

ÍRIS TODESCHINI

**Estudo funcional e estrutural do cluster PAS – GGDEF na
sinalização c-di-GMP em *Leptospira interrogans* sorovar
Copenhageni**

ÍRIS TODESCHINI

**Estudo funcional e estrutural do cluster PAS – GGDEF na
sinalização c-di-GMP em *Leptospira interrogans* sorovar
Copenhageni**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia do Instituto de
Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

São Paulo

2020

ÍRIS TODESCHINI

**Estudo funcional e estrutural do cluster PAS – GGDEF na
sinalização c-di-GMP em *Leptospira interrogans* sorovar
Copenhageni**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Cristiane
Rodrigues Guzzo Carvalho

Versão original

São Paulo

2020

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Todeschini, Íris
Estudo funcional e estrutural do cluster PAS -
GGDEF na sinalização c-di-GMP em *Leptospira*
interrogans sorovar Copenhageni / Íris Todeschini;
orientador Cristiane Rodrigues Guzzo Carvalho. --
São Paulo, 2020.
107 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Bioquímica. 2. Biologia estrutural. 3.
Proteína. I. Rodrigues Guzzo Carvalho, Cristiane ,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Íris Todeschini

Título da Dissertação/Tese: Estudo funcional e estrutural do cluster PAS – GGDEF na sinalização c-di-GMP em *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni

Orientador: Prof. Dra. Cristiane Rodrigues Guzzo Carvalho

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo Estrutural e Funcional de proteínas envolvidas na síntese, degradação e ligação ao c-diGMP e de proteínas do sistema de secreção de *Leptospira interrogans* Copenhageni", protocolada sob o CEUA nº 1880050418, sob a responsabilidade de **Cristiane Rodrigues Guzzo Carvalho** e equipe; *Iris Todeschini* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 23/07/2018.

We certify that the proposal "Structural and Functional studies of proteins related to c-di-GMP signalling and proteins belong to the T2SS of *Leptospira interrogans* Copenhageni.", utilizing 30 Heterogenics rats (30 males), protocol number CEUA 1880050418, under the responsibility of **Cristiane Rodrigues Guzzo Carvalho and team; Iris Todeschini** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 07/23/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: **48 meses**

Depto/Setor: **Microbiologia**

Origem: **Biotério de Produção de Ratos da Rede de Biotérios da USP - Profa. Dra. Zuleica Bruno Fortes**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

Idade ou peso: **250 a 500 g**

Linhagem: **Wistar**

N amostral: 30

São Paulo, 22 de julho de 2019



Profa. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Dr. Alexandre Ceroni
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

AGRADECIMENTOS

Eu agradeço:

A Deus, fonte de conforto espiritual durante este período de pós-graduação.

A minha mãe, Neide A. P. Todeschini, por ter me criado e educado com todo o amor que só uma mãe pode dar.

Ao Phelipe Augusto Mariano Vitale por todo o apoio dado durante estes anos, além da excelente colaboração firmada neste trabalho.

A minha orientadora Prof.^a Dr.^a Cristiane Guzzo pela orientação, pela oportunidade de ser parte de seu laboratório e por sempre se preocupar em me ensinar da melhor forma possível as técnicas utilizadas no desenvolvimento do projeto.

A Prof.^a Dr.^a Taícia Pacheco Fill por nos receber em seu laboratório e colaborar nos experimentos de espectrometria de massas para identificação da brevianamida F.

Ao Prof.^o Dr. Igor Dias Jurberg pela síntese da brevianamida F essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Jose David Rivera Echeverri pela sua prontidão em firmar uma colaboração para tratamento dos dados de calorimetria.

Ao Prof.^o Dr. Roberto Salinas por ajudar na discussão dos dados de RMN e calorimetria. Além disponibilizar seus orientados para auxiliar neste projeto.

Ao Dr. Edgar Enrique Llontop Cornejo por me ensinar de maneira didática as técnicas de purificação e cristalização de proteínas que foram fundamentais no desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann pela colaboração e disponibilização das cepas de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni.

A Dr.^a Josefa Bezerra da Silva pela colaboração, discussão e disponibilização das cepas de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni.

Ao Prof.^o Dr. Prof. Dr. Shaker Chuck Farah por abrir seu laboratório e disponibilizar seus reagentes e equipamentos para realização deste projeto.

Ao Prof.^o Dr. Robson F. Sousa por me orientar durante o estágio de aluno PAE, e pelas conversas produtivas a respeito do tema desta dissertação.

A CAPES (processo n° 1742381) pela bolsa concedida e às agências de fomento à pesquisa CNPq e Fapesp (processos 2016/08414-7 e n° 2019/00195-2) pelo financiamento dado ao projeto.

A todos os membros do grupo de pesquisa por toda ajuda nas discussões científicas e reuniões de grupo e diversas dicas dadas ao longo do projeto: Alexandre Mazarin Bakanova, Aline Dias da Purificação, Ana Paula Barbosa, Anacleto Silva de Souza, Ángel Luis Caba Marchán, Angy Liseth Davalos, Bruno Yasui Matsuyama, Camila Gasque, Gabriel Guarany de Araujo, Gabriel Umaji Oka, Mario Andres Rodríguez Pineda, Matheus Matildes Conforte, Natalia Bueno, Nathalia Marins de Azevedo, Tania Churasacari Vincés e Vanice Harumi de Oliveira Kanashiro.

RESUMO

TODESCHINI, I. **Estudo Funcional e Estrutural do Cluster PAS – GGDEF na sinalização c-di-GMP em *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni.** 2020. 107 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

O objetivo deste trabalho é estudar a estrutura e função das sete proteínas parálogas compostas por domínios PAS e GGDEF (genes LIC_11125 a LIC_11131) presente em cepas de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni (agente etiológico da zoonose Leptospirose), as quais possuem assinatura GG(D/E)EF responsável pela produção do segundo mensageiro bacteriano c-di-GMP, sendo que o domínio PAS regula a atividade do domínio GGDEF. Neste trabalho foi possível identificar o dipeptídeo brevianamida F (ciclo L-prolina L-triptofano) sintetizada por fungos (dentre os quais encontra-se *Aspergillus fumigatus*) que interage com a LcdD (codificada pelo gene LIC_11128) coordenando a interação proteína-proteína entre os domínios LcdB_{PAS}, LcdC_{PAS} e LcdD_{PAS}, modificando a provável heterodimerização entre esses domínios. Além disso, foi possível obter diferentes culturas de *L.interrogans* sorovar Copenhageni, na qual uma expressa a LcdD, e a outra não; de forma que a cultura cuja bactéria expressa a LcdD não apresenta alterações morfológicas após adição de brevianamida F ao cultivo em meio EMJH, mas a cultura que não expressa a proteína apresenta alterações morfológicas e diminuição da curva de crescimento. Logo, é possível levantar a hipótese de que a presença da LcdD esteja relacionada a um mecanismo de resistência da *L. interrogans* sorovar Copenhageni a presença da toxina fúngica brevianamida F.

Palavras chave: *Leptospira interrogans*. Atividade enzimática. Biologia estrutural. Interação proteína-proteína. Interação proteína-ligante.

ABSTRACT

TODESCHINI, I. Functional and Structural Study of the PAS - GGDEF Cluster in c-di-GMP signaling in *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. 2020.107p. Dissertation (Master in Microbiology) - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2020.

The aim of this work is to study the structure and function of seven parallel proteins composed by PAS and GGDEF domains (genes LIC_11125 to LIC_11131) present in strains of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni (etiological agent of the zoonosis Leptospirosis), which have a signature GG(D/E)EF responsible for the production of the second bacterial messenger c-di-GMP, with the PAS domain regulating the activity of the GGDEF domain. In this work, it was possible to identify the dipetid brevianamide F (L-proline L-tritophane cycle) synthesized by fungi (among which is found *Aspergillus fumigatus*) that interacts with LcdD (encoded by the LIC_11128 gene) coordinating the protein-protein interaction between the LcdB_{PAS}, LcdC_{PAS} and LcdD_{PAS} domains, modifying the probable heterodimerization between these domains. In addition, it was possible to obtain different cultures of *L. interrogans* serovar Copenhageni, in which one expresses the LcdD, and the other don't express this protein; so that the culture whose bacterium expresses LcdD does not show morphological changes after adding brevianamide F to the culture in EMJH medium, but the culture that does not express the protein shows morphological changes and reduced growth curve. Therefore, it is possible to raise the hypothesis that the presence of LcdD is related to a resistance mechanism of *L. interrogans* serovar Copenhageni to the presence of the fungal toxin brevianamide F.

Keywords: *Leptospira interrogans*. Enzymatic activity. Structural biology. Protein-protein interaction. Protein-ligand interaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Hipótese da síntese de c-di-GMP através da formação de homodímeros..	20
Figura 2 - Hipótese da síntese de c-di-GMP através da formação de heterodímeros.	21
Figura 3 – Reconhecimento de LcdD _{PAS} via <i>Western Blotting</i> com diferentes diluições do anticorpo primário.....	36
Figura 4 - Arvore filogenética das proteínas com domínios PAS e GGDEF dentre as bactérias que constituem a família <i>Leptospiraceae</i>	39
Figura 5 - Localização dos sete genes que codificam as proteínas estudadas neste trabalho.....	40
Figura 6 - Alinhamento das sete proteínas.....	41
Figura 7 - WebLogo das sete proteínas... ..	42
Figura 8 - Árvore filogenética das proteínas em estudo.	43
Figura 9 - Géis SDS-PAGE (15% acrilamida) comprovando a purificação das oito proteínas utilizadas neste trabalho.	45
Figura 10 - <i>Western Blotting</i> anti poli histidinda.....	46
Figura 11 - Pico de eluição das proteínas LcdC _{PAS} (em A) e LcdG _{PAS} (em B) utilizando cromatografia por exclusão de tamanho (coluna Superdex 75 10/300 GL)..	46
Figura 12 - Resultado de espectrometria de massas do ligante presente em LcdD _{PAS}	47
Figura 13 - Molécula detectada por espectrometria de massas como sendo o ligante de LcdD _{PAS}	48
Figura 14 – Cristalização e estrutura tridimensional de LcdC _{PAS}	49
Figura 15 - “Diagrama de Ramachandran” do modelo cristalográfico de LcdC _{PAS}	50
Figura 16 - Topologia do domínio da estrutura LcdC _{PAS}	52
Figura 17 - Cristalização e estrutura tridimensional de LcdD _{PAS} ligada a brevianamida F.....	54
Figura 18 – Sítio de interação de LcdD _{PAS} com brevianamida F.....	55

Figura 19 - “Diagrama de Ramachandran” do modelo cristalográfico de LcdD _{PAS} cristalizada com brevianamida F.....	56
Figura 20 - Topologia do domínio da estrutura LcdD _{PAS} ligada a brevianamida F.....	57
Figura 21 – Cristalização e estrutura tridimensional de LcdD _{PAS} apo.....	59
Figura 22 - “Diagrama de Ramachandran” do modelo cristalográfico de LcdD _{PAS} apo. Nenhum resíduo possui ângulos em regiões não favoráveis.	60
Figura 23 - Topologia do domínio da estrutura LcdD _{PAS} apo.....	61
Figura 24 - Sobreposição das estruturas cristalográficas e do sítio de interação com brevianamida F de LcdD _{PAS} na forma apo e ligada..	63
Figura 25 – Cristalização e estrutura tridimensional de LcdG _{PAS}	65
Figura 26 - “Diagrama de Ramachandran” do modelo cristalográfico de LcdG _{PAS} apo. Nenhum resíduo possui ângulos em regiões não favoráveis.	66
Figura 27 - Topologia do domínio da estrutura LcdG _{PAS} ..	67
Figura 28 - Sobreposição em pares das quatro estruturas obtidas.	69
Figura 29 - Picos de eluição de cada domínio PAS para determinação do estado oligomérico.....	71
Figura 30 - Espectro de ¹ H ¹⁵ N HSQC da proteína LcdD _{PAS} apo. Neste espectro a proteína aparenta estar pouco estruturada com picos alargados.....	73
Figura 31 - Espectro de correlação ¹ H- ¹⁵ N HSQC da proteína LcdD _{PAS} frente a diferentes titulações do ligante brevianamida F.	74
Figura 32 - Sobreposição dos espectros da proteína LcdD _{PAS} apo frente a adição de triptofano e prolina.....	75
Figura 33 – Sobreposição do espectro de correlação ¹ H- ¹⁵ N HSQC da proteína LcdD _{PAS} apo frente o espectro da proteína LcdD _{PAS} apo com LcdA _{PAS}	76
Figura 34 - Comparação do espectro de correlação ¹ H- ¹⁵ N HSQC da proteína LcdD _{PAS} apo frente o espectro da proteína LcdD _{PAS} apo com LcdB _{PAS}	77
Figura 35 - Sobreposição dos espectros de correlação ¹ H- ¹⁵ N HSQC da proteína LcdD _{PAS} apo frente o espectro da proteína LcdD _{PAS} apo com LcdC _{PAS}	78

Figura 36 - Sobreposição dos espectros de correlação ^1H - ^{15}N HSQC da proteína LcdD _{PAS} apo frente o espectro da proteína LcdD _{PAS} apo com LcdE _{PAS}	78
Figura 37 - Sobreposição dos espectros de correlação ^1H - ^{15}N HSQC da proteína LcdD _{PAS} apo frente o espectro da proteína LcdD _{PAS} apo com LcdF _{PAS}	79
Figura 38 - Sobreposição dos espectros de correlação ^1H - ^{15}N HSQC da proteína LcdD _{PAS} apo frente o espectro da proteína LcdD _{PAS} apo com LcdG _{PAS}	79
Figura 39 - Sobreposição dos espectros de correlação ^1H - ^{15}N HSQC da proteína LcdD _{PAS} com brevianamida F frente o espectro da proteína LcdD _{PAS} com brevianamida F com LcdA _{PAS}	80
Figura 40 - Sobreposição dos espectros de correlação ^1H - ^{15}N HSQC da proteína LcdD _{PAS} com brevianamida F frente o espectro da proteína LcdD _{PAS} com brevianamida F com LcdB _{PAS}	81
Figura 41 – Comparação do espectro de correlação ^1H - ^{15}N HSQC da proteína LcdD _{PAS} ligada a brevianamida F frente o espectro da proteína LcdD _{PAS} ligada a brevianamida F com LcdC _{PAS}	82
Figura 42 - Sobreposição dos espectros de correlação ^1H - ^{15}N HSQC da proteína LcdD _{PAS} com brevianamida F frente o espectro da proteína LcdD _{PAS} com brevianamida F com LcdE _{PAS}	83
Figura 43 - Sobreposição dos espectros de correlação ^1H - ^{15}N HSQC da proteína LcdD _{PAS} com brevianamida F frente o espectro da proteína LcdD _{PAS} com brevianamida F com LcdF _{PAS}	83
Figura 44 - Sobreposição dos espectros de correlação ^1H - ^{15}N HSQC da proteína LcdD _{PAS} com brevianamida F frente o espectro da proteína LcdD _{PAS} com brevianamida F com LcdG _{PAS}	84
Figura 45 - Interação entre LcdD _{PAS} e LcdD _{PAS} utilizando termoforese em microescala.	85
Figura 46 - Interação entre LcdD _{PAS} e LcdB _{PAS} utilizando termoforese em microescala. Neste experimento é possível observar que a interação entre LcdD _{PAS} e LcdB _{PAS} ocorre com alta afinidade.	86

Figura 47 - Interação entre LcdD _{PAS} e brevianamida F utilizando termoforese em microescala..	89
Figura 48 - Ajuste dos dados de ITC de interação de LcdD _{PAS} com brevianamida F utilizando o modelo Hill..	91
Figura 49 - Análise da atividade enzimática da proteína LcdD por cromatografia de troca iônica..	92
Figura 50 - Curva de crescimento de <i>L. interrogans</i> na ausência de na presença de brevianamida F.....	93
Figura 51 - Detecção da LcdD em <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni via <i>Western Blotting</i> utilizando soro anti-LcdD _{PAS}	94
Figura 52 - Wstestern Blotting anti- LcdD _{PAS} em <i>L. interrogans</i> frente diferentes tempos de exposição a brevianamida F.....	95
Figura 53 - Imagens obtidas através de microscopia eletrônica de transmissão de <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni das cepas que não expressam a proteína LcdD frente a adição de brevianamida F. ...	97
Figura 54 - Imagens obtidas através de microscopia eletrônica de transmissão de <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni das cepas que expressam a proteína LcdD frente adição de brevianamida F.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação de aminoácidos utilizados em cada frente ao gene correspondente.....	25
Tabela 2 - Dados cristalográficos e refinamento estatístico da estrutura LcdC _{PAS}	51
Tabela 3 - Dados cristalográficos e refinamento estatístico da estrutura LcdD _{PAS} na forma apo e complexada a brevianamida F.	61
Tabela 4 – Dados cristalográficos e refinamento estatístico da estrutura LcdG _{PAS}	68
Tabela 5 - Valores de RMSD da comparação em pares dentre as quatro estruturas obtidas.	70
Tabela 6 - Determinação do estado oligomérico das sete proteínas PAS através da comparação entre o peso experimental e o peso teórico.	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Asp - Aspartato

ASU - *Asymmetric units*

c-di-GMP - bis(3'→5')GMP cíclico

CENPEM - Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais

DGC - Diguanilato ciclase

D.O. 600nm - Densidade óptica a 600 nm

EDTA - Ácido etileno-diamino-tetracético

EMJH - *Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris*

FMVZ - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

GGDEF - Motivos conservados GGDEF, G-Glicina, D-aspartato, E-glutamato e Fenilalanina

Glu - Glutamato

Gly - Glicina

GTP - Guanosina trifosfato

HPLC - *High performance liquid chromatography*,

HSQC - *Heteronuclear single quantum correlation*

HRV-3C - *Human Rhinovirus 3C Protease*

IPTG - Isopropil - β -D - tiogalactopiranosídeo

ITC - *Isothermal Titration Calorimetry*

KEGG – *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

L.interrogans - *Leptospira interrogans*

LcdA - *Leptospira cyclic dinucleotide A*

LcdB - *Leptospira cyclic dinucleotide B*

LcdC - *Leptospira cyclic dinucleotide C*

LcdD - *Leptospira cyclic dinucleotide D*

LcdE - *Leptospira cyclic dinucleotide E*

LcdF - *Leptospira cyclic dinucleotide F*

LcdG - *Leptospira cyclic dinucleotide G*

LNBio - Laboratório Nacional de Biociências

LNLS - Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

MST - *Microscale thermophoresis*

OPPF-UK - *Oxford Protein Production Facility*

PAS - Motivos conservados PAS Per-Arnt-Sim

PDB - Banco de dados de proteínas (*Protein Data Bank*)

PEG - Polietilenoglicol

ppm - Parte por milhão

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RMSD - Raiz quadrada do quadrado do desvio padrão médio

SDS - Sódio dodecilsulfato

SDS-PAGE - Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

USP - Universidade de São Paulo

Tris - Tris (hidroximetil)aminometano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1	Clonagem das proteínas.....	24
3.2	Expressão das proteínas	25
3.3	Western Blotting.....	26
3.4	Purificação das proteínas	27
3.5	Remoção da cauda de poli-histidina utilizando a protease HRV-3C.....	28
3.6	Teste de Cristalização das Proteínas	29
3.7	Determinação do estado oligomérico dos domínios PAS em solução	29
3.8	Identificação da molécula acoplada a proteína LcdD _{PAS}	30
3.9	Espectros de correlação ¹ H- ¹⁵ N (HSQC)	31
3.10	Ensaio de termoforese em microescala	32
3.11	Calorimetria de titulação isotérmica (ITC - Isothermal Titration Calorimetry)	
	33	
3.12	Ensaio de atividade diguanilato ciclase	34
3.13	Produção de anticorpos anti-LcdD _{PAS}	35
3.14	Curva de crescimento de <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Copenhageni.....	36
3.15	Visualização de <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Copenhageni por microscopia de transmissão eletrônica	37
4	Resultados e Discussão.....	37
4.1	Relação evolutiva entre os sete genes parálogos.....	37
4.2	Purificação das proteínas	43
4.3	Identificação por espectrometria de massas do ligante de LcdD _{PAS}	47
4.4	Cristalização das proteínas LcdC _{PAS} LcdD _{PAS} e LcdG _{PAS}	48

4.4.1	Estrutura cristalográfica da proteína LcdC _{PAS}	48
4.4.2	Estrutura cristalográfica da proteína LcdD _{PAS} ligada a brevianamida F e na forma apo	52
4.4.3	Estrutura cristalográfica da proteína LcdG _{PAS}	63
4.5	Determinação do estado de oligomérico das proteínas em estudo	70
4.6	Ensaio de interação por RMN	72
4.7	Ensaio de termoforese em microescala para o cálculo da constante de dissociação de interação proteína-proteína e proteína-ligante	84
4.8	Interação entre LcdD _{PAS} e Brevianamida F por ITC (Isothermal Titration Calorimetry)	90
4.9	Atividade diguanilato ciclase – LcdD.....	91
4.10	Curva de crescimento de <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Copenhageni.....	92
4.11	Detecção de LcdD em <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Copenhageni.....	93
4.12	Alterações morfológicas de <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Copenhageni na presença de Brevianamida F	96
5	CONCLUSÃO.....	100
6	REFERÊNCIAS	102

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose emergente amplamente distribuída pelo mundo cujo agente etiológico pertence ao gênero *Leptospira*. A doença afeta humanos e também outros mamíferos domésticos e selvagens (ADLER; LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

A *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni (membro da família *Leptospiraceae*) é agente etiológico da leptospirose em humanos. Trata-se de uma bactéria Gram-negativa, alongada, delgada, altamente móvel, em forma de espiral com diâmetro médio de aproximadamente 0,1 μ m, faixa de comprimento de 6 à 20 μ m, amplitude helicoidal de 0,1 a 0,15 μ m e comprimento de onda de 0,5 μ m (CARLETON et al., 1979) (GOLDSTEIN; CHARON, 1990).

Presume-se que a leptospirose seja a zoonose mais difundida no mundo, ou seja, a incidência da doença ocorre em diversos países, sendo que os desastres naturais podem aumentar a taxa de incidência desta doença (LEVETT, 2001). As séries históricas de casos confirmados no Estado de São Paulo, no período entre 1986 a 2011, registraram 17.541 casos de leptospirose, variando entre 239 (1986) a 1.057 (2006) casos anuais. A incidência teve variação de 0,84 (1986) a 2,87 (1991) casos por 100 mil habitantes. Nesse mesmo período, foram informados 2.217 óbitos, com variação de 43 (1990) a 131 (2006) óbitos anuais, sendo há relação entre a incidência da doença e os períodos chuvosos nos quais ocorrem desastres naturais e alagamentos o que aumenta o contato dos humanos a bactéria (CCZ, 2013).

As fontes de disseminação da leptospirose são essencialmente mamíferos selvagens e domesticados que estão infectados por *Leptospira* apresentando ou não sintomatologia, sendo que *Rattus norvegicus* e *Rattus rattus* são os principais hospedeiros da *L. interrogans*. Estes animais na maioria das vezes são portadores assintomáticos da doença, sendo que a bactéria geralmente coloniza os túbulos renais proximais destes animais e são eliminadas no ambiente através da micção. Em seguida os seres humanos se infectam por intermédio do contato direto com a urina ou indiretamente através de água ou alimentos contaminados. A *L. interrogans*

pode adentrar no hospedeiro através das mucosas dos olhos, nariz ou garganta e através de cortes ou abrasões na pele, em seguida, invadem os tecidos e fluídos do hospedeiro colonizando principalmente regiões privadas do sistema imune. Nos seres humanos, a evolução e gravidade da doença varia na dependência da espécie de *Leptospira*, do estado de saúde e imunidade do hospedeiro e da dose infectante (CINCO, 2010). No entanto, atividades ocupacionais envolvendo animais infectados e solo e água contaminados são fatores de risco para o desenvolvimento da leptospirose

Na maioria dos casos a leptospirose em humanos tem uma apresentação clínica bifásica, que começa com a fase septicêmica seguida de manifestações imunológicas. A leptospirose não apresenta sinais patognômicos, na fase inicial da doença o paciente apresenta febre e mialgia (sintomas comuns a diversas doenças) o que dificulta o diagnóstico e conseqüentemente a notificação da doença. As formas graves da doença, que ocorrem posteriormente, podem ser fatais, com danos em vários sistemas, incluindo insuficiência renal, disfunção hepática, dano vascular, miocardite, hemorragia pulmonar e lesões musculares (síndrome de Weil) nestas fase devido a gravidade dos sinais e a provável soroconversão do paciente o diagnóstico ocorre mais frequentemente, porém a taxa de letalidade é de aproximadamente 10 a 15%. (BRITO; SILVA; ABREU, 2018) (CINCO, 2010) (LEVETT, 2001).

Um fator interessante da fisiologia de *Leptospira interrogans* que impacta na sua prevalência na população é a capacidade da bactéria prosperar no solo e na água por longos períodos de tempo e ainda infectar o hospedeiro (MEHROTRA et al., 2017). Para que a bactéria seja capaz de sobreviver em diferentes ambientes é necessário haver mecanismos de regulação e adaptação. Sendo que, em bactérias, o segundo mensageiro bacteriano c-di-GMP (3',5'-di-guanosina monofosfato cíclico) regula a fisiologia da bactéria conforme mudanças no meio externo e já foi descrito como um fator chave na regulação de diferentes fenótipos bacterianos, tais quais a vida da célula internalizada em um biofilme ou a regulação para a saída do microorganismo em busca de um novo ambiente a ser colonizado; além disso, o c-di-GMP está relacionado ao ciclo celular, diferenciação e mudança de estado

virulento nas infecções agudas ao estado menos virulento, porém mais resistente (RÖMLING; GALPERIN; GOMELSKY, 2013).

A produção do segundo mensageiro bacteriano c-di-GMP na célula é feita por proteínas com domínio GGDEF a qual possui a assinatura GG(D/E)EF essencial para a atividade diguanilato ciclase. Para que ocorra a formação de c-di-GMP, cada monômero da proteína (domínio GGDEF) deve se ligar a uma molécula de GTP na presença de dois íons metálicos (Mg^{2+} ou Mn^{2+}) para que haja formação de c-di-GMP e duas moléculas de pirofosfato. No entanto, o domínio GGDEF se liga a somente uma molécula de GTP por vez, o que implica na necessidade na formação de estados oligoméricos pelo menos diméricos para que as moléculas de GTP se aproximem o suficiente possibilitando a ciclização da molécula de c-di-GMP (SCHIRMER, 2016) (CHAN et al., 2004). Desta forma, as proteínas que contêm domínio GGDEF enzimaticamente ativas não seguem o modelo cinético de Michaelis-Menten, em que uma molécula de proteína liga a um substrato e produz um produto. No caso de enzimas com domínio GGDEF, também chamadas de diguanilato ciclase (DGC), há a formação de dímeros em que cada proteína liga a uma molécula de GTP para, então, sintetizar apenas uma molécula de c-di-GMP.

Análises de bioinformática mostraram que *L. interrogans* possui vários genes que codificam proteínas envolvidas na síntese, degradação e ligação ao c-di-GMP, sendo ao todo 16 proteínas codificam o domínio GGDEF, das quais sete são proteínas parálogas localizadas no cluster LIC_11125, LIC_11126, LIC_11127, LIC_11128, LIC_11129, LIC_11130 e LIC_11131 e possuem a assinatura GG(D/E)EF. Estas sete proteínas parálogas apresentam a mesma arquitetura de domínios, um domínio PAS, na região N-terminal, e um domínio GGDEF no C-terminal.

Os domínios PAS são sensores versáteis e módulos de interação em proteínas de transdução de sinal, sendo que, já foram mostradas interações destes domínios com diversas moléculas, dentre as quais podemos citar grupamento heme, flavina, ácido carboxílico e ácido graxo (HENRY; CROSSON, 2011). Os domínios PAS são sensores que geralmente estão acoplados a domínios efetores regulando a atividade destes domínios (MÖGLICH; AYERS; MOFFAT, 2009).

A presença do cluster de 7 genes parálogos em *L. interrogans* (LIC_11125 a LIC_11131) chama a atenção devido ao fato destas proteínas serem capazes de produzir o segundo mensageiro bacteriano c-di-GMP tendo o domínio PAS como regulador da atividade diguanilato ciclase uma vez que os domínios GGDEFs precisam dimerizar para se tornarem enzimaticamente ativas. (PAUL et al., 2007).

Por isso, foram feitas as seguintes hipóteses sobre a regulação da atividade diguanilato ciclase (DGC) das sete proteínas em estudo: I) formação de homodímeros e II) formação de heterodímeros. Na ocorrência de homodímero a atividade DGC da proteína poderia ser mediada pela presença de um dado ligante o qual poderia ser responsável pela oscilação entre as conformações aberta (inativa) e fechada (ativa) da proteína (**Figura 1**). Na hipótese de formação de heterodímeros haveria um mecanismo de regulação mais complexo, uma vez que há necessidade da interação entre duas proteínas as quais, provavelmente, interagem com diferentes ligantes para regulação da atividade diguanilato ciclase (**Figura 2**).

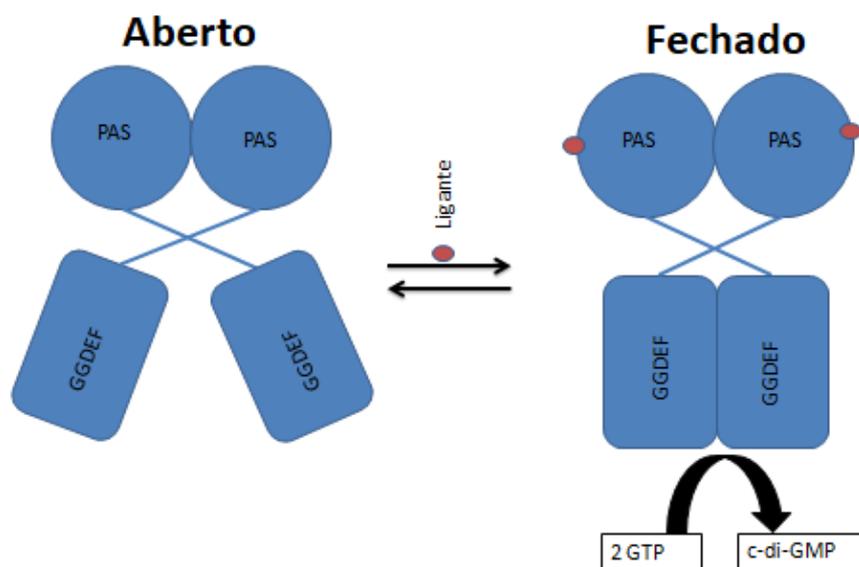


Figura 1 - Hipótese da síntese de c-di-GMP através da formação de homodímeros. Nesta hipótese cada proteína interage com outra molécula da mesma proteína e a modulação da atividade diguanilato ciclase ocorre através da interação do domínio PAS com seu respectivo ligante, a ser identificado.

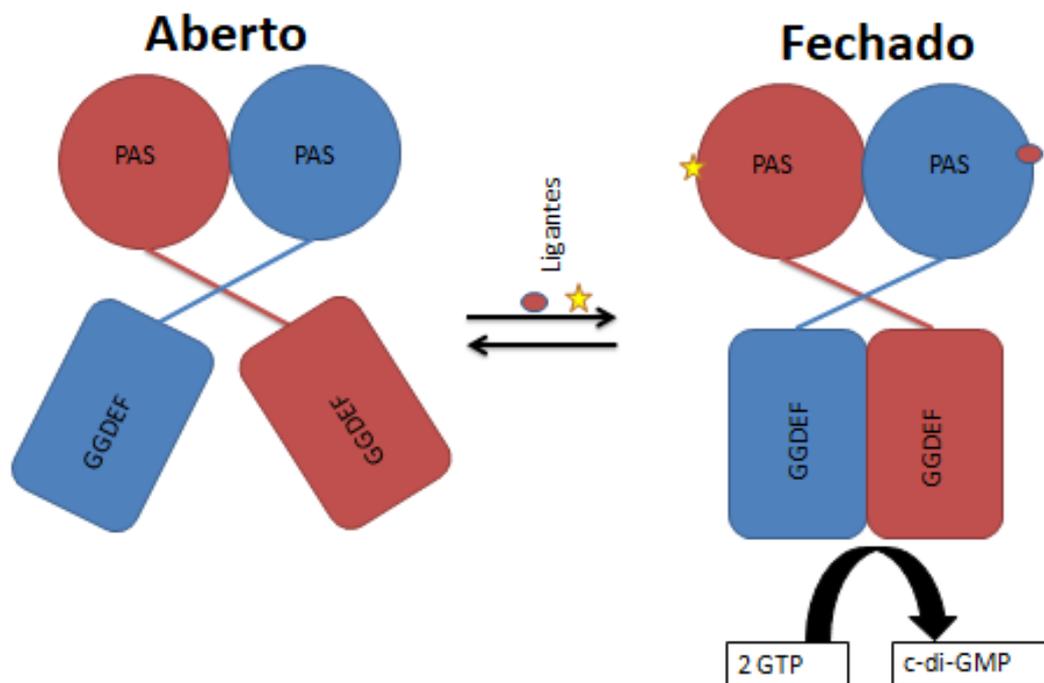


Figura 2 - Hipótese da síntese de c-di-GMP através da formação de heterodímeros. Nesta hipótese dentre as sete proteínas parálogas haveria interação entre duas destas proteínas e a produção de c-di-GMP seria mediada pela interação de diferentes domínios PAS os quais provavelmente reconheceriam diferentes moléculas. Dessa forma a regulação do estado aberto para o fechado seria mediada pela presença de dois ligantes ao invés de um único ligante.

Neste trabalho dentre os sete domínios PAS estudados, foi possível obter a estrutura de três proteínas (LcdC_{PAS}, LcdD_{PAS} apo e em complexo com brevianamida F e LcdG_{PAS}). Devido à complexidade do trabalho e do tempo focamos no estudo LcdD cujo ligante foi identificado como sendo brevianamida F (ciclo L-prolina, L-triptofano); este composto trata-se de um produto natural produzido por fungos. Um fato interessante advindo da identificação deste ligante é que a presença da brevianamida afeta a interação proteína-proteína entre os domínios PAS, o que corrobora com a hipótese II apresentada anteriormente.

Brevianamida F é um composto fúngico precursor de uma variedade de alcaloides pré-metilados com atividade biológica, incluindo a produção de *fumitremorgin A*, *B* e *C* e produção de *triprostatina B* (MAIYA et al., 2006). A via metabólica de produção e utilização da brevianamida está descrita em *Aspergillus fumigatus* (MAIYA et al., 2006), mas a presença deste dipeptídeo também ocorre em outros fungos tais como *Penicillium sp.* (BIRCH; WRIGHT, 1969), e em bactérias dos

gêneros *Actinomyces sp.* e *Streptomyces sp.* as quais produzem brevianamida F, mas ainda não está claro o papel biológico desta molécula na fisiologia destas bactérias (BEN AMEUR MEHDI et al., 2009) (BEN AMEUR MEHDI et al., 2009).

Do ponto de vista antimicrobiano a brevianamida F já se eficaz contra diversos microrganismos tais como *Mycobacterium bovis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* (HUANG et al., 2016), (BEN AMEUR MEHDI et al., 2009). Neste trabalho brevianamida F apresenta toxicidade na (concentração de 100 μM) para *L. interrogans* sorovar Copenhageni quando esta bactéria não expressa a proteína LcdD a níveis detectáveis por *Western Blotting* (fentograma de proteína). Quando a *L. interrogans* sorovar Copenhageni apresenta a expressão da proteína LcdD a níveis detectáveis por *Western blotting* a adição de 100 μM de brevianamida F ao meio EMJH não gera alterações morfológicas, sendo que ainda há necessidade de realizar a curva de crescimento da *L. Interrogans* sorovar Copenhageni que expressa a proteína LcdD em diferentes concentrações de brevianamida F, ou seja, apesar deste composto ser tóxico para diversas bactérias a presença da proteína LcdD em *L. Interrogans* sorovar Copenhageni aparentemente gera resistência desta bactéria à brevianamida F.

2 OBJETIVOS

O objetivo inicial deste projeto era elucidar a rede de sinalização c-di-GMP que envolve os genes parálogos LIC_11125, LIC_11126, LIC_11127, LIC_11128, LIC_11129, LIC_11130 e LIC_11131 os quais possuem o domínio sensor PAS no N-terminal da proteína e o domínio efetor GGDEF na porção C-terminal e, dessa forma, entender a função biológica do c-di-GMP e seu possível papel na virulência de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni. Devido à complexidade desse estudo, ao longo do projeto foi dado foco a caracterização estrutural e funcional de LcdD. Dessa forma os objetivos específicos deste trabalho foram:

- 1- Estudo estrutural dos sete domínios PAS utilizando técnica de cristalografia de raios-X;
- 2- Identificação do ligante da proteína LcdD e sua função biológica em *L. interrogans* sorovar Copenhageni;
- 3- Estudo da atividade diguanilato ciclase de LcdD na presença e ausência de seu ligante (brevianamida F).
- 4- Estudo da interação proteína-proteína de LcdD_{PAS} frente às proteínas LcdA_{PAS}, LcdB_{PAS}, LcdC_{PAS}, LcdE_{PAS}, LcdF_{PAS} e LcdG_{PAS} na presença e na ausência de brevisianamida F.
- 5- Entender o papel biológico da expressão de LcdD na fisiologia e virulência da *Leptospira interrogans*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Clonagem das proteínas*

As clonagens foram feitas em colaboração com o grupo do Dr. Ray Owens, chefe da *Facility* de Produção de Proteínas de Oxford (*Oxford Protein Production Facility*_OPPF-UK) no Reino Unido, juntamente com sua estudante Heather Rada e com o técnico Anil Verma. Os clones obtidos estão mostrados na **Tabela 01**.

A clonagem foi feita seguindo o protocolo da OPPF – UK (Oxford Protein Production Facility) (BIRD, 2016) no qual os fragmentos que sintetizam o gene de interesse são inseridos utilizando o Kit da *In Fusion*™ no plasmídeo pOPINF que resulta na fusão de uma cauda de seis histidinas no N-terminal da proteína junto com um sítio para clivagem com a enzima (*Human Rhinovirus 3C Protease*) HRV-3C. O plasmídeo contém o gene de resistência à ampicilina.

Tabela 1 – Relação de aminoácidos utilizados em cada frente ao gene correspondente.

Nome dado a proteína clonada	Domínio clonado	Gene	Aminoácidos incluídos na clonagem
LcdA _{PAS}	PAS	LIC_11125	2 - 114
LcdA	PAS e GGDEF	LIC_11125	2 - 320
LcdA _{GGDEF}	GGDEF	LIC_11125	142 - 320
LcdB _{PAS}	PAS	LIC_11126	2 - 119
LcdB	PAS e GGDEF	LIC_11126	2 - 311
LcdB _{GGDEF}	GGDEF	LIC_11126	146 - 311
LcdC _{PAS}	PAS	LIC_11127	2 - 112
LcdC	PAS e GGDEF	LIC_11127	2 - 313
LcdC _{GGDEF}	GGDEF	LIC_11127	139 - 313
LcdD _{PAS}	PAS	LIC_11128	2 - 115
LcdD	PAS e GGDEF	LIC_11128	2 - 308
LcdD _{GGDEF}	GGDEF	LIC_11128	145 - 308
LcdE _{PAS}	PAS	LIC_11129	2 - 115
LcdE	PAS e GGDEF	LIC_11129	2 - 317
LcdE _{GGDEF}	GGDEF	LIC_11129	143 - 317
LcdF _{PAS}	PAS	LIC_11130	2 - 115
LcdF	PAS e GGDEF	LIC_11130	2 - 315
LcdF _{GGDEF}	GGDEF	LIC_11130	142 - 315
LcdG _{PAS}	PAS	LIC_11131	2 - 122
LcdG	PAS e GGDEF	LIC_11131	2 - 319
LcdG _{GGDEF}	GGDEF	LIC_11131	142 - 319

3.2 Expressão das proteínas

Para estabelecer a melhor condição de expressão de cada proteína foram feitos testes com diferentes cepas de *Escherichia coli* e diferentes meios de cultura.

Inicialmente cada plasmídeo de interesse foi inserido nas seguintes cepas de *E. coli*: BI21 DE3 (Novagen), C41 (DE3) (Invitrogen), C43 (DE3) (Invitrogen), Lemo 21 (DE3) (NEB) utilizando o protocolo de choque térmico com cloreto de cálcio (INOUE; NOJIMA; OKAYAMA, 1990). Após a determinação da melhor cepa para expressão da proteína foi feito teste do melhor meio de cultura para expressão, sendo que os meios testados foram: 2xTY (16 g/L triptona, 10g/L extrato de levedura, 5 g/L NaCl), LB (10 g/L Triptona, 5 g/L extrato de levedura, 10 g/L NaCl pH 7,5) e TB (12 g/L Triptona; 24 g/l extrato de levedura; 0,5% glicerol; 0.17 M KH₂PO₄; 0.72 M K₂HPO₄).

Em todas as condições no momento em que o cultivo atingiu D.O._{600 nm} de 0,6 - 0,8, uma amostra foi retirada como controle de pré-indução, e foi adicionado 0,5 mM de IPTG para indução da expressão proteica, mantendo-se o cultivo a 16 °C por 16 horas sobre agitação (250 rpm). Em seguida uma amostra de 1 ml é retirada como controle de indução, o restante do inóculo é centrifugado a 10.000 x g para posterior purificação da proteína. A expressão das proteínas foi confirmada por gel de SDS-PAGE e *Western Blotting*.

3.3 *Western Blotting*

As amostras de interesse foram aplicadas em géis de SDS-PAGE(15% acrilamida) (LAEMMLI, 1970) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (0,2 µm) (BIO-RAD). Padrões de massa molecular pré-corados (*Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope*, Bio-Rad) foram utilizados para identificação de peso molecular das bandas do gel e para verificação da qualidade de transferência das proteínas. A transferência foi realizada utilizando o aparelho “*miniVE Vertical Electrophoresis System (Amersham Biosciences)*”. Para a transferência foi utilizado o tampão: 25 mM Tris-HCl, 192 mM Glicina, 20% metanol e 1g/L SDS. A transferência ocorreu por 1 hora a 300 mA. Ao final, a transferência foi confirmada pela coloração das proteínas com Ponceau S (Ponceau S: 0.1 % (peso/vol.) em 1 % de ácido acético).

Após término da transferência, a membrana foi lavada três vezes com o tampão de lavagem (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl e 0,1% (Vol./Vol.) Tween). Para evitar a interação inespecífica do anticorpo com regiões da membrana de nitrocelulose foi realizado o bloqueio com Tampão de Bloqueio (5% (peso/volume) leite em pó desnatado MOLICO (Nestlé); 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl e 0,1%(Vol./Vol.) Tween) por 4 a 6 horas à 4 °C.

Posteriormente, para detecção da cauda de poli-histidina no N-terminal, a membrana foi incubada por 18 horas a 4°C com o anticorpo anti-histag acoplado a peroxidase alcalina (Sigma Aldrich) na diluição 1:8000 em tampão de bloqueio. As membranas foram, então, lavadas três vezes com tampão de lavagem e reveladas utilizando o *Kit Clarity™ Western ECL Substrate* (BIO-RAD).

No caso da detecção das proteínas LcdDPAS e LcdDPAS, após a etapa de bloqueio da membrana foi adicionado soro (proveniente da inoculação proteína purificada em *Rattus rattus*) ao tampão de bloqueio na diluição de 1:1000 e incubado por 12 a 18 horas, em seguida foram feitas três lavagens com tampão de lavagem seguido de um novo período de incubação por 2 a 4 horas com o anticorpo anti-rato (Sigma-Aldrich #cat: A5795-1mL) na diluição de 1:20000. Após a incubação com o anticorpo secundário foi feito novamente três lavagens com o tampão de lavagem e a revelação foi feita utilizando o *Kit Clarity™ Western ECL Substrate* (BIORAD).

3.4 Purificação das proteínas

Após a expressão, o *pellet* de bactéria foi ressuspenso em tampão de lise (50 mM Tris pH 8,0; 200 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 20 mM Imidazol; 10% Glicerol; 25% Sacarose; 0,03% Tween 20 e 0,03% Triton X-100) e submetido a sonicação por um tempo total de 1 hora (amplitude: 60%, pulso: 5 seg., espera: 10 seg.).

As proteínas LcdBPAS, LcdCPAS, LcdDPAS, LcdEPAS, LcdFPAS e LcdDPAS foram purificadas primeiramente através de cromatografia por afinidade ao níquel utilizando a coluna *HisTrap™ High Performance* (GE Healthcare Life Sciences) 5 mL equilibrada previamente com tampão A (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 200 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 20 mM Imidazol; 10% Glicerol). Em seguida a proteína foi eluída através

de gradiente linear com tampão B (50 mM Tris HCl pH 7,5; 200 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 500 mM Imidazol; 10% glicerol). As proteínas LcdA_{PAS} e LcdG_{PAS} foram purificadas utilizando a mesma metodologia, porém o valor do pH dos tampões de afinidade foram de 8,5, a fim de evitar que estas proteínas precipitassem.

As frações oriundas da cromatografia por afinidade foram analisadas por eletroforese em gel SDS-PAGE seguindo o protocolo de Laemmli e colaboradores (LAEMMLI, 1970) para observação da presença da proteína de interesse, seu grau de pureza e seu peso frente ao marcador molecular. Essas frações foram posteriormente concentradas utilizando o *Amicon Ultra Centrifugal Filters Ultracel 3K* (Merck Millipore Ltd.) até um volume final de 5 mL para aplicação na coluna de cromatografia de exclusão por tamanho, sendo que as proteínas LcdD_{PAS} LcdC_{PAS}, LcdD_{PAS}, LcdE_{PAS} e LcdF_{PAS} foram aplicadas na coluna HiLoad™ 16/600 Superdex™ 75 prep grade (GE Healthcare Life Science) equilibrada com tampão de GF (150 mM Tris-HCl pH 7,5 e 200 mM NaCl). As proteínas LcdA_{PAS} e LcdG_{PAS} foram purificadas da mesma forma, porém o pH do tampão de GF foi de 8,5, a fim de evitar a precipitação das proteínas. A proteína LcdD foi purificada utilizando a coluna HiLoad™ 16/600 Superdex™ 200 prep grade (GE Healthcare Life Science) equilibrada com tampão de GF (150 mM Tris-HCl pH 7,5 e 200 mM NaCl).

3.5 Remoção da cauda de poli-histidina utilizando a protease HRV-3C

Para os ensaios de cristalografia, RMN e termoforese houve necessidade de remoção da cauda de poli histidina utilizando a enzima HRV-3C (Sigma Aldrich)

Para tanto, após purificação por afinidade ao níquel, as frações que continham a proteína de interesse foram dialisadas para o buffer de clivagem (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 200 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 20 mM Imidazol; 10% Glicerol e 1 mM EDTA), após diálise foi adicionado 1 mM DTT e a protease HRV-3C (Sigma Aldrich). A reação ocorreu a 4°C por 12 horas.

Em seguida a proteína foi aplicada novamente em uma cromatografia de afinidade ao níquel, a fim de obter a fração que não se ligava à coluna (ou seja, a fração sem cauda de poli-histidina). Ao final, as frações que não se ligaram ao níquel

da coluna foram submetidas a eletroforese em gel de SDS-PAGE (15% acrilamida) (LAEMMLI, 1970), e as frações que contém a proteína sem cauda de histidina foram concentradas até um volume final de 5 mL utilizando filtro Amicon *Ultra Centrifugal Filters Ultracel 3K (Merck Millipore Ltd.)* até obtenção de um volume de no máximo 5 mL e, em seguida, aplicada na coluna HiLoad™ 16/600 Superdex™ 75 prep grade (GE Healthcare Life Science) pré equilibrada com tampão de GF (20 mM Tris-HCl pH 7,5 e 20 mM NaCl).

3.6 Teste de Cristalização das Proteínas

Inicialmente foram feitas triagens de cristalização utilizando a técnica de difusão de vapor por gota sentada. Para tanto, foram utilizados diferentes *kits* comerciais de cristalização de proteínas solúveis desenvolvidos pelas empresas "*Hampton Research*" e "*Molecular Dimensions*". Foram utilizadas caixas de gota sentada (*sitting drop*) contendo 24 poços. No reservatório foram aplicados 400 µL de solução do Kit e no pedestal foram adicionados 1,5 µL da proteína pura concentrada e 1,5 µL da solução do poço de cristalização (reservatório). A placa foi fechada com plástico aderente da empresa Hampton. Quando foram observados formação de cristais foi feito o refinamento das condições de cristalização variando as concentrações do agente precipitante, pH, concentração da proteína e temperatura de cristalização.

3.7 Determinação do estado oligomérico dos domínios PAS em solução

A determinação dos estados oligoméricos dos domínios PAS foi realizada por cromatografia analítica de exclusão por tamanho, para tanto foi utilizado utilizando a coluna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences) pré-equilibrada com o tampão contendo 150 mM Tris-HCl pH 8,5 e 200 mM NaCl; e calibrada utilizando o Kit "*Gel Filtration Calibration kits LMW (GE Healthcare Life Sciences)*", para obtenção da fórmula que correlaciona a massa molecular da proteína com o volume de eluição da coluna; gerando a equação: $\text{Log (Peso Molecular)} = -1,2 * V_0/(\text{Volume de eluição})/8,1 + 3,2$.

Em seguida foi aplicado 100 μ L de cada proteína a 10 g/L com fluxo de 0,5 mL/min. Todos os ensaios foram realizados em triplicata para observar a reprodutibilidade e calcular o desvio padrão do volume de eluição. A aluna de iniciação científica Aline Dias da Purificação auxiliou na expressão e purificação das proteínas para este ensaio.

3.8 Identificação da molécula acoplada a proteína LcdD_{PAS}

A proteína LcdD_{PAS} foi expressa em meio rico LB e purificada por afinidade ao níquel seguido de cromatografia por exclusão de tamanho utilizando o tampão GF baixo sal (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 20 mM NaCl), após confirmação da purificação através de visualização de bandas no gel SDS-PAGE (15% acrilamida) a proteína foi concentrada utilizando o Amicon Ultra Centrifugal Filters Ultracel 3K (Merck Millipore Ltd.). Em seguida a proteína foi fervida para ocorrer a precipitação da mesma e dessa forma desfazer a interação proteína-ligante. Em seguida a solução foi centrifugada a 20000 x g por 30 min e o sobrenadante foi utilizado para análise por espectrometria de massas.

O experimento de HPLC/Massas foi realizado em parceria com o laboratório da Prof.^a Dra. Taícia Pacheco Fill, juntamente com o doutorando Jonas Henrique Costa.

A amostra foi analisada utilizando o sistema de cromatografia líquida de alta velocidade, marca Shimadzu Prominence UFLC, modelo LC-20AD acoplado ao sistema de Espectrometria de Massas da marca Bruker Daltonics, modelo amaZon Speed, analisador de massa/carga *Ion Trap* com fontes de ionização eletrospray (ESI), pertencente ao Laboratório Institucional de Espectrometria de Massas (LIEM) instalado no Instituto de Química da Unicamp.

Após identificação da presença de um íon de massa 284.13935 o Prof. Dr. Igor Dias Jurberg sintetizou e nos entregou o composto brevianamida F (ciclo L-prolina L-triptofano) de massa molecular 283 g/mol para ser utilizado como controle positivo e posteriormente ser utilizado em ensaios de interação proteína-ligante para confirmação da interação.

3.9 Espectros de correlação ^1H - ^{15}N (HSQC)

O ^{15}N -HSQC (*heteronuclear single quantum correlation*) é um espectro no qual cada pico possui duas frequências, a do hidrogênio ^1H e a frequência do núcleo de ^{15}N ao qual ele está diretamente ligado. Portanto, o espectro de ^1H - ^{15}N -HSQC apresentará um pico para cada grupo HN presente na proteína, ou seja, um pico para cada aminoácido com exceção da prolina, e um pico para cada grupo NH presente nas cadeias laterais de Asp, Asn, Arg, Lys, His e Trp.

Para identificar interação proteína-proteína e proteína-ligante via ^1H - ^{15}N HSQC a proteína de interesse necessita estar marcada com o isótopo ^{15}N e para tanto, a expressão da proteína LcdD_{PAS} foi feita em meio mínimo M9 marcado com ^{15}N (48 mM Na_2HPO_4 ; 22 mM KH_2PO_4 ; 0,84 mM NaCl; 2 mM MgSO_4 ; 0,4 % (peso/volume) glicose; 1 g/L $^{15}\text{NH}_4\text{C}$; 0,1g/L tiamina) com adição de 0,1 mg/L ampicilina, 0,03 mg/L cloranfenicol para seleção da bactéria com plasmídeo de interesse.

Em seguida as proteínas foram purificadas por afinidade ao níquel, a cauda de poli-histidina foi clivada, e ao final todas as proteínas foram submetidas a cromatografia por exclusão de tamanho utilizando o tampão: 20 mM Tris-HCl, pH 8,5; 20 mM NaCl. No ensaio todas as proteínas foram utilizadas na concentração de 400 μM .

Os experimentos de ^1H - ^{15}N HSQC foram realizados em parceria com o laboratório do Prof. Dr. Roberto Kopke Salinas, pelo doutorando Phelipe Augusto Mariano Vitale. Realizados em um espectrômetro Bruker Avance III equipado com uma sonda resfriada TCI e operando à frequência de 800 MHz para o núcleo de hidrogênio, pertencente à Central Analítica do IQ-USP.

Todos os ensaios continham aproximadamente 400 μM de proteína marcada com ^{15}N em tampão contendo 20 mM Tris-HCl pH 8,5, 20mM de NaCl, 10% de $^2\text{H}_2\text{O}$. Os experimentos foram adquiridos a 308 K (temperatura calibrada).

Os espectros de ^1H - ^{15}N HSQC foram adquiridos com pulsos de *flip back* aplicados sobre a água a fim de manter a sua magnetização em “z” durante todo o experimento, e *watergate* para supressão do sinal da água (fast HSQC) (MORI et al., 1995). Todos os espectros foram processados com uma função cosseno (para

apodização) nas duas dimensões e preenchidos com zeros até completar uma matriz de 2048x512 pontos (real + imaginário).

Para os experimentos de interação proteína-proteína a proteína LcdD_{PAS} (marcada com ¹⁵N) foi utilizada na concentração de 400 μM, as demais proteínas (testadas para interação) também foram utilizadas na concentração de 400 μM. Já para os experimentos de interação proteína-ligante foram utilizados os mesmos 400 μM da proteína LcdD_{PAS} marcada com ¹⁵N frente quatro diferentes concentrações de cada ligante (400 μM, 800 μM, 1600 μM, 3200 μM), sendo que foram testadas as seguintes moléculas como possíveis ligantes: triptofano, prolina e brevianamida F.

Após confirmação da interação da proteína LcdD_{PAS} com brevianamida F foi feito novo teste de interação proteína-proteína na presença do ligante brevianamida F, mantendo as mesmas concentrações de proteína LcdD_{PAS} marcada (400 μM) e de proteína não marcada (400 μM) na presença de 1600 μM de brevianamida F (relação 1:4 de proteína/ligante).

3.10 Ensaios de termoforese em microescala

A técnica de termoforese em microescala (MST) utiliza uma pequena variação de temperatura (variação de aproximadamente 4 °C), sendo que o movimento das moléculas nos diferentes campos de temperatura é muito sensível a variações no tamanho, na carga e na camada de solvatação de uma molécula (JERABEK-WILLEMSSEN et al., 2011).

Para isso, é preparada uma diluição em série do ligante, misturada com uma concentração constante da molécula alvo marcada (proteína de interesse), carregada nos capilares e analisada no instrumento por varredura subsequente de cada capilar. As alterações na termoforese são então plotadas e usadas para derivar a constante de ligação.

O experimento foi realizado utilizando o aparelho “*MicroScale Thermophoresis Monolith NT.115*” o qual se encontra no Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria (LEC) pertencente ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) – CENPEM.

Em todos os ensaios foi utilizado a proteína LcdD_{PAS} expressa em meio mínimo M9 (com o intuito de obter a proteína na forma apo, pois em meio mínimo não ocorre co-purificação com brevianamida F) e purificada mantendo a cauda de poli-histidina a qual é utilizada para marcação com a sonda “*Monolith Protein Labeling Kit RED-NHS 2nd Generation*” (NanoThemper cat# MO-L011). Ao final as reações são lidas utilizando os capilares “Monolith NT.115 Capillaries” (NanoThemper cat# MO-K022).

No experimento de homodimerização a proteína LcdD_{PAS} (marcada com a sonda RED) foi utilizada na concentração de 50 nM, enquanto a proteína LcdD_{PAS} sem cauda de poli-histidina foi utilizada para diluição seriada em uma concentração máxima de 290 µM (16 pontos, fator de diluição 1:3).

No experimento para determinação da interação entre LcdD_{PAS} e LcdB_{PAS}, foi mantida a sonda RED na proteína LcdD_{PAS} com cauda de poli-histidina, já a proteína LcdB_{PAS} sem cauda de poli-histidina foi utilizada para realização da diluição seriada em uma concentração máxima de 20 µM (16 pontos, fator de diluição 1:3); já a concentração da proteína LcdD_{PAS} foi mantida em 50 nM em todos os pontos do ensaio.

Para os experimentos de interação com brevianamida F a concentração da proteína LcdD_{PAS} (marcada com a sonda RED) teve que ser aumentada para 5 µM, quando a proteína está em uma concentração abaixo da constante de dimerização (3,4 +/- 0,52 µM) não há interação com brevianamida F. A molécula de brevianamida F foi utilizada para titulação na concentração máxima 600 µM (16 pontos, fator de diluição 1:3).

3.11 Calorimetria de titulação isotérmica (ITC - Isothermal Titration Calorimetry)

Para mensurar a afinidade da proteína ao seu respectivo ligante através de mensuração calorimétrica foi utilizado o equipamento ITC-Vp Microcal – (GE *Healthcare Life Sciences*) presente no Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria (LEC) pertencente ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) – CENPEM.

Para que a proteína não viesse co-purificada com seu ligante (brevianamida F) a mesma foi expressa em meio mínimo M9 e purificada por afinidade ao níquel e cromatografia por exclusão de tamanho como descrito anteriormente (**Item 3.4**). Para realizar este experimento a proteína foi purificada em buffer de baixo sal (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 20 mM NaCl). As amostras contendo a proteína LcdD_{PAS} e brevianamida F foram desgaseificadas previamente a realização do experimento.

O experimento foi realizado em triplicada utilizando a proteína LcdD_{PAS} na concentração de 60 μ M em um volume de aproximadamente 1,5 mL na cela de amostra. Após estabilização térmica (20 °C) foi feita a primeira injeção de 2 μ L de Brevianamida F a 450 μ M (diluída no mesmo buffer da proteína) seguida de 43 injeções de 5 μ L cada com intervalos de 5 min entre cada injeção.

Além disso, como controle, foi feito um experimento com os mesmos parâmetros utilizando 450 μ M de brevianamida F, mas mantendo apenas tampão na cela de amostra com o intuito de confirmar que o calor liberado durante o experimento era decorrente da interação LcdD_{PAS} com brevianamida F e não somente devido ao fator de diluição do ligante no tampão.

Ao final, os dados foram processados e analisados em parceria com o laboratório do Prof. Dr. Roberto Kopke Salinas, pelo pós-doutorando Dr. Jose David Rivera Echeverri.

3.12 Ensaio de atividade diguanilato ciclase

A LcdD_{PAS} (possui o domínio sensor PAS e o efetor GGDEF) foi expressa em meio mínimo M9 e purificada por afinidade ao níquel e cromatografia por exclusão de tamanho conforme descrito anteriormente (item 3.4).

Foram feitas as seguintes reações: **Reação 1:** contém 1 μ M LcdD_{PAS}; 1 mM de GTP; 2 mM MgCl₂; 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 20 mM NaCl em um volume final de 100 μ L. **Reação 2:** contém 1 μ M LcdD_{PAS}; 10 μ M Brevianamida F; 1 mM de GTP; 2 mM MgCl₂; 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 20 mM NaCl em um volume final de 100 μ L. Ambas as reações foram em triplicatas e mantidas a 30 °C por 2 horas e 12 horas. Ao final

do tempo de incubação a reação foi parada adicionando 10 mM de HCl (para desnaturação proteica). Em seguida as soluções foram centrifugadas a 20000g por 30 min; o pellet foi descartado e o sobrenadante foi filtrado utilizando o *Amicon Ultra Centrifugal Filters Ultracel 3K* (Merck Millipore Ltd.) para retirar qualquer vestígio de proteína que pudesse interferir nos ensaios.

Os resultados das reações foram analisados por cromatografia de troca iônica. Cada 1 mL resultante da reação foi aplicado na coluna *Resource Q* de 1 mL (*GE Healthcare*) equilibrada com 10 mM HCl em seguida foi feito um gradiente de 0% a 100% com 200 mM NaCl em um fluxo constante de 1 mL/min. Nas mesmas condições foram aplicados os padrões: 1mL de GTP a 100 μ M e 1 mL de c-di-GMP a 10 nM; tais padrões foram utilizados para identificar o tempo de retenção do substrato (GTP) e do produto c-di-GMP.

3.13 Produção de anticorpos anti-LcdD_{PAS}

Para produção de anticorpo anti-LcdD_{PAS} mediante autorização da comissão de ética ICB-USP foram utilizados dois animais *Rattus rattus*, macho, linhagem Wistar os quais após um período de adaptação de 2 semanas foram submetidos a quatro imunizações de 100 μ L intramuscular com intervalos de uma semana entre cada aplicação. Sendo que a primeira imunização foi feita quando o animal atingiu oito semanas de vida.

As imunizações foram feitas utilizando a proteína LcdD_{PAS} purificada sem cauda de poli-histidina e filtrada por membrana de 0,22 μ m, em seguida 100 μ L a solução contendo a proteína foi utilizada para emulsificação com 100 μ L o coadjuvante TiterMax[®] Gold (Sigma Aldrich).

Uma semana após a última inoculação, os animais foram anestesiados utilizando 2 mg/Kg de acepromazina (pré-anestésico); 2,5 mg/Kg de xilazina, 100 mg/Kg de cetamina (indução) e 5 mg/Kg metadona. Com os animais devidamente anestesiados foi feita a coleta de sangue por punção cardíaca, procedimento pelo qual foi possível obter cerca de 5 mL de sangue total por animal. Ao final foi feita a decapitação como procedimento básico para descarte dos corpos.

Em seguida o sangue total foi centrifugado por 15 min a 5000 x g para obtenção do soro, o qual foi utilizado no *Western Blotting* (descrito no **item 3.3**) em três diferentes diluições (soro/tampão de bloqueio): 1:5.000/ 1:30.000/ 1:60.000 utilizando a proteína LcdA_{PAS} na concentração de 100 µM sem cauda de poli histidina cujo resultado está presente na **Figura 3**. Ao final ambas as diluições foram incubadas com anticorpo secundário anti-rato (Sigma-Aldrich #cat: A5795-1mL) na mesma diluição de 1:20.000 e as membranas foram reveladas com o *Kit Clarity™ Western ECL Substrate* (BIORAD).

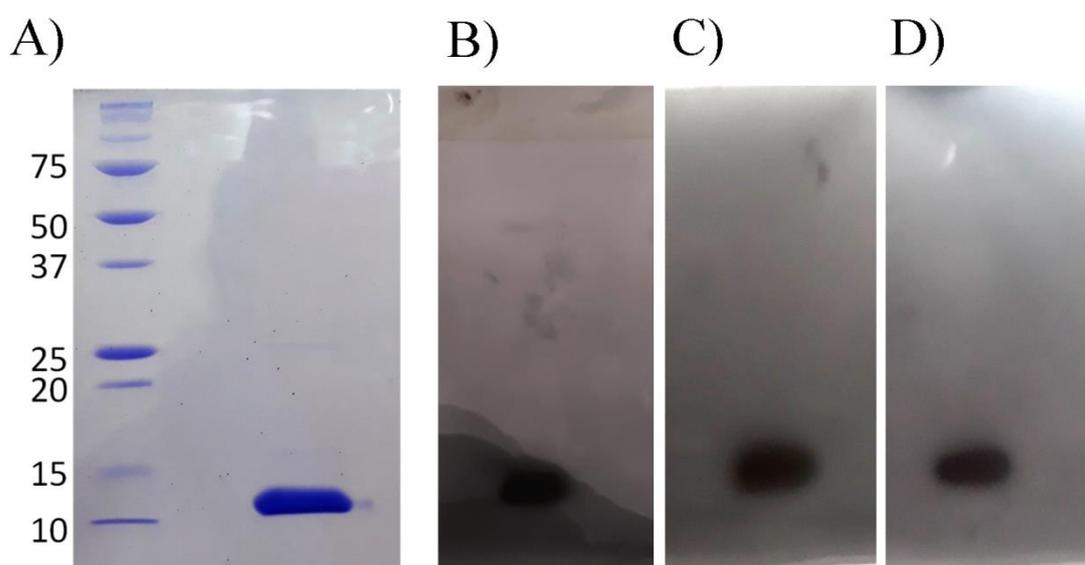


Figura 3 – Reconhecimento de LcdD_{PAS} via *Western Blotting* com diferentes diluições do anticorpo primário. A) Gel SDS-PAGE (15% acrilamida) com a proteína LcdD_{PAS} sem cauda de poli-histidina. B) *Western Blotting* com diluição de 1:5.000 do soro de rato; em C) *Western Blotting* com diluição de 1:30.000 do soro de rato. D) *Western Blotting* com diluição de 1:60.000 do soro de rato.

3.14 *Curva de crescimento de Leptospira interrogans sorovar Copenhageni*

A cepa de *L. interrogans* sorovar Copenhageni foi gentilmente cedida pela Dr.^a Josefa Bezerra da Silva (Laboratório de Bacteriologia II – Instituto Butantã). Em seguida, com o intuito de saber se a molécula de brevianamida F gerava alguma alteração na curva de crescimento ou na morfologia de *L. interrogans* foram cultivados seis tubos de 10 mL de meio de cultura Ellinghausen-McCullough-

Johnson-Harris (EMJH), em três tubos foram adicionados 100 μ M de brevianamida F diluída em água destilada e deionizada (a solução foi previamente filtrada em filtro de 0,22 μ m antes de ser adicionada ao meio de cultura), os outros três tubos tiveram a adição somente da água destilada e deionizada estéril.

A contagem do número de células foi feita a cada 24h por sete dias de forma manual utilizando microscopia de campo escuro e câmera de Neubauer.

3.15 Visualização de *Leptospira interrogans* sorovar *Copenhageni* por microscopia de transmissão eletrônica

Foram cultivados tubos de 10 mL de meio EMJH contendo *L. interrogans* sorovar *Copenhageni*, em um dos tubos foi adicionado 100 μ M de brevianamida F e no outro foi adicionado 100 μ L de água destilada e deionizada estéril para efeito de comparação. Após 10 dias de cultivo todo o volume contido em cada tubo foi centrifugado a 5000 x g por 15 min. e o pellet foi utilizado para montagem do *grid* (*carbon film* 400 mesh) corado negativamente com acetato de uranila 2% e então os grids foram observados no microscópio de transmissão eletrônica JEOL JEM 2100 (200 kV) na central analítica do instituto de química – USP.

4 Resultados e Discussão

4.1 Relação evolutiva entre os sete genes parálogos.

Em vista de identificar a correlação entre a presença de proteínas que possuem atividade diguanilato ciclase com regulação por domínio PAS e a capacidade da *L. interrogans* infectar animais, foi feita uma árvore filogenética com auxílio do colaborador Gabriel Sánchez Hueck (orientado pelo Prof. Dr. Robson Francisco de Souza) que utilizou um BLASTp para busca e alinhamento de proteínas com os domínios PAS e GGDEF dentro da família *Leptospiraceae* em seguida foi construída a árvore filogenética utilizando o programa *FastTree* (**Figura 4**). Nesta árvore filogenética é possível observar que há uma distinção entre os organismos

patogênicos (em preto) e os de vida livre (em verde) relacionado a proteínas com os domínios PAS e GGDEF, pois além de haver maior homologia entre as proteínas presentes em bactérias patogênicas é possível notar que, também, há maior repetição destes domínios dentre as leptospirosas patogênicas do que dentre as de vida livre, o que levanta a hipótese de haver correlação entre a atividade diguanilato ciclase e a capacidade da bactéria se adaptar tanto a vida livre quanto a vida dentro do hospedeiro.

Dentre os organismos elencados na árvore filogenética a seguir as leptospirosas patogênicas são: *Leptospira alstonii* sp. (BOONSILP et al., 2013); *Leptospira stimsonii* sp; *Leptospira barantonii* sp; *Leptospira kmetyi* sp; *Leptonema illini* e *Leptospira perolatii* sp (CASANOVAS-MASSANA et al., 2019); *Leptospira kirschneri* sp; *Leptospira interrogans* sp; *Leptospira noguchii* sp; *Leptospira weilii* sp (BHARTI et al., 2003); *Leptospira dzianensis* sp; *Leptospira gomenensis* sp (VINCENT et al., 2019). Já as leptospirosas saprofíticas são: *Turneriella parva* (STACKEBRANDT et al., 2013); *Leptospira biflexa* sp; *Leptospira brenneri* sp; *Leptospira harrisiae* sp; *Leptospira idonii* sp; *Leptospira levettii* sp; *Leptospira macculloughii* sp; *Leptospira meyeri* sp; *Leptospira stimsonii* sp; *Leptospira vanthiellii* sp; *Leptospira wolbachii* sp; *Leptospira yanagawae* sp; *Leptospira idonii* sp (CASANOVAS-MASSANA et al., 2019); *Leptospira bourretii* sp; *Leptospira bouyouniensis* sp; *Leptospira dzianensis* sp; *Leptospira gomenensis* sp; *Leptospira ilyithenensis* sp; *Leptospira jelokensis* sp; *Leptospira kanakyensis* sp; *Leptospira mtsangambouensis* sp; *Leptospira congkakensis* sp; *Leptospira semungkisensis* sp (VINCENT et al., 2019).

Utilizando o banco de dados KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>) foi analisado os genes que codificam as sete proteínas estudadas neste trabalho (**Figura 5**); estes genes codificam proteínas com os mesmos domínios: domínio PAS na região N-terminal e domínio GGDEF na região C-terminal, sendo que estes genes constituem um cluster gênico.

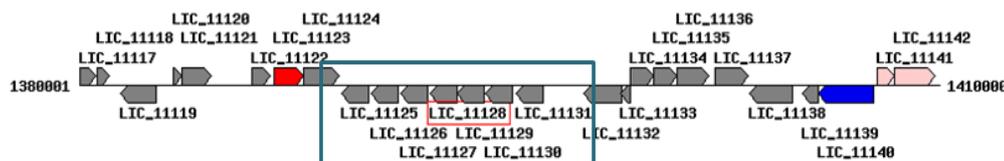


Figura 5 - Localização dos sete genes que codificam as proteínas estudadas neste trabalho. O retângulo azul mostra a que os sete genes estão agrupados em um *cluster* no genoma de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni.

Para entender um pouco melhor os eventos de duplicação gênica que gerou as sete proteínas parálogas foi feito inicialmente um alinhamento da sequência de aminoácidos das sete proteínas utilizando os programas ClustalW-2.1 e “Clustal Omega” (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). O alinhamento múltiplo mostrado na **Figura 6** revela que existe maior similaridade de sequência primária nos domínios GGDEF do que nos domínios PAS. Isto sugere que os domínios PAS de cada proteína provavelmente divergiram em sequência primária para poder se ligar a diferentes moléculas e então regular a atividade DGC do domínio GGDEF, que nas sete proteínas apresenta a assinatura GG[D/E][D/E]F, ou seja, possuem todos os resíduos importantes para catálise, para visualizar melhor essa diferença na conservação da sequência de aminoácidos do domínio GGDEF foi feito um WebLogo utilizando a ferramenta “WebLogo/berkeley” (<https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) (**Figura 7**).

Um fato interessante está na comparação dos aminoácidos envolvidos na interação proteína-ligante, dentre as três proteínas cristalizadas (vide resultados a seguir), pois é possível observar conservação entre alguns aminoácidos sobretudo o triptofano que faz ligação de π stacking com o anel dos ligantes nas estruturas das proteínas LcdC_{PAS} (W 93) e LcdD_{PAS} (W 97) e também interage com o ligante presente na estrutura LcdG_{PAS} (W 103) o qual não possui anel indol mas mantém uma interação hidrofóbica com o ligante.

```

LcdC -----M-QYDYEKFFHNSLDILVIARMDNCHVIHVNPSFERIFGWSEKRLGLGS
LcdG MYSRNRMKYEEMKYDIEKFFDYSLDMLCIARLD-GYIFRINPSFQKAFGWKSEDLLAFGS
LcdA -----MDLEN-EYNHEKFFNYSLDLHAIQKMD-GIILQINQSFQIRIMGWTNEDLKGRTH
LcdB -MEKRHMSYQN-EYNLEKFFNYSLDLFSIQRLD-GTVISVNPSFERILGWKEEELLGRDP
LcdF -----MEYKN-EYNLEKFFNYSLDLFSIQRMD-GTVISVNPSFERILGWKEEELLGKNP
LcdD -----MTNFEK-EYDLEKLVNNSLDLLSIQRLD-GTVLQVNPAERLLGWREEELIGRNP
LcdE -----MNFEN-EYDLEKLVNNSLDLLTIVDLS-GNVLLVNPAFERTLGWKKEDLVGKDP
          *: **: ***: * :. * :: :* :*.. **: .: * .

LcdC YEFLLHPEDLPSTQETAAKATGAPIVSEENRYRSIDGNYRTLSWTAVPEYKSGMVYAIAR
LcdG YTFLLHPDDVEPTYQVVEKLLKGTPIVSEFQNRVRCCTNGEYKNFSWTAFFDLRSELIYAIAR
LcdA FHLHLPEDVESLKEFEQNLNEGVSLSIQNRRCRCADGTYKYFSWTAFFDLRSELDRIYVTGR
LcdB FHLHLPEDLGSA-KEFEELDGGVPRSSIQNRIRCADGTYKHFAWTGYPDLEAGLVYVTGR
LcdF FHLHLPEDQETIVQEFQKLDGGIPRYSIKNRRCRCADGTYKHFAWTGFPIESGLVYITGR
LcdD FHLHLPEDRESVFQEFKLLNQGLPVFAFQNRFLCSDGTYKYFSWTASPDLSAGLIYVTGR
LcdE FHLHLPEDKESTYKEFEKLNQGLLTLTSFQNRVICADGQYRYFSWTASPDLVSGLVYVTGR
          : :***:* . : : * * :::** . : * * . :***. * : : * . *

LcdC DITEAIESNRKISELATELKEANNMLLEQASTDPLTKLKNRRAFNAELNHLLQIAQKQSN
LcdG DITEIVESNRKLNQLAAELKDANDKLFQASTDPLTKLKNRRTFNEELKDLIVHTNKKRG
LcdA DITDIIESNQKISKLASDLEEANNKLEQASTDPLTKLKNRRSFNEEINHILRLGQHQEK
LcdB DITETIEANRQISQLATELKEANDLLEQASTDPLTKLKNRRAFNNDLHSLRFRMQQEK
LcdF DITETIESNRKISQLATELKDANDKLFQASTDPLTKLKNRRAFNEALNHLVHFSQKQKS
LcdD DISDLIESNRKISLLAAELKDANDKLFQACSTDPLTKLKNRRAFNEELNLSIQLSQKQLS
LcdE DITDVIESNRKISQLAVKLEKTNDRLEQASTDPLTKLKNRRMFNEELNLIHACDKESH
          **:: :*:*.:. ** .*:::*: * :*** ** .***** * . : : * : : :

LcdC PISLLMIDADHFKDYNDKFGHPAGDQVLIDLAFLLHTLRQHDVIARYGGEFFIVAMPDT
LcdG FLSLLMIDVDHFKTYNDQFGHPAGDQVLIRLASVLTALRVSDLLARFGGEFFVVALPET
LcdA SISLMMIDVDHFKDYNDKFGHPAGDRILIRLAEVFTETLRSCDLVARFGGEFFVVALSDT
LcdB FLSLLMIDVDHFKTYNDQFGHLAGDKVLVCLAKVLENTLRSDLLGRFGGEFFVAALPNT
LcdF PLSLLMIDADHFKDYNDTFGHLEGDKILILADLLTKALRKGVDLARYGGEFFIVALPLT
LcdD PLSLLMIDVDFFKDYNDKFGHPAGDKVLAILASLLAKTLRKDDVTARYGGEFFIVALPNT
LcdE PLSLLMIDADHFKDYNDKFGHLAGDKVLVELASILTCTFRKKDVLARYGGEFFIAALPNT
          :**:**.*.** *** ** ** .:* ** : : : * * :. :*:*****:.*:. *

LcdC SEVASLQIAERLIHVVEFNWEKRPVTISIGAAATLPGEKQKTSLEENRHFINLIESADKA
LcdG GEYKAIEVADRLVVTIQKETWENRPITISVGIATLDFSLPVSTFRDTRDFSTRIVEEADRA
LcdA NEEKAVEVAERLMANVKKKSWENSPITISVGITTLNFNGPVIY-HTDLSTGIIEDADRA
LcdB CEKKSIEIGERLVNAVREFNWEYRSITISVGISTSDFEKKQLDV-D---STNLIKADKA
LcdF SEDETIDISERLLQTVREFNWEKRIITVSVGAATYDFNSNSKNI-NLEYSINLIEQADKA
LcdD SEKEAIEIAERLVKVIIEESRWEKRSVTISVGIITTSQINPSN----NADHSIDIIEADRA
LcdE SEPEANQIAERLVQTVREFSWEKRSVTISVGIITTYNFNPTSKEI-NSEYLLNLIEQADKA
          * : :.:.**: : : ** :*:*: * : * . : : * .**.*.*

LcdC LYHSKINGRNQVNHSSRILPCKEA-----
LcdG LYRSKANGRNQATHCSQILL-----
LcdA LYRSKANGRNQATHSSQLKTENQTSVRKN
LcdB LYQSKVNGRNKATHSSQIY-----
LcdF LYCSKVNGRNRITHFSKKYSLQQN-----
LcdD LYHSKVNGRNRVTHSSQIS-----
LcdE LYCSKVSGRDRITHFSWVQNKKSGSI-----
          ** ** .**:. . * * .

```

Figura 6 - Alinhamento das sete proteínas. Em amarelo está situado o domínio PAS sendo que os aminoácidos envolvidos na interação com o ligante de cada proteína estão destacados em vermelho. Em azul claro está o domínio GGDEF responsável pela atividade diguanilato ciclase da proteína sendo que a assinatura GG[D/E][D/E]F conservada nas sete está destacada em azul escuro.

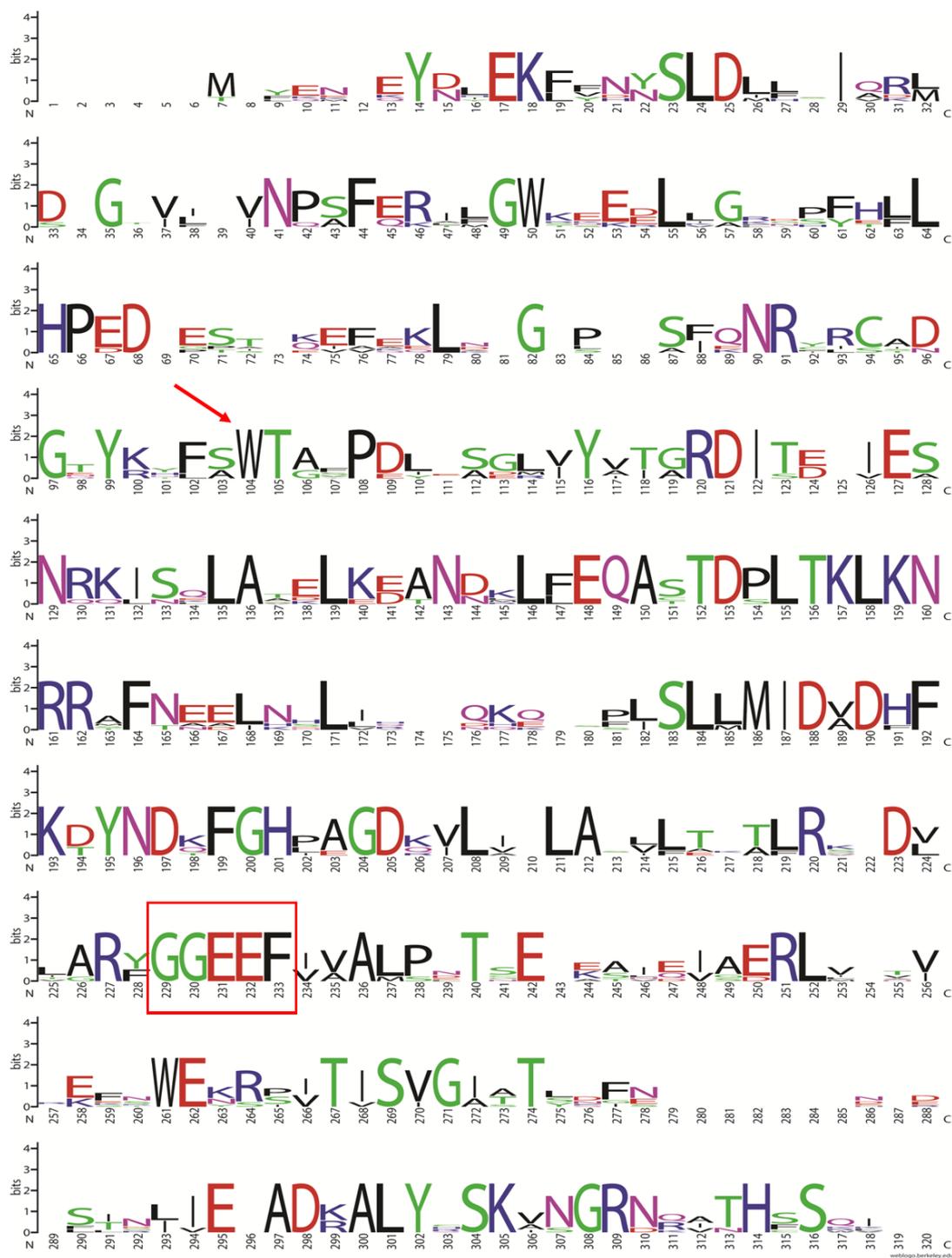


Figura 7 - WebLogo das sete proteínas. A seta vermelha resalta o triptofano 104 altamente conservado entre as sete proteínas presente no sítio de ligação das três estruturas resolvidas. O retângulo vermelho resalta a sequência GGEFF responsável pela atividade diguanilato ciclase das sete proteínas.

Para analisar melhor as diferenças de estrutura primária e comparar as sete proteínas alvo de estudo deste trabalho foi feita uma árvore filogenética através do programa Jalview (**Figura 8**) na qual é possível observar que a proteína LcdC é a que mais diverge dentre as sete estudadas, já a proteína LcdG é mais próxima de LcdA, LcdD é mais similar a LcdE e LcdB é mais similar a LcdF na comparação entre as sete proteínas.

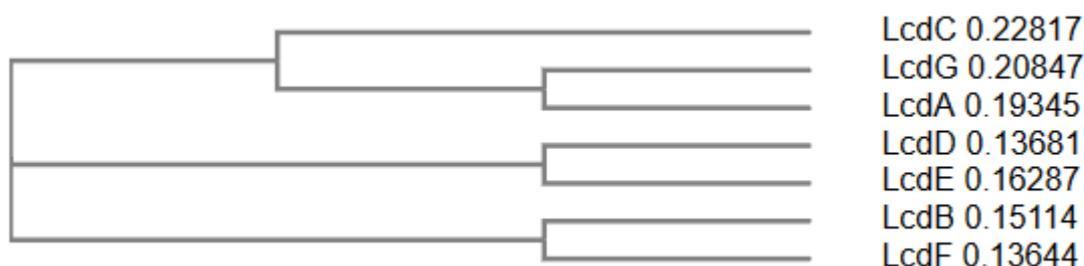


Figura 8 - Árvore filogenética das proteínas em estudo.

4.2 Purificação das proteínas

As proteínas de interesse foram clonadas em vetores de expressão via colaboração com o Dr. Ray Owens, chefe da *Facility* de Produção de Proteínas de Oxford (*Oxford Protein Production Facility*_OPPF-UK) no Reino Unido, foram feitas construções para obtenção dos domínios PAS e GGDEF separados e também em conjunto, sendo que essas construções estão descritas na **Tabela 1 (Item 3.1)**. As proteínas são chamadas como LcdA (*Leptospira cyclic dinucleotide A*), LcdB (*Leptospira cyclic dinucleotide B*), LcdC (*Leptospira cyclic dinucleotide C*), LcdD (*Leptospira cyclic dinucleotide D*), LcdE (*Leptospira cyclic dinucleotide E*), LcdF (*Leptospira cyclic dinucleotide F*) e LcdG_{PAS} (*Leptospira cyclic dinucleotide G*). Sendo que quando se trata da construção que contém apenas um dos domínios o mesmo está subscrito.

LcdA_{PAS}, LcdB_{PAS}, LcdC_{PAS}, LcdD_{PAS}, LcdE_{PAS}, LcdF_{PAS} e LcdG_{PAS} foram purificadas com sucesso através da metodologia convencional de purificação de proteínas heterólogas. Utilizando cromatografia de afinidade ao níquel seguida por

cromatografia por exclusão por tamanho (mais detalhes sobre o protocolo de purificação estão descritos nos materiais e métodos, **item 3.4**).

As amostras purificadas dos domínios PAS das sete proteínas de interesse e da proteína LcdD (a qual possui domínio PAS e GGDEF) estão mostradas em géis de (15% acrilamida) SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), **Figura 9**. As amostras de proteína purificadas foram submetidas a análise por *Western Blotting* utilizando o anticorpo anti-his (**Figura 10**) e todas elas foram marcadas comprovando que as proteínas de interesse foram purificadas.

No ensaio de *Western Blotting* (**Figura 10**) outras bandas de peso molecular maior do que a banda monomérica de LcdC_{PAS} foram marcadas. Apesar das amostras estarem em condições desnaturantes e terem sido fervidas por quinze minutos antes de serem aplicadas no gel de SDS-PAGE (15% acrilamida), migrações anômalas ainda podem ocorrer devido a diferentes estados oligoméricos da proteína (SHI et al., 2012). Isso pode explicar a marcação de outras bandas de peso molecular acima do esperado, apesar de não observarmos na cromatografia por exclusão por tamanho estados oligoméricos acima de dímeros (**Figura 11**). Outra possibilidade que também explica a marcação de várias bandas na amostra de LcdC_{PAS} é a quantidade de amostra aplicada no gel de SDS-PAGE (15% acrilamida), como foi aplicado grande quantidade de proteína, estados oligoméricos da proteína que estão em baixa quantidade são marcados no *Western Blotting* devido a sensibilidade do ensaio, pois em gel de SDS-PAGE (15% acrilamida) corado com *Coomassie Brilliant Blue*, vemos apenas uma banda (**Figura 9**). Algo semelhante também foi observado para a proteína LcdG_{PAS} a qual também elui em apenas um pico na cromatografia por exclusão de tamanho (**Figura 11**).

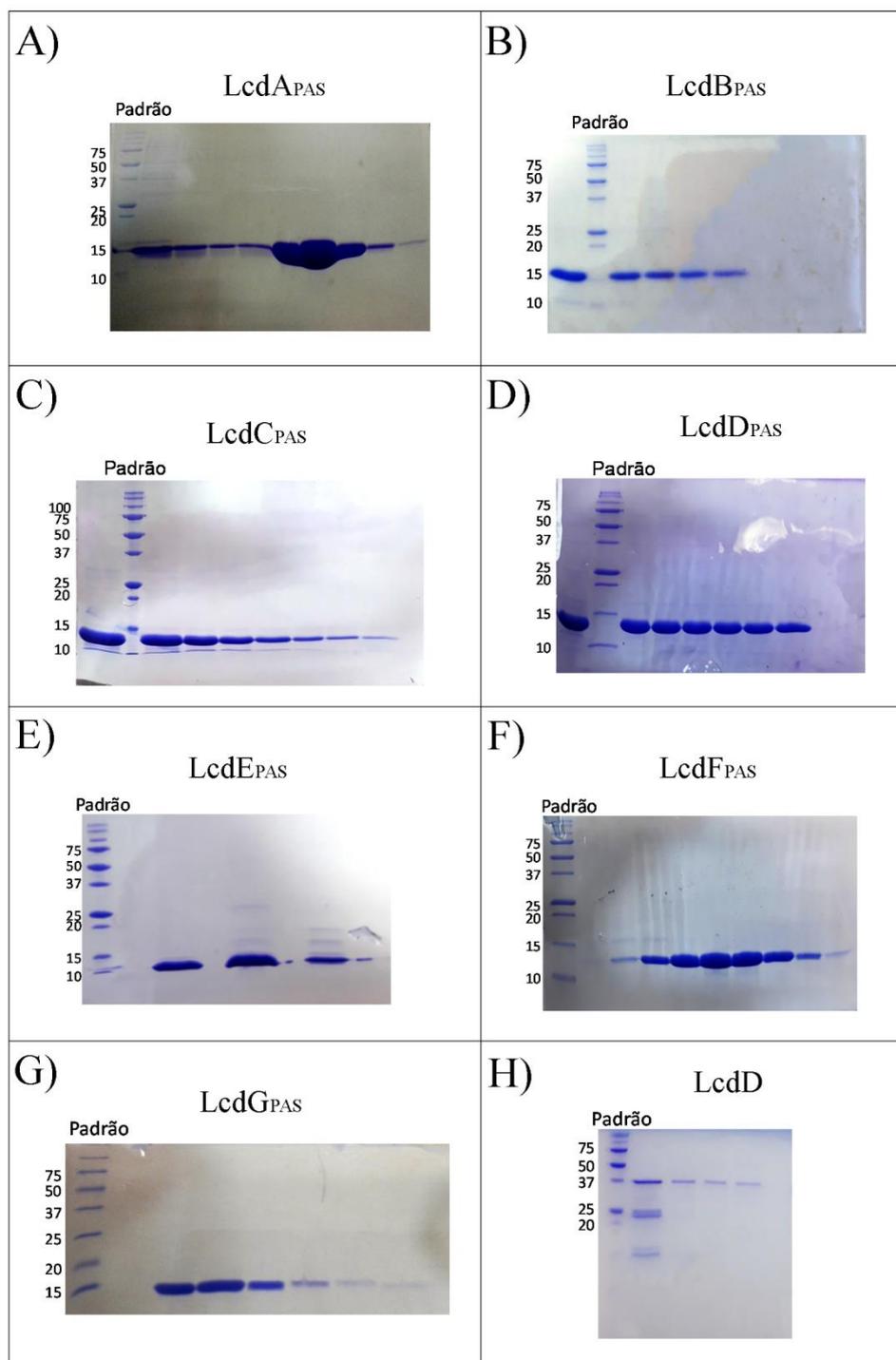


Figura 9 - Géis SDS-PAGE (15% acrilamida) comprovando a purificação das oito proteínas utilizadas neste trabalho. A) Bandas oriundas da purificação de LcdA_{PAS} que possui 15,5 KDa. B) Bandas oriundas da purificação de LcdB_{PAS} que possui 15,8 KDa. C) Bandas oriundas da purificação de LcdC_{PAS} que possui 14,9 KDa. D) Bandas oriundas da purificação de LcdD_{PAS} que possui 15,4 KDa. E) Bandas oriundas da purificação de LcdE_{PAS} que possui 15,3 KDa. F) Bandas oriundas da purificação de LcdF_{PAS} que possui 15,5 KDa. G) Bandas oriundas da purificação de LcdG_{PAS} que possui 16,6 KDa. H) Bandas oriundas da purificação de LcdD que possui 37 KDa.

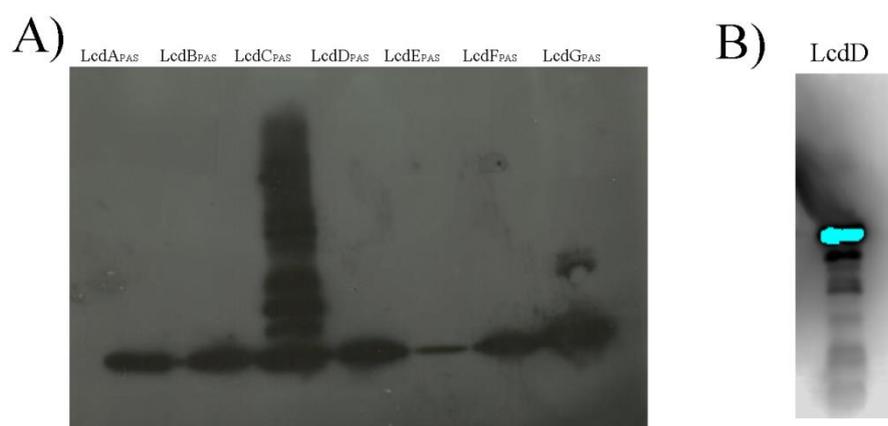


Figura 10 - Western Blotting anti poli histidinda. A) Marcação das sete proteínas PAS purificadas. B) Marcação da LcdD (a qual possui os domínios PAS e GGDEF).

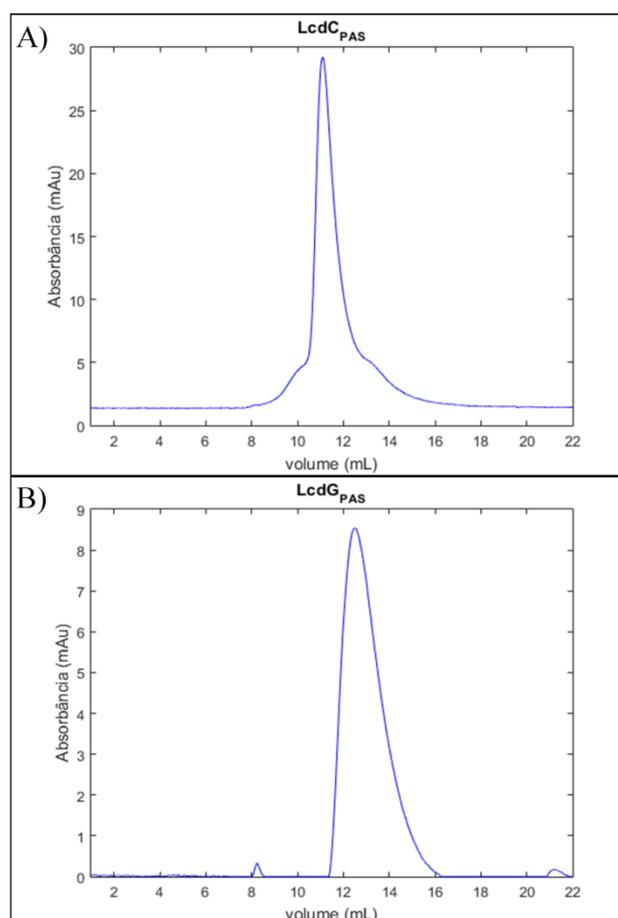


Figura 11 - Pico de eluição das proteínas LcdC_{PAS} (em A) e LcdG_{PAS} (em B) utilizando cromatografia por exclusão de tamanho (coluna Superdex 75 10/300 GL). Nestes cromatogramas é possível observar que cada proteína apenas um pico de eluição.

4.3 Identificação por espectrometria de massas do ligante de LcdD_{PAS}

Para identificar o ligante de LcdD_{PAS} foi feita a expressão da proteína em meio rico seguida pela purificação por afinidade ao níquel e cromatografia por exclusão de tamanho. Em seguida a proteína foi desnaturada por aquecimento a 100 °C para que a proteína liberasse o ligante. Em seguida a amostra foi centrifugada a 20.000 x g por 30 min; o pellet foi descartado e o sobrenadante foi analisado por espectrometria de massas acoplado ao HPLC (*High performance liquid chromatography*). Este experimento foi realizado em colaboração com laboratório da Prof^a Dra. Taícia Pacheco Fill, juntamente com o doutorando Jonas Henrique Costa (ambos do instituto de química da UNICAMP).

Ao aplicar a amostra no HPLC foi possível observar um pico em 3 min o qual não ocorria no controle negativo (amostra contendo apenas o tampão da proteína), este pico foi aplicado no espectrômetro de massas e gerou uma molécula com massa molecular de 284,13 g/L. A fragmentação da molécula no espectrômetro de massas também foi feita para auxiliar na identificação da molécula que parecia ser a brevianamida F.

Para provar que se tratava da brevianamida F, esta foi quimicamente sintetizada pelo Prof.^o Dr. Igor Dias Jurberg (UNICAMP) e aplicada no HPLC-MS/MS. A brevianamida F sintetizada eluiu no HPLC no mesmo tempo que o ligante de LcdD_{PAS} e fragmentou no espectrômetro de massas da mesma forma que o ligante, comprovando que a molécula ligada a LcdD_{PAS} é brevianamida F (**Figura 12**).

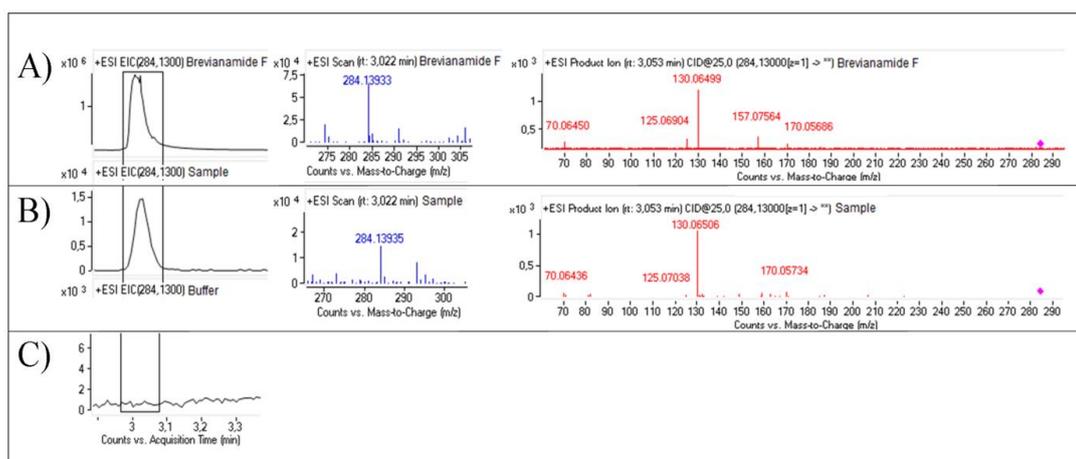
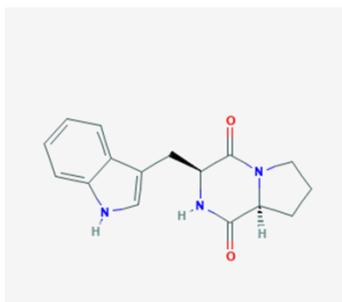


Figura 12 - Resultado de espectrometria de massas do ligante presente em LcdD_{PAS}.
 A) Resultado do controle positivo brevianamida F sintetizada. B) Resultado obtido ao aplicar o sobrenadante da amostra fervida de LcdD_{PAS}. C) Tampão utilizado para purificação da proteína LcdD_{PAS} (controle negativo). D) Tampão utilizado para purificação da proteína LcdD_{PAS} (controle negativo).



Fórmula molecular: $C_{16}H_{17}N_3O_2$

Nome: Brevianamida F

Sinônimo: ciclo L-Prolina L-Triptofano

Peso molecular: 283,32 g/mol

Figura 13 - Molécula detectada por espectrometria de massas como sendo o ligante de LcdD_{PAS}.

4.4 Cristalização das proteínas LcdC_{PAS} LcdD_{PAS} e LcdG_{PAS}

A proteína LcdC_{PAS} foi cristalizada e teve suas fases resolvidas pelo o grupo do Dr. Ray Owens, chefe da *Facility* de Produção de Proteínas de Oxford (*Oxford Protein Production Facility*_OPPF-UK) no Reino Unido, a metodologia utilizada está em vias de publicação. A proteína LcdD_{PAS} também havia sido cristalizada pela *Oxford Protein Production Facility*_OPPF-UK, porém após a identificação da interação desta proteína com Brevianamida F foram feitos novos testes de cristalização na presença e na ausência do ligante. A proteína LcdG_{PAS} cristalizou em 77 condições, das quais apenas duas geraram bons dados de difração por raios-X usando o Síncrotron do LNLS linha W01B-MX2. As proteínas LcdA_{PAS} e LcdB_{PAS}, LcdE_{PAS} e LcdF_{PAS} não cristalizaram nas condições de cristalização testadas (**item 3.6**). Sendo que as tentativas de cristalização das proteínas, LcdE_{PAS} e LcdF_{PAS} foram feitas pela aluna de iniciação científica Aline Dias da Purificação.

4.4.1 Estrutura cristalográfica da proteína LcdC_{PAS}

A proteína LcdC_{PAS} cristalizou na concentração de 45 mg/mL na condição: 25% (p/v) polietileno glicol 1.500; 0,1 M MIB System pH 6,0 (**Figura 14**). O cristal foi difratado na linha de luz Diamond i04 *beamline*, obtendo-se resolução de 1 Å, grupo espacial P 2₁. O tamanho da célula unitária foi de 34,7 Å, 62,2 Å e 49,5 Å e ângulos α , β e γ de 90°, 107° e 90°, respectivamente. A resolução das fases foi feita experimentalmente pelo nosso colaborador Dr. Ray Owens utilizando a técnica de inserção de metal pesado de iodo e determinação das fases por SIRAS utilizando

também o sinal anômalo do enxofre das metioninas da proteína, técnica ainda em vias de publicação. Com isso, foi possível obter a estrutura cristalográfica da proteína LcdC_{PAS} a qual cristalizou como um dímero na unidade assimétrica – ASU. Além disso, há a presença de um ligante ainda não identificado em uma das moléculas da ASU, mas como o cristal difratou em alta resolução foi possível desenhar uma aproximação da estrutura do ligante que será caracterizada futuramente utilizando espectrometria de massas em colaboração com a Prof.^a Dr.^a Taícia Pacheco Fill.

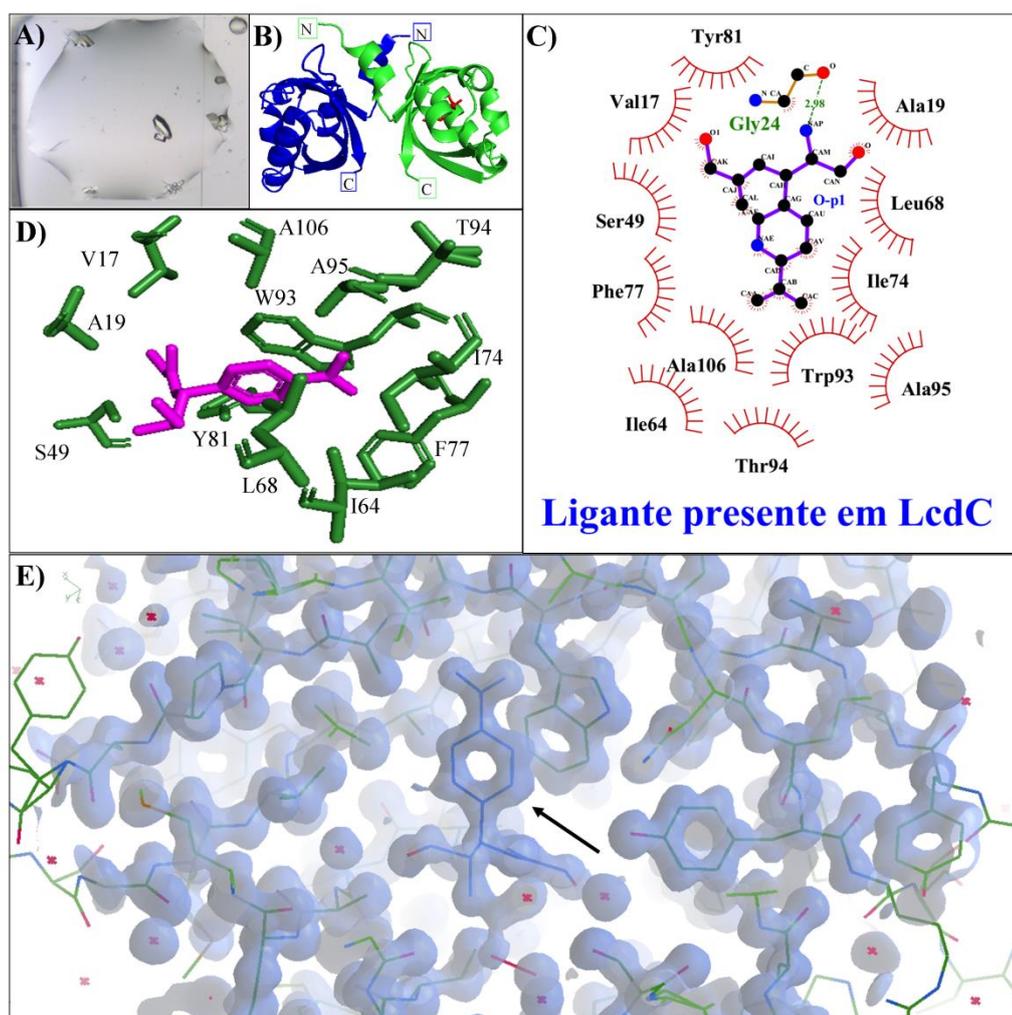


Figura 14 – Cristalização e estrutura tridimensional de LcdC_{PAS}. A) Cristal LcdC_{PAS}. B) Estrutura de LcdC_{PAS} mostrando a interface de dimerização cada molécula está colorida em azul e verde, o ligante está colorido em rosa. C) Representação dos aminoácidos que interagem com o ligante (imagem obtida pelo programa LigPlot). D) Representação da localização do sítio de ligação e dos resíduos envolvidos na ligação. E) Densidade eletrônica da proteína e do ligante o qual é referenciado pela seta ($2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}} = 1.0$) (imagem obtida pelo programa WinCoot CCP4).

Na análise estatísticas do diagrama de ramachandran os ângulos diedrais ψ e ϕ da estrutura de LcdC_{PAS} estão todos em regiões favoráveis (**Figura 15**).

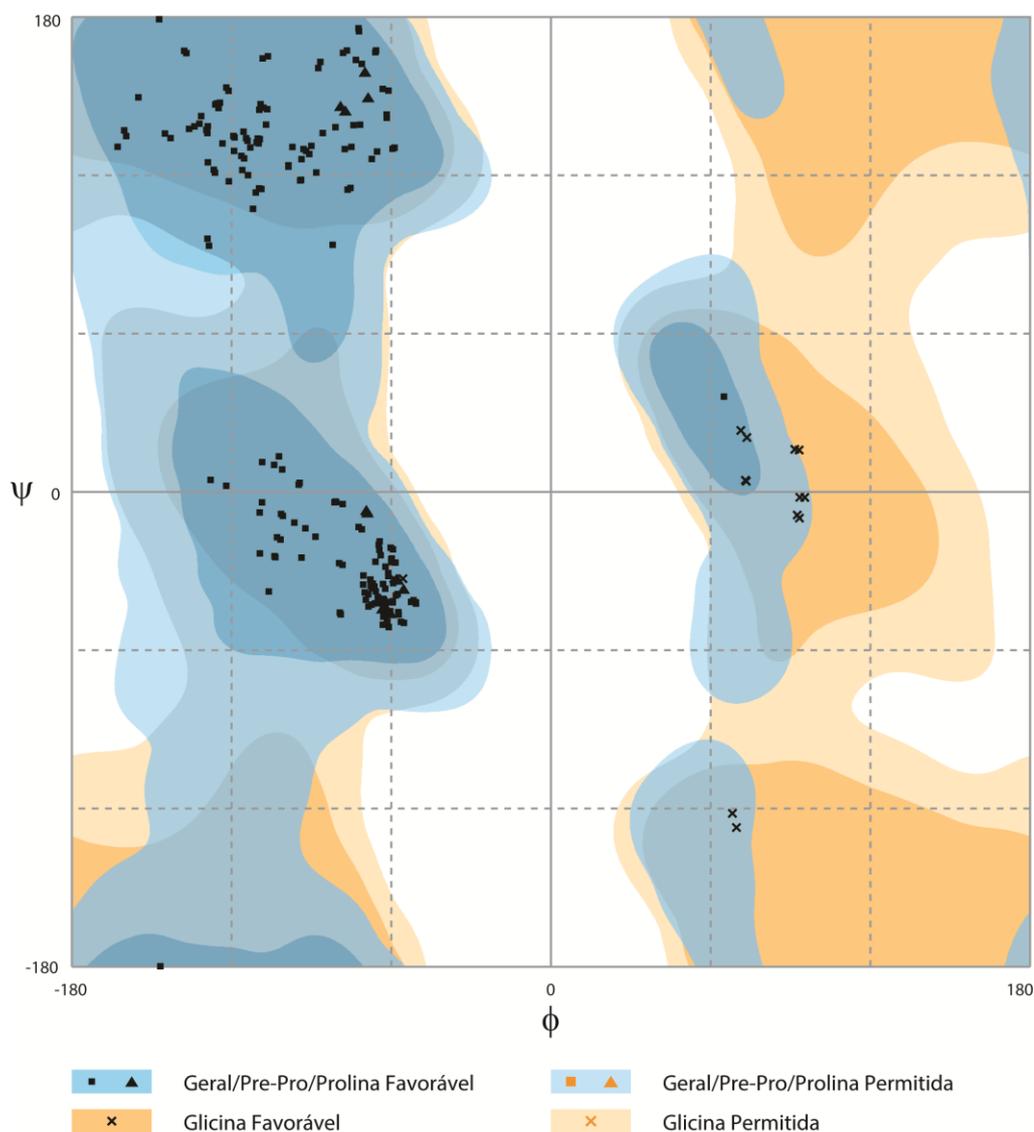


Figura 15 - “Diagrama de Ramachandran” do modelo cristalográfico de LcdC_{PAS}. Não há presença de nenhum resíduo com ângulos fora de regiões favoráveis.

Além disso, o cálculo da superfície enterrada (“PDBe & PISA & EMBL-EBI”) mostra uma área de interface de 1.309,6 Å² entre os monômeros que compõe o dímero presente na ASU, sugerindo que a dimerização ilustrada na (**Figura 14-B**) representa um dímero biologicamente relevante.

Tabela 2 - Dados cristalográficos e refinamento estatístico da estrutura LcdC_{PAS}.

Dados de Raio-X coletados	
Grupo espacial	P 1 21 1
Parâmetro da célula unitária	
a (Å)	34,72
b (Å)	62,21
c (Å)	49,45
Dados do Refinamento	
Faixa de resolução Å	37,6 - 1
Rfactor/Rfree (%)	16,8/19,65
Número de reflexões	92486
Estatísticas do “Diagrama de Ramachadran” (%)	
Regiões mais favorecidas	100
Regiões permitidas	0,0
Regiões não permitidas	0,0

No diagrama da topologia de domínios é possível observar que LcdC_{PAS} apresenta uma estrutura de domínios α/β composta de cinco fitas β flanqueadas por cinco α hélices (**Figura 16**), o que condiz com a conservação da estrutura terciária de domínios PAS os quais são compostos de cinco fitas β antiparalelas flanqueados por α hélices as quais fecham o sítio de ligação. (HENRY; CROSSON, 2011) (AMEZCUA et al., 2002) (MÖGLICH; AYERS; MOFFAT, 2009).

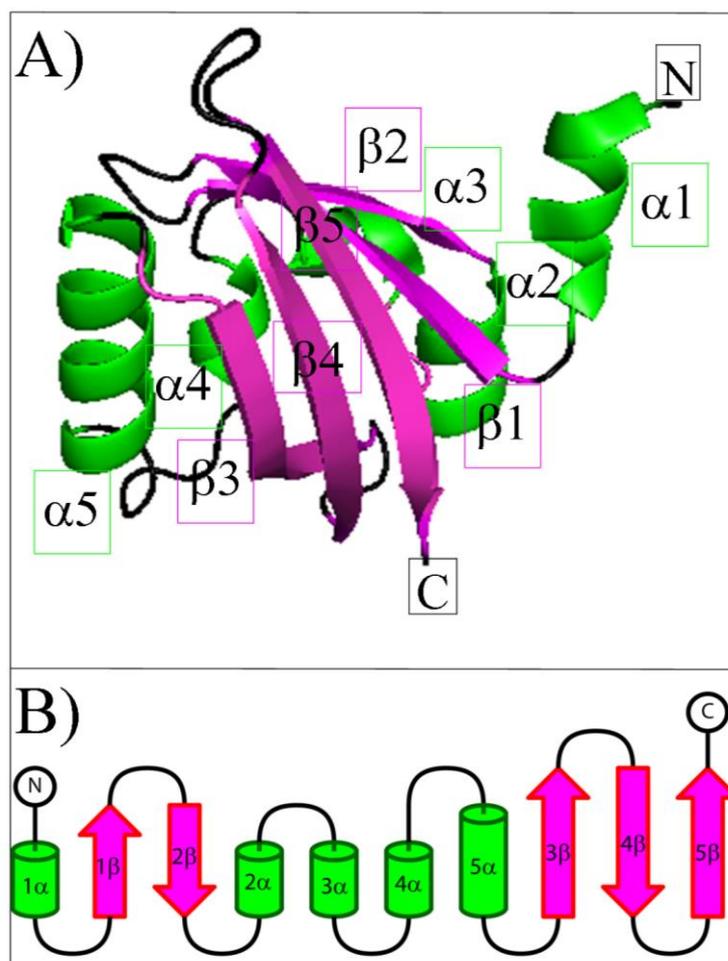


Figura 16 - Topologia do domínio da estrutura LcdCPAS. Em A) Estrutura terciária do monômero cristalizado. Em B) arranjo da estrutura secundária de LcdCPAS a qual possui três α hélices e cinco fitas β .

4.4.2 Estrutura cristalográfica da proteína LcdDPAS ligada a brevianamida F e na forma apo

A proteína LcdDPAS foi cristalizada inicialmente em parceria com o grupo do Dr. Ray Owens, chefe da *Facility* de Produção de Proteínas de Oxford (*Oxford Protein Production Facility*_OPPF-UK) no Reino Unido e a estrutura foi resolvida pelo nosso grupo via substituição molecular utilizando a estrutura LcdCPAS a qual possui 47% de identidade com LcdDPAS. Durante o processo de refinamento observamos uma densidade eletrônica no sítio de ligação na qual a presença do anel indol era evidente e isso ajudou na busca por moléculas com grupo indol nos ensaios de espectrometria de massas. Após identificação do ligante por espectrometria de massas, conforme

descrito no **item 3.8** foram feitos novos testes de cristalização com e sem brevianamida F.

Para tanto, a proteína foi expressa em meio mínimo M9 e após a purificação foi adicionado 2 mM de brevianamida F gerando o cristal com a presença de brevianamida F no sítio de ligação. Além disso, o mesmo ensaio também foi realizado adicionando-se 2 mM de triptofano ao invés de brevianamida F, uma vez que inicialmente não sabíamos se a interação com brevianamida F era específica. Devido aos resultados obtidos por RMN (**item 4.6**) no qual foi possível comprovar não haver interação entre LcdD_{PAS} e triptofano, a estrutura de LcdD_{PAS} cristalizada com 2 mM de triptofano na condição de cristalização é considerada uma estrutura apo.

Dessa forma, LcdD_{PAS} ligada a brevianamida F cristalizou na concentração de 28 mg/mL na condição de 0,1M Bis tris pH 5,7; 20% PEG 10000 e 0,1M acetato de amônio (**Figura 17**). O cristal foi difratado na linha de luz W01B-MX2 do LNLS (Campinas), obtendo-se a resolução de 2 Å com a presença de três moléculas na unidade assimétrica – ASU, os dados cristalográficos oriundos da difração e do refinamento estão apresentados na **Tabela 3**. Mas, ainda há necessidade de concluir etapas finais de refinamento e validação da estrutura.

A estrutura foi resolvida através da técnica de substituição molecular utilizando a primeira estrutura obtida da proteína LcdD_{PAS} como modelo. Após a adição de brevianamida F foi possível obter uma estrutura que comprovou a interação e elucidou melhor a interface de interação proteína-ligante (**Figura 18**). A estrutura está sendo refinada usando os programas WinCoot CCP4 e Refmac, os dados atuais de R_{Free} e R_{Factor} são de 21,9% e 27% respectivamente.

O cálculo da superfície enterrada (“PDBE < PISA < EMBL-EBI”) mostra uma área de interface de 1.234,5 Å² entre as cadeias A e C presentes na **Figura 17** a seguir o que sugere que esta interação represente um dímero biologicamente relevante.

A análise estatística do diagrama de ramachandran (**Figura 19**) mostra que a maioria dos ângulos diedrais ψ e ϕ presentes na estrutura de LcdD_{PAS} com

brevianamida F estão em regiões favoráveis (98%) e apenas 1,2% estão em regiões adicionalmente favoráveis não havendo ângulos em regiões não favoráveis.

Em seguida foi feito um diagrama da topologia de domínios no qual é possível observar que LcdD_{PAS} ligada a brevianamida F apresenta uma estrutura de domínios α/β composta de cinco fitas β antiparalelas flanqueadas por cinco α hélices (**Figura 20**) o que novamente condiz com a conservação da estrutura de domínios PAS os quais são compostos de cinco fitas β antiparalelas e α hélices que fecham o sítio de ligação (HENRY; CROSSON, 2011) (AMEZCUA et al., 2002).

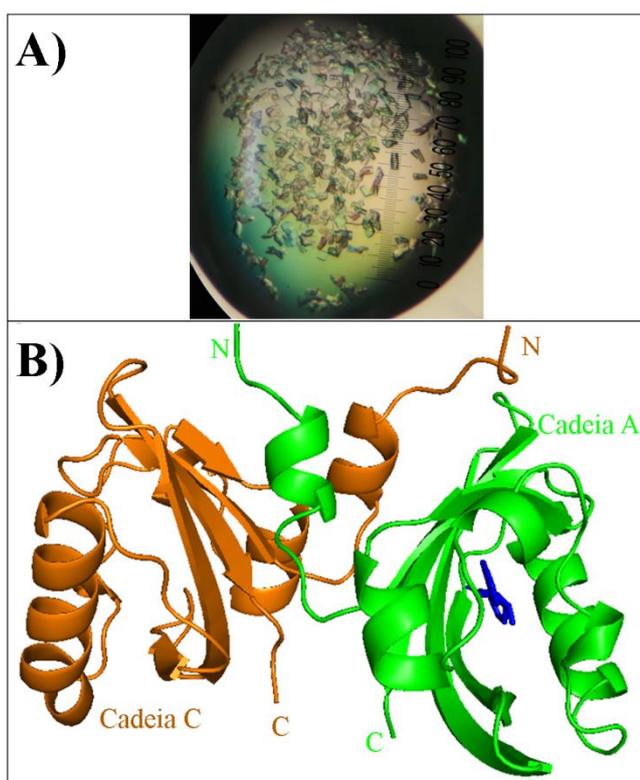


Figura 17 - Cristalização e estrutura tridimensional de LcdD_{PAS} ligada a brevianamida F. A) Cristais de LcdD_{PAS} ligada a brevianamida F. B) Estrutura de LcdD_{PAS} mostrando a interface de dimerização entre a cadeia A (em verde) e a cadeia C (em laranja) e a molécula de brevianamida F está em azul.

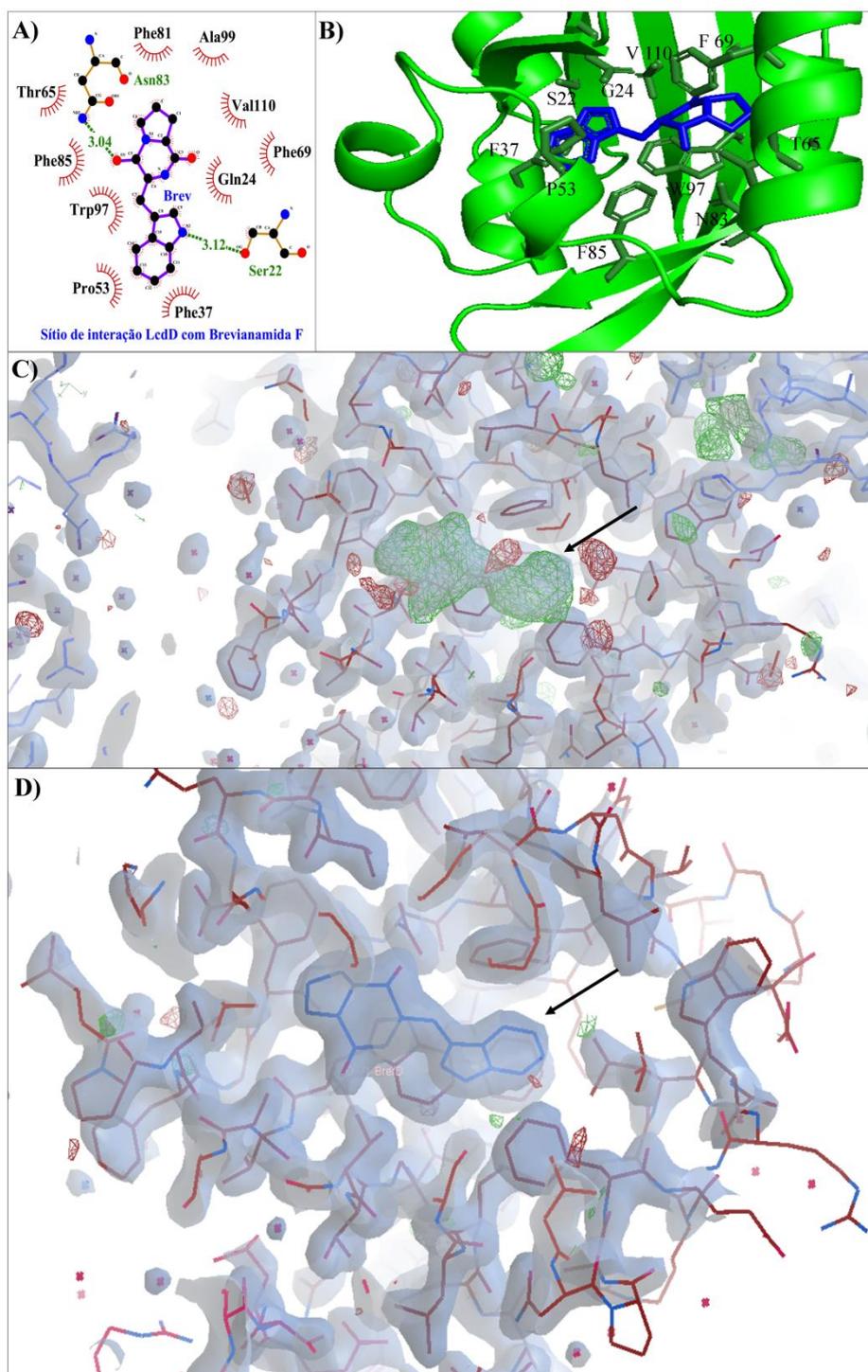


Figura 18 – Sítio de interação de LcdD_{PAS} com brevianamida F. A) Representação dos aminoácidos de LcdD_{PAS} que interagem com brevianamida F (imagem obtida pelo programa *LigPlot*). B) Representação da localização dos resíduos envolvidos na interação com brevianamida F. C) Densidade eletrônica da proteína e do sítio de ligação com brevianamida F indicado pela seta ($F_0 - F_{calc} = 1.0$), imagem obtida através do programa WinCoot CCP4. D) Densidade eletrônica da proteína e do ligante brevianamida F indicado pela seta ($2F_{obs} - F_{calc} = 1.0$), imagem obtida através do programa WinCoot CCP4.

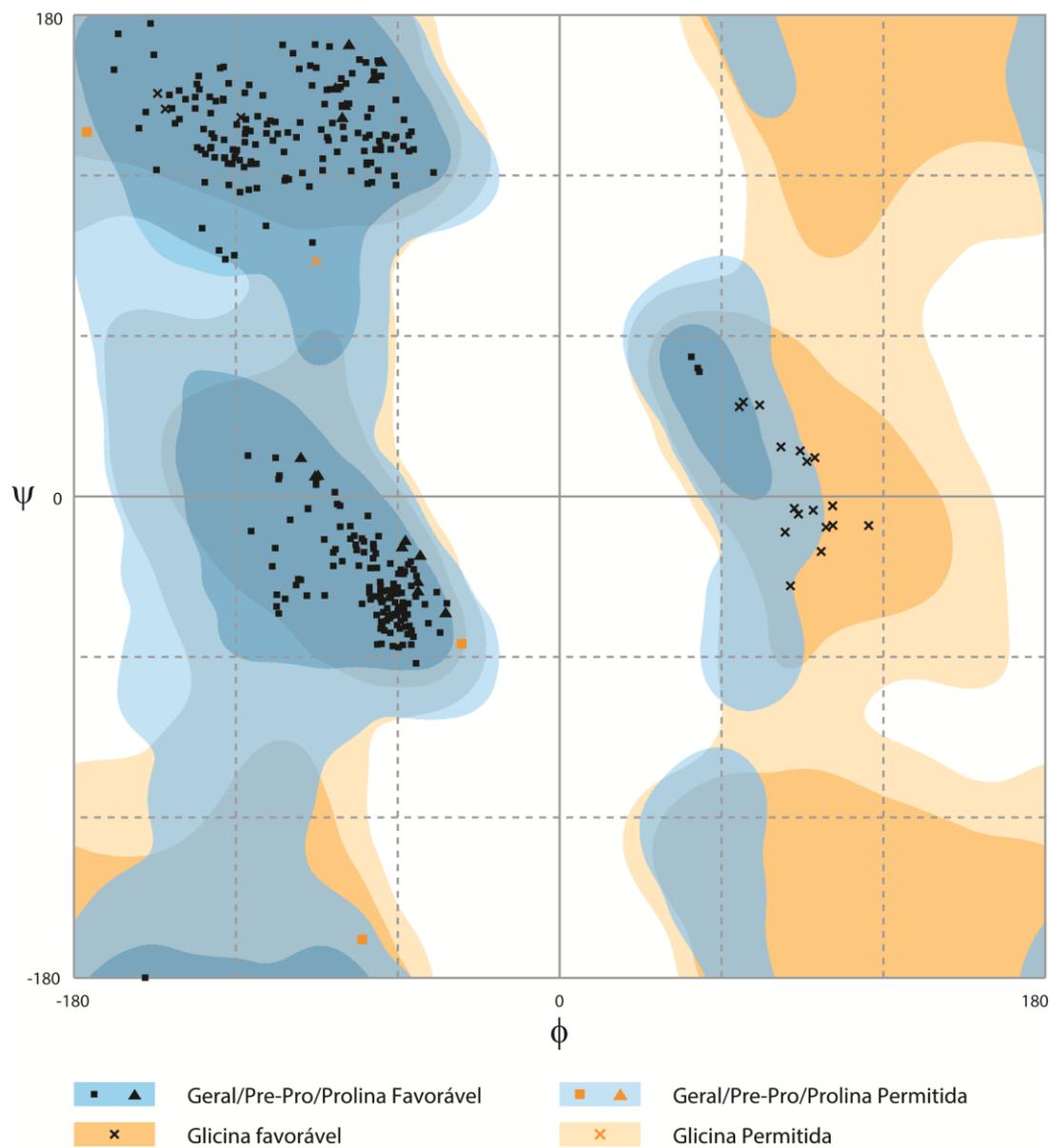


Figura 19 - “Diagrama de Ramachandran” do modelo cristalográfico de LcdD_{PAS} cristalizada com brevianamida F. Nenhum resíduo possui ângulos em regiões não favoráveis.

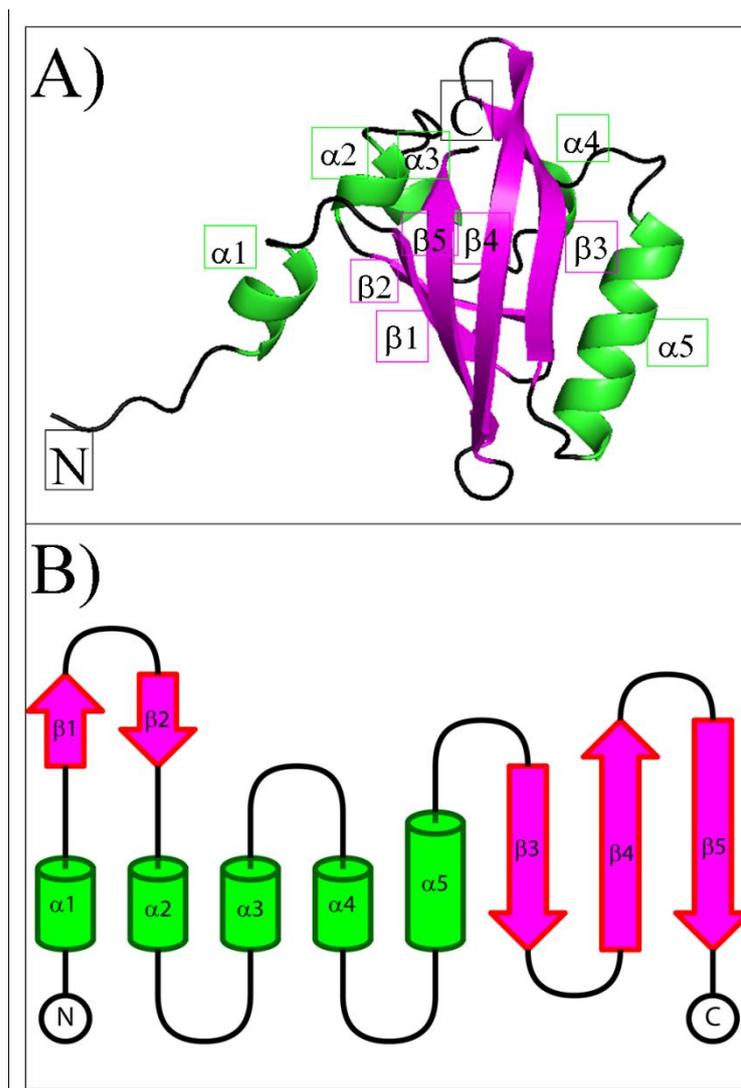


Figura 20 - Topologia do domínio da estrutura LcdD_{PAS} ligada a brevianamida F. A) Estrutura do monômero cristalizado referenciando a localização das α hélices e fitas β . B) Arranjo da estrutura secundária de LcdD_{PAS} a qual possui cinco α hélices e cinco fitas β .

Além da forma ligada a brevianamida F, foram feitos testes de cristalização da proteína LcdD_{PAS} expressa em meio mínimo M9 (forma apo) a qual cristalizou na concentração de 28 mg/mL na condição: 0,1M Bis tris, pH 5,5; 0,1M Acetato de amônio; 17% w/v PEG 10000 com adição de 2 mM de triptofano. O cristal de LcdD_{PAS} apo difratou na linha de luz W01B-MX2 do LNLS (Campinas) e foi obtido dados de difração até 2,9 Å com a presença de três moléculas na unidade assimétrica – ASU, os dados cristalográficos oriundos da difração e do refinamento estão apresentados na **tabela 3**. A imagem do cristal e de sua estrutura resultante estão apresentados na **figura 21**. A estrutura foi resolvida através da técnica de substituição molecular

utilizando a primeira estrutura obtida da proteína LcdD_{PAS} como modelo. Os dados estão sendo refinados utilizando os programas Refmac 5 e WinCoot CCP4, os valores atuais de R_{free} e R_{factor} são de 33,2 e 20,6 respectivamente.

O cálculo da superfície enterrada de LcdD_{PAS} na forma apo (“PDBe & EMBL-EBI”) mostra uma área de interface de 1.280,6 Å² entre os monômeros que compõe o dímero presente na ASU, sugerindo que este represente um dímero biologicamente relevante. Além disso, a estrutura obtida é muito similar a estrutura de LcdD_{PAS} em complexo com Brevianamida F a qual também contém 3 moléculas na unidade assimétrica e há formação de um dímero.

É importante mencionar que ensaios de ressonância magnética nuclear (RMN) mostraram que a proteína LcdD_{PAS} interagem especificamente com Brevianamida F, ou seja, não há interação com triptofano (resultados mostrados a seguir no **item 4.6**). Por isso, é possível considerar que a presença do triptofano na cadeia B do dímero seja um artefato cristalográfico decorrente da adição de 2 mM de triptofano na condição de cristalização, além disso há a presença de um acetato (presente na condição de cristalização) na cadeia A o que provavelmente deve-se a um artefato cristalográfico. Logo, é possível considerar esta estrutura como sendo uma forma apo de LcdD_{PAS}.

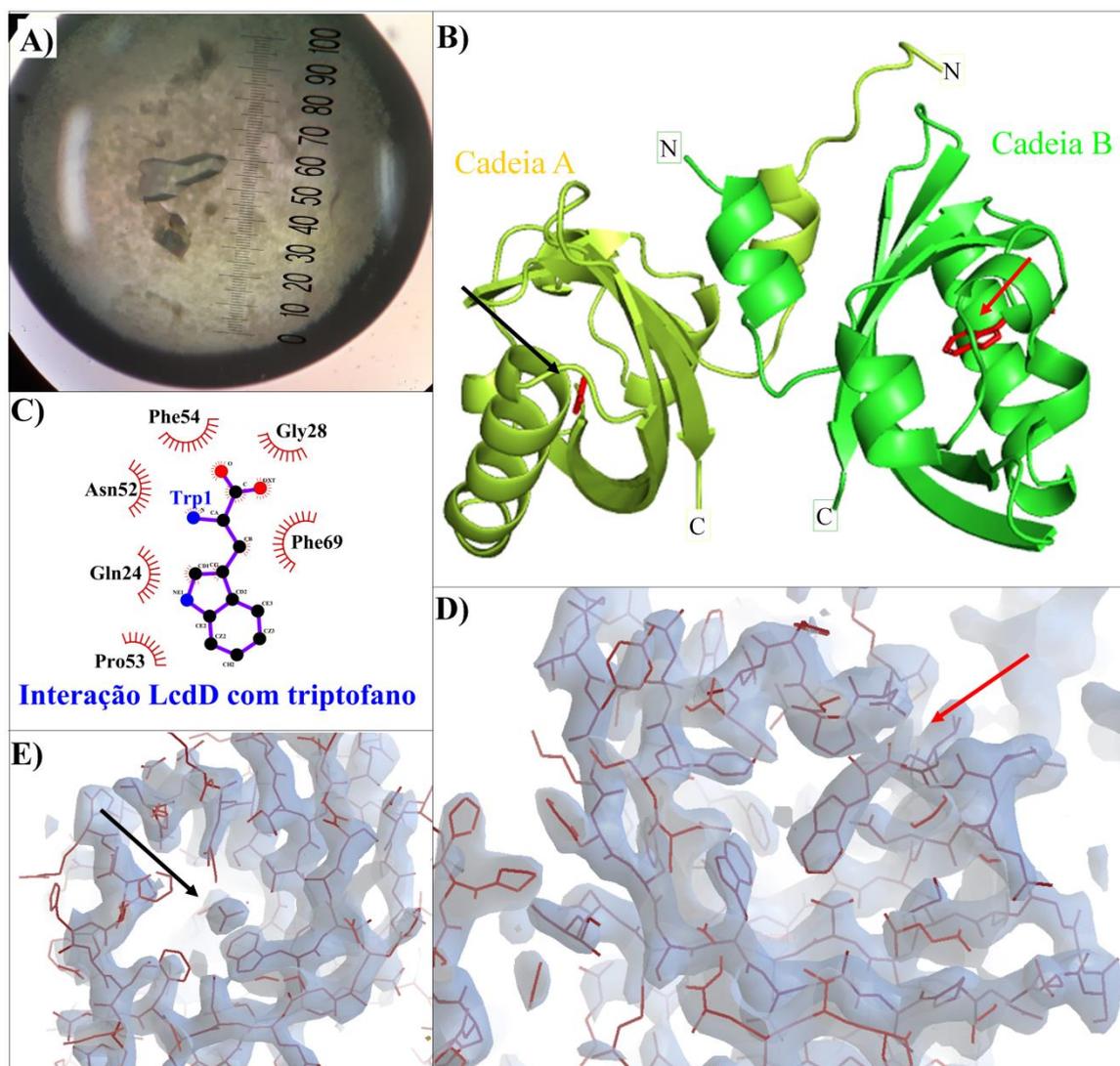
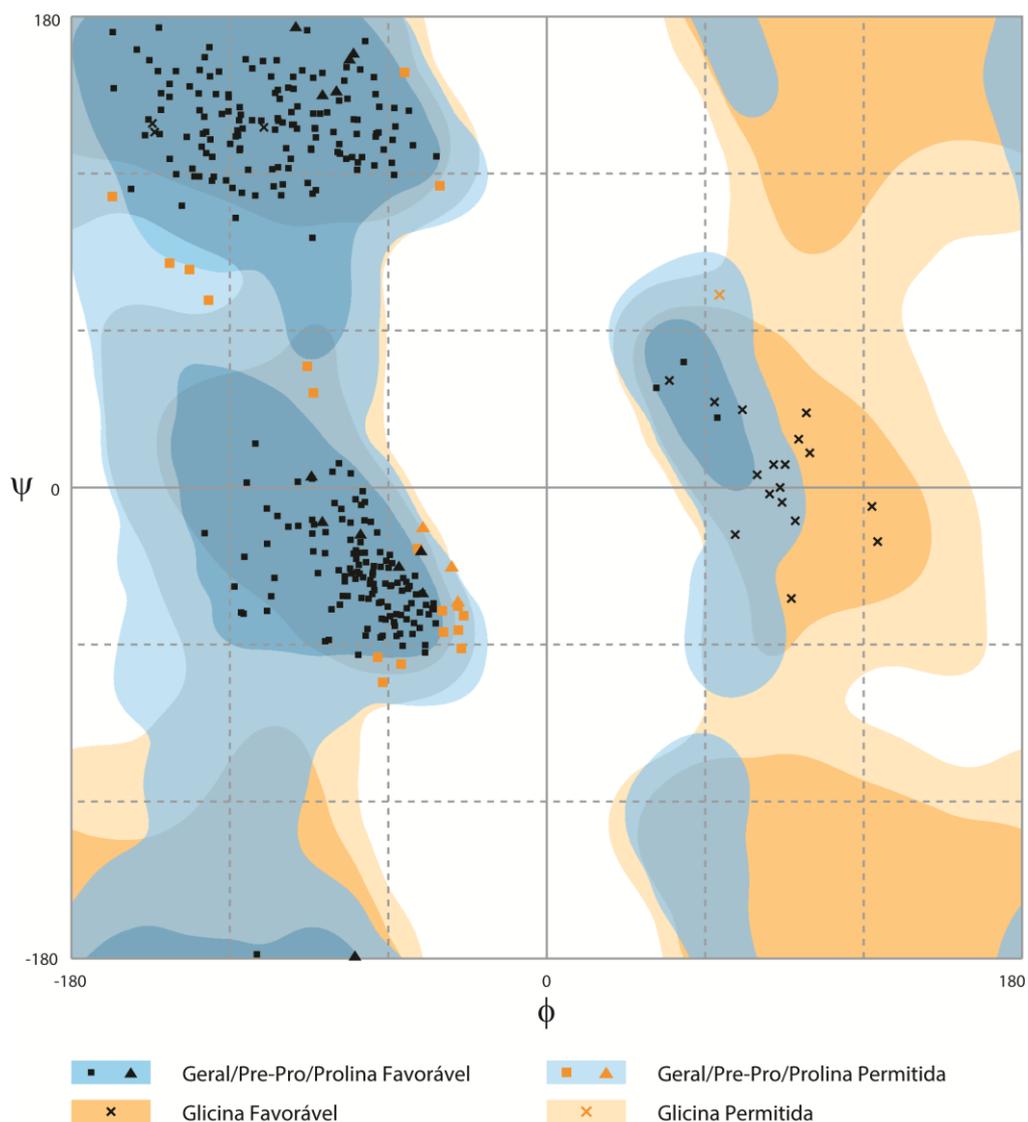


Figura 21 – Cristalização e estrutura tridimensional de LcdD_{PAS} apo. A) Cristal de LcdD_{PAS} apo. B) Estrutura de LcdD_{PAS} mostrando a interface de dimerização entre as cadeias A (em amarelo) e B (em verde); a mesma região de cada monômero é ocupada por diferentes moléculas: acetato (seta preta) e triptofano (seta vermelha). C) Representação dos aminoácidos de LcdD_{PAS} que interagem com triptofano na estrutura. D) Mapa de densidade eletrônica da cadeia B com a presença de um triptofano (seta vermelha) ($2F_{obs} - F_{calc} = 1.0$), imagem obtida através do programa WinCootCCP4. E) Mapa de densidade eletrônica da cadeia A com a presença de um acetato ($2F_{obs} - F_{calc} = 1.0$) imagem obtida através do programa WinCootCCP4.

Após obtenção dos dados cristalográficos foi feita análise estatísticas do diagrama de ramachandran para análise dos ângulos diedrais ψ e ϕ presentes na estrutura de LcdD_{PAS} apo (**Figura 22**) sendo que 93,1% dos ângulos desta estrutura estão em regiões favoráveis e apenas 6,9% estão em regiões adicionalmente favoráveis e não há presença de ângulos em regiões não favoráveis.



α/β composta de cinco fitas β por cinco α hélices (**Figura 23**) mantendo a mesma estrutura secundária da forma ligada a brevianamida F.

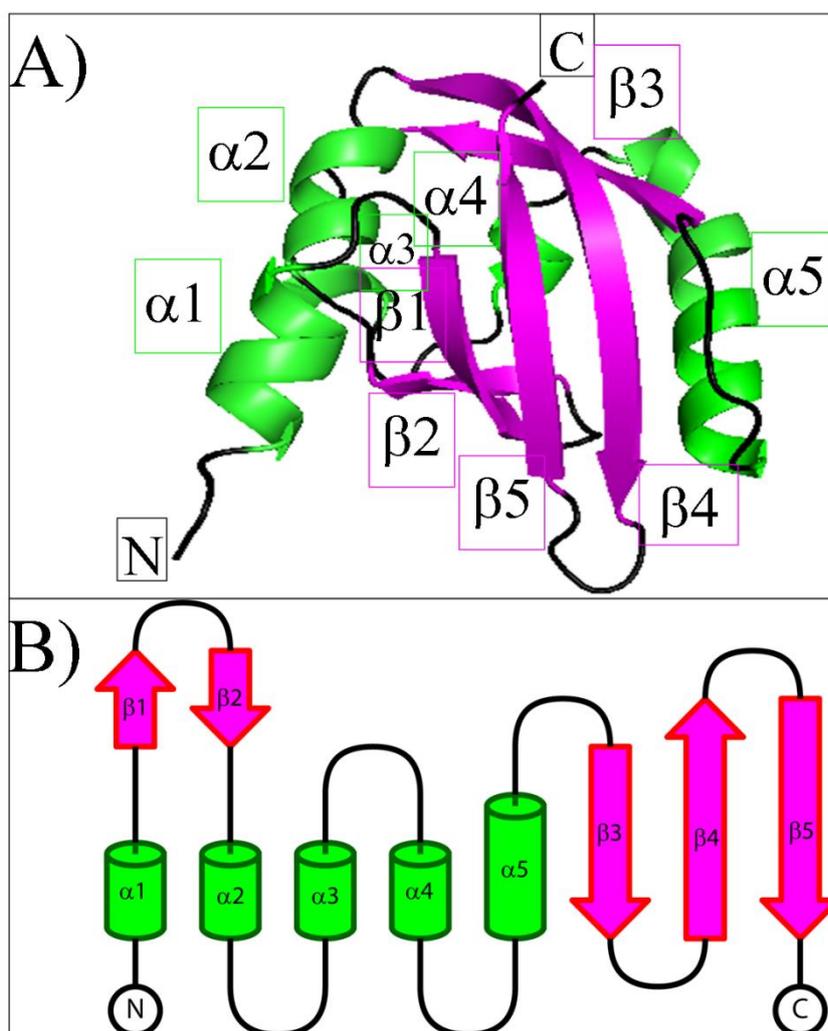


Figura 23 - Topologia do domínio da estrutura LcdDPAS apo. A) Estrutura do monômero cristalizado. B) Topologia dos domínios de LcdDPAS a qual possui cinco α hélices e cinco fitas β .

Tabela 3 - Dados cristalográficos e refinamento estatístico da estrutura LcdDPAS na forma apo e complexada a brevianamida F.

Dados de Raio-X coletados		
	LcdDPAS apo	LcdDPAS ligada a brevianamida F
Grupo espacial	P222	P 222
Parâmetro da célula unitária		

a (Å)	48	48
b (Å)	55	55
c (Å)	140	143
Faixa de resolução (Å)	50 - 3 (3,11 - 3)	50 - 1,99 (2,06 - 1,99)
Número de reflexões totais	40682	149714
Número de reflexões únicas	8070	26612
Completeza (%)	99,2 (99,4)	99,2 (99,5)
Redundância	5	5,6
I/erro	12,6 (6,6)	25,2 (7,9)
R-fac (%)	7,4 (17,8)	3,3 (17,5)
Dados do Refinamento		
Faixa de resolução Å	50 - 3	30 - 1,99
R _{factor} /R _{free} (%)	20,6/33,2	21,9/27
Número de reflexões	7622	25217
Estatísticas do “Diagrama de Ramachadran” (%)		
Regiões mais favorecidas	93,1	98,8
Regiões permitidas	6,9	1,2
Regiões não permitidas	0,0	0,0

O alinhamento entre a estrutura apo e a estrutura ligada a brevianamida F é muito similar (RMSD = 0,609), isto provavelmente deve-se a uma seleção de conformação para cristalização uma vez que os espectros de ¹H-¹⁵N (HSQC) apresentados no **item 4.6** mostram grandes diferenças estruturais entre a proteína ligada a brevianamida F e a proteína na forma apo. No entanto, é interessante observar os aminoácidos que fecham o sítio de interação, sobretudo os aminoácidos F66, F54 e F69 os quais movem sua cadeia lateral ao interagir com brevianamida F fechando o sítio de interação (**Figura 24**).

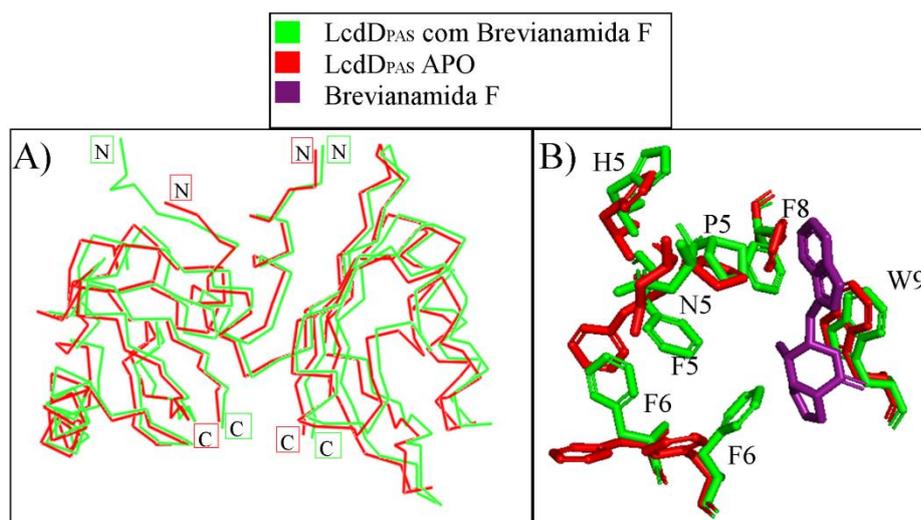


Figura 24 - Sobreposição das estruturas cristalográficas e do sítio de interação com brevianamida F de LcdDPAS na forma apo e ligada. A) Sobreposição dos dímeros na forma apo e ligada. B) Diferenças estruturais encontradas no sítio de interação entre a proteína apo (em vermelho) e ligada (em verde).

4.4.3 Estrutura cristalográfica da proteína LcdGPAS

A proteína LcdGPAS cristalizou na concentração de 7 mg/mL na condição: 0.2 M sulfato de lítio monoidratado; 0.1 M HEPES, pH 7.5; 25% PEG 3,350. O cristal foi difratado na linha de luz W01B-MX2 do LNLS (Campinas), obtendo-se a resolução de 2,3 Å e apresenta um grupo espacial P 3₁. O tamanho da célula unitária é de 66,1 Å, 66,1 Å e 146 Å e ângulos α , β e γ de 90°, 90° e 120° respectivamente, os dados cristalográficos oriundos da difração e do refinamento estão apresentados na **tabela 4**.

A resolução das fases foi feita pela técnica de substituição molecular utilizando a proteína LcdCPAS como modelo, cuja identidade corresponde a 44% quando comparada à proteína LcdGPAS em questão. Com isso, foi possível obter a estrutura cristalográfica da proteína LcdGPAS a qual cristalizou com seis monômeros na unidade assimétrica – ASU. Em todos os seis monômeros presentes na estrutura há uma densidade eletrônica correspondente a um provável ligante ainda não identificado, porém é possível ajustar perfeitamente um citrato na densidade eletrônica presente no sítio de ligação. Interessante ressaltar que nas estruturas LcdCPAS e LcdDPAS quando só há densidade eletrônica correspondente a um ligante

em uma das cadeias constituinte do dímero, já na estrutura de LcdG_{PAS} há presença de um ligante em ambas as cadeias dos dímeros.

Os dados estão sendo refinados utilizando os programas Refmac 5 e WinCoot CCP4, os valores atuais de R_{free} e R_{factor} são de 26,95 e 19,9 respectivamente. Futuramente será feito a identificação deste ligante por espectrometria de massas. Os dados estruturais de LcdG_{PAS} estão dispostos a seguir (**Figura 25**):

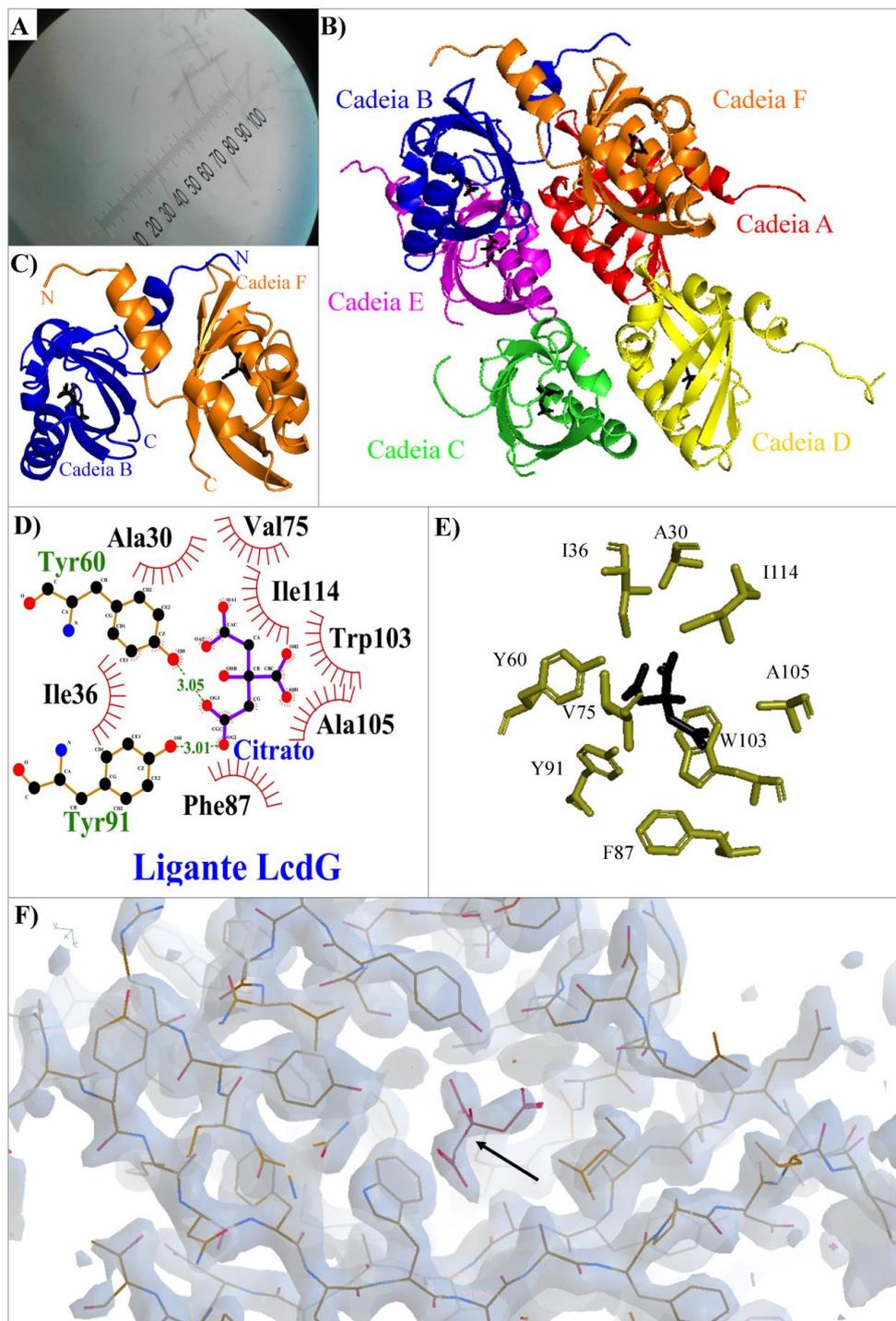


Figura 25 – Cristalização e estrutura tridimensional de LcdG_{PAS}. A) Cristal de LcdG_{PAS}. B) Estrutura de LcdG_{PAS} mostrando os seis monômeros que constituem a unidade assimétrica sendo que cada cadeia está representada por uma dada cor. C) Estrutura de LcdG_{PAS} mostrando a interface de dimerização entre as cadeias B (em azul) e F (em laranja). D) Representação dos resíduos que interagem com citrato (provável ligante). E) Representação da localização tridimensional dos resíduos que interagem com citrato. F) Mapa de densidade eletrônica ($2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}} = 1.0$) da região de interação entre LcdG_{PAS} e citrato (evidenciado pela seta), dados obtidos pelo programa WinCoot e CCP4.

Após obtenção dos dados cristalográficos de LcdG_{PAS} foi feita análise estatísticas dos ângulos diedrais ψ e ϕ , o diagrama de ramachandran mostra que 97,6% dos ângulos desta estrutura estão em regiões favoráveis e apenas 2,4% estão em regiões adicionalmente favoráveis e nenhum ângulo está em região não favorável (Figura 26).

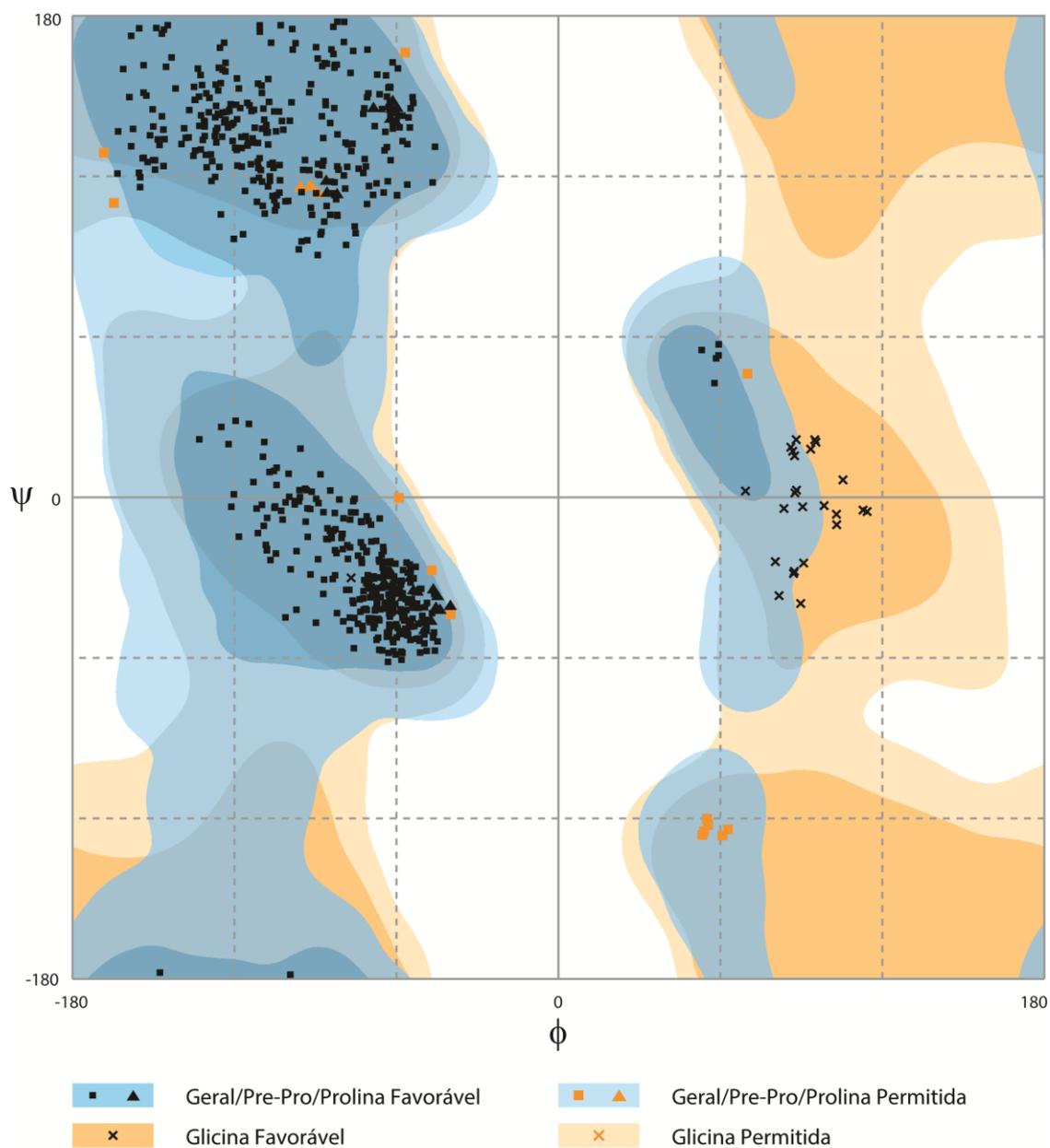


Figura 26 - “Diagrama de Ramachandran” do modelo cristalográfico de LcdG_{PAS} apo. Nenhum resíduo possui ângulos em regiões não favoráveis.

A estrutura de LcdG_{PAS} apresenta domínios α/β composta de cinco fita β flanqueada por cinco α hélices (**Figura 27**) que é a estrutura secundária típica dos domínios PAS (HENRY; CROSSON, 2011) (AMEZCUA et al., 2002).

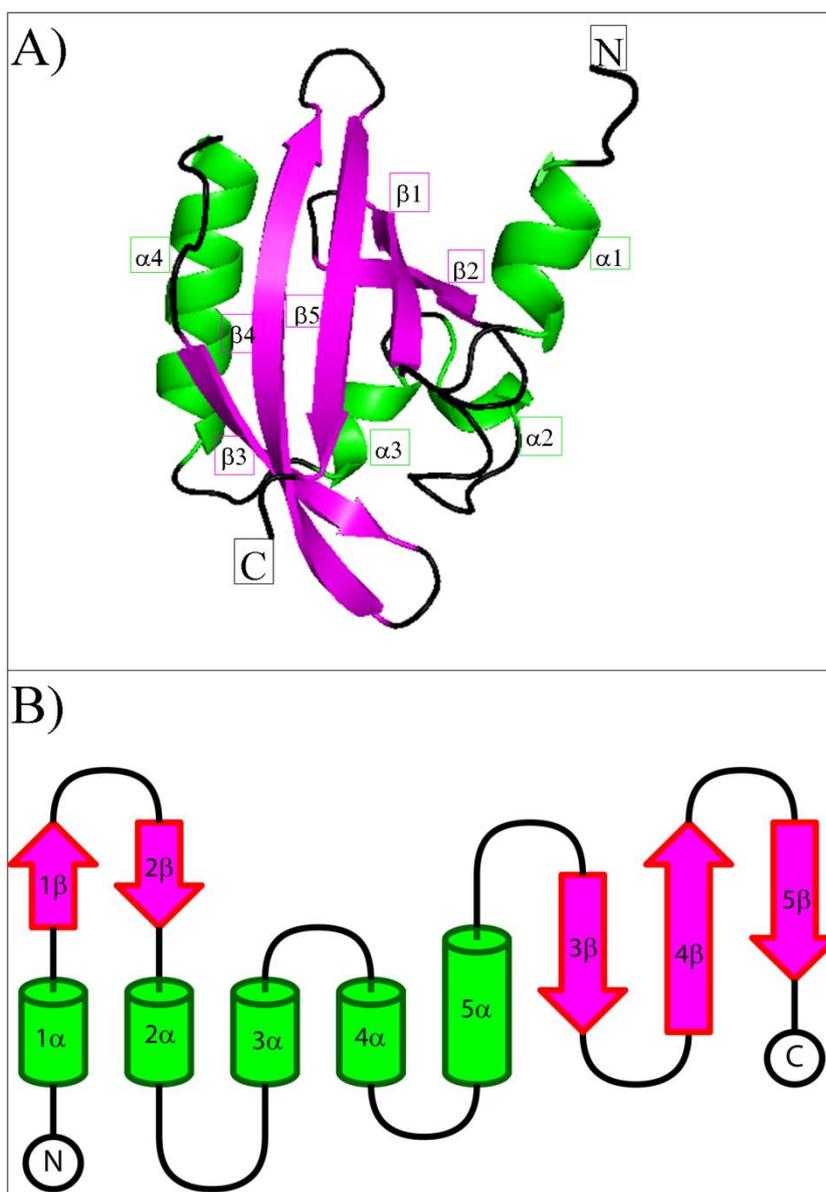


Figura 27 - Topologia do domínio da estrutura LcdG_{PAS}. Em A) estrutura do monômero cristalizado. Em B) arranjo da estrutura secundária de LcdDPAS a qual possui cinco α hélices e cinco β folhas.

Tabela 4 – Dados cristalográficos e refinamento estatístico da estrutura LcdG_{PAS}

Dados de Raio-X coletados	
Grupo espacial	P31
Parâmetro da célula unitária	
a (Å)	66,12
b (Å)	66,12
c (Å)	145,99
Dados do Refinamento	
Faixa de resolução Å	28 – 2.3
R _{factor} /R _{free} (%)	19,9/26,95
Número de reflexões	30025
Estatísticas do “Diagrama de Ramachadran” (%)	
Regiões mais favorecidas	97,6
Regiões permitidas	2,4
Regiões não permitidas	0,0

O cálculo da superfície enterrada de LcdG_{PAS} (“PDBe < PISA < EMBL-EBI”) mostra uma área de interface de 7.129 Å² entre as cadeias B e F, sugerindo que este represente um dímero biologicamente relevante.

Ao comparar os dímeros presentes nas quatro estruturas resolvidas neste trabalho (LcdC_{PAS}, LcdD_{PAS} ligada a brevianamida F, LcdD_{PAS} apo e LcdG_{PAS}) é possível observar que há pouca diferença entre as estruturas, sendo que o principal sítio de divergência é a primeira α hélice responsável pela dimerização das proteínas (**Figura 28**).

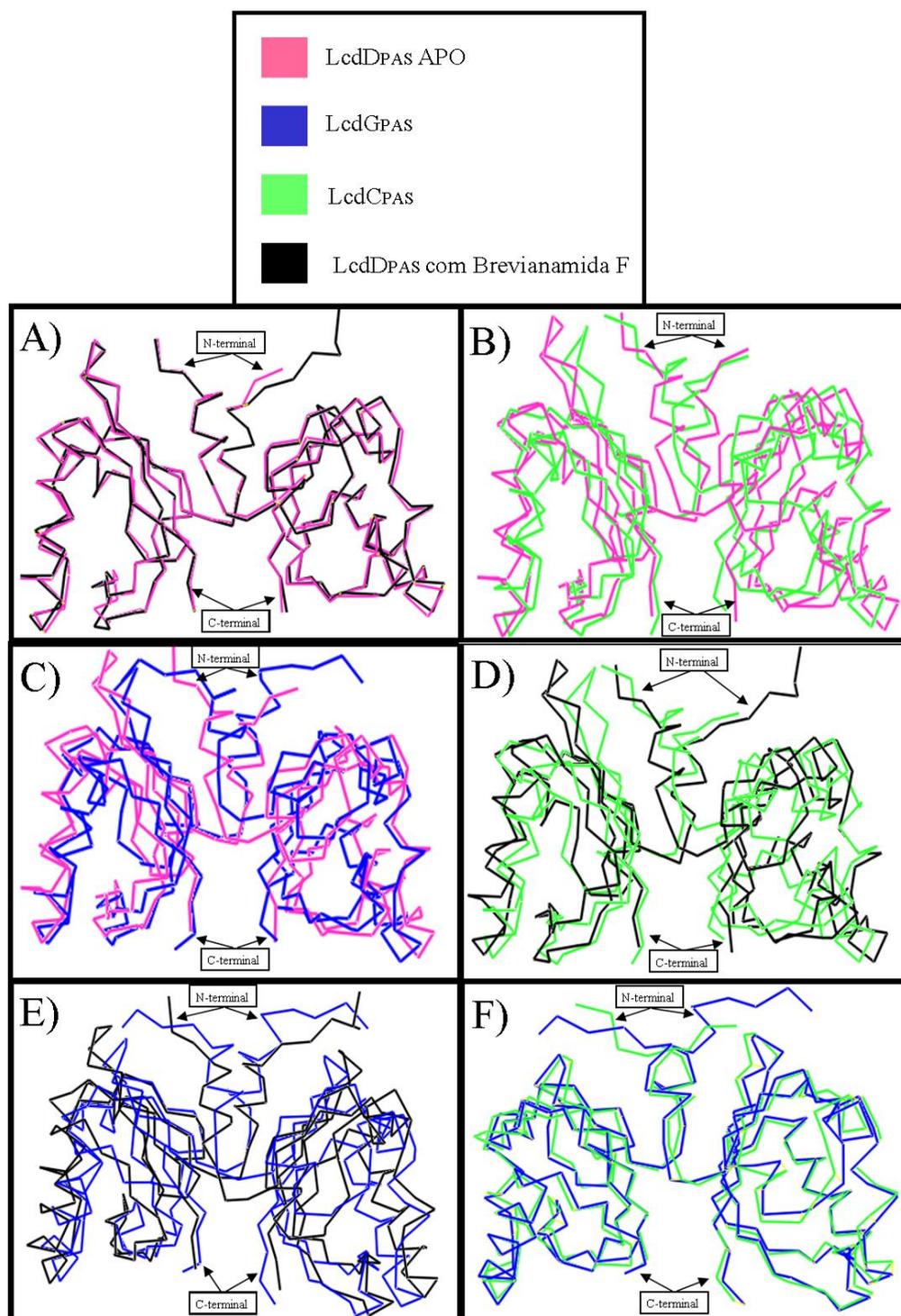


Figura 28 - Sobreposição em pares das quatro estruturas obtidas. A) Sobreposição de LcdDPAS apo com LcdDPAS cristalizada com brevianamida F. B) Sobreposição de LcdDPAS apo com LcdCPAS. C) Sobreposição de LcdDPAS apo com LcdGPAS. D) Sobreposição de LcdDPAS cristalizada com brevianamida F com LcdCPAS. E) Sobreposição de LcdDPAS cristalizada com brevianamida F com LcdGPAS. F) Sobreposição de LcdCPAS com LcdGPAS.

Junto dos dados de sobreposição de cada dímero presente na unidade assimétrica das estruturas foi obtido o valor de RMSD para comparar melhor as diferenças entre cada estrutura. Os dados estão sintetizados a seguir (**Tabela 6**):

Tabela 5 - Valores de RMSD da comparação em pares dentre as quatro estruturas obtidas. Estes dados mostram que a estrutura de LcdD_{PAS} cristalizada com triptofano (apo) e com brevianamida F (holo) diferenciam pouco entre si. Já dentre as diferentes proteínas a LcdD_{PAS} é a que mais apresenta divergência tanto na forma apo quanto na forma ligada a brevianamida F. Dados obtidos através do programa *PyMol*.

Estruturas sobrepostas	RMSD_{Cα}
LcdD _{PAS} com triptofano vs LcdD _{PAS} com brevianamida	0,4
LcdD _{PAS} apo vs LcdC _{PAS}	2,7
LcdD _{PAS} apo vs LcdG _{PAS}	2,4
LcdD _{PAS} com brevianamida F vs LcdC _{PAS}	2,8
LcdD _{PAS} com brevianamida F vs LcdG _{PAS}	2,5
LcdC _{PAS} vs LcdG _{PAS}	1

Logo, comparando os dados estruturais obtidos através de cristalografia a estrutura cristalizada de LcdD_{PAS} na forma apo e ligada a brevianamida F não apresentam grandes diferenças. Entre as estruturas das proteínas LcdD_{PAS}, LcdC_{PAS} e LcdG_{PAS} as estruturas obtidas de LcdC_{PAS} e LcdG_{PAS} são mais semelhantes entre si quando comparadas a estrutura de LcdD_{PAS} tanto na forma apo como na forma ligada, o que corrobora com os dados da árvore filogenética obtidos no **item 4.1**.

4.5 Determinação do estado de oligomérico das proteínas em estudo

A determinação dos estados oligoméricos dos domínios PAS das sete proteínas foi realizada através de cromatografia por exclusão por tamanho utilizando a coluna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences) previamente calibrada utilizando o Kit “*Gel Filtration Calibration kits LMW (GE Healthcare Life Sciences)*”. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e tiveram o desvio padrão calculado. Os dados obtidos foram tratados e as massas moleculares experimentais calculadas (**Tabela 3**). Todas as proteínas eluíram como dímeros

(Figura 29), condizente com os dados estruturais das proteínas LcdC_{PAS}, LcdD_{PAS} e LcdG_{PAS}, que cristalizaram como homodímeros.

É possível observar que a maioria das proteínas mesmo quando apresentam um pequeno pico correspondente a um oligômero há um predomínio de dímeros na população. As únicas exceções são a LcdA_{PAS}, LcdD_{PAS} e LcdG_{PAS} nas quais há formação de dímero, porém este estado não é predominante. A proteína LcdA_{PAS} apresenta um equilíbrio entre hexâmero e dímero. A proteína LcdG_{PAS} apresenta uma base larga cujo volume de eluição do pico corresponde a um intermediário entre monômero e dímero, o mesmo padrão de eluição ocorre com a proteína LcdD_{PAS}. Os pesos teóricos e experimental de cada proteína estão apresentados na **tabela 7**.

Os padrões utilizados no ensaio e seus respectivos volumes de eluição foram: blue dextran (peso: 2000 KDa) que eluiu em 8,07 mL; canalbumina (peso molecular: 75 KDa) que eluiu em 9,14 mL; ovalbumina (peso: 44 KDa) que eluiu em 9,79 mL; anidrase carbônica (peso: 29 KDa) que eluiu em 11,14 mL; ribonuclease (peso: 13,7 KDa) que eluiu em 13 mL.

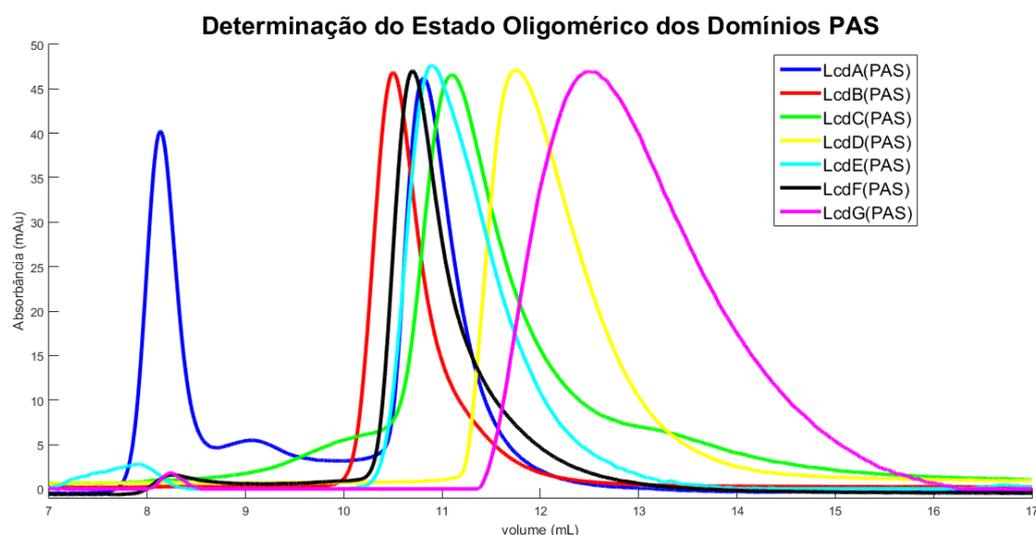


Figura 29 - Picos de eluição de cada domínio PAS para determinação do estado oligomérico. Neste cromatograma apenas a proteína LcdA_{PAS} apresenta dois picos de eluição mostrando haver dois estados oligoméricos distintos. As proteínas LcdB_{PAS}, LcdC_{PAS}, LcdE_{PAS} e LcdF_{PAS} apresentam picos de eluição correspondentes ao estado de dímero, mas as proteínas LcdD_{PAS} e LcdG_{PAS} eluem com picos mais alargados que representam um equilíbrio entre monômero e dímero em solução.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e tiveram o desvio padrão calculado. Os dados obtidos foram tratados e as massas moleculares experimentais calculadas (**Tabela 7**).

Tabela 6 - Determinação do estado oligomérico das sete proteínas PAS através da comparação entre o peso experimental e o peso teórico. A maior parte das proteínas possuem picos correspondente a dímeros em solução, porém a proteínas LcdA_{PAS}, possui dois picos de eluição no qual um corresponde a dímero e o outro corresponde a um oligômero. Já as proteínas LcdD_{PAS} e LcdG_{PAS} apresentam valores de peso molecular experimental abaixo do correspondente ao estado de dímero, mas acima do estado de monômero, provavelmente devido a um equilíbrio monômero dímero.

Proteína	Peso molecular teórico (KDa)	Pico de eluição	Peso molecular experimental (KDa)	Estado oligomérico
LcdA _{PAS}	15,5	Pico 1	86,4 ± 0,4	Oligômeros
		Pico 2	34,2 ± 0,06	Dímero
LcdB _{PAS}	15,8	Pico 1	38,2 ± 0,07	Dímero
LcdC _{PAS}	14,9	Pico 1	30,1 ± 0,87	Dímero
LcdD _{PAS}	15,4	Pico 1	23,8 ± 1,5	Equilíbrio monômero/dímero
LcdE _{PAS}	15,3	Pico 1	91,6 ± 0,6	Oligômeros
		Pico 2	34,1 ± 0,9	Dímero
LcdF _{PAS}	15,5	Pico 1	92,2 ± 6,0	Oligômeros
		Pico 2	35,4 ± 0,5	Dímero
LcdG _{PAS}	16,6	Pico 1	85,2 ± 1,2	Oligômeros
		Pico 2	21,3 ± 2,2	Equilíbrio monômero/dímero

4.6 Ensaios de interação por RMN

Para comprovar a interação de LcdD_{PAS} com brevianamida F e identificar a especificidade desta interação, a proteína LcdD_{PAS} foi expressa em meio mínimo M9 marcado com ¹⁵N e purificada por afinidade ao níquel, clivagem da cauda de histidina e cromatografia de exclusão de tamanho, em seguida os dados obtidos por ressonância nuclear magnética (RMN) foram realizados em parceria com o laboratório do Prof. Dr. Roberto Kopke Salinas, pelo doutorando Phelipe Augusto Mariano Vitale.

Inicialmente foi feito um espectro de ¹H-¹⁵N (HSQC) da proteína LcdD_{PAS} na concentração de 0,4 mM (**Figura 30**).

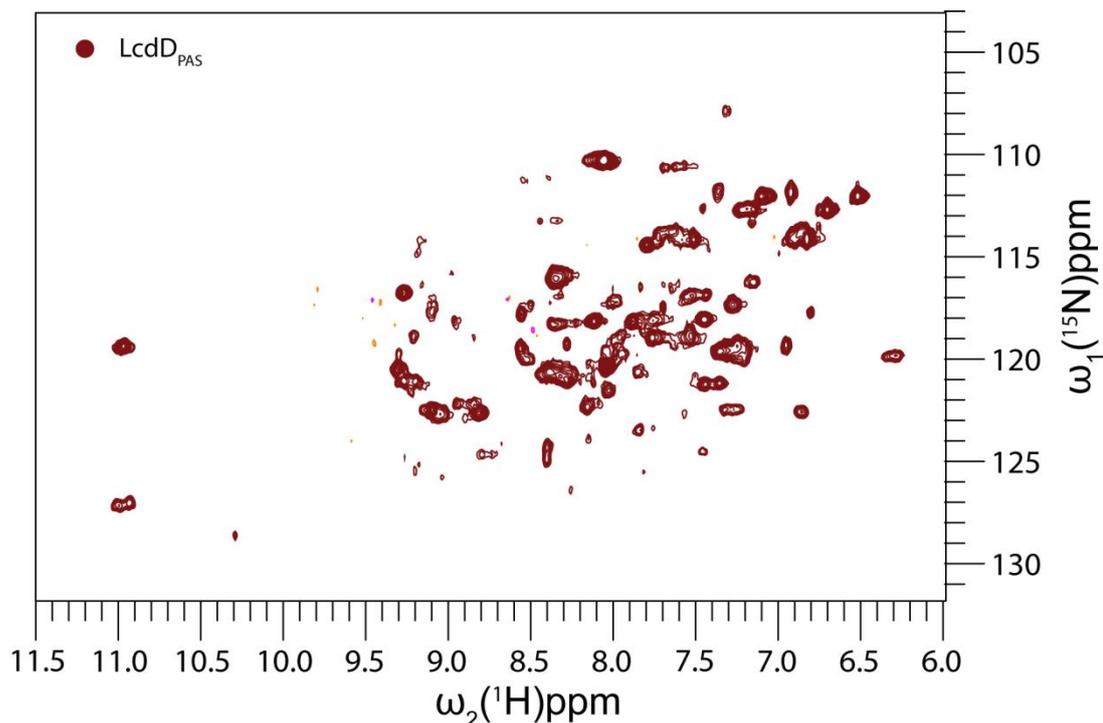


Figura 30 - Espectro de ^1H ^{15}N HSQC da proteína LcdD_{PAS} apo. Neste espectro a proteína aparenta estar pouco estruturada com picos alargados.

Para os experimentos de interação com ligantes foram utilizados a brevianamida F (ciclo L-prolina L-triptofano), prolina e triptofano nas concentrações de 0,4 mM, 0,8 mM, 1,6 mM, 3,2 mM de cada ligante, sendo que essas concentrações correspondem a respectiva relação proteína/ligante: 1:1; 1:2; 1:4; 1:8.

Dentre os ensaios de interação proteína-ligante somente a titulação com brevianamida F apresentou interação com a proteína LcdD_{PAS} (**Figura 31**) sendo que desde o primeiro ponto (concentração proteína ligante 1:1) já foi possível observar uma grande diferença no espectro, tanto com surgimento de novos picos como estreitamento de picos, sendo que houve diferença do espectro entre cada ponto de titulação até atingir o valor de 1:4 (proteína/ligante) de forma que não há diferença entre os espectros 1:4 e 1:8 (proteína/ligante). Dentre as diferenças observada nos espectros entre a forma apo e a complexada com brevianamida F está o deslocamento de pontos correspondentes ao triptofano o qual realiza interação de *π stacking* na estrutura cristalográfica.

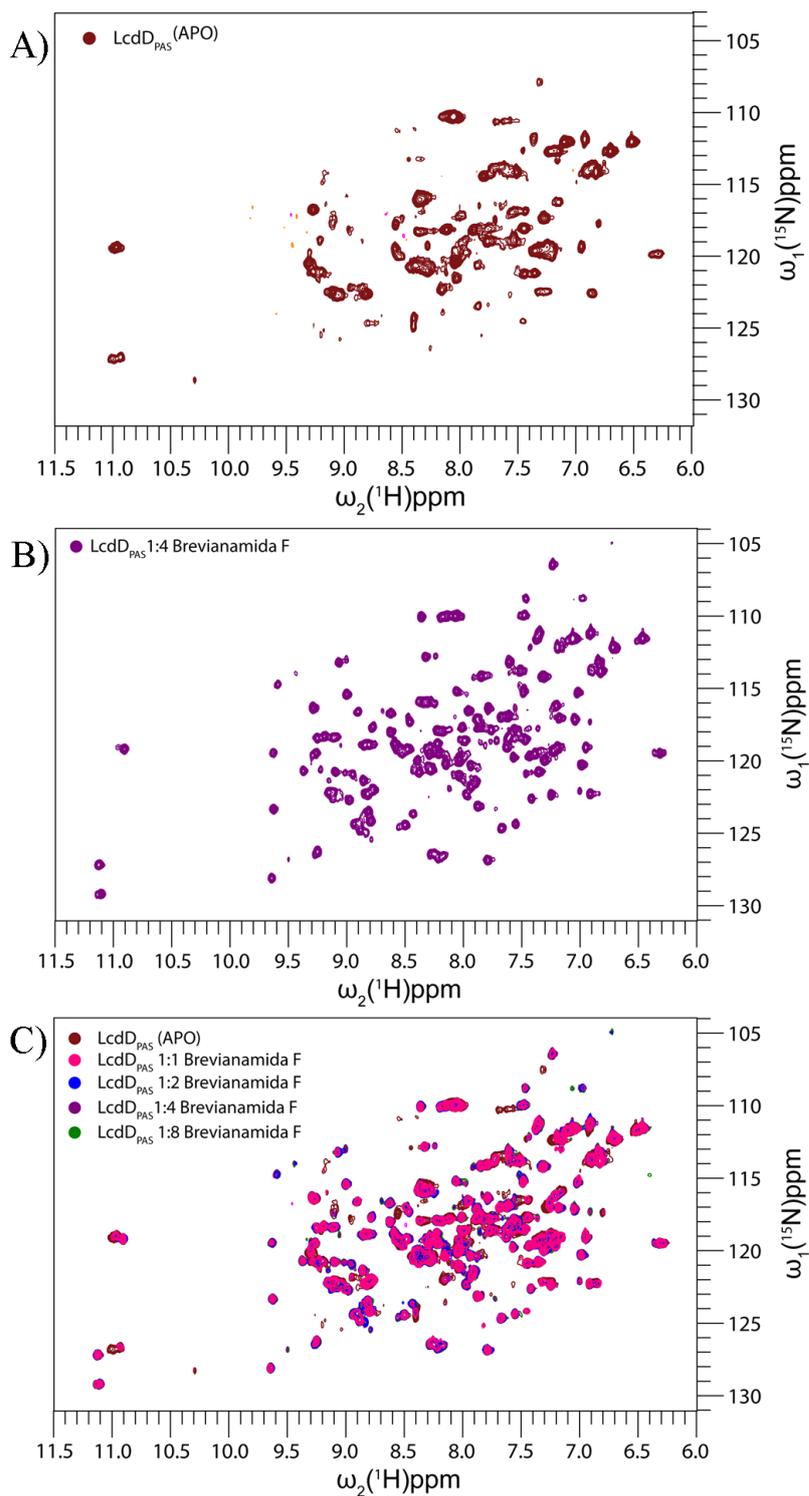


Figura 31 - Espectro de correlação ^1H - ^{15}N HSQC da proteína LcdD_{PAS} frente a diferentes titulações do ligante brevianamida F. Em A) espectro da proteína na forma apo para efeito de comparação. Em B) Espectro da proteína saturada com brevianamida F, é possível observar grandes diferenças entre a forma apo e a ligada com surgimento de diversos pontos, aumento de resolução de cada ponto além de deslocamento de pontos.

O mesmo experimento de titulação também foi feito com prolina e triptofano, nas mesmas concentrações. Porém, nem mesmo na concentração de 1:8 (proteína/ligante) houve qualquer diferença no espectro que indicasse interação entre LcdD_{PAS} e prolina ou triptofano (**Figura 32**). Logo, a interação com brevianamida F é específica de forma que a presença de triptofano no sítio de ligação na estrutura cristalográfica de LcdD_{PAS} apo provavelmente deve-se a um artefato cristalográfico devido a adição de 2 mM de triptofano na condição de cristalização.

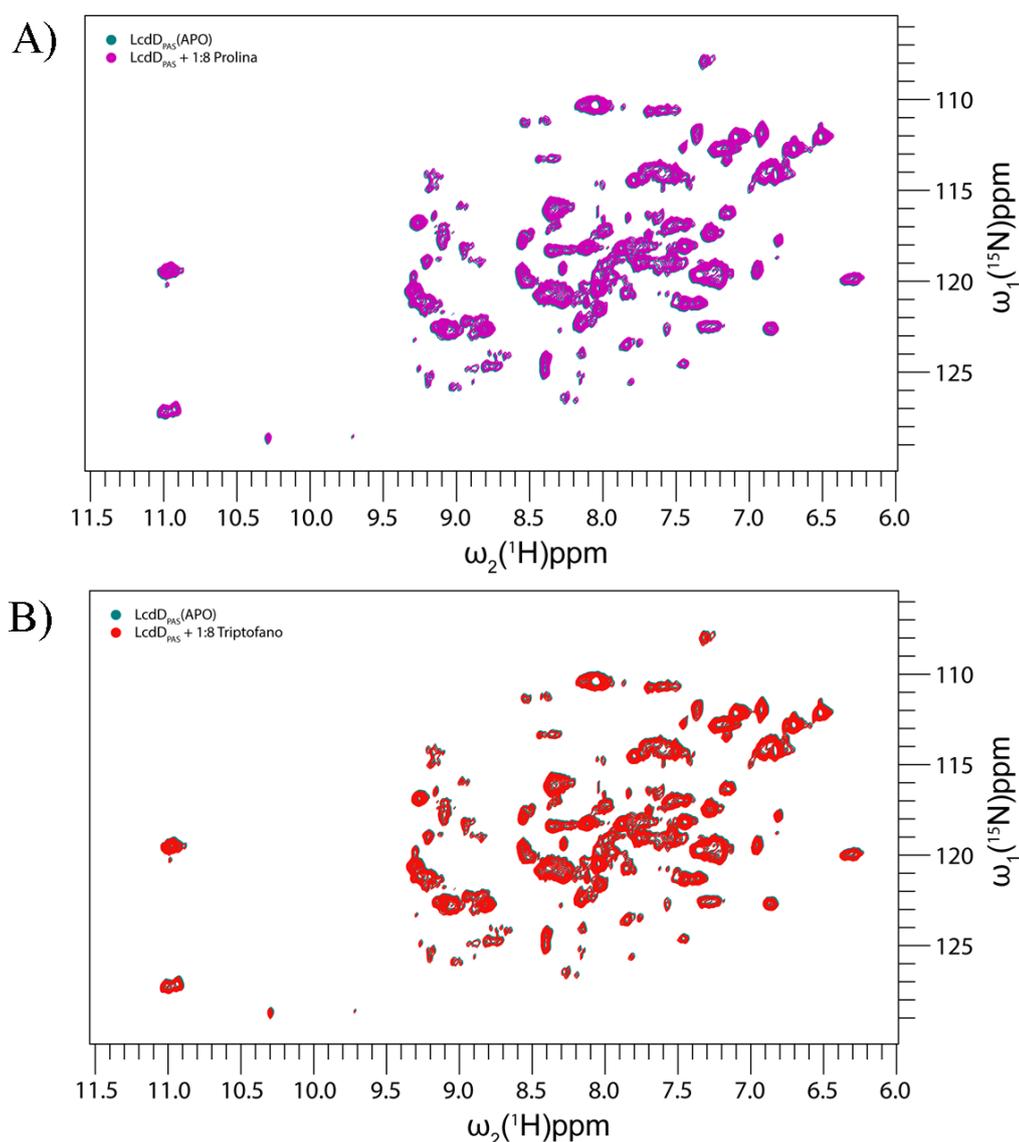


Figura 32 - Sobreposição dos espectros da proteína LcdD_{PAS} apo frente a adição de triptofano e prolina. Em A) sobreposição do espectro apo com o espectro obtido na adição de 3,2 mM de prolina (1:8 proteína/ligante). Em B) sobreposição do espectro apo com o espectro obtido na adição de 3,2 mM de triptofano (1:8 proteína/ligante).

Além disso, também foram realizados experimentos de interação proteína-proteína com LcdD_{PAS} apo marcada com ¹⁵N na concentração de 0,4 mM frente as outras seis proteínas: LcdA_{PAS} (**Figura 33**), LcdB_{PAS} (**Figura 34**), LcdC_{PAS} (**Figura 35**), LcdE_{PAS} (**Figura 36**), LcdF_{PAS} (**Figura 37**) e LcdG_{PAS} (**Figura 38**) todas na mesma concentração de 0,4 mM, ou seja, relação 1:1 proteína/proteína. Neste experimento somente a adição da proteína LcdB_{PAS} gerou alterações importantes no espectro da proteína LcdD_{PAS} marcada com ¹⁵N (**Figura 34**) o que mostra haver interação entre a proteína LcdD_{PAS}(apo) e LcdB_{PAS}.

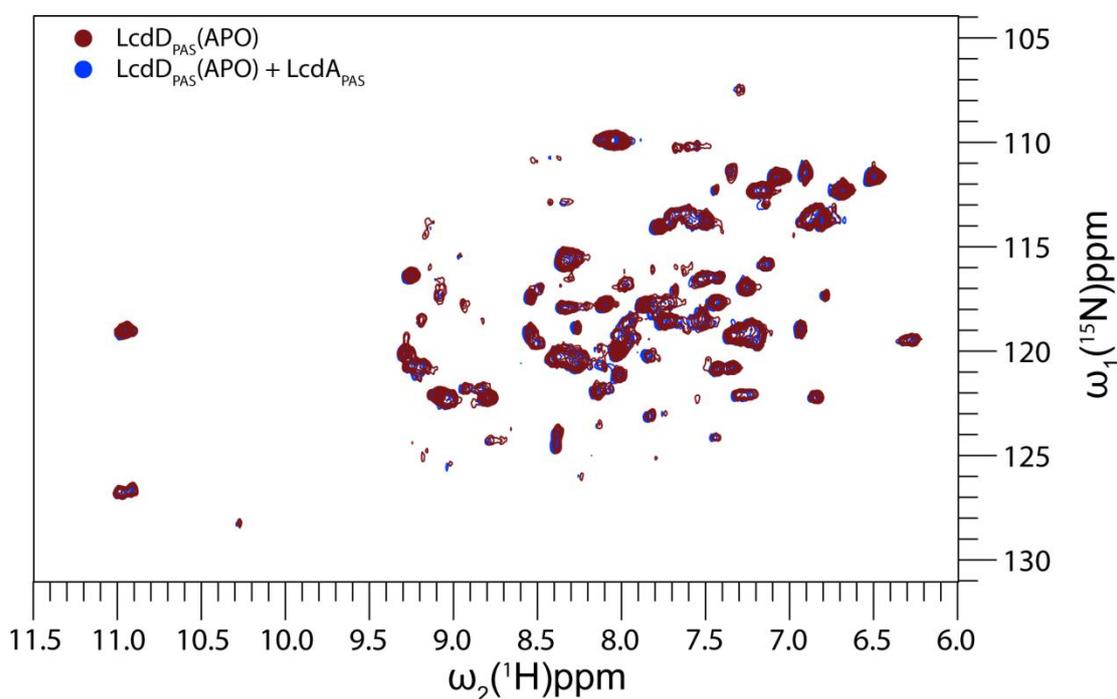


Figura 33 – Sobreposição do espectro de correlação ¹H-¹⁵N HSQC da proteína LcdD_{PAS} apo frente o espectro da proteína LcdD_{PAS} apo com LcdA_{PAS}. Neste experimento não houve alteração do espectro que evidenciasse interação entre essas proteínas nesta condição.

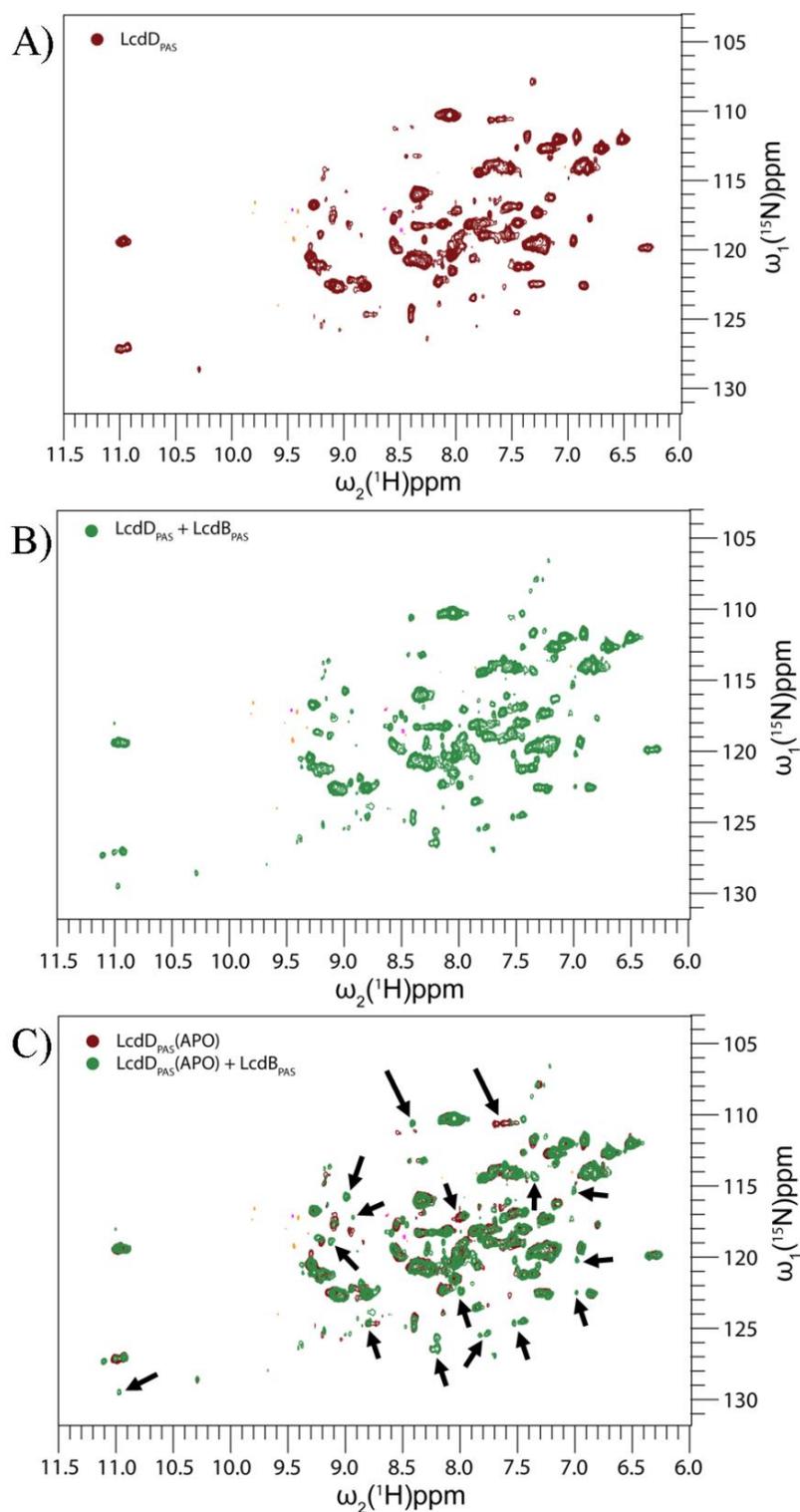


Figura 34 - Comparação do espectro de correlação ^1H - ^{15}N HSQC da proteína LcdD_{PAS} apo frente o espectro da proteína LcdD_{PAS} apo com LcdB_{PAS}. A) Espectro da proteína LcdD_{PAS} apo para efeito de comparação. B) Espectro da proteína LcdD_{PAS} apo com LcdB_{PAS} para efeito de comparação. C) Sobreposição de ambos os espectros, as setas indicam as principais diferenças observadas entre os espectros obtidos o que mostra haver interação entre essas proteínas nesta condição.

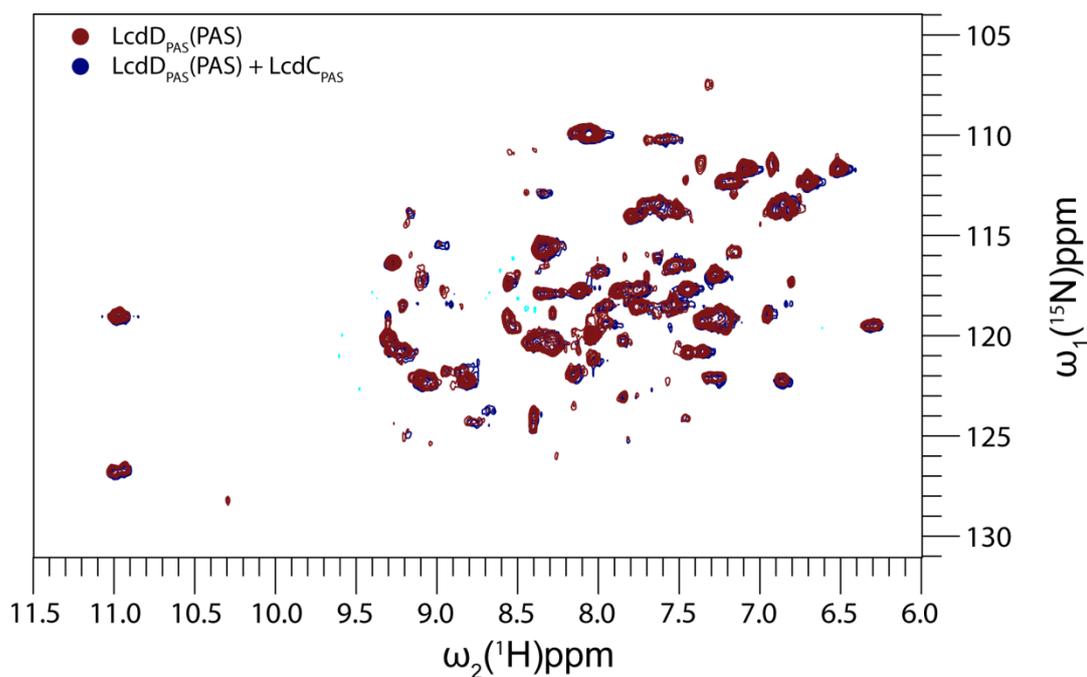


Figura 35 - Sobreposição dos espectros de correlação ^1H - ^{15}N HSQC da proteína LcdD_{PAS} apo frente o espectro da proteína LcdD_{PAS} apo com LcdC_{PAS} . Neste experimento não houve alterações do espectro que evidenciasse interação entre essas proteínas nesta condição.

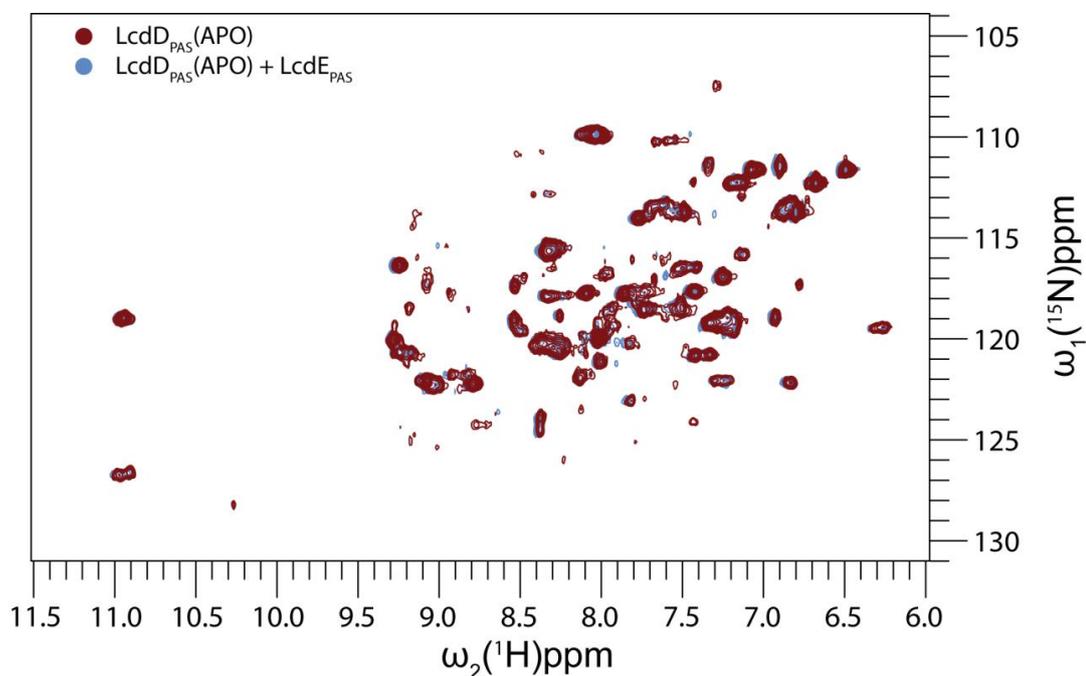


Figura 36 - Sobreposição dos espectros de correlação ^1H - ^{15}N HSQC da proteína LcdD_{PAS} apo frente o espectro da proteína LcdD_{PAS} apo com LcdE_{PAS} . Neste experimento não houve alterações do espectro que evidenciasse interação entre essas proteínas nesta condição.

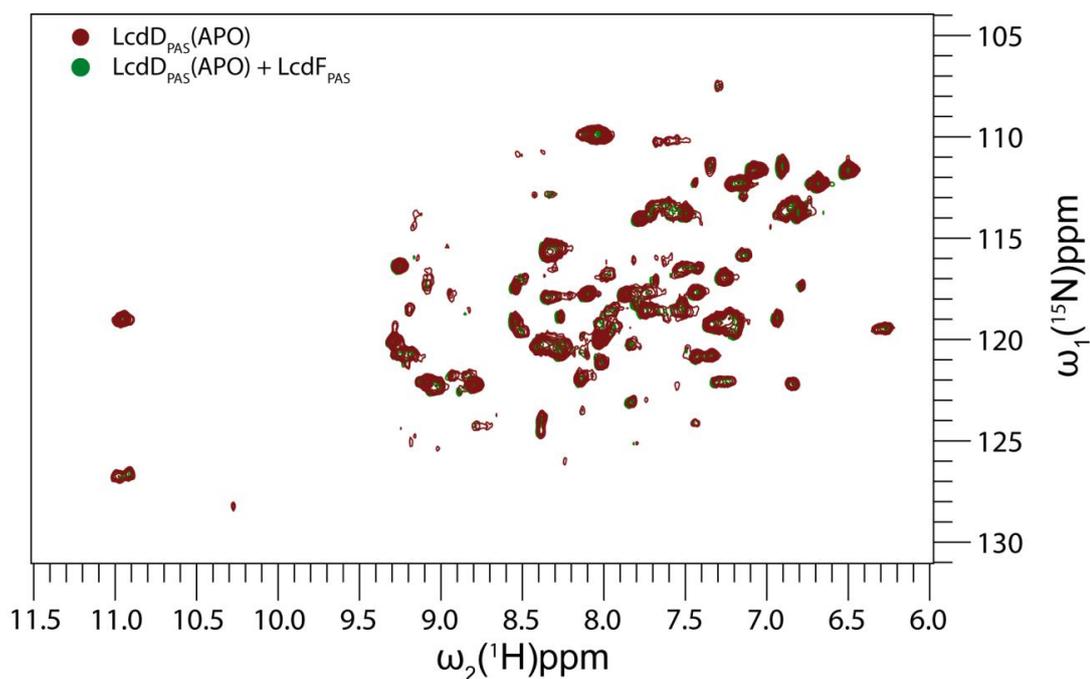


Figura 37 - Sobreposição dos espectros de correlação ^1H - ^{15}N HSQC da proteína LcdD_{PAS} apo frente o espectro da proteína LcdD_{PAS} apo com LcdF_{PAS} . Neste experimento não houve alterações do espectro que evidenciasse interação entre essas proteínas nesta condição.

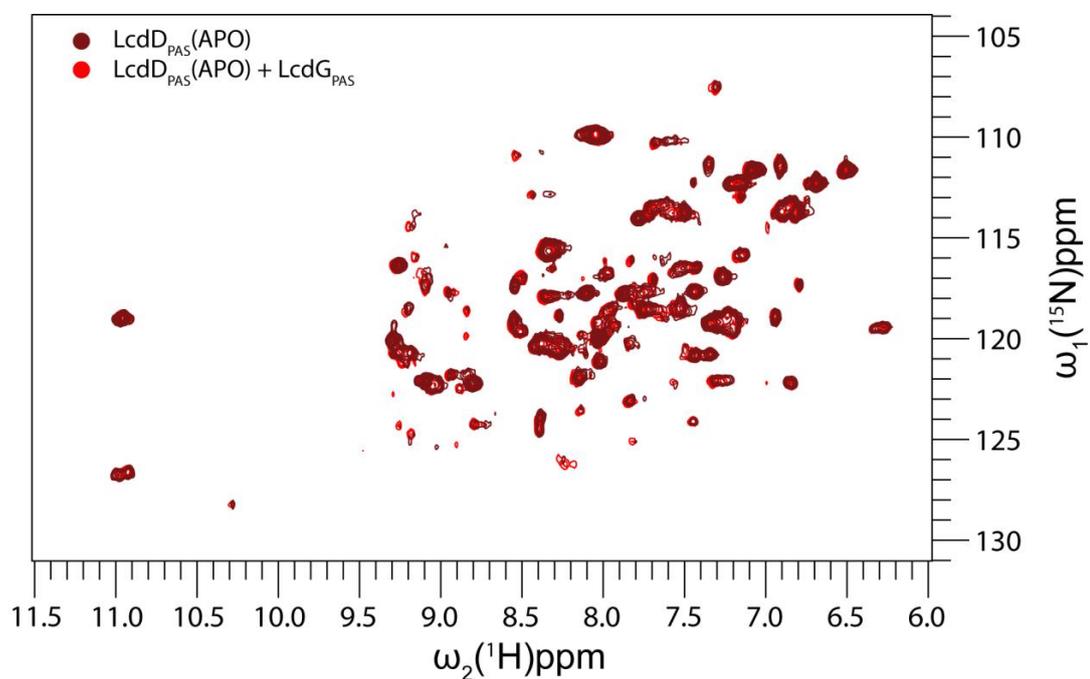


Figura 38 - Sobreposição dos espectros de correlação ^1H - ^{15}N HSQC da proteína LcdD_{PAS} apo frente o espectro da proteína LcdD_{PAS} apo com LcdG_{PAS} . Neste experimento não houve alterações do espectro que evidenciasse interação entre essas proteínas nesta condição.

Após o término dos ensaios de interação proteína-proteína com LcdD_{PAS} apo, foram feitos testes de interação proteína-proteína na presença de brevianamida F na concentração 1:4 (0,4 mM LcdD_{PAS}; 1,6 mM brevianamida F) com o intuito de identificar interação entre proteínas mediada pela presença de brevianamida F. Para tanto, foram utilizadas novamente as proteínas LcdA_{PAS} (**Figura 39**); LcdB_{PAS} (**Figura 40**); LcdC_{PAS} (**Figura 41**); LcdE_{PAS} (**Figura 42**); LcdF_{PAS} (**Figura 43**) e LcdG_{PAS} (**Figura 44**) na concentração de 0,4 mM. Neste experimento foi possível observar que a proteína LcdD_{PAS} na presença de brevianamida F não interage com LcdB_{PAS}, mas sim com a proteína LcdC_{PAS} ou seja, a presença do ligante afeta a interação proteína-proteína.

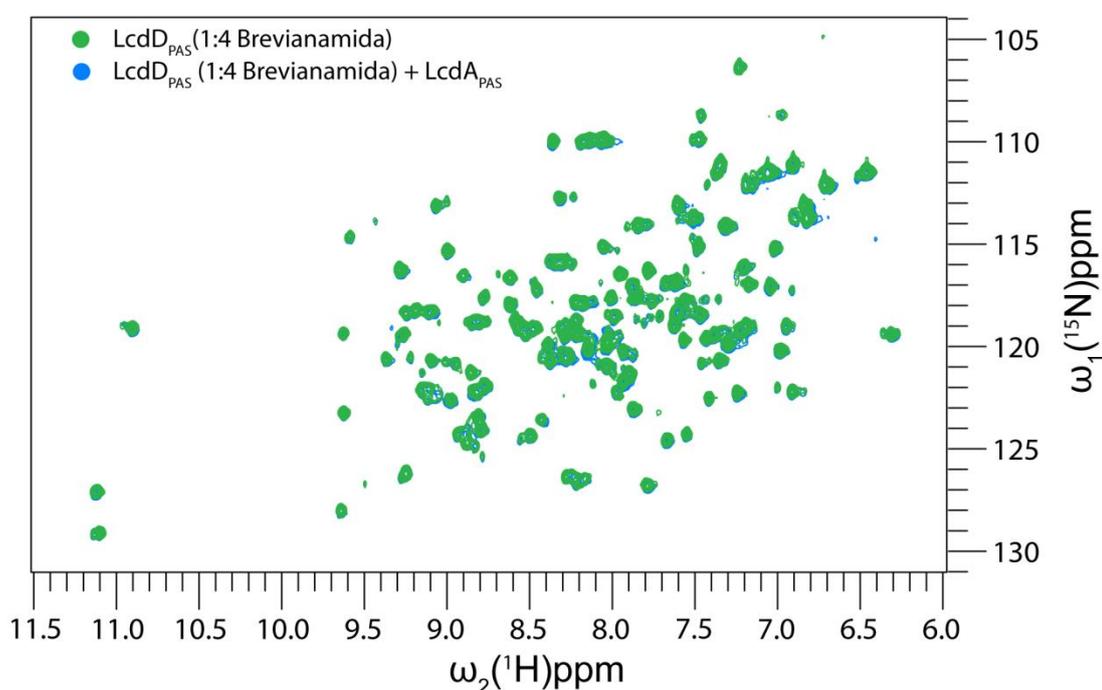


Figura 39 - Sobreposição dos espectros de correlação ^1H - ^{15}N HSQC da proteína LcdD_{PAS} com brevianamida F frente o espectro da proteína LcdD_{PAS} com brevianamida F com LcdA_{PAS}. Neste experimento não houve alterações do espectro que evidenciasse interação entre essas proteínas nesta condição.

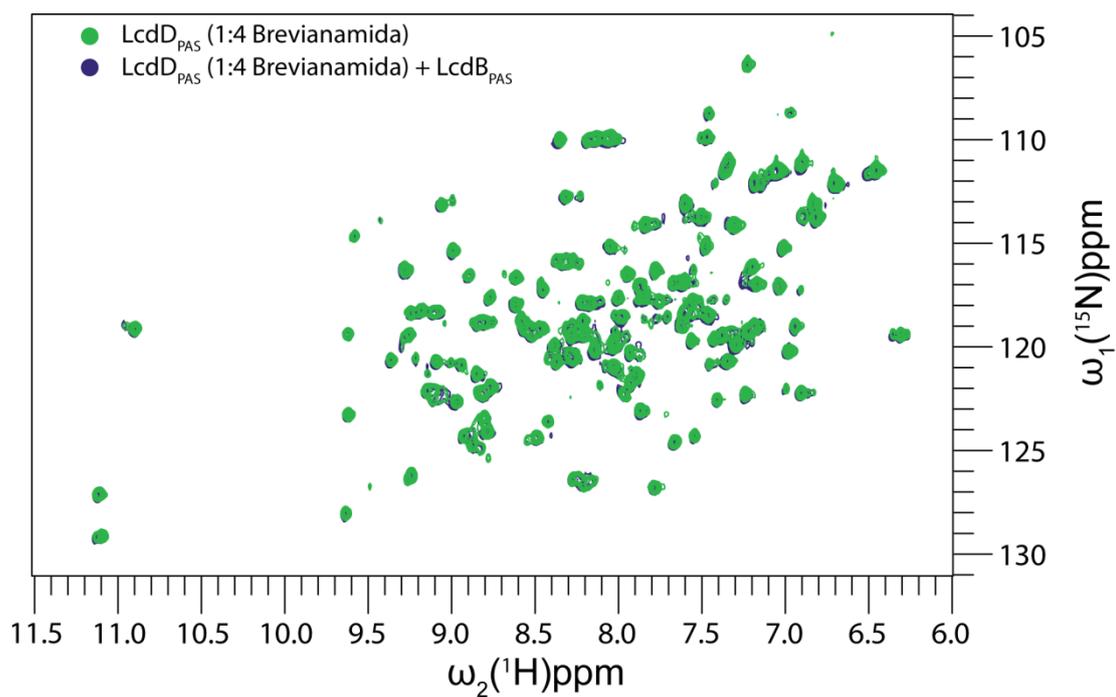


Figura 40 - Sobreposição dos espectros de correlação ^1H - ^{15}N HSQC da proteína LcdD_{PAS} com brevianamida F frente o espectro da proteína LcdD_{PAS} com brevianamida F com LcdB_{PAS}. Neste experimento não houve alterações do espectro que evidenciasse interação entre essas proteínas nesta condição.

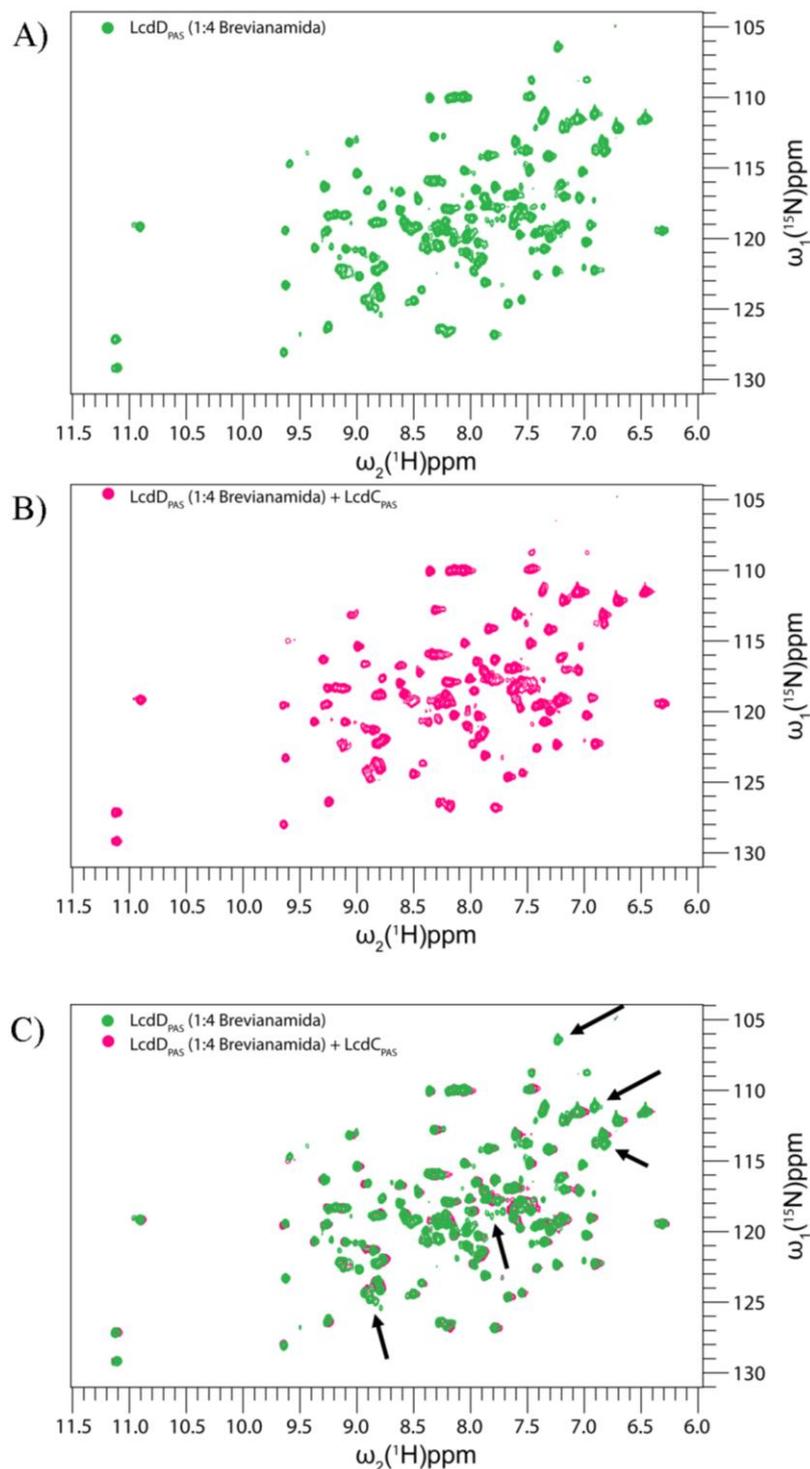


Figura 41 – Comparação do espectro de correlação ^1H - ^{15}N HSQC da proteína LcdD_{PAS} ligada a brevianamida F frente o espectro da proteína LcdD_{PAS} ligada a brevianamida F com LcdC_{PAS} . Em A) espectro da proteína LcdD_{PAS} ligada a brevianamida F para efeito de comparação. Em B) espectro da proteína LcdD_{PAS} ligada a brevianamida F com LcdC_{PAS} para efeito de comparação. Em C) sobreposição de ambos os espectros, as setas indicam as principais diferenças observadas entre os espectros que consistem, principalmente, em desaparecimento de picos o que evidencia interação entre essas proteínas nesta condição.

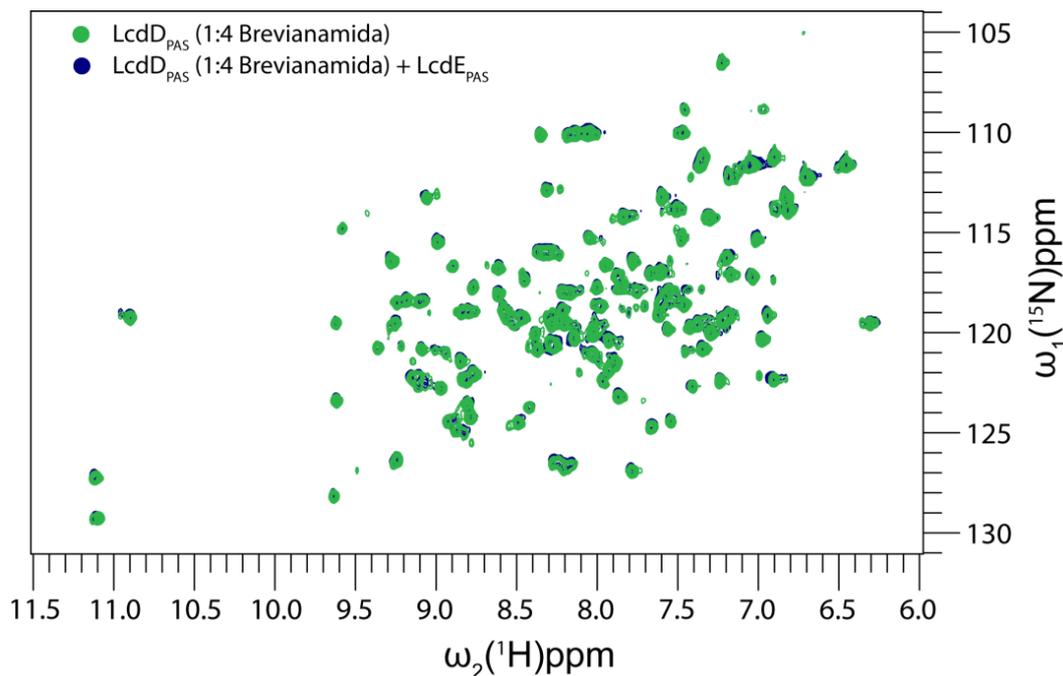


Figura 42 - Sobreposição dos espectros de correlação ^1H - ^{15}N HSQC da proteína LcdD_{PAS} com brevianamida F frente o espectro da proteína LcdD_{PAS} com brevianamida F com LcdE_{PAS}. Neste experimento não houve alterações do espectro que evidenciasse interação entre essas proteínas nesta condição.

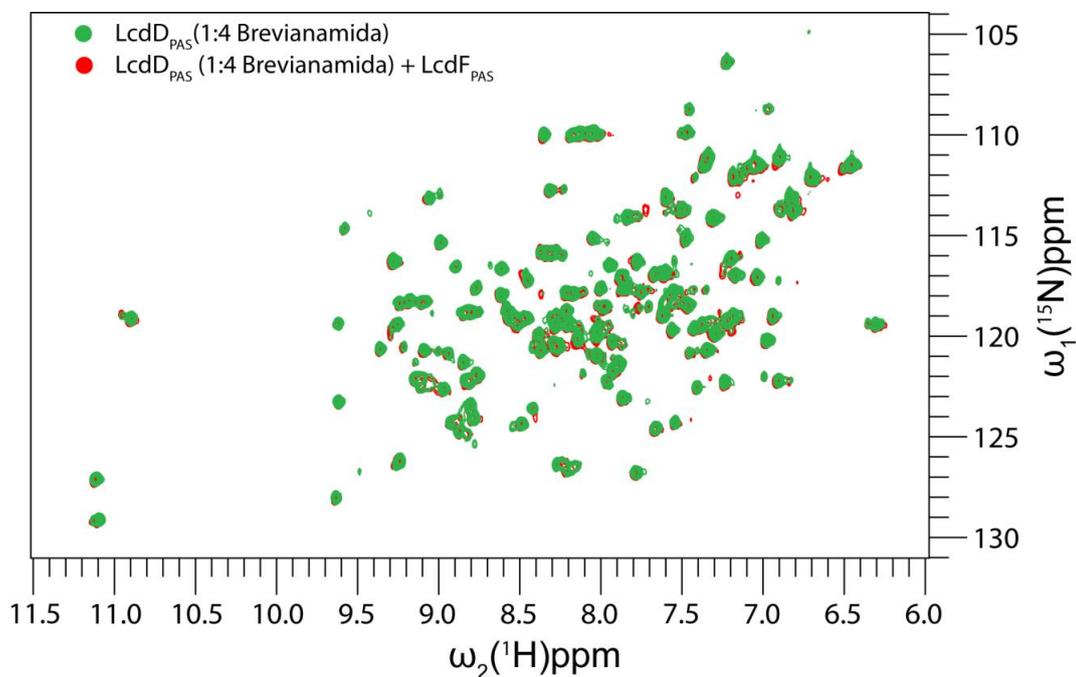


Figura 43 - Sobreposição dos espectros de correlação ^1H - ^{15}N HSQC da proteína LcdD_{PAS} com brevianamida F frente o espectro da proteína LcdD_{PAS} com brevianamida F com LcdF_{PAS}. Neste experimento não houve alterações do espectro que evidenciasse interação entre essas proteínas nesta condição.

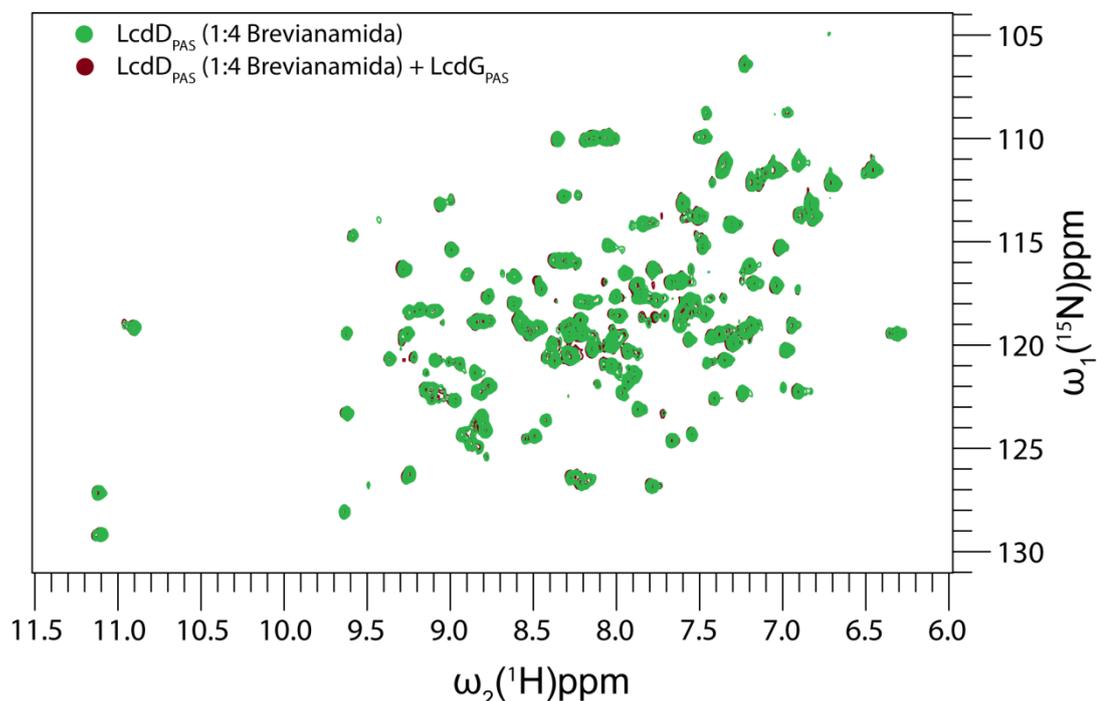


Figura 44 - Sobreposição dos espectros de correlação ^1H - ^{15}N HSQC da proteína LcdD_{PAS} com brevianamida F frente o espectro da proteína LcdD_{PAS} com brevianamida F com LcdG_{PAS} . Neste experimento não houve alterações do espectro que evidenciasse interação entre essas proteínas nesta condição.

4.7 *Ensaio de termoforese em microescala para o cálculo da constante de dissociação de interação proteína-proteína e proteína-ligante*

Após identificação da interação entre LcdD_{PAS} e LcdB_{PAS} na ausência de brevianamida F foi feito ensaios de termoforese em microescala para identificar a a constante de dissociação.

Inicialmente foi determinado a constante de dissociação para formação do homodímero de LcdD_{PAS} . Para tanto, foi feita a marcação da proteína LcdD_{PAS} (com cauda de poli-histidina) conforme descrito nos materiais e métodos (**item 3.10**) e a proteína LcdD_{PAS} sem cauda de poli-histidina (ou seja, sem capacidade de interagir com a sonda e gerar ruído) foi utilizada para titulação. Os dados obtidos foram utilizados para ajuste ao modelo de “curva de saturação de um sítio” no software *Prims* (**Figura 45**). Os experimentos foram feitos em duplicata e o ajuste dos dados geraram um $K_d = 3,3 \pm 0,6 \mu\text{M}$; $B_{\text{MAX}} = 1,06 \pm 0,04$ e $R^2 = 0,9715$. É possível fazer

a inferência sobre o número de sítios de ligação, pois na estrutura cristalográfica LcdD_{PAS} só apresenta um sítio de ligação na região N-terminal da proteína e é possível dizer que a interação observada entre as proteínas LcdD_{PAS} corresponde a dimerização da mesma, pois no **item 4.5** foi descrito a determinação do estado oligomérico dos domínios PAS das sete proteínas estudadas, sendo que a proteína LcdD_{PAS} elui como um equilíbrio monômero/dímero.

Equação para ajuste dos dados:

$$Y = \frac{B_{max} * X}{K_d + X}$$

X = Concentração do ligante

Y = Ligação

B_{max} = Ligação máxima

K_d = Constante de dissociação

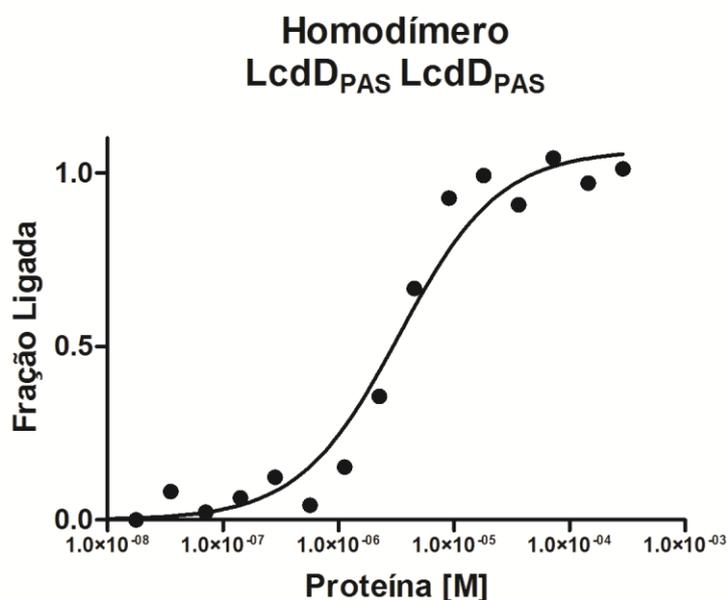


Figura 45 - Interação entre LcdD_{PAS} e LcdD_{PAS} utilizando termoforese em microescala.

Para determinar a afinidade da interação entre LcdD e LcdB na ausência de brevianamida F, vista por RMN, a proteína LcdD_{PAS} (com cauda de poli-histidina) foi

marcada com a sonda “*Monolith Protein Labeling Kit RED-NHS 2nd Generation*” (NanoThemper cat# MO-L011). conforme descrito nos materiais e métodos (**item 3.10**) em seguida foram feitas titulações com LcdB_{PAS} sem cauda de poli-histidina, os dados foram ajustados através do software Prism utilizando “curva de saturação para um sítio” (**Figura 46**). Os experimentos foram feitos em duplicata e o ajuste dos dados gerou um $K_d = 79,2 \pm 0,5 \text{ nM}$; $B_{MAX} = 0,89$ e $R^2 = 0,9827$.

Equação para ajuste dos dados:

$$Y = \frac{B_{max} * X}{K_d + X}$$

X = Concentração do ligante

Y = Ligação

B_{max} = Ligação máxima

K_d = Constante de dissociação

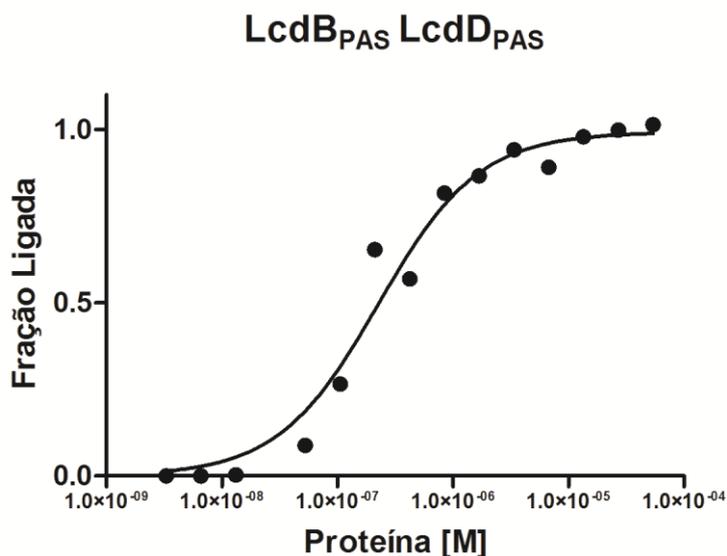


Figura 46 - Interação entre LcdD_{PAS} e LcdB_{PAS} utilizando termoforese em microescala. Neste experimento é possível observar que a interação entre LcdD_{PAS} e LcdB_{PAS} ocorre com alta afinidade.

Logo, a afinidade da proteína LcdD_{PAS} é maior por LcdB_{PAS} do que por ela mesma (LcdD_{PAS}), cerca de cem vezes. Isto indica que *in vivo* não ocorra a formação de homodímero e sim, provavelmente, de hetero dímero. Porém, ainda há necessidade de comprovar a presença de LcdB em *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Além disso, ainda há necessidade de analisar o estado oligomérico da interação entre LcdB e LcdD para confirmação da formação de heterodímero.

Para identificação da afinidade da interação entre LcdD_{PAS} e brevianamida F, via termoforese em microescala, inicialmente a proteína LcdD_{PAS} foi utilizada na concentração de 50 nM para titulação com brevianamida F (**Figura 47**) condição na qual não houve indícios de interação entre brevianamida F e a proteína LcdD_{PAS}. No entanto, como os dados de cristalografia e RMN comprovam interação e sabemos que esta proteína é um dímero em solução e a constante de dimerização havia sido calculada previamente (3,3 +/- 0,6 μM) foi feito um novo experimento aumentando a concentração da proteína (para 5 μM) e mantendo as mesmas concentrações de brevianamida F nos pontos de titulação. Dessa forma, com a proteína em uma concentração que favorece a formação de homodímero foi possível observar interação entre a proteína e brevianamida F (**Figura 47**) sendo que os dados foram ajustados para o modelo “*Specific binding with Hill slope*” utilizando o software Prism:

$$Y = B_{\max} * X^h / K_d^h + X^h$$

Y: Ligação específica

B_{MAX}: Ligação máxima

X: Concentração do ligante

K_d: Constante de dissociação

Ao ajustar os dados neste modelo foi possível obter um K_d de 6 +/- 0,1 μM com N_{Hill} de 1 a 2,4 e R² de 0,9794. Porém, apesar de ser possível ajustar os dados experimentais neste modelo há poucos pontos na região de inflexão da curva e poucos pontos correspondentes a saturação da ligação. Como esta técnica de termoforese em microescala normalmente utiliza pouca concentração de proteína para obtenção dos dados a quantidade de sonda enviada no kit para marcação é

pouca, de forma que inviabiliza utilização de maiores concentrações de proteína marcada em cada ensaio o que torna a técnica pouco conveniente para determinação da afinidade a proteína por brevianamida F, mas é possível dizer que o estado oligomérico afeta a interação da proteína pelo ligante. Para confirmação da afinidade da interação proteína-ligante e informações sobre a cooperatividade do sistema foi feito experimentos de calorimetria de titulação isotérmica (*Isothermal titration calorimetry* – ITC).

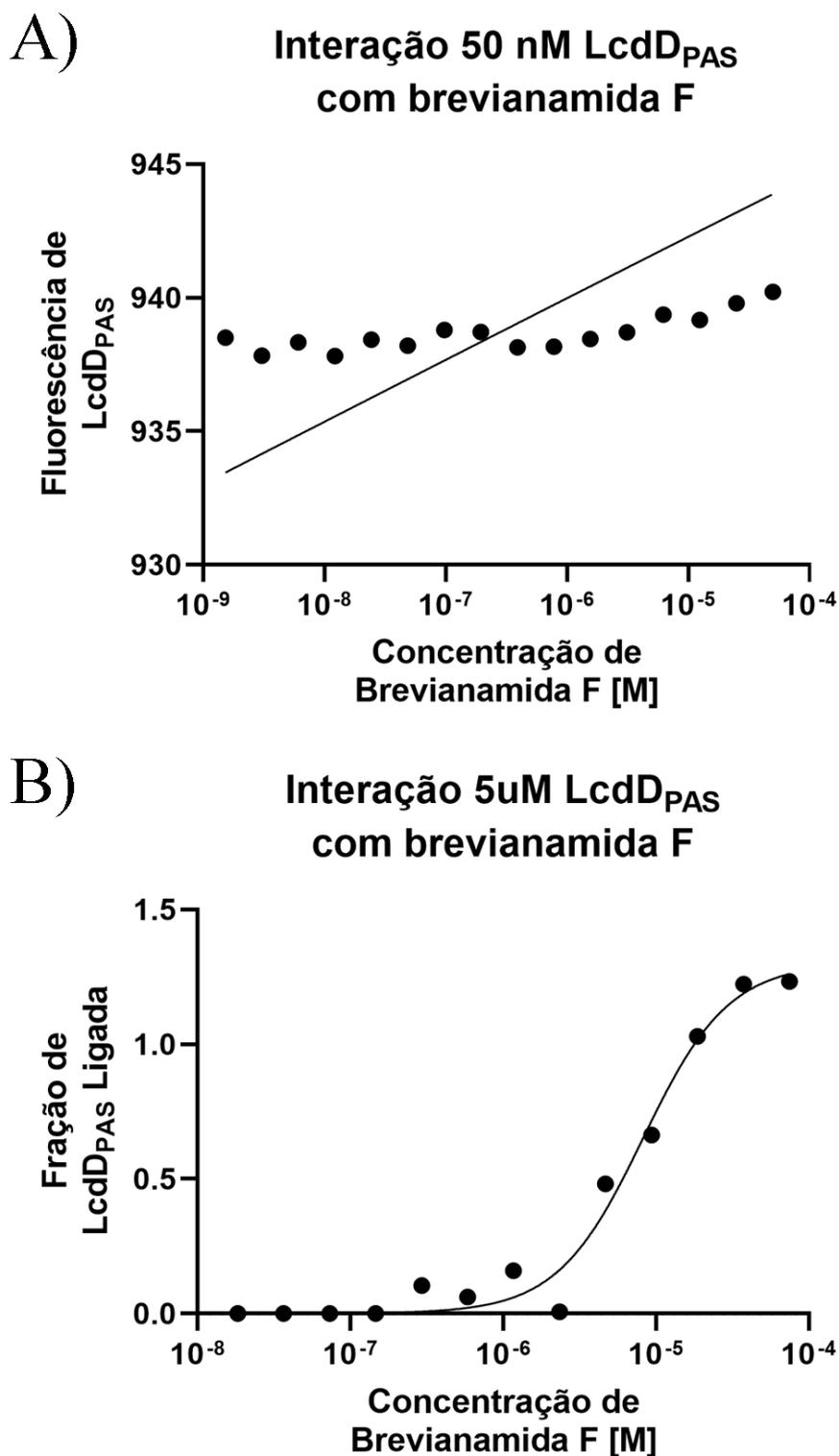


Figura 47 - Interação entre LcdD_{PAS} e brevianamida F utilizando termoforese em microescala. Em A) não ocorre interação entre a proteína e seu ligante. Em B) o aumento da concentração da proteína LcdD_{PAS} gera interação com brevianamida F sugerindo a necessidade de dimerização para interação com o ligante.

4.8 Interação entre LcdD_{PAS} e Brevianamida F por ITC (Isothermal Titration Calorimetry)

Os ensaios de termoforese em microescala não foram conclusivos para entendimento da afinidade de LcdD_{PAS} por brevianamida F, foram feitos experimentos de calorimetria de titulação isotérmica (*Isothermal Titration Calorimetry* – ITC) utilizando a proteína na concentração de 60 μM (acima de sua constante de dissociação para formação de homodímero que é de 3,3 μM) conforme descrito nos materiais e métodos (**Item 3.11**). Os dados foram processados em parceria com o laboratório do Prof. Dr. Roberto Kopke Salinas, pelo pós-doutorando Dr. Jose David Rivera Echeverri, utilizando o programa CalBayS.

Os dados obtidos foram ajustados segundo a equação de Hill (**Figura 48**) (WEISS, 1974) (CARDOSO et al., 2019).

$$\theta = \frac{[L]^n}{[L]^n + K_d}$$

$$\text{Log} \left(\frac{\theta}{1-\theta} \right) = n \text{Log} [L] - \text{Log} K_d$$

θ : Equilíbrio de ligação

L: Concentração do ligante

K_d: Constante de dissociação

n: Número de sítios

O ajuste de dados utilizando a equação de Hill gerou uma constante de dissociação (K_d) de 7,3 +/- 0,6 μM (similar a constante obtida através de termoforese em microescala que foi de 6 +/- 0,1 μM). Além disso, a razão molar obtida está próxima de 0,5 o que significa que há necessidade de duas moléculas de LcdD_{PAS} para haver ligação de uma molécula de brevianamida F, o que novamente corrobora com os dados de termoforese em microescala no qual só há interação proteína-ligante quando a proteína está na condição de dímero. O ajuste dos dados gerou um η_{Hill} é de 1,4 +/-0,02, ou seja, o sistema apresenta cooperatividade .

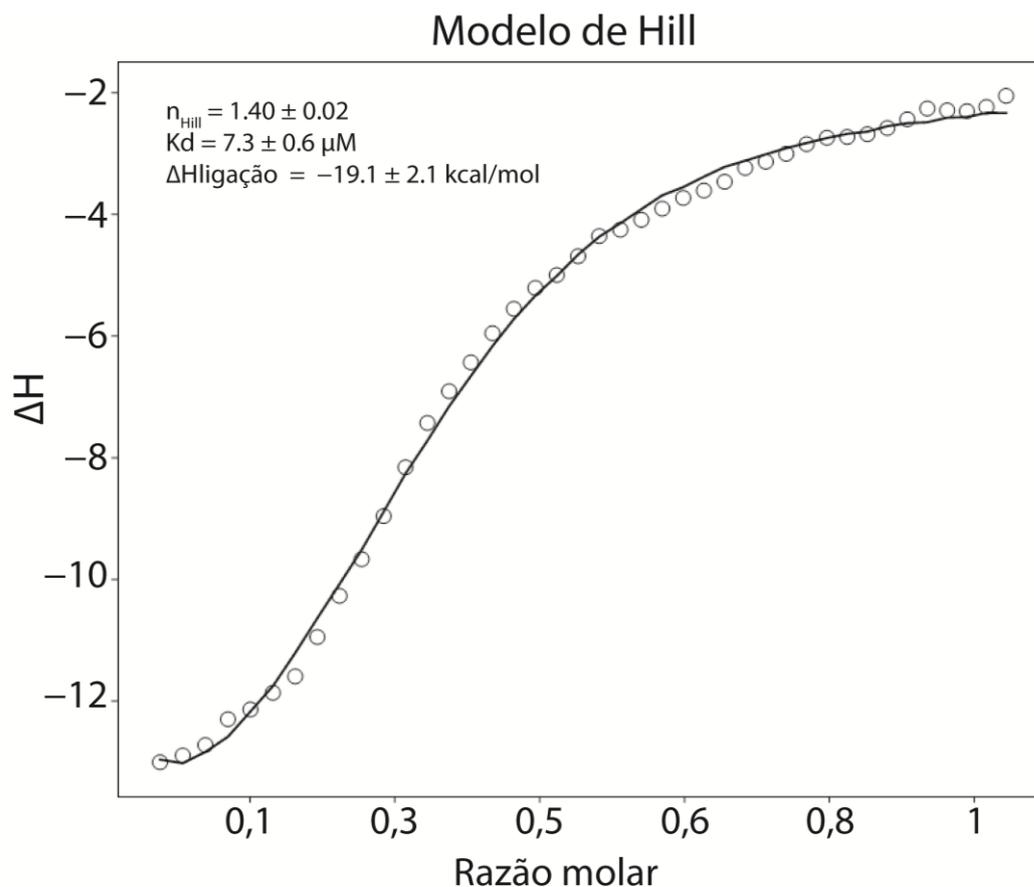


Figura 48 - Ajuste dos dados de ITC de interação de LcdD_{PAS} com brevianamida F utilizando o modelo Hill. Nesta figura é possível observar que a razão (ligante/proteína) é próxima de 0,5, ou seja, há necessidade de duas moléculas de LcdD_{PAS} (dímero) para ligação de uma molécula de brevianamida F.

4.9 Atividade diguanilato ciclase – LcdD

Como LcdD apresenta domínio GGDEF foi feito o ensaio de atividade enzimática seguido de leitura por cromatografia de troca iônica. Para tanto, inicialmente foram aplicados em triplicata os de GTP (100 μM) e c-di-GMP (10 nM) os quais foram aplicados na coluna individualmente para determinação do tempo de retenção destes nucleotídeos.

Em seguida o produto das reações nos tempos de 2 horas e 12 horas (com e sem brevianamida F) foram aplicados na mesma coluna para detecção de atividade enzimática, ou seja, diminuição nos níveis de GTP e produção de c-di-GMP. Ao final do experimento foi possível determinar que a LcdD possui atividade catalítica

conforme predito e o ligante brevianamida F gera alterações na atividade enzimática (Figura 49).

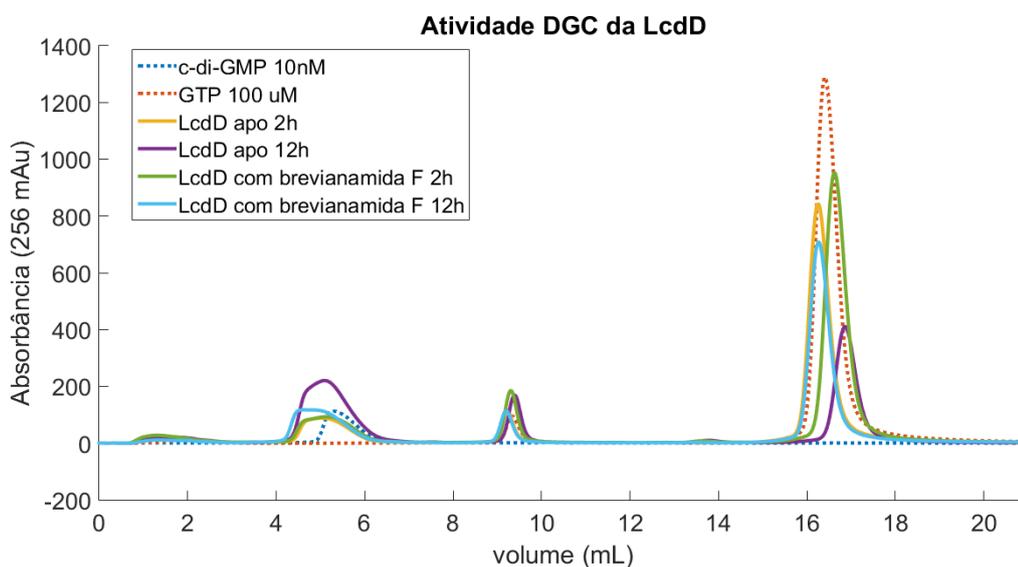


Figura 49 - Análise da atividade enzimática da proteína LcdD por cromatografia de troca iônica. Soluções padrão foram aplicadas para determinação do volume de eluição de c-di-GMP (5,2 mL) e GTP (26,5 mL). O produto das reações com e sem brevianamida F tanto em 2h como em 12h de reação apresenta um pico correspondente a produção de c-di-GMP, porém a forma apo da proteína apresenta maior produção de c-di-GMP e, conseqüentemente, maior consumo de GTP.

4.10 Curva de crescimento de *Leptospira interrogans* sorovar *Copenhageni*

A cepa de *L. interrogans* sorovar *Copenhageni* gentilmente cedida pela Dr^a Josefa Bezerra da Silva (Laboratório de Bacteriologia II – Instituto Butantã) foi cultivada em meio EMJH na ausência e na presença de brevianamida F (100 μ M) em triplicata. Ao final o experimento que perdurou por sete dias, foi possível identificar uma diminuição no nível de crescimento quando a bactéria tratada com brevianamida F frente a não tratada (Figura 50).

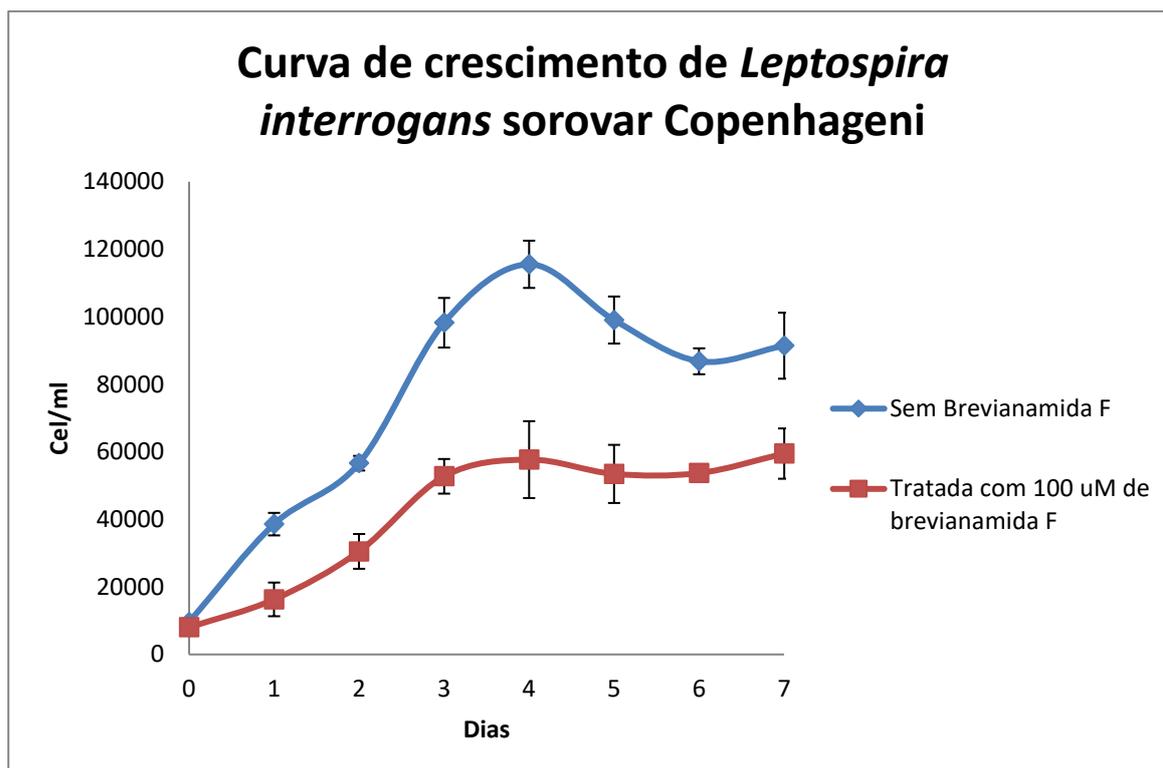


Figura 50 - Curva de crescimento de *L. interrogans* na ausência de na presença de brevianamida F. É notável uma diferença na proliferação celular na presença de brevianamida F frente ao grupo controle (sem adição de brevianamida F), ou seja, a adição deste composto gera uma menor proliferação celular, mas na concentração de 100 μ M de brevianamida F não ocorre morte de todas as células.

4.11 Detecção de LcdD em *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni

Cepas de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (L1-130) foram gentilmente cedidas pela pesquisadora Dr^a Josefa Bezerra da Silva (Laboratório de Bacteriologia II – Instituto Butantã) a qual nos cedeu dois tubos em P1 (primeira passagem em cultura após ser retirada do animal) e pelo pesquisador Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann (Laboratório de Zoonoses Bacterianas – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP) o qual nos forneceu cepas virulentas e não virulentas da mesma bactéria.

As cepas oriundas de ambos pesquisadores foram cultivadas em meio EMJH, ao final 50 mL das passagens em P2 e P3 de cada bactéria foram centrifugados a 5.000 g por 15 min em seguida, cada pellet foi ressuspensionado em buffer de proteína (12% SDS, 6% β mercaptoethanol, 30% glicerol, 0.05% Coomassie blue, 150 mM

Tris/HCl (pH 7.0) na proporção de 1:5; em seguida as amostras foram fervidas por trinta minutos e aplicadas em gel SDS-PAGE (15% acrilamida) para detecção da LcdD via *Western Blotting* conforme descrito nos materiais e métodos (**Item 3.3**) utilizando a diluição de soro na proporção 1:1000; além disso, também foi aplicado 100 μ M de LcdD_{PAS} no mesmo gel SDS-PAGE (15% acrilamida) como controle positivo. Neste teste só foi possível detectar a presença de LcdD_{PAS} (que compõe o N-terminal da LcdD) somente nas cepas cedidas pelo Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann (FMVZ-USP), principalmente nas cepas virulentas tanto em P2 quanto em P3 (**Figura 51**). Desta forma observa-se que há diferenças nos níveis de expressão desta proteína mesmo dentre bactérias da mesma cepa.

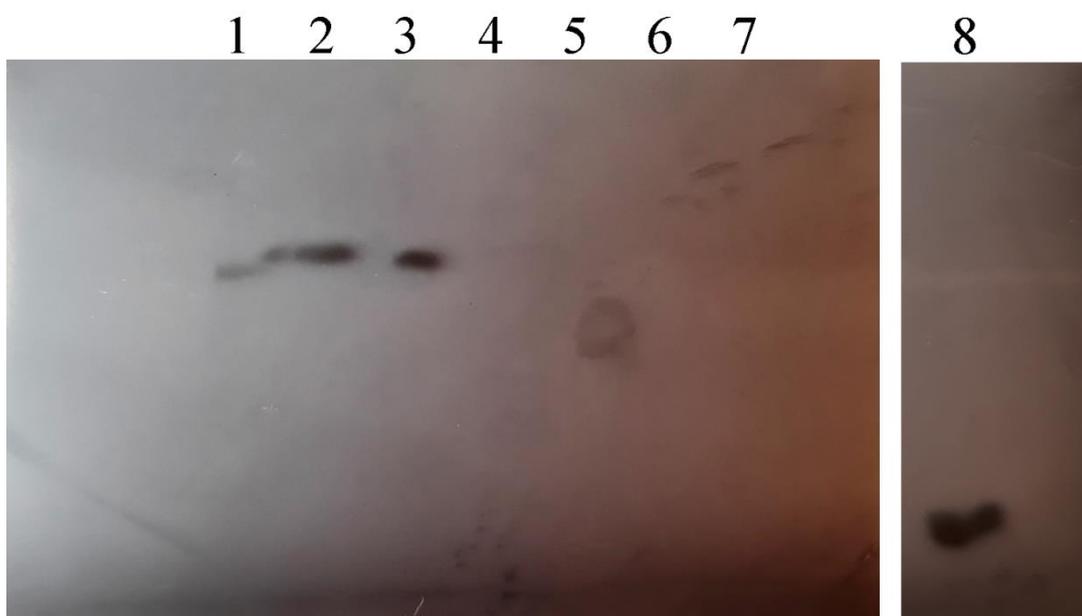


Figura 51 - Detecção da LcdD em *L. interrogans* sorovar Copenhageni via *Western Blotting* utilizando soro anti-LcdD_{PAS}. As amostras foram aplicadas na seguinte ordem: 1 – cepa não virulenta (origem FMVZ); 2 – Cepa virulenta em P2 (origem FMVZ); 3 – Cepa virulenta em P1 (origem FMVZ); 4 – Cepa virulenta em P1 tubo 1 (origem Butantã); 5 – Cepa virulenta em P1 tubo 2 (origem Butantã); 6 – Cepa virulenta em P2 tubo 1 (origem Butantã); 7 – Cepa virulenta em P2 tubo 2 (origem Butantã); 8 – controle positivo contendo 100 μ M de LcdD_{PAS} a qual estava presente na mesma membrana de nitrocelulose, porém o filme radiográfico foi exposto por menos tempo devido à alta intensidade de quimioluminescência proveniente desta banda.

Em seguida, foi utilizada a *L. interrogans* sorovar Copenhageni oriunda da FMVZ/USP em passagem P5 para detecção de expressão da proteína LcdD frente

diferentes tempos de exposição à brevianamida F. Para tanto, foram cultivados quatro tubos de meio EMJH no a um foi adicionado somente 100 μ L de água destilada e deionizada estéril e nos outros três tubos foram adicionados 100 μ L de brevianamida F (concentração final de 100 μ M) sendo que após exposição por 15, 30 e 60 min respectivamente as células foram peletizadas e lisadas utilizando Tampão de Lise Leptospira (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 200 mM NaCl; 2% SDS; 2% triton X-100; 2% tween – 20) e fervidas por 30 min. Em seguida todas as amostras foram centrifugadas a 20.000 g por 1 hora, o pellet foi descartado e o sobrenadante foi utilizado para normalização de proteína total utilizando o *kit Pierce BCA Protein Assay* (Sigma Aldrich # cat 23225). Após a normalização de proteína total as amostras foram aplicadas no gel SDS-PAGE (15% acrilamida), seguido de *Western Blotting* utilizando soro anti-LcdD_{PAS} na diluição de 1:1000 (**Figura 52**).

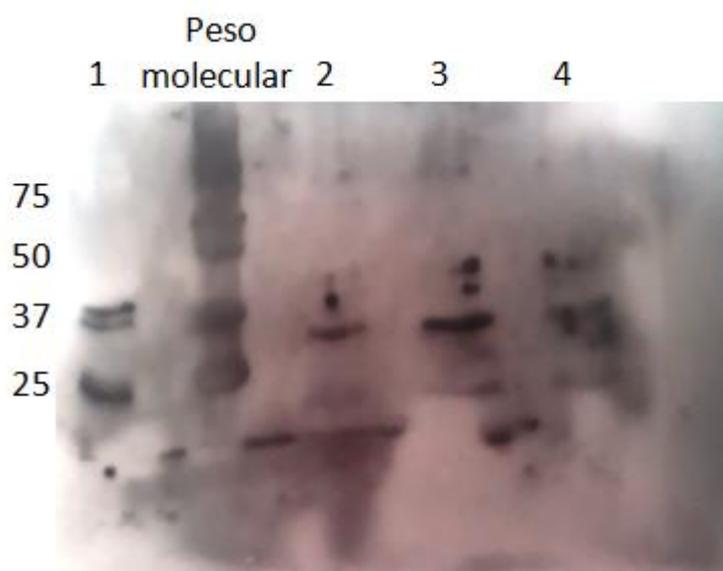


Figura 52 - Western Blotting anti- LcdD_{PAS} em *L. interrogans* frente diferentes tempos de exposição a brevianamida F. As amostras foram aplicadas na seguinte sequência: Em 1- *L.interrogans* na ausência de brevianamida F; em 2 - *L. interrogans* com 15' de exposição à brevianamida F; em 3 - *L. interrogans* com 30' de exposição à brevianamida F; em 4 - *L. interrogans* com 60' de exposição à brevianamida F.

Em ambos os tempos de exposição da *L. interrogans* sorovar Copenhageni à brevianamida F ocorre a expressão da proteína LcdD, futuramente este experimento será repetido. Além disso, também será feito Real Time-PCR para quantificação da

expressão gênica de LcdD e das outras seis proteínas expressas pelo cluster LIC_11125 – LIC_11131 frente diferentes tempos de exposição a brevianamida F.

4.12 Alterações morfológicas de *Leptospira interrogans* sorovar *Copenhageni* na presença de *Brevianamida F*

Foram cultivados dois tubos de 10 mL de meio EMJH contendo *L. interrogans* sorovar *Copenhageni* oriundas do laboratório Dr^a Josefa Bezerra da Silva (Laboratório de Bacteriologia II – Instituto Butantã). Em um tubo foi adicionado 100 µM de brevianamida F e no outro tubo foi adicionado o mesmo volume contendo somente água destilada e deionizada estéril o cultivo foi mantido por 10 dias a 30 °C; em seguida as células foram concentradas por centrifugação e o pellet foi utilizado para montagem dos grids conforme descrito nos materiais e métodos (**Item 3.15**).

As *L. interrogans* sorovar *Copenhageni* oriundas do Instituto Butantã que não expressam a proteína LcdD apresentaram diferenças morfológicas importantes, sobretudo com o alongamento das células e surgimento de bolhas em algumas áreas das células (**Figura 53**).

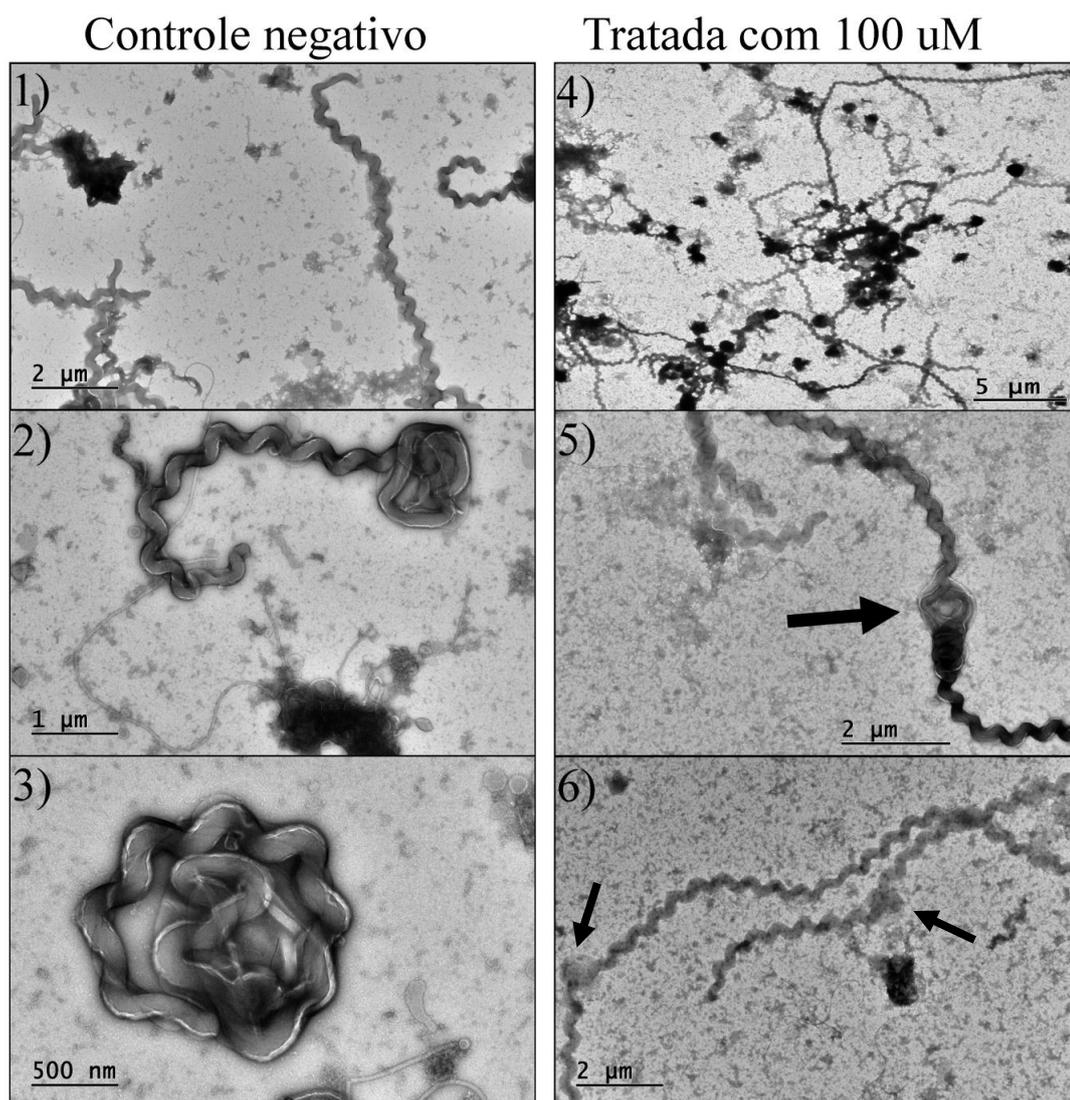


Figura 53 - Imagens obtidas através de microscopia eletrônica de transmissão de *L. interrogans* sorovar *Copenhageni* das cepas que não expressam a proteína LcdD frente a adição de brevipianamida F. As imagens de 1 a 3 correspondem ao crescimento por 10 dias em meio EMJH sem adição de brevipianamida F (controle negativo); as imagens 4, a 6 decorrem dos testes de crescimento com 10 dias de tratamento com brevipianamida F. Em 4) observa-se grande número de células agregadas, mas que possuem tamanho mais alongado quando comparada com o grupo não tratado; em 5) observa-se uma área mais alargada evidenciada pela seta; em 6) as setas apontam outras áreas de alongamento das células.

O mesmo experimento foi realizado com as células provenientes da FMVZ/USP utilizando o meio de cultura EMJH e adicionando 100 μ M de brevipianamida F para tratamento das células, porém o cultivo neste experimento foi mantido apenas por seis dias; em seguida foram feitos grids os quais foram observados por microscopia

eletrônica de transmissão conforme descrito nos materiais e métodos (Item 3.15) (Figura 54). Neste experimento não houve diferenças morfológicas entre o grupo controle e o tratado.

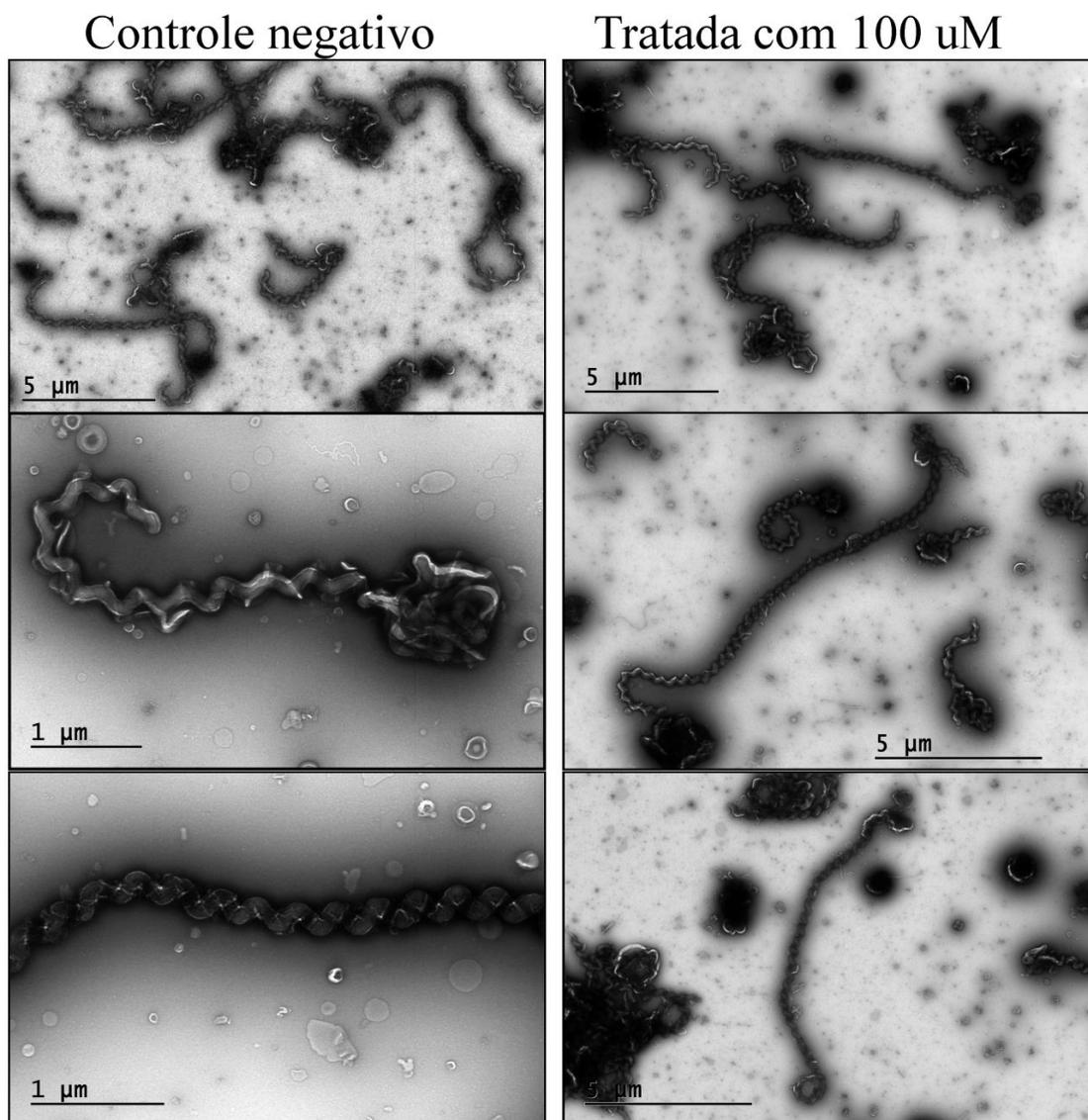


Figura 54 - Imagens obtidas através de microscopia eletrônica de transmissão de *L. interrogans* sorovar *Copenhageni* das cepas que expressam a proteína **LcdD** frente adição de **brevianamida F**. As imagens a esquerda correspondem ao crescimento por 6 dias em meio EMJH sem adição de **brevianamida F**; as imagens a direita correspondem ao mesmo tempo de crescimento com adição de 100 µM de **brevianamida F** ao meio de cultura, nestas imagens não há diferença morfológica entre o grupo tratado e o não tratado.

Como a presença da proteína LcdD aparentemente está envolvida com a resistência de *L. interrogans* à brevianamida F ainda há necessidade de realizar o teste da curva de crescimento de *L. interrogans* sorovar Copenhageni com a bactéria oriunda da FMVZ/USP, visto que ela expressa a proteína de interesse e não há evidências de alterações morfológicas quando adicionado brevianamida F ao meio de cultura (**Figura 54**). Por isso, é possível levantar a hipótese de que a proteína LcdD esteja envolvida com a resistência da bactéria à brevianamida F, toxina produzida por *Aspergillus fumigatus* entre outros fungos que coabitam o mesmo nicho que *L. interrogans*.

5 CONCLUSÃO

O cluster LIC_11125 – LIC_11131 codifica proteínas parálogas que possuem baixa similaridade de sequência primária no sítio N-terminal das proteínas (domínio PAS) e maior similaridade de sequência no sítio C-terminal (domínio catalítico GGDEF). Este grupo de proteínas parálogas estão presentes principalmente em cepas patogênicas da família *Leptospiraceae* sugerindo um possível papel destas proteínas na virulência, patogênese ou adaptação ao hospedeiro.

Devida a complexidade do trabalho foi dado foco ao estudo funcional e estrutural de LcdD a qual foi possível determinar a estrutura cristalográfica e a interação com o ligante brevianamida F. Sendo que a interação foi comprovada tanto por ensaios de cristalização com o ligante como por RMN, ITC e termoforese em microescala. Os ensaios de ITC e termoforese forneceram constantes de dissociação similares em torno de $7,3 \pm 0,6 \mu\text{M}$. A proteína LcdD_{PAS}, assim como os outros domínios PAS estudados neste trabalho, se apresenta no estado oligomérico de dímero, sendo que a constante de dissociação para formação de homodímero é de $3,3 \pm 0,6 \mu\text{M}$. Um fato interessante desta proteína é que mesmo cristalizando a proteína com 2 mM de brevianamida F, só há uma molécula de brevianamida F por dímero de LcdD_{PAS}, somando-se a isso, os ensaios de termoforese em microescala mostraram haver necessidade da dimerização para que ocorra interação entre LcdD_{PAS} e brevianamida F e nos experimentos de ITC a razão molar obtida está próxima de 0,5 o que corrobora com a necessidade de duas moléculas de LcdD_{PAS} para haver ligação de uma molécula de brevianamida F. Ensaio de atividade enzimática mostram que LcdD sintetiza c-di-GMP na ausência e presença de brevianamida F, porém a adição do ligante diminui a atividade enzimática da proteína.

Através de experimentos de interação proteína-proteína por RMN foi possível identificar heterodimerização mediada pelo ligante brevianamida F, sendo que LcdB_{PAS} interage com LcdD_{PAS} na ausência do ligante e após a adição do ligante LcdD_{PAS} passa a interagir com LcdC_{PAS}. A interação entre LcdB_{PAS} e LcdD_{PAS} na ausência de brevianamida F também foi possível ser identificada por termoforese em

microescala e foi possível comprovar que esta interação é mais forte do que a interação para formação de homodímero. Futuramente será determinado o estado oligomérico da interação entre LcdB_{PAS} e LcdD_{PAS} para saber se ocorre formação de heterodímero.

Ensaio funcionais de crescimento bacteriano de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (L1-130) mostraram que quando não há expressão da proteína LcdD a adição de brevianamida F na concentração de 100 μ M gera diminuição da curva de crescimento e alterações morfológicas nas células residuais. Mas quando a bactéria expressa a proteína LcdD as alterações morfológicas não ocorrem, futuramente será feito a curva de crescimento da *L. interrogans* sorovar Copenhageni que expressa a proteína LcdD na presença e ausência de brevianamida F.

Além da estrutura tridimensional de LcdD_{PAS}, também foi possível determinar a estrutura tridimensional de LcdC_{PAS} e LcdG_{PAS}. A estrutura terciária de LcdD_{PAS} é levemente mais divergente em relação aos outros dois domínios PAS sendo as estruturas de LcdC_{PAS} e LcdG_{PAS} mais similares entre si do que com LcdD o que condiz com os dados de filogenia que mostram uma relação evolutiva mais próxima entre LcdC e LcdG. Assim como ocorre com LcdD_{PAS}, todos cristalizaram como dímeros e a proteína LcdC_{PAS} também apresenta apenas uma molécula do ligante por dímero, já a proteína LcdG_{PAS} cristaliza como dímero, mas apresenta um ligante por molécula de proteína, ou seja, dois ligantes por dímero.

Logo, LcdD presente no cluster LIC_11125 – LIC_11131 possui atividade diguanilato ciclase, forma homodímeros e interage com LcdB e LcdC na dependência de brevianamida F, sendo que LcdD_{PAS} liga especificamente brevianamida F que é uma toxina sintetizada por fungos que coabitam o mesmo nicho de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, e quando esta bactéria expressa a proteína LcdD ela não apresenta alterações morfológicas mediante a adição de brevianamida F.

6 REFERÊNCIAS

ADLER, B.; LA PEÑA MOCTEZUMA, A. De. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary microbiology**, v. 140, n. 140, p. 287–296, 2010.

AMEZCUA, C. A.; HARPER, S. M.; RUTTER, J.; GARDNER, K. H. Structure and interactions of PAS Kinase N-terminal PAS domain: Model for intramolecular kinase regulation. **Structure**, v. 10, n. 10, p. 1349–1361, 2002.

BEN AMEUR MEHDI, R.; SHAABAN, K. A.; REBAI, I. K.; SMAOUI, S.; BEJAR, S.; MELLOULI, L. Five naturally bioactive molecules including two rhamnopyranoside derivatives isolated from the *Streptomyces* sp. strain TN58. **Natural Product Research**, v. 23, n. 12, p. 1095–1107, 2009.

BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICARDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **THE LANCET Infectious Diseases**, v. 3, n. December, p. 757–771, 2003.

BIRCH, A. J.; WRIGHT, J. J. The brevianamides: A new class of fungal alkaloid. **Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications**, v. 4, n. 12, p. 644–645, 1969.

BIRD, L. **OPPF-UK Standard Protocols: Cloning and Expression Screening Oxford Protein Production Facility**. [s.l: s.n.].

BOONSILP, S.; THAI PADUNG PANIT, J.; AMORNCHAI, P.; WUTHIEKANUN, V.; BAILEY, M. S.; HOLDEN, M. T. G.; ZHANG, C.; JIANG, X.; KOIZUMI, N.; TAYLOR, K.; GALLOWAY, R.; HOFFMASTER, A. R.; CRAIG, S.; SMYTHE, L. D.; HARTSKEERL, R. A.; DAY, N. P.; CHANTRATITA, N.; FEIL, E. J.; AANENSEN, D. M.; SPRATT, B. G.; PEACOCK, S. J. A Single Multilocus Sequence Typing (MLST) Scheme for Seven Pathogenic *Leptospira* Species. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 1, 2013.

BRITO, T. de; SILVA, A. M. G.; ABREU, P. A. E. Pathology and pathogenesis of human leptospirosis: a commented review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 60, n. January, p. 1–10, 2018.

CARDOSO, M. V. C.; RIVERA, J. D.; VITALE, P. M.; DEGENHARDT, M.; ABIKO, L. A.; OLIVEIRA, C. P.; SALINAS, R. K. An investigation of the CALX-CBD1 Ca²⁺ binding cooperativity using NMR spectroscopy and calorimetry experiments with Bayesian statistics. **Biophysical journal**, n. 7, p. 1–13, 2019.

CARLETON, O.; CHARON, N. W.; ALLENDER, P.; O'BRIEN, S. Helix handedness of *Leptospira interrogans* as determined by scanning electron microscopy. **Journal of Bacteriology**, v. 137, n. 3, p. 1413–1416, 1979.

CASANOVAS-MASSANA, A.; HAMOND, C.; SANTOS, L. A.; DE OLIVEIRA, D.; HACKER, K. P.; BALASSIANO, I.; COSTA, F.; MEDEIROS, M. A.; REIS, M. G.; KO, A. I.; WUNDER, E. A. *Leptospira yasudae* sp. nov. and *Leptospira stimsonii* sp. nov., two new species of the pathogenic group isolated from environmental sources. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2019.

CCZ. Leptospirose no Estado de São Paulo, 2007 a 2011. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 9, n. 107, p. 5–11, 2013.

CHAN, C.; PAUL, R.; SAMORAY, D.; AMIOT, N. C.; GIESE, B.; JENAL, U.; SCHIRMER, T. Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 49, p. 17084–17089, 2004.

CINCO, M. New insights into the pathogenicity of leptospires : **New Microbiologica**, v. 33, p. 283–292, 2010.

GOLDSTEIN, S. F.; CHARON, N. W. Multiple-exposure photographic analysis of a motile spirochete. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 13, p. 4895–4899, 1990.

HENRY, J. T.; CROSSON, S. Ligand-Binding PAS Domains in a Genomic, Cellular, and Structural Context. **Annual Review of Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 261–286, 2011.

HUANG, P.; XIE, F.; REN, B.; WANG, Q.; WANG, J.; WANG, Q.; ABDEL-MAGEED, W. M.; LIU, M.; HAN, J.; OYELEYE, A.; SHEN, J.; SONG, F.; DAI, H.; LIU, X.; ZHANG, L. Anti-MRSA and anti-TB metabolites from marine-derived *Verrucosispora*

sp. MS100047. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 17, p. 7437–7447, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-7406-y>>.

INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, v. 96, n. 1, p. 23–28, 1990.

JERABEK-WILLEMSEN, M.; WIENKEN, C. J.; BRAUN, D.; BAASKE, P.; DUHR, S. Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 9, n. 4, p. 342–353, 2011.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, n. 2, p. 296–326, 2001.

MAIYA, S.; GRUNDMANN, A.; LI, S. M.; TURNER, G. The fumitremorgin gene cluster of *Aspergillus fumigatus*: Identification of a gene encoding brevianamide F synthetase. **ChemBioChem**, v. 7, n. 7, p. 1062–1069, 2006.

MEHROTRA, P.; RAMAKRISHNAN, G.; DHANDAPANI, G.; SRINIVASAN, N.; MADANAN, M. G. Comparison of *Leptospira interrogans* and *Leptospira biflexa* genomes: analysis of potential leptospiral–host interactions. **Molecular BioSystems**, v. 13, p. 883–891, 2017. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2017/mb/c6mb00856a>>.

MÖGLICH, A.; AYERS, R. A.; MOFFAT, K. Structure and Signaling Mechanism of Per-ARNT-Sim Domains. **Structure**, v. 17, n. 10, p. 1282–1294, 2009.

MORI, S.; ABEYGUNAWARDANA, C.; JOHNSON, M. O.; ZUL, P. C. M. Van. Hsqc.Pdf. **Journal os Magnetic Ressonance**, v. 108, n. B, p. 94–98, 1995.

PAUL, R.; ABEL, S.; WASSMANN, P.; BECK, A.; HEERKLOTZ, H.; JENAL, U. Activation of the diguanylate cyclase PleD by phosphorylation-mediated dimerization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 40, p. 29170–29177, 2007.

PDBe & PISA & EMBL-EBI. Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/cgi-bin/piserver>. Acesso em: 29 out. 2018.

RÖMLING, U.; GALPERIN, M. Y.; GOMELSKY, M. Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 1, p. 1 LP – 52, 1 mar. 2013. Disponível em: <<http://mmbbr.asm.org/content/77/1/1.abstract>>.

SCHIRMER, T. C-di-GMP Synthesis: Structural Aspects of Evolution, Catalysis and Regulation. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, n. 19, p. 3683–3701, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2016.07.023>>.

SHI, Y.; MOWERY, R. A.; ASHLEY, J.; HENTZ, M.; RAMIREZ, A. J.; BILGICER, B.; SLUNT-BROWN, H.; BORCHELT, D. R.; SHAW, B. F. Abnormal SDS-PAGE migration of cytosolic proteins can identify domains and mechanisms that control surfactant binding. **Protein Science**, v. 21, n. 8, p. 1197–1209, 2012.

STACKEBRANDT, E.; CHERTKOV, O.; LAPIDUS, A.; NOLAN, M.; LUCAS, S.; HAMMON, N.; DESHPANDE, S.; CHENG, J. F.; TAPIA, R.; GOODWIN, L. A.; PITLUCK, S.; LIOLIOS, K.; PAGANI, I.; IVANOVA, N.; MAVROMATIS, K.; MIKHAILOVA, N.; HUNTEMANN, M.; PATI, A.; CHEN, A.; PALANIAPPAN, K.; LAND, M.; PAN, C.; ROHDE, M.; GRONOW, S.; GÖKER, M.; DETTER, J. C.; BRISTOW, J.; EISEN, J. A.; MARKOWITZ, V.; HUGENHOLTZ, P.; WOYKE, T.; KYRPIDES, N. C.; KLENK, H. P. Genome sequence of the free-living aerobic spirochete *Turneriella parva* type strain (HT), and emendation of the species *Turneriella parva*. **Standards in Genomic Sciences**, v. 8, n. 2, p. 228–238, 2013.

VINCENT, A. T.; SCHIETTEKATTE, O.; GOARANT, C.; NEELA, V. K.; BERNET, E.; THIBEAUX, R.; ISMAIL, N.; KHALID, M. K. N. M.; AMRAN, F.; MASUZAWA, T.; NAKAO, R.; KORBA, A. A.; BOURHY, P.; VEYRIER, F. J.; PICARDEAU, M. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 5, 2019.

WEISS, J. N. The Hill equation revisited: uses and misuses. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, p. 835–841, 1974.