UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

MICHEL CONRAD ROBERT DE GROOTE

Estudos cristalográficos da proteína ElrR, regulador transcricional do
fator de virulência ElrA de *Enterococcus faecalis*, e indícios de sua
interação com a região de ligação ao DNA

SÃO CARLOS
2017

MICHEL CONRAD ROBERT DE GROOTE

Estudos cristalográficos da proteína ElrR, regulador transcricional do fator de virulência ElrA de *Enterococcus faecalis*, e indícios de sua interação com a região de ligação ao DNA

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

Área de Concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Profa. Dra. Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

SÃO CARLOS

2017

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)

De Groote, Michel Conrad Robert

Estudos cristalográficos da proteína ElrR, regulador transcricional do fator de virulência ElrA de *Enterococcus faecalis*, e indícios de sua interação com a região de ligação ao DNA / Michel Conrad Robert De Groote; orientador Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo - versão corrigida -- São Carlos, 2017.

120 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2017.

1. Regulador Transcricional. 2. RRNPP. 3. *Enterococcus faecalis*. 4. Cristalografia de raio X. I. Lopes Baratella da Cunha Camargo, Ilana, orient. II. Título.

Nem tudo aquilo que se quer, se pode! Mas agregando trabalho, dedicação, apreço e vontade, e ainda, contando com a boa sorte, consegue-se chegar mais perto do poder!

Dedico aos vários que se impulsionaram para o alto, e ainda são humanos.

Dedico ainda às bactérias que produziram o material para trabalho.

AGRADECIMENTOS

Palavras não bastam para agradecer aos que me apoiaram, incentivaram e auxiliaram no decorrer de minha passagem pelo instituto e ainda mais por toda a força emprestada, na difícil empresa de trabalhar por quase três anos sem remuneração.

Inicialmente quero agradecer ao Maycou Deriggi por ter me apresentado àquele que por muito tempo me orientou, ensinou e permitiu meu crescimento e a formação, Dr. Eduardo Horjales Reboredo, que acompanhou minha trajetória na USP e me ensinou realmente como fazer pesquisa e como pensar maior, pensar como pesquisador.

Aos técnicos do laboratório de biologia estrutural (cristalografia) Susana Sculaccio, Norma Bianca Saes e Humberto Pereira D'Muniz que a todo momento estavam dispostos a auxiliar, explicar e ajudar. Sem vocês esse trabalho não seria possível, mas principalmente, eu não teria aprendido tanto e não chegaria a concluir essa etapa. Agradeço vocês de todo o coração.

Aos técnicos do laboratório de biofísica Bel, Andressa e Patrícia que além das dicas e ensinamentos, principalmente no manejo de diversos equipamentos, utilizaram e gastaram seu tempo, e esforço, para realizar análises e me ensinar a conduzi-las. Meu muito obrigado.

Aos companheiros de laboratório que promoveram vários momentos de descontração, discussão e ensinamento, auxiliando diretamente no trabalho e por vezes deixando de realizar seus experimentos para que eu pudesse conduzir os meus, me ajudando no que fosse necessário, para que as experimentações dessem certo. Muito obrigado Ivan, Túlio, Ana Laura, Tatiana, Paola, Diego e vários outros. Alguns também, além de companheiros de trabalho, viraram amigos que estarão eternamente em meu coração. Larissa, Valquíria, Amanda, Vitor (B2), Matheus. Vocês fizeram a diferença e estarão sempre presentes em minha vida, ainda que talvez, apenas em pensamento.

Além desses agradeço imensamente aos meus irmãos Jean, Francine e Suzanne que sempre me apoiaram, incentivaram e me deram forças para que não desistisse e sempre me mostravam outra forma de ver e encarar os problemas, vocês são de mais. Roland, meu irmão fugidio, você também fez parte disso, talvez apenas por não estar mais! Uma pena. E novamente agradeço à minha irmã Suzanne e seu marido (Donato) que me presentearam permitindo o término da escrita desta tese e da apresentação. Vocês são super.

À minha mãe que nas horas difíceis me deu abrigo, comida, amor e carinho e, por menos tempo que eu tivesse para disponibilizar para você, lá estava você, disposta e de braços abertos. Obrigado.

Quero também agradecer minha esposa (Edna), por ter aceitado minhas várias noites passadas no laboratório para realizar análises, pelas várias vezes que, por trabalho, passei “tempos” longe, e, por fim, quando a vida nos passou a perna e nos distanciou, aceitou que eu continuasse o trabalho, mesmo que não nos desse retorno financeiro e me ajudou a “bancar” o trabalho. Você que ainda quando longe me apoiou, e por mais difíceis que as condições tenham sido nesse período, me ajudou a terminar essa tese. Você foi, e é, quem me apoia e compartilha as angustias e alegrias da vida. Você é quem me traz ao eixo correto. Obrigado, muito obrigado, minha companheira e amiga.

Aos colaboradores desse projeto, Pascale Serror e Francis Repoilla, que permitiram que eu realizasse meu projeto de pesquisa com o produto de seus trabalhos. Vocês compartilharam de conhecimentos essenciais para a evolução do trabalho, e ainda possibilitaram conhecer e trabalhar em seus laboratórios.

Especialmente, quero agradecer a pessoa que não me deixou desistir e encontrou uma solução para o término deste trabalho ao invés da desistência, Ilana Camargo, não tenho como te agradecer. O que você fez, não tem preço. Só garanto que esse trabalho escrito e pronto dependeu inteiramente de você. Toda a gratidão que sinto ainda é pouco para equivaler à imensidão de seu ato em meu favor.

Vários outros que também possibilitaram o desenvolvimento do trabalho, ainda que não saibam, o trabalho de cada um foi e é essencial para o trabalho de muitos. Muito obrigado!

Agradeço à FAPESP, pelo auxílio financeiro, imprescindível para a experimentação laboratorial e viagens de trabalho, à CAPES pelo auxílio financeiro durante os dois anos iniciais (de mestrado), à USP-COFECUB, *Agence française pour la promotion de l'enseignement supérieur, l'accueil et la mobilité internationale* e INRA pela aceitação, e auxílio na estadia, do trabalho realizado na França.

“Eu sou um universo de átomos e ainda assim, um átomo no universo”
Richard P. Feynman

RESUMO

DE GROOTE, M. C. R. **Estudos cristalográficos da proteína ElrR, regulador transcricional do fator de virulência ElrA de *Enterococcus faecalis* e indícios de sua interação com a região de ligação ao DNA.** 2017. 120p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

A ampliação do conhecimento sobre as formas de comunicação, controle e regulação existentes em bactérias traz luz aos avanços no combate das infecções hospitalares que são responsáveis por inúmeros prejuízos relacionados à saúde pública em todo planeta. DUMOULIN et al (2013), descreveram o regulador transcricional (RT) ElrR, que regula positivamente a transcrição do gene *elrA*, um fator de virulência de *Enterococcus faecalis*. ElrA apresenta grande similaridade com as internalinas de *Listeria monocytogenes*, que facilitam a invasão da bactéria ao hospedeiro. ElrR é considerada como pertencente à família Rgg-like de RT exclusivo de bactérias Gram positivas. Por vários motivos a família Rgg foi inserida à superfamília RNPP, gerando a superfamília RRNPP de RT. Os RRNPP fazem parte de um sistema de regulação por *quorum sensing* (QS), um sistema de comunicação célula-célula dependente de densidade celular, com função associada na ativação ou inibição da expressão de proteínas relacionadas, dentre outros, à virulência, formação de biofilme e esporulação. Para a melhor compreensão do mecanismo de como ocorre a ativação da transcrição do fator de virulência ElrA, este trabalho apresenta resultados de expressão heteróloga em *E. coli* e purificação das proteínas ElrR e ElrA, bem como resultados de experimentos biofísicos que caracterizam algumas propriedades estruturais e biológicas destas proteínas. Utilizando técnicas de cromatografia, espectroscopia de dicroísmo circular (CD), anisotropia de fluorescência, espalhamento dinâmico de luz (DLS), cristalografia de raios X e ressonância plasmônica de superfície (SPR), foi possível a obtenção da estrutura tridimensional de ElrR e de indícios da interação com uma região de 25bp do DNA. Realizou-se ainda, em colaboração com Dra. Pascale Serror, a tentativa de obtenção da molécula autoindutora (AI) de ElrR. São apresentados primeiros resultados da obtenção heteróloga de ElrA, sua purificação e cristalização, com importantes características que permitirão a continuação da investigação deste fator de virulência. ElrR é composta somente por alfa-hélices e apresenta-se dimérico em solução. Apesar da

similaridade estrutural dos RRNPP, a identidade da sequência entre ElrR e os outros membros é extremamente baixa, o que motivou a resolução das fases cristalográficas experimentalmente. A estrutura de ElrR apresenta-se similar às homólogas, porém, com maior interface de interação entre os protômeros, que formam o dímero. O sítio de ligação do AI, em ElrR, apresenta-se mais amplo, com cavidade maior que as demais estruturas estudadas, conservando vários dos resíduos apresentados nos homólogos que realizam a estabilização do AI. Os altos fatores de temperatura dos cristais de ElrR, adicionado a anisotropia dos átomos, de uma das estruturas obtidas, apresenta a grande flexibilidade desse RT. Os indícios de interação entre ElrR e DNA aqui apresentados, obtidos por SPR e anisotropia de fluorescência, apresentam que ElrR liga especificamente ao fragmento proposto do DNA, ainda na ausência do AI. A não cristalização do complexo (ElrR-DNA), adicionada a alta flexibilidade apresentada na estrutura e a instabilidade observada na ligação ao DNA (por SPR) apontam para a obrigatoriedade da molécula de regulação (AI) para que o complexo ElrR-DNA seja estável.

Palavras chave: Regulador transcricional. RRNPP. *Enterococcus faecalis*.
Cristalografia de raios X.

ABSTRACT

DE GROOTE, M. C. R. **Crystallographic studies of the protein ElrR, a transcriptional regulator of the *Enterococcus faecalis* virulence factor ElrA, and indications of its interaction with DNA fragment.** 2017. 120p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017

The enhancing of the knowledge about communication, control and regulation in bacteria bring possibilities on the advance of hospital-acquired infections control responsible for various prejudices related to public health worldwide. DUMOULIN, et al (2013) described ElrR, a transcriptional regulator (TR), that positively regulates transcription of the *elrA* gene, which codifies a virulence factor of *Enterococcus faecalis*. ElrA shows high similarity with *Listeria monocytogenes* internalins, which facilitates host invasion by these bacteria. ElrR are considered belonging to Rgg-like TR family exclusive of Gram positive bacteria. Several reasons include the Rgg family into the RNPP superfamily, generating the RRNPP superfamily of TR. The RRNPP are controlled by a quorum sensing (QS) regulation system, a cell-cell communication system based on cellular density that activates or inhibits the expression of proteins related with virulence, biofilm formation, sporulation, and others. For a better understanding of the transcription activation mechanism of ElrA, this work shows ElrR and ElrA heterologous expression in *E. coli* and purification of these proteins, as well as biophysics assays to characterize some structural and biological features of both proteins. Using chromatography, circular dichroism (CD), fluorescence anisotropy, dynamic light scattering (DLS), X-ray crystallography and surface plasmon resonance (SPR) technics, it was possible to obtain the tridimensional structure of ElrR, and evidences of ElrR-DNA complex formation, confirming DNA interaction site of ElrR with a 25 bp fragment. In collaboration with Dr. Pascale Serror, we attempted to achieve the ElrR auto-induction (AI) molecule. Also, results of the heterologous obtainment of ElrA are presented, as well as ElrA purification and crystallization, presenting important characteristics which will allow the further investigation of this virulence factor in near future. ElrR is composed by alpha-helices presenting dimeric fold in solution. Despite the similarity between the RRNPP members, the low identity of ElrR to the other members motivates the experimental crystallographic phases solution. ElrR structure is very similar to the homologous structures, presenting a higher interface between the

protomers that compose the dimer. Its AI binding site is wider than the other structures studied, conserving several amino acid residues presented at the homologous proteins, that stabilizes the AI molecule. High temperature factors of the amino acid residues showed in all the obtained ElrR crystallographic structures plus the anisotropy of the atoms in one of those structures show the high flexibility of this TR. The evidence of the ElrR-DNA complex presented in this study, obtained by SPR and fluorescence anisotropy, indicates that ElrR binds at the proposed DNA site even in the absence of the AI molecule. The failure to obtain the ElrR-DNA complex crystals added to the high flexibility presented at some places of the structure and the observed instability at the formed complex (observed at SPR) suggest the mandatory need of the AI molecule to create a stable ElrR-DNA complex.

Keywords: Transcriptional regulator. RRNPP. *Enterococcus faecalis*. X-ray crystallography.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Esquema do mecanismo de funcionamento dos sistemas quorum sensing. Onde: um pré-peptídeo (cruz amarela com faixa azul - **a**) é produzido no interior da célula (fundo branco) e exportado (3/4 de círculo laranja - **b**), onde sofre clivagem (tesouras - **b** ou **c**), gerando o peptídeo maduro (cruz amarela - **d**), que ao atingir concentração crítica, será transferido para o meio intracelular via oligopermease (barras paralelas amarelas - **e**), onde irá se ligar ao regulador transcricional (cruz azul - **f**), que então poderá realizar sua função de regulação do gene (setas em cinza - **g**). As interrogações representam a possibilidade de a maturação do peptídeo ser realizada durante a exportação ou quando no meio extracelular. 36
- Figura 2 - Sobreposição estrutural das formas não ligada (magenta) e ligada (ciano) do RT PrgX (PDBid. 2AXU, 2AXZ), evidenciando a alteração conformacional, em vermelho e azul, para a forma não ligada e ligada, respectivamente. O AI é representado em amarelo. Imagem gerada utilizando Pymol. 40
- Figura 3 - Gel SDS-PAGE apresentando frações da expressão e purificação por cromatografia de afinidade de ElrR_{6HIS}. 1. Solúvel total; 2. Insolúvel total; 3. Não interagente; 4. Purificado. (Os itens “linha” correspondem às mesmas frações, de uma duplicata). 60
- Figura 4 - Cromatograma de gel filtração, Superdex 200 Hiload 16/600, obtido como resultado da segunda etapa de purificação de ElrR_{6HIS}. Os picos identificados são correspondentes a: a. agregado de proteínas ElrR_{6HIS}; b. ElrR_{6HIS} dímero; c. não identificado. 61
- Figura 5 - Gráficos superpostos de distribuição de moléculas em solução de ElrR_{6HIS}, por DLS, em diferentes temperaturas. Ambos os gráficos correspondem a um mesmo ensaio porém, o gráfico à esquerda apresenta a distribuição de partículas em solução, enquanto que no gráfico à direita está representada a correspondência de massa destes mesmos picos, componentes da solução. 62
- Figura 6 - Formas cristalinas de ElrR_{6HIS} observadas em diferentes condições de cristalização do kit de cristalização Morpheus®. A) Cristais octaedros com grupo espacial P4₃2₁2 apareceram em poucas condições de cristalização; B) Cristais em placas com grupo espacial P1 compõe a maioria dos cristais formados. 63
- Figura 7 - Espectro de absorção, por fluorescência, do átomo de selênio, realizado em cristal ElrR_{6HIS}, no LNLS, anteriormente à coleta de dados a fim de determinar a energia de emissão do raio X na difração, para obtenção das fases experimentais. 66
- Figura 8 - Representação da estrutura cristalográfica dimérica de ElrR_{6HIS} em cilindros. A coloração de um dos monômeros foi realizada de acordo com a escala de cores do espectro visível, seguindo do N-terminal (azul) para C-terminal (vermelho). Em A, a linha pontilhada inserida no dímero, representa o eixo de pseudosimetria da estrutura, enquanto que a estrela indica o provável sítio de interação do AI. Imagem obtida em programa Pymol. 70

- Figura 9 - Apresentação dos subdomínios que compõe o domínio C-terminal de ElrR. **A)** Dímero de ElrR_{6HIS} é apresentado com um monômero destacado em azul, de modo a melhor observar o domínio TPR-*like*; **B e C)** a proposta de “separação” deste em dois subdomínios, destacados nas elipses, central (**B**), composto pelas alfa-hélices $\alpha 6$ a $\alpha 10$, e C-terminal (**C**), composto pelas alfa-hélices $\alpha 11$ a $\alpha 16$. Imagens obtidas em programa Pymol. 71
- Figura 10 - Alinhamento de sequência de aminoácido de algumas das RRNPP, destacando o motivo HTH (caixa azul) e os resíduos de interação com o DNA, em vermelho. 72
- Figura 11 - Alinhamento estrutural de ElrR_{6HIS} P1 (verde escuro) e P4₃₂₁₂ (verde claro), apresentando os possíveis resíduos de arginina responsáveis pela interação com o DNA (**A**), e (**B e C**) com a estrutura do complexo PlcR-DNA (amarelo) confirmando a possibilidade de interação destes resíduos com o DNA. Figura obtida em programa Pymol e sobreposição (SSM) em COOT. 73
- Figura 12 - Região do DNA (25 bp) de ligação de ElrR, apresentando o possível sítio de interação semi-palindrômico. 73
- Figura 13 - Representação da região C-terminal de ElrR_{6HIS}, destacando as interações entre monômeros. **A)** os resíduos representados em “palitos” amarelos formam um bolsão hidrofóbico na região interna de contatos entre as hélices $\alpha 14$ - $\alpha 16$, os palitos em azul identificam um dos monômeros, nesta região. O destaque no círculo azul indica o contato mediado entre as isoleucinas I195 e I197. O destaque no círculo vermelho, foi ampliado em **B** e demonstra o contato entre monômeros, mediado pelos resíduos de aminoácido N240, W242, R243, L246, L282, F281. Imagens geradas em programa Pymol. 74
- Figura 14 - Contatos intermonoméricos realizados por resíduos localizados no domínio N-terminal e subdomínio central. **A)** Representação dos resíduos em esferas desta região de contato entre os monômeros. **B)**, destaque das interações entre alfa-hélice $\alpha 2$ de um monômero (amarelo) e conexões entre $\alpha 7$ - $\alpha 8$ e $\alpha 9$ - $\alpha 10$ com outro monômero (verde). Apesar de a densidade eletrônica (aqui em $1,2\sigma$) não ser completa para todas as cadeias laterais, é suficiente para confirmar os contatos apresentados. Imagens obtidas nos programas Pymol (**A**) e COOT (**B**). 75
- Figura 15 - Sobreposição estrutural dos monômeros que compõe os dímeros de ElrR_{6HIS} apresentados na unidade assimétrica do grupo espacial P1. **A)** Visualização dos subdomínios central e C-terminal, cadeia A (verde), cadeia B (ciano), cadeia C (magenta), cadeia D (amarelo), enquanto o N-terminal é apresentado em **B**. As setas indicam as regiões que apresentam os maiores desvios entre os monômeros. Imagens geradas em programa Pymol. 78
- Figura 16 – **A.** Representação da anisotropia dos átomos da cadeia principal da estrutura de ElrR_{6HIS} grupo espacial P1 (dímero AD); **B.** isotropia **B)** dos átomos da cadeia principal da estrutura de ElrR_{6HIS} grupo espacial P4₃₂₁₂. Cada monômero das estruturas está representado em cores diferentes. Imagens obtidas em programa CCP4mg 79

- Figura 17 - Representação da interação entre moléculas, simétricos cristalográficos, apresentadas para as estruturas P4₃2₁2 (**A**) e P3₁21 (**B**) de ElrR_{6HIS}. A molécula simétrica, em cinza, apresenta interação entre C-terminais, as hélices α6 e α7 estão destacadas em amarelo. Os pontos em magenta, no simétrico, apresentam regiões de contato. Imagens obtidas em Pymol. 80
- Figura 18 - Sobreposição de monômeros de ElrR_{6HIS} obtidos nos diferentes grupos espaciais: P1 - monômero A (verde); P4₃2₁2 – monômero A (azul); P3₁21 – monômero B (vermelho). Imagem obtida em Pymol. 81
- Figura 19 - Deslocamento de cadeia lateral do resíduo F264, A, evidenciando em sobreposição dos monômeros, A (verde), B (ciano), C (amarelo) e D (magenta), da estrutura em grupo espacial P1. B, representação do resíduo com a densidade eletrônica correspondente para cada monômero. Imagens obtidas nos programas Pymol (A) e COOT (B). 82
- Figura 20 - Domínio N-terminal de ElrR_{6HIS}, apresentado em sobreposição estrutural dos monômeros de ElrR_{6HIS}. **a.** Monômeros (P1) A (verde), B (ciano), C (amarelo), D (magenta). **b.** monômero A (azul claro) grupo espacial P43212 sobreposto com monômeros A e C (P1). Imagens obtidas em programa Pymol. 83
- Figura 21 – Sobreposição estrutural, por similaridade de estrutura secundária, realizada entre os monômeros de ElrR (em verde) com os homólogos RRNPP. **A-** ElrR – PlcR, destacando a região que compreende entre os resíduos de aminoácidos D71 a K103, em PlcR, e de K78 a K111 em ElrR, como sendo a de maior discrepância na região do sítio alostérico; **B-** ElrR – PrgX, destacando a região que compreende os resíduos P292 a I305 de PrgX, que apresenta uma hélice única entre os membros RRNPP; **C-** ElrR-Rgg2_{sd} sem grandes diferenças estruturais, apenas no comprimento do sítio, maior em ElrR. 84
- Figura 22 - Representação de cadeias laterais dos resíduos de aminoácido apontando para o sítio do AI de ElrR_{6HIS}. Destacando os resíduos que estão no trajeto proposto para estabilização do AI (em azul) e os resíduos hidrofóbicos (em laranja) que compõem grande parte da superfície do sítio. Imagem obtida em Pymol. 88
- Figura 23 – Representação de superfície (raio de Van der Waals) do sítio de ligação do AI de ElrR_{6HIS} (monômero em verde), através de duas perspectivas. Em ambas figuras estão representadas as cargas positivas (azuis) e negativas (vermelho) dos átomos. A coloração dos resíduos de aminoácidos corresponde a da Figura 22. Imagem obtida em Pymol. 89
- Figura 24 - Representação de superfície (raio de Van der Waals) do sítio do AI de ElrR_{6HIS} (colorido igual Figura 22) com simulação dos heptapeptídeos (A) cCF10 (LVTLVFV) em azul e (B) PapR7 (ADLPFEF) em rosa, no interior do sítio. Imagem obtida em Pymol. 90
- Figura 25 - Cromatograma, resultado da purificação da amostra controle negativo, em coluna Sephadex G25 desalting Hitrap 91

Figura 26 - Cromatograma, resultado da purificação da amostra controle positivo, em coluna Sephadex G25 desalting Hitrap.	91
Figura 27 - Sobreposição de espectros UV-VIS das amostras controle positivo (bege) e controle negativo (verde).	92
Figura 28 - Sobreposição de espectros de absorção UV-VIS de ElrR _{6HIS} em comparação com a interação ElrR _{6HIS} e frações purificadas, na pesquisa, do AI.	93
Figura 29 - Representação gráfica e valores da interação ElrR _{6HIS} -DNA _{bind} , realizada por SPR. Onde cada interação corresponde à concentração de ElrR utilizada, sendo a interação 1 correspondente a ElrR 30 nM, a interação 2 a ElrR 100 nM, interação 3 a ElrR 180nM, interação 4 a ElrR 300 nM e interação 5 a ElrR 450 nM.	95
Figura 30 - Representação gráfica e valores da interação ElrR _{6HIS} -DNA _{NB} , realizada por SPR. Onde cada interação corresponde à concentração de ElrR utilizada, sendo a interação 1 a ElrR 3 nM, a interação 2 a ElrR 10 nM, interação 3 a ElrR 30nM, interação 4 a ElrR 180 nM, interação 5 a ElrR 300 nM, interação 6 a ElrR 450 nM, interação 7 a ElrR 700 nM.	96
Figura 31 - Representação gráfica e valores da interação deoxicolato-ElrR _{6HIS} -DNA _{BIND} , realizada por SPR. Onde cada interação corresponde à concentração de ElrR utilizada, sendo a interação 2 a ElrR 10 ηM, a interação 3 a ElrR 30 ηM, interação 4 a ElrR 100ηM, interação 5 a ElrR 180 ηM, interação 6 a ElrR 300 ηM, interação 7 a ElrR 450 ηM, interação 8 a ElrR 700 ηM	97
Figura 32 - Representação gráfica e valores da interação colato-ElrR _{6HIS} -DNA _{BIND} , realizada por SPR. Onde cada interação corresponde à concentração de ElrR utilizada, sendo a interação 2 a ElrR 10 ηM, a interação 3 a ElrR 30 ηM, interação 4 a ElrR 100ηM, interação 5 a ElrR 180 ηM, interação 6 a ElrR 300 ηM, interação 7 a ElrR 450 ηM, interação 8 a ElrR 700 ηM.	98
Figura 33 - Curva de anisotropia de fluorescência gerada como resposta da interação entre ElrR _{6HIS} e DNA _{bind} .	99
Figura 34 - Gel SDS-PAGE de frações coletadas durante a purificação de ElrA _{6HIS} por cromatografia de afinidade. a. 1 solúvel total; 2. não interagente; 3. eluído da coluna 0mM imidazol; 4. eluído da coluna 0 a 5% imidazol; 5. eluído da coluna 20mM imidazol; 6. eluído da coluna em 50mM imidazol; 7. primeiro tubo eluído da coluna > 50 mM imidazol. b. apresenta frações eluídas em diferentes concentrações de imidazol (50 a 500 mM) durante a purificação por afinidade.	101
Figura 35 - Cromatograma de gel filtração, Superdex 200 Hiloal 16/600, obtido como resultado da purificação de ElrA _{6HIS} em tampão “C”.	102
Figura 36 - Cromatograma de gel filtração, Superdex 200 Hiloal 16/600, de ElrA _{6HIS} em tampão “C”, 20 mM Ca ⁺⁺ .	103

- Figura 37- Gel SDS-PAGE dos diferentes oligômeros de ElrA_{6HIS}, purificados por cromatografia de exclusão por massa molecular; 1, monômero; 2, dímero; 3, hexâmero; 4 e 5, oligômeros maiores. 104
- Figura 38 - Gel nativo de diferentes frações de ElrA_{6HIS} purificadas por cromatografia de exclusão por massa molecular. 1- monômero, 2-tetrâmero/hexâmero; 3 oligômeros maiores. 105
- Figura 39 - Cristais de ElrA_{6HIS} obtidos em condição de cristalização 15% m/v PEG 6000, 5% m/v glicerol. 106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tipos de moléculas regulatórias (AI) reportados para bactérias Gram positivas e negativa	37
Tabela 2 - Exemplo de peptídeos AI em bactérias Gram positivas	41
Tabela 3 - Esquema de montagem de condições para otimização da cristalização de proteína ElrA _{6HIS}	52
Tabela 4 - Dados de difração e refinamento das estruturas cristalográficas de ElrR _{6HIS}	68
Tabela 5 - Comparação dos contatos intermonoméricos e das áreas de interface da estrutura de ElrR _{6HIS} e dos homólogos estudados, considerando a completa e os primeiros 180 resíduos de aminoácido calculados em PISA	76
Tabela 6 - Resíduos de aminoácido de ElrR _{6HIS} com cadeia lateral direcionada para o sítio de ligação do AI apresentando a conservação com respeito à posição relativa das hélices quando alinhadas estruturalmente com alguns RRNPP	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AI: Autoindutor

BHI: meio de cultura Infusão de Cérebro e Coração (do inglês: *Brain Heart Infusion*)

CD: Dicroísmo Circular (do inglês: *Circular Dichroism*)

COFECUB: Comitê francês de avaliação da cooperação universitária com o Brasil

DBD: domínio de ligação ao DNA (do inglês: *DNA binding domain*)

DLS: Espalhamento dinâmico de luz (do inglês *Dynamic Light Scattering*)

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DO₆₀₀: Densidade ótica, medida em comprimento de onda igual a 600 nm

EMSA: deslocamento por eletroforese em gel (do inglês: *Electrophoretic Mobility Shift Assay*)

GOL: Glicerol

HCl: Ácido Clorídrico

HTH: hélice-volta-hélice (do inglês: *helix-turn-helix*)

IFSC: Instituto de Física de São Carlos

INRA: Instituto Nacional de Pesquisa Agronômica (do francês: *Institut National de la Recherche Agronomique*)

IPTG: Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosideo

IRAS: Infecções relacionadas à assistência à saúde

LB: meio de cultura Luria Bertani

LB-amp: meio de cultura Luria Bertani adicionado de 100 μ g/mL ampicilina

LBEst: Laboratório de Biologia Estrutural

LNLS: Laboratório Nacional de Luz Sincrotron

M9: meio mínimo (de cultura)

M9-amp: Meio mínimo adicionado de 100 µg/mL ampicilina

NaCl: Cloreto de Sódio

NaOH: Hidróxido de Sódio

NCS: Simetrias Não Cristalográficas (do inglês: *Non Crystallographic Symmetry*)

OMS: Organização Mundial da Saúde

PDB: Banco de Dados de Proteínas (do inglês: *protein data bank*)

PEG: Polietilenoglicol

PI: Ponto Isoelétrico

QS: *Quorum Sensing*

RT: Regulador Transcricional

RMSd: Desvio Médio da Raiz Quadrática (do inglês: *Root Mean Square deviation*)

RNA: Ácido Ribonucléico

RRNPP: Acrônimo para Rgg, Rap, NprR, PlcR e PrgX

RT: Regulador Transcricional

SA: Streptavidina

SAD: Difração Anômala Simples (do inglês: *Single Anomalous Diffraction*)

SDS: Duodecil Sulfato de Sódio (do inglês: *Sodium Duodecyl Sulphate*)

SDS-PAGE: Eletroforese em Gel Desnaturante de Poliacrilamida (do inglês: *Sodium Duodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

SeMet: Selenometionina

SHP: Pequenos Peptídeos Hidrofóbicos (do inglês: *Small Hydrophobic Peptides*)

SPR: Ressonância Plasmônica de Superfície (do inglês: *Surface Plasmon Resonance*)

TLS: Translação, Oscilação, Giro (do inglês: *Translation, Libration, Screw*)

TPR: Repetição Tetratricopeptídeo (do inglês: *Tetratricopeptide Repeat*)

USP: Universidade de São Paulo

UA: Unidade Assimétrica

VRE: *Enterococcus* Resistentes à Vancomicina (do inglês *Vancomycin Resistant Enterococcus*)

XIP: Peptídeo Indutor de sigX (do inglês: *sigX Inducting Peptide*)

UV-VIS: Região Ultravioleta e Visível do Espectro de Luz

LISTA DE SÍMBOLOS

Å: Angstrom

Da: Dalton

M: Molar

mM: Milimolar

μM: Micromolar

nM: Nanomolar

kDa: Quilo Dalton

°C: Graus Celsius

λ: Comprimento de onda

mL: Mililitro

L: Litro

g: Grama

mg: Miligrama

μg: Micrograma

RPM: Rotações por minuto

xg: Aceleração gravitacional

h: Hora

min: Minuto

s: Segundo

VC: Volume de coluna

%: Percentagem

Ka: Constante de associação

Kd: Constante de dissociação

Rmax: Máximo valor de interação

RU: Unidade de ressonância

uA: Unidade de Absorção

Sumário

1	INTRODUÇÃO	31
1.1	Enterococcus faecalis	31
1.2	“Inteligência” bacteriana.....	33
1.3	Reguladores transcricionais e <i>quorum sensing</i>	33
1.3.1	Sistemas QS descritos para Gram positivos.....	37
1.4	ElrR / ElrA.....	42
2	OBJETIVOS	43
2.1	Objetivos específicos	43
3	MATERIAIS e MÉTODOS.....	45
3.1	Preparação dos clones <i>E. coli</i> - ElrR _{6HIS} e <i>E. coli</i> - ElrA _{6HIS} e sequenciamento dos genes nos plasmídeos.....	45
3.2	Expressão heteróloga do regulador transcricional ElrR _{6HIS}	46
3.2.1	Preparação de ElrR _{6HIS} -SeMet para determinação de fases cristalográficas	46
3.3	Purificação de ElrR _{6HIS} heteróloga	46
3.3.1	Cromatografia de afinidade.....	47
3.3.2	Cromatografia de exclusão por massa molecular	47
3.4	Expressão heteróloga do fator de virulência ElrA	48
3.5	Purificação de ElrA _{6HIS} heteróloga	48
3.5.1	Cromatografia de afinidade.....	48
3.5.2	Cromatografia de exclusão por massa molecular	49
3.5.3	Eletroforese em gel nativo.....	49
3.6	Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)	50
3.7	Verificação da estabilidade/homogeneidade dos oligômeros em solução, utilizando espalhamento dinâmico de luz (DLS)	50
3.7.1	ElrR	50
3.7.2	ElrA	51
3.8	Investigação da estrutura secundária de ElrR _{6HIS} por dicroísmo circular	51
3.9	Determinação de estrutura tridimensional de ElrR _{6HIS} e ElrA _{6HIS}	51
3.9.1	Cristalização	51
3.9.2	Obtenção de dados cristalográficos por difração de raio X	52

3.9.3	Processamento dos dados, obtenção de fases e refinamento do modelo	53
3.10	Indícios de formação do complexo ElrR _{6HIS} –DNA	54
3.10.1	Anisotropia de fluorescência	54
3.10.2	Ressonância plasmônica de superfície (SPR)	55
3.11	Tentativa de obtenção do AI regulatório de ElrR	56
3.11.1	Interação ElrR _{6HIS} amostras purificadas	57
4	RESULTADOS e DISCUSSÃO	59
4.1	ElrR.....	59
4.1.1	Confirmação da identidade de sequência do gene no plasmídeo e análises bioinformáticas através de sequência	59
4.1.2	Expressão e purificação.....	59
4.1.3	Estabilidade e homogeneidade da amostra determinada por espalhamento dinâmico de luz (DLS)	61
4.1.4	Cristalografia.....	63
4.1.4.1	Determinação das fases cristalográficas de ElrR _{6HIS}	64
4.1.4.2	Determinação das estruturas de ElrR _{6HIS}	67
4.1.5	A estrutura tridimensional de ElrR _{6HIS}	69
4.1.5.1	Regiões de estabilização do dímero	73
4.1.6	ElrR _{6HIS} apresenta grande flexibilidade	77
4.1.7	A estrutura cristalográfica de ElrR nos diferentes grupos espaciais	80
4.1.8	Comparação entre estruturas tridimensionais de ElrR com outros RRNPP	83
4.1.9	Pesquisa do AI utilizando dados estruturais de ElrR	84
4.1.10	Tentativa de obtenção da molécula AI de ElrR.....	90
4.1.11	Ressonância plasmônica de superfície (SPR)	93
4.1.12	Anisotropia de fluorescência	99
4.2	ElrA.....	100
4.2.1	Confirmação de sequência e análises bioinformáticas através de sequência	100
4.2.2	Expressão e purificação.....	100
4.2.3	Estabilidade de ElrA _{6HIS} em solução	104
4.2.4	Cristalização de ElrA _{6HIS} e difração dos cristais.....	105
5	CONCLUSÕES	107
5.1	ElrR.....	107

5.2	ElrA	108
6	PERSPECTIVAS	109
	REFERÊNCIAS.....	111

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Enterococcus faecalis*

Enterococcus spp. são bactérias cocos Gram positivo, catalase negativo, que crescem aerobiamente aos pares ou em cadeias curtas. Estas bactérias possuem a capacidade de sobreviver em temperaturas mais altas, a 45°C, e em concentrações elevadas de NaCl, em torno de 6,5%.¹ Considerado um saprófito natural do sistema gastrointestinal, *Enterococcus* era considerado como *Streptococcus* do Grupo D de Lancefield até 1984, quando após conclusões retiradas de experimentos bioquímicos, genéticos e imunológicos, foi reclassificado como gênero *Enterococcus*.²

Enterococcus spp. possuem grande capacidade de adquirir genes horizontalmente, com destaque os que conferem resistência a antibióticos e virulência. Diante disso, *E. faecium* encontra-se entre os temidos patógenos que mais causam infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), descritos como ESKAPE, acrônimo que compreende: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e espécies de *Enterobacter*.³ Apesar de somente *E. faecium* estar neste grupo, *E. faecium* junto com *E. faecalis* são as espécies de maior ocorrência em infecções causadas por *Enterococcus* spp.⁴

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), diversos são os transtornos causados pelas IRAS, incluindo a mortalidade relacionada e, principalmente, o prolongamento do tratamento antibiótico, que está diretamente vinculado ao aparecimento de linhagens resistentes.⁵⁻⁷

O fator de destaque no caso das bactérias que promovem IRAS, é que, em grande parte, são residentes naturais do trato gastrointestinal do organismo humano (comensais), inclusive, atuando diretamente na promoção da saúde do indivíduo.⁸ Esses organismos são assim considerados oportunistas, pois ao alterar seu comportamento, em resposta a estímulos externos, causam infecções invadindo as células/tecidos do hospedeiro. A partir da reclassificação de *Enterococcus*, tornou-se possível o registro da participação do gênero nas IRAS e o estudo de suas

particularidades. Em diversos países, estudos relacionados a IRAS apresentam aumento na prevalência do *Enterococcus* ssp., inclusive, com maior participação de *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE).⁹⁻¹⁶

As bactérias podem invadir o hospedeiro por diferentes vias, tais como queimaduras, feridas cirúrgicas, pelo do uso de cateter e através do revestimento do intestino.¹⁶ Além dos transtornos causados pelos genes de resistência, vários fatores de virulência auxiliam na proteção da bactéria no hospedeiro, ou favorecem o processo infeccioso.¹⁷⁻¹⁸ *E. faecalis* possui diferentes fatores de virulência conhecidos, descritos a seguir.

Substância de agregação: o plasmídeo pCF10 apresenta três genes de codificação para proteínas de superfície (genes *prgA*, *prgB* e *prgC*),¹⁹ a proteína gerada pelo gene *prgB* é chamada substância de agregação, sendo o componente imprescindível para a transferência deste plasmídeo. Além de promover a agregação, para possibilitar a transferência do plasmídeo pCF10, a substância de agregação é também observada durante o processo de evasão pela bactéria, e também para adesão em células tubulares renais,²⁰ intestinais e cardíacas.²¹⁻²²

Proteínas de superfície de enterococcus (Esp): esse fator de virulência é relacionado à formação de biofilme, que gera a possibilidade de persistência das bactérias no processo de infecção, permitindo a evasão ao sistema imune do hospedeiro.²²⁻²³

Gelatinase: é uma protease (Zn-metaloprotease) secretada, capaz de hidrolisar caseína, colágeno, hemoglobina, peptídeos e outros.²¹⁻²² Este fator de virulência é observado presente em diversos tipos de infecções em animais.^{21, 24} A produção dessa protease é verificada como um dos responsáveis pela inibição da ação do sistema imune, destruindo fatores que ativam o sistema complemento.²⁵

ElrA: um dos recentes fatores de virulência apresentados em *E. faecalis* é a proteína associada à superfície ElrA. Definida como proteína tipo internalina,²⁶ até o momento foi demonstrado que o domínio C-terminal WxL de ElrA possui capacidade de realizar interação forte, não covalente, com peptideoglicano da superfície de bactérias Gram positivas, e que está relacionada com a capacidade de invasão durante a infecção.²⁷

1.2 “Inteligência” bacteriana

A primeira publicação considerando que as bactérias são seres “inteligentes” provém do início do século XX,²⁸ com observações sobre o comportamento bacteriano, apresentando que sua movimentação ocorre na busca de regiões mais nutritivas ou menos tóxicas.²⁸⁻²⁹

Mais recentemente, no início dos anos 2000, algumas pesquisas relacionaram as variações de expressão gênica das bactérias com sua dependência populacional, estresse e outras condições. Adicionando ao quesito “inteligência” para as bactérias, a existência de genes relacionados a transdução de sinais externos e os que produzem moléculas de sinalização, que geram respostas em sociedade.²⁹

A apresentação de determinados grupos de proteínas regulatórias, produzidas em resposta ao aumento da densidade populacional, abriu novo caminho para as pesquisas, vinculando determinados comportamentos da bactéria com sistemas específicos de regulação.³⁰ Esses sistemas estão começando a ser desvendados e se apresentam como mecanismos complexos, que promovem a comunicação entre esses seres unicelulares.

1.3 Reguladores transcricionais e *quorum sensing*

Para que existam alterações do modo de vida, de comensal para patógeno, bactérias realizam mudanças na regulação da expressão de genes específicos. Esta regulação depende da participação de moléculas, também específicas, que geram a possibilidade de transcrição desses genes.

Os genes que normalmente não estão acessíveis para a ação da RNA polimerase após ação dos reguladores transcricionais (RT) tornam-se acessíveis, permitindo a polimerização do RNA mensageiro.

RT são, em grande maioria, proteínas que possuem domínios de interação ao DNA, do inglês: *DNA binding domain* (DBD), que podem ser, ou não, sítio específico. Sua função é a de possibilitar a transcrição dos genes, auxiliando diretamente ou “apenas” sinalizando o sítio de transcrição para a RNA polimerase.³¹

Diversos são os genes dedicados à produção de RT, sendo propostos mais de 300 genes relacionados em *E. coli*,³² destes, 208 foram estudados até o momento e apenas 51 RT são categorizados como sítio específico.³³

Ao realizar a classificação da função dos RT propostos em *E. coli*, PÉREZ-RUEDA & COLLADO-VIDES, 2000, distinguiram que 35% são ativadores, 43% repressores e 22% reguladores duplos (repressores e ativadores). Ainda nessa classificação, detalham que a grande maioria dos RT realizam sua função no DNA a partir de um domínio chamado hélice-volta-hélice, do inglês: *helix-turn-helix* (HTH).³²

Esse domínio HTH, existente nos mais variados organismos, é responsável pela ligação às bases nitrogenadas do DNA, preponderantemente através da segunda hélice, sendo esta, portanto, a responsável pela especificidade do sítio de ligação.³⁶

Outro fator de destaque é que na grande maioria os RT são compostos por dois domínios, o HTH, e outro, que realiza a oligomerização da proteína e promove interação com pequenas moléculas.³⁴

O sistema *quorum sensing* foi evidenciado inicialmente com a apresentação do sistema LuxR-LuxI, regulador da luciferase bacteriana, observado em *Vibrio*.³⁵⁻³⁶ Sistemas homólogos de LuxR-LuxI estão presentes em diversas bactérias. A partir deste, vários outros sistemas de regulação genética alterada por quórum, foram relatados.

Grande parte desses mecanismos de sinalização bacteriana são compostos por dois genes complementares, um correspondente à produção de moléculas exportadas, que difundem no ambiente extracelular, e o outro para transcrição do receptor dessa molécula.³⁷

Em pequenas populações bacterianas a quantidade destas moléculas dispersas no ambiente extracelular não é suficiente para que sejam percebidas, pelas células da vizinhança. Porém, com o aumento da população (quórum) de bactérias circunvizinhas, as moléculas atingem determinada concentração (crítica) e começam a ser reconhecidas por receptores de membrana, específicos, que geram a internalização da molécula. O termo *quorum sensing* (QS) designa toda comunicação bacteriana, célula-célula, dependente de quórum.³⁷

Por serem produzidas pela bactéria e efetuarem ação na mesma, essas moléculas de sinalização, que difundem no ambiente extracelular, foram chamadas autoindutores (AI).³⁵

A proposta geral de funcionamento para os sistemas QS, esquematizado na Figura 1, é de que um precursor para a molécula de sinalização (pré-AI), é produzido no citoplasma e então exportado, para o meio extracelular, onde sofre maturação. Ainda não é conhecido para todos os QS descritos se a maturação do AI é realizada durante a exportação ou se no meio extracelular. O acúmulo do AI maduro na vizinhança, ao atingir a concentração crítica, é reconhecido pelos receptores de membrana, sendo então transportados, via sistema de oligopermease (Opp), para o citoplasma onde realizarão interação com o RT, permitindo a função deste e, portanto, o acesso da polimerase no gene a ser transcrito.^{30, 38}

As classes de moléculas AI que compõe os sistemas QS, exemplificadas na Tabela 1, são amplamente estudadas visando a melhor compreensão dos vários sistemas QS já descritos. Sabe-se que a maioria dos AI agem exclusivamente em determinada espécie de bactéria, entretanto, casos de comunicação entre espécies são observados.³⁹

Figura 1 - Esquema do mecanismo de funcionamento dos sistemas quorum sensing. Onde: um pré-peptídeo (cruz amarela com faixa azul - **a**) é produzido no interior da célula (fundo branco) e exportado (3/4 de círculo laranja - **b**), onde sofre clivagem (tesouras - **b** ou **c**), gerando o peptídeo maduro (cruz amarela - **d**), que ao atingir concentração crítica, será transferido para o meio intracelular via oligopermease (barras paralelas amarelas - **e**), onde irá se ligar ao regulador transcricional (cruz azul - **f**), que então poderá realizar sua função de regulação do gene (setas em cinza - **g**). As interrogações representam a possibilidade de a maturação do peptídeo ser realizada durante a exportação ou quando no meio extracelular.

Fonte: Elaborada pelo autor; BASSLER³⁰; MILLER; BASSLER³⁸

Pelo fato dos sistemas QS serem bastante específicos e estarem diretamente relacionados com resistência e virulência, diversas propostas apontam para a possibilidade de inibir seu funcionamento como forma auxiliar ao combate às infecções, especialmente nos casos de infecção por bactérias multiresistentes.³⁹⁻⁴⁴

Tabela 1 - Tipos de moléculas regulatórias (AI) reportados para bactérias Gram positivas e negativa.

AI	Moléculas	Grupo
N-acil homoserina lactona		Gram negativo
Hidroxiquinolona		Gram negativo
Dipeptídeo cíclico		Gram negativo
Oligopeptídeo linear		Gram negativo e Gram positivo
Oligopeptídeo cíclico		Gram positivo

Fonte: Adaptada de READING; SPERANDIO³⁹; PODBIELSKI; KREIKEMEYER⁴¹

O caminho a percorrer para desvendar os componentes dos sistemas QS existentes é longo, dada a variedade de organismos e suas capacidades ainda desconhecidas.

1.3.1 Sistemas QS descritos para Gram positivos

Parte dos sistemas QS evidenciados, em Gram positivos, apresentam os genes responsáveis pela codificação de todas as etapas do processo de comunicação, em um mesmo *operon* (conjunto de genes com função relacionada).³⁶ Esse *operon*

contém os genes codificantes para as partes relacionadas ao circuito QS: pré-AI, transportador, receptor e regulador transcricional.⁴³

Enterococcus é pertencente ao filo Firmicutes (bactérias Gram positivas com baixo conteúdo de C+G).⁴⁵ Os AI catalogados para Firmicutes, até o momento, são pequenos peptídeos hidrofóbicos (feromônios) que estão divididos em grupos, separados pelas características do feromônio (AI) e de seu receptor (RT).⁴⁶⁻⁴⁷

- feromônios cíclicos do tipo agr: Descrito e amplamente estudado em *Staphylococcus aureus*, o regulador do gene acessório, do inglês: *accessory gene regulator* (agr), possui quatro genes envolvidos no sistema QS (*fsrABCD*). Esse sistema QS é regulado por peptídeos cíclicos (*fsrB*), que possuem em comum, um resíduo de serina/cisteína, responsável pela formação do anel de lactona/tiolactona (ciclização do peptídeo). O sistema agr está envolvido na formação de biofilme em diversas bactérias Gram positivas, como *Lactobacillus* ssp., *Enterococcus* ssp., *Staphylococcus* ssp., *Listeria* ssp. etc.^{44, 47}

- Processamento de peptídeos de dupla glicina (G-G): Esse grupo QS está relacionado com competência bacteriana e produção de bacteriocinas.^{43,48} É associado ao sistema ComAB/ComCDE, amplamente estudado em *Streptococcus*, onde ComAB, formam o par de reconhecimento e exportação do AI, e ComCDE, correspondem a AI, transportador histidina quinase (transferência para região intracelular) e RT. O pré-peptídeo ComC possui um motivo de dupla glicina, região de clivagem da peptidase ComA, que o distingue dos outros sistemas.^{43, 46}

- Superfamília RRNPP: O nome deste grupo de RT provém das proteínas *Rgg*,⁴⁹ *Rap*,⁵⁰ *NprR*,⁵¹ *PlcR*,⁵² *PrgX*,⁵³ que foram agrupadas por possuírem similaridades estruturais além de manterem relação entre função.⁵² De todos os membros, apenas a proteína Rap não atua na regulação gênica direta, mas interage com o RT modulando a ligação ao DNA. Além do domínio C-terminal, as outras proteínas possuem em comum o domínio N-terminal e realizam função diretamente no DNA.⁵⁴

O domínio C-terminal de estrutura conservada dos RRNPP é bastante similar aos domínios repetidos de tetratricopeptídeos, do inglês *tetratricopeptide repeat* (TPR), encontrado em eucariotos, responsáveis por realizar interação proteína-proteína, proteína-peptídeo.⁵⁵

Apesar de não possuírem a sequência característica do domínio TPR, a região C-terminal das RRNPP apresenta igualmente várias repetições do motivo hélice-volta-hélice (alfa-hélices antiparalelas), com ângulo de aproximadamente 24 ° entre elas,⁵⁶ que ao se sobreporem apresentam uma face côncava e outra convexa, formando uma superhélice, onde internamente (na parte côncava), está o sítio de ligação do AI regulatório.⁵⁷ Para as RRNPP o domínio C-terminal é também apresentado como responsável pela alteração da conformação da proteína.^{54, 57-58}

As proteínas Rgg, NprR, PlcR e PrgX possuem no domínio N-terminal a presença de um motivo HTH-XRE *type*,⁵⁹⁻⁶⁰ composto por quatro a cinco alfa-hélices, onde a segunda e terceira hélices correspondem ao HTH. Outra característica observada na família é a conservação de resíduos de asparaginas que mediam a estabilização do AI: N163 e N201 em PlcR, N161 e N196 em PrgX, N98 e N138 em RopB (família Rgg)⁶¹ e N153 e N190 em Rgg2_{sd}.^{50, 54}

Apesar de manterem similaridade estrutural que leva a sua função, cada uma dessas proteínas apresenta um mecanismo distinto de alteração da sua conformação, onde, a interação com o peptídeo (AI) gera o posicionamento correto do motivo HTH, ou a possibilidade de acesso ao estado oligomérico ativo.⁵²⁻⁵⁴

Com a elucidação das estruturas dos RT na forma ligada e não ligada ao AI, foi possível observar que:

Em PrgX, a associação ao AI causa a alteração de sua pequena alfa-hélice C-terminal, para um par de fitas Beta, que estabiliza o peptídeo, “tampando o sítio”. Com essa alteração a estrutura apresenta uma superfície de contato (C-terminal) que permitirá a formação do tetrâmero, oligômero biologicamente ativo.^{53-54, 62-63}

Após interação do AI no sítio de PlcR a propagação do movimento gerado pelos resíduos C-terminais da estrutura leva ao rompimento da interação entre tirosinas (Y64) na hélice *link*. A quebra dessa interação desfaz a estabilidade local da grande hélice, que liga os distintos domínios, gerando uma quebra do enovelamento local, causando grande deslocamento do domínio N-terminal, permitindo que tenha a flexibilidade necessária para ligação ao DNA.^{52, 54, 63}

A Figura 2 apresenta estas alterações, como exemplo de quão diferentes são os mecanismos e de quão abruptas podem ser as mudanças estruturais geradas pela interação com o AI.

Figura 2 - Sobreposição estrutural das formas não ligada (magenta) e ligada (ciano) do RT PrgX (PDBid. 2AXU, 2AXZ), evidenciando a alteração conformacional, em vermelho e azul, para a forma não ligada e ligada, respectivamente. O AI é representado em amarelo. Imagem gerada utilizando Pymol.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Já em Rgg2_{sd}, as estruturas publicadas na forma livre e ligada ⁵⁷ não permitem a proposta de um mecanismo de funcionamento, pois a molécula utilizada (ciclosporina) na formação do complexo proteína-peptídeo, trata-se de um inibidor de função e não o AI real do RT.

Novas estruturas de RT que incorporaram a família RRNPP tiveram suas estruturas reportadas recentemente.

NprR, que apenas cristalizou na ausência dos 60 resíduos N-terminais (DBD), não permitiu determinar o mecanismo estrutural específico induzido pelo peptídeo. Porém, a presença do peptídeo induz a formação de tetrâmeros, muito mais estáveis

do que a forma dimérica, apresentada na ausência do peptídeo, indicando ser o AI indispensável para obtenção da forma ativa deste RT.⁵¹

Apesar de também apresentar unidade funcional dimérica, o RT ComR (família Rgg), apresenta-se originalmente como monômero, onde o N-terminal está em contato com uma porção do domínio C-terminal. Essa interação é rompida após a ligação do AI, permitindo a formação do oligômero.⁶⁴ Curiosamente o N-terminal deste RT apenas se cruza (*domain swap*) para / ou após se ligar no DNA.⁶⁵⁻⁶⁶

Representantes Rgg *like* são encontrados em diferentes bactérias e, até o momento, duas classes de AI foram relacionadas: os pequenos peptídeos hidrofóbicos (SHP) e o peptídeo estimulador de sigX (XIP). Estes AI apenas foram relacionados aos Rgg estudados em alguns *Streptococcus*, permanecendo, o AI, desconhecido em diversos outros membros.^{46, 67}

O que sustenta a proposta de o AI para todos Rgg serem peptídeos é o fato de que, até o momento, apenas pequenos peptídeos foram relatados como AI em Gram positivos, e a cada novo membro apresentado, os peptídeos continuam sendo relatados. Os peptídeos ativos conhecidos possuem de cinco (5) a dezesseis (16) resíduos de aminoácido,^{46, 53, 67} podendo ser lineares ou cíclicos (Tabela 2).⁴²

Tabela 2 - Exemplo de peptídeos AI em bactérias Gram positivas

Família de RT	Espécie	Feromônio	Sequência de aminoácido
RRNPP	<i>Enterococcus faecalis</i>	cCF10	MKKYKRLLLMAG/ <u>LVTLVFV</u> /LSA
	<i>Enterococcus faecalis</i>	iCF10	MKTTLKKLSRYIAVV/ <u>IAITLFI</u>
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	SHP	MKKISKFLPILILAM/ <u>DIIIVGG</u>
Peptídeo cíclico	<i>Enterococcus faecalis</i>	GBAP	MKFGKKIKNVIEKRVAKVSDGVGTPRLN/ <u>QNSPNIFGQYMQTEKPKKNIEK</u>
Dupla glicina	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	CSP	MKNTVKLEQFVALKEKDLQKIKGG/ <u>EMRLSKFFRDFILQRKK</u>
	<i>Streptococcus anginosus</i>	CSP	MKKLFAKKEVVKKEVFEKELNDEQLDKIIGG/ <u>DSRIRMGDFSKLFGK</u>

/, região de clivagem do peptídeo. Os peptídeos ativos estão sublinhados

Fonte: Adaptada de JIMENEZ;FEDERLE⁶⁸; HÅVARSTEIN;COOMARASWAMY;MORRISON⁶⁹; CHANG et al.⁷⁰

1.4 ElrR / ElrA

Este é um trabalho, resultante da colaboração (USP-COFECUB) com a Dra. Pascale Serror, diretora de pesquisa de um dos grupos que compõe o *Microbiologie de l'Alimentation au service de la Santé* (Micalis), do *Institut National de la Recherche Agronomique* (INRA), França.

Em seus estudos acerca do *E. faecalis*, a pesquisadora descreve um fator de virulência tipo internalina, *Enterococcal leucine-rich repeat protein A* (ElrA), uma proteína de superfície contendo sinal de exportação na porção N-terminal, seguido por um domínio de repetições ricas em leucina (LRR) que geram uma estrutura de arquitetura tipo ferradura, e um domínio WxL na porção C-terminal, que promove associação com peptidoglicanos da parede celular. ElrA contribui para a virulência do *E. faecalis*, estimulando a resposta inflamatória do hospedeiro. O gene correspondente ao fator de virulência ElrA é encontrado em um *operon* que contém o gene para produção de outras proteínas associadas a membrana, mas sem função definida.²³

Em uma segunda publicação, apresentam a proteína codificada pelo gene vizinho ao promotor da transcrição do gene *elrA*, o regulador transcricional ElrR (*Enterococcal leucine-rich protein regulator*), responsável pela regulação da expressão de ElrA. Por manter características comuns, o RT ElrR foi considerado pertencente à família Rgg-*like* (posteriormente superfamília RRNPP). A apresentação da interação ElrR-DNA, por deslocamento em gel de poliacrilamida (EMSA) evidenciou uma pequena região do DNA (~140 bp), na qual ElrR realiza interação, para sua função.⁷¹

Com intuito de expandir o conhecimento sobre as características e função das proteínas ElrA e ElrR formou-se esta colaboração. Neste trabalho são apresentados nossas contribuições, na evolução do conhecimento sobre estas proteínas.

2 OBJETIVOS

Com a descoberta do fator de virulência ElrA e do RT associado, ElrR, em *E. faecalis*, um dos sistemas responsáveis pela invasão dessa bactéria ao hospedeiro ficou, até certo ponto, conhecido. A possibilidade de estudar as proteínas através de sua estrutura tridimensional permite observar os mecanismos que traduzem os sinais em função, auxiliando a desvendar as características da biomolécula.

O objetivo principal do trabalho foi o de obtenção das estruturas cristalográficas do regulador transcricional ElrR e do fator de virulência ElrA. A investigação da interação de ElrR com o sítio exato do DNA e a obtenção do AI de ElrR também foram direcionadores do trabalho.

2.1 Objetivos específicos

- Otimizar a expressão heteróloga (*E. coli*) e purificação das proteínas ElrR e ElrA;
- Determinar a estrutura tridimensional de ElrR e ElrA;
- Investigar a interação entre ElrR e o sítio de ligação do DNA;
- Determinar a estrutura tridimensional do complexo ElrR – DNA;
- Determinar a molécula regulatória (AI) de ElrR,
- Determinar da estrutura tridimensional do complexo ElrR – AI – DNA.

3 MATERIAIS e MÉTODOS

Durante o desenvolvimento deste trabalho de caracterização e determinação da estrutura tridimensional do RT ElrR^{*1} e do fator de virulência ElrA^{*1}, as seguintes metodologias foram utilizadas:

3.1 Preparação dos clones *E. coli* - ElrR_{6HIS} e *E. coli* - ElrA_{6HIS} e sequenciamento dos genes nos plasmídeos

Os plasmídeos contendo os genes que codificam ElrR_{6HIS} e ElrA_{6HIS}, cedidos pela Dra. Pascale Serror, foram transformados em bactérias *E. coli* DH5α e *E. coli* BL21 DE3, através de transformação por choque térmico. As bactérias foram inoculadas em placas de Petri contendo meio LB-ágar com 100 µg/mL ampicilina e incubadas a 37 °C por 12 h. Diferentes colônias foram inoculadas em tubos, individuais contendo caldo LB (5mL) com 100 µg/mL ampicilina (LB-amp), mantendo 37 °C, em agitação, 80 RPM, por 12 h.

Plasmídeos obtidos das diferentes colônias em *E. coli* BL21 foram extraídos utilizando kit de extração plasmidial *Wizard® Plus SV minipreps DNA purification system* (PROMEGA) seguindo protocolo do fabricante. Os plasmídeos foram gentilmente sequenciados pelo Grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas” IFSC–USP. Foram utilizados primers baseados nas sequências do promotor e terminador T7 (10 pmol), contidos nas extremidades do sítio múltiplo de clonagem do plasmídeo (pET28 modificado),⁷¹ o qual foi usado ~400 pmol para a polimerização. As sequências foram alinhadas em ClustalW⁷² e traduzidas em sequência de aminoácidos utilizando Expasy Translate.⁷³

^{*1} No decorrer do trabalho as proteínas são denominadas ElrR_{6HIS} e ElrA_{6HIS} pelo fato de possuírem fusão de hexahistidina.

3.2 Expressão heteróloga do regulador transcricional ElrR_{6HIS}

O protocolo de expressão da proteína ElrR_{6HIS} foi determinado após ensaios variando temperatura de expressão (20 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C), meio de cultura (LB, 2XYT), concentração de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) (1,2; 1,0; 0,5 mM) e densidade celular (densidade ótica 600 nm) igual a 0,6, 0,9 e 1,2 uA para indução da expressão. Realizou-se o cultivo das células em incubadora a 37 °C com rotação de 150 rpm e subsequente alteração da temperatura para expressão do gene de interesse.

3.2.1 Preparação de ElrR_{6HIS}-SeMet para determinação de fases cristalográficas

Nova transformação de bactérias *E. coli* BL21 (DE3) do plasmídeo contendo o gene *elrR*_{6HIS}, foi realizada igual descrito anteriormente. Após crescimento das colônias, em placa de Petri, as mesmas foram raspadas com 10 mL (5 mL + 5 mL) de meio M9 e transferidas para um volume final de 100 mL de meio M9 contendo 100 µg/mL de ampicilina (M9-amp), incubado 37 °C, 80 RPM até OD₆₀₀ = 0,6. Posteriormente, a cultura foi transferida para um volume final de 1000 mL de meio M9-amp sendo incubada a 37 °C e 150 RPM. Ao atingir OD₆₀₀ = 0,9, foram adicionados 684,0 µM L-lisina, 605,5 µM L-fenilalanina, 839,5 µM L-treonina, 381,0 µM L-leucina, 381,0 µM L-isoleucina, 457,0 µM L-valina e 306,0 µM L-selenometionina, mantendo em agitação por 10 min antes de induzir expressão com IPTG. O protocolo de expressão e purificação utilizado foi o mesmo que para o cultivo das células em meio LB.

3.3 Purificação de ElrR_{6HIS} heteróloga

Após centrifugação a 4660 xg por 40 min a 4 °C, o material celular foi separado e essa massa celular foi acondicionada a -20 °C por 12 h. Após esse período, as células eram suspendidas em tampão "A" (0,08 M Tris-HCl, pH 7,8, 0,25 M NaCl) para realizar o rompimento das membranas celulares por sonicação, em banho de gelo,

em equipamento *Sonifier FB505* (Fisher Scientific), durante seis minutos (30 s pulso, 30 s repouso). O conteúdo foi novamente centrifugado (20100 $\times$ g, 40 min, 4 °C), para utilização da fração solúvel em cromatografia de afinidade.

3.3.1 Cromatografia de afinidade

Utilizando de bomba peristáltica, a amostra a ser purificada era injetada em coluna *fast flow*, contendo Ni-NTA *agarose*, 5 mL (QIAGEN), em fluxo de 3 mL/min. Terminada a interação com a amostra, realizava-se a lavagem da coluna com três volumes de coluna (VC) de solução tampão “A” contendo 20 mM imidazol. A eluição da amostra da coluna era realizada variando a concentração de tampão “B” (0,08 M Tris-HCl, pH 7,8, 0,25 M NaCl, 0,5 M Imidazol), com gradiente crescente de imidazol, 0,02 – 0,5 M. Todas as etapas de limpeza foram realizadas utilizando equipamento de purificação em alta pressão AKTA *purifier* (GE), com monitoramento em $\lambda = 280$ nm e coleta automática de 1 mL/tubo.

O material recolhido dessa purificação tinha sua concentração ajustada para 1 mg/mL (27,6 μ M), utilizando tampão “A” em tubos de concentração AMICON 30 kDa (Milipore) em centrífuga 5810R (EPPENDORF), 2000 RPM, para então ser armazenado a 4 °C.

As medições de concentração das amostras, foram realizadas em equipamento *Nanodrop 2000* (Thermo Scientifics), fornecendo os dados de absorção molar e massa molecular calculados (ProtParam)⁷³, para quantificação da proteína em solução.

3.3.2 Cromatografia de exclusão por massa molecular

Para os ensaios biofísicos as amostras foram purificadas por cromatografia de exclusão por massa molecular, em coluna Superdex 200 *HiLoad* 16/600, previamente acondicionada com tampão “A” em equipamento AKTA *purifier* (GE) com detecção em $\lambda = 280$ nm. A concentração da amostra para injeção (6 - 8 mg/mL), foi realizada em tubos concentradores, igual citado anteriormente.

Utilizou-se também da técnica de cromatografia de exclusão por massa molecular para determinação da massa molecular dos oligômeros de ElrR_{6HIS} presentes em solução, após calibração da coluna, em iguais condições experimentais, utilizando soluções a 0,5 mg/mL dos “padrões de alto massa molecular 12 - 2000 kDa” (SIGMA-ALDRICH).

3.4 Expressão heteróloga do fator de virulência ElrA

O protocolo de expressão da proteína ElrA foi realizado em meio LB determinando as melhores condições após ensaios variando temperatura de expressão (20° C e 37° C), concentração de IPTG (1,0 mM e 2,0 mM) e densidade celular (OD₆₀₀= 0,6, 0,75, 0,9, 1.2) para indução da expressão. O cultivo das células foi realizado em incubadora a 37 °C com rotação de 150 rpm e subsequente alteração da temperatura para expressão do gene de interesse.

3.5 Purificação de ElrA_{6HIS} heteróloga

Ao centrifugar o conteúdo (4660 xg, 40 min, 4 °C), o material celular obtido foi suspenso em tampão “C” (Tris-HCl 50 mM pH 7,2, NaCl 50 mM). A purificação foi realizada em dois passos: quatro ciclos de choque térmico (nitrogênio líquido /banho térmico a 40 °C), seguido por sonicação em equipamento *Sonifier* FB505 (Fisher Scientific), durante 3 minutos (30 s pulso, 30 s repouso), em banho de gelo. O conteúdo lisado foi separado por centrifugação (20100 xg, 4 °C, 40 min) e a fração solúvel foi utilizada em cromatografia de afinidade.

3.5.1 Cromatografia de afinidade

A amostra a ser purificada foi injetada em fluxo de 3 mL/min em coluna *fast flow* contendo Ni-NTA agarose, 5 mL, (QIAGEN) utilizando uma bomba peristáltica. A seguir, realizou-se a lavagem da coluna com três VC de solução tampão “C”. A eluição da amostra da coluna foi realizada em 5 passos, variando a concentração de tampão “D” (Tris-HCl 50 mM pH 7,2, NaCl 50 mM, 0,5 M Imidazol): (1) limpeza, adicionando

gradualmente tampão “D” até concentração de 5 mM de imidazol, (2) mantendo essa concentração por 5 VC, (3) aumento linear da concentração de tampão “D” em 5 VC até concentração final de 20 mM de imidazol, (4) mantendo a concentração por mais 5 VC, para eliminação de elementos fracamente ligados à resina, e (5) aumento gradual de imidazol até 500 mM, para eluição da amostra de interesse (ElrA_{6HIS}). Todas as etapas, após inserção da amostra na coluna, foram realizadas utilizando equipamento AKTA *purifier* (GE) com monitoramento em $\lambda = 280$ nm e coleta automática de 1 mL/tubo.

As medições de concentração das amostras, foram realizadas em equipamento *Nanodrop 2000* (Thermo Scientifics), fornecendo os dados de absorção molar e massa molecular calculados (ProtParam),⁷³ para quantificação da proteína em solução.

3.5.2 Cromatografia de exclusão por massa molecular

Para continuação da purificação e observação dos oligômeros de ElrA presentes em solução, as amostras obtidas, pela cromatografia de afinidade, foram purificadas em cromatografia de exclusão por massa molecular em coluna Superdex 200 *HiLoad* 16/600, previamente acondicionada com tampão “C”. A amostra foi concentrada em tubos concentradores de 50 kDa Amicon (MILIPORE) para posterior injeção no equipamento de purificação em alta pressão AKTA *purifier* (GE) com coleta automática de 1 mL/tubo e detecção em $\lambda = 280$ nm. A concentração da amostra para injeção no equipamento foi realizada em tubos concentradores Amicon (MILIPORE) com membrana com corte de 50 kDa.

3.5.3 Eletroforese em gel nativo

A observação da variação dos estados oligoméricos das frações purificadas de ElrA_{6HIS}, por cromatografia de exclusão por massa molecular, foi realizada por eletroforese em gel nativo com gradiente, *PhastGel* 8-25 (GE) em tampão *PhastGel Buffer Strips – Native* (GE), em equipamento PhastSystem (AMERSHAN

PHARMACIA) utilizando 4 μ L de solução de ElrA_{6HIS} a 2 mg/mL (55,3 μ M). O gel foi corado com comassie blue G-50 (1%), solução aquosa de metanol 25% e ácido acético 5%.

3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

Os géis desnaturantes com 12% de poliacrilamida foram usados para realização da eletroforese. Os experimentos foram realizados em cuba de eletroforese, com voltagem constante (180 V), em tampão de corrida Tris salino (TBS), corando ao término da eletroforese com solução de comassie blue G-50 (0,2%) e descorando em água morna. O marcador de massa molecular *SDS-PAGE Standards Low Range* (BIO-RAD) foi utilizado nos géis SDS-PAGE apresentados neste trabalho.

3.7 Verificação da estabilidade/homogeneidade dos oligômeros em solução, utilizando espalhamento dinâmico de luz (DLS)

3.7.1 ElrR

As medições de espalhamento dinâmico de luz da amostra de ElrR_{6HIS} a 1 mg/mL em solução tampão “A” foram realizadas a 20 °C, em cubeta de quartzo de 2 μ L em equipamento *Zetasizer ZMV2000* (MALVERN) em triplicata, sendo cada medida o resultado da média de 12 leituras. Para verificação da manutenção do estado oligômero presente em solução, amostras de ElrR_{6HIS} na concentração de 1 mg/ml armazenadas a 4 °C em solução tampão “A” foram analisadas semanalmente durante 5 semanas.

Para obter indícios da estabilidade térmica de ElrR_{6HIS}, utilizou-se o mesmo equipamento aumentando a temperatura em etapas. A amostra era incubada 5 min, para cada temperatura. Iniciou-se a análise em 5 °C, aumentando de 5 em 5 °C, até 40 °C.

3.7.2 ElrA

As medições de espalhamento dinâmico de luz da amostra de ElrA_{6HIS} a 1 mg/mL em solução tampão “C” foram realizadas em cubeta de quartzo de 2 µL a 20 °C, em equipamento *Zetasizer ZMV2000* (MALVERN). Todas medidas foram realizadas em triplicata, sendo cada medida o resultado da média de 12 leituras.

3.8 Investigação da estrutura secundária de ElrR_{6HIS} por dicroísmo circular

Foram realizados ensaios de varredura, em espectroscopia de dicroísmo circular, em equipamento *CD Spectrometer J-815* (JASCO), utilizando λ entre 190–240 nm, a 20 °C, e de variação térmica (4 °C - 90 °C) monitorando em $\lambda = 220$ nm. A amostra de ElrR_{6HIS} foi utilizada na concentração de 0,02 mg/mL em tampão fosfato de potássio 20 mM em pH 7,5. A manipulação e deconvolução dos dados foram realizados utilizando os programas *Cdtool* e *DichroWeb*.⁷⁴⁻⁷⁵

3.9 Determinação de estrutura tridimensional de ElrR_{6HIS} e ElrA_{6HIS}

3.9.1 Cristalização

Os ensaios de cristalização foram realizados utilizando ElrR_{6HIS} na concentração de 30 mg/mL (829,3 µM), em tampão 0,03 M Tris/HCl, 0,05 M NaCl, em pH 7,5, distribuída em placas de 96 (x3) poços, com kit de cristalização *Morpheus® protein crystallization screen*.⁷⁶ As gotas sentadas, 1 µL + 1 µL, foram dispostas por robô *Cartesian Dispensing System honeybee 961/963* (GENOMIC SOLUTIONS). As placas foram armazenadas em sala climatizada a 18 °C.

Foram realizadas tentativas de co-cristalização dos possíveis complexos, ElrR_{6HIS}-dsDNA (2:1), utilizando fragmento de DNA de 25 pares de base (TAATTTGGACAGTTTGTCTAATTG), ElrR_{6HIS}-AI (Deoxicolato, ácido litocólico ou ácido linoleico) (1:1) e ElrR_{6HIS}-AI-dsDNA (2:2:1) utilizando os kits de cristalização

Morpheus® e JBScreen Nuc-ProS 1-4 (JENA BIOSCIENCE), dispondo as gotas de mesma forma descrita acima.

Os primeiros cristais de ElrA_{6HIS}, na concentração de aproximadamente 20 mg/mL, em solução tampão “C”, foram obtidos na condição G6 (15% m/v PEG6000, 5% m/v glicerol), do kit de cristalização PEG II *Suite* (QIAGEN) em caixa de cristalização montada e acondicionada de mesma forma descrita anteriormente. Após, realizou-se a otimização das condições de cristalização de ElrA_{6HIS} manualmente, através de alterações da solução de cristalização, investigando concentração de PEG, glicerol e pH, como apresenta a Tabela 3, em gotas sentadas (1 µL + 1 µL), em placas de cristalização de 96 (x2) poços.

Tabela 3 - Esquema de montagem de condições para otimização da cristalização de proteína ElrA_{6HIS}.

	PEG 8000			PEG 8000			PEG 8000		
	15%			17%			19%		
	GOL	GOL	GOL	GOL	GOL	GOL	GOL	GOL	GOL
	3%	6%	9%	3%	6%	9%	3%	6%	9%
pH 6.8									
pH 7.2									
pH 7.5									

PEG 8000 – Polietilenoglicol 8000Da; GOL – Glicerol

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.9.2 Obtenção de dados cristalográficos por difração de raio X

Os primeiros dados de cristais de ElrA_{6HIS} foram obtidos em difrações realizadas no sincrotron Diamond (Inglaterra), linha I24, com ambas as formas cristalinas. A difração de cristais para obtenção das fases cristalográficas foi realizada no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS), linha MX2 (Brasil), realizando difração de um cristal tipo placa, obtido em condição D12 - *Morpheus®* (12,5% m/v, PEG1000, 12,5% m/v PEG3350, 12,5% v/v MPD, 20 mM mistura de álcoois, 100mM bicina/Trizma pH 8,5). Foram irradiados 360° do cristal, com oscilação de 0,1° e 3s de exposição utilizando detector Pilatus. Pequenos cristais, crescidos em solução

contendo DNA alvo de ElrR_{6HIS} e possíveis ligantes (AI), bem como cristais de ElrA_{6HIS}, foram difratados no sincrotron Soleil (França), linha PROXIMA II, utilizando detector CCD e recursos de difração, como coleta helicoidal e determinação da região de melhor difração dos cristais. Os conjuntos de dados coletados, em Soleil, de um cristal obtido na condição de cristalização C1- Morpheus® (10% *m/v* PEG 20000, 20% *v/v* PEG MME 550, 30 mM NPS, 100 mM MES/imidazol pH 6,5) e outro obtido em condição de cristalização F12- Morpheus® (12,5% *m/v* PEG 1000, 12,5% *m/v* PEG 3350, 12,5% *v/v* MPD, 20 mM mistura de monossacarídeos, 100 mM bicina/Trizma pH 8,5), permitiram a obtenção das estruturas nos grupos espaciais P4₃2₁2 e P3₁2₁, as difrações, desses cristais, foram realizadas considerando a simetria do grupo espacial apresentado, coletando apenas um conjunto de dados de cada cristal.

Diversos cristais de ElrA_{6HIS} e ElrR_{6HIS} também foram difratados no laboratório de biologia estrutural (LBEST) IFSC-USP, utilizando ânodo rotatório (Cu²⁺).

3.9.3 Processamento dos dados, obtenção de fases e refinamento do modelo

Os conjuntos de dados de ElrR_{6HIS} foram processados utilizando XDS,⁷⁷ selecionando a resolução de corte, de acordo com as estatísticas de intensidade dos dados. No processamento do conjunto de dados utilizado para a obtenção das fases considerou-se os dados anômalos (quebra da Lei de Friedel). A determinação da posição dos átomos de selênio foi realizada por programa HYSS,⁷⁸ as fases cristalográficas e o crescimento da subestrutura foram determinados por programa SOLVE/RESOLVE,⁷⁹⁻⁸⁰ todos contidos no programa de resolução automática AUTOSOL,⁸¹ do pacote Phenix.⁸² A subestrutura obtida, foi ampliada utilizando programa BUCCANEER.⁸³⁻⁸⁵ O escalonamento dos dados de difração foram realizados nos programas Scala e Aimless.⁸⁵⁻⁸⁷ Todas substituições moleculares foram realizadas em Phaser.⁸⁸ As etapas iniciais de refinamento, em *phenix refine*,⁸⁹⁻⁹⁰ foram realizadas considerando fator B de grupos, coordenadas (x,y,z) e ocupância dos átomos. Nas últimas etapas do refinamento alterou-se o refinamento para fatores B individuais e no último refinamento considerando TLS,⁹¹ selecionando quatro grupos para cada monômero (N-term – 61; 62 – 94, 95 – 169; 170 – C-terminal). Em todo refinamento considerou-se a simetria não cristalográfica (NCS) da estrutura.

Os trabalhos de ajuste manual das estruturas entre as etapas de refinamento foram realizados em COOT.⁹² As imagens de estrutura apresentadas neste trabalho foram geradas em COOT⁹² e Pymol.⁹³

As sobreposições estruturais apresentadas neste trabalho foram realizadas em COOT,⁹² utilizando método de similaridade entre estruturas secundárias (SSM).

3.10 Indícios de formação do complexo ElrR_{6HIS}-DNA

3.10.1 Anisotropia de fluorescência

Para a realização da técnica faz-se necessário adição do fluoróforo em apenas uma das extremidades 5' do DNA dupla fita. Dentre os materiais existentes para a execução do trabalho o único DNA com as características necessárias era o seguinte fragmento, Biotina-5'-TTGTCTATACAAATTAATTTGGACAGTTTGTCGTAATTGAACC-3', produzido (SIGMA-ALDRICH) para os experimentos de ressonância plasmônica de superfície, sendo assim o fragmento utilizado para a ligação do fluoróforo. A fluoresceína maleimida foi usada como fluoróforo para ligação ao DNA utilizando o kit de marcação "5' EndTag™ Nucleic Acid Labelling System" (VECTOR LABORATORIES) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. A amostra de DNA (500 nM) preparada para o experimento possuía 10% das moléculas marcadas com o fluoróforo. Após realizada a marcação do DNA com o fluoróforo, conduziu-se o escaneamento em UV-VIS a fim de observar o comprimento de onda de maior absorção do fluoróforo. O valor determinado (494 nm) foi utilizado como comprimento de onda de emissão no equipamento.

O experimento foi realizado em espectrofluorímetro K2 Multiphase *sequence fluorimeter* (ISS) em geometria L, utilizando um canal de monitoramento. O λ de excitação foi de 494 nm, em cubeta de quartzo (300 μ L) com 1 cm de caminho óptico. A emissão foi monitorada na faixa de 515-530 nm, tomando 5 interações por medida de maneira a minimizar os erros experimentais. Foram realizadas medidas da interação de DNA (500 nM) com ElrR_{6HIS} nas concentrações 0, 15, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 180, 225, 275, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 e 2500 nM.

3.10.2 Ressonância plasmônica de superfície (SPR)

A ocorrência da interação entre moléculas, por SPR, é realizada em tempo real. Para o experimento uma das moléculas investigadas permanece fixa (ligante) no compartimento experimental (chip) permitindo realização de diversos ciclos de interação utilizando pouca quantidade de amostra (analito).

Os experimentos foram conduzidos em Biacore X, utilizando *Sensor Chip SA* (GE), e tampão HBS-N (0,01 M HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl - GE).

As sequências de DNA utilizadas no experimento foram sintetizadas, aneladas e, em uma das fitas complementares, inserido biotina na extremidade 5', pelo fabricante (SIGMA-ALDRICH). Com o material recebido preparou-se solução estoque na concentração de 2,1 μ M em água ultrapura autoclavada mantendo armazenada a -20 °C, e a solução utilizada para imobilização do DNA no chip em concentração final de 50 nM, em tampão HBS-N. Realizou-se a imobilização das sequências 'DNA controle negativo' (DNA_{NB}) Biotina-5'-ATTCTTCATGTATTAAGCATGTT-3' e 'DNA controle positivo' (DNA_{bind}) Biotina-5'-TTGTCTATACAAATTAATTTGGACAGTTTGTCTGTAATTGAACC-3', em chips distintos, mantendo em cada um dos chips uma das celas como branco (sem ligantes).

Os ensaios foram realizados utilizando soluções de ElrR_{6HIS} (em tampão HBS-N) em diferentes concentrações (30 nM, 100 nM, 180 nM, 300 nM, 450 nM e 700 nM), em fluxo de 50 μ L/min. As injeções de amostra foram realizadas com 120 μ L, permitindo assim dois minutos de interação. A fase de dissociação foi mantida por dez minutos, para observação da estabilidade dos complexos formados. Para a liberação dos pares restantes, ainda interagentes, no chip, foi utilizada solução de SDS 0,015%, realizando a regeneração do chip, para novo ciclo experimental.

Ao utilizar pela primeira vez o chip, o mesmo foi ativado com três injeções de solução 0,05 M NaOH, 0,5 M NaCl. Após a ativação realizou-se mais três injeções da solução de regeneração (0,015% SDS), para só então realizar a imobilização do ligante (DNA). Esse protocolo difere um pouco do recomendado pelo fabricante, que não indica necessidade de utilização da solução de regeneração. Esta etapa extra apresentou-se necessária, pois ao realizar apenas o protocolo recomendado pelo

fabricante, o material já ligado à matriz (DNA) foi removido durante a condução do experimento, fazendo com que se perdesse material e tempo.

Os resultados experimentais e ajustes das curvas foram obtidos utilizando software BIAevaluation V.3, ajustando as curvas através do modelo de dois estados de reação (com alteração conformacional).⁹⁵

3.11 Tentativa de obtenção do AI regulatório de ElrR

O grupo colaborador na França possui resultados que demonstram que alguns sais biliares estimulam a produção de ElrA em meio de cultura (dados não publicados). Devido à alta hidrofobicidade de grande parte das moléculas propostas, deoxicolato foi utilizado como controle positivo, e colato como controle negativo na maioria dos experimentos.

Após observar que NAKAYAMA et al, 2001⁴² obtiveram a molécula de regulação (AI) através da purificação do meio de cultura, do crescimento da bactéria, realizou-se uma tentativa parecida de obtenção da molécula, porém utilizando a fração citoplasmática, ao invés do meio de crescimento.

Em colaboração com a Dra. Pascale Serror, nas dependências do Micalis-INRA (Jouy em Josas, França), realizou-se a tentativa de obtenção do AI de ElrR, através de purificação do conteúdo celular de 7 L de cultura de *E. faecalis*, crescido em meio (M17glu/BHI) adicionando deoxicolato para induzir a expressão de ElrA. Por conta de se tratar de material ainda não publicado e de domínio do grupo de colaboração, o protocolo detalhado de crescimento das bactérias e as concentrações de indutores da expressão, utilizados na realização do experimento, não são aqui apresentados.

Após seguidos os protocolos de crescimento e expressão, realizou-se a centrifugação para obtenção das células, realizando lavagem (solução fisiológica) e nova centrifugação para o armazenamento (-20 °C) da massa de células. Para a purificação, as células foram suspendidas em tampão 0,025M Tris pH 7,5, adicionando dois tabletes do coquetel de inibidor de protease *cOmplete*[™] (ROCHE). A quebra das membranas foi realizada por pressão (2,5 kBar) em French press, e o conteúdo obtido centrifugado a 11000 xg, por 45 minutos, a 4 °C, para separação dos

restos celulares. Realizou-se precipitação das macromoléculas (DNA/RNA/proteína) com isopropanol (-20 °C, por no mínimo 30 min), e recuperação do material ainda em solução através de centrifugação a 16000 $\times$ g, por 45 minutos, a 4 °C. Utilizando de rotaevaporador realizou-se a evaporação do solvente a 25 °C, com fluxo de ar. Ao material quase seco, adicionou-se mesmo tampão até completar 50 mL de volume final. Como se trata provavelmente de um pequeno peptídeo realizou-se filtrações consecutivas com tubos de filtragem AMICON (MILLIPORE) passando a amostra por filtro de 50 kDa, depois por 30 kDa, 10 kDa e por final 3 kDa. O material filtrado na última etapa foi liofilizado e armazenado em tubo cônico de 50 mL vedado com parafilme (3M). O mesmo protocolo foi realizado em mais 7 L de meio de cultivo, adicionando colato, controle negativo da expressão de ElrA (dados ainda não publicados).

De volta ao LBEST (IFSC-USP), o material liofilizado foi suspenso em tampão Tris-HCl 0,025M pH 7,5 e novamente purificado por cromatografia, utilizando Sephadex G25 *desalting Hitrap* 5 mL (GE), realizando detecção em λ = 215, 259 e 280 nm, em equipamento AKTA *purifier* (GE). Com intuito de observar aproximadamente o volume de eluição de moléculas de 1000 kDa e de 3000 kDa, realizou-se prévia e separadamente a eluição de soluções contendo bradiquinina (1060 Da) e de cadeia B de insulina (3496 Da) na mesma coluna.

3.11.1 Interação ElrR_{6HIS} amostras purificadas

Para a observação inicial de ElrR_{6HIS} em complexo com o AI, caso presente na amostra, foi realizado espectro de absorção UV-VIS incubando 0,5 mg de ElrR_{6HIS} (60 μ M) em cada fração de amostra purificada, mantendo em agitação orbital durante a noite. No dia seguinte, as amostras foram purificadas em colunas de bancada contendo 100 μ L de resina de Ni²⁺ (QIAGEN), para cromatografia de afinidade. O material foi eluído com 300 μ L (três volumes de 100 μ L) de tampão “A” contendo 300 mM de imidazol. Os espectros UV-VIS foram realizados em *Nanodrop* 2000 (THERMO SCIENTIFICS).

4 RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1 ElrR

4.1.1 Confirmação da identidade de sequência do gene no plasmídeo e análises bioinformáticas através de sequência

Como resultado do sequenciamento do plasmídeo a sequência foi confirmada como 100% idêntica à fornecida pelos colaboradores, comparada por alinhamento em programa (clustalW)⁷² e, após traduzida em aminoácidos (EXPASY TRANSLATE),⁷³ apresenta, além dos 307 resíduos de ElrR, dois resíduos extras (G e S) no C-terminal da proteína, além da hexa-histidina propositalmente inserida nessa região. Apresenta também uma substituição, em relação ao gene EF2687 no segundo aminoácido, alterando o original resíduo lisina em um ácido glutâmico.

Utilizando a ferramenta ProtParam,⁹⁴ para análise através da sequência de aminoácidos, de ElrR_{6HIS}, obteve-se os valores teóricos de massa molecular ~36 kDa e ponto isoelétrico 5,2.

4.1.2 Expressão e purificação

Após otimização, o protocolo de crescimento das bactérias, e expressão da proteína ElrR_{6HIS}, foi realizada em meio LB-amp, 37 °C, mantendo em agitação (150 RPM) até obtenção de densidade ótica, determinada em 600 nm, (OD₆₀₀) = 0,9 – 1,0 uA, induzindo então para a expressão da proteína ElrR_{6HIS}, 1 mM IPTG, mantendo em agitação, 150 RPM, por 4 h, 30 °C. O estudo de otimização para a expressão heteróloga de ElrR_{6HIS}, resultou em ótimas quantidades de material, sendo obtidos, aproximadamente, 25 mg de proteína ElrR_{6HIS} para cada litro de meio de cultura LB (mg/L).

A eluição das moléculas de ElrR_{6HIS} em cromatografia de afinidade se dá em concentrações entre de 0,20 M e 0,25 M de imidazol, sem presença de outras moléculas, como observado no gel apresentado na Figura 3.

Figura 3 - Gel SDS-PAGE apresentando frações da expressão e purificação por cromatografia de afinidade de ElrR_{6HIS}. 1. Solúvel total; 2. Insolúvel total; 3. Não interagente; 4. Purificado. (Os itens “linha” correspondem às mesmas frações, de uma duplicata).

Fonte: Elaborada pelo autor.

O cromatograma de exclusão por massa molecular apresenta dois picos correspondentes a oligômeros de ElrR_{6HIS}, onde massa relativa ao pico de maior massa molecular (~360 kDa) é muito pequena em relação ao total de ElrR_{6HIS} dimérica, apresentado em pico bem definido (Figura 4b).

Ao realizar calibração da coluna Superdex 200 16/600 ($r^2 = 0,988$), nas mesmas condições do experimento, obteve-se a massa calculada do dímero, em torno, de 74 kDa, muito próxima da massa teórica do dímero, de 72,4 kDa.

Figura 4 - Cromatograma de gel filtração, Superdex 200 HiLoad 16/600, obtido como resultado da segunda etapa de purificação de ElrR_{6HIS}. Os picos identificados são correspondentes a: a. agregado de proteínas ElrR_{6HIS}; b. ElrR_{6HIS} dímero; c. não identificado.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.3 Estabilidade e homogeneidade da amostra determinada por espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Através do DLS, foi possível observar que a proteína ElrR_{6HIS} na forma dimérica purificada mantém estável o estado oligomérico em solução por mais de 30 dias em tampão “A”, sendo a massa calculada sempre próxima do valor do dímero quando armazenada a 4 °C na concentração de 1 mg/mL. As amostras de ElrR_{6HIS} dimérica purificadas para experimentos e armazenadas nas condições descritas acima, eram apenas utilizadas no espaço de tempo de um mês.

Ao conduzir ensaio de estabilidade térmica, ElrR_{6HIS} apresenta variação no raio hidrodinâmico de uma parte de sua população, aumentando assim a polidispersividade da amostra, porém, ainda se demonstra preponderantemente dimérica em temperaturas até 30 °C, observando-se a agregação completa da proteína a partir de 40 °C.

Por mais que a solução apresente diversas partículas, a massa do dímero é preponderante e correspondente a mais de 98% da amostra como observado na Figura 5.

Figura 5 - Gráficos superpostos de distribuição de moléculas em solução de ElrR_{6HIS}, por DLS, em diferentes temperaturas. Ambos os gráficos correspondem a um mesmo ensaio porém, o gráfico à esquerda apresenta a distribuição de partículas em solução, enquanto que no gráfico à direita está representada a correspondência de massa destes mesmos picos, componentes da solução.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As amostras quando concentradas para os ensaios de cristalização apresentaram-se pouco polidispersas, demonstrando-se ótima para continuação dos experimentos.

4.1.4 Cristalografia

Primeiros cristais de ElrR_{6HIS} obtidos eram pequenos e foram observados após 24 h e cristais de maiores dimensões foram observados a partir de 3 a 7 dias, em armazenamento a 18 °C. As temperaturas de incubação de 4 °C e a temperatura ambiente (entre 22 °C e 25 °C) não demonstraram resultados tão satisfatórios de cristalização quanto a 18 °C.

Utilizando o kit Morpheus®,⁷⁶ em variadas condições de cristalização, ocorreu a formação de dois tipos de cristais (Figura 6). Na maioria das vezes, as gotas que apresentaram uma forma cristalina não apresentavam a outra. Porém, esporadicamente, uma mesma gota apresentava ambas formas cristalinas. Desta forma não foi possível determinar algum padrão para as diferentes formas de crescimento dos cristais, nem como induzir o crescimento de uma forma cristalina ou de outra.

Figura 6 - Formas cristalinas de ElrR_{6HIS} observadas em diferentes condições de cristalização do kit de cristalização Morpheus®. A) Cristais octaedros com grupo espacial $P4_32_12$ apareceram em poucas condições de cristalização; B) Cristais em placas com grupo espacial P1 compõe a maioria dos cristais formados.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Ainda um terceiro tipo de cristal foi obtido nas tentativas de co-cristalização entre ElrR e as distintas moléculas utilizadas como AI, bem como com o fragmento de DNA proposto (de 25 bp apresentado mais adiante).

Os primeiros dados cristalográficos de ElrR_{6HIS} obtidos no *Synchrotron DIAMOND* (Inglaterra), linha I24, apresenta que placas e octaedros correspondem aos

grupos espaciais P1 e P4₃2₁2 respectivamente. O tratamento destes conjuntos de dados, apesar de ter boa estatística (R_{merge} , R_{pim} , Multiplicidade etc),⁸⁷ apresentava bastante anisotropia, em um dos eixos, nos dados no grupo P1 e baixa resolução no grupo P4₃2₁2 (3.5 Å).

Com esses conjuntos de dados conseguimos coletar informações referentes ao grupo espacial, tamanho de cela e quantidade de possíveis moléculas nas unidades assimétricas, determinando que em P1 deveriam existir dois dímeros enquanto que em P4₃2₁2 apenas um dímero.

4.1.4.1 Determinação das fases cristalográficas de ElrR_{6HIS}

Na tentativa de resolver o problema das fases cristalográficas e assim resolver a estrutura tridimensional de ElrR, inicialmente optou-se por realizar substituição molecular.⁹⁶⁻⁹⁷

Para a determinação de um bom modelo de busca, obteve-se informações sobre a estrutura secundária de ElrR_{6HIS} por dicroísmo circular. Após o tratamento dos dados, observou-se que a estrutura de ElrR_{6HIS} é composta por, 72,3% de hélices alfa, 0,7% de fitas beta e 17% de regiões desestruturadas (voltas e conexões). Ou seja, uma proteína formada apenas por alfa-hélices, como predito para a família de RT Rgg (RRNPP).^{71, 98}

Com essa informação, foram selecionadas estruturas de reguladores transcricionais (homólogos estruturais) com apenas alfa-hélices e que possuíam a estrutura terciária predita para a família RRNPP, para utilizar como modelo de busca no método de substituição molecular.

Utilizando a sequência de aminoácidos de ElrR_{6HIS} em pesquisa de bioinformática com a ferramenta FASTA⁹⁹ foram encontrados, até o momento, dois reguladores homólogos membros da família RRNPP com estrutura depositada no PDB. Porém, estes apresentam baixa identidade de sequência com ElrR_{6HIS} sendo menor de 12%, o que torna a resolução das fases e obtenção da estrutura muito difícil, se não impossível, pelo método proposto.

Ainda assim, foram realizadas inúmeras tentativas de obtenção da estrutura por substituição molecular, utilizando como modelo inicial, as estruturas dos reguladores PlcR, de *Bacillus turingiensis* e *Bacillus cereus* (PDBid. 3U3W e 4FSC), e PrgX de *Enterococcus faecalis* (PDBid. 2AXZ, 2AW6 e 2AXU).

Apesar das diversas formas e possibilidade de busca dos diferentes programas que foram utilizados na tentativa da obtenção de uma solução para as fases cristalográficas, nenhum modelo satisfatório foi obtido através deste método.

É possível que a baixa identidade apresentada entre as sequências de aminoácidos de ElrR_{6HIS} e dos modelos utilizados seja o motivo da não obtenção de um resultado satisfatório, utilizando o método de substituição molecular, que se baseia na similaridade entre a estrutura de referência e a estrutura a ser obtida, sendo que quanto mais idênticas suas estruturas primárias são, menor é o desvio estrutural que se espera haver entre elas.⁹⁶

Não obtendo resultados pelo método de substituição molecular optou-se pela obtenção das fases experimentalmente.

Inicialmente realizou-se o crescimento dos cristais em condições de cristalização contendo átomos de platina (Pt), mercúrio (Hg), iodo (I) e europium (Eu) para tentativa de substituição isomórfica simples e múltipla.¹⁰⁰ Obteve-se cristais crescidos na presença de I e Hg e Pt. Estes foram irradiados no LBEst e os conjuntos de dados foram coletados e processados. Ao realizar a pesquisa dos átomos pesados, os mesmos não foram detectados.

Como última tentativa, para obtenção de fases, utilizou-se de substituição das metioninas presentes na estrutura da proteína, dez em cada monômero, por selenometioninas (SeMet).

Para tanto realizou-se a expressão de ElrR_{6HIS}, em meio quimicamente controlado (meio M9-salt) disponibilizando os aminoácidos necessários, porém, adicionando SeMet em substituição às metioninas, esperando que essas fossem utilizadas para a produção das proteínas pela maquinaria da bactéria.

O procedimento de expressão foi o mesmo protocolado anteriormente, com o meio LB, tendo rendimento de aproximadamente 15 mg/L, um pouco menor que o obtido em meio LB (25 mg/L).

Repetindo a metodologia de cristalografia, os cristais $\text{ElrR}_{6\text{His}}\text{-SeMet}$ cresceram com as mesmas características, não distinguindo dos primeiros resultados.

Anteriormente à coleta de dados, determinou-se, a energia de máxima absorção dos átomos de selênio em escaneamento por fluorescência (Figura 7). Os cristais de $\text{ElrR}_{6\text{His}}\text{-SeMet}$, de grupo espacial P1 e $P4_32_12$ foram irradiados utilizando energia de emissão, do raio X, com $\lambda = 0.97906 \text{ \AA}$ (ou $\sim 12665 \text{ keV}$).

Figura 7 - Espectro de absorção, por fluorescência, do átomo de selênio, realizado em cristal $\text{ElrR}_{6\text{His}}$, no LNLS, anteriormente à coleta de dados a fim de determinar a energia de emissão do raio X na difração, para obtenção das fases experimentais.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Foi realizada a coleta de dados cristalográficos de apenas um cristal, pertencente ao grupo espacial P1, pois os de grupo espacial $P4_32_12$ apresentaram pior resolução. A irradiação de raios X no cristal foi realizada com $0,1^\circ$ oscilação do cristal, 3 s de exposição, 360° (irradiados), resultando em 3600 imagens.

O conjunto de imagens foi processado, separando os dados anômalos obtendo como melhor resolução $2.55 \text{ \AA}$, com bons parâmetros estatísticos.¹⁰¹ O processamento pelo programa (XDS) apresentou dados anômalos consideráveis até $3.2 \text{ \AA}$, sendo essa a resolução de corte, para o processamento dos dados, na obtenção das fases.

Como resultado do programa AUTOSOL,⁸¹⁻⁸² a busca dos átomos de selênio foi realizada com resolução em 3.6 Å e foram encontrados 41 átomos de selênio na unidade assimétrica. Na continuação do protocolo o programa gerou uma subestrutura com 917 resíduos de aminoácido (em 42 fragmentos, 0.32 R_{work} , 0.37 R_{free}). Essa subestrutura foi ampliada em BUCCANEER,⁸³⁻⁸⁵ obtendo 1233 resíduos de aminoácidos em 23 fragmentos, condizentes com ~98% da estrutura.

4.1.4.2 Determinação das estruturas de ElrR_{6HIS}

Ao detectar que as fases encontradas eram constantes e se adequavam à subestrutura gerada, utilizou-se o monômero mais completo dessa subestrutura, para utilizar como modelo inicial em uma substituição molecular utilizando conjunto de dados de ElrR_{6HIS}, também contendo selênio, com maior resolução (2.15 Å) coletado no LBEst.

O motivo de não completar o refinamento da estrutura nos dados do modelo determinado pelas fases experimentais está no fato de o número de difrações obtidas ser muito baixo (44.390) dado o número de átomos presentes na cela (9.927), é importante ressaltar que os valores diferem dos apresentados na Tabela 4 por serem os utilizados na tentativa de refinamento. Além deste, ao considerar a ausência de simetria rotacional apresentada pelo grupo espacial P1 o refinamento não seria confiável.

Os dados de coleta dos cristais e refinamento dos modelos cristalográficos são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Dados de difração e refinamento das estruturas cristalográficas de ElrR_{6HIS}.

Dados	Métodos			
	SAD	MR	MR	MR
Grupo espacial	P1	P1	P4 ₃ 2 ₁ 2	P3 ₁ 2 ₁
Dimensões de cela <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> , α , β , γ .	70,46 Å; 75,40 Å; 83,94 Å; 113,09°; 90,01°; 104,24°	70,80 Å; 75,33 Å; 85,28 Å; 112,99°; 89,93°; 103,88°	108,71 Å; 108,71 Å; 144,37 Å; 90°; 90°; 90°	105,20 Å; 105,20 Å; 124,25 Å; 90°; 90°; 120°
Detector	PILATUS 2M	RIGAKU RAXIS IV ⁺	ADSC QUANTUM 315r	ADSC QUANTUM 315r
Comprimento de onda (Å)	0,97906	1,541	0,9801	0,9801
Resolução (Å)	48,32 - 2,55	39,04 – 2,15 (2,27 – 2,15)	60,14 – 2,28 (2,35 – 2,28)	62,1 – 2,9
Multiplicidade	3,5	2,9	8,0	4,5
R _{meas} (%)	9,8	6,2	6,8	11,6
CC _(1/2)	0,993	0,997(0,50)	0,999 (0,5)	0,997
Completeza (%)	96,00	89,8 (61)	99,9 (97,5)	99,9
Completeza anômala (%)	90,5	-	-	-
Reflexões totais	166641	185116	321458	82034
Reflexões únicas	47961	76473	40129	18074
I / σ (I)	9,7	8,6 (1,6)	18,1 (1,5)	10,5
Refinamento				
Reflexões utilizadas para o refinamento		73398	40121	18042
R _{Work} (%)		19,60	19,60	21,04
R _{Free} (%)		24,20	22,73	25,53
No. átomos da proteína		10029	4948	5014
No. átomos total		10218	5047	5111
B (Å ²) todos átomos		80,0	68,0	
Erro de coordenada (Å)		0,34	0,32	0,41
Erro de fase (°)		30,60	24,94	24,86
Ramachandran				
Favorecido (%)		97,77	98,49	94,81
Permitido (%)		1,32	1,34	3,85
Não permitido (%)		0,91	0,17	1,34
Clashscore		7,39	6,79	8,55
RMSD da geometria ideal				
r.m.s. distância ligação		0,009	0,015	0,004
r.m.s. ângulo de ligação		1,140	1,585	0,927
PDB id		5V5T	5V5U	

Fonte: Elaborada pelo autor.

Ao todo, três estruturas foram obtidas provenientes de três diferentes tipos de cristais de ElrR_{6HIS}, em grupos espaciais distintos. Porém, em nenhuma ocorreu presença de outras moléculas além da proteína.

As estruturas de ElrR_{6HIS} nos grupos espaciais P4₃2₁2 e P3₁21, foram determinadas por substituição molecular ⁸⁸ utilizando como modelo inicial, um monômero da estrutura de ElrR_{6HIS} no grupo espacial P1, previamente refinada.

4.1.5 A estrutura tridimensional de ElrR_{6HIS}

ElrR apresenta estrutura quaternária homodimérica, sendo cada protômero formado exclusivamente por alfa-hélices, somando 16 hélices.

A estrutura de ElrR_{6HIS} apresenta, como esperado, o enovelamento predito para os reguladores da família RRNPP ⁵⁴ (Figura 8). O domínio N-terminal é formado pelas alfa-hélices $\alpha 1$ a $\alpha 4$ de quatro alfa-hélices, onde está presente o motivo HTH (alfa-hélices $\alpha 2$ e $\alpha 3$), seguido por uma conexão de 16 resíduos de aminoácidos com 1,5 a 2 voltas de alfa-hélice (alfa-hélice $\alpha 5$), que conecta o N-terminal ao C-terminal, em *domain swapping*,⁶⁶ cruzando o eixo de pseudosimetria do dímero.

O domínio C-terminal é composto por 11 hélices ($\alpha 6$ - $\alpha 16$), formando uma estrutura com enovelamento, característico, do domínio TPR-*like*, apresentando 5 conjuntos TPR ($\alpha 6$ - $\alpha 7$; $\alpha 8$ - $\alpha 9$; $\alpha 10$ - $\alpha 11$; $\alpha 12$ - $\alpha 13$; $\alpha 14$ - $\alpha 16$) que, provavelmente, abrigam o sítio de interação do AI no espaço entre as alfa-hélices $\alpha 6$, $\alpha 8$, $\alpha 10$, $\alpha 12$ e $\alpha 16$.⁵⁴

Apesar de, pela proximidade, poder fazer parte do domínio N-terminal, a estrutura de conexão entre os domínios (alfa hélice $\alpha 5$) será aqui tratada por *link*. Não apenas por realizar a ligação dos domínios cruzando o eixo de pseudosimetria do dímero, mas também por realizar interação com todos os domínios da estrutura.

Apesar da similaridade de estrutura e função da região C-terminal dos RRNPP com o domínio TPR, o programa de predição a partir de sequência, TPRpred ¹⁰³ não caracteriza o domínio C-terminal de ElrR e de outras RRNPP como tal ⁵¹⁻⁵³, sendo caracterizado, como muitos outros, dentro da superfamília de domínio TPR-*like* [SCOPe 48452].¹⁰⁴

Figura 8 - Representação da estrutura cristalográfica dimérica de ElrR_{6HIS} em cilindros. A coloração de um dos monômeros foi realizada de acordo com a escala de cores do espectro visível, seguindo do N-terminal (azul) para C-terminal (vermelho). Em A, a linha pontilhada inserida no dímero, representa o eixo de pseudosimetria da estrutura, enquanto que a estrela indica o provável sítio de interação do Al. Imagem obtida em programa Pymol.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Observando o domínio C-terminal na estrutura de ElrR_{6HIS} apresentado em destaque na Figura 9, é possível distinguir que existe uma maior interação entre algumas alfa-hélices, formando dois grupos distintos. O primeiro grupo abriga as alfa-hélices $\alpha 6$ a $\alpha 11$ e o segundo grupo abriga as alfa-hélices $\alpha 12$ a $\alpha 16$. Essa aparente existência de dois grupos leva a proposta da separação do domínio C-terminal de ElrR em dois subdomínios, um central e um C-terminal.

Ao verificarmos essa proposta utilizando a ferramenta DynDom,¹⁰⁵⁻¹⁰⁶ que realiza busca de grupos quase-rígidos em estruturas, obteve-se o mesmo resultado, contribuindo para a proposta de caracterização do domínio TPR-*like* de ElrR como composto por domínios distintos.

Figura 9 - Apresentação dos subdomínios que compõe o domínio C-terminal de ElrR. **A)** Dímero de ElrR_{6HIS} é apresentado com um monômero destacado em azul, de modo a melhor observar o domínio TPR-*like*; **B e C)** a proposta de “separação” deste em dois subdomínios, destacados nas elipses, central (**B**), composto pelas alfa-hélices $\alpha 6$ a $\alpha 10$, e C-terminal (**C**), composto pelas alfa-hélices $\alpha 11$ a $\alpha 16$. Imagens obtidas em programa Pymol.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Essa distribuição, em dois núcleos, do domínio C-terminal é única dentro dos RRNPP apresentados até o momento. O relato mais próximo encontrado na literatura é a consideração das duas últimas hélices do domínio C-terminal de Rgg2_{sd}, PlcR e PrgX, como um subdomínio (*cap subdomain*), gerador, ou iniciador, das alterações conformacionais observadas pós a interação com o AI.^{54, 57, 63}

A região N-terminal das RRNPP é onde se concentra a maior parte da conservação na sequência de resíduos de aminoácidos. A Figura 10 apresenta o

alinhamento dos oitenta primeiros resíduos de alguns dos membros, o que levou à sugestão de que os resíduos de aminoácido R38 e R42 de ElrR são os responsáveis pela interação com as bases nitrogenadas do DNA.

```

2AXU  -----MFKIGSVLKQIRQELNYHQIDLYSGIMSKSVYIKVEADSRPISVEELSKFSE 52
4YV6  -----MDKELGKTLRRLRQGKQVSISSLADEHLKSQISRFEFGESEISCSRLNLLD 53
5V5T  MEQKEYMEYRPLGEEIERIRKGNIPLRVFDENGVSRSYQRFVQGNSELRIDLAIIVE 60
4FSC  -----MQAEKLGSEIKKIRVLRGITOKOLSENICHOSEVSRIESGAVYPSMDILQGIAA 54
          :*. :.:*          : . . . . . * .

2AXU  RLGVNFFEILNRAGMNTKSVNETGKEKL      80
4YV6  KLNITIDEFVSTHSKTHTHFTLLSRV--    80
5V5T  ILSISPMEMTEKLTPMSKTV-----    80
4FSC  KLQIPIIHFYEVLIYSDIERKKQFKD---    80
          * : . . . . . : . . .

```

Figura 10 - Alinhamento de sequência de aminoácido de algumas das RRNPP, destacando o motivo HTH (caixa azul) e os resíduos de interação com o DNA, em vermelho.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A proposta apresentada pelo alinhamento de sequência, concorda com o observado na estrutura de ElrR_{6HIS}, que apresenta a cadeia lateral destes resíduos de arginina apontando para o solvente, livres para a interação com o sulco maior do DNA como observado na sobreposição das estruturas de ElrR_{6HIS} com a estrutura do homólogo PlcR em complexo com DNA (PDBid: 3U3W) (Figura 11).

Realizando mutação nesta sequência de DNA, alterando a sequência de bases correspondente a região de interação de ElrR, pôde-se determinar mais especificamente as possíveis bases de interação, ou o *box* de ElrR (Figura 12).

Figura 11 - Alinhamento estrutural de ElrR_{6HIS} P1 (verde escuro) e P4₃₂₁₂ (verde claro), apresentando os possíveis resíduos de arginina responsáveis pela interação com o DNA (A), e (B e C) com a estrutura do complexo PlcR-DNA (amarelo) confirmando a possibilidade de interação destes resíduos com o DNA. Figura obtida em programa Pymol e sobreposição (SSM) em COOT.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5' TAATTTGGACAGTTTGTCGTAATTG 3'
3' ATTAAACCTGTCAAACAGCATTAAC 5'

Figura 12 - Região do DNA (25 bp) de ligação de ElrR, apresentando o possível sítio de interação semi-palindrômico.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.5.1 Regiões de estabilização do dímero

Os contatos que promovem a estabilização dos homodímeros de ElrR_{6HIS}, estão distribuídos entre várias interações fracas, e algumas fortes, que realizam o contato dos diferentes domínios, entre os distintos protômeros.

ElrR_{6HIS} apresenta cinco regiões de contato intermonoméricos ao todo:

- contatos hidrofóbicos entre cadeias laterais, e ligações de hidrogênio entre cadeias principais no início do domínio C-terminal (I195 – I197),
- um bolsão hidrofóbico formado pelos resíduos N240, W242, R243, L246, L282, F281, de ambos monômeros, localizado mais no final do domínio C-terminal;
- interações realizadas entre os três domínios com o *link*;
- no contato realizado entre os domínios N-terminal e subdomínio central;
- no contato entre os N-terminais.

A interação apresentada no domínio C-terminal, em destaque na Figura 13A, aparenta ser o local de maior contribuição para a estabilidade do dímero, assim como apresentado para as outras RRNPP.⁵³⁻⁵⁴ Mais especificamente, o resíduo de aminoácido W242 em ElrR aparenta ser o principal componente desta interação.

Figura 13 - Representação da região C-terminal de ElrR_{6HIS}, destacando as interações entre monômeros. A) os resíduos representados em “palitos” amarelos formam um bolsão hidrofóbico na região interna de contatos entre as hélices $\alpha 14$ - $\alpha 16$, os palitos em azul identificam um dos monômeros, nesta região. O destaque no círculo azul indica o contato mediado entre as isoleucinas I195 e I197. O destaque no círculo vermelho, foi ampliado em B e demonstra o contato entre monômeros, mediado pelos resíduos de aminoácido N240, W242, R243, L246, L282, F281. Imagens geradas em programa Pymol.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As interações apresentadas pelo *link* são várias e ocorrem com as três regiões da estrutura de ElrR_{6HIS}. Aparentemente, essa região bastante variável na família

RRNPP aparenta ser um dos influenciadores na alteração da posição do domínio N-terminal por propagação após a interação do AI no domínio C-terminal.⁵⁷

Com relação aos contatos intermonoméricos, o destaque apresentado na estrutura de ElrR_{6HIS} está naqueles realizados entre os domínios N-terminal e o subdomínio central, representado na Figura 14, que abrange grande área de contato neste regulador (Tabela 5).

Figura 14 - Contatos intermonoméricos realizados por resíduos localizados no domínio N-terminal e subdomínio central. A) Representação dos resíduos em esferas desta região de contato entre os monômeros. B), destaque das interações entre alfa-hélice $\alpha 2$ de um monômero (amarelo) e conexões entre $\alpha 7$ - $\alpha 8$ e $\alpha 9$ - $\alpha 10$ com outro monômero (verde). Apesar de a densidade eletrônica (aqui em $1,2\sigma$) não ser completa para todas as cadeias laterais, é suficiente para confirmar os contatos apresentados. Imagens obtidas nos programas Pymol (A) e COOT (B).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os contatos desta região são, em grande parte, interações fracas: ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Porém, algumas ligações iônicas estão presentes (R194-E15; T161/N164-K23; K118-N33-E60), conferindo uma forte interação entre os domínios N-terminais e subdomínios centrais.

Tabela 5 - Comparação dos contatos intermonoméricos e das áreas de interface da estrutura de ElrR_{6HIS} e dos homólogos estudados, considerando a completa e os primeiros 180 resíduos de aminoácido calculados em PISA.¹⁰⁶

Estruturas	No. de aa ² em contato entre monômeros (estrutura completa)	No. de aa em contato entre monômeros (N-terminal-aa180)	Área de interface não acessível ao solvente (Å ²) (estrutura completa)
ElrR-5V5T	97 (32,6%)	62 (20,8%)	3945,7
PrgX-2AXU	75 (25%)	54 (18,0%)	2788.1
PrgX -2AW6	76 (26,6%)	55 (19,3%)	2804,3
PlcR - 4FSC	49 (18,4%)	17 (6,4%)	1620,2
PlcR - 3U3W	54 (19,3%)	35 (12,5%)	1933.9
Rgg2 _{sd} - 4YV6	69 (25%)	49 (17,7%)	2610,7

Fonte: Elaborada pelo autor.

O contato entre os dois domínios N-terminais é realizado através de interações hidrofóbicas e entre cadeias principais dos resíduos de aminoácido L50 e I52, e possivelmente através de uma ponte salina formada entre as cadeias laterais dos resíduos E49 e R51, que coincidem com a posição das cisteínas que formam ponte dissulfeto presentes na estrutura de Rgg2_{sd}.⁵⁷ Infelizmente, a densidade eletrônica desta região (Q45-R51) é bastante fraca, principalmente nas cadeias laterais dos resíduos, o que impede a confirmação desta ponte salina.

Algumas regiões das estruturas, principalmente no grupo espacial P1, apresentam pouca densidade eletrônica em boa parte das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos voltados para as partes com maior acesso ao solvente e em algumas conexões entre alfa-hélices. Além da região já citada anteriormente no N-terminal entre as alfa-hélices $\alpha 3$ e $\alpha 4$ (Q45-R51), regiões como o *link*, após a primeira volta da alfa-hélice $\alpha 5$ (K72) até o início da alfa-hélice $\alpha 6$ (K78), e na conexão entre as alfa-hélices $\alpha 6$ e $\alpha 7$ (S92-E97) dos monômeros A e D (P1), também apresentam pouca densidade eletrônica.

² aa- resíduos de aminoácido

4.1.6 ElrR_{6HIS} apresenta grande flexibilidade

Ao realizar a sobreposição dos quatro monômeros de ElrR_{6HIS} que compõe a unidade assimétrica (UA) do cristal, grupo espacial P1, foi possível observar grandes diferenças em partes específicas da estrutura (Figura 15), chegando a 1.10 Å de RMSd entre os monômeros mais discrepantes. As diferenças são verificadas nos domínios HTH, no *link* e na extremidade mais externa com relação ao eixo de pseudosimetria das primeiras hélices do subdomínio central ($\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 8$) e de hélices do C-terminal ($\alpha 12$, $\alpha 15$ e $\alpha 16$).

A consideração dos altos fatores de temperatura apresentados em algumas regiões da estrutura e a grande diferença entre os monômeros da UA, direcionaram a realização do refinamento dos parâmetros de deslocamentos atômicos (ADP, do inglês *Atomic Displacement Parameter*), por TLS (do inglês, *translation, libration, screw*), separando quatro grupos quase-rígidos para cada protômero da estrutura (N-terminal - 61; 62 - 94; 95 - 169; 170 - C-terminal). Esse passo foi determinante para a melhora dos erros deste modelo cristalográfico (relação $R_{\text{free}} / R_{\text{work}}$).¹⁰⁸

Na Figura 16 pode-se observar que a representação dos deslocamentos atômicos gerados, pelo refinamento, demonstra grande anisotropia em átomos localizados, principalmente, nas regiões mais expostas ao solvente, coincidindo com as regiões de maior discrepância na sobreposição estrutural (Figura 15).

Figura 15 - Sobreposição estrutural dos monômeros que compõe os dímeros de ElrR_{6HIS} apresentados na unidade assimétrica do grupo espacial P1. A) Visualização dos subdomínios central e C-terminal, cadeia A (verde), cadeia B (ciano), cadeia C (magenta), cadeia D (amarelo), enquanto o N-terminal é apresentado em B. As setas indicam as regiões que apresentam os maiores desvios entre os monômeros. Imagens geradas em programa Pymol.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para as estruturas de ElrR_{6HIS} obtidas em outros grupos espaciais, o refinamento considerando TLS^{91, 107} não apresenta o deslocamento atômico observado na estrutura de grupo espacial P1, não melhorando os erros relativos destas estruturas durante o refinamento. Apesar de não melhorar os erros do modelo, é possível observar na estrutura do grupo espacial P4₃2₁2 grande isotropia na região do motivo HTH e no *link*.

Figura 16 – A. Representação da anisotropia dos átomos da cadeia principal da estrutura de ElrR_{6HIS} grupo espacial P1 (dímero AD); B. isotropia B) dos átomos da cadeia principal da estrutura de ElrR_{6HIS} grupo espacial P4₃₂₁₂. Cada monômero das estruturas está representado em cores diferentes. Imagens obtidas em programa CCP4mg

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os altos fatores de temperatura observados nas regiões das estruturas que apresentam as diferenças estruturais apresentadas entre os monômeros, em grupo espacial P1, levam a clareza da flexibilidade intrínseca deste regulador, sendo evidente ainda na forma cristalina.

A apreciação dos elevados fatores de temperatura da estrutura de ElrR_{6HIS} demonstra a grande flexibilidade apresentada por esse RT.

4.1.7 A estrutura cristalográfica de ElrR nos diferentes grupos espaciais

Observando o empacotamento dos dímeros nos cristais de grupo espacial $P4_32_12$ e $P3_121$, é possível reparar que a concavidade do domínio TPR-*like* de diferentes dímeros estão em contato (Figura 18). Essa interação reduz o grau de liberdade das moléculas, reduzindo assim o fator de temperatura do cristal que ainda assim, permanece grande. Aparentemente, apesar de pior resolução dos dados, esse contato também permitiu apreciação de maior quantidade de cadeias laterais com densidade eletrônica completa, quando em comparação com a estrutura obtida no grupo espacial $P1$.

Figura 17 - Representação da interação entre moléculas, simétricas cristalográficas, apresentadas para as estruturas $P4_32_12$ (A) e $P3_121$ (B) de ElrR_{6HIS}. A molécula simétrica, em cinza, apresenta interação entre C-terminais, as hélices $\alpha6$ e $\alpha7$ estão destacadas em amarelo. Os pontos em magenta, no simétrico, apresentam regiões de contato. Imagens obtidas em Pymol.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A aproximação entre dímeros no empacotamento do grupo espacial $P3_121$, com a presença da região do DNA de ligação na condição de cristalização, apresenta maior aproximação entre os dímeros (simétricos cristalográficos), fazendo aumentar a distância entre as extremidades dos subdomínios central e C-terminal, gerando uma cavidade “mais aberta” do sítio de ligação do Al.

Observando a sobreposição dos monômeros mais discrepantes das três estruturas obtidas (Figura 19), evidencia-se que as diferenças estão nas mesmas regiões apresentadas anteriormente, mas com maior deslocamento.

Figura 18 - Sobreposição de monômeros de ElrR_{6HIS} obtidos nos diferentes grupos espaciais: P1 - monômero A (verde); P₄₃₂₁₂ - monômero A (azul); P₃₁₂₁ - monômero B (vermelho). Imagem obtida em Pymol.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O deslocamento exagerado observado no C-terminal de um dos monômeros da estrutura em grupo espacial P₃₁₂₁ se dá pelo contato entre o dímero simétrico apresentado anteriormente (Figura 15).

Um detalhe acerca do deslocamento observado nas hélices do C-terminal é a alteração da posição da cadeia lateral do resíduo F269, aparentemente, único responsável pelo deslocamento da extremidade da alfa-hélice C-terminal ($\alpha 16$) (Figuras 15 e 19). Esse deslocamento também é observado entre os monômeros da estrutura em grupo espacial P₄₃₂₁₂ (Figura 20), mas não na estrutura do grupo

espacial $P3_121$ que apenas apresenta a cadeia lateral do resíduo F269 mais internalizada (igual apresentada pelos monômeros A e B na Figura 20A).

Figura 19 - Deslocamento de cadeia lateral do resíduo F264, A, evidenciando em sobreposição dos monômeros, A (verde), B (ciano), C (amarelo) e D (magenta), da estrutura em grupo espacial P1. B, representação do resíduo com a densidade eletrônica correspondente para cada monômero. Imagens obtidas nos programas Pymol (A) e COOT (B).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Pequenos deslocamentos são observados no domínio N-terminal na sobreposição dos monômeros, grupo espacial P1, apresentado na Figura 21a. Já no alinhamento estrutural entre os monômeros obtido em grupo espacial $P4_3212$, o monômero A apresenta um deslocamento médio aproximado de 2,2 Å em relação ao monômero B (medindo distâncias entre $C\alpha$), e de 3,0 Å com relação ao monômero C (P1) para as duas alfa-hélices ($\alpha 2$ e $\alpha 3$) que compõem o HTH (Figura 21b).

Figura 20 - Domínio N-terminal de ElrR_{6HIS}, apresentado em sobreposição estrutural dos monômeros de ElrR_{6HIS}. **a.** Monômeros (P1) A (verde), B (ciano), C (amarelo), D (magenta). **b.** monômero A (azul claro) grupo espacial P43212 sobreposto com monômeros A e C (P1). Imagens obtidas em programa Pymol.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.8 Comparação entre estruturas tridimensionais de ElrR com outros RRNPP

Ao realizar a comparação entre os monômeros de ElrR_{6HIS} é possível observar entre aqueles presentes no grupo espacial P1 valores de RMSd que vão de 0,6 até 1,1 Å, enquanto que nos grupos espaciais P4₃₂₁₂ e P3₁₂₁ verifica-se RMSd de 1,25 Å e em 1,6 Å, respectivamente, entre os pares.

Já ao realizar sobreposição de ElrR com as estruturas dos RT homólogos PlcR (PDBid 3U3W), PrgX (PDBid 2AXZ) e Rgg2_{sd} (PDBid 4YV6) observa-se, em média, um RMSd de 3,5 Å, sendo apresentados valores sempre maiores na comparação com ElrR_{6HIS} grupo espacial P4₃₂₁₂ do que aqueles em comparação com as do grupo espacial P1.

É possível a observação de grande similaridade entre a estrutura tridimensional de ElrR e do homólogos RRNPP, especialmente com PrgX e Rgg2_{sd}, como é possível observar na figura 21.

Com essas sobreposições estruturais foi possível a observação de que o sítio de interação do AI de ElrR é bastante similar em localização e tamanho ao dos outros RRNPP, diferindo nas características químicas do ambiente, assim como ocorre entre os outros membros, e no comprimento do sítio, que se apresenta um pouco maior que as demais.

Figura 21 – Sobreposição estrutural, por similaridade de estrutura secundária, realizada entre os monômeros de ElrR (em verde) com os homólogos RRNPP. **A-** ElrR – PlcR, destacando a região que compreende entre os resíduos de aminoácidos D71 a K103, em PlcR, e de K78 a K111 em ElrR, como sendo a de maior discrepância na região do sítio alostérico; **B-** ElrR – PrgX, destacando a região que compreende os resíduos P292 a I305 de PrgX, que apresenta uma hélice única entre os membros RRNPP; **C-** ElrR-Rgg2_{sd} sem grandes diferenças estruturais, apenas no comprimento do sítio, maior em ElrR.

4.1.9 Pesquisa do AI utilizando dados estruturais de ElrR

Como já apresentado, cada RRNPP possui um mecanismo específico de alteração da conformação de sua estrutura quando na presença do ligante (AI). Apesar de seus mecanismos serem diferentes, as estruturas dos RRNPP apresentam

conservação no formato da região de ligação ao AI diferindo nas características químicas do ambiente, determinando assim a alta especificidade do AI.⁵⁴

Utilizando de alinhamentos estruturais com outros RRNPP, realizou-se a tentativa de prever em ElrR quais seriam os resíduos de aminoácido que possivelmente participam da estabilização do AI no sítio, na tentativa de obter mais informações sobre as características de sua molécula de regulação.

A Tabela 6 apresenta os resíduos de aminoácido dos RRNPP estudados que possuem sua cadeia lateral voltada para o sítio de interação com o AI, sendo possível observar em ElrR a conservação de alguns dos resíduos de aminoácido, que são responsáveis pela estabilização do AI nos homólogos.

Tabela 6 - Resíduos de aminoácido de ElrR_{6HIS} com cadeia lateral direcionada para o sítio de ligação do AI apresentando a conservação com respeito à posição relativa das hélices quando alinhadas estruturalmente com alguns RRNPP.

	ElrR (PDBid.5V5T)	PrgX (PDBid.2AW6)	Rgg2 (PDBid.4YV6)	PlcR (PDBid.3U3W)	RopB (PDBid.5DL2)
Hélice 6		K70	F73		
	K83♣	K79♦♣	L77		F73
	F86*	I82*			D75
	N87		R81		
	I91*	F86*	Y84*	C86*	K80
	K93♣		K87♣	K89♦♣	
Hélice 8					
	S124♣	S111♣	M108	Q118	
	L128*	G115	I112*	V121*	
	L131*			V125*	
	F132		S115		
Hélice 10			Y142		H144
	K166*	E154♦*	I146	Y156	V148
	A169*	S157	G149*	N159♦	
	L170	N158♦	N150	A160	
	N173♣	N161♣	R153	N163♦♣	N152♣
				I164	F155
				E167	
Hélice 12	R200*	D185*	T179		
	E203♣	L188	L183		E185♣
	Q207♣	T192	Q187♣	K197*♦	R188*
			L188		
	D211	N196♦	N190	N201♦	N192
	F214*	T199♦		K204♦	I195*
				Y206	
				L207	Q199
Hélice 14	R243*	Y232	Y222	Q237♦*	Y224
	W247*	E235♦	V226	Y240*	F231*
				E244	F232

Continua

Continuação				
Hélice 16	K286	L262		M267
				F268
	F289*	Y266*	Y275*♦	Y271*
	Q293*	E279♦*	H269	A278

A conservação (♠) e semiconservação (*) de resíduos, em relação a ElrR_{6HIS}. ♦ resíduos que interagem com o AI.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Partindo do princípio de que até o momento apenas peptídeos foram descritos como AI para os RRNPP, os resultados agora discutidos consideram o AI de ElrR também como um peptídeo.

Uma vez que a ligação do peptídeo nos demais RT organiza-se sempre com o C-terminal mais internalizado no sítio de ligação, ⁵⁴ os resíduos de aminoácido em ElrR com grande possibilidade de realizar a estabilização do N-terminal e C-terminal do AI são, respectivamente, os resíduos D211 e os pares K83:K166. Essa proposta é sustentada pelo compartilhamento da posição destes resíduos com os dos homólogos que realizam interação com os correspondentes peptídeos (Tabela 6).

Assim, para a verificação dessa assertiva foi realizado, pelo grupo de colaboração, ensaios de atividade de β -galactosidase para observar a atividade intrínseca e também a atividade induzida de ElrR contendo mutações pontuais. Os resultados obtidos, em comunicação pessoal da Dra. Pascale Serror, acerca das mutações K83A e K166A propostas, a partir das observações da estrutura de ElrR feitas neste estudo, indicam aumento na atividade intrínseca da proteína e também na atividade quando a expressão é induzida, demonstrando que ao substituir esses resíduos ocorre a possibilidade de outras moléculas mimetizarem o ligante real.

Utilizando a ideia proposta por DIAZ ET AL, 2012,⁵⁰ foi representada uma linha ligando os átomos carregados desses resíduos para observar quais outros resíduos seriam possíveis de considerar como interagentes do peptídeo. A partir da distância obtida entre os átomos N ζ -K166 : O δ_2 -D211 (~14 Å) e entre os átomos N ζ -K83 : O δ_2 -

D211 (~ 18 Å), caso o AI de ElrR_{6HIS} confirme ser um peptídeo, deverá possuir, entre cinco e sete (ou mais), resíduos de aminoácido.

Os resíduos de aminoácido K83, N87, K166, A169, N173, R200, E203, I204, Q207, D211, F214 representados na Figura 22, são os que estão próximos ao trajeto gerado e assim apresentam grandes chances de participarem da interação com AI. É possível ainda que o resíduo de aminoácido E239 do monômero oposto auxilie também na estabilização do AI (dependendo do tamanho deste).

Ao observar a superfície eletrostática de ElrR_{6HIS} nota-se, na Figura 23, no bolsão de ligação do AI, a presença de uma grande região hidrofóbica, próximo ao par de lisinas, indicando que um resíduo com cadeia lateral grande pode ali se encaixar.

Figura 22 - Representação de cadeias laterais dos resíduos de aminoácido apontando para o sítio do AI de ElrR_{6HIS}. Destacando os resíduos que estão no trajeto proposto para estabilização do AI (em azul) e os resíduos hidrofóbicos (em laranja) que compõem grande parte da superfície do sítio. Imagem obtida em Pymol.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 23 – Representação de superfície (raio de Van der Waals) do sítio de ligação do Al de ElrR_{6HIS} (monômero em verde), através de duas perspectivas. Em ambas figuras estão representadas as cargas positivas (azuis) e negativas (vermelho) dos átomos. A coloração dos resíduos de aminoácidos corresponde a da Figura 22. Imagem obtida em Pymol.

Fonte: Elaborada pelo autor

Pelas características químicas do ambiente interno do sítio observado, o Al de ElrR será, possivelmente, um peptídeo preponderantemente apolar, contendo ao menos um resíduo aminoácido hidrofóbico de cadeia grande, possivelmente na posição -1 ou -2 (anteriores) ao C-terminal.

Para confirmar esta possibilidade realizou-se uma modelagem, no sítio de ElrR, sem alterar a forma original dos Al, cCF10 de PrgX e PapR de PlcR, apresentado na Figura 24, verificando que o sítio de ElrR possui a capacidade de estabilizar um peptídeo linear de sete resíduos de aminoácido, ou mais, dependendo do arranjo realizado pela molécula.

Figura 24 - Representação de superfície (raio de Van der Waals) do sítio do AI de ElrR_{6HIS} (colorido igual Figura 22) com simulação dos heptapeptídeos (A) cCF10 (LVTLVFV) em azul e (B) PapR7 (ADLPFEF) em rosa, no interior do sítio. Imagem obtida em Pymol.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Visto que a flexibilidade de ElrR permite a movimentação de algumas alfa-hélices dos dois subdomínios que compõe o sítio do ligante, é possível propor que a estabilização do AI modificará esta superfície de modo a “fechar” o sítio, reduzindo a interação do bolsão com o solvente.

4.1.10 Tentativa de obtenção da molécula AI de ElrR

Os perfis cromatográficos apresentados na purificação das amostras controle positivo, com deoxicolato, (Figura 25) e negativo, com colato, (Figura 26) demonstram a separação de cada uma das amostras em três grupos cada, apresentando perfis parecidos. A quantidade de material total obtido na amostra controle negativo é aproximadamente dez vezes maior que o material total obtido no controle positivo.

Figura 25 - Cromatograma, resultado da purificação da amostra controle negativo, em coluna Sephadex G25 desalting Hitrap

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 26 - Cromatograma, resultado da purificação da amostra controle positivo, em coluna Sephadex G25 desalting Hitrap.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Apesar da semelhança, dos perfis cromatográficos, observa-se que a proporção dos grupos purificados é bastante diferente, e que o pico II', apresentado na Figura 26, apresenta um volume de eluição não observado na purificação do controle negativo. Ainda que o tamanho da coluna não seja o mais indicado para este tipo de análise, verificou-se que o volume de eluição de bradiquinina (1060 Da) e da cadeia B de insulina (3496 Da), são respectivamente 4,8 mL e 3,3 mL, sugerindo que um grupo de moléculas de tamanho entre 1500 e 2000 Da, esteja presente no pico II' (dados não mostrados).

Ao realizar o escaneamento de absorção UV-VIS dos picos purificados, é possível observar que a amostra controle negativo, curiosamente, não apresenta absorção, diferentemente do observado durante a purificação das amostras algumas horas antes (Figura 27).

Figura 27 - Sobreposição de espectros UV-VIS das amostras controle positivo (bege) e controle negativo (verde).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após realizar a interação da proteína ElrR_{6HIS} com as soluções correspondentes a cada um dos picos purificados da amostra de interesse, observou-se utilizando varredura no UV-VIS, que cada amostra altera discretamente a resposta de absorção, em relação a proteína isolada, apresentado na Figura 28. A única fração purificada que aumenta a absorção em 280 nm, quando em interação com ElrR_{6HIS}, é o pico II'.

Ao observar cada uma destas soluções, por DLS, apenas é evidenciada a presença de grandes oligômeros.

Figura 28 - Sobreposição de espectros de absorção UV-VIS de ElrR_{6HIS} em comparação com a interação ElrR_{6HIS} e frações purificadas, na pesquisa, do AI.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Apesar de esse resultado sugerir a existência de resíduos de aminoácidos aromáticos na solução II', não foi possível analisar a interação entre as partes (ElrR-AI), não sendo possível, portanto, assumir a relação do resultado com a obtenção, ou a presença, da molécula AI na solução testada. Ficando o protocolo de obtenção inconclusivo, quanto à possibilidade, ou não, de chegar ao AI de ElrR pelo método sugerido.

4.1.11 Ressonância plasmônica de superfície (SPR)

Os ensaios foram realizados fixando aproximadamente 1200 unidades de ressonância (RU) do DNA_{bind} (ligante) e as injeções realizadas sob fluxo de 50 µL/min com as diferentes concentrações de ElrR_{6HIS} (analito), por dois minutos. O alto fluxo utilizado apresentou-se necessário após o ensaio ter sido realizado em fluxos mais brandos (10 e 25 µL/min) que não geraram boas medições no equipamento.

Para o DNA_{NB} fixou-se aproximadamente 960 RU na cela do chip e o experimento foi realizado com as mesmas características de injeção e fluxo das amostras de ElrR_{6HIS}.

Ao realizar o ajuste das curvas o único ajuste que representa as curvas, com parâmetros mais próximos aos ideais, é aquele que considera dois estados de ligação (com alterações na conformação), apresentando valores de χ^2 (parâmetro de concordância entre ajuste-experimento) condizentes com um bom ajuste.⁹⁵ Ao tentar ajustar as curvas com o modelo tradicional de Langmuir (1:1) o programa não é capaz de ajustar o experimento.

A resposta observada no experimento com o DNA_{bind}, apresentada na Figura 29, demonstra que, após o período de interação do analito com o ligante, ocorre a dissociação de praticamente todo complexo formado.

Apesar deste resultado ser apenas formado por uma série de experimentos, e portanto, os valores não serem confiáveis a ponto de estipular a termodinâmica da interação, a dinâmica da ligação apresenta uma taxa de dissociação (K_d) menor para o segundo passo (K_d2), na ordem de nanomolar, em relação ao primeiro (K_d1), que está na ordem de milimolar. Segundo a literatura consultada,⁹⁵ K_a1/K_d1 correspondem respectivamente a formação e dissociação do complexo formado entre ligante e analito, enquanto que K_a2/K_d2 correspondem respectivamente a alteração da conformação do ligante após formação do complexo e a volta desta alteração conformacional.

Figura 29 - Representação gráfica e valores da interação $\text{ElrR}_{6\text{HIS}}\text{-DNA}_{\text{bind}}$, realizada por SPR. Onde cada interação corresponde à concentração de ElrR utilizada, sendo a interação 1 correspondente a ElrR 30 nM, a interação 2 a ElrR 100 nM, interação 3 a ElrR 180 nM, interação 4 a ElrR 300 nM e interação 5 a ElrR 450 nM.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Este resultado leva à demonstração de que apesar de $\text{ElrR}_{6\text{HIS}}$ realizar interação com o sítio proposto do DNA, aparentemente, essa interação só será estável após a alteração da conformação da proteína, que deve ser induzida pela ligação do AI, provavelmente reduzindo a flexibilidade deste RT.

Ainda, apesar de existir a interação de $\text{ElrR}_{6\text{HIS}}$ com DNA_{bind} , a mesma apresenta pouca estabilidade, dissociando rapidamente os complexos formados, o que não é esperado para um regulador transcricional. Esse fato é notado pelo perfil de interação obtido, que não apresenta um platô durante a etapa de associação. Ou seja, a evidência de que todos os sítios de DNA disponíveis estariam ocupados.¹⁰⁹

Quando realizada a interação de $\text{ElrR}_{6\text{HIS}}$ com o DNA_{NB} nenhuma detecção é apresentada pelo equipamento, (Figura 30), obtendo menos de uma unidade de

ressonância como valor máximo de associação medido, que pode ser atribuída ao erro natural do equipamento. Essa evidência apresenta, ainda que parcialmente, a especificidade de interação de ElrR com o sítio proposto do DNA.

	Ka1 (1/Ms)	Kd1 (1/s)	Ka2 (1/s)	Kd2 (1/s)	Rmax (RU)	RI (RU)	Concentração de analito (nM)	K (1/M)	Chi2
Global		1,01 e- 5		1 e-5	0,737	53,5			1,97 e3
Interação 1	997		1 e-3				3	9,93 e9	
Interação 2	1 e3		1 e-3				10	9,98 e9	
Interação 3	987		1 e-3				30	9,83 e9	
Interação 4	404		1 e-3				180	4 e9	
Interação 5	176		1 e-3				300	1,76 e9	
Interação 6	131		1 e-3				450	1,3 e9	
Interação 7	81,3		1 e-3				700	8,12 e9	

Figura 30 - Representação gráfica e valores da interação ElrR_{6HIS}-DNA_{NB}, realizada por SPR. Onde cada interação corresponde à concentração de ElrR utilizada, sendo a interação 1 a ElrR 3 nM, a interação 2 a ElrR 10 nM, interação 3 a ElrR 30nM, interação 4 a ElrR 180 nM, interação 5 a ElrR 300 nM, interação 6 a ElrR 450 nM, interação 7 a ElrR 700 nM.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A evidência de que a presença de alguns sais biliares no meio de cultura induz a produção do fator de virulência ElrA (dados não publicados) trouxe a possibilidade de estes serem o AI de ElrR.

Para desvendar se esses sais biliares são ligantes diretos de ElrR, verificou-se por SPR a interação $\text{ElrR}_{6\text{HIS}}\text{-DNA}_{\text{bind}}$, na presença de alguns dos candidatos, esperando que a estabilidade do complexo formado fosse alterada. Nestes ensaios $\text{ElrR}_{6\text{HIS}}$ era mantida incubada a temperatura ambiente ($\sim 20^\circ\text{C}$) com uma molécula indutora (deoxicolato) e uma molécula controle (colato), ambas na concentração final de $500\ \mu\text{M}$ por, pelo menos, 30 minutos, para só então iniciar as injeções. O resultado apresenta que a interação, na presença de deoxicolato e colato, respectivamente apresentadas na Figura 31 e Figura 32, é afetada, de igual modo e apresenta valores menores de interação do que a proteína sozinha.

Figura 31 - Representação gráfica e valores da interação deoxicolato- $\text{ElrR}_{6\text{HIS}}\text{-DNA}_{\text{BIND}}$, realizada por SPR. Onde cada interação corresponde à concentração de ElrR utilizada, sendo a interação 2 a ElrR $10\ \text{nM}$, a interação 3 a ElrR $30\ \text{nM}$, interação 4 a ElrR $100\ \text{nM}$, interação 5 a ElrR $180\ \text{nM}$, interação 6 a ElrR $300\ \text{nM}$, interação 7 a ElrR $450\ \text{nM}$, interação 8 a ElrR $700\ \text{nM}$

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 32 - Representação gráfica e valores da interação colato-ElrR_{6HIS}-DNA_{BIND}, realizada por SPR. Onde cada interação corresponde à concentração de ElrR utilizada, sendo a interação 2 a ElrR 10 nM, a interação 3 a ElrR 30 nM, interação 4 a ElrR 100 nM, interação 5 a ElrR 180 nM, interação 6 a ElrR 300 nM, interação 7 a ElrR 450 nM, interação 8 a ElrR 700 nM.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Ao comparar os resultados de associação, dissociação (K_a , K_d) obtidos das diferentes amostras, observou-se que ElrR_{6HIS} sozinha em solução, possui taxas relativamente maiores do que quando na presença das moléculas testadas, indicando que esses sais biliares não são ligantes diretos de ElrR.

Essa evidência também é sustentada por duas outras razões. Uma delas, é a não obtenção de cristais complexados com nenhuma das moléculas testadas, e a outra, a manutenção da temperatura de *melting* da proteína na presença de colato ou deoxicolato, observado em CD (não apresentado).

Assim, as moléculas de sais biliares utilizadas no decorrer do projeto como possíveis AI de ElrR não parecem interagir diretamente com o RT. Este resultado leva

à evidência de que os sais biliares propostos sejam reguladores indiretos de ElrR, exercendo função em alguma etapa anterior do processo, ou como forma de ativação do sistema de localização da bactéria como considerado no caso do sistema QS TprA/PhrA, *Streptococcus pneumoniae*, ativado na presença de galactose.¹¹⁰

4.1.12 Anisotropia de fluorescência

Inicialmente, realizou-se o experimento com baixa concentração de DNA (50 nM), não havendo respostas de detecção. Por isso, aumentou-se a concentração do DNA (500 nM), gerando as condições para experimentação.

Com a titulação da proteína foi possível observar a interação entre ElrR_{6HIS} e o fragmento proposto de DNA (Figura 33).

Figura 33 - Curva de anisotropia de fluorescência gerada como resposta da interação entre ElrR_{6HIS} e DNA_{bind}.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 ElrA

4.2.1 Confirmação de sequência e análises bioinformáticas através de sequência

Ao obter células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com o gene *elrA*_{6HIS}, realizou-se o sequenciamento do plasmídeo com as sequências do promotor e terminador T7 da região de sítios múltiplos de clonagem do plasmídeo, obtendo assim a sequência de ambas as fitas do gene no plasmídeo.

Pela capacidade de extensão da sequência de DNA do equipamento de sequenciamento utilizado, a fração correspondente aos resíduos entre A276 e W450, não foi possível de ser observada e assim não comprovada identidade. O restante da sequência foi confirmada como 100% idêntica, a partir do resíduo de aminoácido vinte e sete (E27), da sequência original, comparada por alinhamento em programa clustalW.⁷² Foi confirmada também a presença da hexahistidina adicionada ao N-terminal da sequência.

Os primeiros vinte e seis resíduos da sequência original de ElrA são identificados como sinal de exportação (SignalP)¹¹¹ e, por isso, não estão presentes no plasmídeo. Utilizando estrutura primária de ElrA_{6HIS} em ferramenta de bioinformática,⁷³ calculou-se que seu monômero possui ~78,65 kDa de massa, e PI ~5,0.

4.2.2 Expressão e purificação

O protocolo fixado para crescimento das bactérias, e expressão de ElrA_{6HIS}, foi realizado em meio LB-amp, 37 °C mantendo em agitação, 150 RPM, induzindo a expressão da proteína com 1 mM IPTG em OD₆₀₀ = 1.2, mantendo em agitação (150 RPM) por 4 h a 20 °C. O montante de ElrA_{6HIS} expressado com o protocolo determinado, apresenta rendimento razoável, com valor estimado de 20 mg/L.

A utilização da primeira etapa de purificação (choque térmico) gerou um acréscimo na quantidade de ElrA_{6HIS} na fração solúvel da amostra, demonstrando-se imprescindível para obtenção de maior quantidade de material, ao final, estimado em 12 mg/L.

A cromatografia de afinidade deveria apresentar ótimos resultados de purificação da proteína devido à fusão da hexahistidina à porção N-terminal da proteína. Porém, isso não aconteceu, uma vez que aproximadamente metade das moléculas de ElrA_{6HIS} passam pela coluna sem realizar interação com a fase estacionária (Figura 34).

O comportamento da amostra durante sua purificação por cromatografia de afinidade não é o evidenciado usualmente (em uma gaussiana), ainda que toda amostra liberada da coluna, em concentrações maiores que 50 mM de imidazol, apresentem majoritariamente ElrA_{6HIS} (Figura 34b).

Figura 34 - Gel SDS-PAGE de frações coletadas durante a purificação de ElrA_{6HIS} por cromatografia de afinidade. **a.** 1 solúvel total; 2. não interagente; 3. eluído da coluna 0mM imidazol; 4. eluído da coluna 0 a 5% imidazol; 5. eluído da coluna 20mM imidazol; 6. eluído da coluna em 50mM imidazol; 7. primeiro tubo eluído da coluna > 50 mM imidazol. **b.** apresenta frações eluídas em diferentes concentrações de imidazol (50 a 500 mM) durante a purificação por afinidade.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Apesar de modificar o tempo e a forma de interação entre a solução a ser purificada com fase estacionária da coluna (Ni^{2+} *HiTrap* - QIAGEN), não houve nenhuma melhora na interação, e consequentemente na purificação. Também foi realizada utilização da resina de cobalto, em substituição ao níquel; alteração da força iônica da solução (até 1 M NaCl); alteração para tampão fosfato; sem obter, em nenhuma das tentativas, melhora nos resultados nesta etapa de purificação.

Ao final da cromatografia de afinidade, a quantidade obtida de ElrA_{6HIS} variou entre 4 e 6 mg/L de cultura.

Ao realizar cromatografia de exclusão por massa molecular em tampão C, é possível observar a separação da amostra em diversos picos (Figura 35). Dois picos em específico apresentam massa molecular correspondentes, quando calculado através da calibração da coluna a valores correspondentes a monômeros, trimeros, e hexâmeros com um acréscimo de aproximadamente 26 kDa para cada oligômero, podendo estar assim associado a um deslocamento diferenciado da proteína na coluna e não a alguma molécula associada a cada monômero.

Figura 35 - Cromatograma de gel filtração, Superdex 200 Hilo 16/600, obtido como resultado da purificação de ElrA_{6HIS} em tampão “C”.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tendo em base a similaridade que ElrA apresenta com as internalinas de *Listeria monocytogenes*,¹¹²⁻¹¹³ considerou-se a existência de sítios de ligação de cálcio. Embora nenhuma predição a partir de sequência tenha relatado a existência desses sítios, realizou-se a adição de 50 mM de solução de cloreto de cálcio após

cromatografia de afinidade no tampão de amostra (“C”) para nova purificação por exclusão por massa molecular. Como resultado, apresentado na Figura 36, os picos apresentaram mais bem definidos, mas com tendência a oligômeros maiores.

Figura 36 - Cromatograma de gel filtração, Superdex 200 HiLoad 16/600, de ElrA_{6HIS} em tampão “C”, 20 mM Ca⁺⁺.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Curiosamente, as amostras purificadas pela exclusão por massa molecular apresentam algumas bandas de menor massa molecular independentemente do estado oligomérico purificado, e da presença de 1 mM - 5 mM β -mercaptoetanol ou 10 mM ditioneitol (DTT) em solução (Figura 37).

Figura 37- Gel SDS-PAGE dos diferentes oligômeros de ElrA_{6HIS}, purificados por cromatografia de exclusão por massa molecular; 1, monômero; 2, dímero; 3, hexâmero; 4 e 5, oligômeros maiores.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.3 Estabilidade de ElrA_{6HIS} em solução

Ao conduzir experimentos de estabilidade em DLS dos oligômeros purificados de ElrA_{6HIS}, foi possível reparar a instabilidade das partículas em solução pela alta polidispersividade apresentada. Como resultados do experimento a cada medição realizada, a massa relativa preponderante em solução apresentava-se oscilante entre monômeros, dímeros, trímeros, tetrâmeros e oligômeros maiores. Um resultado similar foi obtido em um gel nativo realizado com as frações purificadas, exclusão por massa molecular, onde cada fração apresenta diversos oligômeros (Figura 38).

Figura 38 - Gel nativo de diferentes frações de ElrA_{6HIS} purificadas por cromatografia de exclusão por massa molecular. 1- monômero, 2-tetrâmero/hexâmero; 3 oligômeros maiores.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma maior estabilidade quanto a variação dos oligômeros em solução é percebida em análise por DLS na presença de 20 mM até 120 mM de cálcio, concentrando a oscilação dos oligômeros entre monômeros, dímeros, trímeros, tetrâmeros e hexâmeros mas, ainda apresentando alta polidispersividade nas amostras.

Foi investigado se a adição de cálcio altera o ponto isoelétrico da proteína (dados não apresentados), como indicativo de interação do cálcio com sítios específicos, mas nenhuma diferença foi observada entre as bandas.

4.2.4 Cristalização de ElrA_{6HIS} e difração dos cristais

Utilizando das frações purificadas (tetrâmero/hexâmero), obteve-se a formação de alguns cristais pequenos e apenas um grande cristal (na condição descrita na metodologia) depois de aproximadamente três meses de acondicionamento da placa de cristalização (Figura 39). A otimização das condições não apresentou melhoras na cristalização da proteína.

Figura 39 - Cristais de ElrA_{6HIS} obtidos em condição de cristalização 15% m/v PEG 6000, 5% m/v glicerol.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Realizando pesquisa através de alinhamento de sequência em FASTA com busca nas estruturas depositadas no PDB¹¹⁴, ElrA apresenta-se como 35% de identidade e 68% de similaridade à internalina A,¹¹⁴ (E-score 8.3 e⁻²⁷), e 27% de identidade e 55% de similaridade à internalina B ¹¹³ (E-score 4.1 e⁻¹⁴) de *Listeria monocytogenes*, o que tornaria plausível a tentativa de resolução das fases cristalográficas através de substituição molecular.

Infelizmente, quando irradiados, os cristais não produziram difração, mesmo os difratados no sincrotron Soleil.

Ao considerar que ElrA_{6HIS} apresenta-se variando os estados oligoméricos em solução, e que possivelmente sua estrutura se assemelhe à das internalinas de *Listeria* (tendo uma arquitetura tipo ferradura), é possível imaginar que devido a seu empacotamento, o cristal abrigue grande quantidade de água entre as moléculas, reduzindo a capacidade de difração do mesmo.

Tendo como referência esse resultado, não parece ser possível obter dados estruturais de ElrA utilizando difração de raios X, ao menos nas condições aqui testadas.

5 CONCLUSÕES

5.1 ElrR

Os resultados apresentados do estudo do RT ElrR permitem realizar algumas conclusões acerca de seu comportamento e especificidades que levam à sua função.

A expressão heteróloga apresentou ótimo rendimento e ótima purificação do RT obtida diretamente da cromatografia de afinidade.

Diversas condições de cristalização produzem bons cristais de ElrR, que crescem em duas diferentes geometrias.

ElrR se apresenta como dímero em solução e também nas unidades assimétricas dos cristais, sendo considerado único oligômero estável na rede cristalina (PISA).¹⁰⁶ Como apenas um sítio de DNA foi determinado, para ligação deste RT,⁷¹ sua unidade biologicamente ativa mais provável deve ser o dímero.

Como apresentado para outros membros RRNPP, o dímero de ElrR, é estabilizado, principalmente, através das interações realizadas no final do domínio C-terminal.⁵⁴ A região de interação de destaque apresentada em ElrR é a realizada entre as alfa-hélices $\alpha 1$ e $\alpha 2$ do domínio N-terminal com o domínio C-terminal. Outra particularidade apresentada por ElrR, é a organização do domínio C-terminal que, pelo contato apresentado entre as alfa-hélices constituintes, permitiu a proposta de divisão em dois subdomínios (central e C-terminal), sustentado por análise de bioinformática,¹⁰⁵ observado apenas neste RT, até o momento.

Enquanto que alguns RT apenas conseguem se ligar ao DNA na presença da molécula de regulação,¹¹⁵ ElrR demonstra capacidade para interação mesmo sem o AI. Porém, os resultados da interação, ainda que parciais, apresentam que apesar de haver a ligação específica de ElrR com o sítio proposto do DNA, a mesma não é estável, se desfazendo rapidamente.

As moléculas de sais biliares utilizadas no decorrer do projeto como possíveis AI de ElrR não demonstram interação direta com o RT, não devendo considerá-los como AI.

Infelizmente a tentativa de obtenção do AI de ElrR não gerou resultados satisfatórios. Como RT pertencente à família RRNPP, ElrR apresenta vários dos quesitos considerados da família, e provavelmente possuirá como AI um pequeno peptídeo. A partir do estudo realizado na comparação de ElrR com os outros membros da família, é possível propor que o peptídeo de ElrR possuirá algo entre 5 e 7 resíduos de aminoácido, com um caráter fortemente hidrofóbico, visto os bolsões hidrofóbicos apresentados no sítio.

5.2 ElrA

Apesar das diversas tentativas de otimizar a expressão heteróloga e purificação de ElrA, pouca quantidade de proteína pura foi obtida.

Ainda assim, foi possível avaliar algumas características deste fator de virulência, como por exemplo, a variedade de oligômeros formados e a instabilidade dos mesmos em solução. Possivelmente, os oligômeros formados em solução inibem a interação da hexahistidina N-terminal com o metal presente na coluna de afinidade, sugerindo que esta região fique “escondida” nos oligômeros.

Apesar da polidispersividade apresentada nas amostras e do longo tempo necessário, cristais de ElrA_{6HIS} se formaram, mas não apresentaram difração, indicando que a determinação da estrutura de ElrA dificilmente será obtida por cristalografia de raios X com o protocolo aqui apresentado.

6 PERSPECTIVAS

Como complemento do estudo sobre o RT ElrR ainda é necessário, além de determinar as constantes de afinidade do complexo com DNA, determinar a molécula de regulação (AI), para então observar, através das diferenças nas constantes de afinidade do complexo duplo (ElrR-DNA) e triplo (ElrR-AI-DNA), se as conclusões aqui relatadas, acerca da flexibilidade de ElrR são confirmadas.

Ao ponto que o AI de ElrR for desvendado, torna-se viável realizar a tentativa de co-cristalização e resolução da estrutura do complexo duplo e triplo, para então poder observar em detalhes os mecanismos estruturais deste RT. Apesar de não obter a cristalização do complexo duplo (ElrR-DNA) neste trabalho, é possível propor tentativa de co-cristalização com fragmentos de tamanho variados do DNA, uma vez que apenas foi realizada a tentativa de co-cristalização com o fragmento de 25 bp, podendo reduzi-lo, já que a região semi-palindrômica se restringe a 19 bp.

A partir dos resultados sobre as mutações sugeridas aos colaboradores, fica também uma possibilidade de pesquisar mais a fundo o comportamento do RT através dos mutantes.

A apresentação dos poucos resultados obtidos sobre o fator de virulência ElrA foram realizados com o intuito de apresentar a possibilidade de obtenção da molécula através de expressão heteróloga, permitindo futuras investigações para aumentar a estabilidade da molécula em solução, para poder melhor investigar seu comportamento e características *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- 1 TEIXEIRA, L. et al. *Enterococcus*. In: VERSALOVIC J, et al (Ed.), **Manual of clinical microbiology**. 10th ed. Washington, DC: ASM Press, 2011. p. 350-364. doi:10.1128/9781555816728.ch21.
- 2 SCHLEIFER, K. H.; KILPPER-BALZ, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* norn. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 34, p. 31-34, 1984. doi: <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-34-1-31> \h10.1099/00207713-34-1-31 .
- 3 RICE, L. B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no SKAPE. **Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 8, p. 1079-1081, 2008. doi: 10.1086/533452.
- 4 KRISTICH, C. J.; RICE, L. B.; ARIAS, C. A. Enterococcal infection - treatment and antibiotic resistance. 2014. In: GILMORE, M. S. et al. **Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection**. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3713858/>> . Acesso em: 12 set. 2016.
- 5 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health care-associated infections FACT SHEET**. Disponível em: <http://www.who.int/gpsc/country_work/gpsc_ccisc_fact_sheet_en.pdf> . Acesso em: 03 ago. 2016.
- 6 SENGUPTA, S.; CHATTOPADHYAY, M., GROSSART, H. P. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 47, eCollection, 2013. Open access. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2013.00047/full>> . Acesso em: 25 maio 2017.
- 7 VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis part1: cause and threats. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 40, n. 4, p. 277-283, 2015.
- 8 GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.
- 9 GALES, A. C. et al. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in brazilian hospitals participating in the SENTRY program (2005-2008). **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 90-98, 2009. doi:10.1590/S1413-86702009000200004.
- 10 EMORI, T. G.; GAYNES, R. P. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 4, p. 428-442, 1993.
- 11 WISPLINGHOFF, H. et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 3, p. 309-317, 2004.

- 12 FISHER, K.; PHILLIPS, C. Review: the ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v. 155, pt. 6, p. 1749-1757, 2009. doi:10.1099/mic.0.026385-0.
- 13 JAKOVAC, S. et al. Characteristics of vancomycin-resistant *Enterococcus* strains in the West Balkans: a first report. **Microbial Drug Resistance**, v. 23, n. 1, p. 122-126, 2017. doi:10.1089/mdr.2015.0355.
- 14 ATRAY, D.; SHARMA, A.; ATRAY, M. Prevalence of Enterococci and its antibiotic resistance in various clinical samples at tertiary care hospital in Southern Rajasthan, India. **International Journal of Research in Medical Sciences**, v. 4, n. 8, p. 3413-3416, 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.18203/2320-6012.ijrms20162303> .
- 15 ABDELKAREEM, M. Z. et al. Multi-drug-resistant *Enterococcus faecalis* among egyptian patients with urinary tract infection. **Journal of Chemotherapy**, v. 29, n. 2, p. 74-82, 2017. doi: 10.1080/1120009X.2016.1182358.
- 16 ARIAS, C. A.; MURRAY B. E. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. **Nature Reviews in Microbiology**, v.10, n. 4, p. 266-278, 2012. doi:10.1038/nrmicro2761.
- 17 WILSON, M.; MCNAB, R.; HENDERSON, B. **Bacterial disease mechanisms: an introduction to cellular microbiology**. United Kingdom: Cambridge University Press, 2002. p. 405-408.
- 18 WILSON, J. W. et al. Mechanisms of bacterial pathogenicity. **Postgraduate Medical Journal**, v. 78, n. 918, p. 216-224, 2002. doi:10.1136/pmj.78.918.216.
- 19 BATTHY, M. et al. *Enterococcus faecalis* pCF10-encoded surface proteins PrgA, PrgB (aggregation substance), and PrgC contribute to plasmid transfer, biofilm formation, and virulence. **Molecular Microbiology**, v. 95, n. 4, p. 660-677, 2015. doi:10.1111/mmi.12893.
- 20 KREFT, B. et al. Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 1, p. 25-30, 1992
- 21 JETT, B. D.; HUYCKE, M. M.; GILMORE, M. S. Virulence of Enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, n. 4, p 462-478, 1994.
- 22 SHANKAR, V. et al. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 1, p. 193-200, 1999.
- 23 TOLEDO-ARANA, A. et al. The Enterococcal surface protein, *esp*, is Involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4538-4545, 2001. doi:10.1128/AEM.67.10.4538-4545.2001.
- 24 FURUMURA, M. T. et al. Virulence-associated characteristics of *Enterococcus faecalis* strains isolated from clinical sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 230-236, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822006000300007&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 06 abr. 2017.

- 25 PARK, S. Y. et al. Extracellular gelatinase of *Enterococcus faecalis* destroys a defense system in insect *Hemolymph* and human serum. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 4, p. 1861-1869, 2007. doi: 10.1128/IAI.01473-06.
- 26 BONAZZI, M.; LECUIT, M.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes* internalin and E-caderin: from bench to bedside. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.4, n. a003087, 2009. Open access. Disponível em: <<http://cshperspectives.cshlp.org/content/1/4/a003087.full.pdf+html>>. Acesso em: 24 jul. 2014.
- 27 BRINSTER, S. et al. Enterococcal leucine-rich repeat-containing protein involved in virulence and host inflammatory response. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 9, p. 4463–4471, 2007. doi:10.1128/IAI.00279-07.
- 28 JENNINGS, H. S. **Behavior of the lower organisms**. New York: Columbia University Press, MacMillan & Co.Ltd,1906. 293p.
- 29 LYON, P. The cognitive cell: bacterial behavior reconsidered. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 264, 2015. Open access. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4396460/pdf/fmicb-06-00264.pdf>>. Acesso em: 25 maio 2017.
- 30 BASSLER, B. L. Small talk: cell-to-cell communication in bacteria. **Cell**, v. 109, p. 421-424, 2002. doi:10.1016/S0092-8674(02)00749-3.
- 31 BROWNING, D. F.; BUSBY, S. J. W. The regulation of bacterial transcription initiation. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, n. 1, p. 57-65, 2004. doi:10.1038/nrmicro787.
- 32 PÉREZ-RUEDA, E.; COLLADO-VIDES, J. The repertoire of DNA-binding transcriptional regulator in *Escherichia coli* K-12. **Nucleic Acid Research**, v. 28, n. 8, p. 1838-1847, 2000. doi:10.1093/nar/28.8.1838.
- 33 GAMA-CASTRO, S. et al. RegulonDB version 9.0: high-level integration of gene regulation, coexpression, motif clustering and beyond. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D133-43, 2016. doi:10.1093/nar/gkv1156.
- 34 ARAVIND, L. et al. The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n.2, p. 231-262, 2005. doi:10.1016/j.femsre.2004.12.008.
- 35 NEALSON, K. N.; PLATT, T. J.; HASTINGS, W. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial responsive luminescent system. **Journal of Bacteriology**, v. 104, n. 1, p. 313-322, 1970.
- 36 FUQUA, W. C.; WINANS, S. C.; GREENBERG, E. P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR/LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 2, p. 269-275, 1994.
- 37 VISICK, K. L.; FUQUA, C. Meeting review: decoding microbial chatter: cell-cell communication in bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 16, p. 5507-5519, 2005. doi:10.1128/JB.187.16.5507-5519.2005.
- 38 MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 165-199, 2001. doi:10.1146/annurev.micro.55.1.165.

- 39 READING, N. C.; SPERANDIO, V. Quorum sensing: the many languages of bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 254, n. 1, p. 1-11, 2006. doi:10.1111/j.1574-6968.2005.00001.x.
- 40 LEUNG, V.; LÉVESQUE, C. M. A stress-inducible quorum-sensing peptide mediates the formation of persister cells with noninherited multidrug tolerance. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 9, p. 2265-2274, 2012. doi:10.1128/JB.06707-11.
- 41 PODBIELSKI, A.; KREIKEMEYER, B. Cell density-dependent regulation: basic principles and effects on the virulence of Gram-positive cocci. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 2, p. 81-95, 2004. doi:10.1016/j.ijid.2003.04.003.
- 42 NAKAYAMA, J. et al. Gelatinase biosynthesis-activating pheromone: a peptide lactone that mediates a quorum sensing in *Enterococcus faecalis*. **Molecular Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 145-154, 2001. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02486.x.
- 43 RUTHERFORD, S. T.; BASSLER, B. L. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 11, 2012. Open access. Disponível em: <<http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/2/11/a012427.long>>. Acesso em: 25 maio 2017.
- 44 GRAY, B.; HALL, P.; GRESHAM, H. Targeting *agr*- and *agr*-like quorum sensing systems for development of common therapeutics to treat multiple Gram-positive bacterial infections. **Sensors**, v. 13, n. 4, p. 5130-5166, 2013. doi: 10.3390/s130405130.
- 45 FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. H.; STACKEBRANDT, E. **Prokaryotes: bacteria: firmicutes, cyanobacteria**. New York: Springer Science & Business Media, 2006. v. 4, 163p.
- 46 COOK, L. C.; FEDERLE, M. J. Peptide pheromone signaling in *Streptococcus* and *Enterococcus*. **FEMS Microbiology Review**, v. 38, n. 3, p. 473-492, 2013. doi:10.1111/1574-6976.12046.
- 47 KLEEREBEZEM, M. et al. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction in system in Gram-positive bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 24, n. 5, p. 895-904, 1997.
- 48 DIRIX, G. et al. Screening genomes of Gram-positive bacteria for double-glycine-motif-containing peptides. **Microbiology Society Journals** v. 150, pt. 5, p. 1121-1126, 2004.
- 49 SULAVIK, M. C.; TARDIF, G.; CLEWELL, D. B. Identification of a gene, *rgg*, which regulates expression of glucosyltransferase and influences the Spp phenotype of *Streptococcus gordonii* Challis. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 11, p. 3577-3586, 1992.
- 50 DIAZ, A. R. et al. *Bacillus subtilis* RapA phosphatase domain interaction with its substrate Spo0F, and inhibitor PhrA peptide. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 6, p. 1378-1388, 2012. doi:10.1128/JB.06747-11.

- 51 ZOUHIR, S. et al. Peptide-binding dependent conformational changes regulate the transcriptional activity of the quorum-sensor NprR. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 16, p. 7920-7933, 2013. doi:10.1093/nar/gkt546.
- 52 GRENHA, R. et al. Structural basis for the activation mechanism of the PlcR virulence regulator by the quorum-sensing signal peptide PapR. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 3, p. 1047-1052, 2013. doi:10.1073/pnas.1213770110.
- 53 SHI, K. et al. Structure of peptide sex pheromone receptor PrgX and PrgX/pheromone complexes and regulation of conjugation in *Enterococcus faecalis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 51, p. 18596-18601, 2005. doi:10.1073/pnas.0506163102.
- 54 DO, H.; KUMARASWAMI, M. Structural mechanisms of peptide recognition and allosteric modulation of gene regulation by the RRNPP family of quorum-sensing regulators. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, n. 14, p. 2793-2804, 2016. .
- 55 BLATCH, G. L.; LASSLE, M. The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein–protein interactions. **BioEssays**, v. 21, n. 11, p. 932-939, 1999.
- 56 DAS, A. K.; COHEN, P. T. W.; BRADFORD, D. The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein–protein interactions. **EMBO Journal**, v. 17, n. 5, p. 1192-1199, 1998. doi:10.1093/emboj/17.5.1192.
- 57 PARASHAR, V. et al. Rgg protein structure–function and inhibition by cyclic peptide compounds. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 16, p. 5177-5182, 2015. doi:10.1073/pnas.1500357112.
- 58 LOUGHMAN, J. A.; CAPARON, M. G. Contribution of invariant residues to the function of rgg family transcription regulators. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 2, p. 650-655, 2007. doi:10.1128/JB.01437-06.
- 59 SCHULTZ, J. et al. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 11, p. 5857-5864, 1998.
- 60 FINN, R. D. et al. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 1, p. 279-285, 2016. doi:10.1093/nar/gkv1344.
- 61 MACTHAL, N. et al. Structural and functional analysis of RopB: a major virulence regulator in *Sterptococcus pyogenes*. **Molecular Microbiology**, v. 99, n. 6, p. 1119-1133, 2016. doi:10.1111/mmi.13294.
- 62 KOZLOWICZ, B. K. et al. Molecular basis for conjugation by bacterial pheromone and inhibitor peptides. **Molecular Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 958-969, 2006. doi:10.1111/j.1365-2958.5006.05434.x.
- 63 DECLERCK, N. et al. Structure of PlcR: insights into virulence regulation and evolution of quorum sensing in bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 104, n. 47, p. 18490-18495, 2007. doi:10.1073/pnas.1213770110.

- 64 SHANKER, E. et al. Pheromone recognition and selectivity by ComR proteins among *Streptococcus* species **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 12, e1005979, 2016. Open access. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005979>>. Acesso em: 05 abr. 2017.
- 65 TALAGAS, A. et al. Structural insights into Streptococcal competence regulation by the cell-to-cell communication system ComRS. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 12, e1005980, Dec. 2016. Open access. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005980>>. Acesso em: 05 abr. 2017.
- 66 BENNETT, M. J.; SCHLUNEGGER, M. L. P.; EISENBERG, D. 3D domain swapping: a mechanism for oligomer assembly. **Protein Science**, v. 4, n. 12, p. 2455-68, 1995.
- 67 FLEUCHOT, B. et al. Rgg proteins associated with internalized small hydrophobic peptides: a new quorum-sensing mechanism in streptococci. **Molecular Microbiology**, v. 80, n. 4, p. 1102-1119, 2011. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07633.x.
- 68 JIMENEZ, J. C.; FEDERLE, M.J. Quorum sensing in group A *Streptococcus*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, p.127, eCollection, 2014. Open access. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2014.00127>>. Acesso em: 26 fev. 2015.
- 69 HÅVARSTEIN, L. S.; COOMARASWAMY, G.; MORRISON, D. A. An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 24, p. 11140-11144, 1995.
- 70 CHANG, J. et al. Two group a Streptococcal peptide pheromones act through opposing Rgg regulators to control biofilm development. **PLOS Pathogens**, v. 7, n. 8, e1002190, 2011. Open access. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1002190>>. Acesso em: 28 maio 2015.
- 71 DUMOULIN, R. et al. Enterococcal rgg-like regulator ElrR activates expression of the *elrA* operon. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 13, p. 3073-3083, 2013. doi:10.1128/JB.00121-13.
- 72 LARKIN, M. A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007. doi:10.1093/bioinformatics/btm404.
- 73 GASTEIGER, E. et al. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3784-3788, 2003. doi:10.1093/nar/gkg563.
- 74 LEES, J. G. et al. 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.
- 75 WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. DICHROWEB: an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. W668-673, 2004. doi: 10.1093/nar/gkh371.

- 76 GORREC, F. The MORPHEUS protein crystallization screen. **Journal of Applied Crystallography**, v. 42, pt. 6, p. 1035-1042, 2009. doi:10.1107/S0021889809042022.
- 77 KABSCH, W. XDS. **Acta Crystallographica Section D: biological crystallography**, v. 66, pt. 2, p. 125-132, 2010. doi:10.1107/S0907444909047337.
- 78 GROSSE-KUNSTLEVE, R. W.; ADAMS, P. D. Substructure search procedures for macromolecular structures **Acta Crystallographica Section D: biological crystallography**, v. 59, pt. 11, p. 1966-1973, 2003.
- 79 TERWILLIGER, T.C. SOLVE and RESOLVE: automated structure solution, density modification and model building. **Journal of Synchrotron Radiation**, v. 11, n.1, p. 49-52, 1999.
- 80 TERWILLIGER, T. C. Automated main-chain model building by template matching and iterative fragment extension. **Acta Crystallographica Section D: biological crystallography**, v. 59, p.38-44, 2003. Open access. Disponível em: <<http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?gr2291>>. Acesso em: 18 maio 2017.
- 81 TERWILLIGER, T. C. et al. Decision-making in structure solution using Bayesian estimates of map quality: the PHENIX AutoSol wizard. **Acta Crystallographica Section D: biological crystallography**, v. 65, pt. 6, p.582-601, 2009. Open access. Disponível em: <<http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S0907444909012098>>. Acesso em: 18 maio 2017.
- 82 ADAMS, P. D. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallographica Section D: biological crystallography**, v. 66, pt. 2, p. 213-221, 2010. Open access. Disponível em: <<http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?dz5186>>. Acesso em: 18 maio 2017.
- 83 COWTAN, K. The Buccaneer software for automated model building. 1: tracing protein chains. **Acta Crystallographica Section D: biological crystallography**, v. 62, pt. 9, p. 1002-1011, 2006. Open access. Disponível em: <<http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?av5064>>. Acesso em: 18 maio 2017.
- 84 COWTAN, K. Fitting molecular fragments into electron density. **Acta Crystallographica Section D: biological crystallography**, v. 64, pt. 1, p. 83–89, 2008. doi:10.1107/S0907444907033938.
- 85 WINN, M. D. et al Overview of the CCP4 suite and current developments. **Acta Crystallographica Section D: biological crystallography**, v.67, pt. 4, p. 235-242, 2011. Open access. Disponível em: < <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?dz5219>>. Acesso em: 18 maio 2017.
- 86 KABSCH, W. Evaluation of single-crystal X-ray diffraction data from a position-sensitive detector. **Journal of Applied Crystallography**, v. 21, n.6, p. 916-924, 1988. doi: 10.1107/S0021889888007903.
- 87 EVANS, P. R.; MURSHUDOV, G. N. How good are my data and what is the resolution? **Acta Crystallographica Section D: biological crystallography**, v. 69, pt. 7, p. 1204-1214, 2013. Open access. Disponível em: <<http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S0907444913000061>>. Acesso em: 18 maio 2017

88 MCCOY, A. J. et al. Phaser crystallographic software **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, p. 658-674, 2007. Open access. Disponível em: <<http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?he5368>>. Acesso em: 18 maio 2017

89 AFONINE, P. V. et al. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. **Acta Crystallographica Section D: biological crystallography**, v.68, pt. 4, p. 352-67, 2012. doi:10.1107/S0907444912001308.

90 ADAMS, P. D. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallographica Section D: biological crystallography**, v. 66, pt. 2, p. 213-221, 2010. doi:10.1107/S0907444909052925.

91 URZHUMTSEV, A. et al From deep TLS validation to ensembles of atomic models built from elemental motions. **Acta Crystallographica Section D: biological crystallography**, v. 71, pt. 8, p. 1668-83, 2015. doi. 10.1107/S1399004715011426.

92 EMSLEY, P. et al. Features and development of Coot. **Acta Crystallographica Section D: biological crystallography**, v. 66, pt. 4, p. 486–501, 2010. doi:10.1107/S0907444910007493.

93 PyMOL: Molecular Graphics System. version 1.8, Schrödinger, LLC. Disponível em:< <https://pymol.org> >. Acesso em: 26 maio 2017.

94 GASTEIGER, E. et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: WALKER, J. M. (Ed): **The proteomics protocols handbook**. New Jersey: Humana Press Inc., 2005. p. 571-607.

95 BIAEVALUATION 3.0 software handbook. July 1997 (version C).Disponível em:< http://101.200.202.226/files/res/origs/201508/11/1439279200_11519.pdf>. Acesso em: 26 maio 2017.

96 EVANS, P.; MCCOY, A. An introduction to molecular replacement. **Acta Crystallographica Section D: biological crystallography**, v. 64, pt. 1, p. 1-10, 2008. doi. 10.1107/S0907444907051554.

97 SCAPIN, G. Molecular replacement then and now. **Acta Crystallographica Section D: biological crystallography**, v. 69, n. 11, p. 2266-75, 2013. doi. 10.1107/S0907444913011426.

98 MASHBURN-WARREN, L.; MORRISON, D. A.; FEDERLE, M. J. A novel double-tryptophan peptide pheromone controls competence in *Streptococcus mutans* via an Rgg regulator. **Molecular Microbiology**, v. 78, n. 3, p. 589-606, 2010. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07361.x.

99 PEARSON, W. R.; LIPMAN, D. J. Improved tools for biological sequence comparison. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 8, p. 2444-2448, 1988.

100 WANG, C. Resolution of phase ambiguity in macromolecular crystallography. **Methods in Enzimology**, v. 115, p. 90-112, 1985. doi:10.1016/0076-6879(85)15009-3.

101 WEISS, M.S. Global indicators of X-ray data quality. **Journal of Applied Crystallography**, v. 34, p. 130-135, 2001. doi:10.1107/S0021889800018227.

102 KARPENAHALLI, M. R.; SÖDING, J.; LUPAS, A. N. TPRpred: a tool for prediction of TPR-, PPR- and SEL1-like repeats from protein sequences. **BMC Bioinformatics**, v. 8, n. 2, 2007. doi:10.1186/1471-2105-8-2.

103 HAYWARD, S.; BERENDSEN, H. J. C. Systematic analysis of domain motions in proteins from conformational change: new results on citrate synthase and T4 lysozyme. **Proteins, Structure, Function and Genetics**, v. 30, n. 2, p. 144-154, 1998.

104 FOX, N. K.; BRENNER, S. E.; CHANDONIA, J. M. SCOPe: structural classification of proteins—extended, integrating SCOP and ASTRAL data and classification of new structures. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D304-D309, 2014. Open access. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkt1240>>. Acesso em: 19 maio 2017.

105 HAYWARD, S.; KITAO, A.; BERENDSEN, H. J. C. Model-free methods of analyzing domain motions in proteins from simulation: a comparison of normal mode analysis and molecular dynamics simulation of lysozyme. **Proteins, Structure, Function and Genetics**, v. 27, n. 3, 425-437, 1997.

106 KRISSINEL, E.; HENRICK, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. **Journal of Molecular Biology**, v. 372, n. 3, p. 774-797, 2007. doi:10.1016/j.jmb.2007.05.022.

107 SHERIFF, S.; HENDRICKSON, W. A. Description of overall anisotropy in diffraction from macromolecular crystals. **Acta Crystallographica Section A: foundations and advances**, v. 43, pt. 2, p. 118-121, 1987. doi:10.1107/S010876738709977X.

108 SCHOMAKER, V.; TRUEBLOOD, K. N. On the rigid-body motion of molecules in crystals. **Acta Crystallographica Section B: structural science, crystal engineering and material**, v. 24, pt. 1, p. 63-76, 1968. doi:10.1107/S0567740868001718.

109 BEHR, S.; HEERMANN, R.; JUNG, K. Insights into the DNA-binding mechanism of LytR-type transcription regulator. **Bioscience Report**, v. 36, n. 2, e00326, 2016. Open access. Disponível em: <<http://www.biosciencerep.org/content/ppbiosciencerep/36/2/e00326.full.pdf>>. Acesso em: 13 maio 2017.

110 HOOVER, S. E. et al. A new quorum sensing system (TprA/PhrA) for *Streptococcus pneumoniae* D39 that regulates a lantibiotic biosynthesis gene cluster. **Molecular Microbiology**, v. 97, n. 2, p. 229-243, 2015. doi:10.1111/mmi.13029.

111 PETERSEN, T. N. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, n. 8, n. 10, p. 785-786, 2011. doi:10.1038/nmeth.1701.

112 DRAMSI, S. et al. Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of InlB, a surface protein of the internalin multigene family. **Molecular Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 251-261, 1995.

113 GAILLARD, J. L. et al. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from Gram-positive cocci. **Cell**, v. 65, n. 7, p.1127-1141, 1991.

114 NCBI RESOURCE COORDINATORS. Database resources of the national center for biotechnology information. **Nucleic Acids Research**, v.45, n. 1, p. D12-D17, 2017. doi:10.1093/nar/gkw1071. Epub 2016 Nov. 28.

115 FONTAINE, L. et al. Mechanism of competence activation by the ComRS signaling system in streptococci. **Molecular Microbiology**, v. 86, n. 6, p. 1113-1132, 2013. doi:10.1111/mmi.12157.