O c-di-AMP é hidrolizado a pApA por fosfodiesterases que contém os domínios DHH/DHHA1 ou HD, denominadas GdpPs ou PgpH, respectivamente. A manutenção dos níveis intracelulares de c-di-AMP têm sido associada a diversos processos biológicos como: transporte iônico, homeostase de potássio, metabolismo da parede celular, manutenção da integridade do DNA, controle da esporulação e germinação, homeostase da membrana. 40
- Figura 4 -** Arquitetura das proteínas mais abundantes que contém o domínio DAC..... 42
- Figura 5 -** Representação da reação de síntese de c-di-AMP por diadenilato ciclases. 42
- Figura 6 -** **Estrutura cristalográfica do domínio DAC da diadenilato ciclase A de *L. monocytogenes* (Lmo_DacA), depositada no Protein Data Bank (PDB) com código de acesso 4RV7.** (A) A porção citoplasmática de um monômero de Lmo_DacA (colorido na forma de arco-íris do N-terminal para o C-terminal) tem uma forma globular composta de uma folha- β torcida central envolta por hélices- α de ambos os lados, como podemos ver através de um giro de 90° em torno do da folha- β (B)..... 44
- Figura 7 -** Cartoon mostrando o sítio de ligação do ATP e do magnésio, destacando os motivos DGA e RHR destacados em sticks amarelos. 44
- Figura 8 -** (A) Representação em *cartoon* da configuração das quatro moléculas de Lmo_DacA encontradas em unidade assimétrica do cristal de Lmo_DacA. (B) O mesmo que o anterior, mas com destaque em azul royal para a localização dos sítios de ligação de ATP em cada monômero de Lmo_DacA.⁴³ 45
- Figura 9 -** Monômero da Tma_DisA mostrando o enovelamento e delimitação de cada domínio que a constitui. 47
- Figura 10 -** **Estrutura cristalográfica do domínio DAC da *DNA integrity scanning protein A* de *T. maritima* (Tma_DisA), depositada no Protein Data Bank (PDB) com código de acesso 3C21.**(A) Domínio DAC de um monômero de Tma_DisA (colorido na forma de arco-íris do N-terminal para o C-terminal) tem uma forma globular composta de uma folha- β

	torcida central envolta por hélices- α de ambos os lados, como podemos ver através de um giro de 90° em torno do da folha- β (B).	47
Figura 11 -	Sobreposição dos domínios DAC de Tma_DisA (em azul – PDB 3C21) e Lmo_DacA (em ocre claro - PDB 4RV7) evidenciando as mesmas estruturas secundárias que formam do sítio de ligação do ATP em ambas as proteínas.	48
Figura 12 -	(A) Representação da configuração das duas moléculas de Tma_DisA encontradas em unidade assimétrica da rede cristalina. (B) Representação da configuração octamérica de Tma_DisA encontrada através de análise dos contatos moleculares na rede cristalina através do eixo de simetria de ordem 4 do cristal e modelagem dos dados de espalhamento de baixo ângulo (SAXS).	48
Figura 13 -	A conformação estrutural apresentada pelas duas moléculas nas unidades assimétricas do cristal de Tma_DisA e consequentemente no octâmero ativo (Figura10), propicia a aproximação face-a-face de dois sítios de ligação de ATP resultando, pois, na hidrólise destas moléculas e na síntese do dinucleotídeo. O zoom da figura mostra o encontro destes sítios na estrutura da Tma_DisA, destacando os motivos DGA e RHR (em ciano) e o c-di-AMP (em sticks) encontrado ligado nessa estrutura (Utilizamos aqui o código PDB 3C1Y referente a Tma_DisA complexada com c-di-AMP).	49
Figura 14 -	Modelo do mecanismo de verificação do DNA através da Tma_DisA. A DisA é uma proteína que realiza a verificação do DNA através do domínio HhH (laranja). Na ausência de lesões cromossômicas, a DisA é capaz de sintetizar c-di-AMP através do domínio DAC (verde). Quando essa proteína reconhece ácidos nucleicos ramificados, alguma mudança conformacional deve ocorrer na estrutura da Tma_DisA, inibindo a síntese de c-di-AMP e indicando para a célula bacteriana a presença de cromossomos não-segregáveis.	50
Figura 15 -	Monômero da Bce_DacB mostrando o enovelamento e delimitação de cada domínio que a constitui.	51
Figura 16 -	Estrutura modelada da domínio DAC da diadenilato ciclase B de <i>Bacillus cereus</i> (Bce_DacB), depositada no Protein Data Bank (PDB) com código de acesso 4RV7. (A) Domínio DAC de um monômero de Bce_DacB (colorido na forma de arco-íris do N-terminal para o C-terminal) tem uma forma globular composta de uma folha- β torcida central envolta por hélices- α de ambos os lados, como podemos ver através de um giro de 90° em torno do da folha- β (B).	51
Figura 17 -	Sobreposição dos domínios DAC de Tma_DisA (em azul), Lmo_DacAb(em ocre claro) e Bce_DacB (magenta) mostrando que as mesmas estruturas secundárias que formam o sítio de ligação do ATP na Lmo_DacA são encontradas na mesma região do domínio DAC da Tma_DisA.	52

- Figura 18 -** (A) Representação da configuração das três moléculas de Bce_DacB encontradas na unidade assimétrica. (B) Representação da configuração hexamérica de Bce_DacB encontrada através de análise dos contatos moleculares entre unidades assimétricas vizinhas do eixo de simetria de ordem 6..... 53
- Figura 19 -** A conformação estrutural hexamérica apresentada pela Bce_DacB (Figura16B) não propicia, propicia a aproximação face-a-face de dois sítios de ligação de ATP. Assim não propicia a hidrólise destas moléculas e consequentemente a síntese do dinucleotídeo, como relatado por Mehne *et al.*³⁸. O zoom da figura mostra a disposição dos possíveis sítios de ATP simetricamente opostos na estrutura da Bce_DacB, destacando os motivos DGA e RHR (em ciano) e o ATP (em *sticks*) modelado nessa estrutura..... 53
- Figura 20 -** Mecanismo de síntese de c-di-AMP pelas DacBs proposto por Mehne *et al.*³⁸. Os hexâmeros de DacB de *B. subtilis* não possuem uma conformação favorável para a síntese do nucleotídeo. Logo a única maneira desta proteína se tornar enzimaticamente ativa seria se fatores externos como ligação de ATP, modificações pós-traducionais ou ligação de efetores alostéricos, ocasionassem a dissociação do hexâmero de DacB e promovessem a reassociação de seus monômeros em dímeros, constituindo, assim, uma conformação completa de um sítio ativo para síntese de c-di-AMP..... 54
- Figura 21 -** Arquitetura das proteínas mais abundantes que contém o domínio YbbR, denominadas proteínas YbbR-like disponíveis no Pfam..... 55
- Figura 22 - Estruturas dos domínios I e IV da proteína da família das YbbR-like de Desulfitobacterium hafniense Y51.** (A) Estrutura do domínio IV da YbbR Desulfitobacterium hafniense Y51 de obtida por ressonância magnética nuclear. (B) Estrutura do domínio I da YbbR Desulfitobacterium hafniense Y51 obtida por ressonância magnética nuclear. (C) Sobreposição das estruturas obtidas para os domínios I (em azul) e IV (em laranja) mostra a similaridade entre as duas moléculas. 56
- Figura 23 -** Microscopia eletrônica mostrando as células de *S. aureus*. 57
- Figura 24 - Análises de bioinformática.** Arquitetura da Sau_DacA e construções das porções citoplasmáticas dessa proteína mostrando a predição de hélices transmembranas através do programa TMHMM V2.0 e localização do domínio DAC através do programa PFAM. Weblogo do alinhamento dos domínios diadenilato ciclase de enzimas com arquiteturas do tipo DacA,³ mostrando a conservação dos motivos DGA e RHR, responsáveis pela estabilização do ATP e motivo EE, responsável pela coordenação do Mn^{2+} 93
- Figura 25 -** (A) Amplificação dos genes a partir de DNA genômico: (MM) Padrão massas moleculares; (1) ORF86; (2) ORF98 e (3) ORF106. (B) Análise de restrição da subclonagem em vetor pGEM T-easy: (MM) Padrão massas moleculares; (1) ORF86; (2) ORF98 e (3) ORF106. (C) Análise de restrição da clonagem em vetor de expressão pSMT3: (MM) Padrão

massas moleculares; (1) ORF86; (2) ORF98 e (3) ORF106. **(D) Verificação da expressão das proteínas de interesse – Análise por gel SDS-PAGE 15%:** (MM) Padrão massas moleculares; (1) Não-Induzido Sau_DacA,⁸⁶ (2) Induzido Sau_DacA,⁸⁶ (3) Não-Induzido Sau_DacA,⁹⁸ (4) Induzido Sau_DacA,⁹⁸ (5) Não-Induzido Sau_DacA,¹⁰⁶ (6) Induzido Sau_DacA,¹⁰⁶ respectivamente.95

Figura 26 - Análise do protocolo de purificação e estado oligomérico. (A) Análise em SDS-PAGE- 15% da purificação da Sau_DacA⁸⁶: (MM) Padrão massas moleculares (1) Pellet; (2) Sobrenadante; (3) Sobrenadante após passar pela resina de afinidade; (4) Lavagem com tampão 20 mM Tris, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH8; (5) Eluição da Sau_DACA⁸⁶ com 10 mL de tampão 20 mM Tris, 300 mM NaCl; **(B) Análise em SDS-PAGE- 15% da purificação da Sau_DACA¹⁰⁶:** (MM) Padrão massas moleculares (1) Pellet; (2) Sobrenadante; (3) Sobrenadante após passar pela resina de afinidade; (4) Lavagem com tampão 20 mM Tris, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH8; (5) Eluição da Sau_DACA¹⁰⁶ com 10 mL de tampão 20 mM Tris, 300 mM NaCl; **(C) Cromatograma após Superdex75 10/300 de ambas construções.**96

Figura 27 - (A) Dados de homogeneidade obtidos através da desconvolução dos correlogramas dos experimentos de DLS da proteína Sau_DacA⁸⁶ em solução. (B) Distribuição de tamanhos em um gráfico de intensidade obtida do experimento de DLS para verificação da homogeneidade das amostras de Sau_DacA⁸⁶.97

Figura 28 - (A) Espectros de CD de polipeptídeos e proteínas representando estruturas secundárias: (1) α -hélice em preto; (2) folha- β antiparalela em vermelho; (3) estrutura desordenada em verde; (4) tripla hélice de colágeno em azul marinho e (5) colágeno desnaturado em ciano 5. (B) Espectro de CD na região do UV distante da construção citoplasmática Sau_DacA⁸⁶ em tampão 20 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8. (C) Dados resultantes da desconvolução dos espectros através do servidor online BeStSel.¹⁰⁵98

Figura 29 - (A) Espectros de CD referentes ao desenovelamento térmico da construção Sau_DacA⁸⁶ no intervalo de 20 a 90°C. (B) Curva de desenovelamento térmico obtido através dos espectros de Sau_DacA⁸⁶ em função da temperatura, no comprimento de onda de 208nm.99

Figura 30 - Termogramas de DSC provenientes de uma triplicada de ensaios de desenovelamento térmico da Sau_DacA.⁸⁶100

Figura 31 - (A) Medidas características do sinal de fluorescência polarizada do BODIPY® TR-ATP previamente incubado com Sau_DacA⁸⁶ na ausência e na presença de diferentes cofatores metálicos. (B) Constantes de dissociação (Kd) obtidas através do ajuste não-linear das curvas em (A)......102

Figura 32 - Análise por HPLC da síntese do c-di-AMP pela Sau_DacA⁸⁶ em função do tempo em pH 8......103

Figura 33 - Curva de calibração do HPLC para associação de área de integração de pico com concentração de c-di-AMP.	103
Figura 34 - (A) Testes de atividade da Sau_DacA ⁸⁶ com ATP como substrato e (A) na presença de diferentes cofatores em pH 8,0, ou (B) em diferentes pHs, ambos na presença de Mn ²⁺	104
Figura 35 - Dependência da atividade da Sau_DacA ⁸⁶ com a (A) concentração de Mn ²⁺ , e (B) temperatura. ATP foi utilizado como substrato.	104
Figura 36 - Cinética enzimática da Sau_DacA ⁸⁶ com ATP como substrato e Mn ²⁺ como cofator, com ajuste dos dados por uma hipérbole representativa de uma curva de Michaelis-Menten.	105
Figura 37 - Ensaios de RPE de onda contínua à 37 °C. (A) Espectros de RPE do Mn ²⁺ na ausência e na presença da Sau_DacA ⁸⁶ e do α,β -Me-ATP. (B) Gráficos de barras representando a perda de intensidade do sinal paramagnético do Mn ²⁺ na presença da Sau_DacA ⁸⁶ , do α,β -Me-ATP ou de ambos Sau_DacA ⁸⁶ + α,β -Me-ATP comparada com o sinal do íon livre em solução. As linhas pontilhadas em cinza servem como guias para comparação do sinal de Mn ²⁺ na presença de α,β -Me-ATP sem e com Sau_DacA ⁸⁶	106
Figura 38 - (A) Cristais de Sau_DacA ⁸⁶ obtidos na condição G4 da triagem inicial de cristalização através do Kit Index HT. (B) Cristais de Sau_DacA ⁸⁶ obtidos após otimização da condição G4 Kit Index HT, gerando cristais adequados para difração na condição de cristalização de 0.1M Tris, 0,2M LiSO ₄ , 21% PEG3350, 4 mg/ml de proteína, 2 mM MgCl ₂ , pH 8.	108
Figura 39 - Cristais de N166E_Sau_DacA ⁸⁶ obtidos após otimização da condição G4 Kit Index HT, gerando cristais adequados para difração na condição de cristalização de 0,1 M Tris, 0,2 M LiSO ₄ , 21% PEG3350, 4 mg/ml de proteína, 2 mM MgCl ₂ , pH 8.	110
Figura 40 - Sau_DacA mostrou-se como um dímero em cada unidade assimétrica, sendo que cada monômero de Sau_DacA encontra-se enovelado em um sanduíche α/β característico do domínio DAC (em destaque no círculo preto).	110
Figura 41 - Sobreposição dos monômeros de Sau_DacA ⁸⁶ e Lmo_DacA com RMSD = 0,62 Å.	111
Figura 42 - (A) Sobreposição dos monômeros de Sau_DacA ⁸⁶ e Tma_DisA, cujo RMSD = 2,72 Å. (B) Sobreposição dos monômeros de Sau_DacA ⁸⁶ e Bce_DacB, cujo RMSD = 0,76 Å. (C) Sobreposição dos monômeros de Sau_DacA ⁸⁶ , Bce_DacB e Tma_DisA, onde não podemos visualizar mudanças conformacionais no sítio de ligação do ATP (destacado com os círculos pontilhados em preto). (D) Uma rotação de 90° da sobreposição em (C) mostra a região do sítio, destacada com os círculos pontilhados preto, com enovelamento conservado – exceto para DisA que possui regiões flexíveis (os loops) em conformação distinta.	112

Figura 43 - (A) Sau_DACA⁸⁶ possui dois sítios para ligação de ATP, sendo cada um localizado em uma subunidade da proteína. (B) O ATP se encontra ligado em um bolsão raso conservado quando comparado com a estrutura do domínio DAC de proteínas análogas através da ferramenta online CONSURF.113

Figura 44 - (A) Weblogo dos motivos DGA e RHR nas diadenilato ciclase A. (B) Weblogo dos motivos DGA e RHR nas diadenilato ciclase B. (C) Weblogo dos motivos DGA e RHR nas DNA integrity scanning. (D) Resíduos que estabilizam o ATP no sítio ativo. Em azul, os resíduos dos motivos DGA e RHR e em laranja, a Y192 conservada que interage indiretamente com o nucleotídeo. Em verde, os resíduos E228, E229 e H175 conservados que coordenam o manganês (em magenta).114

Figura 45 - (A) Weblogo mostrando a diferença no provável sítio de ligação com Mn²⁺ nas diadenilato ciclase A. (B) Weblogo mostrando a diferença no provável sítio de ligação com Mn²⁺ nas diadenilato ciclase B. (C) Weblogo mostrando a diferença no provável sítio de ligação com Mn²⁺ nas DNA integrity scanning. (D) Os resíduos de interação com ATP, R208 e H209, e com o metal estão destacados. As coordenações com o íon Mn²⁺ (magenta) estão mostradas em pontilhado preto. (E) Sobreposição estrutural de DacA com DisA destacando a diferença dos resíduos que interagem com o Mn²⁺ (particularmente R261 no lugar de E229) e conformações distintas da molécula de ATP no sítio ativo.115

Figura 46 - (A) Estrutura da Sau_DacA destacando os aminoácidos mutados. (B) Ensaios de FP com mutantes do sítio ativo na presença do substrato e na presença e ausência de Mn²⁺. (C) Ensaios de RPE a 37°C. As linhas pontilhadas vermelhas servem como guias para comparação do sinal de Mn²⁺ na presença de α,β-Me-ATP sem e com Sau_DacA⁸⁶ e com mutantes do sítio ativo. (D) Ensaios de atividade dos mutantes do sítio ativo da Sau_DacA⁸⁶. As barras representam concentração de c-di-AMP detectada em cada triplicata de reação com suas respectivas margens de erro.116

Figura 47 - (A) Estrutura da Sau_DacA destacando os aminoácidos mutados. (B) Ensaios de FP com mutantes do sítio de coordenação do Mn²⁺ na presença do substrato e na presença e ausência de Mn²⁺. (C) Ensaios de RPE a 37°C. As linhas pontilhadas vermelhas servem como guias para comparação do sinal de Mn²⁺ na presença de α,β-Me-ATP sem e com Sau_DacA⁸⁶ e com mutantes do sítio de coordenação do Mn²⁺. (D) Ensaios de atividade dos mutantes do sítio de coordenação do Mn²⁺ da Sau_DacA⁸⁶. As barras representam concentração de c-di-AMP detectada em cada triplicata de reação com suas respectivas margens de erro.117

Figura 48 - (A) Modelos de dímero, octâmero e hexâmero propostos, respectivamente, para a Sau_DacA, Tma_DisA e Bce_DacB. (B) Weblogo do alinhamento dos domínios diadenilato ciclase de enzimas com arquiteturas do tipo DacA, mostrando conservação dos aminoácidos da região da interface de dimerização encontrada em Sau_DacA⁸⁶ e muito parecida para DacA e DacB, sendo que ambas se distinguem da conservação de aminoácidos de DisA. (C) A análise realizada no programa CONSURF mostra que a

região da interface de dimerização é altamente conservada tanto em DacA quanto em DisA e DacB.....	119
Figura 49 - (A) Sobreposição de monômeros de Tma_DisA, Bsu_DacB e Sau_DacA ⁸⁶ mostrando a conservação do enovelamento da região da interface dimérica de Sau_DacA. ⁸⁶ (B) Estrutura da Sau_DacA ⁸⁶ com a região da interface dimérica destacada em vermelho. (C) Estrutura da Tma_DisA com a região da interface que estabiliza o octâmero, equivalente a interface dimérica de Sau_DacA, ⁸⁶ destacada em vermelho. (D) Estrutura da Bce_DacB com a região da interface que estabiliza o hexâmero, equivalente a interface dimérica de Sau_DacA, ⁸⁶ destacada em vermelho.	120
Figura 50 - (A) O zoom na representação em cartoon mostra que a coordenação exercida pelos resíduos da interface dimérica (lilás) é próxima ao loop L5 (lilás), que é constituído por resíduos responsáveis pela ligação do ATP e do Mn ²⁺ (em azul e verde, respectivamente). (B) Representação dos resíduos de aminoácidos da interface dimérica escolhidos para mutação. (C) Cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex75 com as enzimas Sau_DacA ⁸⁶ nativa e mutantes da interface de dimerização L163E, N166E e L174E.	122
Figura 51 - Termogramas de DSC provenientes do desenovelamento térmico da Sau_DacA ⁸⁶ e dos mutantes da interface dimérica L163E e N166E mostraram perda de estabilidade térmica, visualizada através do deslocamento do Tm dos mutantes para temperaturas menores que o Tm da Sau_DacA ⁸⁶	123
Figura 52 - Representação dos mutantes da interface dimérica selecionados e utilizados nos ensaios biofísicos e bioquímicos – em parênteses indicamos a subunidade do dímero que o resíduo pertence. (B) Medidas características do sinal de fluorescência polarizada do BODIPY® TR-ATP previamente incubado com Sau_DacA e mutantes da interface de dimerização e reacional. (C) Ensaios de RPE a 37°C. As linhas pontilhadas vermelhas servem como guias para comparação do sinal de Mn ²⁺ na presença de α,β -Me-ATP sem e com Sau_DacA ⁸⁶ e mutantes. (D) Testes de atividade enzimática com os mutantes da interface mostram a perda de atividade.	124
Figura 53 - (A) Estrutura da Sau_DacA ⁸⁶ com ênfase nos resíduos mutados da interface de dimerização (assinalados em azul, vermelho e roxo) e a proximidade dos mesmos com o sítio ativo (<i>loop</i> assinalado em amarelo, onde se encontra o domínio DGA) – em parênteses indicamos a subunidade do dímero a que o resíduo pertence. (B) A mesma região de dimerização ocorre na estrutura de Bce_DacB, sendo que dos resíduos escolhidos para mutação nesta região, apenas o N166 não ocorre na estrutura de DacB, sendo substituído por uma S166 como mostrado em azul escuro – em parênteses indicamos a subunidade do dímero a que o resíduo pertence.....	125
Figura 56 - Modelagem baseada na estrutura de DisA da potencial interface de interação de Sau_DacA durante o encontro competente para síntese de c-	

di-AMP. Destaque para o resíduo H175 que se aproxima do sítio de ligação de Mn^{2+} (pink), potencialmente fechando as coordenações do metal necessárias para catálise – em parênteses indicamos o dímero que o resíduo pertence. E o resíduo de treonina (T207) mutado para verificação da ocorrência desta interface durante o processo de síntese de c-di-AMP.....127

Figura 55 - (A) Medidas características do sinal de fluorescência polarizada do BODIPY® TR-ATP previamente incubado com Sau_DacA e mutantes da interface de dimerização e reacional. (B) Ensaios de RPE a 37°C. As linhas pontilhadas vermelhas servem como guias para comparação do sinal de Mn^{2+} na presença de ATP de hidrólise lenta sem (terceira barra) e com Sau_DacA⁸⁶ e mutantes (todas as outras barras). (C) Testes de atividade enzimática com os mutantes da interface de síntese da Sau_DacA mostram a perda de atividade do mutante T207E.....128

Figura 56 - (A) Modelo deformação dos aglomerados de Sau_DacA⁸⁶ para síntese de c-di-AMP. (B) Ensaios de DLS mostraram a formação de aglomerados proteicos da Sau_DacA⁸⁶ na presença do substrato e do cofator, possibilitando o encontro de sítios complementares de ligação do substrato para a síntese de c-di-AMP. (B) Ensaios de DLS mostraram que o mutante T207E, mas não o T207A, perde a capacidade de formar aglomerados na presença do substrato e do cofator.129

Figura 57 - (A) Representação da interface de síntese de c-di-AMP assinalando a distância entre o resíduo H175 e o manganês na estrutura cristalográfica da Sau_DacA⁸⁶. (B-E) Mapas de contorno obtidos dos experimentos de HYSCORE em diferentes condições. (B) Controle de ATP com manganês. (C-D) Na presença de ATP+ Mn^{2+} , o espectro HYSCORE apresenta ATP hidrolisado parcialmente (C) e totalmente (D), além da presença de um sinal de ¹⁴N, indício da coordenação do íon pela H175. (E) O mutante T207E não é capaz de hidrolizar o ATP e não apresenta um sinal de ¹⁴N, mostrando distanciamento dos dímeros impedindo, pois, o encontro face-a-face para síntese de nucleotídeo. Alguns parâmetros das medidas foram apresentados diretamente nas figuras.132

Figura 58 - Arquitetura da Sau_YbbR mostrando a predição de hélice transmembrana através do programa TMHMM V2.0 e a localização dos domínios YbbR através do programa PFAM, além das construções das porções citosólicas da proteína.137

Figura 59 - Predição da estrutura secundária da Sau_YbbR via software PSIPRED.138

Figura 60 - (A) Amplificação dos genes a partir de DNA genômico: (MM) Padrão massas moleculares; (1) ORF45 e (2) ORF47. (B) (B) Análise de restrição da subclonagem em vetor pGEM T-easy: (MM) Padrão massas moleculares; (1) ORF75 e (2) ORF47. (C) Análise de restrição da subclonagem em vetor de expressão pSMT3: (MM) Padrão massas moleculares; (1) ORF45 e (2) ORF47. (D) Verificação da expressão das proteínas de interesse – Análise por gel SDS-PAGE 15%: (MM) Padrão massas moleculares; (1) Não-Induzido da Sau_YbbR⁴⁵. (2)

Induzido da Sau_YbbR⁴⁵ contendo SUMO-fusão. (3) Induzido da Sau_YbbR⁴⁷ contendo SUMO-fusão. 140

Figura 61 - Análise dos protocolos de purificação. (A) Análise em SDS-PAGE-15% da purificação da Sau_YbbR⁴⁵: (MM) Padrão massas moleculares (1) Sobrenadante após passar pela resina de afinidade; (2) Lavagem com tampão 50 mM Tris, pH 7,5, 300 mM NaCl, 5% glicerol; (3) Eluição da Sau_YbbR⁴⁵ com tampão 50 mM Tris, pH 7,5, 300 mM NaCl, 5% glicerol, 500 mM imidazol. **(B) Análise em SDS-PAGE- 15% da purificação da Sau_YbbR⁴⁷:** (MM) Padrão massas moleculares (1) Sobrenadante após passar pela resina de afinidade; (2) Lavagem com tampão 50 mM Tris, pH 7,5, 300 mM NaCl, 5% glicerol; (3) Eluição da Sau_YbbR⁴⁷ com tampão 50 mM Tris, pH 7,5, 300 mM NaCl, 5% glicerol, 500 mM Imidazol. **(C) Cromatograma das construções da Sau_YbbR após Superdex75 10/300 GL.** 141

Figura 62 - (A) Tabela contendo os dados obtidos através do programa Zeta Sizer do equipamento de DLS para a Sau_YbbR⁴⁵. **(B)** Tabela contendo os dados obtidos através do programa Zeta Sizer do equipamento de DLS para a Sau_YbbR⁴⁷. **(C)** Medida de DLS para verificação da homogeneidade das amostras de Sau_YbbR⁴⁵. **(D)** Medida de DLS para verificação da homogeneidade das amostras de Sau_YbbR⁴⁷. 142

Figura 63 - (A) Espectros de CD na região do UV distante das construções citosólicas Sau_YbbR⁴⁵ e Sau_YbbR⁴⁵ em tampão 50 mM Tris, 300 mM NaCl, 5% glicerol, pH 7,5. **(B)** Desconvolução dos espectros de CD da Sau_YbbR⁴⁵ através do servidor online BeStSel.¹⁰⁵ **(C)** Desconvolução dos espectros de CD da Sau_YbbR⁴⁵ através do mesmo servidor. 143

Figura 64 - (A) Ensaio de “Pull down” da Sau_YbbR⁴⁵: (MM) Padrão massas moleculares; (1) YbbR⁴⁵; (2) Extrato celular de *S. aureus* SA16; (3) Lavagem da resina com 3VC de tampão 20 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl e (4) Eluição do retido na resina 3VC de tampão 20 mM Tris, pH7,5, 150 mM NaCl. **(B) Ensaio de “Pull Down” da Sau_YbbR⁴⁷:** (MM) Padrão massas moleculares; (1) YbbR⁴⁷; (2) Extrato celular de *S. aureus* SA16; (3) Lavagem da resina com 3VC de tampão 20 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl e (4) Eluição do retido na resina 3VC de tampão 20 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl. **(C) Ensaio controle:** (MM) Padrão massas moleculares; (1) Extrato celular de *S. aureus* SA16; (2) Lavagem da resina com 3VC de tampão 20 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl e (3) Eluição do retido na resina 3VC de tampão 20 mM Tris, pH7,5, 150 mM NaCl. **(D) Enzimas utilizadas na preparação do extrato celular de *S. aureus* SA16:** (MM) Padrão massas moleculares; (1) Lisostafina; (2) DNase; (3) RNase e (4) Lisozima. 145

Figura 65 - Mecanismo putativo proposto para a síntese de c-di-AMP de proteínas do tipo DacA. (A) A síntese de c-di-AMP deve ocorrer via encontro face-a-face de dois sítios de ligação de ATP presentes em dímeros protéicos distintos (laranja claro e laranja escuro). **(B)** A taxa de síntese do c-di-AMP pode ser alterada através de interação proteína-proteína com a YbbR (azul), quando esta última detectar alguma modificação do ambiente que a

circunda através de uma sinalização ainda não conhecida. A interação entre a Sau_YbbR e a Sau_DacA deve alterar a síntese de c-di-AMP, no entanto, o output que essa interação promove em *S. aureus* ainda é desconhecido.....150

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela de oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes de interesse que expressam Sau_DacA e Sau_YbbR, com inclusão dos sítios das enzimas de restrição BamHI (vermelho) e XhoI (azul).	68
Tabela 2 - Resíduos de aminoácidos de Sau_DacA ⁸⁶ mutados, gerando mutantes simples e duplos da diadenilato ciclase e oligonucleotídeos da Sau_DacA ⁸⁶ utilizados na amplificação por PCR.	77
Tabela 3 - Combinações proteicas utilizadas no ensaio de “Pull Down”	87
Tabela 4 - Análise bioinformática via software Protparam para obtenção dos caracteres bioquímicos da enzima Sau_DacA.	94
Tabela 5 - Parâmetros termodinâmicos provenientes do desenovelamento térmico de cada construção citoplasmática da Sau_DacA.	100
Tabela 6 - Estatísticas da coleta de dados dos cristais obtidos com as proteínas provenientes das porções citoplasmáticas da Sau_DacA. (Valores entre parênteses são para a faixa mais alta resolução).....	109
Tabela 7 - Parâmetros termodinâmicos provenientes do desenovelamento térmico da proteína nativa e dos mutantes da interface dimérica da Sau_DacA ⁸⁶	123
Tabela 8 - Análise bioinformática via software Protparam para obtenção dos caracteres bioquímicos da enzima Sau_YbbR.....	139

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α,β -Me-ATP	α,β -metileno adenosina 5'-trifosfato
AMP	Adenosina monofostato
ATP	Adenosina trifosfato
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
BeStSel	<i>Beta Structure Selection</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
CabP	c-di-AMP <i>binding protein</i>
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica
CD	<i>Circular Dichroism</i> ou Dicroísmo Circular
c-di-AMP	Adenosina monofosfato dimérica cíclica
c-di-GMP	Guanosina monofosfato dimérica cíclica
cGMP	Guanosina monofosfato cíclica
DAC	Diadenilato ciclase
DacA	Diadenilato ciclase A
DacB	Diadenilato ciclase B
Datp	<i>Deoxyadenosine trifosfato</i>
DGA	Aspartato-Glicina-Alanina
DisA	DNA integrity scanning protein A
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	<i>Deoxynucleotide solution mix</i>
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> ou Calorimetria de varredura diferencial
ΔH_{cal}	Entalpia calorimétrica
$\Delta T_{1/2}$	Largura a meia-altura do pico de transição
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FP	Fluorescência Polarizada
GdpP	<i>GGDEF domain protein containig PDE</i>
GlmM	Glucosamina-6-fosfato mutase
HhH	<i>Helix-hairpin-Helix</i> ou hélice-volta-hélice
HPLC	High performance liquid chromatography
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
Kd	Constante de dissociação

Km	Constante de Michaelis-Menten
LB	<i>Luria Broth médium</i>
LEMiMo	Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Molecular
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
LNBio	Laboratório Nacional de Biociências
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Sincrotron
LTA	Ácido lipoteicóico
<i>M.genitalium</i>	<i>Mycobacterium genitalium</i>
<i>M. pulmonis</i>	<i>Mycobacterium pulmonis</i>
<i>M. smegmatis</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
N	Grau de cooperatividade
NaI	Iodeto de sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NLNS	<i>National Synchrotron Light Source</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDB	Protein Data Base
PEG	Polietilenoglicol
Pfam	Protein Families Database
R _{factor}	<i>Factor of agreement between the crystallography model and the experimental X-ray diffraction data</i>
R _{free}	<i>Factor of agreement between a portion of the crystallography model and the same portion of the experimental X-ray diffraction data</i>
RHR	Arginina-Histidina-Arginina
RMSD	<i>Root-mean square deviation</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RPE	Ressonância Paramagnética Eletrônica
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SAD	<i>Single-wavelength anomalous diffraction</i>
SAXS	Small-angle X-ray scattering ou espalhamento de Raio-X a baixo ângulo
SEC	Exclusão molecular por tamanho
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecilsulfato de sódio
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>

SUMO	<i>Small ubiquitin-like modifier</i>
TAE	Tris-Acetato-EDTA
<i>T. maritima</i>	<i>Thermotoga maritima</i>
<i>T. tengcongensis</i>	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>
TM	Transmembrana
T _m	Temperatura de Melting
TPR	Tetratricopeptídeo repetido
TRIS	Trisaminometano
Ulp1	<i>Ubl-specific protease 1</i>
UV	Ultravioleta
VC	Volume de coluna
V _{máx}	Velocidade enzimática máxima

SUMÁRIO

1	Introdução	35
1.1	Nucleotídeos sinalizadores, processos celulares que regulam e a descoberta do c-di-AMP.	37
1.2	O domínio DAC e as Diadenilato ciclases	41
1.2.1	Diadenilato ciclase A - DacA	43
1.2.2	<i>DNA integrity scanning protein A</i> - DisA.....	46
1.2.3	Diadenilato ciclase B - DacB.....	50
1.3	YbbR.....	54
1.4	A biosíntese de c-di-AMP em <i>Staphylococcus aureus</i>	57
2	Objetivos.....	61
3	Metodologia.....	65
3.1	Ensaio de clonagem.....	67
3.1.1	Análise das sequências primárias das Sau_DacA e Sau_YbbR	67
3.1.2	Construção dos oligonucleotídeos e amplificação das ORFS que codificam as porções citosólicas de Sau_DacA e Sau_YbbR.....	67
3.1.3	Purificação dos produtos amplificados por PCR das ORFS que codificam as porções citosólicas de Sau_DacA e Sau_YbbR.....	69
3.1.4	Reação de adenilação dos produtos de PCR purificados e subclonagem dos produtos de PCR adenilados nos vetores de clonagem pGEM-T <i>Easy</i> das ORFs referentes às porções citosólicas de Sau_DacA e Sau_YbbR.....	69
3.1.5	Transformação da bactéria <i>Escherichia coli</i> DH5α com os plasmídeos recombinantes pGEM-T <i>easy</i> das ORFS que codificam as porções citosólicas de Sau_DacA e Sau_YbbR.....	70
3.1.6	Extração, análise de restrição e sequenciamento dos plasmídeos recombinantes pGEM-T <i>easy</i> de <i>Escherichia coli</i> DH5α das ORFS que codificam as porções citosólicas de Sau_DacA e Sau_YbbR.	71

3.1.7	Subclonagem das ORFs que codificam as porções citosólicas de Sau_DacA e Sau_YbbR no plasmídeo de expressão pSMT3.	72
3.1.8	Transformação da bactéria <i>Escherichia coli</i> DH5α com plasmídeos recombinantes pSMT3 das ORFS que codificam as porções citosólicas de Sau_DacA e Sau_YbbR.	72
3.1.9	Extração e análise de restrição dos plasmídeos recombinantes pSMT3 de <i>Escherichia coli</i> DH5α das ORFS que codificam as porções citosólicas de Sau_DacA e Sau_YbbR.	72
3.1.10	Transformação da bactéria de <i>E. coli</i> BL21(DE3) para as ORFs da Sau_DacA e em <i>E. coli</i> Rosetta2 (DE3) para as ORFs da YbbR com plasmídeos recombinantes pSMT3.	73
3.2	Ensaio de expressão e purificação.	73
3.2.1	Teste de expressão das construções citosólicas.	73
3.2.2	Expressão e purificação das construções citosólicas de Sau_DacA.	74
3.2.3	Expressão e purificação das construções citosólicas de Sau_YbbR.	75
3.3	Mutações sítio-dirigidas da Sau_DacA.	76
3.4	Cristalização, coleta de dados e resolução estrutural da Sau_DacA.	78
3.5	Análises e comparações estruturais.	79
3.6	Cromatografia por exclusão molecular.	80
3.7	<i>High-performance liquid chromatography</i> (HPLC) ⁸⁹⁻⁹⁰	80
3.7.1	Ensaio de atividade enzimática da Sau_DacA ⁸⁶	80
3.7.2	Purificação de c-di-AMP para curva de calibração.	81
3.7.3	Curva de calibração para detecção do c-di-AMP.	81
3.7.4	Análise da dependência da atividade da Sau_DacA ⁸⁶ em relação ao cofator, à concentração do cofator, ao pH e à temperatura.	82
3.8	Cinética Enzimática ⁹¹⁻⁹²	82
3.9	Fluorescência polarizada (FP) ⁹³⁻⁹⁵	83
3.10	Ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e a ligação do Mn ²⁺	84
3.10.1	RPE convencional ⁹⁶	84

3.10.2 RPE Pulsada (HYSCORE) ⁹⁷	84
3.11 Calorimetria de varredura diferencial (DSC). ⁹⁹⁻¹⁰⁰	85
3.12 Dicroísmo Circular (CD). ¹⁰¹⁻¹⁰³	85
3.12.1 Sau_DacA	85
3.12.2 Sau_YbbR	86
3.12.3 Tratamento de dados e análise dos experimentos de CD	86
3.13 Espalhamento dinâmico de luz (DLS) ⁸⁸	86
3.13.1 Sau_DacA	86
3.13.2 Sau_YbbR	87
3.14 Ensaios de “Pull down” Sau_YbbR ¹⁰⁹⁻¹¹⁰	87
4 Resultados e Discussões	89
4.1 Sau_DacA	91
4.1.1 Análise de Bioinformática	93
4.1.2 Clonagem, expressão, purificação e estado oligomérico	94
4.1.3 Homogeneidade, estrutura secundária e estabilidade térmica	97
4.1.4 Ligação do ATP, atividade, especificidade do cofator, mecanismo de ligação do cofator	101
4.1.5 Cristalização e resolução estrutural	107
4.1.6 Estudo da estrutura e função	110
Sau_YbbR	135
4.1.7 Análise de bioinformática	137
4.1.8 Clonagem, expressão e purificação	139
4.1.9 Homogeneidade das amostras e estrutura secundária	141
4.1.10 Ensaios de “Pull down”	143
5 Conclusões	147
Referências	151

1 Introdução

1.1 Nucleotídeos sinalizadores, processos celulares que regulam e a descoberta do c-di-AMP.

Ao longo dos últimos anos, estudos sobre nucleotídeos mensageiros bacterianos têm se expandido com extrema rapidez, sendo que nas três últimas décadas pelo menos quatro nucleotídeos cíclicos (cGMP, cAMP, c-di-GMP, c-di-AMP e o (p)ppGpp) foram identificados e associados à sinalização de mecanismos de transdução de sinais clássicos tanto em bactérias quanto de Archaea.¹⁻² Por serem moléculas indispensáveis a todas as células vivas, uma vez que constituem tanto DNA quanto RNA, serem importantes fontes de energia e atuarem como sinalizadores e reguladores de diversos processos fisiológicos, o estudo dessas moléculas, seus mecanismos de produção, mecanismos de degradação e processos celulares aos quais elas estão envolvidas são de extrema necessidade.³

Dentre este grupo de nucleotídeos encontra-se o cAMP (adenosina 3',5'- monofosfato cíclico - Figura 1A) e o cGMP (guanosina 3',5'- monofosfato cíclico – Figura 1B), os quais são mononucleotídeos cíclicos sintetizados por uma adenilato ciclase e uma guanilato ciclase, respectivamente, e degradados por fosfodiesterases específicas. Estes são os nucleotídeos mais comuns e extensamente encontrados em células eucarióticas desempenhando funções relevantes na homeostase de eletrólitos e relaxamento de musculatura lisa através de modulação da atividade de proteínas quinases⁴ e canais de íons.⁵⁻⁶ Recentemente, estes mononucleotídeos cíclicos foram identificados exercendo funções regulatórias em diversos processos bacterianos, tais como: metabolismo de carbono e respostas à mudanças ambientais, causadas pela limitação de nutrientes; regulação da formação de biofilme e da expressão de genes relacionados a virulência.^{3,7-8}

Outro mononucleotídeo utilizado por bactérias é o (p)ppGpp (guanosina pentafofato – Figura 1C). Este nucleotídeo linear é sintetizado por sintases e hidrolisado por hidrolases² como um sinalizador alarmante em resposta a falta de diversos nutrientes intracelulares como aminoácidos,⁹ fosfatos,¹⁰ ácidos graxos,¹¹ entre outros).

Nos últimos anos, em adição a esses mononucleotídeos sinalizadores e com os rápidos avanços dos estudos de sinalização bacteriana, foram identificados dois dinucleotídeos cíclicos: o c-di-GMP (3',5'- diguanosina monofosfato cíclico – Figura 1D) e o c-di-AMP (3',5'- diadenosina monofosfato cíclico – Figura 1E).

Figura 1 - Estrutura molecular das moléculas sinalizadoras baseadas em nucleotídeos cíclicos encontradas em bactérias e seus fenótipos ou processos celulares controlados por: (A) cGMP, (B) cAMP, (C) (p)ppGpp, (D) c-di-GMP e (E) c-di-AMP.

Fonte: Adaptada de KALIA et al.²

Descoberto na década de 80 por Benziman e colaboradores,¹² o c-di-GMP é um dinucleotídeo produzido por uma diguanilato ciclase e hidrolizado por fosfodiesterases, podendo assim ter seu nível intracelular controlado por essas proteínas. A concentração do c-di-GMP no interior celular encontra-se intrinsecamente ligada à sinalização que esta molécula exerce, sendo que, usualmente, níveis aumentados de c-di-GMP, levam a um aumento na formação de biofilme, uma vez que inibem a mobilidade mediada por flagelos e pili¹³⁻¹⁴ e aumentam a produção de adesinas extracelulares. Em contrapartida, baixos níveis do nucleotídeo suprimem a ação de adesinas extracelulares,¹³⁻¹⁴ promovendo a dispersão do biofilme, e aumento da virulência bacteriana.

Até o ano de 2008, o c-di-GMP era tido como único dinucleotídeo cíclico promotor de sinalização celular bacteriana. No entanto, neste ano, Witte et al. descobriram de maneira inesperada uma proteína capaz de sintetizar um novo dinucleotídeo cíclico: o c-di-AMP.¹⁵

Análises da estrutura octamérica da proteína de verificação de integridade do DNA (*DNA integrity scanning* – DisA) de *Thermotoga marítima*, realizadas por esses pesquisadores, revelaram uma densidade eletrônica compatível a uma molécula de c-di-AMP

em bolsões localizados na interface dimérica de dois domínios DUF147, com função até então desconhecida, das Tma_DisA. O c-di-AMP não havia sido acrescido ao preparo da proteína durante os ensaios de cristalização. Portanto, para descobrir a origem desta molécula estudos de espectrometria de massas MALDI TOF das etapas de preparação de amostra foram realizados e foi verificada a presença de c-di-AMP, demonstrando, assim, a capacidade da DisA de *Thermotoga marítima* (Tma_DisA) em sintetizar o dinucleotídeo através do domínio DUF147, onde o mesmo foi localizado.

Assim, o domínio DUF147 foi renomeado como domínio DAC, devido a função de diadenilato ciclase que exerce.¹⁵ Consequentemente, foi iniciado o estudo de proteínas que possuem o domínio diadenilato ciclase e dos processos biológicos aos quais o c-di-AMP encontra-se associado.³

Figura 2 - Estrutura octamérica da DisA de *Thermotoga maritima*, com destaque para o sítio onde foi visualizada a densidade eletrônica compatível a uma molécula de c-di-AMP.

Fonte: Adaptada de WITTE et al.¹⁵

Sintetizado a partir da condensação de duas moléculas de ATP por proteínas do tipo diadenilato ciclases que contém o domínio DAC, o c-di-AMP sintetizado pode ter seu nível intracelular controlado a partir de hidrólise realizada por proteínas fosfodiesterases usualmente denominadas GdpPs (*GGDEF domain protein containing PDE*¹⁶) ou PgpHs¹⁷ (Figura 3).

Figura 3 - Síntese de c-di-AMP. O c-di-AMP é sintetizado a partir da condensação de duas moléculas de ATP por diadenilato ciclasas que contém o domínio DAC (em laranja), liberando duas moléculas de pirofosfato. O c-di-AMP é hidrolizado a pApA por fosfodiesterases que contém os domínios DHH/DHHA1 ou HD, denominadas GdpPs ou PgpH, respectivamente. A manutenção dos níveis intracelulares de c-di-AMP tem sido associada a diversos processos biológicos como: transporte iônico, homeostase de potássio, metabolismo da parede celular, manutenção da integridade do DNA, controle da esporulação e germinação, homeostase da membrana.

Fonte: Elaborada pela autora.

O c-di-AMP e o controle de seus níveis intracelulares no interior de células bacterianas têm sido atrelados a inúmeros processos biológicos (Figura 3), como: verificação da integridade do DNA em *B. subtilis*, *M. tuberculosis* e *T. maritima*,^{15,18-21} estímulo à resposta imune do hospedeiro em infecções através de exportação de nucleotídeo²²⁻²³ por proteínas multi-transportadoras de ‘drogas’,²⁴⁻²⁵ crescimento bacteriano,²⁶ homeostase celular²⁶ e controle da atividade metabólica de piruvato carboxilases em *L. monocytogenes*,²²⁻²³ o controle do tamanho celular, homeostase celular, resistência à estresse na parede celular e virulência em *S. aureus*,^{16,27-28} regulação da síntese de ácidos graxos em *Mycobacterium smegmatis* (*M. smegmatis*),²⁹ esporulação, respostas ao estresse osmótico e metabolismo da parede celular em *Thermoanaerobacter tengcongensis* (*T. tengcongensis*),³⁰ virulência em *M. tuberculosis*,^{21,31} inibição da captação de potássio quando ligado a c-di-AMP binding protein (CabP) em *S. pneumoniae*,³² dentre outros.

A distribuição do domínio DAC em diversos organismos bacterianos e Archaeas, e a associação do mesmo com inúmeros domínios sensores e sinalizadores culminando em diferentes arquiteturas de diadenilato ciclases levam a acreditar que o c-di-AMP provavelmente seja um nucleotídeo cíclico com um importante e ubíquo papel como mensageiro celular.³³

1.2 O domínio DAC e as Diadenilato ciclases

Até o momento, 1756 sequências de proteínas bacterianas que contém o domínio DAC provenientes de 1480 organismos podem ser encontradas no banco de dados *Protein Families Database* (Pfam).³⁴ A maioria destas proteínas é encontrada em espécies bacterianas, porém existe um pequeno número presente em Archaea do filo Euryarchaeota.³⁵ Em bactérias, proteínas que contém o domínio DAC são mais frequentemente encontradas majoritariamente nos filos de bactérias Gram-positivas tais como *Firmicutes* e *Actinobacteria*, mas também podem ser encontradas, com menor frequência, em bactérias Gram-negativas.³ Uma característica interessante é que a maioria dos organismos contém uma única proteína com domínio DAC; organismos que contém duas ou mais proteínas-DAC, tais como *Clostridium* e *Bacillus* spp., são exceções.³

O domínio DAC pode ser encontrado associado a diversos domínios reguladores, sinalizadores internos, receptores de sinal externo,²⁰ a domínios distintos como de *scanning* de DNA,^{15,36} dentre outros. Sabendo desta característica, Corrigan & Gründling propuseram uma classificação das proteínas que contém o domínio o DAC, agrupando-as de acordo com o domínio àquele que estaria associado (Figura 4).³

Segundo Corrigan & Gründling,³ dentre as 1756 sequências de proteínas que contém o domínio DAC, 69,1% são do tipo DacA,³ constituídas de três hélices transmembrana (TM) em seu N-terminal seguidas de um domínio DAC; 24,1% são do tipo DisA, constituída de um domínio DAC no N-terminal seguido de um *linker* que conecta esse primeiro à um domínio HhH (*Helix-hairpin-Helix*)³⁷ característico de ligação à duplas fitas de DNA; e 5,5% são do tipo DacB, constituídas de um domínio YojJ³⁸ (de função desconhecida) associado ao N-terminal de um domínio DAC. As demais arquiteturas são encontradas em menor frequência, mas não são menos relevantes. As DacC possuem no N-terminal 3 hélices transmembrana, seguidas de uma domínio DAC, uma hélice transmembrana e um domínio YbbR,³⁹ o qual aparentemente é um domínio sinalizador para proteínas-DacA. As DacDs possuem no N-terminal um domínio EIIA,⁴⁰ característico de transporte de açúcar dependente de

fosfoenolpiruvato como fonte de energia em bactérias seguido de um domínio DAC. As DacEs possuem no N-terminal um domínio DAC seguido de um domínio TPR⁴¹ (tetratricopeptídeo repetido), característico por mediar interações proteicas. As DacFs possuem um domínio de função desconhecida no N-terminal, DUF4062, seguido de um domínio DAC. (Figura 4)

Figura 4 - Arquitetura das proteínas mais abundantes que contém o domínio DAC.

Fonte: Adaptada de CORRIGAN; GRÜNDLING.³

Proteínas que contém o domínio DAC são denominadas diadenilato ciclases de acordo com a função que exercem. São proteínas capazes de condensar duas moléculas de ATP, sintetizando um AMP dimérico cíclico, também denominado c-di-AMP e liberando duas moléculas de pirofosfato (Figura 5).

Figura 5 - Representação da reação de síntese de c-di-AMP por diadenilato ciclases.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para realizar essa síntese, o domínio DAC faz uso de dois motivos conservados e característicos de diadenilato ciclases, o domínio DGA (Aspartato-Glicina-Alanina) e o RHR (Arginina-Histidina-Arginina), os quais, segundo a estrutura cristalográfica da DisA de *Thermotoga maritima* (*T. maritima* - Tma_DisA),¹⁵ são responsáveis pela ligação do ATP no sítio ativo do domínio DAC (descrição na seção 1.2.2). Logo, esses motivos são essenciais

para a funcionalidade das proteínas–DAC, conforme demonstrado experimentalmente através de mutações sítio dirigidas daqueles aminoácidos combinadas à análise de atividade das proteínas.^{15,36}

Na literatura encontram-se disponíveis estruturas cristalográficas e estudos bioquímicos das três proteínas-DAC mais abundantes em bactérias: DacA, DisA e DacB. Assim, faremos, a seguir, uma descrição destas proteínas.

1.2.1 Diadenilato ciclase A - DacA

Contabilizando 69,1% das 1756 proteínas que contém o domínio DAC, a DacA é a proteína-DAC mais abundante em bactérias. Encontrada, muitas vezes, como única diadenilato ciclase em importantes patógenos como *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *S. pneumoniae*, a DacA mostrou ser essencial para estes, tornando-se um excelente alvo para o desenvolvimento de novos fármacos que atuem, especialmente, em bactérias multirresistentes como o *S. aureus*.⁴²

A arquitetura desta família de proteínas é constituída de um domínio com 3 hélices transmembranas, com função desconhecida, seguido de um domínio DAC, responsável pela síntese de c-di-AMP (Figura 2).

Recentemente, em 2015, a estrutura da porção citoplasmática de uma diadenilato ciclase, a diadenilato ciclase A de *L. monocytogenes* (Lmo_DacA), fora depositada no *Protein Data Bank* (PDB) com código de acesso 4RV7.⁴³ Através desta estrutura, pode-se verificar que cada monômero da porção citoplasmática referente ao domínio DAC enovela-se de maneira globular em um sanduíche α/β constituído de uma folha- β central, 7 fitas- β antiparalelas, envolta por 5 hélices- α (Figura 4).⁴³

Figura 6 – Estrutura cristalográfica da domínio DAC da diadenilato ciclase A de *L. monocytogenes* (Lmo_DacA), depositada no *Protein Data Bank* (PDB) com código de acesso 4RV7. (A) A porção citoplasmática de um monômero de Lmo_DacA (colorido na forma de arco-íris do N-terminal para o C-terminal) tem uma forma globular composta de uma folha- β torcida central envolta por hélices- α de ambos os lados, como podemos ver através de um giro de 90° em torno do da folha- β (B).

Fonte: Elaborada pela autora.

Conforme ilustrado na Figura 5, o sítio de ligação do ATP e do cofator encontra-se em uma cavidade bem definida constituída pelas estruturas secundárias: hélice-4 ($\alpha 4$), fita- $\beta 1$ ($\beta 1$) e fita- $\beta 5$ ($\beta 5$), assim como os *loops* que conectam a hélice-1 ($\alpha 1$) e a fita- $\beta 1$ ($\beta 1$), a hélice-3 ($\alpha 3$) e a fita- $\beta 3$ ($\beta 3$), a fita- $\beta 4$ ($\beta 4$) e a hélice-4 ($\alpha 4$), e a fita- $\beta 5$ ($\beta 5$) e a fita- $\beta 6$ ($\beta 6$).

Figura 7 - Cartoon mostrando o sítio de ligação do ATP e do magnésio, destacando os motivos DGA e RHR destacados em sticks amarelos.

Fonte: Elaborada pela autora.

Analisando a unidade assimétrica da estrutura obtida para a Lmo_DacA, Rosenberg et al.⁴³ verificaram a existência de 4 moléculas idênticas (monômeros) por unidade assimétrica (Figura 6A). Estes monômeros encontram-se arranjados na unidade assimétrica com os sítios de ligação de ATP dispostos aleatoriamente, como pode ser visualizado com o destaque dos sítios de ligação do ATP em azul *royal* na Figura 6B. Esse arranjo cristalino apresentado pelos monômeros de Lmo_DacA mostra-se incompatível à formação de uma interface de síntese do nucleotídeo, visto que a síntese ocorra, é necessário a aproximação de dois sítios de ligação de ATP.

Figura 8 - (A) Representação em *cartoon* da configuração das quatro moléculas de Lmo_DacA encontradas em unidade assimétrica do cristal de Lmo_DacA. **(B)** O mesmo que o anterior, mas com destaque em azul royal para a localização dos sítios de ligação de ATP em cada monômero de Lmo_DacA.⁴³

Fonte: Elaborada pela autora.

Todas as diadenilato ciclases A (DacAs) estudadas até o momento (DacA de *L. monocytogenes*,⁴³ *Bacillus subtilis*,²⁰ *S. pyogenes*⁴⁴ e *S. aureus*) são proteínas ativas. Alguns destes estudos salientam, ainda, que essas proteínas são ativas apenas em forma dimérica.^{20,36,43} Logo, através de análise destes dados da literatura e da estrutura de Lmo_DacA, Rosenberg et al.⁴³ asseguraram que a conformação obtida na estrutura cristalina da Lmo_DacA (os monômeros de Lmo_DacA) não é a conformação apresentada pela proteína em solução.

As DacAs utilizam ATP como substrato e necessitam de cofator metálico (Mn^{2+} , Co^{2+} e/ou Mg^{2+} , nesta ordem) para efetivar condensação do ATP. Para condensar duas moléculas de ATP (alocadas uma em cada sítio de ligação da proteína) e, então, sintetizar o nucleotídeo cíclico, é necessário que ocorra uma aproximação de dois sítios de ligação de ATP, provenientes de dois domínios DAC distintos.⁴³ Contudo, até o momento não há dados que mostrem efetivamente a interface de síntese utilizada por estas proteínas.

Usualmente o gene que codifica para uma DacA é localizado no mesmo operon de genes que codificam proteínas que contenham um ou múltiplos domínios YBBR, os quais dão nome às proteínas que constituem.³⁵

Recentemente, Mehne et al. mostraram que a YbbR do organismo *Bacillus subtilis* (Bsu_YbbR) interage via seu N-terminal com o N-terminal da DacA, estimulando a atividade da ciclase.²⁰ Desta forma, os autores inferiram que o domínio YbbR pode ser um domínio sensor de algum sinal extracelular, ainda não identificado, agindo como regulador da atividade das DacAs.

No entanto, apesar de haver estudos com proteínas DacA, seu mecanismo de síntese de nucleotídeo não se encontra elucidado. Conforme mencionado, a estrutura obtida para Lmo_DacA não apresentou a suposta a conformação dimérica funcional em solução, nem a interface de síntese do nucleotídeo. Realizando uma sobreposição com a estrutura de DisA de *T. maritima* (Tma_DisA), descrita na seção 1.2.2, Rosenberg et al.⁴³ especularam que os monômeros apresentados na estrutura cristalina de Lmo_DacA devam se rearranjar em forma dimérica onde dois domínios DAC distintos se aproximam na orientação face-a-face. Contudo, não existem resultados experimentais que efetivem essa proposição, o que sinaliza a necessidade de investigação tanto do mecanismo de síntese do nucleotídeo quanto da interface de síntese utilizada pelas DacAs.

1.2.2 DNA integrity scanning protein A - DisA

Encontrada em 24,1% das proteínas bacterianas que contém o domínio DAC e principalmente em actinobactérias e firmicutes formadores de esporo,³ a DisA é a segunda arquitetura proteica mais abundante dentre as proteínas-DAC. A arquitetura desta família é constituída de um domínio DAC e um domínio que se liga especificamente ao DNA, interligados por um *linker* (Figura 4).

As estruturas cristalográficas da DisA de *T. maritima* (com acessos PDBs: 3C1Z, 3C21, 3C23, 3C1Y) foram as primeiras estruturas de diadenilato ciclases obtidas.¹⁵ Essas estruturas mostram o enovelamento dos domínios que constituem a Tma_DisA (Figura 9). Utilizando o código PDB 3C21 para as análises que seguem, pode-se verificar que o domínio de ligação a DNA apresenta-se como um domínio helicoidal com um enovelamento do tipo HhH (*Helix-hairpin-Helix*),⁴⁵ característico de ligação aos fosfatos presentes no DNA (em verde na Figura 9). O *linker* consiste de um feixe de cinco hélices- α (em azul na Figura 9). O domínio DAC enovela-se de maneira análoga a este domínio das DacAs, ou seja, em forma de um sanduíche α/β globular (em laranja na Figura 9), com uma folha- β central, constituída por sete fitas- β paralelas e anti-paralelas, envolta por 5 hélices- α (Figura 10A e 10B).¹⁵

Figura 9 - Monômero da Tma_DisA mostrando o enovelamento e delimitação de cada domínio que a constitui.
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 10 - Estrutura cristalográfica do domínio DAC da *DNA integrity scanning protein A* de *T. maritima* (Tma_DisA), depositada no Protein Data Bank (PDB) com código de acesso 3C21. (A) Domínio DAC de um monômero de Tma_DisA (colorido na forma de arco-íris do N-terminal para o C-terminal) tem uma forma globular composta de uma folha- β torcida central envolta por hélices- α de ambos os lados, como podemos ver através de um giro de 90° em torno do da folha- β (B).
Fonte: Elaborada pela autora.

O sítio de ligação do ATP na estrutura da Tma_DisA encontra-se em um bolsão bem definido constituído pelas mesmas estruturas secundárias do sítio de ligação encontrado nas DacAs (Figura 11). O sítio de ligação do cofator não fora observado nesta estrutura. Witte *et al.* acabaram descobrindo não somente um novo nucleotídeo, o c-di-AMP, mas também a função do domínio DAC (previamente denominado DUF147), ainda desconhecida.¹⁵

Figura 11 - Sobreposição dos domínios DAC de Tma_DisA (em azul – PDB 3C21) e Lmo_DacA (em ocre claro - PDB 4RV7) evidenciando as mesmas estruturas secundárias que formam do sítio de ligação do ATP em ambas as proteínas.

Fonte: Elaborada pela autora.

A estrutura obtida da Tma_DisA apresentou duas moléculas de proteínas por unidade assimétrica do cristal (Figura 12A). Analisando os contatos moleculares na rede cristalina através do eixo de simetria de ordem 4 do cristal e buscando uma solução para a estrutura em solução através de espalhamento de baixo ângulo (SAXS⁴⁶), Witte *et al* verificaram que a Tma_DisA forma um octâmero em solução, com interações das hélices do domínio *linker* que estabilizam dois tetrâmeros (Figura 12B) os quais interagem via domínio DAC estabilizando o octâmero de Tma_DisA (Figura 12B).¹⁵

Figura 12 - (A) Representação da configuração das duas moléculas de Tma_DisA encontradas em unidade assimétrica da rede cristalina. (B) Representação da configuração octamérica de Tma_DisA encontrada através de análise dos contatos moleculares na rede cristalina através do eixo de simetria de ordem 4 do cristal e modelagem dos dados de espalhamento de baixo ângulo (SAXS).

Fonte: Elaborada pela autora.

Todas as diadenilato ciclases do tipo DisA estudadas até o momento (DisA de *T. maritima*,¹⁵ *B. subtilis*²⁰ e *Mycobacterium tuberculosis*³⁶) são proteínas ativas. Alguns destes estudos salientam, ainda, que essas proteínas mostram-se ativas na forma octamérica.^{15, 20} Isso se deve ao fato de que os octâmeros de DisA formam um sítio ativo completo de uma diadenilato ciclase. Conforme ilustrado na Figura 13, os octâmeros de DisA são estabilizados pelos domínios DAC de cada monômero proteico. Esse estado oligomérico propicia a aproximação de dois sítios de ligação de ATP de maneira face-a-face, possibilitando, assim, a condensação dos ATPs e síntese do dinucleotídeo cíclico.

Figura 13 - A conformação estrutural apresentada pelas duas moléculas nas unidades assimétricas do cristal de Tma_DisA e conseqüentemente no octâmero ativo (Figura10), propicia a aproximação face-a-face de dois sítios de ligação de ATP resultando, pois, na hidrólise destas moléculas e na síntese do dinucleotídeo. O zoom da figura mostra o encontro destes sítios na estrutura da Tma_DisA, destacando os motivos DGA e RHR (em ciano) e o c-di-AMP (em sticks) encontrado ligado nessa estrutura (Utilizamos aqui o código PDB 3C1Y referente a Tma_DisA complexada com c-di-AMP).

Fonte: Elaborada pela autora.

As DisAs utilizam tanto ATP quanto ADP como substrato e necessitam de cofator metálico para efetivar a condensação dos nucleotídeos utilizando Mn^{2+} , Mg^{2+} e/ou Co^{2+} como cofator, sendo mais ativas na presença de Mn^{2+} quando tem ATP como substrato e com Mg^{2+} quando ADP é o substrato.^{15,31,36}

A atividade de síntese das DisAs é controlada alostericamente através da ligação de ácidos nucleicos não íntegros ao domínio HhH.¹⁵ Segundo o modelo proposto por Witte et al.,¹⁵ ao escanear o DNA através do domínio HhH, as DisAs são capazes de produzir o dinucleotídeo cíclico, c-di-AMP, através do domínio DAC. No entanto, ao encontrar alguma alteração na fita de ácidos nucleicos, tais como ramificações, a DisA paralisa o escaneamento devido à ligação da proteína com essa porção alterada do DNA. Isso pode levar a proteína a sofrer alguma mudança conformacional, ainda desconhecida, que impede a síntese de nucleotídeo e, conseqüentemente, sinaliza para a célula um problema encontrado (Figura 14).

Figura 14 - Modelo do mecanismo de verificação do DNA através da Tma_DisA. A DisA é uma proteína que realiza a verificação do DNA através do domínio HhH (laranja). Na ausência de lesões cromossômicas, a DisA é capaz de sintetizar c-di-AMP através do domínio DAC (verde). Quando essa proteína reconhece ácidos nucleicos ramificados, alguma mudança conformacional deve ocorrer na estrutura da Tma_DisA, inibindo a síntese de c-di-AMP e indicando para a célula bacteriana a presença de cromossomos não-segregáveis.

Fonte: Adaptada de WITTE et al.¹⁵

Em *B. subtilis*, o gene que codifica a proteína DisA (*disA*) se localiza em um *operon* que contém genes que codificam proteínas relacionadas ao reparo de DNA e à degradação de proteínas danificadas especialmente durante o estresse térmico ao qual as células são submetidas.⁴⁷ Esse *operon* é precedido por promotores controlados por diversos fatores de regulação,³ sugerindo que tanto a DisA quanto o c-di-AMP produzido por ela são importantes para assegurar que a integridade do DNA seja mantida durante os diversos estresses celulares sofridos por estas bactérias e não apenas no processo de esporulação.³

1.2.3 Diadenilato ciclase B - DacB

A terceira família de proteínas-DAC mais prevalente dentre as proteínas-DAC são as DacBs. Contabilizando 5,5% das proteínas-DAC, as DacBs são essencialmente encontradas em bactérias formadoras de esporos durante a fase de esporulação, mais especificamente em bactérias da ordem *Bacillales*. Essas proteínas possuem arquitetura proteica constituída de um domínio YojJ, de função ainda desconhecida, seguido por um domínio DAC (Figura 4).

A estrutura da DacB de *Bacillus cereus* (código PDB 2FB5), única estrutura de DacBs disponível na literatura, mostra o enovelamento do domínio YojJ em forma um feixe ortogonal de hélices- α (em roxo na Figura 135 seguido pelo domínio DAC (em laranja na

Figura 15), o qual apresenta o característico enovelamento globular do tipo sanduíche α/β (Figura 16).

Figura 15 - Monômero da Bce_DacB mostrando o enovelamento e delimitação de cada domínio que a constitui.
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 16 - Estrutura modelada da domínio DAC da diadenilato ciclase B de *Bacillus cereus* (Bce_DacB), depositada no Protein Data Bank (PDB) com código de acesso 4RV7. (A) Domínio DAC de um monômero de Bce_DacB (colorido na forma de arco-íris do N-terminal para o C-terminal) tem uma forma globular composta de uma folha- β torcida central envolta por hélices- α de ambos os lados, como podemos ver através de um giro de 90° em torno do da folha- β (B).

Fonte: Elaborada pela autora.

A estrutura da Bce_DacB não foi obtida na presença de ligantes, logo o sítio de ligação do cofator não pode ser observado. No entanto, uma sobreposição desta estrutura com aquelas da Lmo_DacA e Tma_DisA mostrou que o provável sítio de ligação do ATP é constituído pelas mesmas estruturas secundárias do sítio de ligação encontrado nas DacA e DisAs (Figura 17).

Figura 17 - Sobreposição dos domínios DAC de Tma_DisA (em azul), Lmo_DacAb(em ocre claro) e Bce_DacB (magenta) mostrando que as mesmas estruturas secundárias que formam o sítio de ligação do ATP na Lmo_DacA são encontradas na mesma região do domínio DAC da Tma_DisA.
Fonte: Elaborada pela autora.

A Bce_DacB apresentou três moléculas de proteínas por unidade assimétrica (Figura 18A). No entanto, a única diadenilato ciclase B estudada até o momento (DacB de *B. subtilis* - Bsu_CdaS, denominada no presente trabalho como Bsu_DacB)³⁸ é descrita como um hexâmero em solução. Logo, a conformação estrutural apresentada pela DacB de *Bacillus cereus* poderia não descrever a realidade. Com efeito, os contatos entre as moléculas das unidades assimétricas vizinhas através do eixo de simetria de ordem 6, Mehne et al³⁸ verificaram que as moléculas de cada unidade assimétrica da estrutura da proteína interagem entre si. Através de análises destas interações moleculares foi encontrada a possível conformação do hexâmero de Bce_DacB, na qual hélices do domínio YojJ (em roxo na Figura 18B) estabilizam dímeros de proteína separados, os quais interagem via domínio DAC (em laranja na Figura 18B) estabilizando o hexâmero de Bce_DacB.¹⁵

Figura 18 - (A) Representação da configuração das três moléculas de Bce_DacB encontradas na unidade assimétrica. (B) Representação da configuração hexamérica de Bce_DacB encontrada através de análise dos contatos moleculares entre unidades assimétricas vizinhas do eixo de simetria de ordem 6.

Fonte: Elaborada pela autora.

A forma hexamérica dessa proteína apresenta os domínios DAC de cada subunidade proteica em uma conformação não propícia para síntese do nucleotídeo, uma vez que os possíveis sítios de ligação de ATP se encontram dispostos simetricamente opostos como pode ser visualizado no zoom que dá destaque a esses sítios na Figura 19.

Figura 19 - A conformação estrutural hexamérica apresentada pela Bce_DacB (Figura16B) não propicia, propicia a aproximação face-a-face de dois sítios de ligação de ATP. Assim não propicia a hidrólise destas moléculas e consequentemente a síntese do dinucleotídeo, como relatado por Mehne *et al.*³⁸ O zoom da figura mostra a disposição dos possíveis sítios de ATP simetricamente opostos na estrutura da Bce_DacB, destacando os motivos DGA e RHR (em ciano) e o ATP (em sticks) modelado nessa estrutura.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em um estudo realizado por Mehne *et al.*³⁸ foi mostrado a ineficácia do hexâmero da DacB de *B. subtilis* em produzir o nucleotídeo. Todavia, mutações realizadas na porção do domínio YojJ resultaram em uma proteína ativa e a retirada deste domínio gerou dímeros de domínios DAC da Bsu_DacB com atividade de diadenilato ciclase.

Uma análise da estrutura de Bce_DacB análoga àquela mostrada na Figura 17 em conjunto com os dados de atividade enzimática da Bsu_DacB³⁸ permitiram inferir que para a Bsu_DacB ser ativa deve ocorrer a dissociação do hexâmero e a reassociação dos monômeros da proteína em uma conformação dimérica ativa (Figura 20), análoga àquela encontrada nos octâmeros de DisA (Figura 13). Foi especulado, ainda, que essa mudança conformacional da Bce_DacB seja induzida por alguns fatores como ligação de ATP, modificações pós-traducionais ou ligação de efetores alostéricos, no entanto essa questão ainda se encontra em aberto.³⁸

Figura 20 - Mecanismo de síntese de c-di-AMP pelas DacBs proposto por Mehne et al³⁸. Os hexâmeros de DacB de *B. subtilis* não possuem uma conformação favorável para a síntese do nucleotídeo. Logo a única maneira desta proteína se tornar enzimaticamente ativa seria se fatores externos como ligação de ATP, modificações pós-traducionais ou ligação de efetores alostéricos, ocasionassem a dissociação do hexâmero de DacB e promovessem a reassociação de seus monômeros em dímeros, constituindo, assim, uma conformação completa de um sítio ativo para síntese de c-di-AMP.

Fonte: Elaborada pela autora.

A DacB não é expressa na forma vegetativa das células de *B. subtilis*, entretanto sua expressão aumenta durante o processo de esporulação. Com base nestes dados de transcrição, Mehne *et al.* sugeriram que a DacB é controlada por um fator de regulação denominado fator σ^G e que o c-di-AMP é produzido por essas proteínas para controlar processos específicos durante a esporulação.^{20,38}

1.3 YbbR

Ybbrs são proteínas de membranas que possuem domínios proteicos de mesmo nome, com função desconhecida até o momento. Esses domínios foram identificados pela primeira vez como subunidades de uma proteína de *B. subtilis*, contudo não mostraram ser exclusivos dessa espécie bacteriana. São encontrados amplamente distribuídos dentre as diversas bactérias e mais comumente em bactérias Gram-positivas como *Bacillus anthracis*, *Clostridium botulinum* e *S. aureus*.³⁹

Existem, até o momento, 1744 sequências de proteínas que contém domínios YbbR, denominadas YbbR-like, que pertencem a família de proteínas PF07949, de acordo com

Pfam.³⁴ Essas sequências proteicas estão agrupadas, pelo mesmo servidor, em seis arquiteturas distintas (Figura 21) de acordo com a disposição de um, dois, três ou quatro domínios repetidos em sequência ou não. Esses domínios podem, ainda, estar associados a domínios DAC, a porções de membrana (hélices transmembranas) ou a peptídeos sinais.

Dentre todas as arquiteturas encontradas para proteínas YbbR-like no PFAM, as mais abundantes são as que contém apenas domínios YbbR associados a um peptídeo sinal (arquiteturas de 1 a 3 -Figura 21), as quais representam juntas 87,3% das proteínas YbbR-like. Em seguida, a arquitetura 4, ou seja, àquela que contém uma porção de membrana (hélice transmembrana), representa 10,9% das proteínas YbbR-like (Figura 21). Proteínas que contém outros domínios associados ao YbbR são encontradas raramente em bactérias e representam 1,5% das proteínas YbbR-like.

Figura 21 - Arquitetura das proteínas mais abundantes que contém o domínio YbbR, denominadas proteínas YbbR-like disponíveis no Pfam.

Fonte: Elaborada pela autora.

Recentemente, estruturas proteicas de dois domínios YbbR (domínios I e IV) de uma proteína YbbR-like de *Desulfotobacterium hafniense* Y51 (arquitetura 3) foram resolvidas. Esses domínios apresentaram estrutura parecida com cilindros achatados, dando duas voltas ao redor do seu eixo do cilindro (Figura 22). São domínios compostos quase inteiramente de folhas- β pregueadas e *loops*, embora o domínio IV tenha um curto segmento de α -hélice (Figuras 22A e 22B). A sobreposição dos domínios I e IV mostrou alta similaridade entre as estruturas das duas moléculas (Figura 22C).³⁹

Figura 22 - Estruturas dos domínios I e IV da proteína da família das YbbR-like de *Desulfitobacterium hafniense* Y51. (A) Estrutura do domínio IV da YbbR *Desulfitobacterium hafniense* Y51 de obtida por ressonância magnética nuclear. (B) Estrutura do domínio I da YbbR *Desulfitobacterium hafniense* Y51 obtida por ressonância magnética nuclear. (C) Sobreposição das estruturas obtidas para os domínios I (em azul) e IV (em laranja) mostra a similaridade entre as duas moléculas.

Fonte: Adaptada de BARB et al.³⁹

Ao realizar uma busca por proteínas com estruturas similares utilizando as ferramentas de bioinformática DALI⁴⁸ e MarkUs, Barb et al.³⁹ mostraram que os domínios YbbR possuem topologia e estrutura similares aos domínios C-terminal das proteínas ribossomais TL5 de *Thermus thermophilus*⁴⁹ (Tthe_TL5) e L25 *Deinococcus radiodurans*⁵⁰ (Drad_L25). Tthe_TL5 e Drad_L25 são proteínas ribossomais que interagem entre si e que ligam RNA ou outras proteínas ribossomais.⁴⁹⁻⁵⁰ Logo, Barb et al.³⁹ levantou a hipótese de que os domínios YbbR também possam realizar esse tipo de interação tanto com proteínas quanto com RNAs, recebendo, assim, algum tipo de sinalização celular.

Realizando ensaios de “pulldown” em conjunto com a técnica de “cross-linking”,⁵¹ Gundlach et al.⁵² encontram duas proteínas que interagiram com a YbbR de *B. subtilis* (Bsu_YbbR): CdaA (Bsu_DacA de *B. subtilis*) e a GlmM (glucosamina-6-fosfato mutase) as quais são essenciais para o organismo e codificada no mesmo *operon* da YbbR. Essas interações demonstram uma ligação funcional entre as proteínas.

Estudos com proteínas de *Bacillus subtilis* mostraram que a interação entre a Bsu_YbbR e a Bsu_DacA ocorre via região N-terminal (de membrana) de ambas as proteínas.²⁰ Segundo ensaios de duplo-híbrido, essa interação é específica e forte, uma vez que não foi necessária a utilização de agentes de cross-linking para sua visualização em gel de SDS-PAGE. Através desses estudos também foi demonstrado que a interação da Bsu_YbbR com a Bsu_DacA aumenta aproximadamente 20 vezes a atividade da ciclase, ocasionando um grande aumento na síntese do nucleotídeo cíclico. Especula-se que essa interação e o consequente aumento da atividade da ciclase possam ocorrer após o recebimento de uma sinalização pelos domínios YbbR, que se encontram na região extracelular da bactéria. Ainda

não se sabe a origem dessa sinalização, contudo há indícios de que ela possa ser proveniente de interações proteína-proteína.

1.4 A biosíntese de c-di-AMP em *Staphylococcus aureus*

Descoberto no século XIX⁵³, o *Staphylococcus aureus* (Figura 23) é uma bactéria na forma de cocos, gram-positiva e anaeróbia facultativa.⁵⁴ Encontra-se entre os principais organismos bacterianos simbiotes do ser humano, colonizando desde a pele até mucosas de fossas nasais, da faringe e dos intestinos.⁵⁵⁻⁵⁷

Figura 23 - Microscopia eletrônica mostrando as células de *S. aureus*.
Fonte: *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*⁵⁸

S. aureus é um patógeno humano que coloniza de forma muito prevalente as vias nasais e pele de aproximadamente 20% da população, enquanto que outros 60% tem colonizações transitórias.⁵⁹ Infecções causadas por esse patógeno tem se tornado cada vez mais difícil de serem tratadas devido a sua resistência contra antibioticoterapias.

O que antes era considerado o antibiótico de escolha para essas infecções, a meticilina, na atualidade, é eficaz apenas contra aproximadamente 60% das infecções por *S. aureus*. Adicionalmente, tem-se observado nos últimos anos um aumento dos casos de infecção por *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) que resultam em danos severos à pele e tecidos moles, assim como sepsias, pneumonias necrosantes e osteomielite.⁶⁰⁻⁶¹

A habilidade desta bactéria em causar essa variedade de afecções depende de uma série de fatores e é, em parte, devido a uma série de funções relacionadas ao seu envelope celular. Além disso, a recente descoberta que níveis intracelulares alterados de c-di-AMP aumenta a capacidade do *S. aureus* em resistir a estresses no envelope celular¹⁶ torna as

enzimas responsáveis por sua biossíntese alvos atrativos para o desenvolvimento de novas moléculas terapêuticas.

Em *S. aureus*, existe uma única diadenilato ciclase (Sau_DacA), ancorada à membrana celular, capaz de sintetizar o c-di-AMP. A atividade da Sau_DacA é essencial a esse organismo uma vez que mutações neste gene causam mudanças na capacidade de crescimento bacteriano e de resistência a antibióticos como a meticilina.²⁸ Além disso, a inativação de seu gene pode gerar células bacterianas inviáveis, em analogia ao que ocorre em *L. monocytogenes*^{22 26} e *S. pyogenes*.⁶²

As DacAs encontram-se sempre ativas em células bacterianas, ou seja, produzem constantemente c-di-AMP.²⁰ A síntese deste dinucleotídeo pode ser controlada através da interação entre a porção N-terminal da proteína, domínio localizado na membrana, e a porção N-terminal de uma proteína YbbR-like, como descrito para *B. subtilis*.²⁰

A análise do genoma de *S. aureus* mostrou a existência de uma proteína YbbR-like contendo 3 domínios YbbR extracelulares dispostos sequencialmente. O gene que codifica essa YbbR-like encontra-se no mesmo *operon* do gene que codifica a diadenilato ciclase, sendo anterior ao gene que codifica a Sau_DacA, o que é indício de que essas proteínas possam ser co-expressas nessa bactéria.^{20,28} Sendo assim, sabendo-se da hipótese de que a YbbR pode ser proteína sinalizadora, a interação entre Sau_YbbR e a Sau_DacA pode ser responsável não somente pelo controle da produção de c-di-AMP intracelular, mas também da cascata de sinalização decorrente do aumento da concentração do dinucleotídeo no interior bacteriano.

Em conjunto com essas proteínas, outra proteína denominada GdpP (*GGDEF domain protein containing phosphodiesterase*) controla os níveis de c-di-AMP no interior celular. Cepas com deficiência de produção do ácido lipoteicóico (LTA), um componente crucial para o crescimento bacteriano normal e divisão celular, mostraram gerar uma mutação compensatória no gene que codifica essa fosfodiesterase responsável pela hidrólise do c-di-AMP. Essa mutação inibe a atividade da GdpP, aumentando, por conseguinte, o nível intracelular do dinucleotídeo.¹⁶ O nível aumentado de c-di-AMP colabora para que a bactéria consiga sobreviver em condições adversas.

Visto que a interferência na síntese do c-di-AMP ou na sinalização para sua produção pode tornar as células bacterianas menos capazes ou incapazes de lidar com o estresse celular que ocorre durante o processo de infecção, a Sau_YbbR e Sau_DacA representam excelentes alvos de estudos para novos fins terapêuticos, pois são as únicas proteínas envolvidas diretamente no controle dos níveis intracelulares e na síntese de c-di-AMP em *Staphylococcus*

aureus. Logo, a identificação da inibição das funções destas proteínas combinadas ou não com os tratamentos atualmente disponíveis poderia levar ao controle das infecções até mesmo das formas mais resistentes dos diversos patógenos que as contém.

2 Objetivos

De acordo com a revisão bibliográfica apresentada na Introdução do presente trabalho, o estudo e a elucidação do mecanismo catalítico da única diadenilato ciclase A (DacA) de *S. aureus* (Sau_DacA) e do mecanismo de sinalização recebido pela única possível proteína sinalizadora Sau_YbbR²⁰ podem levar a uma melhor compreensão de suas atividades catalíticas e de recepção de sinal. Além de abrir a possibilidade para estudos racionais de desenvolvimento de inibidores, tais estudos poderão contribuir de maneira significativa para essa nova área de pesquisas.

Logo, o objetivo desse trabalho consiste na elucidação dos mecanismos catalítico da Sau_DacA e de recepção de sinalização da Sau_YbbR. Para atingirmos este objetivo, os objetivos específicos consistiram em:

- Análise de bioinformática para delimitar os domínios de interesse e construção de *Open Reading Frames* (ORFs) que codificam as porções citosólicas das proteínas Sau_DacA e Sau_YbbR;
- Amplificação das ORFs que codificam as porções citosólicas de ambas as proteínas a partir do DNA genômico de *S. aureus*;
- Clonagem das ORFs amplificadas em vetor de expressão;
- Determinação de protocolos de expressão e purificação das proteínas;
- Estudos biofísicos em solução para determinação de estados e/ou mudanças de estados oligoméricos das enzimas através de exclusão molecular por tamanho (SEC), espalhamento dinâmico de luz (DLS) e espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS);
- Ensaios de Fluorescência Polarizada (FP) e Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) para estudo de ligação do ATP e do cofator a Sau_DacA;
- Determinação da atividade enzimática de Sau_DacA através de métodos espectrofotométricos e separação de compostos por *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC);
- Busca por parceiros de interação da Sau_YbbR por ensaios de *Pull Down*;
- Cristalização e resolução estrutural das proteínas através de cristalografia de raios X;
- Mutações sítio-dirigidas baseados em dados da estrutura cristalográfica para verificar relevância dos motivos DGA e RHR, da interface dimérica, da aproximação de dímeros distintos da Sau_DacA;
- Análise comparativa entre as proteínas já existentes da literatura e as obtidas;
- Análise dos dados da literatura e dos obtidos no trabalho para proposição dos mecanismos das proteínas de interesse.

3. Metodologia

3.1 Ensaios de clonagem

3.1.1 Análise das sequências primárias das Sau_DacA e Sau_YbbR

A partir da sequência de nucleotídeos BA000018, depositada no GenBank, sendo a região de 2228184 a 2228993 a *Open Reading Frame (ORF)* correspondente a Sau_DacA, e a sequência de nucleotídeos L895_10445, a *ORF* correspondente a Sau_YbbR, depositada no *European Nucleotide Archive*, foram realizadas análises de bioinformática dessas sequências para identificação de: sítios de enzimas de restrição via NEBcutter V2.0⁶³ (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>), predição de hélices transmembranas via TMHMM V2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>),⁶⁴ predição de estrutura secundária via PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)⁶⁵ e delimitação dos domínios via PFAM^{34,66} (<http://pfam.sanger.ac.uk>).

3.1.2 Construção dos oligonucleotídeos e amplificação das ORFS que codificam as porções citosólicas de Sau_DacA e Sau_YbbR

Após análise estrutural como descrita na seção 3 foi realizado o desenho dos oligonucleotídeos para clonagem das Sau_DacA e Sau_YbbR. Para tanto utilizou-se a ferramenta *OligoPerfectTM Designer* da Invitrogen (<http://tools.invitrogen.com/content.cfm?pageid=9716>) afim de se diminuir a possibilidade de erros nesta etapa do processo. Os oligonucleotídeos gerados por este software foram analisados e adquiridos comercialmente da empresa Sigma (Tabela 1).

Tabela 1 - Tabela de oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes de interesse que expressam Sau_DacA e Sau_YbbR, com inclusão dos sítios das enzimas de restrição BamHI (vermelho) e XhoI (azul).

Proteína	Clones	Oligos	Sequência
Sau_DacA	Sau_DacA ⁸⁶	Forward	CAGT GGATCC CAACCAGAAATTAGACGTGCG
		Reverse	CAGT CTCGAG TTATTTCACACCTTTCTTTTGAAAGC
	Sau_DacA ⁹⁸	Forward	CAGT GGATCC AGAGGTAGCTTTTTAAAACGCTATACTTC
		Reverse	CAGT CTCGAG TTATTTCACACCTTTCTTTTGAAAGC
	Sau_DacA ¹⁰⁶	Forward	CAGT GGATCC ACTTCTAATACGTATAGTAAAGATGAAGAG
		Reverse	CAGT CTCGAG TTATTTCACACCTTTCTTTTGAAAGC
Sau_YbbR	Sau_YbbR ⁴⁵	Forward	CAGT GGATCC CAAGATGTACCCGTTGAAAT
		Reverse	CAGT CTCGAG TTATTTTACATTTATATAAGCCTTCGTTTC
	Sau_YbbR ⁴⁷	Forward	CAGT GGATCC GTACCCGTTGAAATT
		Reverse	CAGT CTCGAG TTATTTTACATTTATATAAGCCTTCGTTTC

Fonte: Elaborada pela autora.

As *Open Reading Frames (ORFs)* que codificam as porções citosólicas da Sau_DacA (ORF_86 que codifica a região que compreende os resíduos de 86 a 269, ORF_98 resíduos de 98 a 269, e a ORF_106 resíduos de 106 a 269) denominadas de Sau_DacA⁸⁶, Sau_DacA⁹⁸ e Sau_DacA¹⁰⁶, e as porções citosólicas da Sau_YbbR (ORF_45 que codifica a região que compreende os resíduos de 45 a 310 e ORF_47 resíduos de 47 a 310) denominadas de Sau_YbbR⁴⁵ e Sau_YbbR⁴⁷, respectivamente foram amplificadas a partir do DNA genômico de *S. aureus SA16*^{*} através de reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction – PCR*).⁶⁷

A amplificação via PCR foi realizada em um termociclador Veriti® Thermal Cycler 96 poços (Applied Biosystems, California, USA), empregando-se um volume final de reação de 50µL para cada enzima:

- para a Sau_DacA a reação foi constituída de 100 pmol de cada oligonucleotídeos, 200 ng de DNA genômico, 10 mM de dNTPs, 1 U de Accu Taq LA polimerase, completou-se o volume com água Milli-Q;
- para a Sa_YbbR a reação foi constituída de 100 pmol de cada oligonucleotídeos, 200 ng de DNA genômico, 10 mM de dNTPs, 1 U de Accu Taq LA polimerase e 2% de DMSO, completou-se o volume com água Milli-Q.

^{*} Cedido pela Prof. Dr. Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo do Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Molecular – LEMiMo.

As condições de amplificação compreenderam uma desnaturação inicial à 94°C por 180 s, seguida de 35 ciclos constituídos de desnaturação à 94°C por 30 s, hibridização variando de 60°C (para as ORFs da Sau_DacA) e 52,3°C (para as ORFs da Sau_YbbR) por 30 s e extensão dos oligonucleotídeos à 68°C por 120 s; com extensão final à 68°C por 10 min. A reação foi finalizada à 4°C.

Os produtos das amplificações foram analisados aplicando-se 10 µL das misturas de reação em gel de agarose 0,8% contendo 0,5 µg.mL⁻¹ de brometo de etídeo, em tampão 1X TAE (80 mM Tris; 40 mM ácido acético glacial; 2,5 mM EDTA, pH 8,3) e em seguida foi submetido a uma tensão de 100 V por 45 minutos. O gel resultante foi visualizado e documentado em equipamento do tipo Bio-Rad Gel Doc XR - Universal Hood (Biorad).

3.1.3 Purificação dos produtos amplificados por PCR das ORFs que codificam as porções citosólicas de Sau_DacA e Sau_YbbR

Após análise em gel de agarose, os produtos de PCR restantes (40 µL) foram separados novamente por eletroforese em gel de agarose preparativo, conforme descrito na seção 3.1.2.

As bandas de interesse dos produtos de PCR foram, então, recortadas do gel com lâmina de bisturi e purificadas utilizando-se o *Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean Up System*, de acordo com as instruções do fabricante. O resultado da extração foi quantificado por espectrofotometria no UV-visível através de um espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

3.1.4 Reação de adenilação dos produtos de PCR purificados e subclonagem dos produtos de PCR adenilados nos vetores de clonagem pGEM-T *Easy* das ORFs referentes às porções citosólicas de Sau_DacA e Sau_YbbR

A Accu Taq LA polimerase não adiciona adenina às extremidades 3' dos produtos de PCR por conta de sua atividade exonuclease. No entanto, para ligação de produtos de PCR destes ao vetor de propagação pGEM-T *Easy* a adenina é necessária, portanto, necessitou-se realizar adição de adenina (A) nas extremidades 3' terminais mediante uma reação denominada *A-tailing procedure*.⁶⁸ Nesta reação, os substratos são o produto da PCR e uma deoxiadenosina trifosfato (dATP) e uma *Taq* DNA polimerase sem atividade corretiva.

As reações de adenilação foram executadas em um termociclador Veriti® Thermal Cycler 96 poços (Applied Biosystems, California, USA), utilizando-se como volume final 15 µL, constituído de 8 µg do produto de PCR purificado, 1,5 µL de tampão da *Taq* DNA Polimerase sem MgCl₂ (10X), 50mM de MgCl₂, 10 mM de dATP, 2,5 U da *Taq* DNA Polimerase, completou-se o volume com água Milli-Q. As reações foram incubadas por 30 minutos à 72°C.

Os produtos de PCR adenilados foram purificados utilizando o *Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean Up System*, e posteriormente quantificados antes da ligação ao vetor pGEM-T *Easy* através de uma reação de ligação. Cada reação de ligação foi preparada em um volume final de 10 µL, contendo: 150 ng de produto de PCR adenilado, 50 ng de vetor pGEM-T *easy*, 5 U da T4 DNA ligase e 5 µL do tampão da T4 DNA Ligase (2X), completou-se o volume com água Milli-Q. A reação foi mantida à 20°C *overnight* e após esse período foi utilizada para transformar bactérias *Escherichia coli* DH5α.

3.1.5 Transformação da bactéria *Escherichia coli* DH5α com os plasmídeos recombinantes pGEM-T *easy* das ORFS que codificam as porções citosólicas de Sau_DacA e Sau_YbbR.

As soluções contendo células competentes, estocadas a -80°C, foram mantidas por aproximadamente 10 min em gelo. A cada 50 µL de células DH5α foram adicionados 2 µL da reação de ligação da seção 3.1.4. A mistura resultante foi mantida no gelo por aproximadamente 10 min. Em seguida, estas misturas foram submetidas à incubação em banho de água a 42°C por 1 min e subsequentemente em banho de gelo por 5 min (choque térmico)⁶⁹. Após este período, 200 µL de meio LB foram adicionados a cada um dos tubos contendo as células transformadas com as reações de ligação. As novas misturas foram mantidas a 37°C por 45 min sob agitação de 250 rpm. Estas foram plaqueadas em placas de Petri contendo 25 mL de meio seletivo Luria-Broth sólido (LB, 3g de ágar) suplementado com 0,5 mM de IPTG, 100 µg de X-Gal e 100 µg de ampicilina; incubadas *overnight* a 37°C em estufa.

3.1.6 Extração, análise de restrição e sequenciamento dos plasmídeos recombinantes pGEM-T *easy* de *Escherichia coli* DH5α das ORFS que codificam as porções citosólicas de Sau_DacA e Sau_YbbR.

Após a incubação foram selecionadas algumas colônias brancas resistentes (possíveis recombinantes ou clones positivos) a fim de realizar a extração de seus DNA plasmidiais. A seleção definitiva dos recombinantes foi realizada através de análise de restrição e confirmada pelo sequenciamento de DNA.

Assim, as colônias foram transferidas, individualmente, em tubos estéreis para cultivo celular, contendo 5 mL de meio LB líquido, com 100 µg de ampicilina (pré-inóculo). Os tubos foram incubados a 37°C *overnight*, sob agitação de 250 rpm. A seguir, as células tiveram seus DNAs plasmidiais extraídos através do *Kit Wizard®Plus SV Minipreps DNA Purification Systems* e posteriormente quantificados através de um espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

A análise de restrição foi realizada empregando-se um volume final de 10 µL constendo 300 ng dos DNAs plasmidiais, 0,5 µL da enzima *Bam*HI, 0,5 µL da enzima *Xho*I (ambas Fast Digest da Thermo Fisher Scientific) e 1 µL de tampão da enzima *Fast Digest* (10X), completando-se o volume com água Milli-Q. A reação foi mantida em estufa por 3 horas. Os produtos da digestão foram analisados em gel de agarose 0,8% visualizados e documentados em fotodocumentador (Bio-Rad Gel Doc XR - Universal Hood (Biorad)). Os plasmídeos de propagação contendo clones positivos, segundo análise de restrição, foram submetidos a sequenciamento cujos resultados foram analisados comparativamente com as sequências das ORFS de interesse através da ferramenta BLAST,⁷⁰ disponível em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

A partir dos clones positivos, após sequenciamento, foi realizada uma nova análise de restrição, empregando-se um volume maior, de 20 µL com a finalidade de se obter quantidade suficiente dos insertos de interesse com extremidades coesivas adequadas para serem subclonados nos vetores de expressão, previamente digeridos com as mesmas endonucleases de restrição.

3.1.7 Subclonagem das ORFs que codificam as porções citosólicas de Sau_DacA e Sau_YbbR no plasmídeo de expressão pSMT3.

Plasmídeos do sistema pET possuem um gene que confere resistência a canamicina⁷¹ e podem apresentar uma sequência nucleotídica na região do N- ou C-terminal do sítio de múltipla clonagem que codifica seis histidinas denominada *His-tag*.

Os clones de interesse foram inseridas no vetor pSMT3.⁷² Cada reação de ligação foi preparada em um volume final de 10 µL contendo 50 ng de vetor pSMT3[†] previamente digeridos com as enzimas selecionadas (*Bam*HI e *Xho*I), 20 ng do inserto de interesse, 5 U de T4 DNA ligase, 1 µL de tampão da T4 DNA ligase (2X) e completado o volume com água Milli-Q. Estas reações foram incubadas à 20°C *overnight*.

Essas misturas foram utilizadas na transformação por choque térmico⁶⁹ de células competentes de *E. coli* DH5α para nova propagação plasmidial.

3.1.8 Transformação da bactéria *Escherichia coli* DH5α com plasmídeos recombinantes pSMT3 das ORFS que codificam as porções citosólicas de Sau_DacA e Sau_YbbR.

A transformação de células competentes de *E. coli* DH5α foi adaptada a partir de protocolo descrito na secção 3.1. Utilizou-se 5 µL de reação de ligação para se transformar as células. As células transformadas foram plaqueadas em placas de Petri contendo 20 mL de meio seletivo LB suplementado apenas com 50 µg de canamicina, no caso das *E. coli* BL21(DE3), ou suplementado com 50 µg de canamicina e 34 µg de clorafenicol, no caso das *E. coli* Rosetta2 (DE3), e incubadas *overnight* em estufa à 37°C.

3.1.9 Extração e análise de restrição dos plasmídeos recombinantes pSMT3 de *Escherichia coli* DH5α das ORFS que codificam as porções citosólicas de Sau_DacA e Sau_YbbR

Após o tempo de incubação foram selecionadas algumas colônias a fim de realizar a extração de seus DNAs plasmidiais. Essas colônias foram transferidas, individualmente, em tubos estéreis para cultivo celular, contendo 5 mL de meio LB líquido, com 50 µg de

[†] Vetor pSMT3 foi cedido pelo professor André Luis Berteli Ambrosio do Laboratório Nacional de Biociências – LNBio.

canamicina, no caso das *E. coli* BL21(DE3) ou 50 µg de canamicina e 34 µg de clorafenicol, no caso das *E. coli* Rosetta2 (DE3). Os tubos foram incubados a 37°C *overnight*, sob agitação de 250 rpm. A seguir as células tiveram seus DNAs plasmidiais extraídos através do *Kit Wizard®Plus SV Minipreps DNA Purification Systems* e posteriormente quantificados através de um espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

Análises de restrição dos plasmídeos extraídos foram realizadas empregando-se um volume final de 10 µL constituídos de 300 ng do DNA plasmidial, 0,5 µL da enzima *Bam*HI, 0,5 µL da enzima *Xho*I, ambas Fast Digest, e 1 µL de tampão da enzima *Fast Digest* (10X), completando-se o volume com água Milli-Q. A reação foi mantida em estufa por 3 horas. Os produtos de digestão foram analisados em gel de agarose 0,8% e analisados em fotodocumentador (Bio-Rad Gel Doc XR - Universal Hood (Biorad)).

Os clones positivos foram sequenciados. Após confirmadas as sequência de DNA que codificam as proteínas de interesse, seus respectivos plasmídeos foram utilizados na transformação por choque térmico⁶⁹ de células competentes de *E. coli* BL21(DE3) para as ORFs da *Sau_DacA* e em *Escherichia coli* Rosetta2 (DE3) para as ORFs da *YbbR*.

3.1.10 Transformação da bactéria de *E. coli* BL21(DE3) para as ORFs da *Sau_DacA* e em *E. coli* Rosetta2 (DE3) para as ORFs da *YbbR* com plasmídeos recombinantes pSMT3

Para a transformação de células competentes de *E. coli* BL21(DE3) e *E. coli* Rosetta2 (DE3). Utilizaram-se 50 ng de plasmídeos de pSMT3 contendo as ORFs de interesse. Estas foram plaqueadas em placas de Petri contendo 20 mL de meio seletivo LB suplementado com 50 µg de canamicina, no caso das *E. coli* BL21(DE3), ou suplementado com 50 µg de canamicina e 34 µg de clorafenicol, no caso das *E. coli* Rosetta2 (DE3), e ambas foram incubadas *overnight* em estufa a 37°C.

3.2 Ensaios de expressão e purificação.

3.2.1 Teste de expressão das construções citosólicas.

Para realizar um teste inicial de expressão das proteínas, repicou-se uma colônia das placas de petri com bactérias *E. coli* BL21(DE3) ou *E. coli* Rosetta2(DE3) transformadas e inoculou-se em 5 mL meio de cultura LB acrescido de 50 µg de canamicina para *Sau_DacA* e

50 µg de canamicina mais 34 µg de clorafenicol. Estes inóculos foram colocados sob agitação de 250 rpm em temperatura constante de 37°C até atingir $D.O_{600nm}=0,6$.

Os inóculos foram divididos em 2 inóculos de 2,5 mL de cultura. A expressão das proteínas foi induzida em 1 inóculo, de cada par de teste, com 0,1 mM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG - Sigma) e o crescimento foi mantido por 5h. Uma alíquota de cada pré-inóculo foi retirada e fervida a 98°C acrescida de tampão de amostra para gel de SDS-PAGE 15%.

3.2.2 Expressão e purificação das construções citosólicas de Sau_DacA

Para a expressão das proteínas, repicou-se uma colônia das placas de Petri preparadas anteriormente com bactérias *E. coli* BL21(DE3) transformadas com plasmídeos contendo as ORFS de interesse e inoculou-se em 5 mL meio de cultura LB acrescido de 50 µg de canamicina. Estes pré-inóculos foram colocados sob agitação de 250 rpm em temperatura constante de 37°C durante 16 h.

Cada pré-inóculo foi utilizado para crescer 1 L de cultura de bactéria, acrescido de 50 µg canamicina, à 37 °C e 250 rpm até uma $OD_{600nm} = 0.6$. A indução da expressão da proteína foi realizada com a adição de 0,1 mM IPTG (Sigma). As culturas foram mantidas sob agitação à 250 rpm e 20 °C por aproximadamente 20 h e então as células foram coletadas por centrifugação à 4 °C e 4000 rpm por 40 min.

Cada pellet de células coletadas referente à 1L de cultura celular foi ressuspensionado em 30 mL de tampão de lise (20 mM Tris, pH 8, 300 mM NaCl, 5 mM Imidazol) e incubado com 10 mg de lisozima a 4°C por 30 min antes de realizar lise por sonicação (em sonificador *Sonic Dismembrator Mode 500* (Fisher Scientific)). Decorrido o tempo e após lise, os extratos celulares foram centrifugados a 4 °C e 10000 rpm por 30 min, os sobrenadantes foram filtrados em papel filtro (Whatman nº1) e aplicados a 5 mL de resina de afinidade por Metal TALON (Clontech) previamente equilibradas com o tampão de lise. As resinas foram lavadas com 10 volumes de coluna (VC) de tampão A (20 mM Tris, pH 8, 300 mM NaCl, 5mM Imidazol) e 3 VC de tampão B (20 mM Tris, pH 8, 300 mM NaCl). A clivagem da proteína de fusão *Small Ubiquitin-like Modifier* (SUMO) foi feita através do acréscimo de ~5 µM de Ulp1 (Ubl-specific protease 1)⁷³ à 8 °C por ~ 16 h. As proteínas foram eluídas com os 3 VC que estavam na resina e mais 3VC de tampão B em frações de 10 mL e analisadas por SDS-PAGE. A fusão SUMO foi eluída da resina com tampão B acrescido de 500 mM de Imidazol

e a resina foi recuperada de acordo com protocolo do fabricante. A pureza das proteínas foi confirmada por SDS-PAGE 15% e essas amostras foram submetidas a uma etapa adicional de purificação por cromatografia de exclusão molecular eluídas a temperatura ambiente (24 °C) em tampão B, através de uma coluna Superdex75 10/300 GL (GE Healthcare), acoplada a um sistema *ÄKTA purifier*. As amostras foram quantificadas por um espectrômetro de UV-visível, Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) e estocadas a -80 °C após rápido congelamento em nitrogênio líquido. As amostras foram novamente analisadas por SDS-PAGE 15% e, então, quantificadas por um espectrômetro de UV-visível, Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

3.2.3 Expressão e purificação das construções citosólicas de Sau_YbbR.

Para a expressão da Sau_YbbR, repicou-se uma colônia das placas de Petri preparadas com bactérias *E. coli* Rosetta2 (DE3) transformadas com plasmídeos contendo as ORFS de interesse e inoculou-se em 5 mL meio de cultura LB acrescido de 50 µg de canamicina e 34 µg de clorafenicol. Estes pré-inóculos foram colocados sob agitação de 250 rpm em temperatura constante de 37°C durante 16 h.

Cada pré-inóculo foi utilizado para crescer 1 L de cultura de bactéria, acrescido de 50 µg de canamicina e 34 µg de clorafenicol, à 37 °C e 250 rpm até uma $OD_{600nm} = 0.6$. A indução da expressão da proteína foi realizada com a adição de 0,1 mM IPTG (Sigma). As culturas foram mantidas sob agitação à 250 rpm e 20 °C por aproximadamente 20 h e então as células foram coletadas por centrifugação à 4 °C e 4000 rpm por 40 min.

Cada pellet de células coletada referente à 1L de cultura foi ressuspensionado em 30 mL de tampão de lise (50 mM Tris, pH 7.5, 300 mM NaCl, 5 mM Imidazol, 5% Glicerol) e incubado com 10 mg de lisozima a 4°C por 30 min antes de realizar lise por sonicação, em sonificador *Sonic Dismembrator Mode 500* (Fisher Scientific). Após essa etapa, os extratos celulares foram centrifugados a 4 °C e 10000 rpm por 30 min, os sobrenadantes foram filtrados em papel filtro (Whatman nº1) e aplicados a 5 mL de resinas de afinidade por Metal Ni-NTA (Clontech) previamente equilibradas com o tampão de lise. As etapas de purificação seguintes foram divididas, como descrito a seguir, em duas formas de acordo com os ensaios a serem realizados.

Para os ensaios de “Pull down”, as resinas foram lavadas com 10 volumes de coluna (VC) de tampão 50 mM Tris, pH 7.5, 300 mM NaCl, 5 mM Imidazol, 5% Glicerol e eluídas

com 5 VC de tampão 50 mM Tris, pH 7.5, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 5% Glicerol. A His-tag e a proteína de fusão SUMO foram mantidas. A retirada de Imidazol foi realizada através de diálise com tampão 50 mM Tris, pH 7.5, 300 mM NaCl, 5% Glicerol. A pureza das proteínas foi confirmada por gel de SDS-PAGE 15% e elas foram submetidas a uma etapa adicional de purificação por cromatografia de exclusão molecular eluídas a temperatura ambiente (24 °C) em 50 mM Tris, pH 7.5, 300 mM NaCl, 5% Glicerol, através de uma coluna Superdex75 10/300 GL (GE Healthcare), acoplada a um sistema *ÄKTA purifier*. As amostras foram novamente analisadas por SDS-PAGE 15% e, então, quantificadas por um espectrômetro de UV-visível, Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) e estocadas a -80 °C após rápido congelamento em nitrogênio líquido.

Para os ensaios de cristalização, as resinas foram lavadas com 10 volumes de coluna (VC) de tampão 50 mM Tris, pH 7.5, 300 mM NaCl, 5% Glicerol, 5 mM Imidazol, antes da indução da clivagem da proteína de fusão SUMO através do acréscimo de ~5 µM de Ulp1 (Ubl-specific protease 1)⁷³ à 8 °C por ~ 16 h. As proteínas foram eluídas com 6 VC de tampão 50 mM Tris, pH 7.5, 300 mM NaCl, 5% Glicerol e analisadas por SDS-PAGE 15%. A fusão SUMO foi eluída da resina com tampão 50 mM Tris, pH 7.5, 300 mM NaCl, 500 mM de Imidazol, 5% Glicerol e a resina foi recuperada de acordo com protocolo do fabricante. A pureza das proteínas foi confirmada por SDS-PAGE 15% e elas foram submetidas a uma etapa adicional de purificação por cromatografia de exclusão molecular eluídas a temperatura ambiente (24 °C) em tampão B, através de uma coluna Superdex75 10/300 GL (GE Healthcare), acoplada a um sistema *ÄKTA purifier*. As amostras foram quantificadas por um espectrômetro de UV-visível, Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) e estocadas a -80 °C após rápido congelamento em nitrogênio líquido. As amostras foram novamente analisadas por gel de SDS-PAGE 15% e, então, quantificadas por um espectrômetro de UV-visível, Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

3.3 Mutações sítio-dirigidas da Sau_DacA.

Com a finalidade de se analisar os aminoácidos importantes para a atividade enzimática da diadenilato ciclase, mutações dos resíduos conservados e dos motivos DGA e RHR foram realizadas. Os mutantes de interesse foram gerados via amplificação por PCR⁷⁴⁻⁷⁶ a partir do vetor de expressão pSMT3 com a ORF_86 (pSMT3DACA86), uma vez que essa construção abrange a maior parte de porção citosólica de Sau_DacA e os *oligonucleotídeos* listados na Tabela 2.

Tabela 2 - Resíduos de aminoácidos de Sau_DacA⁸⁶ mutados, gerando mutantes simples e duplos da diadenilato ciclase e oligonucleotídeos da Sau_DacA⁸⁶ utilizados na amplificação por PCR.

Localização	Mutação efetuada	Nome	Primer	Sequência
Interface dimérica	Leu163-Glu163	L163E	L163E_F	GTATTGCAATGGATTCAAATATTCGCAAGAAGAGTTAATTAATGTCTTTATACCTAACACACCTT
			L163E_R	AAAGGTGTGTTAGGTATAAAGACATTAACTTCTTTCGCAAAATATTGAATCCATTGCAATAC
	Asn166-Glu166	N166E	N166E_F	GCAATGGATTCAAATATTCGCAAGAACCTTTAATTGAGGTCTTTATACCTAACACACCTTTA
			N166E_R	TAAAGGTGTGTTAGGTATAAAGACCTCAATTAAGTCTTTGCGAAATATTGAATCCATTGC
	Leu174-Glu174	L174E	L174E_F	GCAATGGATTCAAATATTCGCAAGAACCTTTAATTGAGGTCTTTATACCTAACACACCTTTA
			L174E_R	TAAAGGTGTGTTAGGTATAAAGACCTCAATTAAGTCTTTGCGAAATATTGAATCCATTGC
Sítio de ligação do ATP	Arg208-Ala208	R208A	R208A_F	CTAAGATATCTAAAAGTTTGGGTACAGCACATAGAGCTGCGGTTG
			R208A_R	CAACCGCAGCTCTATGTGCTGTACCCAACTTTTAGATATCTTAG
	His209-Ala209	H209A	H209A_F	TCTAAAAGTTTGGGTACAAGAGCTAGAGCTGCGGTTGGTATTTT
			H209A_R	GAAATACCAACCGCAGCTCTAGCTCTTGTAACCCAACTTTTAGA
	Arg208-Glu208	R208E	R208E_F	CTAAGATATCTAAAAGTTTGGGTACAGACATAGAGCTGCGGTTGGTATTTT
			R208E_R	TCTGAAATACCAACCGCAGCTCTATGTCTGTACCCAACTTTTAGATATCTTAG
	His209-Glu209	H209E	H209E_F	AAGATATCTAAAAGTTTGGGTACAAGAGAGAGAGCTGCGGTTGG
			H209E_R	CCAACCGCAGCTCTCTCTCTGTACCCAACTTTTAGATATCTT
Interface de síntese do c-di-AMP	Asp176-Glu176	D176A	D176A_F	TACCTAACACACCTTTACATGCTGGTGCAATGATTATTCAAGG
			D176A_R	TAAAGGTGTGTTAGGTATAAAGACCTCAATTAAGTCTTTGCGAAATATTGAATCCATTGC
	Thr207-Ala207	T207A	T207A_F	CTAAGATATCTAAAAGTTTGGGTACAGCACATAGAGCTGCGGTTG
			T207A_R	ACCGCAGCTCTATGTCTTGCACCCAACTTTTAGATATC
Sítio de ligação do manganês	Thr207-Glu207	T207E	T207E_F	GATAGTCTTAAGATATCTAAAAGTTTGGGTGAGAGACATAGAGCTGCGGTTG
			T207E_R	CAACCGCAGCTCTATGTCTCTACCCAACTTTTAGATATCTTAGGACTATC
	Glu228-Ala228	E228A	E228A_F	GCATTTACCGTTATTGTATCTGCAGAACTGGTGATATTTTCGGTA
			E228A_R	TACCGAAATATCACCAGTTTCTGCAGATACAATAACGGTAAATGC
	Glu229-Ala229	E229A	E229A_F	ATTTACCGTTATTGTATCTGAAGCAACTGGTGATATTTTCGGTAACAT
			E229A_R	ATGTTACCGAAATATCACCAGTTGCTTCAGATACAATAACGGTAAAT
	Glu228-Arg228 e Glu229-Arg229	EE228:229RR	EE:RR_F	AAGTATCTGATGCATTACCGTTATTGTATCTAGAAGAACTGGTGATATTTTCGGTAACATTTGATGG
			EE:RR_R	CCATCAAATGTTACCGAAATATCACCAGTTCTTCTAGATACAATAACGGTAAATGCATCAGATACTT
	His175-Ala175	H175A	H175A_F	GAACTTTTAAATTAATGTCTTTATACCTAACACACCTTTAGCTGATGGTGCAATGATTATTC
			H175A_R	GAATAATCATTTGCACCATCAGCTAAAGGTGTGTTAGGTATAAAGACATTAATTAAGTTC

Fonte: Elaborada pela autora.

A amplificação via PCR foi realizada em um termociclador Veriti® Thermal Cycler 96 poços (Applied Biosystems, California, USA), empregando-se um volume final de reação de 50 µL para cada reação, contendo: 100 pmol de cada oligonucleotídeos, 50 ng de DNA plasmidial, 10 mM de dNTPs, 2,5 U de Pfu Turbo DNA polimerase, 25 mM de MgCl₂ e completou-se o volume com água Milli-Q. Sendo que as condições de amplificação compreenderam: uma desnaturação inicial à 95°C por 180 s, seguida de 35 ciclos constituídos de desnaturação à 95°C por 30 s, hibridização variando de 60 °C por 30 s e extensão dos oligonucleotídeos à 72 °C por 7 min; com extensão final à 72°C por 10 min. Ao final da reação a mesma foi interrompida à 4°C.

Os produtos das amplificações foram analisados aplicando-se 10 µL das misturas de reação em gel de agarose à 0,8% contendo 0,5g mL⁻¹ de brometo de etídeo, em tampão 1X TAE e em seguida foi submetido a uma tensão de 100 V por 45 minutos. O gel analisado e fotodocumentado (Bio-Rad Gel Doc XR - Universal Hood (Biorad)). Após a confirmação da amplificação, todos os produtos de PCR foram tratados com DpnI para digerir o plasmídeo utilizado como molde e as misturas resultantes foram clonados em BL21 (DE3), após passagem através de análise de sequência.

3.4 Cristalização, coleta de dados e resolução estrutural da Sau_DacA

As buscas por condições de cristalização das Sau_DacA⁸⁶ e Sau_DacA¹⁰⁶ foram realizadas inicialmente com a enzima em 3 concentrações distintas (2, 4 e 8 mg/ml), em tampão 20 mM Tris, pH 8, 300 mM NaCl, utilizando método padrão de gota sentada (*sitting drop*) através de uma triagem com soluções precipitantes comerciais disponíveis no kit Index (Hampton Research), à 18 °C, totalizando 288 condições para cada construção da proteína. Após uma semana, foram encontrados cristais da Sau_DacA na forma de agulhas na condição 0,2 M sulfato de lítio mono-hidratado, 0,1 M Hepes, pH 7,5, 25% Polietilenoglicol 3350 (PEG 3350).

Esta condição foi refinada e reproduzida, utilizando-se o método de gota suspensa, variando-se a concentração de PEG 3350, pH e concentração de proteína, com o intuito de melhorar a formação e crescimento dos cristais para torná-los adequados aos experimentos de difração de raios X.

Cristais adequados para difração de raios-X foram obtidos usando 4 mg/ml de Sau_DacA⁸⁶ na condição de cristalização: 0,1 M de Tris, pH 8, 0,2 M de sulfato de lítio

mono-hidratado, 21% PEG3350, à 18 °C. Para coleta de dados de difração, os cristais foram submetidos à *soaking* com solução similar à de cristalização, suplementada com 500 mM de NaI e 20% de etilenoglicol por 30 segundos. Os dados foram coletados em um difratômetro Rigaku MicroMax-007 HF com detector de imagem R-AXIS IV⁺⁺ e processados com o programa XDS.⁷⁷ A estrutura cristalográfica foi resolvida por Single-wavelength anomalous diffraction (SAD) e refinada com os programas SHELXD, PHASER e PHENIX.⁷⁸⁻⁸⁰

Para obtenção da estrutura da proteína na presença de seus ligantes foi realizado *soaking* dos cristais em solução de cristalização suplementada com 2 mM de α,β -metileno adenosina 5'-trifosfato (α,β -Me-ATP) e com 10 mM MnCl₂ por 2 h para garantir a presença dos ligantes nos cristais. As estruturas cristalográficas foram obtidas através de substituição molecular, utilizando como modelo a estrutura da proteína obtida em sua forma APO.

No intuito de se investigar a relevância da interface dimérica apresentada pela Sau_DacA⁸⁶, mutações sítio dirigidas foram realizadas em resíduos conservados dessa região, dentre essas mutações encontra-se o mutante N166E. Cristais adequados para difração de raios-X foram obtidos usando 4 mg/ml de N166E_Sau_DacA⁸⁶ na condição de cristalização: 0,1 M de Tris pH 8,0, 0,2 M de sulfato de lítio mono-hidratado, 21% PEG3350, à 18 °C em placas de 96 poços para gotas sentada. Os cristais foram imersos em solução criogênica contendo 20% de etilenoglicol por 30 segundos e levados para difração na linha X15⁸¹ no National Synchrotron Light Source (NSLS) para aquisição de dados[‡]. As estruturas cristalográficas foram obtidas através de substituição molecular, utilizando como modelo a estrutura da proteína obtida em sua forma APO.

3.5 Análises e comparações estruturais

A busca de sequências para as diversas análises de alinhamento foram realizadas através do servidor online HMMER⁸² (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/>). Os alinhamentos múltiplos foram realizados através da ferramenta ClustalO⁸³ (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>). Após os alinhamentos, as análises de identificação de regiões conservadas nas estruturas de proteínas foram realizadas pelo servidor online CONSURF⁸⁴ (<http://consurf.tau.ac.il/>) e a identificação dos aminoácidos conservados foi realizada através do servidor online Weblogo⁸⁵ (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>).

[‡] A aquisição dos dados e a resolução da estrutura do mutante N166E foram obtidas em colaboração com os alunos Dr. Bruno Matsuyama e Ms. Flávio Rosseto.

As sobreposições de estruturas, cálculo de RMSD, análises de diferenças de enovelamento e as figuras apresentadas foram realizadas no Pymol.⁸⁶

3.6 Cromatografia por exclusão molecular

Com o intuito de estimar o estado oligomérico das construções de Sau_DacA, realizamos ensaios de exclusão molecular analítica⁸⁷ utilizando o Kit Gel Filtration Calibration (GE Helthcare), em tampão 20 mM Tris, pH 8, 300 mM NaCl para as construções citosólicas da Sau_DacA, e em tampão 50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5% glicerol, para as construções citosólicas da Sau_YbbR, seguindo as instruções do fabricante para a calibração da coluna Superdex75 10/300 (GE Helthcare). Com a coluna calibrada, realizamos análises cromatográficas com cada construção da proteína, onde verificamos o volume de eluição no máximo de absorção para possibilitar o cálculo da massa molecular aparente através da curva de calibração como indicado pelo fabricante. Os experimentos foram realizados em duplicatas técnicas e os dados resultantes foram analisados no programa GraphPad Prisma 5.0.

Com a finalidade de comparar e confirmar os resultados obtidos com a cromatografia de exclusão molecular analítica e verificar a homogeneidade das proteínas, realizamos experimentos de Espalhamento de Luz Dinâmica (DLS)⁸⁸, utilizando um Zetasizer μ V Essentials (Malvern), a 20°C, com cubeta de quartzo de 1,25 cm e capacidade de 2 μ L. As medidas foram realizadas em triplicata, sendo cada uma delas médias de 13 medidas de 10 segundos cada.

3.7 *High-performance liquid chromatography* (HPLC)⁸⁹⁻⁹⁰

3.7.1 Ensaios de atividade enzimática da Sau_DacA⁸⁶

Para determinar a atividade enzimática da Sau_DacA⁸⁶, 200 μ L de cada reação contendo 20 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM MnCl₂ e 100 μ M de adenosina trifosfato (ATP, Sigma) foram preparadas e iniciadas com adição de 5 μ M de proteína e incubadas a 37°C por 120 min. Após este tempo, as reações foram paradas fervendo-se as amostras em banho úmido a aproximadamente 98 °C para desnaturação da proteína. As reações foram centrifugadas por 5 min a 10000 rpm para remover os debris de proteína. Por fim, 100 μ L de cada amostra foram aplicados ao HPLC Waters Alliance equipado com uma coluna de fase reversa C18 (250 x 4.6 mm, Vydac), utilizada para a separação das moléculas presentes nas amostras, as quais foram

eluídas usando uma fase móvel contendo 100 mM de acetato de amônio pH 5,0 e um gradiente de acetato de amônio 30 mM pH 5,0 e 70% metanol. Os nucleotídeos foram monitorados em 254 nm.

Os experimentos foram realizados em triplicatas técnicas e duplicatas biológicas e os dados resultantes foram analisados no programa GraphPad Prisma 5.0, como descrito abaixo.

3.7.2 Purificação de c-di-AMP para curva de calibração

Para obter nucleotídeo em grande quantidade utilizamos a construção Sau_DacA⁸⁶. 10 reações de 50 mL contendo 20 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM MnCl₂ e 100 µM de adenosina trifosfato foram preparadas e iniciadas com adição de 5 µM de proteína e incubadas a 37°C por 16h (com a finalidade de total conversão do ATP em c-di-AMP). Após este tempo, as reações foram paradas fervendo-se as amostras em banho úmido a aproximadamente 98 °C para desnaturação da proteína. As reações foram centrifugadas por 5 min a 10000 rpm para remover os debris de proteína. O sobrenadante de cada reação foi liofilizado em uma Savant speedvac plus-Thermo Quest por aproximadamente 16 h. O produto liofilizado foi hidratado com 10 mL de água mili-Q. 1 ml desta ressuspensão foi aplicado no sistema *ÄKTA purifier* equipado com uma coluna de fase reversa C18 (Gemini 5µm, 250 x 10.0 mm) utilizada para a separação das moléculas presentes nas reações. Essas moléculas foram separadas usando uma fase móvel contendo 100 mM de acetato de amônio pH 5,0 e um gradiente de acetato de amônio 30 mM pH 5,0 e 70% metanol. Os nucleotídeos foram monitorados em 254 nm. Os picos dos cromatogramas foram coletados e analisados por espectrometria de massas.[§]

3.7.3 Curva de calibração para detecção do c-di-AMP

Para obtenção de uma curva de calibração do equipamento de HPLC e consequente determinação da concentração de c-di-AMP produzido em cada reação, cinco amostras contendo diferentes concentrações do nucleotídeo (de 3 a 15 µM), produzidos pela própria Sau_DacA⁸⁶ através de protocolo estabelecido pelo nosso grupo de pesquisa, foram injetadas no equipamento de HPLC. A área abaixo de cada curva foi integrada utilizando o programa do equipamento e associamos o valor correspondente ao pico do c-di-AMP à concentração injetada no equipamento. Os dados obtidos foram analisados em um gráfico de concentração de c-di-AMP (µM) versus área de integração (u.a.) e um ajuste linear dos dados foi realizado

[§] Espectrometria de massas realizada em colaboração com o Dr. Edson Crusca

através do programa GraphPad Prima 5.0. Os experimentos foram realizados em duplicata técnica.

3.7.4 Análise da dependência da atividade da Sau_DacA⁸⁶ em relação ao cofator, à concentração do cofator, ao pH e à temperatura

A dependência do íon metálico como cofator foi investigada através de reações contendo 5 μM de proteína (Sau_DacA⁸⁶) em tampão 20 mM Tris, pH 8, 300 mM NaCl e 10 mM $[\text{metal}^{2+}]$. As reações foram iniciadas com 100 μM ATP, mantidas à 37°C e paradas após 120 min fervendo-se as amostras em banho úmido a aproximadamente 98 °C para desnaturação da proteína. A influência da concentração de MnCl_2 foi analisada através da mesma reação descrita anteriormente, utilizando Mn^{2+} como cofator, na faixa de concentração de 0,5 a 250 mM. A influência do pH na faixa de pH 7,0 a 9,0 e a influência da temperatura na faixa de 30°C a 40°C, utilizando Mn^{2+} como cofator e a reação descrita anteriormente.

Ao final de cada desnaturação as amostras foram centrifugadas por 5 min a 10.000 rpm para retirada dos debris proteicos. Seguindo, 20 μl de cada amostra foram aplicados ao equipamento e separados por HPLC de fase reversa com a coluna C18 (250 x 4.6 mm, Vydac). As amostras foram eluídas usando uma fase móvel contendo 100 mM de acetato de amônio (pH 5,0) e um gradiente de acetato de amônio 30 mM (pH 5,0), 70% metanol. Os nucleotídeos foram monitorados em 254 nm. Os experimentos foram realizados em triplicatas técnicas e os dados resultantes foram analisados com o programa GraphPad Prisma 5.0.

3.8 Cinética Enzimática⁹¹⁻⁹²

As constantes cinéticas da Sau_DacA⁸⁶ foram determinadas através do experimento de cinética enzimática^{**} obedecendo aos requisitos de uma reação de Michaelis-Menten. A reação foi realizada conforme o *kit EnzChek*, preparando-se um *mix* que continha os componentes do *kit* acrescidos de 1,1 μM Sau_DacA⁸⁶ e 11,1 mM MnCl_2 . Foram transferidos 90 μl por poço deste *mix* para placas de 96 poços de tal forma que as concentrações finais de Sau_DacA⁸⁶ e MnCl_2 na reação foram, respectivamente, de 1 μM e 10 mM. Para iniciar a reação foi adicionado ATP por meio de uma diluição seriada de 6,5 mM até 12,8 μM e transferiu-se 10 μl por poço dessas diluições para as placas de 96 poços contendo o *mix*. A concentração final de ATP nas reações variou entre 650 μM e 1,28 μM . O experimento foi

^{**} Ensaios de cinética enzimática foram realizados em colaboração com o aluno Raphael Meneghelo.

feito em triplicata. A reação foi acompanhada através do monitoramento da absorbância em 360 nm, em um leitor de placas SpectraMax® i3 por 3 horas e 30 minutos, com leituras a cada 41 segundos. Os dados foram transformados para velocidades iniciais de reação a partir da curva de calibração, para conversão dos valores de absorbância em valores de velocidade de reação e analisados no programa GraphPad Prisma 5.0.

3.9 Fluorescência polarizada (FP)⁹³⁻⁹⁵

Para realizarmos ensaios de ligação do substrato ATP com a diadenilato ciclase, foram realizadas medidas de fluorescência polarizada do ATP marcado com uma sonda fluorescente, o BODIPY® TR-ATP (Life Technologies), o qual consiste de uma sonda do tipo BODIPY® TR ligada a ribose do ATP. Os experimentos foram realizados em um equipamento 2104 EnVision® Multilabel Reader, disponibilizado pelo Prof. Dr. Artur Cordeiro do Laboratório Nacional de Biociências – LNBio, na presença da Sau_DacA⁸⁶ em várias condições. Antes dos ensaios de ligação, foi realizada uma medida de fluorescência do tampão e da sonda para utilizarmos como controle e otimizarmos as medidas.

Uma diluição seriada da Sau_DacA⁸⁶ a partir de 300 µM a 140 nM, em tampão 20 mM Tris, pH 8, 300 mM NaCl, foi realizada em uma microplaca de titulação preta e de fundo chato, contendo um volume final de 25 µl em cada poço. Separadamente uma solução contendo 20 mM [metal²⁺], 100 nM de BODIPY® TR-ATP em tampão 20 mM Tris, pH 8, 300 mM NaCl foi preparada para incubação de 25 µl dessa solução em cada poço da microplaca com as diferentes concentrações de Sau_DacA⁸⁶. Desta forma, foi iniciado o ensaio de ligação do ATP com a ciclase, contendo como concentrações finais de cada composto 10 mM [metal²⁺], 50 nM de BODIPY® TR-ATP e a diluição seriada da enzima de 150 µM a 70 nM.

Após 5 minutos de incubação da microplaca dentro do equipamento, para proteção da sonda sob efeito da luz ambiente, a fluorescência do BODIPY® TR-ATP foi medida através de excitação da sonda no comprimento de onda de 555 nm e a emissão em 632 nm. Os experimentos foram realizados em triplicatas técnicas e duplicatas biológicas e os resultados foram analisados e ajustados por uma sigmoide com o programa GraphPad Prisma 5.0.

3.10 Ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e a ligação do Mn^{2+}

3.10.1 RPE convencional⁹⁶

Com a finalidade de se descobrir se o substrato real da diadenilato ciclase A seria apenas o nucleotídeo (ATP) ou o complexo formado pelo nucleotídeo e o cofator Mn^{2+} foi explorada natureza paramagnética do íon Mn^{2+} através da técnica de RPE.⁹⁶

Amostras contendo 100 μM de proteína, 100 μM α,β -Me-ATP e 100 μM de $MnCl_2$ em tampão 20 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8 foram transferidas para capilares de vidro de 1,5 mm (ID). Estes capilares foram inseridos em um tubo de quartzo contendo um banho de óleo mineral para estabilização da temperatura da amostra durante as medidas.

As medidas do sinal paramagnético do íon Mn^{2+} livre em solução foram realizadas em um espectrômetro de RPE Varian E109, que opera em banda X e usa uma cavidade retangular Varian E-248. A temperatura foi controlada utilizando o controlador *homemade* acoplado ao espectrômetro com uma incerteza de aproximadamente 0,2 °C. As condições de aquisição dos espectros foram: frequência de modulação do campo magnético, 100 kHz; modulação da amplitude do campo, 4 G; largura da varredura, 1.000 G e potência de microondas, 40 mW. A intensidade dos espectros foi analisada e comparada ao controle contendo $MnCl_2$ em tampão 20 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8. Os experimentos foram realizados em triplicatas técnicas e duplicatas biológicas e os dados resultantes foram analisados com o programa GraphPad Prisma 5.0.

3.10.2 RPE Pulsada (HYSCORE)⁹⁷

A espectroscopia de *hyperfine sublevel correlation* (HYSCORE), uma técnica de RPE pulsada, foi utilizada para se verificar o ambiente ao redor do Mn^{2+} ligado à proteína. Mais especificamente, prótons (1H), núcleos próximos de ^{31}P do ATP ou de ^{15}N de resíduos de histidina próximos (até ~ 5 Å) podem ser “vistos” pelo Mn^{2+} dada a aplicação de uma sequência de pulsos adequada.⁹⁸ Os experimentos foram realizados no espectrômetro Bruker Elexys E580 operando em banda-X (~ 9.5 GHz) em colaboração com o pesquisador Dr. Luís Guilherme Mansor Basso, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

As amostras foram preparadas incubando-se 100 μM de Mn^{2+} e 100 μM de ATP por 10 minutos. 1 mM de Sau_DacA⁸⁶ foi adicionado à solução anterior, ajustando-se o volume

para 100 μL . A solução final foi transferida para um tubo de quartzo de 3 mm e congelada rapidamente em nitrogênio líquido, antes de sua transferência para o espectrômetro. As medidas foram realizadas à temperatura de 6 K usando-se o sistema criogênico ITC503 Oxford para controle da temperatura. A análise dos dados foi realizada através de software específico do espectrômetro ou através do programa Origin 8.0.

3.11 Calorimetria de varredura diferencial (DSC).^{99, 100}

Com o intuito de se estudar a estabilidade da Sau_DacA (utilizando a Sau_DacA⁸⁶) e seus mutantes, experimentos de DSC foram realizados no calorímetro VP-DSC fabricado pela MicroCal (Northampton, MA), usando-se uma taxa de aquecimento de 60°C/h e pressão de 22 psi (libra por polegada quadrada). Antes das medidas, as amostras foram desgaseificadas por um período de 10 a 20 minutos e aplicadas no equipamento (500 μL), onde foi equilibrada por 10 minutos em 20°C. O intervalo de varredura dos experimentos foi de 20 a 80°C para a Sau_DacA⁸⁶ e de 20 a 65°C para os mutantes. A concentração de proteína utilizada em todos os experimentos foi de 48 μM . Nos ensaios realizados com os mutantes na ausência e na presença do substrato utilizou-se 250 μM de ATP e 250 μM de MnCl_2 . A aquisição da linha de base instrumental foi feita no mesmo intervalo de temperaturas preenchendo as celas de amostra e de referência com o tampão 20 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8, desgaseificado. Os termogramas adquiridos foram, então, normalizados pela concentração antes de analisados.

3.12 Dicroísmo Circular (CD).¹⁰¹⁻¹⁰³

3.12.1 Sau_DacA.

Para analisarmos o enovelamento da Sau_DacA⁸⁶ e possíveis modificações de sua estrutura secundária causadas pelas mutações sítio-dirigidas, experimentos de dicroísmo circular (CD) foram realizados no espectropolarímetro Jasco J-720. As medidas foram registradas em um intervalo de comprimento de onda de 200 ou 205 nm (dependendo da condição) a 260 nm e utilizando-se cubetas de quartzo de 1 mm de caminho óptico. Para os experimentos, 9,6 μM de Sau_DacA⁸⁶ em tampão 20 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8 foram utilizados. O espectro de CD resultante foi gerado por uma média de 8 leituras consecutivas.

A análise da estabilidade estrutural com relação à temperatura foi realizada variando-se a temperatura de 20 a 90 °C, mantendo-se todas as outras condições supracitadas.

3.12.2 Sau_YbbR.

Para analisarmos o enovelamento da Sau_YbbR, espectros de dicroísmo circular foram obtidos no espectropolarímetro Jasco J-720, em um intervalo de comprimento de onda de 195 a 240 nm, sendo os espectros gerados por uma média entre 8 leituras consecutivas. Para as mesmas foram utilizados 1 μ M de Sau_YbbR⁴⁵ em tampão 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 5% Glicerol, pH 7.5 e em cubetas de quartzo de 1 mm de caminho óptico.

3.12.3 Tratamento de dados e análise dos experimentos de CD

Os dados foram tratados no programa CDTTool¹⁰⁴ para eliminar interferências de ruído e subtrair os brancos de cada ensaio. Os espectros obtidos foram normalizados com relação à concentração molar e ao caminho óptico da cubeta, retornando dados em elipticidade molar. Esses dados foram graficados com o programa GraphPad Prisma 5.0.

A deconvolução espectral para quantificação das estruturas secundárias foi realizada no servidor BeStSel (Beta Structure Selection),¹⁰⁵ disponível no endereço <http://bestsel.elte.hu/>, o qual contém um banco de dados mais completo de proteínas com estruturas secundárias do tipo folha- β e do tipo hélice- α e folha- β coexistentes, comparativamente a programas já existentes como Dicroweb¹⁰⁶ e CDPro.¹⁰⁷⁻¹⁰⁸

3.13 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)⁸⁸

3.13.1 Sau_DacA

Com o objetivo de estudar a homogeneidade e o estado oligomérico da Sau_DacA⁸⁶ e mutantes na presença do substrato e do cofator, medidas de espalhamento dinâmico de luz (DLS) foram conduzidas em um Zetasizer μ V (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK), usando uma cubeta de quartzo ZMV1002 – 2 μ L.

Para verificar a formação ou não de aglomerados proteicos, foram realizadas medidas de DLS utilizando a proteína Sau_DacA⁸⁶ nativa e os mutantes T207A e T207E em três condições: a primeira continha somente a proteína em solução; a segunda continha a Sau_DacA⁸⁶ com o análogo de seu substrato, α,β -Me-ATP, para não ocorrer hidrólise durante o ensaio; a terceira continha a proteína, α,β -Me-ATP e o cofator que concede à Sau_DacA⁸⁶ sua forma ativa, o Mn^{2+} . Para cada uma dessas condições foram realizadas diluições seriadas, com a concentração

das proteínas variando desde 450 μM a 7 μM . As concentrações de $\alpha,\beta\text{-Me-ATP}$, e do cofator metálico foram mantidas fixas em 500 μM e 10 mM, respectivamente. Cada amostra foi preparada para um volume final de 10 μL . Antes de cada medida, as amostras foram centrifugadas por 15 min à 16.000 rpm. A temperatura foi fixada em 20 °C, com tempo de equilíbrio de 180 s. Os experimentos foram realizados em duplicata técnicas e duplicatas biológicas. Cálculos da distribuição de tamanho foram realizados no software Zetasizer Software for the Nano, APS and μV , versão 6.20 e os dados resultantes foram analisados com o programa GraphPad Prisma 5.0.

3.13.2 Sau_YbbR.

As medidas da Sau_YbbR foram conduzidas no mesmo equipamento citado na seção 3.13.1. Cada amostra contendo 1mg/mL de proteína foi preparada para um volume final de 10 μL . Antes de cada medida, as amostras foram centrifugadas por 15 min à 16.000 rpm. A temperatura foi fixada em 20 °C, com tempo de equilíbrio de 180 s. Os experimentos foram realizados em duplicata técnicas e duplicatas biológicas. Cálculos da distribuição de tamanho foram realizados no software Zetasizer Software for the Nano, APS and μV , versão 6.20 e os dados resultantes foram analisados com o programa GraphPad Prisma 5.0.

3.14 Ensaios de “Pull down” Sau_YbbR^{109, 110}

Tendo como objetivo buscar parceiros de interação do domínio YbbR foi realizado o ensaio de “Pull down” entre as construções truncadas da proteína Sau_YbbR e um extrato celular de cepas de *Staphylococcus aureus* 16^{††}. As reações foram montadas conforme mostrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Combinações proteicas utilizadas no ensaio de “Pull Down”.

Ensaio	Amostra imobilizada no Níquel	Presença de extrato celular SA16
1	-	SIM
2	His-SUMO-YbbR ⁴⁵	SIM
3	His-SUMO-YbbR ⁴⁷	SIM

Fonte: Elaborada pela autora.

^{††} O extrato de *Staphylococcus aureus* SA16 foi preparado pela Dr. Andrei Nicoli Gebieluca Dabul sob orientação da Prof. Dr. Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo.

Os diferentes ensaios foram utilizados para se verificar a ocorrência ou não de interação de quaisquer proteínas do extrato celular com a resina de níquel (Ensaio 1) e para verificar a possibilidade de interação dos domínios YbbR das proteínas truncadas YbbR⁴⁵ e YbbR⁴⁷ e algum parceiro de interação (Ensaio 2 e 3).

Para imobilização das construções das porções citoplasmáticas da Sau_YbbR na coluna de afinidade, 1 mL de cada construção de proteína à 1 mg/ml foram aplicados a 0,5 mL de resinas de afinidade por metal Ni-NTA-Agarose (Clontech) distintas, previamente equilibradas com o tampão 50 mM Tris, pH 7,5, 300 mM NaCl, 5 mM Imidazol, 5% glicerol. As resinas foram lavadas com 3 VC do mesmo tampão. Adicionou-se 1 mL de extrato celular a cada resina e incubou-se por 2 h sob leve agitação a 4 °C. Após esse período, o não-ligado foi eluído e a resina lavada com 3 VC de tampão 20 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl. A eluição das proteínas foi realizada através de 3 VC do mesmo tampão acima com a adição de 500 mM de imidazol. As amostras foram levadas a desnaturação térmica através de aquecimento por 10 minutos a 95 °C e analisadas através de SDS-PAGE 15%.

4 Resultados e Discussões

4.1 Sau_DacA

4.1.1 Análise de Bioinformática

Uma análise do genoma bacteriano de *S. aureus* verificou existência de apenas um gene que codifica uma diadenilato ciclase.³ A única diadenilato ciclase de *S. aureus*, a Sau_DacA, é uma proteína que pertence à família das diadenilato ciclase (DacA) com o maior número de representantes de proteínas com domínios DAC nos genomas bacterianos já analisados. Apenas recentemente a estrutura de uma proteína desta família foi disponibilizada na literatura,⁴³ contudo pouco se sabe em nível molecular, bioquímico e biofísico da síntese de c-di-AMP através de uma DacA.^{16,20,62}

Logo, para a realização do estudo do mecanismo de síntese de c-di-AMP pela DacA de *S. aureus*, a sequência de aminoácidos da Sau_DacA foi analisada através de diversos programas de bioinformática (seção 3.1.1), dos seguintes domínios/motivos: 1) domínio DAC (em laranja - Figura 24); 2) das sequências de aminoácidos dos motivos DGA (Asp-Gly-Ala) e RHR (Arg-His-Arg), responsáveis pela ligação e estabilização do substrato ATP à diadenilato ciclase conservadas (em azul - Figura 24); 3) dos aminoácidos que possivelmente coordenam o cofator (em verde - Figura 24); e 4) de hélices transmembranas (em vermelho - Figura 24).

Figura 24 - Análises de bioinformática. Arquitetura da Sau_DacA e construções das porções citoplasmáticas dessa proteína mostrando a predição de hélices transmembranas através do programa TMHMM V2.0 e localização do domínio DAC através do programa PFAM. Weblogo do alinhamento dos domínios diadenilato ciclase de enzimas com arquiteturas do tipo DacA,³ mostrando a conservação dos motivos DGA e RHR, responsáveis pela estabilização do ATP e motivo EE, responsável pela coordenação do Mn²⁺.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os dados obtidos pelas análises de bioinformática (Figura 24) permitiram o desenho de oligonucleotídeos para amplificar as ORFs correspondentes a cada construção das porções citoplasmáticas da Sau_DacA, como descrito na seção 3.1.2, com o intuito de se maximizar as chances de obtenção de uma proteína solúvel, homogênea e adequada para a cristalização e outros ensaios biofísicos e bioquímicos.

Outras características relevantes a serem avaliadas previamente são as características bioquímicas da proteína de interesse, visando à otimização dos possíveis tampões para solubilizar e estocar a proteína. A Tabela 4 abaixo sumariza alguns parâmetros importantes como massa molecular aparente e pI teórico das construções da Sau_DacA obtidos através de análise realizada pelo programa Protparam.

Tabela 4 - Análise bioinformática via software Protparam para obtenção dos caracteres bioquímicos da enzima Sau_DacA.

Construção proteica	Número de aminoácidos	Massa molecular aparente (Da)	Número de Cisteínas	pI teórico
Sau_DacA	269	30079,1	0	8,63
Sau_DacA ⁸⁶	184	20495,3	0	7,05
Sau_DacA ⁹⁸	172	19103,7	0	7,05
Sau_DacA ¹⁰⁶	164	18095,5	0	5,64

Fonte: Elaborada pela autora

4.1.2 Clonagem, expressão, purificação e estado oligomérico.

As ORFs de interesse, aqui denominadas como ORF86, ORF98 e ORF106, que codificam, respectivamente a Sau_DacA⁸⁶, Sau_DacA⁹⁸ e Sau_DacA¹⁰⁶ foram amplificadas a partir de DNA genômico de *Staphylococcus aureus* N315 (Figura 25A). As ORFs amplificadas (seção 3.1.2) foram subclonadas (seção 3.1.4) em vetor de propagação pGEM T-Easy (Promega) (Figura 25B) e posteriormente clonadas (seção 3.1.7) em vetor de expressão pSMT3^{††} (Figura 25C), entre os sítios das enzimas de restrição BamHI e XhoI. Após análise de sequenciamento das ORFs foi realizado um teste de expressão (seção 3.2.1) das proteínas de interesse (Figura 25D).

^{††} Vetor pSMT3 foi cedido pelo professor André Luis Berteli Ambrosio do Laboratório Nacional de Biociências – LNBio.

Figura 25 - (A) Amplificação dos genes a partir de DNA genômico: (MM) Padrão massas moleculares; (1) ORF86; (2) ORF98 e (3) ORF106. (B) Análise de restrição da subclonagem em vetor pGEM T-easy: (MM) Padrão massas moleculares; (1) ORF86; (2) ORF98 e (3) ORF106. (C) Análise de restrição da clonagem em vetor de expressão pSMT3: (MM) Padrão massas moleculares; (1) ORF86; (2) ORF98 e (3) ORF106. (D) Verificação da expressão das proteínas de interesse – Análise por gel SDS-PAGE 15%: (MM) Padrão massas moleculares; (1) Não-Induzido Sau_DacA,⁸⁶ (2) Induzido Sau_DacA,⁸⁶ (3) Não-Induzido Sau_DacA,⁹⁸ (4) Induzido Sau_DacA,⁹⁸ (5) Não-Induzido Sau_DacA,¹⁰⁶ (6) Induzido Sau_DacA,¹⁰⁶ respectivamente.

Fonte: Elaborada pela autora.

Verificada a expressão das proteínas de interesse, expressões em baixa escala (250 mL de meio de cultura LB) foram primeiramente realizadas (como descrito na seção 3.2.1) para analisarmos a solubilidade da proteína (dados não apresentados) e, assim, determinarmos um protocolo de expressão em *E. coli* (BL21) para obtenção das construções proteicas, em larga escala, conforme descrito na seção 3.2.2. Embora a proteína Sau_DacA⁹⁸ tenha sido expressa, ela se mostrou instável durante as etapas de purificação, sendo, portanto, descartada dos estudos seguintes.

Uma análise da pureza das proteínas após as etapas de purificação foi realizada através de SDS-PAGE 15% (Figura 26A e 26B) mostrando que as proteínas se encontravam puras e com peso molecular aparente muito próximo do valor do teórico (Tabela 4), ou seja, 20 kDa e 18 kDa para os monômeros de Sau_DacA⁸⁶ e Sau_DacA¹⁰⁶, respectivamente.

Figura 26 - Análise do protocolo de purificação e estado oligomérico. (A) Análise em SDS-PAGE- 15% da purificação da Sau_DacA⁸⁶: (MM) Padrão massas moleculares (1) Pellet; (2) Sobrenadante; (3) Sobrenadante após passar pela resina de afinidade; (4) Lavagem com tampão 20 mM Tris, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH8; (5) Eluição da Sau_DacA⁸⁶ com 10 mL de tampão 20 mM Tris, 300 mM NaCl; **(B) Análise em SDS-PAGE- 15% da purificação da Sau_DacA¹⁰⁶:** (MM) Padrão massas moleculares (1) Pellet; (2) Sobrenadante; (3) Sobrenadante após passar pela resina de afinidade; (4) Lavagem com tampão 20 mM Tris, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH8; (5) Eluição da Sau_DacA¹⁰⁶ com 10 mL de tampão 20 mM Tris, 300 mM NaCl; **(C) Cromatograma após Superdex75 10/300 de ambas construções.**

Fonte: Elaborada pela autora.

O estado oligomérico das proteínas foi analisado por cromatografia de exclusão molecular, que retornou volumes de eluição de 10,4 mL e 10,8 mL, correspondendo a massa molecular de aproximadamente 42 ± 3 kDa para a Sau_DacA⁸⁶ e de 38 ± 2 kDa para a Sau_DacA¹⁰⁶, indicando que ambas as construções se apresentam como dímeros em solução (Figura 26C). Esse resultado corrobora com os dados descritos na literatura para DacA de *Listeria monocytogenes*⁴³ e *B. subtilis* (Bsu_DacA),²⁰ onde dímeros em solução dessas proteínas foram capazes de condensar o ATP e, assim, sintetizar o c-di-AMP, diferentemente do observado para proteínas que também possuem o domínio DAC em sua arquitetura (Figura 4) associado a um domínio sinalizador ou de escaneamento de DNA.³ Bai et al. e Witte et al. estudaram diadenilato ciclases de *M. tuberculosis* (Mtu_DisA) e *Thermotoga maritima* (Tma_DisA), respectivamente, e mostraram que essas proteínas se apresentaram como octâmeros ativos em solução, permitindo, assim, a síntese de c-di-AMP.^{15,36} Logo,

dependendo dos domínios aos quais possam estar associadas, proteínas que possuem o domínio DAC podem apresentar diferentes estados oligoméricos e, portanto, mecanismos de síntese de c-di-AMP ligeiramente distintos.

4.1.3 Homogeneidade, estrutura secundária e estabilidade térmica

Através de medidas de espalhamento dinâmico de luz (DLS), pudemos obter informações em relação à homogeneidade das amostras, uma vez que estas medidas retornam a distribuição de populações, os tamanhos e massas de partículas que se encontram presentes nas soluções.

A deconvolução do correlograma obtido do experimento de DLS da Sau_DacA⁸⁶ mostrou baixa polidispersividade da proteína em solução, com raio hidrodinâmico e massa equivalente a uma proteína dimérica não-globular (Figura 27A). O gráfico de intensidade versus tamanho das moléculas (Figura 27B) evidencia a população única e monodispersa da Sau_DacA⁸⁶ em solução, condições propícias para ensaios de cristalização.

Figura 27 - (A) Dados de homogeneidade obtidos através da desconvolução dos correlogramas dos experimentos de DLS da proteína Sau_DacA⁸⁶ em solução. (B) Distribuição de tamanhos em um gráfico de intensidade obtida do experimento de DLS para verificação da homogeneidade das amostras de Sau_DacA⁸⁶.

Fonte: Elaborada pela autora.

Outra característica a ser avaliada para fins de cristalização de proteínas é o enovelamento das estruturas secundárias. Espectros de CD, na região do UV distante, são úteis para investigarmos o conteúdo e o tipo de estruturas secundárias de proteínas¹¹¹ (Figura 28A). Proteínas que contêm o domínio DAC possuem um enovelamento característico que contém tanto hélice- α quanto folhas- β ,^{16,38,43} logo poderíamos esperar que o espectro de CD da Sau_DacA⁸⁶ apresentasse características dessas duas estruturas secundárias.

Para efeitos de comparação, apresentamos na Figura 28A espectros de CD característicos de estruturas secundárias particulares de proteínas. O espectro da Sau_DacA⁸⁶ (Figura 28B) se assemelha com o espectro de hélice- α apresentado na Figura 28A (espectro 1). Com efeito, as duas bandas negativas em torno de 208 e 220 nm, associadas às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$, respectivamente, são típicas de espectros de CD de estruturas em hélices- α . No entanto, a larga banda observada em torno de 220 nm (Figura 28B) sugere a coexistência de outros tipos de estruturas secundárias como conformações em folhas- β antiparalelas, as quais têm como característica espectral uma banda negativa em torno de 215 nm associada à transição $n \rightarrow \pi^*$ (Figura 28A, espectro 2). A deconvolução do espectro de CD da Sau_DacA⁸⁶ através do servidor online BeStSel¹⁰⁵ forneceu um conteúdo de 49% de hélices- α e 10% de folhas- β antiparalelas, entre outras estruturas (Figura 28C).

Figura 28 - (A) Espectros de CD de polipeptídeos e proteínas representando estruturas secundárias: (1) α -hélice em preto; (2) folha- β antiparalela em vermelho; (3) estrutura desordenada em verde; (4) tripla hélice de colágeno em azul marinho e (5) colágeno desnaturado em ciano. (B) Espectro de CD na região do UV distante da construção citoplasmática Sau_DacA⁸⁶ em tampão 20 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8. (C) Dados resultantes da deconvolução dos espectros através do servidor online BeStSel.¹⁰⁵

Fonte: (A) Adaptada de GREENFIELD.¹¹¹; (B) e (C) Elaborada pela autora.

Dando sequência a nossos estudos de estabilidade estrutural realizamos ensaios de desnaturação térmica da Sau_DacA⁸⁶ por CD para verificar a influência da temperatura na estabilidade da estrutura secundária desta proteína. Os espectros de CD da Sau_DacA⁸⁶ em diferentes temperaturas são apresentados na Figura 29A, enquanto que a dependência térmica da elipticidade molar em 220 nm é mostrada na Figura 29B. Note que a construção

Sau_DacA⁸⁶ se mostrou estável até 40°C, quando se inicia a perda da estrutura secundária da proteína (Figuras 29B). A larga banda observada em torno de 218 nm nos espectros obtidos a partir de 60°C é típica de proteínas agregadas, conforme verificado por inspeção visual das amostras após os experimentos. Através dos dados de desenovelamento térmico (Figura 30B), sugerimos que este processo se constitui de apenas uma etapa de desnaturação e realizando um ajuste destes dados através de uma sigmóide, pudemos determinar a temperatura de desenovelamento da Sau_DacA⁸⁶ como $T_m = 52,6^\circ\text{C}$.

Figura 29 - (A) Espectros de CD referentes ao desenovelamento térmico da construção Sau_DacA⁸⁶ no intervalo de 20 a 90°C. (B) Curva de desenovelamento térmico obtido através dos espectros de Sau_DacA⁸⁶ em função da temperatura, no comprimento de onda de 208nm.

Fonte: Elaborada pela autora.

Outro método utilizado para se estudar o desenovelamento térmico da Sau_DacA⁸⁶ foi a calorimetria diferencial de varredura (DSC). O calorímetro de DSC mede trocas de calor que ocorrem durante o processo de desenovelamento estrutural de uma proteína em função da temperatura através da medida da diferença de calor entre a cela de referência (contendo tampão) e a cela de amostra (contendo proteína).⁸⁹ Os dados são representados em forma de um termograma que, após a subtração da linha de base (termograma do tampão) e normalização pela concentração de proteína, possibilita a aquisição de parâmetros termodinâmicos que caracterizam o desenovelamento térmico, tais como: T_m (temperatura na qual 50% das moléculas estão em um estado desenovelado), $\Delta T_{1/2}$ (inversamente proporcional à cooperatividade da transição) e ΔH_{cal} (obtido através da integração da área abaixo da curva e relacionada com a quantidade de calor necessária para interferir na função de uma proteína).¹¹²

A Figura 30 abaixo mostra os termogramas da Sau_DacA⁸⁶ na ausência e na presença de ATP+Mn²⁺. Através de uma triplicata de termogramas obtidos para ambas as amostras, foi

observado um pico de transição em $(53,5 \pm 0,2)^{\circ}\text{C}$ referente ao desenovelamento da proteína apo e em $(54,7 \pm 0,1)^{\circ}\text{C}$ na presença do ligante $\text{ATP}+\text{Mn}^{2+}$ (Figura 30). Ao serem retiradas do calorímetro, as amostras mostraram-se precipitadas, indicativo de que o processo de desnaturação térmica é irreversível¹¹³ para Sau_DacA⁸⁶

Figura 30 - Termogramas de DSC provenientes de uma triplicada de ensaios de desenovelamento térmico da Sau_DacA⁸⁶.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Tabela 5, apresentamos os parâmetros termodinâmicos característicos do desenovelamento térmico da proteína e obtidos da análise dos termogramas. Os maiores valores de T_m ($\Delta T_m \sim 1^{\circ}\text{C}$) e de ΔH_{cal} ($\Delta \Delta H_{\text{cal}} \sim 5 \text{ kcal/mol}$) apresentados pela proteína na presença de $\text{ATP}+\text{Mn}^{2+}$ comparados com a proteína apo indicam um aumento da estabilidade da construção da proteína nativa na presença do substrato.

Tabela 5 - Parâmetros termodinâmicos provenientes do desenovelamento térmico de cada construção citoplasmática da Sau_DacA.

Amostra	$T_m(^{\circ}\text{C})$	$\Delta T_{1/2} (^{\circ}\text{C})$	$\Delta H_{\text{cal}} (\text{kcal/mol})$
Sau_DacA ⁸⁶	$(53,5 \pm 0,2)$	$(3,1 \pm 0,1)$	$(65,7 \pm 2,9)$
Sau_DacA ⁸⁶ +ATP+Mn ²⁺	$(54,7 \pm 0,1)$	$(2,9 \pm 0,1)$	$(70,5 \pm 5,8)$

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.4 Ligação do ATP, atividade, especificidade do cofator, mecanismo de ligação do cofator

Tendo um indicativo que o domínio DAC de uma proteína da família DacA poderia ser um dímero, ou seja, um estado oligomérico distinto dos já apresentados por outras proteínas que contém o domínio DAC, além do fato de que a diadenilato ciclase de *Staphylococcus aureus* encontra-se ativa e é essencial para este organismo,¹⁶ isso nos instigou a estudar mais detalhadamente o mecanismo de síntese de c-di-AMP pela Sau_DacA. Para este estudo, utilizamos a construção Sau_DacA⁸⁶ por se tratar daquela com maior conteúdo da porção citoplasmática.

Ensaio de ligação do ATP à Sau_DacA⁸⁶ realizados com o auxílio da técnica de fluorescência polarizada (Figura 31A) revelaram que esta proteína possui uma afinidade muito baixa pelo ATP na ausência de um cofator ($k_d = 41 \pm 8 \mu\text{M}$). Logo, ensaios de ligação do ATP na presença de diferentes íons metálicos foram realizados (Figura 31A) e as constantes de dissociação (K_d) de cada interação foram determinadas através de um ajuste não-linear dos dados obtidos (Figura 31B). Os resultados mostraram que, analogamente ao encontrado por Bai et al. para Mtu_DisA,³⁶ a ligação do ATP nos sítios da Sau_DacA⁸⁶ necessita da presença de um íon metálico divalente como cofator (Figura 31B). A afinidade Sau_DacA⁸⁶ pelo ATP é significativamente maior na presença de Mn^{+2} ($k_d = 8 \pm 1 \mu\text{M}$), mas apenas ligeiramente aumentada na presença dos íons de Co^{+2} ($k_d = 27 \pm 1 \mu\text{M}$) e Fe^{+2} ($k_d = 30 \pm 3 \mu\text{M}$), comparativamente à afinidade encontrada na ausência destes íons metálicos. Interessantemente, Mg^{+2} e Zn^{+2} não aumentam a afinidade da proteína pelo ATP de maneira estatisticamente relevante ($k_d = 37 \pm 11 \mu\text{M}$ e $k_d = 38 \pm 5 \mu\text{M}$, respectivamente), ao passo que íons de cálcio provocam efeito contrário, ou seja, diminuem a afinidade da proteína pelo nucleotídeo. Já é bem conhecido que íons de cálcio podem inibir ciclases através de ligação no sítio de ligação do cofator efetivo da proteína de interesse através de impedimento estérico de coordenação do cofator no sítio de ligação ou em sítios alostéricos de regulação de atividade da proteína.¹¹⁴⁻¹¹⁸ Logo como não se tem conhecimento da existência de sítios alostéricos de regulação das diadenilato ciclases, até o momento, podemos sugerir que o íon cálcio diminui a afinidade da Sau_DacA⁸⁶ pelo ATP através de impedimento estérico do sítio de coordenação do cofator efetivo da Sau_DacA⁸⁶.

Figura 31 - (A) Medidas características do sinal de fluorescência polarizada do BODIPY® TR-ATP previamente incubado com Sau_DacA⁸⁶ na ausência e na presença de diferentes cofatores metálicos. (B) Constantes de dissociação (K_d) obtidas através do ajuste não-linear das curvas em (A).

Fonte: Elaborada pela autora.

Sabendo-se que a ligação do cofator manganês aumenta a afinidade da Sau_DacA⁸⁶ pelo ATP, realizamos um ensaio preliminar de atividade da proteína na ausência e na presença daquele íon. Os dados provenientes deste ensaio mostram um pico inicial (P1) em torno de 2 min de tempo de retenção, característico de moléculas polares (Figura 32). Ao compararmos o cromatograma das reações com o do padrão do ATP, pudemos inferir que este primeiro pico está associado ao ATP remanescente da reação. Um segundo pico (P2) pode ser observado no ensaio de atividade contendo manganês (Figura 32). Este pico apresenta um tempo de retenção de 9,315 min e aparece após o gradiente de metanol atingir 70%, ou seja, é um pico característico de moléculas polares. Comparando este pico àquele obtido do cromatograma do nucleotídeo puro, pudemos inferir a ocorrência de síntese do c-di-AMP pela Sau_DacA⁸⁶ apenas na presença de Mn²⁺. A síntese do nucleotídeo foi confirmada por espectrometria de massas (dado não apresentado^{§§}).

^{§§} Realizado em colaboração com o Dr. Edson Crusca.

Figura 32 - Análise por HPLC da síntese do c-di-AMP pela Sau_DacA⁸⁶ em função do tempo em pH 8.
Fonte: Elaborada pela autora.

Sabendo-se que a Sau_DacA⁸⁶ é capaz de produzir c-di-AMP, realizamos então uma reação em grande volume com o intuito de se obter grande quantidade deste nucleotídeo. O c-di-AMP obtido dessas reações foi purificado em coluna de fase reversa C18 com maior volume de resina, conforme descrito na seção 3.7.2. Assim realizamos uma curva de calibração do equipamento da coluna C18, conforme mostrado da Figura 28. Através de regressão linear dos dados, obtivemos os coeficientes angular ($b = 2,06 \times 10^{-6} \mu\text{M}/\text{u.a.}$) e linear do gráfico ($a = 0,0 \mu\text{M}$). Desta maneira conseguimos associar a área integrada do pico de c-di-AMP, A (Figura 33), em cada curva, com a concentração de nucleotídeo, [c-di-AMP], produzida através da equação $[\text{c-di-AMP}] = 2,06 \times 10^{-6} * A$.

Figura 33 - Curva de calibração do HPLC para associação de área de integração de pico com concentração de c-di-AMP.

Fonte: Elaborada pela autora.

Uma vez de posse da curva de calibração, pudemos quantificar o c-di-AMP produzido nos ensaios de atividade enzimática da Sau_DacA⁸⁶. Estes estudos foram realizados para investigarmos o cofator (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} e Zn^{2+}) e pH (de 7,0 a 9,0) ótimos para a síntese do nucleotídeo. Conforme ilustrado na Figura 34A, verificou-se que a máxima produção de nucleotídeo pela Sau_DacA⁸⁶ está associada especificamente ao cofator Mn^{2+} e o pH ótimo da síntese ocorre em torno de 8,0 (Figura 34B).

Figura 34 - (A) Testes de atividade da Sau_DacA⁸⁶ com ATP como substrato e (A) na presença de diferentes cofatores em pH 8,0, ou (B) em diferentes pHs, ambos na presença de Mn^{2+} .

Fonte: Elaborada pela autora.

Após otimização do cofator e do pH, a determinação da concentração do íon metálico e da temperatura se faz necessária. Conforme mostrado na figura abaixo, a concentração ideal de Mn^{2+} varia entre 5 e 100 mM – (Figura 35A), ao passo que o intervalo de temperatura ideal varia entre 30 e 40 °C (Figura 35B), para a síntese de c-di-AMP através das construções citosólicas da Sau_DacA.

Figura 35 - Dependência da atividade da Sau_DacA⁸⁶ com a (A) concentração de Mn^{2+} , e (B) temperatura. ATP foi utilizado como substrato.

Fonte: Elaborada pela autora.

Ensaio de cinética enzimática^{***} revelaram uma proteína com um comportamento enzimático do tipo Michaelis–Menten (Figura 36). Através de um ajuste não-linear por uma hipérbole representativa de uma curva de Michaelis–Menten, pudemos determinar a constante de afinidade K_M . O K_M encontrado para a Sau_DacA⁸⁶ foi de $28,6 \pm 4,7 \mu\text{M}$, o que caracteriza uma proteína com baixa afinidade pelo substrato se comparada ao K_M de $0,22 \pm 0,03 \mu\text{M}$ obtido para a Tma_DisA. No entanto, esse comportamento pode ser resultado da ausência do domínio transmembrana da construção da Sau_DacA⁸⁶, o qual deve exercer papel relevante na regulação da atividade da ciclase, como visto por Mehne et al.,²⁰ uma vez que este domínio pode interagir com o domínio N-terminal de proteínas YbbR, aumentando a atividade da Sau_DacA (descrito na seção 1.2.1).

Figura 36 - Cinética enzimática da Sau_DacA⁸⁶ com ATP como substrato e Mn^{2+} como cofator, com ajuste dos dados por uma hipérbole representativa de uma curva de Michaelis-Menten.

Fonte: Elaborada pela autora.

Apesar de sabermos que a Sau_DacA encontra-se ativa e capaz de condensar duas moléculas de ATP em um nucleotídeo cíclico, outra questão em aberto seria o mecanismo desta reação. Para explorar melhor esta questão, fizemos uso da técnica de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) para monitorarmos a interação do Mn^{2+} com Sau_DacA⁸⁶ e com o análogo de ATP com hidrólise lenta, $\alpha,\beta\text{-Me-ATP}$, e para detectar a ocorrência ou não da formação de complexos $\text{Mn}^{2+}\text{-ATP}$ antes da ligação do nucleotídeo à proteína.

O Mn^{2+} apresenta um sinal de RPE bastante característico quando livre em solução. O átomo de ^{55}Mn possui $Z=25$ elétrons, portanto seu estado fundamental corresponde ao orbital

^{***} Ensaio de cinética enzimática realizado segundo protocolo estabelecido pelo aluno de mestrado Raphael Meneghello.

$3d^5$, ou seja, possui spin eletrônico $S = 5/2$. O acoplamento hiperfino entre o spin eletrônico e seu spin nuclear não-nulo ($I = 5/2$) é responsável pelas 6 linhas características do espectro de RPE do Mn^{2+} em solução. As 6 linhas são igualmente espaçadas e de mesma intensidade.¹¹⁹ Entretanto, quando ligados a proteínas ou ligantes, os tempos de relaxação do Mn^{2+} podem aumentar, levando a um alargamento do espectro ou até mesmo supressão do sinal.¹¹⁹ Desta forma, podemos medir a intensidade do espectro de RPE e relacioná-la à porcentagem de manganês livre em solução,¹²¹⁻¹²³ sendo esta a característica utilizada para investigar a ligação dos íons Mn^{2+} ao α,β -Me-ATP e à Sau_DacA⁸⁶ (Figura 37A).

A Figura 32A mostra os espectros de RPE de solução de Mn^{2+} na ausência e na presença da proteína e do análogo de ATP com hidrólise lenta. Como esperado, o espectro do íon livre em solução apresentou 6 linhas igualmente espaçadas e de mesma intensidade (cinza claro). Colocando a proteína nativa em contato com o íon metálico na ausência de α,β -Me-ATP, observamos que o sinal espectral do Mn^{2+} praticamente não teve alteração. Já a incubação do metal com ATP suprimiu grande parte do sinal, demonstrando que a formação do complexo α,β -Me-ATP- Mn^{2+} ocorre em solução. Já a adição da enzima Sau_DacA⁸⁶ à solução contendo o complexo α,β -Me-ATP- Mn^{2+} diminuiu ainda mais a quantidade de manganês livre (Figura 37A), registrando menos de um quarto da porcentagem do sinal obtido inicialmente (Figura 37B), indicando a formação de um complexo reacional e a ocorrência de interação do metal e do substrato com a enzima.

Figura 37 - Ensaios de RPE de onda contínua à 37 °C. (A) Espectros de RPE do Mn^{2+} na ausência e na presença da Sau_DacA⁸⁶ e do α,β -Me-ATP. (B) Gráficos de barras representando a perda de intensidade do sinal paramagnético do Mn^{2+} na presença da Sau_DacA⁸⁶, do α,β -Me-ATP ou de ambos Sau_DacA⁸⁶ + α,β -Me-ATP comparada com o sinal do íon livre em solução. As linhas pontilhadas em cinza servem como guias para comparação do sinal de Mn^{2+} na presença de α,β -Me-ATP sem e com Sau_DacA⁸⁶.

Fonte: Elaborada pela autora.

Analisados em conjunto os resultados dos ensaios de RPE e os dados de ligação do ATP com Sau_DacA⁸⁶ dos ensaios de fluorescência polarizada, demonstramos a necessidade do Mn^{2+} para a ligação do ATP ao sítio ativo da Sau_DacA⁸⁶. A grande quantidade de Mn^{2+} livre em solução contendo a Sau_DacA⁸⁶ sugere que este íon é incapaz de se ligar na proteína sem se ligar ao ATP primeiramente (Figure 37B). Assim, podemos inferir que o substrato da diadenilato ciclase que estudamos é constituído pelo complexo ATP- Mn^{2+} e não unicamente do nucleotídeo.

4.1.5 Cristalização e resolução estrutural

Para elucidar o mecanismo de síntese de c-di-AMP através da Sau_DacA em nível atômico e molecular, a estrutura atômica desta proteína foi resolvida por cristalografia de raios-X. As triagens iniciais de cristalização foram feitas pelos métodos padrões de gota sentada utilizando as soluções precipitantes comerciais. Os primeiros cristais apareceram nos ensaios realizados com a construção Sau_DacA⁸⁶ na condição contendo 0,2 M $LiSO_4$, 0,1 M Hepes (pH 7,5), 25% PEG 3350 após cerca de 24 h, apresentando-se em formatos de agulha na superfície da gota de cristalização e em um denso aglomerado de agulhas na parcela mais profunda da gota (Figura 38A).

O crescimento de cristais para otimização desta condição de cristalização foi realizado numa placa para gota suspensa variando as concentrações do agente precipitante, do pH e adicionando $MgCl_2$. Cristais adequados foram obtidos na condição 0,1 M Tris, 0,2 M $LiSO_4$, 21% PEG3350, 2 mM $MgCl_2$, pH 8. Os resultados obtidos seguem na Figura 38B, onde podemos verificar que os cristais cresceram após 3 dias no formato de agulhas, sendo estas com tamanho variando de 0,1 a 0,4 mm.

Figura 38 - (A) Cristais de Sau_DacA⁸⁶ obtidos na condição G4 da triagem inicial de cristalização através do Kit Index HT. (B) Cristais de Sau_DacA⁸⁶ obtidos após otimização da condição G4 Kit Index HT, gerando cristais adequados para difração na condição de cristalização de 0.1M Tris, 0.2M LiSO₄, 21% PEG3350, 4 mg/ml de proteína, 2 mM MgCl₂, pH 8.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os cristais foram levados a ensaios de difração como descrito na seção 3.4. Primeiramente, a estrutura da construção citoplasmática Sau_DacA⁸⁶ foi determinada a uma resolução de 2,2 Å, cristalizada no grupo espacial ortorrômbico P2₁2₁2₁, com duas moléculas na unidade assimétrica. A estrutura cristalográfica foi resolvida através de dispersão anômala em um comprimento de onda (SAD) utilizando o sinal de iodo incorporado no cristal por *soaking*. O modelo final apresentou uma boa geometria onde foram observados 98,3% de resíduos em regiões favoráveis e nenhum resíduo em regiões não permitidas do diagrama de Ramachandran (Tabela 6). O refinamento da estrutura foi realizado até a obtenção de $R_{factor} = 19,5\%$ e $R_{free} = 25,8\%$.

Seguindo os ensaios de cristalização, através de *soaking* dos cristais com α,β -Me-ATP acrescido de manganês (Mn²⁺) e a partir da difração de raios-X dos mesmos (seção 3.4), foram determinadas as estruturas cristalográficas da Sau_DacA⁸⁶ complexada a seus ligantes através de substituição molecular, utilizando a estrutura da proteína em sua forma apo como modelo.

Tabela 6 - Estatísticas da coleta de dados dos cristais obtidos com as proteínas provenientes das porções citoplasmáticas da Sau_DacA. (Valores entre parênteses são para a faixa mais alta resolução).

Estatísticas da coleta de dados				
Conjunto de dados	Sau_DacA⁸⁶ Nativa	Sau_DacA⁸⁶ α,β-Me-ATP	Sau_DacA⁸⁶ α,β-Me-ATP+ Mn^{2+}	Sau_DacA⁸⁶ N116E
Comprimento de onda (Å)	1,54	1,54	1,54	1,459
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Parâmetros de rede (Å)	a = 44,1; b = 80,7; c = 95,7; $\alpha=90,0^\circ; \beta=90,0^\circ;$ $\gamma=90,0^\circ$	a =44,2; b = 82,7; c = 94,7; $\alpha=90,0^\circ; \beta=90,0^\circ;$ $\gamma=90,0^\circ$	a = 44,1; b = 80,0; c= 97,2 $\alpha=90,0^\circ; \beta=90,0^\circ;$ $\gamma=90,0^\circ$	a = 37,8; b = 77,5; c= 90,0 $\alpha=90,0^\circ; \beta=90,0^\circ;$ $\gamma=90,0^\circ$
Faixa de Resolução (Å)	47,8-2,2 (2,2)	47,5 -2,6 (2,6)	43,1-2,8 (2,8)	50,0 – 2,0 (2,0)
Reflexões Únicas	33614(5284)	11262 (1634)	8231 (1125)	18677 (2911)
Completeza (%)	99,3(96,3)	96,9 (89,5)	97,3 (85,3)	99,6 (98,0)
I/ σ(I)	19,1(2,4)	18,1 (2,0)	18,3 (2,4)	15,1 (3,9)
R_{meas}	6,9 (82,7)	7,9 (79,6)	9,7 (74,7)	10,8 (62,5)
Redundância	5,6(5,4)	4,9 (4,7)	8,4 (7,0)	7,2 (7,2)
Estatísticas de Refinamento				
R_{work} / R_{free} (%)	19,5 / 25,8	21,1/27,4	21,1/27,1	18,0 / 22,8
No. de átomos				
Proteína	2355	2458	2466	2372
Água	184	8	20	129
Rmsd				
Ligações (Å)	0,009	0,009	0,008	0,008
Ângulos (°)	1,092	1,306	1,159	1,242
Ramachandran (%)				
Favoráveis	97,3	97,0	97,4	95,7
Permitidas	2,7	3,0	2,6	3,6
Não Permitidas	0,0	0,0	0,0	0,7

Fonte: Elaborada pela autora.

Ensaios de otimização da condição de cristalização 0,1 M Tris, 0,2 M LiSO₄, 21% PEG3350, 2mM MgCl₂, pH 8, com uma mutação sítio dirigida na região da interface dimérica da proteína (N166E), permitiram a obtenção de cristais adequados para difração (Figura 39). Esses cristais foram levados para difração e a estatística de coleta de dados está sumarizada na Tabela 6.

Figura 39 - Cristais de N166E_Sau_DacA⁸⁶ obtidos após otimização da condição G4 Kit Index HT, gerando cristais adequados para difração na condição de cristalização de 0,1 M Tris, 0,2 M LiSO₄, 21% PEG3350, 4 mg/ml de proteína, 2 mM MgCl₂, pH 8.
Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.6 Estudo da estrutura e função

Estrutura da Sau_DacA: enovelamento e sítio ativo.

As estruturas das porções citoplasmáticas da Sau_DacA apresentaram-se como dímeros em cada unidade assimétrica, sendo que cada subunidade da molécula dimérica contém um único domínio proteico enovelado em um sanduíche α/β (contendo 5 hélices- α e 7 fitas- β antiparalelas) característico do domínio DAC de outras ciclases, (Figura 40).

Figura 40 - Sau_DacA mostrou-se como um dímero em cada unidade assimétrica, sendo que cada monômero de Sau_DacA encontra-se enovelado em um sanduíche α/β característico do domínio DAC (em destaque no círculo preto).

Fonte: Elaborada pela autora.

Uma análise da estrutura primária da Sau_DacA⁸⁶ e da Lmo_DacA (diadenilato ciclase A com estrutura disponível no PDB 4RV7) revelou uma identidade de 58% entre estas

proteínas. Logo, o enovelamento característico do domínio DAC, constituído de um feixe de fitas- β antiparalelas central ($\beta 1 - \beta 7$) envolto por 5 hélices ($\alpha 1 - \alpha 5$), mostrou-se conservado com um desvio das cadeias principais (RMSD) de 0,62 Å quando comparamos os monômeros de Sau_DacA⁸⁶ e Lmo_DacA (Figura 41).

Figura 41 - Sobreposição dos monômeros de Sau_DacA⁸⁶ e Lmo_DacA com RMSD = 0,62 Å.
Fonte: Elaborada pela autora.

Analisando as sequências da Sau_DacA⁸⁶, Bce_DacB e da Tma_DisA, verificamos uma identidade de 44% entre as duas primeiras proteínas e de 26% entre Sau_DacA⁸⁶ e Tma_DisA. Sobrepondo os domínios DAC destas proteínas, verificamos que o enovelamento característico do domínio DAC se mostrou conservado, com um desvio das cadeias principais (RMSD) de 2,72 Å entre a Sau_DacA⁸⁶ e a Tma_DisA (Figura 42A) e de 0,76 Å entre a Sau_DacA⁸⁶ e a Bce_DacB (Figura 42B).

Figura 42 - (A) Sobreposição dos monômeros de Sau_DacA⁸⁶ e Tma_DisA, cujo RMSD = 2,72 Å. (B) Sobreposição dos monômeros de Sau_DacA⁸⁶ e Bce_DacB, cujo RMSD = 0,76 Å. (C) Sobreposição dos monômeros de Sau_DacA⁸⁶, Bce_DacB e Tma_DisA, onde não podemos visualizar mudanças conformacionais no sítio de ligação do ATP (destacado com os círculos pontilhados em preto). (D) Uma rotação de 90° da sobreposição em (C) mostra a região do sítio, destacada com os círculos pontilhados preto, com enovelamento conservado – exceto para DisA que possui regiões flexíveis (os loops) em conformação distinta.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como ilustrado nas Figuras 42C e 42D, existem diferenças de enovelamento locais entre essas proteínas. Nos *loops* que ligam a $\beta 4$ à $\alpha 4$ e a $\alpha 3$ à $\beta 3$ (onde não visualizamos a hélice- α presente na estrutura da Lmo_DacA), responsáveis por formar o bolsão onde se encontra o sítio de ligação do ATP e por sua estabilização neste local, identifica-se tamanho distinto dos loops, o que pode interferir em sua conformação (Figura 42D).

Essas diferenças entre as estruturas da Sau_DacA⁸⁶, Bce_DacB e da Tma_DisA parecem não interferir na atividade destas proteínas, uma vez que todas ligam ATP e são ativas em solução, como mostram os resultados apresentados na seção 4.1.3 e os trabalhos de Mehne et al.^{20,38} e de Witte et al.¹⁵ No entanto, a Tma_DisA mostrou ter uma afinidade maior pelo ATP quando comparada as demais proteínas. Já descrevemos na seção 4.1.3, contudo,

que a menor afinidade da Sau_DacA pelo nucleotídeo pode estar relacionada ao fato de que esta proteína esteja truncada, ou seja, sem o domínio de membrana, o qual aparentemente está associado à sinalização de aumento e diminuição de síntese de nucleotídeo através de interação proteína-proteína com as proteínas do tipo YbbR (seção 1.3 e Mehne *et al.*^{20,38}).

A obtenção da estrutura com os ligantes α,β -Me-ATP e Mn^{2+} nos permitiu localizar o bolsão raso na estrutura da Sau_DacA⁸⁶ (Figura 43A), o qual se encontra igualmente posicionado nas estruturas de Lmo_DacA, Tma_DisA e Bce_DacB (Figura 43B), segundo análises realizadas via a ferramenta online CONSURF (disponível em: <<http://CONSURF.tau.ac.il/>>).^{84,124}

Figura 43 - (A) Sau_DACA⁸⁶ possui dois sítios para ligação de ATP, sendo cada um localizado em uma subunidade da proteína. (B) O ATP se encontra ligado em um bolsão raso conservado quando comparado com a estrutura do domínio DAC de proteínas análogas através da ferramenta online CONSURF.

Fonte: Elaborada pela autora.

Neste bolsão hidrofóbico, o ATP pode se ligar através dos motivos característicos e conservados do domínio DAC (Figura 44A, 44B e 44C): DGA e RHR (assinalados em azul) e alguns aminoácidos conservados da mesma região (assinalado em laranja). O motivo DGA encontra-se localizado no *loop* que liga a $\alpha 3$ e $\beta 3$, onde o resíduo D176 estabiliza a ribose do substrato através de interação por pontes de hidrogênio. O motivo RHR foi localizado no início de $\alpha 4$, onde os resíduos R208 e H209 estabilizam o terceiro e o segundo fosfato, respectivamente, também através de interação por ligações de hidrogênio. O resíduo Y192 estabiliza o anel da adenina através de interação π -stacking. (Figura 44D)

Figura 44 – (A) Weblogo dos motivos DGA e RHR nas diadenilato ciclase A. (B) Weblogo dos motivos DGA e RHR nas diadenilato ciclase B. (C) Weblogo dos motivos DGA e RHR nas DNA integrity scanning. (D) Resíduos que estabilizam o ATP no sítio ativo. Em azul, os resíduos dos motivos DGA e RHR e em laranja, a Y192 conservada que interage indiretamente com o nucleotídeo. Em verde, os resíduos E228, E229 e H175 conservados que coordenam o manganês (em magenta).

Fonte: Elaborada pela autora.

Apesar de apresentarem identidade restrita entre os resíduos responsáveis por reconhecer o ATP no bolsão hidrofóbico (sinalizado em azul na Figura 44A, 44B e 44C), Tma_DisA e Sau_DacA⁸⁶ apresentam algumas diferenças relevantes em relação à coordenação do ATP no sítio de ligação e aos resíduos essenciais responsáveis pela coordenação do cofator na estrutura de Sau_DacA⁸⁶ (Figura 45A, 45B e 45C).

Uma comparação entre a estrutura da Sau_DacA⁸⁶ (Figura 45D) através da sobreposição desta estruturas com a da diadenilato ciclase de *Thermotoga maritima* na presença de ATP (Figura 45E) mostrou uma diferença na disposição do ATP nos sítios destas proteínas, havendo uma pequena torção no posicionamento do ATP neste sítio. Esta conformação distinta do ATP (Figura 45E) pode estar associada ao diferente enovelamento da região que conecta $\alpha 3$ à $\beta 3$ e sua aparente alta flexibilidade na estrutura da Sau_DacA⁸⁶. O cofator de Sau_DacA⁸⁶ se encontra coordenado pelo resíduo E229, conservado nas sequências de DacAs e DacBs (Figura 45A e 45B), e pelos fosfatos do ATP, não apresentando a mesma coordenação na Tma_DisA (não se tem relatos de estrutura destas proteínas com cofatores), uma vez que os resíduos R261 e M73 na estrutura de Tma_DisA ocupam, respectivamente, a mesma posição dos resíduos E229 e H175 na estrutura de Sau_DacA⁸⁶ (Figura 45E). Há, ainda, a ocorrência do deslocamento dos fosfatos e, consequentemente, do sítio de

coordenação do cofator para uma região da estrutura da Tma_DisA um pouco distinta da região de coordenação do cofator na Sau_DacA⁸⁶, conforme ilustrado na Figura 45E.

Figura 45 - (A) Weblogo mostrando a diferença no provável sítio de ligação com Mn^{2+} nas diadenilato ciclase A. (B) Weblogo mostrando a diferença no provável sítio de ligação com Mn^{2+} nas diadenilato ciclase B. (C) Weblogo mostrando a diferença no provável sítio de ligação com Mn^{2+} nas DNA integrity scanning. (D) Os resíduos de interação com ATP, R208 e H209, e com o metal estão destacados. As coordenações com o íon Mn^{2+} (magenta) estão mostradas em pontilhado preto. (E) Sobreposição estrutural de DacA com DisA destacando a diferença dos resíduos que interagem com o Mn^{2+} (particularmente R261 no lugar de E229) e conformações distintas da molécula de ATP no sítio ativo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os motivos DGA e RHR de todas as diadenilato ciclases já estudadas são altamente conservados (Figura 24) e essenciais para a atividade das ciclases.^{15,36,62} No entanto, é notório que nem todos esses aminoácidos estão coordenando diretamente ao substrato ou ao cofator (Figura 44). Sendo assim, para determinar a relevância destes dois motivos e dos resíduos responsáveis pela ligação do ATP e pela coordenação do Mn^{2+} à atividade da Sau_DacA⁸⁶, cada resíduo foi mutado para uma alanina ou outro aminoácido com carga distinta do resíduo original. Os mutantes resultantes foram D176A, R208A, H209A, E228A, E229A e EE228:229RR.

As mutações dos resíduos D176, R208 e H209 (Figura 46A), que estabilizam o ATP no sítio ativo, causaram grande impacto na atividade da Sau_DacA⁸⁶, uma vez que todas as mutações singulares destes resíduos resultaram numa diminuição da afinidade do substrato à

proteína (Figuras 46B e 46C), inibindo, consequentemente, a síntese de c-di-AMP (Figura 46D). Logo, todos os resíduos envolvidos na ligação do ATP se mostraram essenciais para a atividade da Sau_DacA⁸⁶, portanto, as presentes alterações desses resíduos podem causar a interrupção da produção de moléculas de sinalização.

Figura 46 – (A) Estrutura da Sau_DacA destacando os aminoácidos mutados. (B) Ensaio de FP com mutantes do sítio ativo na presença do substrato e na presença e ausência de Mn²⁺. (C) Ensaio de RPE a 37°C. As linhas pontilhadas vermelhas servem como guias para comparação do sinal de Mn²⁺ na presença de α,β-Me-ATP sem e com Sau_DacA⁸⁶ e com mutantes do sítio ativo. (D) Ensaio de atividade dos mutantes do sítio ativo da Sau_DacA⁸⁶. As barras representam concentração de c-di-AMP detectada em cada triplicata de reação com suas respectivas margens de erro.

Fonte: Elaborada pela autora.

Esse mesmo comportamento de diminuição da atividade da Sau_DacA⁸⁶ foi observado por mutações dos resíduos responsáveis pela estabilização do íon de manganês no sítio ativo (Figura 47A). Com exceção do mutante E228A, todas as outras mutações (E229A e EE228:229RR) diminuíram a afinidade do substrato à proteína (Figuras 47B e 47C), interferindo, pois, na síntese de c-di-AMP (Figura 47D). Alterações na coordenação do manganês prejudicam ligação do complexo ATP-Mn²⁺ no sítio ativo. Logo se o ATP não permanece no sítio de ligação não ocorre o ataque nucleofílico pela H209 no fosfato gama. Como resultado, a síntese de c-di-AMP é significativamente prejudicada (Figura 47D). Este

comportamento não ocorre com o E228, uma vez que sua participação na coordenação do manganês é menor do que a do E229, pois o seu campo de coordenação se encontra virado para o lado oposto àquele onde se encontra o íon de manganês (Figura 47A). Desta forma, o resíduo E228 não exerce influência relevante na atividade enzimática de proteína.

Figura 47 - (A) Estrutura da Sau_DacA destacando os aminoácidos mutados. (B) Ensaio de FP com mutantes do sítio de coordenação do Mn²⁺ na presença do substrato e na presença e ausência de Mn²⁺. (C) Ensaio de RPE a 37°C. As linhas pontilhadas vermelhas servem como guias para comparação do sinal de Mn²⁺ na presença de α,β-Me-ATP sem e com Sau_DacA⁸⁶ e com mutantes do sítio de coordenação do Mn²⁺. (D) Ensaio de atividade dos mutantes do sítio de coordenação do Mn²⁺ da Sau_DacA⁸⁶. As barras representam concentração de c-di-AMP detectada em cada triplicata de reação com suas respectivas margens de erro.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados apresentados acima mostram que mutações singulares dos resíduos D176, R208, H209 e E229 incapacitam a Sau_DacA⁸⁶ de sintetizar o c-di-AMP, sugerindo, pois, que estes resíduos são essenciais para a ligação de ATP e para a atividade da diadenilato ciclase Sau_DacA⁸⁶.

Relevância da interface de dimerização encontrada na estrutura cristalográfica da Sau_DacA

Pouco se sabe sobre o estado oligomérico das diversas famílias de diadenilato ciclases e os estudos realizados com algumas proteínas que possuem o domínio DAC descrevem as diadenilato ciclases com estados oligoméricos distintos entre si. Tal fato encontra-se associado à existência de diferentes arquiteturas de proteínas-DAC, ou seja, o domínio DAC ser encontrado associado a diversos domínios sensores e reguladores, os quais proporcionam às proteínas-DAC a capacidade de se organizar estruturalmente de maneiras distintas.

As proteínas ortólogas Mtu_DacA,³⁶ Tma_DisA¹⁵ e Bsu_DisA,¹⁵ pertencentes a família DisA e primeiras proteínas com esse domínio a serem estudadas, foram caracterizadas como octâmeros ativos em solução. O estado oligomérico apresentado por estas proteínas pode ser recuperado em sua forma cristalina através de análises de simetria da rede cristalina da Tma_DisA (Figura 48A). Estes octâmeros estão organizados primeiramente como tetrâmeros, estabilizados pelo domínio *linker* (assinalado em azul na Figura 48A), e então organizados como octâmeros através dos domínios DAC (assinalado em laranja na Figura 48A) via interação similar a da interface de dimerização observada na estrutura da Sau_DacA. Apesar das diferenças na constituição de aminoácidos (Figura 48B), a interface de estabilização aparenta ser a responsável pela formação de dímeros de domínios DAC, uma vez que a mesma região de interação é constituída de aminoácidos altamente conservados dentre as proteínas de cada subfamília de proteínas-DAC (Figura 48C).

Figura 48 - (A) Modelos de dímero, octâmero e hexâmero propostos, respectivamente, para a Sau_DacA, Tma_DisA e Bce_DacB. (B) Weblogo do alinhamento dos domínios diadenilato ciclase de enzimas com arquiteturas do tipo DacA, mostrando conservação dos aminoácidos da região da interface de dimerização encontrada em Sau_DacA⁸⁶ e muito parecida para DacA e DacB, sendo que ambas se distinguem da conservação de aminoácidos de DisA. (C) A análise realizada no programa CONSURF mostra que a região da interface de dimerização é altamente conservada tanto em DacA quanto em DisA e DacB.

Fonte: Elaborada pela autora.

Além de possuir aminoácidos conservados na região da interface dimérica que estabiliza a Sau_DacA⁸⁶ como dímero, uma sobreposição da estrutura desta proteína com monômeros da Tma_DisA e da Bce_DacB revelou que o enovelamento da região da interface dimérica também é conservado (Figura 49A). Analisando as estruturas de cada proteína separadamente, encontramos esta região igualmente enovelada na interface que estabiliza a Sau_DacA⁸⁶ como dímero (Figura 49B), a Tma_DisA como octâmero (Figura 49C) e a Bce_DacB como hexâmero (Figura 49D).

Figura 49 - (A) Sobreposição de monômeros de Tma_DisA, Bsu_DacB e Sau_DacA⁸⁶ mostrando a conservação do enovelamento da região da interface dimérica de Sau_DacA⁸⁶. (B) Estrutura da Sau_DacA⁸⁶ com a região da interface dimérica destacada em vermelho. (C) Estrutura da Tma_DisA com a região da interface que estabiliza o octâmero, equivalente a interface dimérica de Sau_DacA⁸⁶, destacada em vermelho. (D) Estrutura da Bce_DacB com a região da interface que estabiliza o hexâmero, equivalente a interface dimérica de Sau_DacA⁸⁶, destacada em vermelho.

Fonte: Elaborada pela autora.

Outra proteína com estado oligomérico caracterizado foi a Bsu_DacB,³⁸ uma proteína ortóloga à Bce_DacB³⁸ (Figura 48A). Análises estruturais daquela proteína mostram uma organização estrutural na forma de hexâmero, o qual é estabilizado primeiramente através dos domínios YojJ, um domínio N-terminal, e secundariamente através do encontro na forma de dímeros de domínios DAC (Figura 48A). O encontro dimérico dos domínios DAC de Bsu_DacB apresenta uma conformação estrutural idêntica a dos dímeros de Sau_DacA. Esse encontro ocorre através de uma região da estrutura do domínio DAC que contém resíduos altamente conservados e com 57% de identidade com a mesma região encontrada nos dímeros de DacA – Figuras 48B e 48C.

Estudos realizados por Mehne *et al.* da Bsu_DacB³⁸ mostraram que o arranjo hexamérico dessa proteína é incompatível com a atividade do domínio DAC como ciclase, logo essa proteína necessitaria sofrer mudanças conformacionais para exercer sua função no interior celular (Figura 18), o que foi demonstrado por mutações realizadas no domínio N-

terminal e pelo estudo de uma versão truncada da proteína com a deleção da primeira hélice do mesmo domínio, a qual demonstrou a formação de dímeros com alta atividade enzimática.³⁸

A estrutura cristalográfica da Sau_DacA⁸⁶ revelou uma proteína dimérica. No entanto, analogamente às estruturas da Bce_DacB e da Bsu_DacB, esses dímeros proteicos não se apresentam em uma disposição favorável à síntese do nucleotídeo, uma vez que cada sítio de ligação de ATP se encontra simetricamente oposto (Figura 17). Apesar da interface de dimerização apresentada pela Sau_DacA⁸⁶ aparentar não favorecer a atividade da ciclase, algumas descrições na literatura^{20,43} e no presente trabalho relatam as DacAs como proteínas diméricas e ativas em solução, indicando que essa conformação seja relevante para a síntese do nucleotídeo. Este fato levantou duas hipóteses: 1) a interface de dimerização encontrada na estrutura de Sau_DacA⁸⁶ constituiria um artefato de cristalização, ou seja, a proteína seria um dímero em solução, mas assumiria outra conformação dimérica; e 2) essa interface seria relevante para a estabilidade da estrutura da Sau_DacA⁸⁶, mais especificamente do sítio de ligação do substrato à proteína.

Logo, com o intuito de identificar os resíduos importantes para a dimerização dos monômeros de Sau_DacA⁸⁶ e investigar a relevância desta interface de dimerização para a síntese do nucleotídeo, foi realizada uma análise da estrutura cristalográfica da Sau_DacA⁸⁶ através de medidas de distâncias entre dois resíduos presentes em cada hélice responsável pelas supostas interações de estabilização do dímero de cada subunidade da proteína (Figura 50A). Os resíduos escolhidos e mutados para um ácido glutâmico foram L163, N166 e L174 (Figura 50B). Estes mutantes foram expressos e purificados e a formação de dímeros da Sau_DacA⁸⁶ nativae dos mutantes foi analisada usando cromatografia de exclusão de tamanho (Figura 50C).

Figura 50 - (A) O zoom na representação em cartoon mostra que a coordenação exercida pelos resíduos da interface dimérica (lilás) é próxima ao loop L5 (lilás), que é constituído por resíduos responsáveis pela ligação do ATP e do Mn^{2+} (em azul e verde, respectivamente). (B) Representação dos resíduos de aminoácidos da interface dimérica escolhidos para mutação. (C) Cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex75 com as enzimas Sau_DacA⁸⁶ nativa e mutantes da interface de dimerização L163E, N166E e L174E.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como descrito anteriormente, a Sau_DacA⁸⁶ mostrou um volume de eluição de 10,5 ml, correspondente a uma proteína dimérica (~ 40 kDa) com uma massa de aproximadamente 20 kDa de cada subunidade. Já os mutantes L163E, N166E e L174E exibiram claramente dois volumes de eluição distintos: em 10,5 mL e em 12,2 mL (Figura 50C), esse último correspondente a uma proteína com 20 ± 2 kDa, o tamanho esperado para um monômero de Sau_DacA⁸⁶. Desta forma, todas as mutações únicas foram capazes de desestabilizar a interface de dimerização e formar Sau_DacA⁸⁶ monoméricas.

Após a separação dos monômeros de cada mutante, verificamos a estabilidade térmica de suas formas monoméricas por DSC (Figura 51).

Figura 51 - Termogramas de DSC provenientes do desenovelamento térmico da Sau_DacA⁸⁶ e dos mutantes da interface dimérica L163E e N166E mostraram perda de estabilidade térmica, visualizada através do deslocamento do T_m dos mutantes para temperaturas menores que o T_m da Sau_DacA⁸⁶.

Fonte: Elaborada pela autora.

Uma triplicata de termogramas obtidos para a Sau_DacA⁸⁶ e para os mutantes da interface dimérica mostrou apenas um pico referente ao desenovelamento da Sau_DacA⁸⁶, L163E e N166E em $(53,5 \pm 0,2)$ °C, $(48,1 \pm 0,1)$ °C e $(46,3 \pm 0,2)$ °C, respectivamente (Figura 51). Após o desenovelamento, as proteínas se agregaram e precipitaram, conforme verificado pelo sinal ruidoso do termograma destacado com o círculo verde na Figura 51. De fato, ao serem retiradas do calorímetro, todas as amostras estavam precipitadas, indicativo de que o processo de desnaturação térmica é irreversível¹¹³ tanto para Sau_DacA⁸⁶ quanto para os mutantes da interface dimérica. A análise de cada triplicata dos termogramas propiciou, ainda, a obtenção dos parâmetros termodinâmicos característicos do desenovelamento térmico das proteínas, cujos valores estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Parâmetros termodinâmicos provenientes do desenovelamento térmico da proteína nativa e dos mutantes da interface dimérica da Sau_DacA⁸⁶.

Amostra	T _m (°C)	ΔT _{1/2} (°C)	ΔH _{cal} (kcal/mol)
Sau_DacA ⁸⁶	$(53,5 \pm 0,2)$	$(3,2 \pm 0,1)$	$(62,7 \pm 2,9)$
L163	$(48,1 \pm 0,1)$	$(3,4 \pm 0,1)$	$(41,0 \pm 8,3)$
N166E	$(46,3 \pm 0,2)$	$(4,1 \pm 0,1)$	$(47,6 \pm 7,4)$
Sau_DacA ⁸⁶ +ATP+Mn ²⁺	$(54,7 \pm 0,1)$	$(2,9 \pm 0,1)$	$(70,5 \pm 3,8)$
L163+ATP+Mn ²⁺	$(47,9 \pm 0,3)$	$(3,3 \pm 0,1)$	$(52,6 \pm 5,7)$
N166E+ATP+Mn ²⁺	$(46,2 \pm 0,2)$	$(3,9 \pm 0,1)$	$(58,3 \pm 7,9)$

Fonte: Elaborada pela autora.

Na presença do complexo ATP+Mn²⁺, a construção da proteína nativa se torna mais estável (aumento do T_M e do ΔH_{cal} , Tabela7), ao passo que não há mudanças significativas nos parâmetros termodinâmicos dos mutantes da interface dimérica (Tabela7) na ausência e na presença do complexo ATP+Mn²⁺.

A análise dos dados termodinâmicos permite inferir que a Sau_DacA⁸⁶ é mais estável quando encontrada na forma de dímeros e na presença de seu substrato em solução. A “quebra” da interface dimérica, realizada através de mutações únicas de resíduos específicos, desestabiliza a proteína, podendo interferir, portanto, na capacidade da proteína em sintetizar o c-di-AMP.

Para investigar a interferência das mutações da interface dimérica (Figura 52A) na capacidade de ligação do complexo ATP-Mn²⁺, realizamos experimentos de fluorescência polarizada (Figura 52B) e de RPE de onda contínua (Figura 52C). Os resultados destes experimentos indicaram que os mutantes L163E, N166E e L174E mostraram menor capacidade de ligação tanto do ATP quanto do complexo ATP-Mn²⁺ quando comparados à Sau_DacA⁸⁶, resultando em grande redução de atividade (Figura 52D).

Figura 52 - Representação dos mutantes da interface dimérica selecionados e utilizados nos ensaios biofísicos e bioquímicos – em parênteses indicamos a subunidade do dímero que o resíduo pertence. **(B)** Medidas características do sinal de fluorescência polarizada do BODIPY® TR-ATP previamente incubado com Sau_DacA e mutantes da interface de dimerização e reacional. **(C)** Ensaio de RPE a 37°C. As linhas pontilhadas vermelhas servem como guias para comparação do sinal de Mn²⁺ na presença de α,β-Me-ATP sem e com Sau_DacA⁸⁶ e mutantes. **(D)** Testes de atividade enzimática com os mutantes da interface mostram a perda de atividade.

Fonte: Elaborada pela autora.

Analisando a estrutura da Sau_DacA⁸⁶, podemos inferir que a perda da capacidade de ligação do substrato pode ser resultado de uma perturbação estrutural ocasionada por essas mutações na terceira hélice (H3), a qual encontra-se adjacente ao quinto *loop* (L5), onde se localiza o motivo DGA. Estas mutações simples podem ser responsáveis por deslocar este *loop* ou torná-lo mais flexível, modificando a superfície de ligação do substrato e, por conseguinte, sua capacidade de ligação no sítio. Desta maneira, o substrato não consegue interagir com o sítio de ligação para os passos seguintes da síntese do c-di-AMP (Figura 53A). O mesmo pode acontecer com proteínas DacB, visto que, através de uma sobreposição de sua estrutura com a de Sau_DacA⁸⁶, podemos visualizar a conservação estrutural desta região de dimerização (Figura 53B). Desta forma, levantamos a hipótese de que o mecanismo de dissociação do hexâmero de DacB e re-associação dos domínios DAC em dímeros compatíveis à síntese de c-di-AMP proposto por Mehne *et al.*³⁸ e descrito na seção 1.2.3 pode não ocorrer.

Figura 53 - (A) Estrutura da Sau_DacA⁸⁶ com ênfase nos resíduos mutados da interface de dimerização (assinalados em azul, vermelho e roxo) e a proximidade dos mesmos com o sítio ativo (*loop* assinalado em amarelo, onde se encontra o domínio DGA) – em parênteses indicamos a subunidade do dímero a que o resíduo pertence. (B) A mesma região de dimerização ocorre na estrutura de Bce_DacB, sendo que dos resíduos escolhidos para mutação nesta região, apenas o N166 não ocorre na estrutura de DacB, sendo substituído por uma S166 como mostrado em azul escuro – em parênteses indicamos a subunidade do dímero a que o resíduo pertence.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para analisar a pertinência dessa interface de dimerização na atividade enzimática da Sau_DacA⁸⁶, os mutantes foram submetidos a teste de atividade. L163E, N166E e L174E mostraram uma atividade ciclase muito baixa (Figura 52D), apresentando cerca de 18,7% da atividade da Sau_DacA⁸⁶ na presença de Mn²⁺, sendo o N166 o mutante menos ativo, apresentando apenas 12,4% da atividade da Sau_DacA⁸⁶ na presença de Mn²⁺. Como

mostrado na Figura 52A, o N166E é o mutante com a menor distância entre os dois monômeros na estrutura cristalográfica da Sau_DacA⁸⁶, logo a inserção de um resíduo de ácido glutâmico nesta região pode perturbar fortemente a formação da interface dimérica. Consequentemente, o rompimento desta interface diminui a afinidade da Sau_DacA⁸⁶ pelo substrato (Figura 52B), afetando, assim, a síntese do nucleotídeo (Figura 52D).

Em conjunto, estes resultados mostram que os resíduos mutados são essenciais para a formação dos dímeros de Sau_DacA⁸⁶ e, consequentemente, para a função da diadenilato ciclase. Os dímeros de proteína mostraram-se mais estáveis e ativos em solução quando na presença do substrato, demonstrando, assim, a necessidade da proteína em sua forma dimérica para ocorrência de atividade enzimática. Logo, a interface dimérica encontrada na estrutura cristalográfica da Sau_DacA⁸⁶ não constitui um artefato de cristalização, mas sim uma interface essencial para a formação de dímeros ativos da diadenilato ciclase encontrados em solução.

Interface de síntese de c-di-AMP

Como já apresentado, os dímeros de domínios DAC na Sau_DacA são cataliticamente ativos apesar de não possuírem uma conformação estrutural compatível com a atividade de diadenilato ciclase. No entanto, demonstramos que a interface de dimerização apresentada na estrutura cristalina de Sau_DacA⁸⁶ é essencial para sua atividade. Dessa forma, assim como deve ocorrer com os dímeros de DacB (Figura 18), o encontro de dois monômeros de Sau_DacA⁸⁶ em uma orientação propícia para interação seria necessária para sua função enzimática.

No intuito de se estudar como esse encontro de dímeros e consequente síntese do c-di-AMP seria possível, realizamos uma sobreposição da estrutura do dímero de Sau_DacA⁸⁶ com a estrutura cristalográfica do octâmero de Tma_DisA, onde é possível visualizar o encontro de dois sítios de ligação de ATP em um domínio DAC. Através desta sobreposição, pudemos observar que a síntese de c-di-AMP ocorreria apenas através da aproximação de dois sítios complementares provenientes de dois dímeros distintos de Sau_DacA, como mostrado na Figura 54. Observamos, ainda, que o resíduo H175 fecha a coordenação do Mn²⁺ em conjunto com os fosfatos do ATP (Figura 54). Adicionalmente, identificamos que o resíduo T207, além de participar do sítio ativo da Sau_DacA⁸⁶ coordenando o primeiro fosfato do ATP (Figura 44), localiza-se no meio da interface de encontro dos dois domínios de Sau_DacA⁸⁶.

Figura 54 - Modelagem baseada na estrutura de DisA da potencial interface de interação de Sau_DacA durante o encontro competente para síntese de c-di-AMP. Destaque para o resíduo H175 que se aproxima do sítio de ligação de Mn^{2+} (pink), potencialmente fechando as coordenações do metal necessárias para catálise – em parênteses indicamos o dímero que o resíduo pertence. E o resíduo de treonina (T207) mutado para verificação da ocorrência desta interface durante o processo de síntese de c-di-AMP.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na tentativa de se verificar a relevância da aproximação dos dímeros de Sau_DacA⁸⁶ para a atividade da enzima, ou seja, para a formação de c-di-AMP, foram realizadas duas mutações do resíduo T207 (T207A e T207E), o qual é altamente conservado nas sequências de DacA e participa desta suposta interface de síntese (Figura 54), conforme mencionado anteriormente. Para verificar, ainda, se a H175 participa da coordenação do cofator (manganês), a mesma foi mutada (H175A).

A mutação do resíduo T207 pela alanina (T207A), um resíduo cuja cadeia lateral possui cadeia lateral com tamanho proporcional ao da treonina, parece não perturbar nem a afinidade do mutante pelo complexo ATP- Mn^{2+} (Figuras 55A e 55B), nem a atividade da proteína (Figura 55C). Já a substituição da treonina pelo ácido glutâmico (T207E), um resíduo de cadeia lateral maior e negativamente carregado também é capaz de manter a mesma afinidade da proteína ao complexo ATP- Mn^{2+} (Figuras 55A e 55B), mas inativa a proteína (Figura 55C), ou seja, a mutação T207E é capaz de impedir a proteína de sintetizar o c-di-AMP.

A mutação da H175 diminuiu a afinidade do substrato à proteína (Figuras 55A e 55B), interferindo, pois, na síntese de c-di-AMP (Figura 55C). Assim sendo, pudemos inferir que este aminoácido é relevante para a atividade da proteína e muito provavelmente esteja coordenando o Mn^{2+} quando a interface de síntese, aqui proposta, se forma.

Figura 55 - (A) Medidas características do sinal de fluorescência polarizada do BODIPY® TR-ATP previamente incubado com Sau_DacA e mutantes da interface de dimerização e reacional. (B) Ensaio de RPE a 37°C. As linhas pontilhadas vermelhas servem como guias para comparação do sinal de Mn²⁺ na presença de ATP de hidrólise lenta sem (terceira barra) e com Sau_DacA⁸⁶ e mutantes (todas as outras barras). (C) Testes de atividade enzimática com os mutantes da interface de síntese da Sau_DacA mostram a perda de atividade do mutante T207E.

Fonte: Elaborada pela autora.

Sabendo-se que os dímeros de Sau_DacA⁸⁶ possuem uma interface dimérica essencial para sua atividade e a única forma da proteína sintetizar o c-di-AMP seja via a interface de síntese mostrada na Figura 56, a Sau_DacA⁸⁶ necessitaria formar organizações proteicas de maior ordem (aglomerados protéicos) sintetizar o c-di-AMP, como do exemplo mostrado na Figura 56. Logo, é importante verificarmos se a mutação T207E modifica as propriedades geométricas da proteína, ou seja, se esse mutante impede a formação da interface de interação dos dímeros e formação destes aglomerados. Para isso, foram realizados experimentos de DLS, onde informações do tamanho de partículas que se encontram em solução podem ser obtidas.

Os ensaios de DLS mostraram que a Sau_DacA⁸⁶ forma partículas com raio hidrodinâmico (*z-average*) médio 80 vezes maior na presença do análogo de substrato α, β -Me-ATP e do cofator metálico Mn²⁺ que na ausência dos mesmos (Figura 56B), evidenciando a necessidade da formação do complexo enzima-substrato-cofator para a atividade enzimática. Ou seja, a proteína se aglomera em seu estado ativo (na presença do substrato), propiciando o encontro de sítios complementares de ligação do substrato, essencial para a síntese de c-di-AMP.

Figura 56 - (A) Modelo deformação dos aglomerados de Sau_DacA⁸⁶ para síntese de c-di-AMP. (B) Ensaios de DLS mostraram a formação de aglomerados proteicos da Sau_DacA⁸⁶ na presença do substrato e do cofator, possibilitando o encontro de sítios complementares de ligação do substrato para a síntese de c-di-AMP. (C) Ensaios de DLS mostraram que o mutante T207E, mas não o T207A, perde a capacidade de formar aglomerados na presença do substrato e do cofator.

Fonte: Elaborada pela autora.

Estes mesmos ensaios de DLS foram realizados com os mutantes do resíduo T207. Conforme ilustrado na Figura 56C, a mutação T207A não impede a aproximação de dois sítios complementares de ligação do substrato, ou seja, aglomerados proteicos são formados. Já o mutante T207E não foi capaz de formar aglomerados proteicos (Figura 56C), demonstrando que essa mutação consegue impedir a aproximação de dois sítios complementares de ligação do substrato, incapacitando a c-di-AMP a partir dessa interação. Estes resultados sugerem que a atividade da proteína é dependente da formação da interface de interação dos dímeros, propiciando a aproximação de sítios complementares, importante para a síntese do dinucleotídeo cíclico.

Com o intuito de comprovar a hipótese de que a incapacidade de síntese do c-di-AMP é devido a não aproximação de sítios complementares provenientes de dímeros distintos de Sau_DacA⁸⁶, realizamos medidas de HYSCORE^{†††}, uma técnica de RPE pulsada (seção 3.10.2). Como os espectros de RPE de onda contínua são resultado de todas as interações magnéticas do íon paramagnético de interesse (Mn²⁺) com campos magnéticos internos e externamente aplicados, sua forma de linha é bastante complicada. Para simplificar os

^{†††} Ensaios de HYSCORE foram realizados em colaboração com o Dr. Luís Guilherme Mansor Basso.

espectros, sequências específicas de pulsos de microondas podem ser aplicadas aos sistemas para se separar interações magnéticas específicas das demais. HYSCORE é uma técnica bidimensional de RPE pulsada utilizada para monitorar o ambiente local em torno do íon paramagnético de interesse através de medidas do acoplamento dipolar de núcleos próximos (distância menor que $6 \text{ \AA}^{125}$) ao íon paramagnético.⁹⁷ Através desta técnica, podemos identificar tais núcleos e obter informações estruturais precisas a respeito do centro metálico e de seus ligantes. Para isso, os núcleos vizinhos acoplados ao Mn^{2+} devem possuir como pré-requisito spin nuclear não-nulo. Olhando para o sítio ativo da Sau_DacA⁸⁶ na Figura 57A, identificamos o ^{31}P do grupo fosfato do ATP, prótons (^1H) de cadeias laterais próximas ou de moléculas de água e, convenientemente, o ^{14}N proveniente do resíduo H175. Assim, o aparecimento ou não de frequências características do núcleo de ^{14}N da histidina H175 pode ser atribuído à ocorrência ou não da aproximação dos dímeros via a interface modelada na Figura 54, visto que a distância entre o N ϵ da H175 e o manganês obtida da estrutura cristalográfica é de $5,12 \text{ \AA}$ (Figura 57A), dentro do limite da técnica.

Os espectros 2D, com eixos de frequências f_1 e f_2 , obtidos dos experimentos de HYSCORE são graficados em forma de mapas de contorno, conforme ilustrado na Figuras 57B-E, e representam as frequências de acoplamento hiperfino do íon Mn^{2+} com núcleos próximos^{†††}. Os ensaios de HYSCORE foram realizados em quatro condições: 1) Mn^{2+} +ATP (Figura 57B); 2-3) duas etapas distintas da reação de hidrólise do ATP (tempos distintos de congelamento da amostra) no complexo Mn^{2+} +ATP+Sau_DacA⁸⁶ (Figuras 57C-D); e 4) Mn^{2+} +ATP+T207E (Figura 57E).

O experimento controle Mn^{2+} +ATP foi realizado para avaliar a existência de coordenação do Mn^{2+} pelo ATP. Na Figura 57B, pode ser observado um sinal em $\sim 4,0 \text{ MHz}$ devido ao ^{23}Na proveniente do tampão, além de dois picos simétricos em relação a diagonal principal, dispostos simetricamente em torno da frequência de Larmor do ^{31}P do ATP em torno de $6,0 \text{ MHz}$ com acoplamento hiperfino de $4,95 \text{ MHz}$.^{125, 126} Logo, podemos assegurar que os íons manganês estão coordenados pelos grupamentos fosfatos das moléculas de ATP em solução, como já relatado neste trabalho através da estrutura cristalográfica (Figura 44) e dos dados de RPE convencional (Figura 32).

Incubando o complexo ATP+ Mn^{2+} com a Sau_DacA⁸⁶ e congelando a amostra em tempos diferentes, duas etapas da reação de hidrólise do ATP foram observadas. Na primeira, visualizamos os dois sinais característicos do ^{31}P , mas com acoplamento distinto daquele

^{†††} Os dados de HYSCORE foram tratados, plotados e analisados pelo Dr. Luís Guilherme Mansor Basso.

apresentado em solução (4,27 MHz), além de um sinal fraco na diagonal principal em torno de 5,4 MHz (Figura 57C). Já na segunda etapa, os picos relacionados ao ^{31}P não foram visualizados, mas aquele em 5,44 MHz apresentou-se mais intenso (Figura 57D). Estes resultados mostram que o ATP estava sendo consumido durante a reação enzimática da proteína nativa, mas no primeiro caso, uma baixa população do nucleotídeo ainda se encontrava íntegro e ligado ao manganês e à proteína, ao passo que no segundo caso, o ATP foi totalmente hidrolizado pela Sau_DacA⁸⁶. Adicionalmente, o sinal em torno de 5,44 MHz pode ser atribuído ao ^{14}N do resíduo de histidina próxima ao Mn^{2+} ,¹²⁷⁻¹²⁸ ou seja, o nitrogênio do resíduo H175 de fato se encontra acoplado ao íon manganês, fechando o sítio de coordenação do metal em conjunto com os fosfatos do ATP e com o resíduo E229, como mostrado na Figura 40A. O fato do pico do ^{14}N ter aparecido na diagonal principal significa acoplamento fraco com o manganês, provavelmente devido a distância entre eles. Os fosfatos do ATP coordenam diretamente o Mn^{2+} , aproximando o ^{31}P do íon e levando ao desdobramento hiperfino observado (picos simétricos com relação a diagonal principal e centrados na frequência de Larmor do ^{31}P). Em contrapartida, como pode ser visualizado na Figura 57A, o resíduo H175 do dímero 1 da Sau_DacA⁸⁶ não coordena diretamente, mas está acoplado ao manganês que encontra-se ligado no bolsão de ligação do dímero 2 de Sau_DacA⁸⁶ sendo, portanto, mais um indicativo da necessidade de aproximação de dois sítios complementares provenientes de dois dímeros distintos de Sau_DacA⁸⁶.

Figura 57 - (A) Representação da interface de síntese de c-di-AMP assinalando a distância entre o resíduo H175 e o manganês na estrutura cristalográfica da Sau_DacA⁸⁶. (B-E) Mapas de contorno obtidos dos experimentos de HSCORE em diferentes condições. (B) Controle de ATP com manganês. (C-D) Na presença de ATP+Mn²⁺, o espectro HSCORE apresenta ATP hidrolisado parcialmente (C) e totalmente (D), além da presença de um sinal de ¹⁴N, indício da coordenação do íon pela H175. (E) O mutante T207E não é capaz de hidrolizar o ATP e não apresenta um sinal de ¹⁴N, mostrando distanciamento dos dímeros impedindo, pois, o encontro face-a-face para síntese de nucleotídeo. Alguns parâmetros das medidas foram apresentados diretamente nas figuras.

Fonte: Elaborada pela autora.

Por fim, para mostrar que o afastamento da interface modelada sobre a estrutura da Tma_DisA impede a síntese do c-di-AMP, realizamos experimentos de HSCORE com o complexo ATP+Mn²⁺ e o mutante T207E. Os dados obtidos retornaram espectros 2D com os picos característicos do acoplamento hiperfino do ³¹P ao Mn²⁺, além de um pico de íons de sódio do tampão. Como o acoplamento do manganês com o fósforo (4,55 MHz) foi distinto daqueles apresentados em solução ou ligado na proteína nativa, isso significa que o ATP encontra-se intacto no sítio de ligação do mutante da Sau_DacA⁸⁶ e a geometria da interação é distinta nos 3 casos (Figura 57E). Como nenhum pico adicional com frequência característica do ¹⁴N foi observada, podemos assegurar que o resíduo H175 não se encontra próximo suficiente, dentro do limite da técnica de HSCORE, do cofator. Dessa forma, o mutante do resíduo T207 para um ácido glutâmico foi capaz de impedir a aproximação dos dímeros de

Sau_DacA⁸⁶, incapacitando a síntese do nucleotídeo cíclico. Logo, a interface de síntese face-a-face mostrada na Figura 54 é a interface de síntese utilizada pela Sau_DacA.

Sau_YbbR

4.1.7 Análise de bioinformática

Com o objetivo de se desenhar oligonucleotídeos para amplificar as ORFs correspondentes a porção citosólica da Sau_YbbR e cloná-los em vetor pETSUMO utilizando enzimas de restrição, foram realizadas análises de bioinformática da sequência que codifica a Sau_YbbR e da sequência de aminoácidos da Sau_YbbR.

A análise computacional realizada para localizar regiões de membrana, extracelular e/ou citoplasmática identificou a existência de uma hélice transmembrana localizada entre os aminoácidos 10 e 32 (Figura 58), responsável por ancorar a YbbR à membrana plasmática, e três domínios YbbR seguidos na porção citosólica da proteína (YbbR¹, dos aminoácidos 47 a 127; YbbR², dos aminoácidos 135 a 222; e YbbR³, dos aminoácidos 229 a 307 – Figura 58).

Figura 58 - Arquitetura da Sau_YbbR mostrando a predição de hélice transmembrana através do programa TMHMM V2.0 e a localização dos domínios YbbR através do programa PFAM, além das construções das porções citosólicas da proteína.

Fonte: Elaborada pela autora.

A predição de estrutura secundária (Figura 59) mostrou que esses domínios são formados majoritariamente por folhas- β , sendo que o domínio YbbR¹ não possui nenhuma estrutura em hélice- α predita, diferindo de YbbR² e YbbR³ que possuem a predição de apenas uma α -hélice em cada domínio, característico para alguns domínios YbbR, como descrito por Barb et al.³⁹

Figura 59 - Predição da estrutura secundária da Sau_YbbR via software PSIPRED.

Fonte: Elaborada pela autora.

A busca por sítios de clivagem de enzimas comerciais internas ao gene confirmou a ausência de sítios de restrição das enzimas *Bam*HI e *Xho*I, as quais foram escolhidas para a realização da clonagem.

Através de análise conjunta dos dados de bioinformática, foram escolhidas as regiões proteicas a serem amplificadas e as enzimas de restrição utilizadas para tal finalidade. Assim, os oligonucleotídeos para amplificação das *ORFs* de interesse contendo somente as porções citosólicas da Sau_YbbR (Figura 58) foram desenhados no intuito de se maximizar as chances

de obtenção de uma proteína solúvel, homogênea e adequada para a cristalização e para outros ensaios biofísicos e bioquímicos.

Como anteriormente, através de análise realizada pelo programa Protparam, obtivemos parâmetros importantes sobre a massa molecular da proteína esperada (Tabela 8), necessários para realização de ensaios posteriores.

Tabela 8 - Análise bioinformática via software Protparam para obtenção dos caracteres bioquímicos da enzima Sau_YbbR.

Construção proteica	Número de aminoácidos	Massa molecular aparente (Da)	Número de cisteínas	pI teórico
Sau_YbbR	310	34624,5	0	6,07
Sau_YbbR ⁴⁵	266	29657,6	0	5,47
Sau_YbbR ⁴⁷	264	29414,4	0	5,62

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.8 Clonagem, expressão e purificação.

As *ORFs* de interesse, aqui denominadas como ORF45 (que codifica a Sau_YbbR⁴⁵) e ORF47 (que codifica a Sau_YbbR⁴⁷), foram amplificadas a partir de DNA genômico da cepa de *S. aureus* SA16 (Figura 60A), utilizando os oligonucleotídeos mostrados na Tabela 1. As *ORFs* amplificadas foram subclonadas em vetor de propagação pGEM T-Easy (Figura 60B) e posteriormente clonadas em vetor de expressão pSMT3^{§§§} (Figura 60C), entre os sítios de restrição das enzimas BamHI e XhoI. Após análise de sequenciamento, para verificação da identidade da sequência de nucleotídeos de cada *ORF*, foi realizado um teste de expressão das proteínas de interesse (Figura 60D).

§§§ Vetor pSMT3 foi cedido pelo professor André Luis Berteli Ambrosio do Laboratório Nacional de Biociências – LNBio.

Figura 60 - (A) Amplificação dos genes a partir de DNA genômico: (MM) Padrão massas moleculares; (1) ORF45 e (2) ORF47. (B) (B) Análise de restrição da subclonagem em vetor pGEM T-easy: (MM) Padrão massas moleculares; (1) ORF75 e (2) ORF47. (C) Análise de restrição da subclonagem em vetor de expressão pSMT3: (MM) Padrão massas moleculares; (1) ORF45 e (2) ORF47. (D) Verificação da expressão das proteínas de interesse – Análise por gel SDS-PAGE 15%: (MM) Padrão massas moleculares; (1) Não-Induzido da Sau_YbbR⁴⁵. (2) Induzido da Sau_YbbR⁴⁵ contendo SUMO-fusão. (3) Induzido da Sau_YbbR⁴⁷ contendo SUMO-fusão.

Fonte: Elaborada pela autora.

Verificada a expressão das proteínas de interesse, testes de expressão e solubilidade foram realizados. Desta maneira conseguiu-se determinar um protocolo de expressão em *E. coli* Rosetta2 (DE3), para as construções proteicas que se iniciam nos aminoácidos Q45 (Sau_YbbR⁴⁵) e V47 (Sau_YbbR⁴⁷), obtendo produção das proteínas em larga escala como descrito na seção 3.2.3.

Uma análise da pureza após as etapas de purificação foi realizada por de SDS-PAGE 15% (Figura 61A e 61B) e por cromatografia por exclusão molecular mostraram que quando na presença da His-tag e fusão SUMO, ambas as proteínas mostraram-se estar adequadas para os ensaios seguintes. Através de cromatografia por exclusão molecular pode-se verificar que ambas as construções proteicas eluem em um volume de 10,4 mL, o qual ao se comparar com uma curva de calibração (Figura 61C) corresponde a um peso molecular de 50 ± 3 kDa, indicando que ambas se apresentam como monômeros em solução.

Figura 61 – Análise dos protocolos de purificação. (A) Análise em SDS-PAGE- 15% da purificação da Sau_YbbR⁴⁵: (MM) Padrão massas moleculares (1) Sobrenadante após passar pela resina de afinidade; (2) Lavagem com tampão 50 mM Tris, pH 7,5, 300 mM NaCl, 5% glicerol; (3) Eluição da Sau_YbbR⁴⁵ com tampão 50 mM Tris, pH 7,5, 300 mM NaCl, 5% glicerol, 500 mM imidazol. (B) Análise em SDS-PAGE- 15% da purificação da Sau_YbbR⁴⁷: (MM) Padrão massas moleculares (1) Sobrenadante após passar pela resina de afinidade; (2) Lavagem com tampão 50 mM Tris, pH 7,5, 300 mM NaCl, 5% glicerol; (3) Eluição da Sau_YbbR⁴⁷ com tampão 50 mM Tris, pH 7,5, 300 mM NaCl, 5% glicerol, 500 mM Imidazol. (C) Cromatograma das construções da Sau_YbbR após Superdex75 10/300 GL.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.9 Homogeneidade das amostras e estrutura secundária

Através de medidas de espalhamento dinâmico de luz, obtivemos informações a respeito da homogeneidade das amostras. Os dados de DLS das construções citosólicas de YbbR mostraram que as proteínas possuem baixa polidispersividade (Figuras 62A e 62B), o que indica que ambas se encontram monodispersas, e possuem uma única população de moléculas (Figuras 62C e 62D), com raio hidrodinâmico e massa equivalente a uma proteína

monomérica não-globular, ou seja, ambas as construções possuem condições propícias para ensaios de cristalização.

Figura 62 - (A) Tabela contendo os dados obtidos através do programa Zeta Sizer do equipamento de DLS para a Sau_YbbR⁴⁵. (B) Tabela contendo os dados obtidos através do programa Zeta Sizer do equipamento de DLS para a Sau_YbbR⁴⁷. (C) Medida de DLS para verificação da homogeneidade das amostras de Sau_YbbR⁴⁵. (D) Medida de DLS para verificação da homogeneidade das amostras de Sau_YbbR⁴⁷.

Fonte: Elaborada pela autora.

Outra característica a ser avaliada para fins de cristalização de proteínas é o enovelamento das estruturas secundárias através de espectroscopia de CD na região do UV distante (Figura 28A). Os espectros obtidos para as proteínas Sau_YbbR⁴⁵ e Sau_YbbR⁴⁷ mostraram uma banda negativa em torno de 216 nm (Figura 63A), associada a transição $n \rightarrow \pi^*$ e característica de fitas- β antiparalelas. A deconvolução espectral dos dados através do servidor online BeStSel¹⁰⁵ retornou enovelamento majoritário de proteínas contendo folhas- β : 26% de folhas- β antiparalelas e 11% de folhas- β paralelas para a Sau_YbbR⁴⁵ (Figura 63B) e 24% de folhas- β antiparalelas e 10% de folhas- β paralelas para a Sau_YbbR⁴⁷ (Figura 63C). Comparando os dados obtidos experimentalmente com àqueles preditos computacionalmente através da ferramenta PSIPRED (Figura 59), podemos assegurar que ambas as proteínas se

encontram enoveladas corretamente, de acordo com a predição, para os ensaios de cristalização e “Pull down”.

Figura 63 - (A) Espectros de CD na região do UV distante das construções citosólicas Sau_YbbR⁴⁵ e Sau_YbbR⁴⁷ em tampão 50 mM Tris, 300 mM NaCl, 5% glicerol, pH 7,5. (B) Desconvolução dos espectros de CD da Sau_YbbR⁴⁵ através do servidor online BeStSel.¹⁰⁵ (C) Desconvolução dos espectros de CD da Sau_YbbR⁴⁷ através do mesmo servidor.

Fonte: Elaboradas pelo autor.

4.1.10 Ensaios de “Pull down”

Recentes ensaios de busca de parceiros de interação para a CdaR (YbbR) de *B. subtilis* (denominaremos aqui de Bsu_YbbR para simplificar a nomenclatura) revelou a capacidade de interação das proteínas YbbR com outras proteínas deste organismo.²⁰ Por ser uma proteína que possui seu gene codificante no *operon cdaARglmM*, altamente conservado em bactérias Gram-positivas, possivelmente exista uma ligação funcional entre as proteínas codificadas por esse operon.^{20,52} Mehne e colaboradores²⁰ mostraram que a Bsu_YbbR pode interagir, via porção N-terminal enterrada na membrana, com a CdaA (denominaremos aqui de Bsu_DacA para simplificar a nomenclatura) deste organismo. Através deste resultado, os autores inferiram que aquela interação seja a provável transmissora de sinal extracelular para regulação da síntese de c-di-AMP pela Bsu_DacA.²⁰ No entanto, a porção C-terminal da Bsu_YbbR é encontrada exposta para a porção extracelular do organismo, ou seja, ela pode receber sinalizações de diversas maneiras, dentre elas, a interação com proteínas.

Ensaios de “Pull down” foram então realizados com as construções His-SUMO-YbbR⁴⁵ e His-SUMO-YbbR⁴⁷ com o objetivo de isolar proteínas que poderiam interagir *in-vitro* com algum dos domínios YbbR da Sau_YbbR. Devido a Sau_YbbR ser uma proteína

transmembrana com domínios extracelulares, aparentemente com função sensora, a identificação de interações com proteínas da membrana bacteriana ou que se encontrem no periplasma da bactéria pode trazer informações úteis sobre a sinalização transmitida pela YbbR em *S. aureus*.

Para verificar a interação *in vitro* das construções acima com possíveis parceiros de interação, foi utilizado extrato celular de *S. aureus* SA16 incubados com as proteínas His-SUMO-YbbR⁴⁵ e His-SUMO-YbbR⁴⁷ imobilizadas em resina Ni-NTA-Agarose.

Após processos de lavagens para retirada do material não-ligado, o produto de interação proteína-proteína, que permaneceu ligado à resina, foi eluído e analisado por SDS-PAGE 15% (Figuras 64A e 64B). Como controle negativo, realizou-se a incubação de mesma quantidade de extrato celular de *S. aureus* SA16 com a resina Ni-NTA-Agarose vazia, sem proteína recombinante imobilizada e, juntamente a análise de SDS-PAGE 15%, colocou-se as enzimas utilizadas na preparação do extrato celular de *S. aureus* SA16.

Conforme mostrado nas Figuras 64A e 64B, uma banda forte, de alto peso molecular, referente às proteínas His-SUMO-YbbR⁴⁵ e a His-SUMO-YbbR⁴⁷, respectivamente, pode ser visualizada em adição a duas bandas presentes na porção eluída do que ligou à resina contendo as proteínas His-SUMO-YbbR⁴⁵ e His-SUMO-YbbR⁴⁷ imobilizadas (setas vermelhas). A especificidade dessas interações puderam ser verificadas ao compararmos o resultados dos ensaios de interação proteica com o ensaio controle (Figura 64C). Nenhuma banda referente as proteínas utilizadas para preparar o extrato celular de *S. aureus* SA16 (Figura 64D) ou referente as possíveis proteínas que interagiram com a Sau_YbbR foi observada na porção de lavagem (Figura 64C(3)). Logo, possíveis parceiros visualizados nos géis interagiram com dos domínios YbbR das proteínas His-SUMO-YbbR⁴⁵ e His-SUMO-YbbR⁴⁷. Os ensaios de “Pull down” foram reprodutíveis.

Figura 64 - (A) Ensaio de “Pull down” da Sau_YbbR⁴⁵: (MM) Padrão massas moleculares; (1) YbbR⁴⁵; (2) Extrato celular de *S. aureus* SA16; (3) Lavagem da resina com 3VC de tampão 20 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl e (4) Eluição do retido na resina 3VC de tampão 20 mM Tris, pH7,5, 150 mM NaCl. **(B) Ensaio de “Pull Down” da Sau_YbbR⁴⁷:** (MM) Padrão massas moleculares; (1) YbbR⁴⁷; (2) Extrato celular de *S. aureus* SA16; (3) Lavagem da resina com 3VC de tampão 20 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl e (4) Eluição do retido na resina 3VC de tampão 20 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl. **(C) Ensaio controle:** (MM) Padrão massas moleculares; (1) Extrato celular de *S. aureus* SA16; (2) Lavagem da resina com 3VC de tampão 20 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl e (3) Eluição do retido na resina 3VC de tampão 20 mM Tris, pH7,5, 150 mM NaCl. **(D) Enzimas utilizadas na preparação do extrato celular de *S. aureus* SA16:** (MM) Padrão massas moleculares; (1) Lisostafina; (2) DNase; (3) RNase e (4) Lisozima.

Fonte: Elaborado pela autora

Como descrito na secção 1.3, ao realizar ensaios de “pull down” em conjunto com a técnica de “cross-linking”,⁵¹ Gundlach e colaboradores⁵² também encontram duas proteínas que interagiram com a YbbR de *B. subtilis* (Bsu_YbbR): CdaA (Bsu_DacA de *Bacillus subtilis*) e a GlmM (glucosamina-6-fosfato mutase), ambas essenciais para o organismo e codificadas no mesmo *operon* da YbbR. Essas interações demonstram uma ligação funcional entre as proteínas. Comparando nossos dados com os deste artigo, podemos inferir que devido as massas moleculares das bandas encontradas, essas proteínas de nossos experimentos podem corresponder às mesmas proteínas encontradas por Gundlach e colaboradores.⁵² Assim, após a observação da existência de novos possíveis parceiros de interação para as YbbRs, a identificação das proteínas que representam as bandas visualizadas no SDS-PAGE 15% poderão trazer mais informações em relação ao mecanismo de sinalização recebido pelas YbbRs. Essa análise será realizada futuramente através da técnica tripsinização das bandas identificadas, para obtenção de peptídeos proteicos, associada a espectrometria de massas.

5 Conclusões

A Sau_DacA é a única diadenilato ciclase presente em *S. aureus*, sendo a única fonte de síntese de c-di-AMP para a bactéria. Diferentemente de outros organismos, o *S. aureus* não possui outra via de sinalização por nucleotídeo cíclico como mensageiros secundários. A Sau_DacA se mostra essencial, portanto, para a viabilidade bacteriana.³

Estudos realizados com a proteína DacA de *B. subtilis* por Mehne *et al.*³⁸ demonstraram que a DacA se encontra na forma dimérica, sempre ativa nestas células, produzindo um nível basal de c-di-AMP. No entanto, ao interagir com a YbbR, proteína com função ainda desconhecida, via domínios N-terminal que se encontram na membrana celular,²⁰ essa ciclase tem sua atividade aumentada em aproximadamente 20 vezes. Logo, pode-se inferir que a YbbR seja, possivelmente, uma proteína sensora de estímulos extracelulares e transmissora destes sinais via interação com uma diadenilato ciclase e consequente aumento do nível intracelular do nucleotídeo cíclico produzido por ela.

Os dados obtidos no presente trabalho possibilitam-nos inferir que os aminoácidos constituintes dos motivos DGA e RHR, altamente conservados, são essenciais para a atividade da ciclase, pois coordenam o ATP e o íon manganês no sítio ativo, sendo, assim, responsáveis pela estabilidade do complexo ATP-Mn²⁺ no sítio catalítico. A interface de dimerização apresentada na estrutura cristalina de Sau_DacA⁸⁶, também encontrada altamente conservada na estabilização da estrutura de Bce_DacB e com alta identidade entre os resíduos constituintes, mostrou-se extremamente relevante para a atividade da ciclase, uma vez que em sua forma monomérica, os domínios DAC de Sau_DacA⁸⁶ não apresentaram capacidade de ligação do substrato e, por conseguinte a síntese do nucleotídeo.

Apesar de alta conservação e relevância na atividade da ciclase, a interface de dimerização encontrada na estrutura cristalina de Sau_DacA⁸⁶ não se mostra favorável para que a ciclase seja ativa. Através de modelagem da possível interface competente para síntese de c-di-AMP, utilizando como modelo a estrutura de Tma_DisA, demonstramos que a síntese deste nucleotídeo apenas pode ocorrer devido ao encontro de dois sítios complementares, provenientes de dois dímeros distintos, após estes se ligarem ao substrato ATP-Mn²⁺.

Logo, uma análise de todos os dados obtidos no presente trabalho em conjunto com os disponíveis na literatura para proteínas-DAC nos possibilitou propor um modelo para o mecanismo de síntese de c-di-AMP através de proteínas do tipo DacA. Primeiramente, podemos inferir, de acordo com os dados literário apresentados na Introdução do trabalho, que a Sau_DacA sintetiza constantemente c-di-AMP.²⁰ Esta síntese ocorre através do encontro de dois sítios complementares situados em dois dímeros distintos desta proteína (Figura 65A). Desta forma, a DacA estabelece um nível basal de nucleotídeo no interior celular e este nível

basal é produzido pela proteína em estado ativo, ou seja, quando a proteína interage com a Sau_YbbR via porção de membrana. No entanto, esse nível basal de c-di-AMP pode ser alterado quando a Sau_YbbR recebe algum estímulo externo. Este estímulo provavelmente ocorre via uma interação com outra proteína. A sinalização é transmitida para a Sau_DacA através de sua porção N-terminal (Figura 65B), de maneira ainda não elucidada. Essa sinalização pode provocar alguma mudança desta interação proteica inibindo ou facilitando, ainda mais, o encontro de dímeros distintos de DacA. Como consequência, a síntese de c-di-AMP é alterada (Figura 65B).

Figura 65 - Mecanismo putativo proposto para a síntese de c-di-AMP de proteínas do tipo DacA. (A) A síntese de c-di-AMP deve ocorrer via encontro face-a-face de dois sítios de ligação de ATP presentes em dímeros protéicos distintos (laranja claro e laranja escuro). (B) A taxa de síntese do c-di-AMP pode ser alterada através de interação proteína-proteína com a YbbR (azul), quando esta última detectar alguma modificação do ambiente que a circunda através de uma sinalização ainda não conhecida. A interação entre a Sau_YbbR e a Sau_DacA deve alterar a síntese de c-di-AMP, no entanto, o output que essa interação promove em *S. aureus* ainda é desconhecido.

Fonte: Elaborada pela autora.

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. 2011. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07514.x.
- 2 KALIA, D.; MEREY, G.; NAKAYAMA, S.; ZHENG, Y.; ZHOU, J.; LUO, Y.; GUO, M.; ROEMBKE, B. T.; SINTIM, H. O. Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis. *Chemical Society Reviews*, v. 42, n. 1, p. 305-341, 2013. doi: 10.1039/c2cs35206k.
- 3 CORRIGAN, R. M.; GRÜNDLING, A. Cyclic di-AMP: another second messenger enters the fray. *Nature Reviews Microbiology*, v. 11 , n. 8, p. 513-524, 2013. doi: 10.1038/nrmicro3069.
- 4 FRANCIS, S. H.; CORBIN, J. D. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases: intracellular receptors for cAMP and cGMP action. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, v. 36 , n. 4, p. 275-328, 1999.
- 5 LUCAS, K. A.; PITARI, G. M.; KAZEROUNIAN, S.; RUIZ-STEWART, I.; PARK, J.; SCHULZ, S.; CHEPENIK, K. P.; WALDMAN, S. A. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacological Reviews*, v. 52, n. 3, p. 375-414, 2000.
- 6 KAUPP, U. B.; SEIFERT, R. Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiological Reviews*, v. 82 , n. 3, p. 769-824, 2002.
- 7 BOTSFORD, J. L.; HARMAN, J. G. Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiology Reviews*, v. 56, n. 1, p. 100, 1992.
- 8 LINDER, J. U. cGMP production in bacteria. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 334, n. 1-2, p. 215-219, 2010.
- 9 CASHEL, M.; GENTRY, D.; HERNANDEZ, V.; VINELLA, D. The stringent response. In: NEIDHARDT F. C. et al. (Ed.). *Escherichia coli and salmonella: cellular and molecular biology*. 2nd ed. Washington, DC: ASM Press, 1996.p. 1458–1496
- 10 SPIRA, B.; SILBERSTEIN, N.; YAGIL, E. Guanosine 3',5'-bispyrophosphate (ppGpp) synthesis in cells of *Escherichia coli* starved for Pi. *Journal of Bacteriology*, v. 177, n. 14, p. 4053-4058, 1995.
- 11 BATTESTI, A.; BOUVERET, E. Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. *Molecular Microbiology*, v. 62, n. 4, p. 1048-1063, 2006. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05442.x.
- 12 ROSS, P.; WEINHOUSE, H.; ALONI, Y.; MICHAELI, D.; WEINBERGER-OHANA, P.; MAYER, R.; BRAUN, S.; DE VROOM, E.; VAN DER MAREL, G. A.; VAN BOOM, J. H.; BENZIMAN, M. Regulation of cellulose synthesis in *acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature*, v. 325, n. 6101, p. 279-281, 1987.
- 13 WOLFE, A. J.; VISICK, K. L. Get the message out: cyclic-Di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility. *Journal of Bacteriology*, v. 190 n. 2, p. 463-475, 2008. doi: 10.1128/JB.01418-07.

- 14 JENAL, U.; MALONE, J. Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annual Review of Genetics*, v. 40, p. 385-407, 2006. doi: 10.1146/annurev.genet.40.110405.090423.
- 15 WITTE, G.; HARTUNG, S.; BÜTTNER, K.; HOPFNER, K. P. 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, 2008. doi: 10.1016/j.molcel.2008.02.020.
- 16 CORRIGAN, R. M.; ABBOTT, J. C.; BURHENNE, H.; KAEVER, V.; GRÜNDLING, A. 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, 2011. doi: 10.1371/journal.ppat.1002217.
- 17 HUYNH, T. N.; LUO, S.; PENSINGER, D.; SAUER, J. D.; TONG, L.; WOODWARD, J. J. An HD-domain phosphodiesterase mediates cooperative hydrolysis of c-di-AMP to affect bacterial growth and virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 112, n. 7, p. E747-756, 2015. doi: 10.1073/pnas.1416485112.
- 18 LUO, Y.; HELMANN, J. D. Analysis of the role of *Bacillus subtilis* $\sigma(M)$ in β -lactam resistance reveals an essential role for c-di-AMP in peptidoglycan homeostasis. *Molecular Microbiology*, v. 83 n. 3, p. 623-639, 2012. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07953.x.
- 19 OPPENHEIMER-SHAANAN, Y.; WEXSELBLATT, E.; KATZHENDLER, J.; YAVIN, E.; BEN-YEHUDA, S. c-di-AMP reports DNA integrity during sporulation in *Bacillus subtilis*. *EMBO Reports*, v. 12, n. 6, p. 594-601, 2011. doi: 10.1038/embor.2011.77.
- 20 MEHNE, F. M.; GUNKA, K.; EILERS, H.; HERZBERG, C.; KAEVER, V.; STÜLKE, J. Cyclic di-AMP homeostasis in *bacillus subtilis*: both lack and high level accumulation of the nucleotide are detrimental for cell growth. *Journal of Biological Chemistry*, v. 288, n. 3, 2004-17, 2013. doi: 10.1074/jbc.M112.395491.
- 21 YANG, J.; BAI, Y.; ZHANG, Y.; GABRIELLE, V. D.; JIN, L.; BAI, G. Deletion of the cyclic di-AMP phosphodiesterase gene (*cnpB*) in *Mycobacterium tuberculosis* leads to reduced virulence in a mouse model of infection. *Molecular Microbiology*, v. 93, n. 1, 65-79, 2014. doi: 10.1111/mmi.12641.
- 22 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, 1703-1705, 2010. doi: 10.1126/science.1189801.
- 23 SUREKA, K.; CHOI, P. H.; PRECIT, M.; DELINCE, M.; PENSINGER, D. A.; HUYNH, T. N.; JURADO, A. R.; GOO, Y. A.; SADILEK, M.; IAVARONE, A. T.; SAUER, J. D.; TONG, L.; WOODWARD, J. J. The cyclic dinucleotide c-di-AMP is an allosteric regulator of metabolic enzyme function. *Cell*, v. 158, n. 6, p. 1389-1401, 2014. doi: 10.1016/j.cell.2014.07.046.
- 24 KAPLAN ZEEVI, M.; SHAFIR, N. S.; SHAHAM, S.; FRIEDMAN, S.; SIGAL, N.; NIR PAZ, R.; BONECA, I. G.; HERSKOVITS, A. A. *Listeria monocytogenes* multidrug resistance transporters and cyclic di-AMP, which contribute to type I interferon induction,

play a role in cell wall stress. *Journal of Bacteriology*, v. 195, n. 23, p. 5250-5261, 2013. doi: 10.1128/JB.00794-13.

25 TADMOR, K.; POZNIAK, Y.; BURG GOLANI, T.; LOBEL, L.; BRENNER, M.; SIGAL, N.; HERSKOVITS, A. A. *Listeria monocytogenes* MDR transporters are involved in LTA synthesis and triggering of innate immunity during infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 4, p. 16, 2014. doi: 10.3389/fcimb.2014.00016.

26 WITTE, C. E.; WHITELEY, A. T.; BURKE, T. P.; SAUER, J. D.; PORTNOY, D. A.; WOODWARD, J. J. Cyclic di-AMP is critical for *Listeria monocytogenes* growth, cell wall homeostasis, and establishment of infection. *MBio*, v. 4, n. 3, p. e00282, 2013. doi: 10.1128/mBio.00282-13.

27 POZZI, C.; WATERS, E. M.; RUDKIN, J. K.; SCHAEFFER, C. R.; LOHAN, A. J.; TONG, P.; LOFTUS, B. J.; PIER, G. B.; FEY, P. D.; MASSEY, R. C.; O'GARA, J. P. Methicillin resistance alters the biofilm phenotype and attenuates virulence in *Staphylococcus aureus* device-associated infections. *PLOS Pathogens*, v. 8, n. 4, p. e1002626, 2012. doi: 10.1371/journal.ppat.1002626.

28 DENGLER, V.; MCCALLUM, N.; KIEFER, P.; CHRISTEN, P.; PATRIGNANI, A.; VORHOLT, J. A.; BERGER-BÄCHI, B.; SENN, M. M., 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, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0073512.

29 ZHANG, L.; LI, W.; HE, Z. G. DarR, a TetR-like transcriptional factor, is a cyclic di-AMP-responsive repressor in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 288, n. 5, 3085-3096, 2013. doi: 10.1074/jbc.M112.428110.

30 REN, A.; PATEL, D. J. c-di-AMP binds the *ydaO* riboswitch in two pseudo-symmetry-related pockets. *Nature Chemical Biology*, v. 10, p. 780-786, 2014. doi: 10.1038/nchembio.1606.

31 MANIKANDAN, K.; SABAREESH, V.; SINGH, N.; SAIGAL, K.; MECHOLD, U.; SINHA, K. M. Two-step synthesis and hydrolysis of cyclic di-AMP in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*, v. 9 n. 1, p. e86096, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0086096.

32 BAI, Y.; YANG, J.; ZARRELLA, T. M.; ZHANG, Y.; METZGER, D. W.; BAI, G. 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, 2014. doi: 10.1128/JB.01041-13.

33 RÖMLING, U.; GOMELSKY, M.; GALPERIN, M. Y. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Molecular Microbiology*, v. 57, n. 3, p. 629-639, 2005. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04697.x.

34 FINN, R. D.; BATEMAN, A.; CLEMENTS, J.; COGGILL, P.; EBERHARDT, R. Y.; EDDY, S. R.; HEGER, A.; HETHERINGTON, K.; HOLM, L.; MISTRY, J.; SONNHAMMER, E. L.; TATE, J.; PUNTA, M. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Research*, 2013. doi: 10.1093/nar/gkt1223.

- 35 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, 2008. doi: 10.1126/scisignal.133pe39.
- 36 BAI, Y.; YANG, J.; ZHOU, X.; DING, X.; EISELE, L. E.; BAI, G. 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, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0035206.
- 37 DOHERTY, A. J.; SERPELL, L. C.; PONTING, C. P. The helix-hairpin-helix DNA-binding motif: a structural basis for non-sequence-specific recognition of DNA. *Nucleic Acids Research*, v. 24, n. 13, p. 2488-2497, 1996.
- 38 MEHNE, F. M.; SCHRÖDER-TITTMANN, K.; EIJLANDER, R. T.; HERZBERG, C.; HEWITT, L.; KAEVER, V.; LEWIS, R. J.; KUIPERS, O. P.; TITTMANN, K.; STÜLKE, J. Control of the Diadenylate Cyclase CdaS in *Bacillus subtilis*: an autoinhibitory domain limits cyclic DI-AMP production. *Journal of Biological Chemistry*, v. 289, n. 30, p. 21098-21107, 2014. doi: 10.1074/jbc.M114.562066.
- 39 BARB, A. W.; CORT, J. R.; SEETHARAMAN, J.; LEW, S.; LEE, H. W.; ACTON, T.; XIAO, R.; KENNEDY, M. A.; TONG, L.; MONTELLIONE, G. T.; PRESTEGARD, J. H. Structures of domains I and IV from YbbR are representative of a widely distributed protein family. *Protein Science*, v. 20, p. 396-405, 2011. doi: 10.1002/pro.571.
- 40 KOTRBA, P.; INUI, M.; YUKAWA, H. Bacterial phosphotransferase system (PTS) in carbohydrate uptake and control of carbon metabolism. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 92, n. 6, p. 502-517, 2001.
- 41 BLATCH, G. L.; LÄSSLE, M. The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays*, 21, n. 11, p. 932-939, 1999. doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(199911)21:11<932::AID-BIES5>3.0.CO;2-N.
- 42 COOPER, M. A.; SHLAES, D. Fix the antibiotics pipeline. *Nature*, v. 472, n. 7341, 2011. doi: 10.1038/472032a.
- 43 ROSENBERG, J.; DICKMANN, A.; NEUMANN, P.; GUNKA, K.; ARENS, J.; KAEVER, V.; STÜLKE, J.; FICNER, R.; COMMICHAU, F. M. Structural and biochemical analysis of the essential diadenylate cyclase CdaA from *listeria monocytogenes*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 290, n. 10, p. 6596-606, 2015. doi: 10.1074/jbc.M114.630418.
- 44 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, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0069425.
- 45 THAYER, M. M.; AHERN, H.; XING, D.; CUNNINGHAM, R. P.; TAINER, J. A. Novel DNA binding motifs in the DNA repair enzyme endonuclease III crystal structure. *EMBO Journal*, v. 14, n. 16, p. 4108-4120, 1995.
- 46 KIKHNEY, A. G.; SVERGUN, D. I. A practical guide to small angle X-ray scattering (SAXS) of flexible and intrinsically disordered proteins. *FEBS Letters*, v. 589, n. 19, p. 2570–2577, 2014..

- 47 KIRSTEIN, J.; ZÜHLKE, D.; GERTH, U.; TURGAY, K.; HECKER, M. A tyrosine kinase and its activator control the activity of the CtsR heat shock repressor in *B. subtilis*. *EMBO Journal*, v. 24, n. 19, p. 3435-3445, 2005. doi: 10.1038/sj.emboj.7600780.
- 48 HOLM, L.; KÄÄRIÄINEN, S.; ROSENSTRÖM, P.; SCHENKEL, A. Searching protein structure databases with DaliLite v.3. *Bioinformatics*, v. 24, n. 23, p. 2780-2781, 2008. doi: 10.1093/bioinformatics/btn507.
- 49 FEDOROV, R.; MESHCHERYAKOV, V.; GONGADZE, G.; FOMENKOVA, N.; NEVSKAYA, N.; SELMER, M.; LAURBERG, M.; KRISTENSEN, O.; AL-KARADAGHI, S.; LILJAS, A.; GARBER, M.; NIKONOV, S. Structure of ribosomal protein TL5 complexed with RNA provides new insights into the CTC family of stress proteins. *Acta Crystallographica D*, v. 57, n. 7, p. 968-976, 2001. doi: 10.1107/S0907444901006291.
- 50 HARMS, J. M.; WILSON, D. N.; SCHLUENZEN, F.; CONNELL, S. R.; STACHELHAUS, T.; ZABOROWSKA, Z.; SPAHN, C. M.; FUCINI, P. Translational regulation via L11: molecular switches on the ribosome turned on and off by thiostrepton and micrococin. *Molecular Cell*, v. 30, n. 1, p. 26-38, 2008. doi: 10.1016/j.molcel.2008.01.009.
- 51 KLOCKENBUSCH, C.; KAST, J. Optimization of formaldehyde cross-linking for protein interaction analysis of non-tagged integrin beta1. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2010, p. 927585, 2010. doi: 10.1155/2010/927585.
- 52 GUNDLACH, J.; MEHNE, F. M.; HERZBERG, C.; KAMPF, J.; VALERIUS, O.; KAEVER, V.; STÜLKE, J. An essential poison: synthesis and degradation of Cyclic Di-AMP in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, v. 197, n. 20, p. 3265-3274, 2015. doi: 10.1128/JB.00564-15.
- 53 DEURENBERG, R. H.; STOBBERINGH, E. E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 8, n. 6, p. 747-763, 2008.
- 54 LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*, v. 111, n. 9, p. 1265-1273, 2003.
- 55 SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. *Texto & Contexto - enfermagem*, v. 13, p. 64-70, 2004. doi: 10.1590/S0104-07072004000500007.
- 56 RATTI, R. P.; SOUSA, C. P. *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 30, n. 2, p. 137-143, 2009.
- 57 GIAMMARINARO, P.; LEROY, S.; CHACORNAC, J. P.; DELMAS, J.; TALON, R. Development of a new oligonucleotide array to identify staphylococcal strains at species level. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 8, p. 3673-3680, 2005. doi: 10.1128/JCM.43.8.3673-3680.2005.
- 58 STAPHYLOCOCCUS aureus. Disponível em: <<http://www.bacteriainphotos.com/>>. Acesso em: 29 mar. 2016.

- 59 KLUYTMANS, J.; VAN BELKUM, A.; VERBRUGH, H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 10, n. 3, p. 505-520, 1997.
- 60 FRANCIS, J. S.; DOHERTY, M. C.; LOPATIN, U.; JOHNSTON, C. P.; SINHA, G.; ROSS, T.; CAI, M.; HANSEL, N. N.; PERL, T.; TICEHURST, J. R.; CARROLL, K.; THOMAS, D. L.; NUERMBERGER, E.; BARTLETT, J. G. Severe community-onset pneumonia in healthy adults caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the Panton-Valentine leukocidin genes. *Clinical Infectious Diseases*, v. 40, n. 1, p. 100-107, 2005. doi: 10.1086/427148.
- 61 FRIDKIN, S. K. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities. *New England Journal of Medicine*, v. 352, n. 14, p. 1436-1444, 2005. doi: 10.1056/NEJMoa043252.
- 62 KAMEGAYA, T.; KURODA, K.; HAYAKAWA, Y. Identification of a *Streptococcus pyogenes* SF370 gene involved in production of c-di-AMP. *Nagoya Journal of Medical Science*, v. 73, n. 1-2, p. 49-57, 2011.
- 63 VINCZE, T.; POSFAI, J.; ROBERTS, R. J. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*, v. 31, n. 13, p. 3688-3691, 2003.
- 64 KROGH, A.; LARSSON, B.; VON HEIJNE, G.; SONNHAMMER, E. L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, v. 305, n. 3, p. 567-580, 2001. doi: 10.1006/jmbi.2000.4315.
- 65 MCGUFFIN, L. J.; BRYSON, K.; JONES, D. T. The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics*, v. 16, n. 4, p. 404-405, 2000.
- 66 PUNTA, M.; COGGILL, P. C.; EBERHARDT, R. Y.; MISTRY, J.; TATE, J.; BOURSNEILL, C.; PANG, N.; FORSLUND, K.; CERIC, G.; CLEMENTS, J.; HEGER, A.; HOLM, L.; SONNHAMMER, E. L.; EDDY, S. R.; BATEMAN, A.; FINN, R. D. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, v. 40, p. D290-D301, 2012. doi: 10.1093/nar/gkr1065.
- 67 INTEGRATED DNA Technologies. The polymerase chain reaction. 2011. Disponível em: <<https://www.idtdna.com/pages/docs/educational-resources/the-polymerase-chain-reaction.pdf?sfvrsn=4>>. Acesso em: 10 mar. 2016.
- 68 OPENWETWARE. Addition of 3' A overhangs to PCR products. 2009. Disponível em: <http://openwetware.org/wiki/Addition_of_3'_A_overhangs_to_PCR_products>. Acesso em: 10 mar. 2016.
- 69 FROGER, A.; HALL, J. E. Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *Journal of Visualized Experiments*, n. 6, p. 253, 2007. doi:10.3791/253.
- 70 TATUSOVA, T. A.; MADDEN, T. L. BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiology Letters*, v. 174, n. 2, p. 247-250, 1999.

- 71 NOVAGEN. pET system manual. Disponível em: <<http://richsingiser.com/4402/Novagen%20pET%20system%20manual.pdf>>. Acesso em: 12 mar. 2016.
- 72 Yunus, A. A.; Lima, C. D. Purification of SUMO conjugating enzymes and kinetic analysis of substrate conjugation. *Methods in Molecular Biology*, v. 497, p.167-186, 2009. doi: 10.1007/978-1-59745-566-4_11.
- 73 LI, S. J.; HOCHSTRASSER, M. The Ulp1 SUMO isopeptidase: distinct domains required for viability, nuclear envelope localization, and substrate specificity. *Journal of Cell Biology*, v. 160, n. 7, p. 1069-1081, 2003. doi: 10.1083/jcb.200212052.
- 74 ZOLLER, M. J. New molecular biology methods for protein engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 2, n. 4, p. 526-531, 1991.
- 75 REIKOFSKI, J.; TAO, B. Y. Polymerase chain reaction (PCR) techniques for site-directed mutagenesis. *Biotechnology Advances*, v. 10, n. 4, p. 535-547, 1992.
- 76 HO, S. N.; HUNT, H. D.; HORTON, R. M.; PULLEN, J. K.; PEASE, L. R. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, v. 77, n. 1, p. 51-59, 1989.
- 77 KABSCH, W. Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallographica D*, v. 66, Pt 2, p. 133-144, 2010. doi: 10.1107/S0907444909047374.
- 78 SHELDRICK, G. M. Experimental phasing with SHELXC/D/E: combining chain tracing with density modification. *Acta Crystallographica D*, v. 66, Pt 4, p. 479-485, 2010.
- 79 ADAMS, P. D. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica D*, v. 66, Pt 2, p. 213-221, 2010.
- 80 MCCOY, A. J.; GROSSE-KUNSTLEVE, R. W.; ADAMS, P. D.; WINN, M. D.; STORONI, L. C.; READ, R. J. Phaser crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography*, v. 40, Pt4, p. 658-674, 2007.
- 81 HÉROUX, A.; ALLAIRE, M.; BUONO, R.; COWAN, M. L.; DVORAK, J.; FLAKS, L.; LAMARRA, S.; MYERS, S. F.; ORVILLE, A. M.; ROBINSON, H. H.; ROESSLER, C. G.; SCHNEIDER, D. K.; SHEA-MCCARTHY, G.; SKINNER, J. M.; SKINNER, M.; SOARES, A. S.; SWEET, R. M.; BERMAN, L. E. Macromolecular crystallography beamline X25 at the NSLS. *Journal of Synchrotron Radiation*, v. 21, Pt 3, p. 627-632, 2014. doi: 10.1107/S1600577514003415.
- 82 FINN, R. D.; CLEMENTS, J.; EDDY, S. R. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Research*, v. 39, p. W29-W37, 2011. doi: 10.1093/nar/gkr367.
- 83 SIEVERS, F.; HIGGINS, D. G. Clustal omega. *Current Protocols in Bioinformatics*, v. 48, n. 3, p. 13.1-16, 2014. doi: 10.1002/0471250953.bi0313s48.

- 84 GLASER, F.; PUPKO, T.; PAZ, I.; BELL, R. E.; BECHOR-SHENTAL, D.; MARTZ, E.; BEN-TAL, N. ConSurf: identification of functional regions in proteins by surface-mapping of phylogenetic information. *Bioinformatics*, v. 19, n. 1, p. 163-164, 2003.
- 85 CROOKS, G. E.; HON, G.; CHANDONIA, J. M.; BRENNER, S. E. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Research*, v. 14, n. 6, p. 1188-1190, 2004. doi: 10.1101/gr.849004.
- 86 MURA, C.; MCCRIMMON, C. M.; VERTREES, J.; SAWAYA, M. R. An introduction to biomolecular graphics. *PLOS Computational Biology*, v. 6, n. 8, 2010. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000918.
- 87 GOODING, K. M.; REGNIER, F. E. Size exclusion chromatography. In: GOODING, K. M.; REGNIER, F. E. (Ed.). *Hplc of biological macro-molecules*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2002. p. 45-73.
- 88 LORBER, B.; FISCHER, F.; BAILLY, M.; ROY, H.; KERN, D. Protein analysis by dynamic light scattering: methods and techniques for students. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, v. 40, n. 6, p. 372-382, 2012. doi: 10.1002/bmb.20644.
- 89 SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUNCH, S. T. *Principles of instrumental analysis*. Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole, 2006. 1056 p.
- 90 SWADESH, J. K. *HPLC: practical and industrial applications*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2000.
- 91 WILSON, D. J.; ALDRICH, C. C. A continuous kinetic assay for adenylation enzyme activity and inhibition. *Analytical Biochemistry*, v. 404, n. 1, p.56-63, 2010. doi: 10.1016/j.ab.2010.04.033.
- 92 BARAQUET, C.; HARWOOD, C. S. Cyclic diguanosine monophosphate represses bacterial flagella synthesis by interacting with the Walker A motif of the enhancer-binding protein FleQ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 110, n. 46, p. 18478-18483, 2013. doi: 10.1073/pnas.1318972110.
- 93 LEA, W. A.; SIMEONOV, A. Fluorescence polarization assays in small molecule screening. *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 6, n. 1, p. 17-32, 2011. doi: 10.1517/17460441.2011.537322.
- 94 GROVER, P.; SHI, H.; BAUMGARTNER, M.; CAMACHO, C. J.; SMITHGALL, T. E. Fluorescence polarization screening assays for small molecule allosteric modulators of ABL kinase function. *PLoS One*, v. 10, n. 7, p. e0133590, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0133590.
- 95 ROSSI, A. M.; TAYLOR, C. W. Analysis of protein-ligand interactions by fluorescence polarization. *Nature Protocols*, v. 6, n. 3, p. 365-387, 2011 doi: 10.1038/nprot.2011.305.
- 96 JUNK, M. J. N. Assessing the functional structure of molecular transporters by EPR spectroscopy. Berlin: Springer, 2012. doi: 10.1007/978-3-642-25135-1.

- 97 LYUBENOVA, S.; MALY, T.; ZWICKER, K.; BRANDT, U.; LUDWIG, B.; PRISNER, T. Multifrequency pulsed electron paramagnetic resonance on metalloproteins. *Accounts of Chemical Research*, v. 43, n. 2, p. 181-189, 2010. doi: 10.1021/ar900050d.
- 98 STICH, T. A.; LAHIRI, S.; YEAGLE, G.; DICUS, M.; BRYNDA, M.; GUNN, A.; AZNAR, C.; DEROSE, V. J.; BRITT, R. D. Multifrequency pulsed EPR studies of biologically relevant manganese(II) complexes. *Applied Magnetic Resonance*, v. 31, n. 1-2, p. 321-341, 2007. doi: 10.1007/BF03166263.
- 99 LEHARNE, S. A.; CHOWDHRY, B. Z. Thermodynamic background to differential scanning calorimetry. In: LADBURY, J. E.; CHOWDHRY, B. Z. (Ed.). *Biocalorimetry: applications of calorimetry in the biological sciences*. New York: Wiley, 1998. p. 157-182.
- 100 GILL, P.; MOGHADAM, T. T.; RANJBAR, B. Differential scanning calorimetry techniques: applications in biology and nanoscience. *Journal of Biomolecular Techniques*, v. 21, n. 4, p. 167-193, 2010.
- 101 RANJBAR, B.; GILL, P. Circular dichroism techniques: biomolecular and nanostructural analyses - a review. *Chemical Biology & Drug Design*, v. 74, n. 2, p. 101-120, 2009. DOI: 10.1111/j.1747-0285.2009.00847.x.
- 102 KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1751, n. 2, p. 119-139, 2005. doi: 10.1016/j.bbapap.2005.06.005.
- 103 JOHNSON, W. C. Secondary structure of proteins through circular dichroism spectroscopy. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, v. 17, p. 145-166, 1988. doi: 10.1146/annurev.bb.17.060188.001045.
- 104 LEES, J. G.; SMITH, B. R.; WIEN, F.; MILES, A. J.; WALLACE, B. A. CDtool-an integrated software package for circular dichroism spectroscopic data processing, analysis, and archiving. *Analytical Biochemistry*, v. 332, n. 2, p. 285-289, 2004. doi: 10.1016/j.ab.2004.06.002.
- 105 MICSONAI, A.; WIEN, F.; KERNYA, L.; LEE, Y. H.; GOTO, Y.; RÉFRÉGIERS, M.; KARDOS, J. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 112, n. 24, p. E3095-E3103, 2015. DOI: 10.1073/pnas.1500851112.
- 106 WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Research*, v. 32, p. W668-W673, 2004. doi: 10.1093/nar/gkh371.
- 107 SREERAMA, N.; VENYAMINOV, S. Y.; WOODY, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: inclusion of denatured proteins with native proteins in the analysis. *Analytical Biochemistry*, v. 287, n. 2, p. 243-251, 2000. doi: 10.1006/abio.2000.4879.
- 108 SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with

an expanded reference set. *Analytical Biochemistry*, v. 287, n. 2, p. 252-260, 2000. doi: 10.1006/abio.2000.4880.

109 CHERKASOV, A.; HSING, M.; ZORAGHI, R.; FOSTER, L. J.; SEE, R. H.; STOYNOV, N.; JIANG, J.; KAUR, S.; LIAN, T.; JACKSON, L.; GONG, H.; SWAYZE, R.; AMANDORON, E.; HORMOZDIARI, F.; DAO, P.; SAHINALP, C.; SANTOS-FILHO, O.; AXERIO-CILIES, P.; BYLER, K.; MCMASTER, W. R.; BRUNHAM, R. C.; FINLAY, B. B.; REINER, N. E. Mapping the protein interaction network in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Proteome Research*, v. 10, n. 3, p. 1139-1150, 2011. doi: 10.1021/pr100918u.

110 BRYMORA, A.; VALOVA, V. A.; ROBINSON, P. J. Protein-protein interactions identified by pull-down experiments and mass spectrometry. *Current Protocols in Cell Biology*, 2004. doi: 10.1002/0471143030.cb1705s22.

111 GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols*, v. 1, n. 6, p. 2876-2890, 2006. doi: 10.1038/nprot.2006.202.

112 SANTOS, A. M. C. **Purificação e caracterização bioquímica do tripsinogênio, $\alpha\alpha\alpha$ -e $\psi\psi\psi$ - tripsina bovina e análise termodinâmica em meio ácido por calorimetria diferencial de varredura.** 2009. 198 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

113 BASSO, L. G. M. **Interações de fármacos anti-malária com modelos de membrana.** 2009. 150 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

114 COOPER, D. M.; MONS, N.; KARPEN, J. W. Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling. *Nature*, v. 374, n. 6521, p. 421-424, 1995. doi: 10.1038/374421a0.

115 COLVIN, R. A.; OIBO, J. A.; ALLEN, R. A. Calcium inhibition of cardiac adenylyl cyclase. Evidence for two distinct sites of inhibition. *Cell Calcium*, v. 12, n. 1, p. 19-27, 1991.

116 DAHOT, M. U.; SABOURY, A. A.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. Inhibition of beta-amylase activity by calcium, magnesium and zinc ions determined by spectrophotometry and isothermal titration calorimetry. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v. 19 n. 2, p. 157-160, 2004. doi: 10.1080/14756360310001650255.

117 HEAD, D. L.; YANKEELOV, J. A. The effect of calcium chloride on the activity and inhibition of bacterial collagenase. *International Journal of Peptide Research*, v. 8, n. 2, p. 155-165, 1976.

118 ROSENBERGER, S.; THOREY, I. S.; WERNER, S.; BOUKAMP, P. A novel regulator of telomerase. S100A8 mediates differentiation-dependent and calcium-induced inhibition of telomerase activity in the human epidermal keratinocyte line HaCaT. *Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n. 9, p. 6126-6135, 2007. doi: 10.1074/jbc.M610529200.

119 VON GOLDAMMER, E.; ZORN, H. Electron-paramagnetic-resonance study of manganese ions bound to concanavalin A. *European Journal of Biochemistry*, v. 44, n. 1, p. 195-199, 1974.

- 120 HAYDEN, J. A.; BROPHY, M. B.; CUNDEN, L. S.; NOLAN, E. M. High-affinity manganese coordination by human calprotectin is calcium-dependent and requires the histidine-rich site formed at the dimer interface. *Journal of the American Chemical Society*, v. 135, n.2, p. 775-787, 2013. doi: 10.1021/ja3096416.
- 121 KISSELEVA, N.; KRAUT, S.; JÄSCHKE, A.; SCHIEMANN, O. Characterizing multiple metal ion binding sites within a ribozyme by cadmium-induced EPR silencing. *HFSP Journal*, v. 1, n. 1, p.127-136, 2007. doi: 10.2976/1.2756332.
- 122 HOFMANN, G. E.; GLAUNSINGER, W. S. EPR investigation of the Mn(II) binding sites in glutamine synthetase (*Escherichia coli* W). II. Intermediate-affinity binding sites. *Journal of Biochemistry*, v. 83, n. 6, p. 1779-1782, 1978.
- 123 KISSELEVA, N.; KHVOROVA, A.; WESTHOF, E.; SCHIEMANN, O. Binding of manganese(II) to a tertiary stabilized hammerhead ribozyme as studied by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *RNA*, v. 11, n. 1, p. 1-6, 2005.
- 124 ARMON, A.; GRAUR, D.; BEN-TAL, N. ConSurf: an algorithmic tool for the identification of functional regions in proteins by surface mapping of phylogenetic information. *Journal of Molecular Biology*, v. 307, n. 1, p. 447-463, 2001. doi: 10.1006/jmbi.2000.4474.
- 125 NOVARA, C.; ALFAYATE, A.; BERLIER, G.; MAURELLI, S.; CHIESA, M. The interaction of H₂O₂ with TiAlPO-5 molecular sieves: probing the catalytic potential of framework substituted Ti ions. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 15, n. 26, p. 11099-11105, 2003. doi: 10.1039/c3cp51214b.
- 126 PETERSEN, J.; GESSNER, C.; FISHER, K.; MITCHELL, C. J.; LOWE, D. J.; LUBITZ, W. Mn²⁺-adenosine nucleotide complexes in the presence of the nitrogenase iron-protein: detection of conformational rearrangements directly at the nucleotide binding site by EPR and 2D-ESEEM (two-dimensional electron spin-echo envelope modulation spectroscopy). *Biochemistry Journal*, v. 391, Pt 3, p. 527-539, 2005. doi: 10.1042/BJ20050226.
- 127 STICH, T. A.; YEAGLE, G. J.; SERVICE, R. J.; DEBUS, R. J.; BRITT, R. D. Ligation of D1-His332 and D1-Asp170 to the manganese cluster of photosystem II from *Synechocystis* assessed by multifrequency pulse EPR spectroscopy. *Biochemistry*, v. 50, n. 34, p. 7390-7404, 2011. doi: 10.1021/bi2010703.
- 128 LEE, H. C.; GORONCY, A. K.; PEISACH, J.; CAVADA, B. S.; GRANGEIRO, T. B.; RAMOS, M. V.; SAMPAIO, A. H.; DAM, T. K.; BREWER, C. F. Demonstration of a conserved histidine and two water ligands at the Mn²⁺ site in Diocleinae lectins by pulsed EPR spectroscopy. *Biochemistry*, v. 39, n. 9, p. 2340-2346, 2000.