

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

PAMELA IBETH HUANAMBAL ESQUÉN

Estudo da glicosiltransferase LafB de *Enterococcus faecium* envolvida na
supersensibilidade à daptomicina

SÃO CARLOS
2022

PAMELA IBETH HUANAMBAL ESQUÉN

Estudo da glicosiltransferase LafB de *Enterococcus faecium* envolvida na supersensibilidade à daptomicina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Física Biomolecular
Orientador: Prof.^a Dr.^a. Ilana L. B. C. Camargo
Co-orientador: Prof. Dr. João Renato Carvalho Muniz

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

São Carlos
2022

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

Esquén, Pamela Ibeth Huanambal

Estudo da glicosiltransferase LafB de *Enterococcus faecium* envolvida na supersensibilidade à daptomicina / Pamela Ibeth Huanambal Esquén; orientadora Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo; co-orientador João Renato Carvalho Muniz - versão corrigida -- São Carlos, 2022.
98 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2022.

1. Glicosiltransferase LafB. 2. *Enterococcus faecium*.
3. Hipersensibilidade à daptomicina. I. Camargo, Ilana Lopes Baratella da Cunha, orient. II. Muniz, João Renato Carvalho, co-orient. III. Título.

A Deus, por ser minha fortaleza em todo momento.

Aos meus pais e irmã, pelo amor incondicional ao longo da minha vida e pelo
seu sacrifício que me fez chegar até aqui.

A minhas tias, Blanca, Aída, Yola, Bety e Elsa, por sempre serem como mães
na minha vida e na minha formação acadêmica.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Ilana L. B. C. Camargo, pela confiança, ajuda, discussões e ótima orientação que foram essenciais para levar a cabo esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Joao Renato C. Muniz, pela disposição e discussões durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos doutores, Jacqueline Abranches, Jessica Kajfasz e José A. Lemos, por sua contribuição neste trabalho com os experimentos de virulência *in-vivo*.

Ao PhD. Diego L. Cabrejos, pela orientação durante os experimentos para o estudo da proteína e o análise *in-silico*.

Ao técnico Dr. Humberto Pereira, pela ajuda com o software AlphaFold para a predição da proteína.

Às técnicas MSc. Andressa A. Pinto e Dra. Susana A. Sculaccio pelos ensinamentos e discussões construtivas sobre a purificação da proteína.

Aos membros do Grupo de Biofísica e Biologia Estrutural - Prof. Sérgio Mascarenhas pelo companheirismo, discussões e críticas construtivas que ajudaram ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros do LEMiMo, em especial a Camila, Gabriela, Livia, Luciana e Leticia, pela parceria, apoio nos experimentos e discussões que enriqueceram o desenvolvimento deste trabalho. Além disso, pelas risadas, choros e amizade dentro e fora do laboratório.

Ao Instituto de Física de São Carlos e a Universidade de São Paulo, pela oportunidade para a realização deste projeto de pesquisa de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado que fez possível a realização do curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e o Centro de Pesquisa e Inovação em Biodiversidade e Fármacos (CIBFar) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Aos meus amigos Stefany, Diego, Jhon, Eloy, Marco, Genoveva, Ricky, e meus pequenos Emma, Isaac e Gui, por serem minha família em São Carlos durante esses anos de mestrado e pandemia.

A minhas avós e toda minha família por serem minha motivação, e por estarem sempre presentes e pendentes de meu bem-estar.

Ao William, por todo o amor, apoio incondicional e confiança que me sustentaram nos momentos mais difíceis deste desafio longe do meu país.

A minhas amigas Carla e Carolina que a pesar da distância, estiveram sempre presentes no meu dia a dia e fizeram a vida mais leve.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho. Muito obrigada.

“O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos dia após dia.”

Robert Collier

RESUMO

ESQUÉN, P. I. H. **Estudo da glicosiltransferase LafB de *Enterococcus faecium* envolvida na supersensibilidade à daptomicina.** 2022. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

Devido a crescente onda de resistência bacteriana a nível global, a Organização Mundial da Saúde classificou grupos de bactérias multidroga resistentes quanto à prioridade para a pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos, dentre os quais *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina (VRE) se encontra classificado como alta prioridade. Entre as opções terapêuticas de último recurso para combater infecções causadas por VRE está daptomicina (DAP), no entanto, a resistência a este antibiótico em VRE já foi relatada. Recentemente, pesquisadores do IFSC-USP detectaram que uma mutação no gene *lafB* de *E. faecium* causou hipersensibilidade a DAP. O gene *lafB* codifica a glicosiltransferase LafB, envolvida na via de formação da âncora do ácido lipoteicóico (LTA), que também está presente em outras bactérias gram-positivas como *Listeria monocytogenes* e *Enterococcus faecalis*. Deste modo, este trabalho procurou verificar o papel da mutação do gene *lafB* no fenótipo bacteriano, caracterizar biofisicamente a proteína, e estudar *in-silico* uma predição da estrutura tridimensional da LafB, pois é um alvo promissor para aumentar a atividade da DAP em bactérias gram-positivas. Para isso, foi feita uma comparação entre as linhagens de HBSJRP 18_2.1 (supersensível a DAP) e HBSJRP 18_2.7 (sensibilidade normal a DAP) acerca do crescimento bacteriano, perfil metabólico, capacidade de formação de biofilme e virulência *in-vivo* em modelo de *Galleria mellonella*. A mutação em *lafB* causou uma significativa queda no crescimento bacteriano e virulência da linhagem supersensível, porém, não apresentou diferença significativa na capacidade de formação de biofilme, nem nas condições metabólicas analisadas. Concomitantemente, foi feita a clonagem, expressão e purificação por cromatografia de afinidade e de exclusão molecular da proteína LafB nativa e mutada. Ao contrário da LafB nativa, a proteína mutada é insolúvel nos passos de purificação nas mesmas condições de tampão e temperatura. Com amostras purificadas da proteína LafB nativa, se realizaram ensaios de dicroísmo circular e SEC-MALS. Sob condições *in-vitro*, LafB é monomérica, possui uma massa molecular de 41.76 kDa, temperatura de Melting de 37 °C, e possui estruturas secundárias α -helicoidais. Para a análise *in-silico*, a estrutura tridimensional da proteína foi predita usando o software AlphaFold, adicionalmente, foi feito um acoplamento entre a estrutura predita da proteína e o ligante hipotético UDP-galactose. Os resultados sugerem que estruturalmente a LafB pertence às glicosiltransferases da família GT-

B, e que devido ao fato de a mutação estar próxima ao suposto sítio catalítico, é provável que as mudanças nas interações que ocorrem entre os aminoácidos da proteína e ligante, sejam a causa das mudanças observadas no fenótipo da linhagem mutada. No futuro, testes com diferentes condições de purificação serão feitos para estabilizar e cristalizar a proteína para resolver sua estrutura tridimensional, a fim de entender mais a fundo o papel da proteína LafB na sensibilidade a daptomicina.

Palavras-chave: Glicosiltransferase LafB. *Enterococcus faecium*. Hipersensibilidade à daptomicina.

ABSTRACT

ESQUÉN, P. I. H. **Study of LafB glycosyltransferase from *Enterococcus faecium* involved in daptomycin supersensitivity.** 2022. 98 p. Dissertation (Master in Science) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

Given the globally rising wave of bacterial resistance, the World Health Organization has classified groups of multidrug-resistant bacteria as a priority to research and develop new antibiotics, including vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) classified as a high priority microorganism. Among the therapeutic options of last resort to combat infections caused by VRE is daptomycin (DAP). However, the DAP resistance in VRE has already been reported. Recently, researchers at IFSC-USP detected that a mutation in the *E. faecium* *lafB* gene caused hypersusceptibility to DAP. The *lafB* gene encodes the LafB glycosyltransferase, involved in the lipoteichoic acid (LTA) anchor synthesis pathway, which is also present in other Gram-positive bacteria, such as *Listeria monocytogenes* and *Enterococcus faecalis*. Therefore, this work aimed to verify the *lafB* gene mutation role in the bacterial phenotype, characterize the LafB protein biophysically, and study *in-silico* a prediction of the three-dimensional structure of LafB, because it is a promising target to increase the DAP activity in Gram-positive bacteria. For this purpose, a comparison between HBSJRP 18_2.1 (supersensitive to DAP) and HBSJRP 18_2.7 (normal sensitivity to DAP) strains was performed by observing bacterial growth and metabolite profile, biofilm-forming ability, and *in-vivo* virulence in a *Galleria mellonella* model. The mutation caused a significant decrease in bacterial growth and virulence of the supersensitive strain, but the strains showed no significant differences in biofilm-forming ability nor marked differences in the metabolic profile analyzed. Concurrently, the *lafB* gene was cloned, expressed, and LafB was purified by affinity chromatography and molecular exclusion chromatography. Unlike the native LafB, the mutated protein is insoluble under the same buffer and temperature conditions during the purification steps. Circular dichroism and SEC-MALS assays were performed with purified native LafB protein. Under *in-vitro* conditions, LafB is monomeric, has a molecular mass of 41.76 kDa, melting temperature of 37 °C, and α -helicoidal secondary structures. For the *in-silico* analysis, the protein's three-dimensional structure was predicted using AlphaFold software. Additionally, a coupling between the protein predicted structure and UDP-galactose, as a hypothetical ligand, was performed. The results suggest that structurally LafB would belong to the GT-B family of glycosyltransferases. Because the mutation is close to the putative catalytic site, changes in the protein amino acids and the ligand interactions are likely

the causes of the changes observed in the phenotype of the mutated strain. In the future, tests with different purification conditions will be performed to stabilize and crystallize the protein to resolve its three-dimensional structure to understand further the LafB protein's role in daptomycin susceptibility.

Keywords: Glycosyltransferase LafB. *Enterococcus faecium*. Daptomycin hypersusceptibility

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da estrutura da parede celular de bactérias gram-positivas.....	24
Figura 2 - Modelo da síntese do ácido lipoteicóico em <i>Listeria monocytogenes</i>	25
Figura 3 - Esquema proposto da via sintética dos glicolipídios da âncora do ácido lipoteicóico em <i>E. faecalis</i> . O gene <i>bgsB</i> se encontra envolvido na adição o primeiro açúcar glucose no diacilglicerol (DAG) da membrana para a formação do glicolipídio monoglucoildiácilglicerol (MGlcDAG), em quanto o gene <i>bgsA</i> está envolvido na adição do segundo açúcar glucose para a formação do diglucoildiácilglicerol (DGlcDAG).	25
Figura 4 - Formação de biofilme em <i>E. faecalis</i> . Se mostram as quatro etapas de formação: (1) adesão, (2) formação de microcolônias, (3) maturação, (4) dispersão.....	26
Figura 5 - Estrutura química da daptomicina.....	27
Figura 6 - Esquema da formação e aproximação das micelas de daptomicina (DAP) à membrana bacteriana de gram-positivas, mediada pelo Ca^{2+}	29
Figura 7 - Esquema do mecanismo de ação da DAP. (a) Septo de divisão celular (rico em PG e lipídeos com precursores da parede bacteriana) de <i>S. aureus</i> em ausência de DAP. (b) Localização dos oligômeros de DAP no septo de divisão, formando um triplo complexo com o PG e precursores da parede celular acoplados ao bactoprenol bloqueando assim a síntese da parede celular. (c) O tratamento prolongado com DAP resulta em uma dispersão progressiva do antibiótico pela membrana citoplasmática seguida da desintegração da bicamada lipídica o que leva a morte celular.....	30
Figura 8 - Representação esquemática dos resultados da evolução <i>in-vitro</i> da linhagem HBSJRP-18, obtidos por MELLO <i>et al.</i> , cada hexágono representa um dia do experimento e o número dentro é o nome da variante obtida esse dia. Remarcadas em vermelho estão as linhagens selecionadas para este estudo.....	32
Figura 9 - Esquema de determinação da concentração mínima inibitória (MIC, do inglês Minimum Inhibitory Concentration) em microplaca de 96 poços.....	35
Figura 10 - PM utilizados na análise das linhagens HBSJRP 18_2.1 e HBSJRP 18_2.7.....	38
Figura 11 - Mapa e esquema do vetor <i>pGEM®-TEasy</i>	42
Figura 12 - Esquema e mapa do vetor de expressão <i>pET28a</i>	45
Figura 13 - Esquema de purificação da cromatografia por afinidade da proteína LafB de <i>E. faecium</i>	48
Figura 14 - Esquema da coluna de cromatografia de exclusão por tamanho (SEC).....	49

Figura 15 - Esquema da cromatografia de exclusão de tamanho acoplada ao espalhamento de luz multiangulares.....	50
Figura 16 - Esquema do Dicroísmo Circular.....	51
Figura 17 - Espectro de CD no UV –distante. Espectro CD de proteína de hélice α (vermelho). Espectro CD de proteína de fita β (azul), Espectro CD de proteína desestruturada (verde).....	52
Figura 18 - Esquema da técnica de gota sentada utilizada com a proteína LafB de <i>E. faecium</i> nos ensaios de cristalização.....	53
Figura 19 - Representação esquemática de enzimas envolvidas na síntese de precursores de glicolipídios, glicolipídios e/ou cadeia principal de LTA em diferentes bactérias gram-positivas. As enzimas marcadas em um quadrado vermelho são as proteínas que cumprem a mesma função que a LafB em <i>E. faecium</i>	55
Figura 20 - Curva dose-resposta de <i>E. faecium</i> e daptomicina.....	58
Figura 21 - Curva de crescimento das linhagens de <i>E. faecium</i> HBSJRP 18_2.7 (azul) e HBSJRP 2.1 (verde).....	58
Figura 22 - Formação de biofilme das linhagens de <i>E. faecium</i> HBSJRP 18_2.1 e HBSJRP 18_2.7.....	59
Figura 23 - Curvas de crescimento resultantes após 48h de incubação dos PM em <i>E. faecium</i> HBSJRP 18_2.7 (em verde, linhagem de referência) e HBSJRP 18_2.1 (em vermelho, linhagem mutada). Em amarelo mostra-se a convergência das duas curvas.....	60
Figura 24 - Efeitos do aumento de pH no crescimento das linhagens de <i>E. faecium</i> HBSJRP 18_2.7 (em verde, linhagem de referência) e HBSJRP 18_2.1 (em vermelho, linhagem mutada). Em amarelo mostra-se a convergência das duas curvas. Não se observaram diferenças significativas entre elas.....	61
Figura 25 - Curvas metabólicas das linhagens de <i>E. faecium</i> HBSJRP 18 – 2.1 (Vermelho) e HBSJRP 18 – 2.7 (Verde). A. Umbeliferona, B. Blastidicin S. A área de interseção das curvas está representada em amarelo.....	62
Figura 26 - Gráficos de Kaplan-Meier das larvas que receberam injeções de <i>E. faecium</i> HBSJRP 18_2.1 (mutada) e HBSJRP 18_2.7 (normal). Os experimentos foram realizados em triplicatas e os resultados são representativos de um experimento típico. Comparada com a linhagem normal HBSJRP 18_2.7, a linhagem com <i>lafB</i> mutado HBSJRP 18_2.1 demonstrou virulência atenuada com uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0.0001$).....	63
Figura 27 - Expressão e purificação da proteína LafB. (A) SDS-PAGE 12% das frações coletadas durante a expressão e purificação da proteína LafB nativa (B) SDS-PAGE 12% das frações coletadas durante a expressão e purificação da proteína LafB mutada. M: marcador de masa molecular, P: fração insolúvel, S: fração solúvel, NL: proteínas que não interagem com o Níquel na resina, E1: eluição com Imidazol 10mM, E2: eluição com Imidazol 50mM, E3: eluição com Imidazol 100mM, E4: eluição com Imidazol 250mM, E5: eluição com Imidazol 500mM.....	64

Figura 28 - Cromatograma da purificação por exclusão de tamanho (SEC) da proteína LafB.....	65
Figura 29 - Cromatogramas do SEC-MALS da proteína LafB em tampão B (25mM HEPES, 300mM NaCl, 10% glicerol, 5 mM β-Mercaptoetanol, pH 7,5) e massa calculada da proteína.....	66
Figura 30 - Espectro CD da proteína LafB nativa em Tampão C (140mM NaCl, 7mM Na ₂ HPO ₄ , 2,5 mM NaH ₂ PO ₄ H ₂ O) medido a uma temperatura de 16°C.....	68
Figura 31 - Espectros CD da proteína LafB nativa em Tampão C (140mM NaCl, 7mM Na ₂ HPO ₄ , 2,5 mM NaH ₂ PO ₄ H ₂ O) sob quatro temperaturas de 24°C, 34°C, 38°C e 54°C.....	69
Figura 32 - Curva de desnaturação térmica da proteína LafB em tampão C (140 mM NaCl, 7 mM Na ₂ HPO ₄ , 2,5 mM NaH ₂ PO ₄ H ₂ O). T _m =Temperatura de Melting.....	69
Figura 33 - Proteínas representativas dos três tipos de dobramentos estruturais reportados nas glicosiltransferases. (A) Enovelamentos do tipo GT-A, GT-B e GT-C. (B) Estrutura da proteína MshA, representativa do enovelamento do tipo GT-B, onde se observam seus dois domínios e entre eles o sítio catalítico (UDP) característica própria da família GT-B.....	72
Figura 34 - Estrutura predita da proteína LafB de <i>E. faecium</i> . Se apresentam a regiões N-terminal e C-terminal em ciano e verde respectivamente. Em vermelho, se mostra o sítio da mutação.....	73
Figura 35 - Estrutura da proteína PimA (4N9W) que apresenta os domínios N-terminal (roxo) e C-terminal (laranja), e seu ligante GDP-manose (preto).....	73
Figura 36 - Interações do Trp 204 (vermelho) na proteína LafB nativa (2.7).....	74
Figura 37 - Interações da Arg204 (vermelho) na proteína LafB mutada (2.1).....	75
Figura 38 - Predição da LafB ligada ao UDP-Gal no hipotético sitio ativo determinado mediante análise <i>in-silico</i> . Regiões da estrutura da LafB em ciano (região N-terminal) e verde (região C-terminal), o ligante (UDP-Gal) em vermelho e Triptofano204 em verde escuro (A) Vista anterior (B) Vista posterior.....	76
Figura 39 - Gráfico das interações ligante – proteína.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Detalhes da reação PCR para a amplificação do gene <i>lafB</i> de <i>E. faecium</i>	41
Tabela 2 - Condições usadas na PCR para a amplificação do gene <i>lafB</i> de <i>E. faecium</i>	41
Tabela 3- Condições da reação de adenilação do gene <i>lafB</i> de <i>E. faecium</i>	43
Tabela 4 - Detalhes da reação de ligação do gene <i>lafB</i> ao vetor <i>pGEM[®]-T Easy</i>	43
Tabela 5 - Detalhes da reação de digestão com as enzimas NdeI e XhoI	45
Tabela 6 - Detalhes da reação de ligação do gene <i>lafB</i> ao vetor <i>pET28a</i>	46
Tabela 7 - Tampões usados na proteína LafB.....	47
Tabela 8 - Pesos moleculares de algumas proteínas pertencentes à família GT-B das glicosiltransferases.	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DAG	Diacilglicerol
CD	do inglês, <i>Circular Dichroism</i>
DLS	do inglês, <i>Dynamic Light Scattering</i>
DSF	do inglês, <i>Differential Scanning Fluorimetry</i>
GDP	Guanosina difosfato
GroP	Glicerofosfato
IDSA	do inglês, <i>Infectious Diseases Society of America</i>
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
kDa	Kilodalton
LB	do inglês, <i>Lysogeny broth</i>
LTA	do inglês, <i>lipoteichoic acid</i>
MALS	Espalhamento de luz multiangulares
NAG	N-acetilglicosamina
NAM	Ácido N-acetilmurâmico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAE	do inglês, <i>Predicted Aligned Error</i>
PAGE	do inglês, <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
pb	pares de bases
PBS	do inglês, <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>
PG	Fosfatidilglicerol
pH	Potencial hidrogeniônico
PM	do inglês, <i>Phenotype microarray</i>
SDS	do inglês, <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SEC	Cromatografia de exclusão de tamanho
TA	do inglês, <i>teichoic acids</i>
T _m	Temperatura de <i>Melting</i>
IDDT	do inglês, <i>Local Distance Difference Test</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
1.1	<i>Enterococcus faecium</i> e sua importância como patógeno	23
1.2	A parede celular das bactérias gram-positivas e biossíntese do ácido lipoteicóico	24
1.3	A formação de biofilme em enterococos.....	26
1.4	A daptomicina e seu mecanismo de ação.....	27
1.5	<i>Enterococcus faecium</i> hipersensível a daptomicina	31
2	OBJETIVOS	33
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1	Caracterização fenotípica.....	35
3.1.1	Determinação da concentração mínima inibitória (CIM)	35
3.1.2	Curva de crescimento.....	36
3.1.3	Formação de biofilme	36
3.1.4	Microarranjos de fenótipo microbiano com o sistema OmniLog [®]	37
3.2	Avaliação da virulência <i>in-vivo</i> em modelo de <i>Galleria mellonella</i>	38
3.3	Purificação da glicosiltransferase LafB para testes biofísicos	39
3.3.1	Extração de DNA	39
3.3.2	Clonagem no vetor de propagação.....	40
3.3.3	Clonagem no vetor de expressão	44
3.3.4	Expressão heteróloga	46
3.3.5	Purificação usando cromatografia por afinidade.....	47
3.3.6	Purificação usando cromatografia por exclusão de tamanho (SEC).....	48
3.3.7	Cromatografia de exclusão de tamanho acoplada ao espalhamento de luz multiangulares (SEC-MALS).....	49
3.3.8	Dicroísmo Circular (CD).....	50
3.3.9	Ensaio de cristalização.....	53
3.4	Análise <i>in-silico</i> da glicosiltransferase LafB.....	53
3.4.1	Predição da estrutura da proteína com <i>AlphaFold</i>	53

3.4.2 Docking molecular	54
4 RESULTADOS E DISCUSSAO	57
4.1 Caracterização fenotípica	57
4.1.1 Determinação da concentração mínima inibitória (CIM)	57
4.1.2 Curva de crescimento	58
4.1.3 Formação de biofilme	59
4.1.4 Microarranjos de fenótipo microbiano com o sistema OmniLog [®]	60
4.2 Avaliação da virulência <i>in-vivo</i> em modelo de <i>Galleria mellonella</i>	63
4.3 Purificação da glicosiltransferase LafB para testes biofísicos	64
4.3.1 Purificação da glicosiltransferase LafB usando cromatografia por afinidade e cromatografia por exclusão de tamanho	64
4.3.2 Cromatografia de exclusão de tamanho acoplada ao espalhamento de luz multiangulares (SEC-MALS)	66
4.3.3 Dicroísmo circular (CD)	68
4.3.4 Ensaios de cristalização	70
4.4 Análise <i>in-silico</i> da glicosiltransferase LafB	71
4.4.1 Predição da estrutura da proteína com <i>AlphaFold</i>	71
4.4.2 Docking molecular	76
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	79
REFERÊNCIAS	81
ANEXO A	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Enterococcus faecium* e sua importância como patógeno

Os enterococos são bactérias gram-positivas que se encontram colonizando o solo,¹ em águas superficiais² e do mar,³ produtos alimentícios fermentados,⁴ em associações com plantas,⁵⁻⁶ e até formando parte da microbiota intestinal de vertebrados⁷ e invertebrados.⁸ O termo “*entérocoque*” foi usado pela primeira vez em 1899 por Thiercelin quando se descobriu bactérias intestinais com a capacidade de tornar-se patogênicas, e foi utilizado informalmente para se referir aos cocos gram-positivos isolados do intestino ou as fezes de mamíferos.¹ No entanto, a causa de similaridade morfológica e bioquímica, os enterococos foram classificados dentro do gênero *Streptococcus* até 1984, ano em que o nome foi formalmente proposto para a criação do novo gênero *Enterococcus*.⁹

Os enterococos são considerados microrganismos comensais do trato gastrointestinal, no entanto também podem se tornar patogênicos causando infecções de trato urinário, bacteremia, endocardite, infecções intra abdominais e de cateteres, entre outros dispositivos médicos implantados.¹

Enterococcus faecium é um dos principais representantes do gênero *Enterococcus*, e uma das espécies do gênero com importância clínica para o homem particularmente por sua capacidade de adquirir resistência a vários antibióticos especialmente das linhagens isoladas de ambientes hospitalares.¹⁰⁻¹¹ Em consequência da rápida propagação intra-hospitalar e aquisição de resistência a antimicrobianos nas últimas décadas, a IDSA (do inglês, *Infectious Diseases Society of America*) considerou *E. faecium* dentro do grupo de patógenos que representam uma ameaça global para a saúde humana conhecidos pelo acrônimo ESKAPE (*E. faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter sp.*).¹²

A fim de guiar a pesquisa e desenvolvimento relacionados com novos antibióticos, no ano 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) emitiu uma lista de patógenos para os quais se precisa urgentemente o desenvolvimento de novos fármacos, nessa lista *E. faecium* resistente a vancomicina foi classificado como microrganismo de alta prioridade.¹³

Entre as opções terapêuticas de último recurso comumente utilizadas para combater infecções causadas por enterococos multirresistentes (incluindo aos resistentes a glicopeptídeos como vancomicina) estão a linezolida, daptomicina e tigeciclina; no entanto, já se tem relatada a resistência de *E. faecium* a esses antibióticos.¹⁴⁻¹⁶

1.2 A parede celular das bactérias gram-positivas e biossíntese do ácido lipoteicoico

Em comparação às gram-negativas, 90% da parede celular das bactérias gram-positivas (Figura 1) é composta por peptidoglicano, um polissacarídeo que é o responsável pela rigidez da estrutura. O peptidoglicano se compõe de cadeias longas individuais conformadas por moléculas alternadas de N-acetilglicosamina (NAG) e ácido N-acetilmurâmico (NAM), as cadeias de NAG e NAM são interligadas por meio de ligações covalentes cruzadas de aminoácidos como L-alanina, D-alanina, ácido D-glutâmico, ou L-lisina o que confere a rigidez nas camadas. Além do peptidoglicano, muitas bactérias como *E. faecium* apresentam moléculas denominadas ácidos teicoicos (TA, do inglês *teichoic acids*) embebidas na parede celular e ligados covalentemente ao ácido murâmico do peptidoglicano. Os TA, estão conformados por moléculas de glicerol-fosfato, e pelo fato de os fosfatos serem carregados negativamente, os TA são em parte responsáveis da carga elétrica negativa da superfície celular. Determinados TA são ligados covalentemente a lipídeos de membrana, e esses são denominados ácidos lipoteicoico (LTA, do inglês *lipoteichoic acid*).¹⁷

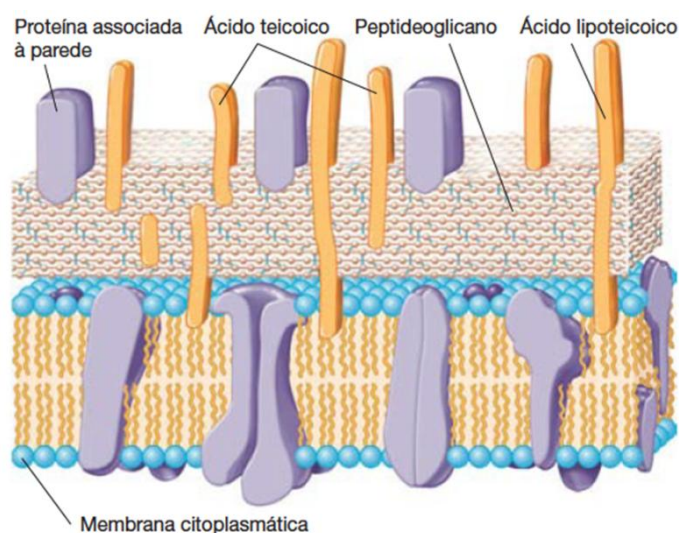


Figura 1 - Esquema da estrutura da parede celular de bactérias gram-positivas.

Fonte: MADIGAN¹⁷

E. faecium possui LTA do tipo I, que é comum entre bactérias do filo *Bacillota* como *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, e *Listeria monocytogenes*.¹⁸ O LTA do tipo I se caracteriza por ter uma espinha dorsal de glicerofosfatos (GroP) não ramificada e geralmente ligada à membrana bacteriana através de uma âncora de glicolípido.¹⁹ Em *L. monocytogenes*, a formação do LTA inicia no citoplasma com a inserção do primeiro açúcar (Glicose) no diacilglicerol (DAG) da membrana, essa reação é catalisada pela glicosiltransferase LafA. Em seguida, é inserido o segundo açúcar (Galactose) pela ação da glicosiltransferase LafB que utiliza uma molécula de

UDP-Gal como substrato. Uma vez formada a âncora do LTA (Gal-Glc-DAG), a enzima LtaP, usando moléculas de fosfatidilglicerol (PG) como substrato, coloca a primeira molécula de GroP nos glicolipídios da âncora, por fim, a enzima LtaS adiciona mais GroP para formar a “espinha dorsal” do LTA (Figura 2).²⁰

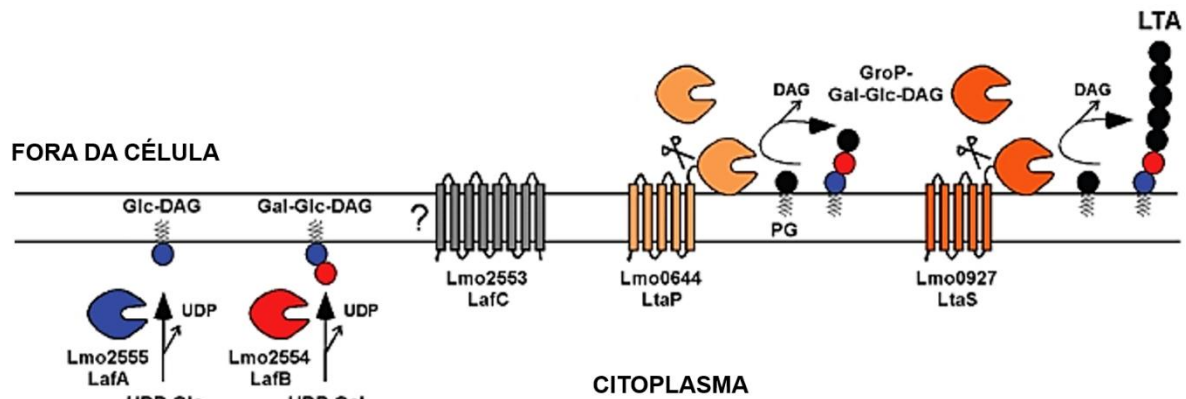


Figura 2 - Modelo da síntese do ácido lipoteicóico em *Listeria monocytogenes*.
Fonte: WEBB *et al.*²⁰

Em *Enterococcus faecalis*, os glicolipídios da âncora do LTA são formados pelas enzimas codificadas pelos genes *bgsB* e *bgsA*, cujas funções catalíticas correspondem respetivamente as glicosiltransferases LafA e LafB de *L. monocytogenes* (Figura 3).²¹⁻²²

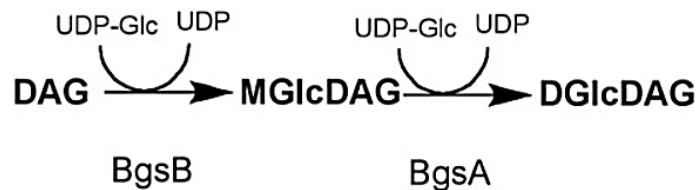


Figura 3 - Esquema proposto da via sintética dos glicolipídios da âncora do ácido lipoteicóico em *E. faecalis*. O gene *bgsB* se encontra envolvido na adição o primeiro açúcar glucose no diacilglicerol (DAG) da membrana para a formação do glicolipídio monoglicosildiácilglicerol (MGlcDAG), em quanto o gene *bgsA* está envolvido na adição do segundo açúcar glucose para a formação do diglicosildiácilglicerol (DGlcDAG).
Fonte: THEILACKER *et al.*²²

A via de síntese do LTA em *E. faecium* ainda não foi descrita, mas já se tem estudado em *E. faecium* um composto antibacteriano, previamente testado com sucesso em *E. faecalis*, que utiliza como alvo a enzima LtaS, cujo homólogo se encontra também presente no genoma de *E. faecium*, com o propósito de inibir a formação do LTA da parede celular. Se demonstrou que em *E. faecium* o composto causou deformações na parede celular e lise bacteriana em *E.*

faecium.²³ Isso sugere que provavelmente as enzimas envolvidas na síntese do LTA seguem um esquema parecido ao descrito em *E. faecalis* e *L. monocytogenes*, além disso, confirma que as proteínas envolvidas na formação do LTA podem ser alvos promissórios para moléculas antimicrobianas.

1.3 A formação de biofilme em enterococos

O biofilme é uma população de células bacterianas aderidas irreversivelmente a várias superfícies bióticas e abióticas, contidas em uma matriz hidratada de substâncias poliméricas extracelulares, proteínas, polissacarídeos e ácidos nucleicos extracelulares²⁴ que reduzem intensamente a capacidade dos agentes antimicrobianos de penetrarem o biofilme, de modo que as bactérias contidas na matriz são pouco afetadas pelos fármacos. Uma vez maduros, os biofilmes são notoriamente difíceis de se erradicar e são fontes de infecções recalcitrantes, especialmente nos hospitais¹⁷, geralmente associados a vários tipos de dispositivos médicos permanentes, como próteses artificiais, dispositivos intrauterinos, cateteres venosos centrais e cateteres urinários.^{25–28}

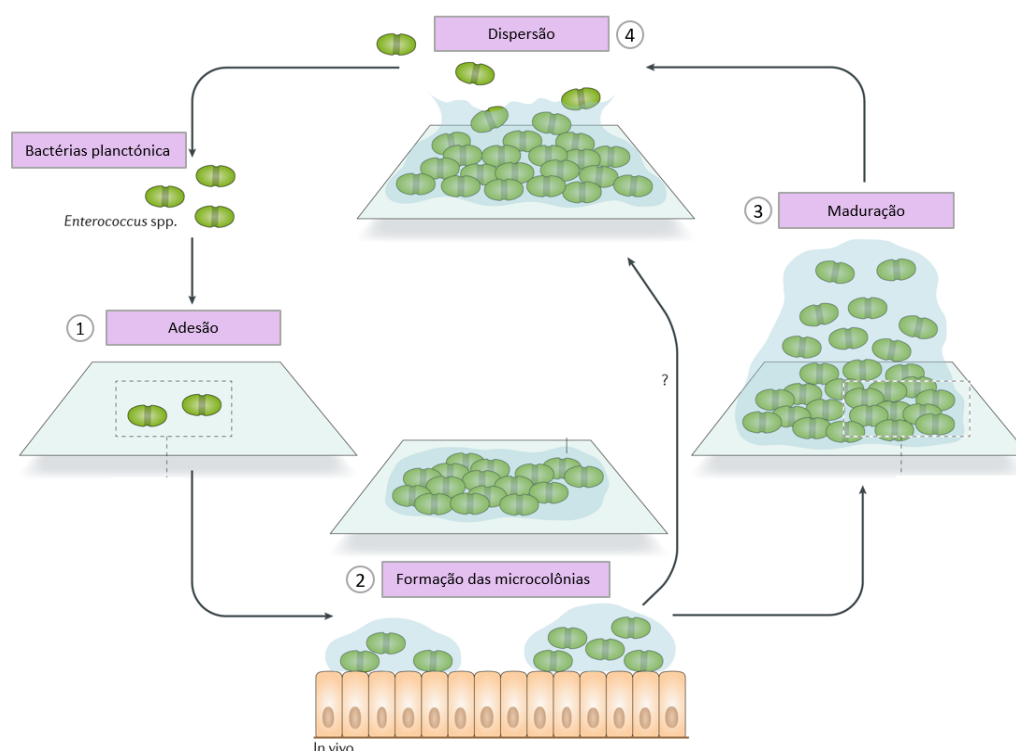


Figura 4 - Formação de biofilme em *E. faecalis*. Se mostram as quatro etapas de formação: (1) adesão, (2) formação de microcolônias, (3) maduração, (4) dispersão. Fonte: CH'NG *et al.*²⁶

A formação de biofilme em *E. faecalis* (Figura 4) compreende quatro etapas: a primeira é a adesão inicial na superfície, mediada por adesinas, proteases e glicolipídios de

superfície como o LTA, especialmente se tem demonstrado que a esterificação com D-alanina do LTA cumpre um papel importante favorecendo a adesão do biofilme.²⁹

Na segunda etapa, as células começam se multiplicar e produzir pequenas quantidades de matriz para formar agregados conhecidos como microcolônias, que uma vez formados começam a ter um crescimento ativo e produção dos componentes da matriz extracelular, essa etapa é chamada de maturação.²⁶ Contudo, os biofilmes não são estruturas estáticas e as células bacterianas podem ser liberadas através de um processo de dispersão provocado por fatores ambientais, em *E. faecium* esse processo não tem sido bem estudado, mas em outras espécies como *Pseudomonas aeruginosa*, se tem demonstrado que as células dispersas possuem uma maior expressão de genes de virulência e menor propensão a serem fagocitadas por macrófagos.²⁶

Outros estudos sobre o biofilme em *E. faecalis*, relatam a importância da síntese do LTA na capacidade de formação do biofilme e mostram que o gene *bgsA* (correspondente ao gene *lafB* em *E. faecium*), responsável pela adição do segundo açúcar na âncora do LTA, está envolvido na capacidade de formação de biofilme da bactéria, pois a deleção de *bgsA* resultou em uma diminuição significativa da capacidade de formação de biofilme, enquanto uma expressão aumentada deste gene, resulta no aumento correlativo de acumulação de biofilme.

21

1.4 A daptomicina e seu mecanismo de ação

Daptomicina (DAP) é um antibiótico derivado de um produto de fermentação de *Streptomyces roseoporus*, e pertence à classe dos lipopeptídeos cíclicos. Sua estrutura é conformada por um núcleo peptídico e uma cauda lipídica (Figura 5) e age especificamente em bactérias gram-positivas.³⁰⁻³¹

DAP foi aprovada inicialmente pela FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) no ano 2003 para infecções em tecido macio (envolve pele e tecido subcutâneo subjacente) causadas por *S. aureus*, estreptococos β -hemolíticos e *E. faecalis* sensíveis a vancomicina; e três anos depois, no 2006, foi liberada para tratar também infecções de corrente sanguínea e endocardite causada por *S. aureus*. Com o tempo, DAP se converteu na prática clínica em um antibiótico comumente utilizado para o tratamento de infecções provocadas por *S. aureus* MRSA (do inglês, *methicillin-resistant S. aureus*) e *Enterococcus faecium* VRE (do inglês, *vancomycin-resistant*).³²⁻³³ Mas como previsto, no 2005, apenas dois anos após a aprovação inicial da DAP, foram relatadas as primeiras amostras resistentes de *E. faecium*.¹

Embora DAP tenha sido utilizada por quase duas décadas na prática clínica, seu mecanismo de ação ainda não foi completamente elucidado. No entanto, se sabe que a ação da DAP é dependente da presença de Ca^{2+} que vai induzir a formação de micelas de 14-16 monômeros de DAP, as quais devido a carga catiônica do Ca^{2+} , se aproximam à membrana bacteriana onde uma vez em contato com a membrana, a micela de DAP se dissocia, permitindo que a DAP monomérica se insira na bicamada (Figura 6).³⁴⁻³⁵

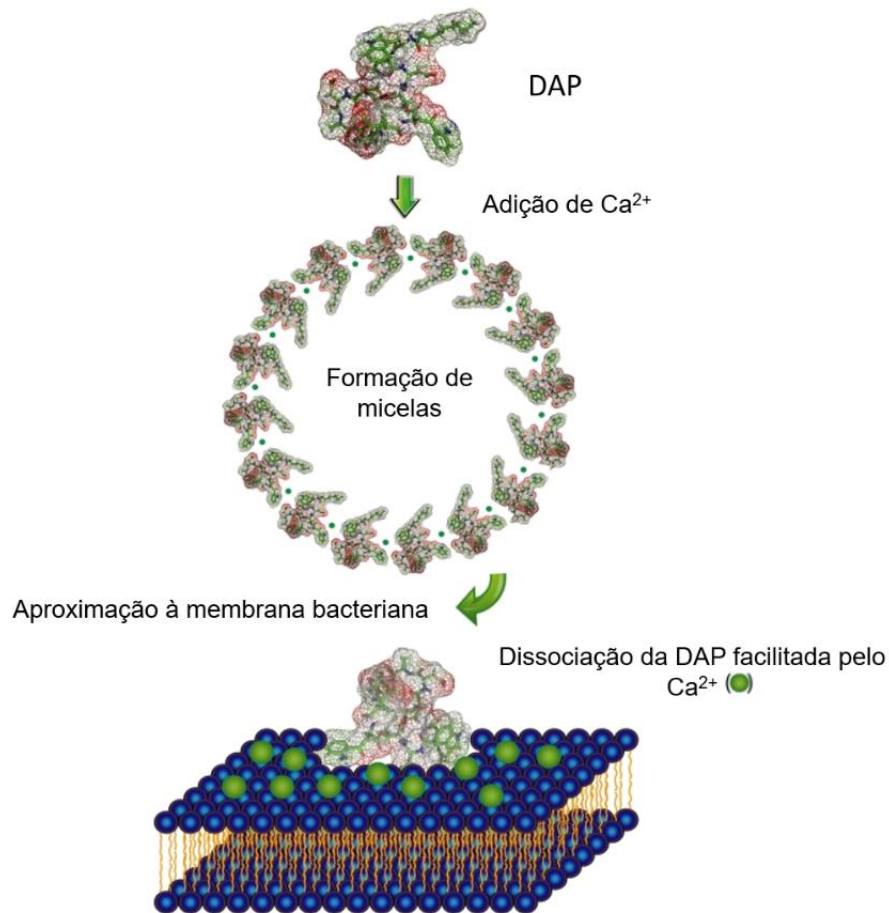


Figura 6 - Esquema da formação e aproximação das micelas de daptomicina (DAP) à membrana bacteriana de gram-positivas, mediada pelo Ca^{2+} .

Fonte: Adaptada de ROBBEL; MARAHIEL.³⁵

Além do Ca^{2+} , DAP precisa se associar com moléculas de fosfatidilglicerol (PG) que é um dos lipídeos aniônicos que compõe a membrana das bactérias gram-positivas. Inclusive, se tem demonstrado que os níveis elevados e reduzidos de PG estão relacionados à sensibilidade e resistência a DAP, respectivamente.³⁶

Recentemente, se informou que há associação $\text{DAP-Ca}^{2+}\text{-PG}$ com bactoprenol que carrega os precursores da parede celular formando assim um triplo complexo entre DAP-Ca^{2+} , PG e o lipídeo II com precursores da parede celular. Com a descoberta desse modo de ação, se demonstrou que DAP-Ca^{2+} age em duas fases, a primeira fase acontece nos primeiros 15 minutos e parece ser o evento principal de eliminação bacteriana, nela, a DAP se liga no septo de divisão celular, que é um local rico em PG e lipídeo II com precursores da parede celular (alvos moleculares), nesta primeira etapa, a DAP consegue reduzir 75% das bactérias viáveis.³⁷ Na segunda fase, a exposição prolongada a DAP causa uma inibição da síntese da parede celular no septo de divisão levando a dispersão progressiva da maquinaria proteica de síntese

da parede e modificação da membrana onde se passa a observar a ligação da DAP e em consequência a morte da célula (Figura 7).³⁷

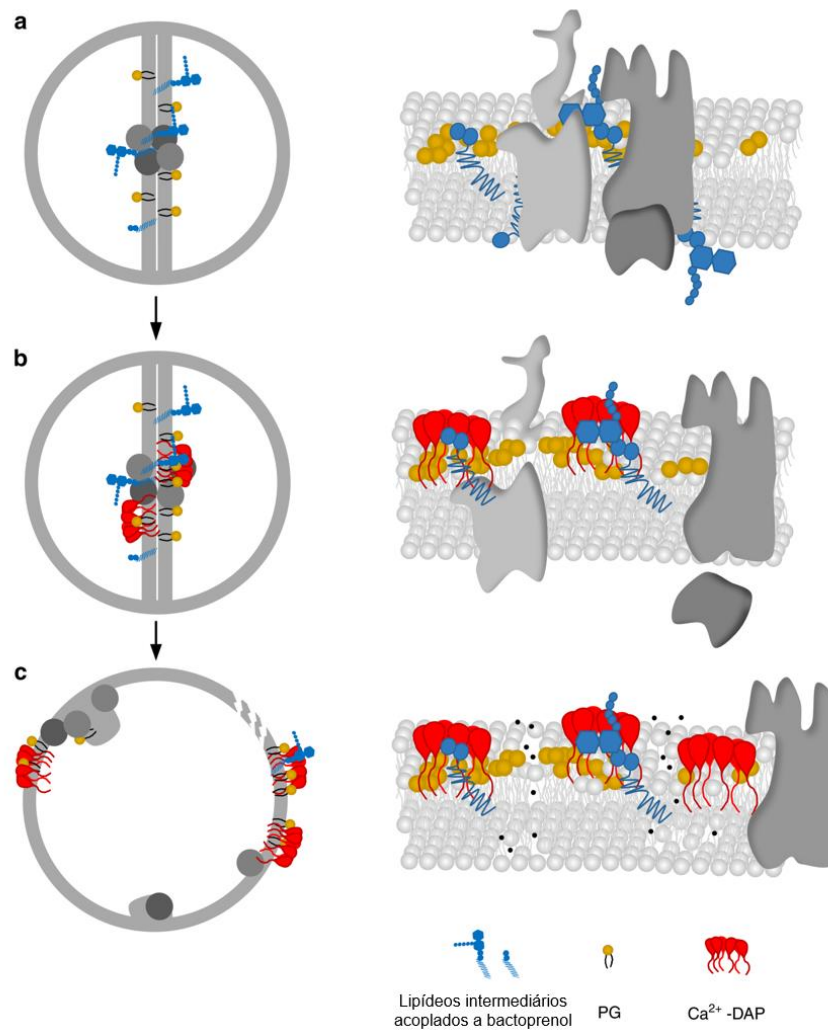


Figura 7 - Esquema do mecanismo de ação da DAP. (a) Septo de divisão celular (rico em PG e lipídeos com precursores da parede bacteriana) de *S. aureus* em ausência de DAP. (b) Localização dos oligômeros de DAP no septo de divisão, formando um triplo complexo com o PG e precursores da parede celular acoplados ao bactoprenol bloqueando assim a síntese da parede celular. (c) O tratamento prolongado com DAP resulta em uma dispersão progressiva do antibiótico pela membrana citoplasmática seguida da desintegração da bicamada lipídica o que leva a morte celular. Fonte: GREIN *et al.*³⁷

1.5 *Enterococcus faecium* hipersensível a daptomicina

Um estudo prévio desenvolvido no Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Moleculares (LEMiMo) do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo (USP) analisou 26 isolados de *E. faecium* do Hospital de Base São Jose do Ríó Preto, o isolado HBSJRP18 apresentou uma sensibilidade muito elevada a DAP com concentração inibitória mínima (CIM) de 0,06 mg/L, o que é raro para a espécie.³⁸

Para compreender o fenótipo deste isolado, foram realizados três experimentos de evolução dirigida na presença de DAP *in-vitro* em paralelo (Figura 8) a fim de conseguir variantes mais resistentes ao fármaco. Algumas das linhagens evoluídas foram selecionadas para o sequenciamento do genoma. A comparação entre os genomas HBSJRP 18_2.1 (CIM_{DAP}=0.06 mg/L) e HBSJRP 18_2.7 (CIM_{DAP}=2 mg/L) mostrou uma transição de C577T (Arg193Trp) no gene anotado como *lafB* que codifica uma glicosiltransferase. A mutação encontrada restaurou a sequência de codificação àquela que ocorre naturalmente em todos os outros isolados clínicos de *E. faecium* relatados, por tanto, essa mutação foi classificada como uma reversão para o genótipo *wild type*.³⁸

Como relatado anteriormente, em enterococos, o gene *lafB*, codifica uma glicosiltransferase encarregada de inserir o segundo açúcar na base da âncora do LTA. Neste trabalho foram utilizadas as linhagens supersensível HBSJRP 18_2.1 e a sensível HBSJRP 18_2.7 (Figura 8) para estudar mais a fundo a proteína LafB de *E. faecium* e a implicação da mutação nos fenótipos bacterianos.

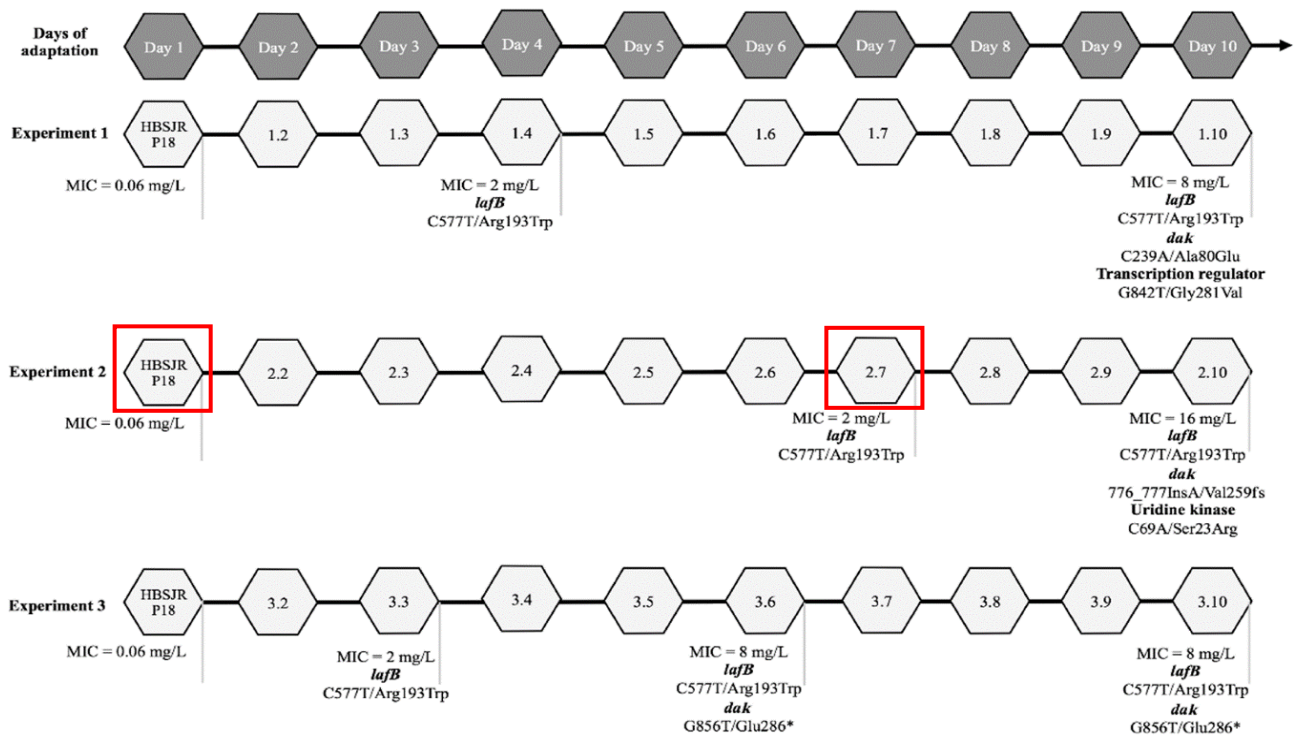


Figura 8 - Representação esquemática dos resultados da evolução *in-vitro* da linhagem HBSJRP-18, obtidos por MELLO *et al.*, cada hexágono representa um dia do experimento e o número dentro é o nome da variante obtida nesse dia. Remarcadas em vermelho estão as linhagens selecionadas para este estudo. Fonte: MELLO *et al.*³⁸

2 OBJETIVOS

O objetivo geral desse projeto foi verificar o papel da mutação do gene *lafB* no fenótipo bacteriano e sua virulência e caracterizar biofísicamente a proteína LafB.

Baseados no objetivo geral, foram indicados os seguintes objetivos específicos:

- ✓ Comparar fenotipicamente as linhagens de *E. faecium* com o gene *lafB* mutado e não mutado, quanto ao metabolismo, sensibilidade a diversos compostos e capacidade de formação de biofilme.
- ✓ Avaliação da virulência *in-vivo* em modelo de *Galleria mellonella*.
- ✓ Clonar o gene *lafB* em vetor de expressão.
- ✓ Padronizar a expressão e purificação da LafB para sua caracterização biofísica.
- ✓ Analisar *in-silico* uma predição da estrutura tridimensional da proteína LafB.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Caracterização fenotípica

3.1.1 Determinação da concentração mínima inibitória (CIM)

A CIM é definida como a menor concentração de um antimicrobiano que, sob condições *in-vitro* estritamente controladas, é capaz de inibir visivelmente o crescimento de um microrganismo após incubação (Figura 9), é considerada o padrão de ouro para se determinar a suscetibilidade dos organismos aos antimicrobianos.³⁹⁻⁴⁰

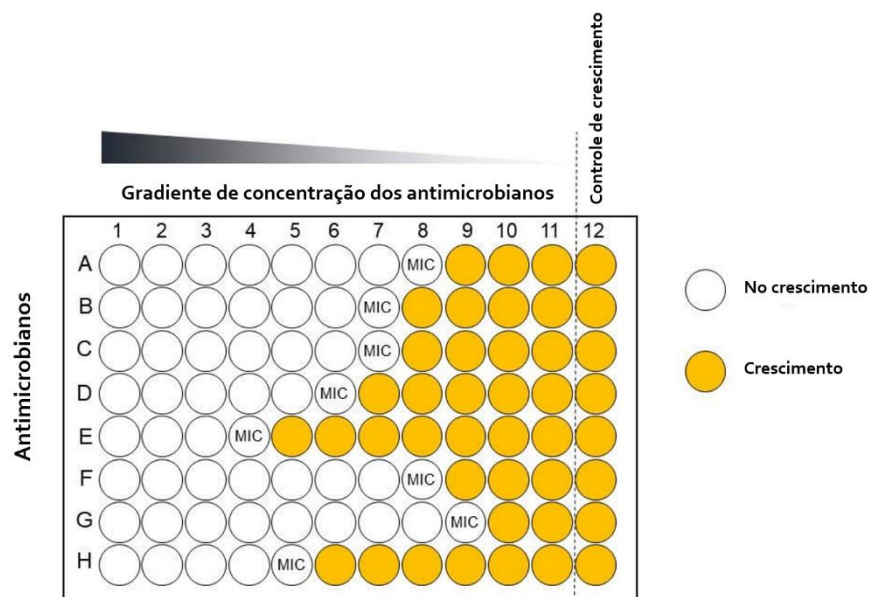


Figura 9 - Esquema de determinação da concentração mínima inibitória (MIC, do inglês Minimum Inhibitory Concentration) em microplaca de 96 poços.
Fonte: EMERY PHARMA.⁴⁰

Neste trabalho a determinação da CIM das linhagens HBSJRP 18_2.1 e HBSJRP 18_2.7 foi feita utilizando microdiluição em caldo baseado nas recomendações do CLSI (do inglês, *Clinical and Laboratory Standards Institute*),⁴¹ com meio de cultura Mueller-Hinton Cátion Ajustado MHCA suplementado com cálcio (50 mg/L) previamente filtrado usando filtro de 0,22 μm . Em triplicatas, as amostras foram incubadas a 37 °C por 24 h em placa de 96 poços em meio suplementado com diferentes concentrações de daptomicina (8 $\mu\text{g/mL}$; 4 $\mu\text{g/mL}$; 2 $\mu\text{g/mL}$; 1 $\mu\text{g/mL}$; 0,5 $\mu\text{g/mL}$; 0,25 $\mu\text{g/mL}$; 0,125 $\mu\text{g/mL}$; 0,06 $\mu\text{g/mL}$ e 0 $\mu\text{g/mL}$). A CIM foi determinada por observação direta na placa, considerando-se como CIM a menor concentração onde não se observa crescimento bacteriano no poço. Com os resultados da incubação de 24 h foi feita uma curva dose-resposta, a leitura da absorbância das replicatas foi feita a 600 nm, utilizando o equipamento *Spectramax M5* (Molecular Devices, USA).

3.1.2 Curva de crescimento

As linhagens HBSJRP 18_2.1 e HBSJRP 18_2.7 foram incubadas em caldo Mueller - Hinton a 37 °C por 18 h, a cultura foi diluída em caldo Mueller-Hinton até a DO₆₀₀ atingir valores entre 0,05 e 0,1. Após o ajuste da cultura, se distribuíram 200 µL de cada amostra nos poços, e foram feitas leituras com intervalos de 15 min durante 12 horas utilizando o equipamento *Spectramax M5*.

Com as medições de absorvância obtidas pelo equipamento foram feitas curvas DO x tempo de incubação de cada replicata, e selecionando os dados da fase de crescimento exponencial da bactéria foram determinados os tempos de duplicação (também conhecido como tempo de geração) ⁴² de cada linhagem utilizando a seguinte fórmula:

$$\frac{\ln(2)}{B}$$

Onde:

B = Exponente da função exponencial da curva.

Um teste de Análise de Variância (ANOVA) foi feito para determinar a significância entre os tempos de duplicação das linhagens.

3.1.3 Formação de biofilme

Levando em consideração que a formação de biofilme em enterococos é predominante em superfícies de dispositivos médicos como o cateter urinário, e que a linhagem HBSJRP 18 foi isolada de uma amostra clínica de urina ³⁸, além de que o gene *bgsA* envolvido na capacidade de formação do biofilme em *E. faecalis* cumpriria uma função similar na formação do LTA que o gene *lafB* em *E. faecium*, foi feita uma avaliação da capacidade formadora de biofilme das linhagens HBSJRP 18_2.1 e HBSJRP 18_2.7.

As duas linhagens foram incubadas a 37 °C por 18 h em caldo BHI (do inglês, *Brain Heart Infusion*) contendo glicose a 0,75%. Como controle positivo do experimento foi usada a linhagem de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 e como controle negativo a *S. epidermidis* ATCC 12228. Estas linhagens foram usadas apenas para validar o teste realizado. Os tubos com as culturas foram centrifugados a 4000 rpm por 10 min a 4 °C. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento bacteriano foi suspenso em 500 µL de caldo BHI 0,75% glicose. Para ajustar a densidade óptica das amostras, foram diluídos 50 µL de cada amostra em 450 µL de tampão PBS, e após serem colocadas em placas de 96 poços em duplicatas, foram levados à *Leitora de Microplacas Polaris (Celler, Brasil)* para ser lida a

absorbância a 600 nm. As amostras foram ajustadas com caldo BHI 0,75% glicose até que a leitura atingisse absorbância igual a 1,0. Imediatamente as amostras ajustadas foram diluídas 1:40 em caldo BHI 0,75% glicose, após a diluição 200 µL das amostras foram inoculados em cada poço de uma placa de 96 poços de fundo chato; foram feitas 12 replicatas de cada. Posteriormente, a placa foi incubada a 37 °C por 24 h. No dia seguinte, se descartou o conteúdo dos poços e foram feitas 3 lavagens manuais adicionando e removendo 200 µL de PBS em cada lavagem.

Para a revelação do biofilme, se adicionaram 200 µL de solução de corante cristal violeta 0,2% e se deixou em repouso por 15 min, depois foram feitas 3 lavagens do corante com PBS como anteriormente descrito. Imediatamente, foram adicionados 200 µL de solução de etanol: acetona (80:20) aos poços e se agitou a placa por 1 min. Finalmente, em uma nova microplaca foram adicionados 160 µL de solução descorante (etanol: acetona) mais 40 µL do conteúdo da placa anterior para no fim, realizar a leitura da absorbância dos poços a 600 nm na Leitora de Microplacas Polaris (*Celler*). Para a análise estatística dos resultados, foi feito um teste de ANOVA entre as amostras.

3.1.4 Microarranjos de fenótipo microbiano com o sistema OmniLog[®]

A tecnologia de Microarranjos fenotípicos da OmniLog (*Biolog*, Estados Unidos) proporciona um ensaio de alto rendimento para caracterização e seguimento dos fenótipos durante o metabolismo das células microbianas e outros organismos.⁴³ A tecnologia é baseada em microarranjos de fenótipos (“PM” do inglês, *Phenotype microarrays*), que consistem em 20 microplacas de 96 poços que compreendem cada um deles diferentes condições de crescimento: diferentes fontes de carbono (placa PM1-2), nitrogênio (PM3, 6-8), fósforo e enxofre (PM4), suplemento nutricional (PM5), osmólitos e pH (PM9-10), e um conjunto de compostos antimicrobianos (PM11-20).⁴⁴ Para a análise dos fenótipos durante o metabolismo, é usada um sal de tetrazolio que é reduzido mediante desidrogenases e redutases produzidas pelas células, indicando que o microrganismo metaboliza ativamente um substrato.⁴³

Para a caracterização das linhagens HBSJRP 18_2.1 e HBSJRP 18_2.7 foram utilizados os 20 PM padronizados pelo fabricante para enterococos. Os PM utilizados contêm substratos como fontes de carbono (PM 1 e 2A), fontes de nitrogênio (PM 3B), fontes de fósforo e enxofre (PM 4A), suplementos nutricionais (PM 5), fontes peptídicas de nitrogênio (PM 6, 7 e 8), osmólitos (PM 9), pH (PM 10), diversos compostos químicos (PM 11C, 12B, 13B, 14A, 15B, 16A, 17A, 18C, 19, 20B) (Figura 10) (Anexo A)

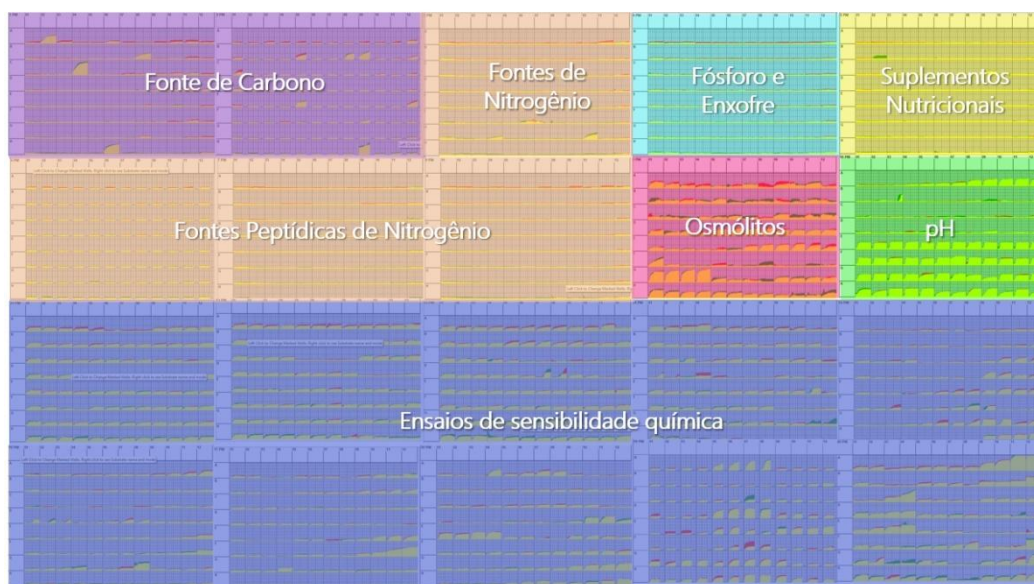


Figura 10 - PM utilizados na análise das linhagens HBSJRP 18_2.1 e HBSJRP 18_2.7.

Fonte: Adaptada de OMNILOG[®] PM SYSTEMS

A análise foi feita utilizando o protocolo do fabricante para bactérias enterocólicas. Para isso, células das linhagens de interesse foram semeadas em ágar *Biolog Universal Growth* (BUG) e foram cultivadas a 37°C por 24h. No seguinte dia, foram coletadas colônias individuais da superfície das placas de ágar utilizando um *swab* estéril, para transferi-las para o fluido de inoculação estéril (IF BiologTM) até uma densidade correspondente ao 81% de transmitância no turbidímetro (Biolog). Em seguida, foram adicionados 100 µL de inóculo bacteriano a cada poço. As placas PM inoculadas, foram colocadas no equipamento OmniLog[®] para a leitura a cada 15 minutos através da câmara CCD do equipamento durante 48h a 37°C. O crescimento bacteriano foi estimado seguindo a redução do colorante de tetrazolio e os dados foram obtidos automaticamente a cada 15 min em Unidades Omnilog (UO).

Os resultados das curvas de crescimento foram observados e comparados utilizando o próprio software *OmniLog PM*, considerando os parâmetros *height*, *slope* e *area under the curve*.

3.2 Avaliação da virulência *in-vivo* em modelo de *Galleria mellonella*

Para investigar se a mutação no gene que codifica a glicosiltransferase LafB de *E. faecium* afeta a virulência da bactéria, foram feitos experimentos de infecção e morte em larvas de *Galleria mellonella* em colaboração com pesquisadores da *University of Florida*: Dra. Jacqueline Abranches, Dra. Jessica Kajfasz e Dr. José A. Lemos.

O experimento foi realizado em triplicatas seguindo a metodologia descrita em *Gaca et al.*⁴⁵ As linhagens de *E. faecium* HBSJRP 18_2.1 e HBSJRP 18_2.7 foram incubadas por 18 horas a 37 °C em meio BHI. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação e imediatamente congeladas para seu uso posterior.

Foram selecionadas aleatoriamente grupos de vinte larvas de *G. mellonella* (*Vanderhorst Wholesale Inc.*) cujo peso oscilava entre 200 e 300 mg. As larvas foram injetadas com alíquotas de 5 µl de inóculo bacteriano (5×10^5 UFC) no hemocele, através da última *proleg* esquerda utilizando uma seringa Hamilton. Como um controle negativo dois grupos de larvas foram injetados com bactérias das duas linhagens inativadas por calor (“HK”, do inglês *heat killed*) a 75°C por 20 min, seguindo o mesmo esquema. Após injeção, as larvas se mantiveram a 37°C e os registros de sobrevivência foram realizados em intervalos selecionados. Com os dados foram feitas curvas de mortalidade de Kaplan-Meier e foram comparadas as diferenças de sobrevivência mediante o teste de Log-rank de Mantel-Cox. Os dados foram analisados utilizando o software *GraphPad Prism 4.0*.

3.3 Purificação da glicosiltransferase LafB para testes biofísicos

3.3.1 Extração de DNA

A extração do DNA genômico foi feita utilizando metodologia baseada em *Palazzo et al.*⁴⁶ Como primeiro passo, as bactérias das linhagens HBSJRP 18-2.1 e HBSJRP 2.7 foram cultivadas em tubos novos com 10 mL de caldo BHI a 37 °C durante 18 h. A cultura obtida foi centrifugada a 5000 rpm a 4 °C por 5 min; o sobrenadante foi desprezado. O sedimento foi suspenso em solução fisiológica 0,85% e centrifugado mais uma vez a 5000 rpm a 4 °C por 5 min. Após centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, e ao sedimento adicionou-se 1 volume (= 200 µL medido em microtubo de 500 µL) de pérolas de vidro previamente tratadas com ácido nítrico 50% por duas horas sob agitação. Posteriormente foram adicionados junto as pérolas 600 µL de tampão de extração TED (0,2 M Tris-HCL pH 8,5, 250 mM NaCl, 250 mM EDTA pH 7,5, 17 mM SDS, água deionizada).

O tubo com o sedimento foi levado ao vórtex por 10 min e, posteriormente, foram transferidos 500 µL da suspensão em um microtubo e foi adicionado um volume de 500 µL de fenol-clorofórmio (1:1); os tubos foram homogeneizados por inversão durante 15 s e centrifugados por 20 min a 12000 rpm a 4 °C. O sobrenadante obtido foi cuidadosamente extraído e um volume de 400 µL do sobrenadante foi transferido a outro tubo contendo 400

μL de isopropanol absoluto gelado. Por fim, as misturas foram armazenadas em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 18 h.

No dia seguinte, os tubos foram centrifugados por 10 min a 12000 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, o sobrenadante foi desprezado e se adicionou 1 mL de etanol 70% gelado. Novamente, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 12000 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, após centrifugação, o líquido remanescente foi escorrido em papel absorvente. Em seguida, os tubos foram colocados abertos em câmara de fluxo laminar até secar; o DNA foi suspenso em $30\text{ }\mu\text{L}$ de água ultrapura obtida no equipamento *Milli-Q Direct Water Purification System* (Merck, Alemanha) e armazenado por 2 h a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após esse tempo, foi adicionado $1\text{ }\mu\text{L}$ de RNase ($10\text{ }\mu\text{g/mL}$) e os tubos foram incubados a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 h. Por fim, o DNA foi quantificado usando *Nano Drop 2000* (Thermo Scientific, USA), e conservado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para uso posterior.

3.3.2 Clonagem no vetor de propagação

Como primeiro passo da clonagem, oligonucleotídeos foram desenhados utilizando o software *SnapGene*, para amplificação do gene *LafB* a partir do genoma bacteriano. Estes oligonucleotídeos apresentam as sequências forward: 5' **CGCGCATATGATGTTATACTATATAAG** 3' e reverse: 5' **TATACTCGAGCTAGTCCTTGACCTG** 3', e possuem sítios de restrição para as enzimas NdeI e XhoI (em negrito), respectivamente. A reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) foi feita com os oligonucleotídeos previamente desenhados e o DNA genômico extraído das linhagens de *E. faecium* HBSJRP 2.1 e 2.7, usando o *Kit Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen, EUA) (Tabela 1).

Tabela 1- Detalhes da reação PCR para a amplificação do gene *lafB* de *E. faecium*

Reagentes	Volume
DNA genômico	4 µL
Primer <i>forward</i> (10µM)	1 µL
Primer <i>reverse</i> (10µM)	1 µL
dNTP (10mM)	1 µL
MgSO ₄ (50mM)	1,5 µL
Tampão (10X)	5 µL
Taq Platinum High Fidelity (5 U/µL)	0,2 µL
Água	36,5 µL

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 2 - Condições usadas na PCR para a amplificação do gene *lafB* de *E. faecium*

Etapa	T (°C)	Tempo	Repetições
Denaturação inicial	94 °C	1 min	1
Denaturação	94 °C	30 s	35
Hibridização	52 °C	30 s	
Extensão	72 °C	1 min	1
Extensão final	72 °C	10 min	
Armazenamento	4 °C	Indeterminado	1

Fonte: Elaborada pela autora.

A PCR foi executada em um termociclador *T100 thermal cycler* (Bio-Rad, USA) nas condições descritas na Tabela 2. Para a confirmação da amplificação do gene *lafB*, que possui 1080 pb, foi feita uma eletroforese em gel de agarose 1%. O amplicon foi purificado usando o *Kit Agarose Gel Extraction* da Cellco Biotec seguindo as instruções do fabricante.

O vetor *pGEM[®]-T Easy* (Promega) foi selecionado para primeira etapa de clonagem do gene *lafB* de *E. faecium* por ser um vetor de alta eficiência que é capaz de gerar um alto número de cópias, permitindo a propagação do gene de interesse. Na sua estrutura (Figura 11), o vetor possui um gene de resistência a ampicilina e uma região de clonagem múltipla dentro da região codificadora (gene *lacZ*) da enzima β-galactosidase. A β-galactosidase é

encarregada de hidrolisar o composto X-gal que é adicionado ao meio de cultura, fazendo com que este seja metabolizado até a formação do corante azul 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo. A inserção do gene na região de clonagem impede a expressão da β -galactosidase e consequentemente, do corante, permitindo assim, a identificação de recombinantes por triagem de colônias azuis e brancas em placas indicadoras.⁴⁷

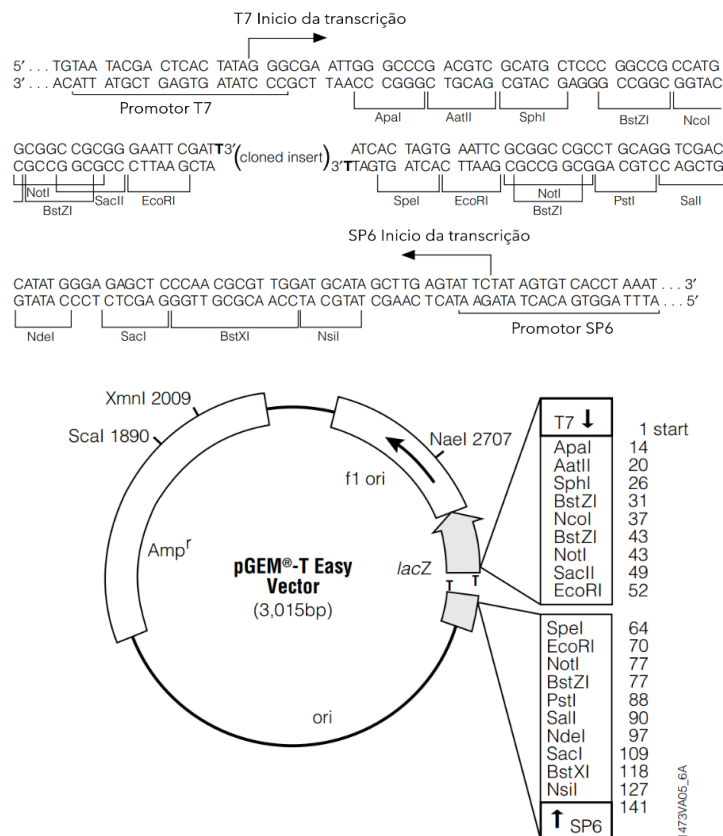


Figura 11 - Mapa e esquema do vetor *pGEM®-T Easy*.
Fonte: PROMEGA.⁴⁷

Além disso, o *pGEM®-T Easy* possui uma timina na região 3' -terminal em ambos extremos do sítio de inserção, o que melhora a eficiência da ligação dos produtos da PCR. Por conta dessas timidinas terminais, antes da reação de ligação, os extremos 5' do gene purificado foram adenilados seguindo os detalhes e condições descritos na Tabela 3. Em seguida, o gene *lafB* foi ligado ao plasmídeo de propagação utilizando a enzima T4 DNA Ligase (*Promega*) (Tabela 4).⁴⁷

Tabela 3- Condições da reação de adenilação do gene *lafB* de *E. faecium*

Reagentes	Volume	Condições
DNA	15 µL	
dATP (10mM)	0,6 µL	
MgCl ₂ (25mM)	3 µL	94 °C por 1 min
Tampão (10X)	3 µL	72 °C por 30 min
Taq Polimerase (U/µL)	0,5 µL	1 ciclo
Água	7,9 µL	

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 4 - Detalhes da reação de ligação do gene *lafB* ao vetor *pGEM[®]-T Easy*

Reagentes	Volume	Condições
DNA <i>lafB</i>	2 µL	
Vector (<i>pGEM[®]-T Easy</i>)	0,5 µL	20 °C
Tampão (10X)	5 µL	16h
T4 DNA Ligase (U/µL)	1 µL	
Água	1,5 µL	

Fonte: Elaborada pela autora.

Subsequente à ligação, células quimiocompetentes de *E. coli* DH5α foram transformadas com a construção do vetor. Para isso, adicionaram-se 20 µL do produto de ligação em um tubo contendo uma alíquota de 100 µL de células quimiocompetentes. As células foram colocadas em gel por 20 min e, em seguida, foi realizado um choque térmico para permitir a entrada do plasmídeo à célula. Para isso, o tubo foi colocado em banho-maria a 42 °C por 45-50 s, e, logo após, as células foram incubadas em gelo por 1 min. O tubo foi retirado do gelo e imediatamente misturado com 500 µL de meio LB (do inglês, *Lysogeny broth*). Então, as células foram levadas a incubação por 1 hora a 37 °C a 150 rpm.

Após incubação, a cultura foi centrifugada a 10000 xg por 1 min, o sobrenadante foi desprezado e 100µL das células foram semeados em uma placa com meio ágar LB

suplementado com 50 mg/ml de ampicilina (antibiótico de seleção), 0,5 mM IPTG e 80 µg/mL X-gal. As placas foram incubadas por 16h a 37 °C.

Após incubação, 5 colônias aleatórias de cada placa foram inoculadas em 5 mL de meio de cultura LB suplementado com ampicilina (50 mg/mL) e incubadas por 16 h a 37 °C e 150 rpm. No dia seguinte, foi feita a extração do plasmídeo das células transformadas utilizando o *Kit Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep* da *Cellco Biotec*. A partir das culturas das colônias, também foram feitas soluções estoques de 1 mL das células transformadas em glicerol 20% para serem armazenadas a -80 °C.

Com o propósito de confirmar a presença do gene no plasmídeo foi realizada uma digestão enzimática com *EcoRI* seguida de uma eletroforese em agarose 1%. O sítio de restrição desta enzima está presente no plasmídeo em ambas extremidades do inserto ligado.

3.3.3 Clonagem no vetor de expressão

Para expressar a proteína de interesse, o gene *lafB* foi clonado em vetor *pET28a* (*Novagen*).⁴⁸ O *pET28a* é um dos plasmídeos de expressão mais amplamente utilizado para a expressão de proteínas recombinantes em *Escherichia coli*. Este vetor possui o promotor T7 e um operon *lac* que suprime a expressão não induzida por isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Entre os sítios de restrição no *pET28a* estão as sequências específicas para as enzimas de restrição NdeI e XhoI, que também foram inseridas nos primers do gene *lafB* e permitirão a ligação por complementariedade das extremidades. A sequência codificadora a ser expressa é clonada em fase leitura junto a uma sequência codificadora para uma cauda de poli-histidina (His) para facilitar a purificação da proteína recombinante.⁴⁹⁻⁵⁰

O gene propagado em *pGEM[®]-T Easy* foi extraído do vetor de clonagem através de uma reação de digestão enzimática utilizando as enzimas NdeI (*Thermo Scientific*) e XhoI (*Thermo Scientific*), cujos sítios de restrição flanqueiam os extremos do gene. Informações acerca da reação são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Detalhes da reação de digestão com as enzimas NdeI e XhoI

Reagentes	Volume	Condições
Buffer 2X	2 μ L	
DNA (vetor contendo o gene)	5 μ L	37 $^{\circ}$ C
NdeI	1, 5 μ L	16h
XhoI	1,5 μ L	
Água	10 μ L	

Fonte: Elaborada pela autora.

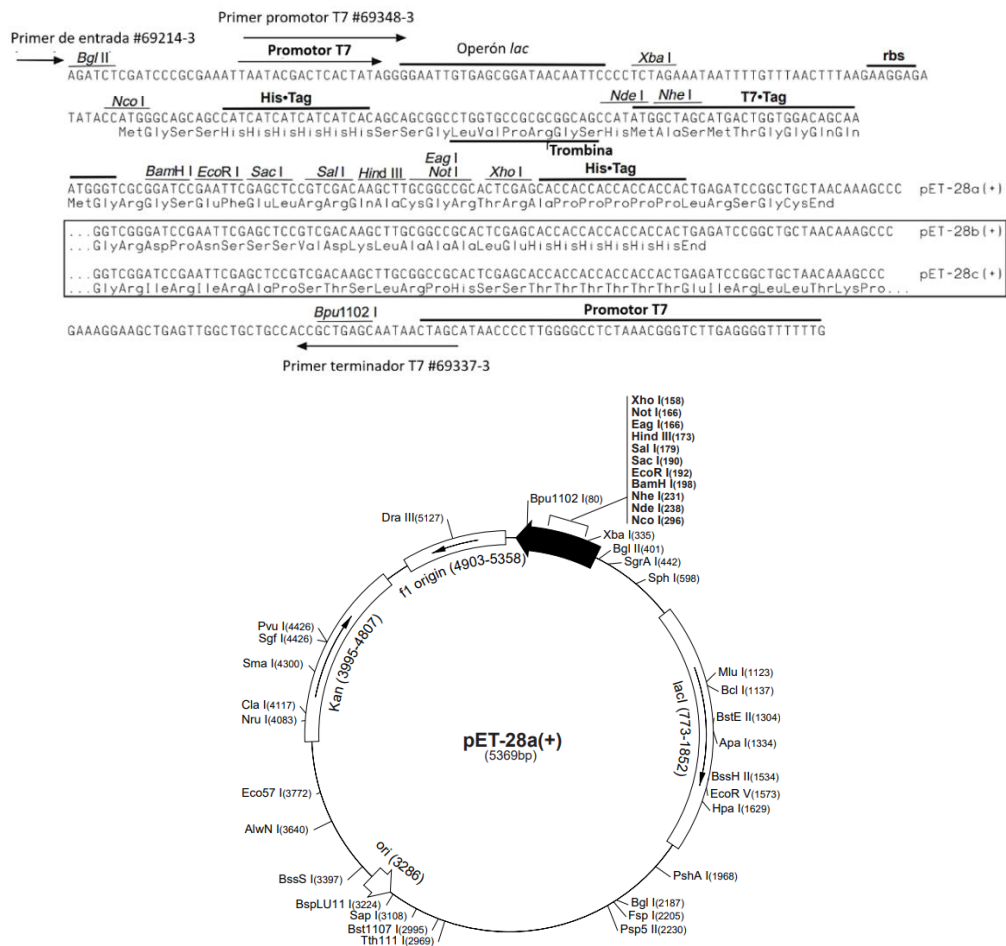


Figura 12 - Esquema e mapa do vetor de expressão *pET28a*.

Fonte: NOVAGEN⁴⁸

Após a reação, foi feita uma eletroforese de agarose 1%, com o objetivo de separar os produtos da digestão, mais especificamente, as bandas correspondentes ao vetor e ao gene. A

banda correspondente ao gene foi extraída do gel e o DNA foi purificado usando o *Kit Wizard SV Gel and PCR Clean Up System*.

Após a purificação do inserto, foi feita uma reação de ligação para ligar o gene (inserto) ao vetor *pET-28a* (Tabela 6)

Tabela 6 - Detalhes da reação de ligação do gene *lafB* ao vetor *pET28a*

Reagentes	Quantidade	Condições
DNA <i>lafB</i>	12 μ L	
Vector (pET-28a)	4 μ L	20 °C
Tampão (10X)	2 μ L	16h
Ligase (U/ μ L)	2 μ L	
Água	-	

Fonte: Elaborada pela autora.

Para a confirmação da ligação e armazenagem dos clones, células competentes de *E. coli* DH5 α foram transformadas com a construção *pET28a-lafB*. A transformação foi feita seguindo protocolo descrito previamente, e após a inserção do gene mediante choque térmico, as células foram semeadas em placas de ágar LB suplementadas com Kanamicina (50 μ g/mL) - antibiótico de seleção para *pET28a*. Foram selecionadas 10 colônias de cada placa semeada para serem sequenciadas, a fim de verificar se a construção do plasmídeo estava correta.

3.3.4 Expressão heteróloga

Para expressar heterologamente a proteína células quimiocompetentes da linhagem *E. coli Rosetta DE3* foram transformadas com a construção do plasmídeo *pET28a_lafB*. A transformação foi feita nas mesmas condições já descritas anteriormente mediante choque térmico e as células foram semeadas em placas de ágar LB suplementadas com antibióticos canamicina (50 μ g/mL) e cloranfenicol (34 μ g/mL), que são antibióticos de seleção para *pET28a* e para a linhagem *Rosetta DE3*, respetivamente.

Após a obtenção de células transformantes foi preparado um inóculo de 1 L de meio de cultura LB suplementado com canamicina (50 μ g/mL) e cloranfenicol (34 μ g/mL) e este foi incubado a 37 °C a 150 rpm até a DO₆₀₀ atingir entre 0,5 e 1. Quando a cultura atingiu os

valores de DO desejados, foram adicionados 200 μ L de 1M IPTG para cada litro de meio de cultura e a cultura foi incubada a 18 °C por 18h, a fim de induzir a expressão de proteínas.

Imediatamente após incubação, a cultura foi centrifugada a 3500 rpm por 45 min a 4 °C, e o *pellet* foi suspenso em 50 mL de Tampão A (Tabela 7). As células foram lisadas por ultrassonicação com uma configuração de 7 min com ciclos de 30 s e intervalos de 59 s. O produto da sonicação foi centrifugado por 45 min a 13500 rpm a fim de separar as partes solúveis e insolúveis, e então, o sobrenadante (solúvel) foi transferido a outro tubo e o *pellet* (insolúvel) foi suspenso em tampão. Com o objetivo de confirmar a expressão da proteína, foi realizada uma eletroforese em SDS-PAGE (do inglês, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Para isso, foi adicionado Tampão de amostra 5X (100mM Tris/HCl pH 6,8, 4% SDS, 0,2% azul de bromofenol, 20% glicerol, 5mM DTT) a alíquotas do sobrenadante e do *pellet* e, em seguida, as amostras foram fervidas durante 5 min em banho-maria. Por fim, as mesmas foram carregadas nos poços de um gel de poliacrilamida 12%, e a eletroforese foi feita a 90V, 400 mA durante 1h aproximadamente.

Tabela 7 - Tampões usados na proteína LafB

Tampão	Componentes
A. Tampão de lise	25mM HEPES, 400mM NaCl, 10% glicerol, 5 mM β - Mercaptoetanol, 0,05% Tween 20, pH 7,5
B. Tampão de exclusão	25mM HEPES, 300mM NaCl, 10% glicerol, 5 mM β - Mercaptoetanol, pH 7,5
C. Tampão fosfato	140mM NaCl, 7mM Na ₂ HPO ₄ , 2,5 mM NaH ₂ PO ₄ H ₂ O

Fonte: Elaborada pela autora.

3.3.5 Purificação usando cromatografia por afinidade

A cromatografia por afinidade é um método de purificação de moléculas que se baseia na interação específica e reversível de uma proteína a um ligante imobilizado à matriz ou resina. O ligante pode interagir diretamente à proteína ou a uma cauda ligada covalentemente a proteína. Esta interação permite imobilizar a proteína alvo na resina enquanto as proteínas contaminantes são eliminadas por lavagem. Posteriormente, é feita a eluição da proteína de interesse desfazendo a interação entre a proteína e o ligante mediante competitividade com outro ligante de maior afinidade (Figura 13).⁵¹

Para a purificação por afinidade da LafB foi utilizada uma coluna de resina que contém níquel imobilizado. O sobrenadante foi carregado na coluna para que, a proteína que possui uma cauda de histidina se ligue ao níquel da resina. Esta primeira fração foi recuperada e armazenada. Subsequentemente, foram passadas 5 diluições de Imidazol preparado com tampão A, na seguinte ordem: 15 mL a 10 mM, 15 mL a 50mM, 10 mL a 100 mM, 10 mL a 250 mM, 10 mL a 500 mM. A passagem do imidazol pela coluna permitiu a eluição da proteína que se encontrava ligada ao níquel. Para observar os resultados da purificação foi realizada uma eletroforese SDS-PAGE de todas as frações eluídas.

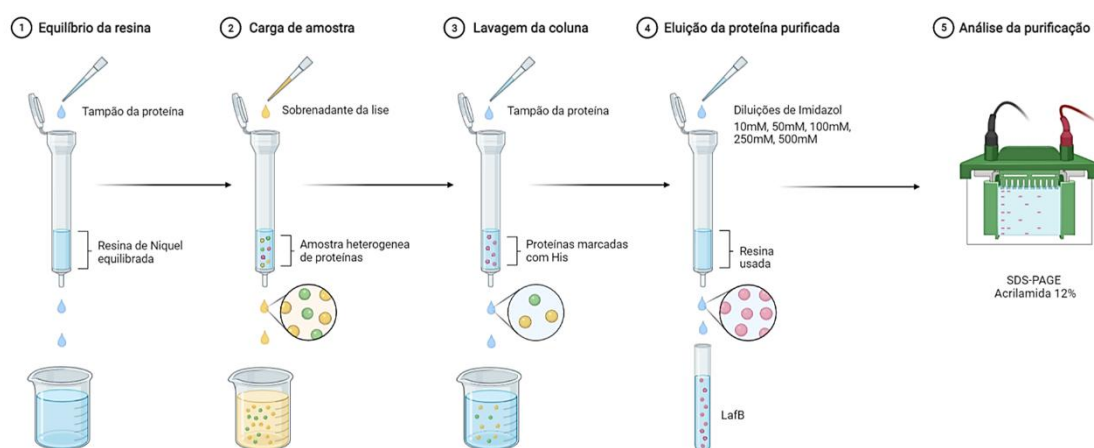


Figura 13 - Esquema de purificação da cromatografia por afinidade da proteína LafB de *E. faecium*.
Fonte: Elaborada pela autora.

3.3.6 Purificação usando cromatografia por exclusão de tamanho (SEC)

Na segunda etapa de purificação, foi feita uma cromatografia de exclusão por tamanho (SEC, do inglês *size exclusion chromatography*) também conhecida como cromatografia em gel, filtração em gel e cromatografia de permeação em gel. A SEC é um método de purificação que tem como princípio a separação das moléculas por tamanhos, mediante a filtração através de um gel composto por pérolas esféricas porosas. As moléculas pequenas se difundem pelos poros e se retardam devido ao seu tamanho, enquanto as moléculas maiores não entram nos poros e se eluem previamente da coluna. Assim, as moléculas são eluídas em ordem decrescente da sua massa molecular (Figura 14).⁵²⁻⁵³

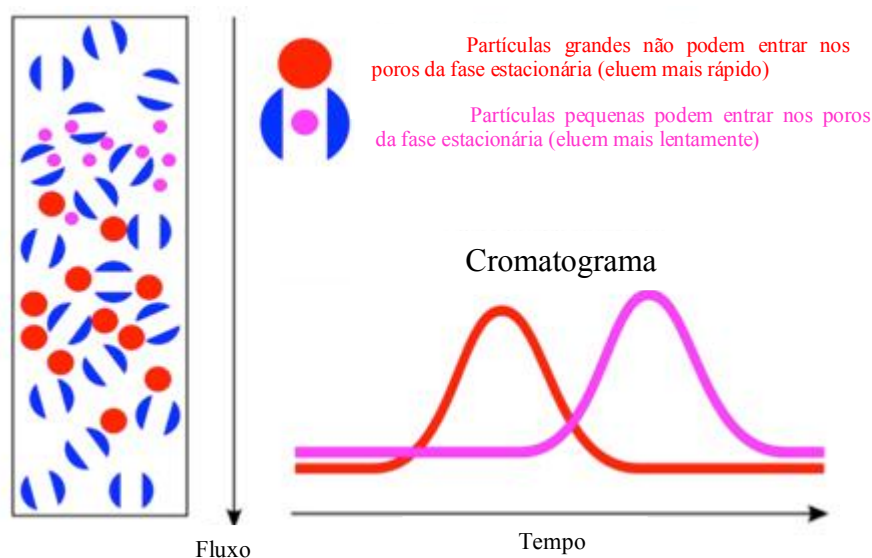


Figura 14 - Esquema da coluna de cromatografia de exclusão por tamanho (SEC).
 Fonte: Adaptada de CREATIVE PROTEOMICS PRONALYSE.⁵³

A proteína LafB 2.7 foi purificada em uma coluna *HiLoad 16/600 Superdex 200 prep. grade* previamente equilibrada com tampão B (25mM HEPES, 300mM NaCl, 10% glicerol, 5 mM β -Mercaptoetanol, pH 7,5). No *AKTA purifier (GE Healthcare, USA)* foi injetado um volume de 2 mL da proteína purificada por cromatografia por afinidade, e a SEC foi realizada sob fluxo de 1 mL/min, monitorando a presença da proteína LafB com absorvância de 280_{nm} e coletando frações de 1 mL. As frações coletadas pelo equipamento foram analisadas mediante eletroforese SDS-PAGE, usando géis de poliacrilamida a 12%.

3.3.7 Cromatografia de exclusão de tamanho acoplada ao espalhamento de luz multiangulares (SEC-MALS)

A determinação da massa molecular de uma proteína e os estados oligoméricos nos quais ela é encontrada é essencial para sua caracterização. A cromatografia de exclusão por tamanho acoplada ao espalhamento da luz multiangular, conhecida como SEC-MALS é considerada um método absoluto para a determinação da massa molecular e o estado oligomérico da proteína quando combinada com um detetor de índice de refração diferencial (dRI). A SEC é usada unicamente com o intuito de separar as diversas espécies na solução do analito, para que entrem nas celas dos detetores individualmente. Já o detetor MALS é encarregado de medir a proporção de luz dispersada em múltiplos ângulos por um analito em relação com o raio laser incidente determinando assim a massa molecular da molécula independentemente do tempo de eluição (Figura 15).⁵⁴⁻⁵⁵

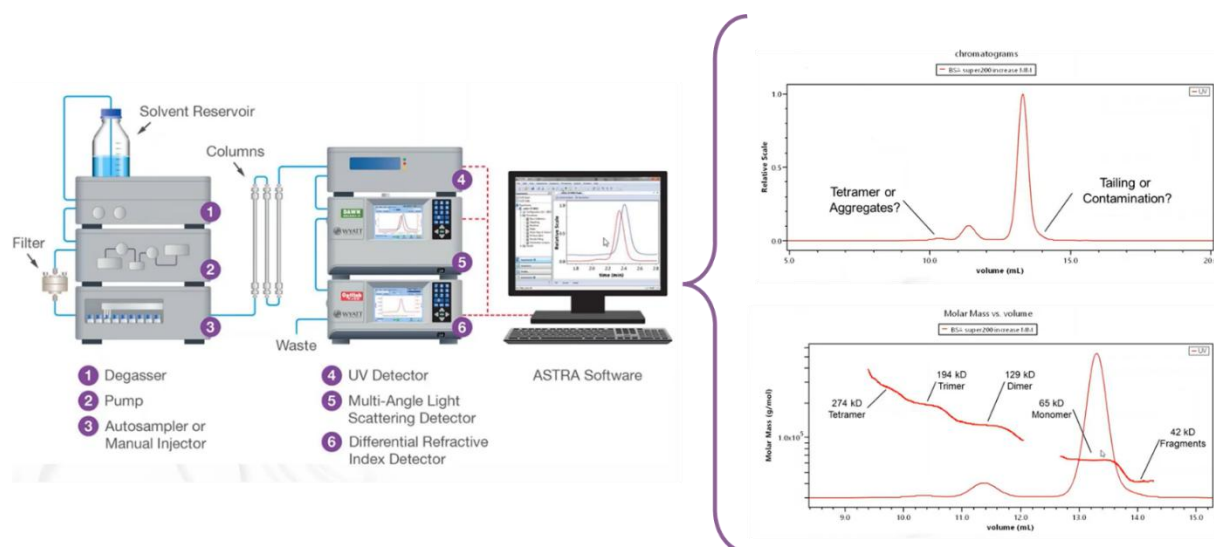


Figura 15 - Esquema da cromatografia de exclusão de tamanho acoplada ao espalhamento de luz multiangulares.
Fonte: SOME⁵⁵

A SEC foi realizada usando uma coluna Superdex 200 10/300 GL (*GE Healthcare*, USA) equilibrada com 20 mM Tris (pH 7.8), 300 mM NaCl. O MALS foi feito usando um equipamento de dispersão de luz *Wyatt miniDAWM-TREOS* (*Wyatt Technology*, USA) a um comprimento de onda de 659 nm e um detector de índice de refração *Wyatt OptilabT-rEX* (*Wyatt Technology*, USA) a um comprimento de onda de 657,5 nm.

3.3.8 Dicroísmo Circular (CD)

A espectroscopia de dicroísmo circular (CD, do inglês *Circular Dichroism*) é utilizada para caracterizar e quantificar o conteúdo estrutural secundário em termos de estrutura α -helicoidal, fita- β e regiões desestruturadas. Um espectropolarímetro de CD consta de uma fonte de luz polarizada circularmente (CPL, do inglês *circularly polarized light*) monocromática à esquerda e à direita e um detetor para registrar a diferença de absorvância das duas polarizações da luz (Figura 16), no entanto, embora os espectropolarímetros de CD meçam a absorvância diferencial, eles produzem um espectro de CD em unidades de elipticidade (θ).⁵⁶⁻⁵⁷

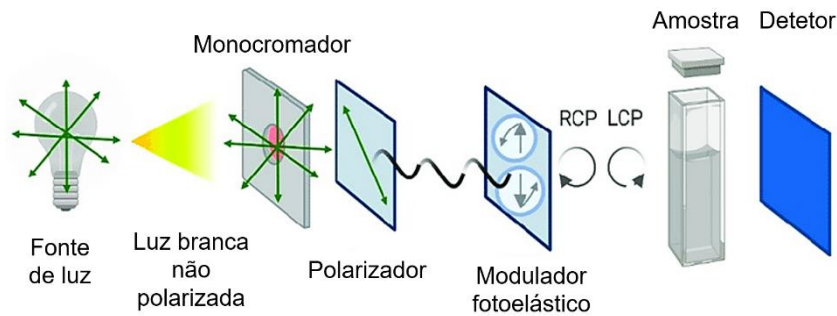


Figura 16 - Esquema do Dicroísmo Circular.
 Fonte: Adaptada de PIGNATARO *et al.*⁵⁸

O espectro do CD é derivado da diferença na absorção da CPL esquerda e direita que emerge da amostra opticamente ativa conhecida também como cromóforo.⁵⁸ Um cromóforo é considerado ativo se é quiral, está unido covalentemente a um centro quiral, ou se está situado em um entorno quiral devido à estrutura tridimensional da molécula. Essa última situação é correspondente ao grupo da espinha dorsal peptídica, que é o cromóforo de maior interesse na proteína.⁵⁹ Quando o espectro da luz (que é constante) atravessa um cromóforo ativo aparece uma flutuação de intensidade, correspondente às diferentes absorções de CPL esquerda e direita. Como o espectro CD representa a soma dos sinais de todos os cromóforos peptídicos na mostra, é possível, mediante esses parâmetros, determinar a proporção de estruturas α -helicoidais e fitas- β ou de regiões desestruturadas pois elas geram um perfil característico de transições (Figura 17).⁶⁰

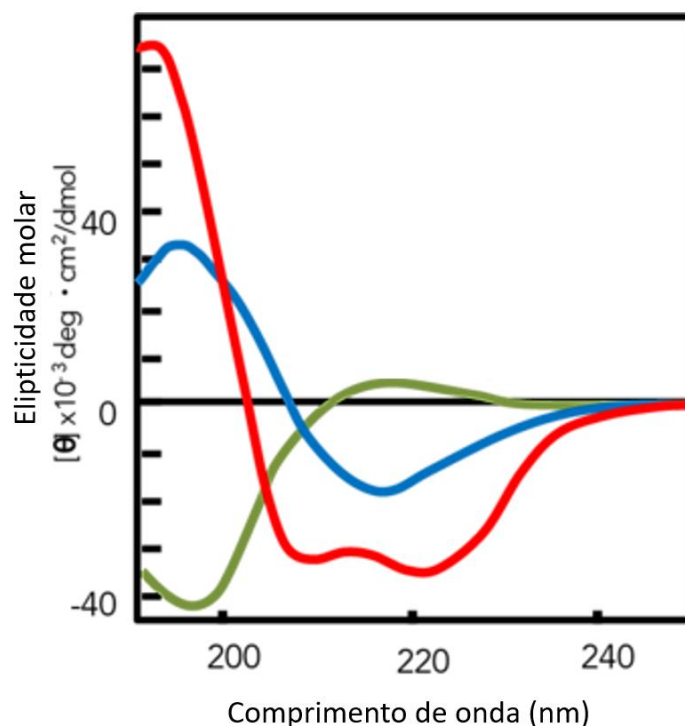


Figura 17 - Espectro de CD no UV –distante. Espectro CD de proteína de hélice α (vermelho). Espectro CD de proteína de fita β (azul), Espectro CD de proteína desestruturada (verde).
Fonte: Adaptada de GREENFIELD; FASMAN.⁹⁹

Com o objetivo de estudar o enovelamento da proteína LafB, uma amostra de proteína foi submetida a um processo de *desalting* usando uma coluna *HiTrap® 5 mL* (*Sigma-Aldrich*, USA) e o Tampão C (Tabela 7), pois tampões com alta concentração de sais atrapalham a especificidade do teste.⁵⁷ Em seguida a amostra foi diluída a uma concentração de 0,25 mg/mL e foi analisada usando o espectrômetro *J-815 CD* (*Jasco*, Brasil) do Grupo de Biofísica e Biologia Estrutural - Prof. Sérgio Mascarenhas, do Instituto de Física de São Carlos, monitorando no intervalo de comprimento de onda 200 – 280 nm com uma resolução de 0,5 nm a 15 °C.

Da mesma forma, é possível determinar, através do CD, a temperatura na qual exatamente a metade das moléculas na solução se encontraram em estado desenovelado (Temperatura de melting (T_m)).

Com o propósito de analisar o efeito da temperatura no enovelamento e a determinação da T_m da proteína LafB, uma amostra de proteína em Tampão C (Tabela 7) foi diluída a uma concentração de 0,25 mg/mL e submetida ao experimento. Assim, foi aplicado a um gradiente de temperatura de 16 °C a 54 °C com incrementos consecutivos de 2 °C e com equilíbrio de 1 min prévio a cada medição. A amostra foi monitorada a 222 nm.

3.3.9 Ensaio de cristalização

Até o momento, a estrutura da proteína LafB de *E. faecium* não foi resolvida completamente e, por isso, foi de nosso interesse realizar ensaios de cristalização, a fim de obter cristais e resolver sua estrutura através da técnica de difração de raio-X. Na tentativa de alcançar esse objetivo, foi empregada uma das técnicas mais utilizadas para cristalização de macromoléculas: a técnica de difusão de vapor por gota sentada automatizada. Por meio desta técnica, uma gota de proteína purificada e concentrada a 2, 3, 5 e 12 mg/mL em tampão B foi injetada pelo robô *Crystal Gryphon* (Art Robbins Instruments, USA) conforme mostrado na figura 18.⁶¹ O experimento foi realizado em diversas condições de cristalização oferecidas pelos kits comerciais: *Salt Rx* (Hampton Research), *Crystal screen* (Hampton Research), *The Classic Suite* (Qiagen), *JCSG* (Molecular dimensions) e *Morpheus* (Molecular dimensions). Após montagem do experimento, as placas foram incubadas a 18 °C.

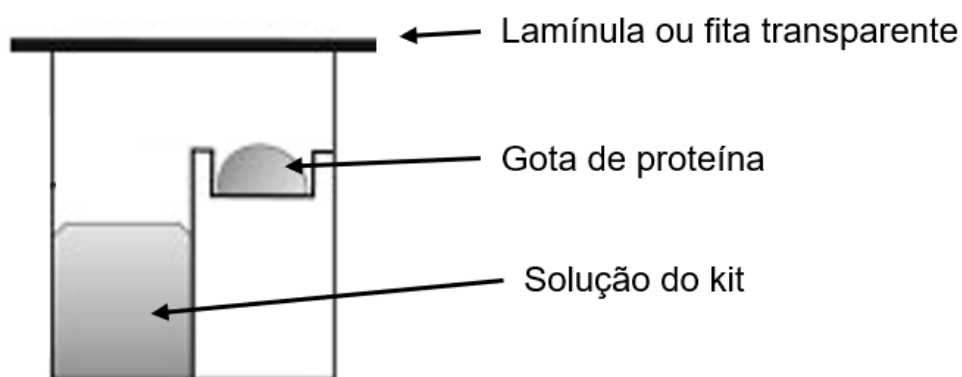


Figura 18 - Esquema da técnica de gota sentada utilizada com a proteína LafB de *E. faecium* nos ensaios de cristalização.

Fonte: Adaptada de MARK *et al.*⁶¹

3.4 Análise *in-silico* da glicosiltransferase LafB

3.4.1 Predição da estrutura da proteína com *AlphaFold*

Com a finalidade de entender os efeitos da mutação na estrutura da LafB, uma predição da sua estrutura foi gerada através do programa *AlphaFold* em colaboração com o Dr. Humberto D'Muniz Pereira do Grupo de Biofísica e Biologia Estrutural do Instituto de Física de São Carlos - USP. O programa *AlphaFold* utiliza inteligência artificial, combinando métodos de predição *in-silico* e de informações estruturais disponíveis no banco de dados

PDB, sendo capaz de prever, com grande precisão, as coordenadas 3D dos átomos de uma proteína específica, usando como *inputs* a sequência de aminoácidos da proteína de interesse, assim como sequências alinhadas com proteínas homólogas.⁶²

A sequência da LafB, depositada no *GenBank* com o código WP_002287604.1,⁶³ foi utilizada na predição usando a ferramenta *ColabFold* que é uma extensão online do software *AlphaFold2*.⁶⁴ Os parâmetros de entrada selecionados para a predição foram: *MMseqs2 (Uniref + Ambiental) msa_mode; unpaired + paired pair_mode automatic model_type*; e *3 run_recycles*, obtendo 5 modelos finais. A confiabilidade dos modelos foi avaliada pelos parâmetros IDDT (do inglês, *Local Distance Difference Test*),⁶⁵ que mede a porcentagem de distâncias interatômicas corretamente preditas, e PAE (do inglês, *Predicted Aligned Error*) que mede a confiança nas posições relativas de pares de resíduos ao longo da estrutura, além disso se usou o *software online Verify3D* (<https://saves.mbi.ucla.edu/>) que mede a compatibilidade do modelo 3D da proteína com sua sequência pontuando cada resíduo de maneira que valida o entorno de cada um deles, a somatória de todas as pontuações dos resíduos gera uma pontuação do perfil 3D, para os modelos de proteínas que se sabe que são corretos, a pontuação do perfil 3D é alta.⁶⁶⁻⁶⁷ As figuras da estrutura foram geradas com o sistema de visualização molecular *PyMol v2.05* (*Schrödinger, LLC*).⁶⁸

Com o intuito de achar domínios de proteína conhecidos na estrutura da LafB, também foi feita uma busca de motivos utilizando a ferramenta online *MOTIF Search* que utiliza as bases de dados PROSITE, NCBI-CDD e Pfam.⁶⁹

3.4.2 Docking molecular

Embora não existam muitas informações acerca do substrato da proteína LafB em *E. faecium*, sabe-se que há proteínas em outras bactérias gram-positivas que também cumprem a função de glicosiltransferase para a síntese de LTA. Estas são encarregadas de transferir o segundo açúcar na formação da âncora do LTA. Algumas das proteínas são: LafB de *Listeria monocytogenes*, YpfP de *S. aureus* e BgsA de *E. faecalis*, entre outras mostradas na Figura 19. Todas elas apresentam como substrato uma molécula de difosfato de uridina (UDP) ligada a uma molécula de glicose ou galactose, que será adicionada ao monoglicosíldiacilglicerol (Glc-DAG).^{22,70}

Considerando essas informações utilizando o *software AutoGridFR*⁷¹ fizemos uma busca da região com maior probabilidade de ser considerada o sítio ativo na glicosiltransferase LafB, fizemos um *docking* molecular utilizando o mesmo *software*, e acoplamos nela a estrutura de uma molécula de difosfato de uridina galactose (UDP-Gal). As

interações ligante-proteína foram determinadas com o software *Discovery Studio Visualizer* V21.1.0.⁷²

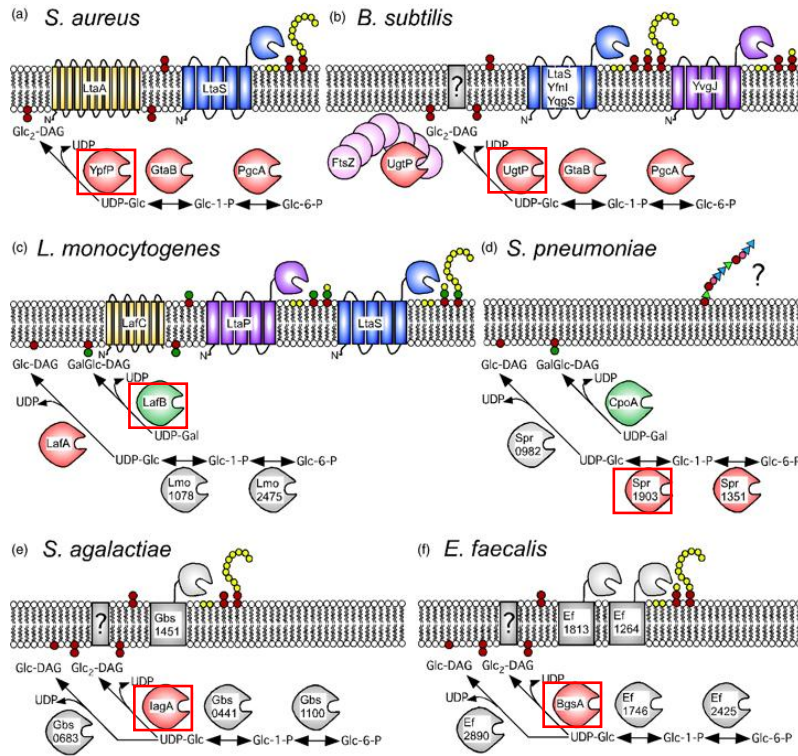


Figura 19 - Representação esquemática de enzimas envolvidas na síntese de precursores de glicolipídios, glicolipídios e/ou cadeia principal de LTA em diferentes bactérias gram-positivas. As enzimas marcadas em um quadrado vermelho são as proteínas que cumprem a mesma função que a LafB em *E. faecium*.

Fonte: Adaptada de REICHMANN; GRÜNDLING.⁷⁰

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização fenotípica

4.1.1 Determinação da concentração mínima inibitória (CIM)

As amostras inicialmente armazenadas a -80 °C nas dependências do Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Moleculares (LEMiMo) do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, tiveram as sensibilidades esperadas para daptomicina das linhagens de *E. faecium* do HBSJRP 18_2.1 e HBSJRP 18_2.7, atingindo CIMs de 0,125 mg/mL e 2 mg/mL, respectivamente.

A fim de determinar a sensibilidade ou resistência das bactérias aos antibióticos, pontos de corte da CIM de um antibiótico são estabelecidos por instituições internacionais como o *Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI)*, e o *Comitê Europeu de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana (EUCAST)* e nacionais como o *Comitê Brasileiro de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana (BrCAST)*. No entanto, embora a daptomicina seja usada cada vez mais no tratamento de infecções enterocócicas de corrente sanguínea e endocardites, o EUCAST reconhece que ainda existem incertezas entre os testes de sensibilidade de daptomicina para *E. faecium* e o desfecho clínico, portanto ainda nem o EUCAST e nem o BrCAST têm estabelecido pontos de corte clínicos para esse antibiótico e é considerado como “IE= evidência insuficiente” nos documentos oficiais. Sob outra perspectiva, o CLSI estabelece ≤ 4 mg/mL como ponto de corte “sensível dependente da dose” para DAP em *E. faecium*.^{33,73-74}

Baseados na pesquisa de *Streit et al.*,⁷⁵⁻⁷⁶ que analisaram mais de 150 isolados clínicos de *E. faecium* provenientes de Europa, América do Norte e América do Sul, e acharam a CIM para daptomicina de 2 mg/mL como a mais comum e a CIM $< 0,12$ como significativamente menos comum, determinamos que a linhagem HBSJRP 18_2.7 encaixa na descrição de “sensibilidade normal” (CIM = 2 mg/L) e devido à diminuição de sensibilidade em aproximadamente 16 vezes, a linhagem HBSJRP 18_2.1 foi considerada como “supersensível” (CIM = 0,12 mg/L). A curva dose-resposta mostrou o comportamento esperado onde se observa a inibição do crescimento bacteriano em quanto as concentrações de daptomicina aumentam (Figura 20).

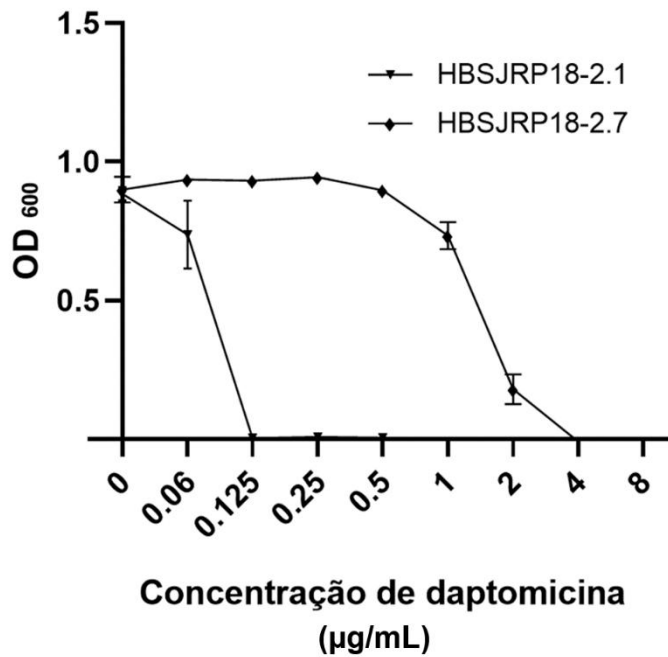


Figura 20 - Curva dose-resposta de *E. faecium* e daptomicina.
Fonte: Elaborada pela autora

4.1.2 Curva de crescimento

Os tempos de duplicação achados foram 281 ± 11 e 360 ± 30 min para as linhagens HBSJRP 18_2.7 e HBSJRP 18_2.1, respectivamente. A diferença entre os tempos de duplicação da linhagem com sensibilidade normal (2.7) e supersensível (2.1) foi estatisticamente significativa ($p= 0.03$), é possível observar na curva como a linhagem 2.7, mesmo iniciando com uma DO levemente menor, ao possuir um tempo de duplicação menor, atinge a curva da linhagem supersensível na fase exponencial (Figura 21).

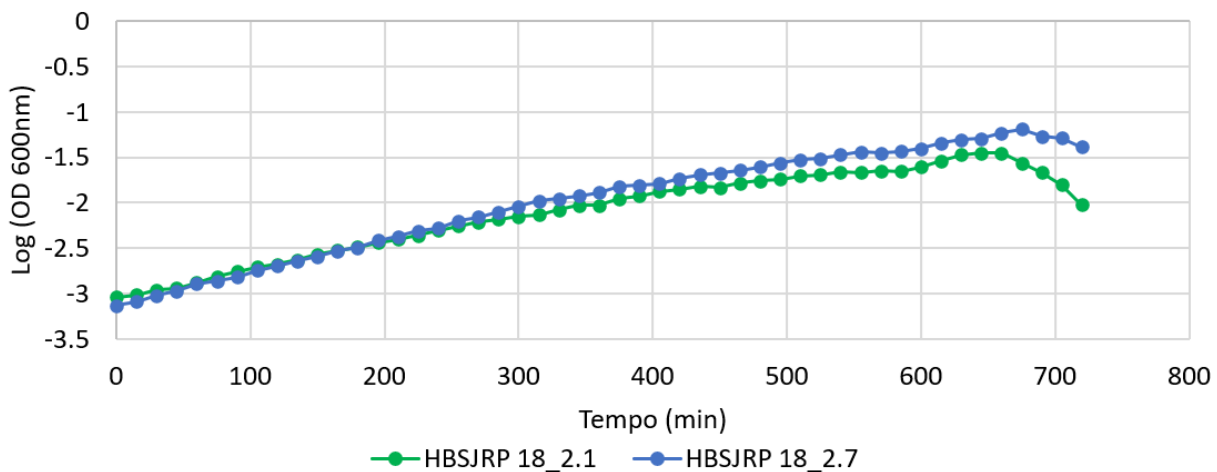


Figura 21 - Curva de crescimento das linhagens de *E. faecium* HBSJRP 18_2.7 (azul) e HBSJRP 2.1 (verde).
Fonte: Elaborada pela autora

A linhagem mutada e supersensível (2.1) obteve também um menor crescimento em comparação à linhagem que possui uma sensibilidade normal (2.7) à daptomicina. Em vista de que a glicoproteína LafB cumpre um papel iniciador na formação do LTA da parede bacteriana⁷⁰ é provável que a mutação no *lafB* seja responsável por afetar o crescimento bacteriano diminuindo-o significativamente.

4.1.3 Formação de biofilme

Apesar de haver uma tendência da linhagem HBSJRP 18_2.7 formar mais biofilme que HBSJRP 18_2.1, a Análise de Variância demonstrou que não há diferença significativa entre os biofilmes formados por estas duas linhagens ($p=0.08$) (Figura 22). Nesse sentido, em vista de que a diferença entre as linhagens 2.1 e 2.7 é uma mutação no gene *lafB* e que não houve diferença significativa entre as médias dos experimentos, podemos afirmar que a mutação não alterou a capacidade de formação de biofilme em relação a linhagem normal 2.7.

Em comparação à redução significativa observada na capacidade de formação de

Figura 22 - Formação de biofilme das linhagens de *E. faecium* HBSJRP 18_2.1 e HBSJRP 18_2.7.
Fonte: Elaborada pela autora.

biofilme em bactérias de *E. faecalis* que não expressavam a proteína BgsA (funcionalmente homóloga a LafB em *E. faecalis*) a linhagem HBSJRP 18_2.1 apresentou uma redução não significativa na capacidade de formação de biofilme, talvez, devido a presença de apenas uma mutação na sequência de aminoácidos e não de uma deleção total do gene *lafB*. Consideramos

interessante no futuro avaliar a capacidade de formação de biofilme em ausência da expressão da proteína LafB de *E. faecium*.

4.1.4 Microarranjos de fenótipo microbiano com o sistema OmniLog®

Com o intuito de pesquisar mais sobre as diferenças no perfil fenotípico e metabólico das linhagens HBSJRP 18_2.1 e HBSJRP 18_2.7, foi realizado um *screening* que testa diversas condições de crescimento bacteriano (Figura 23).

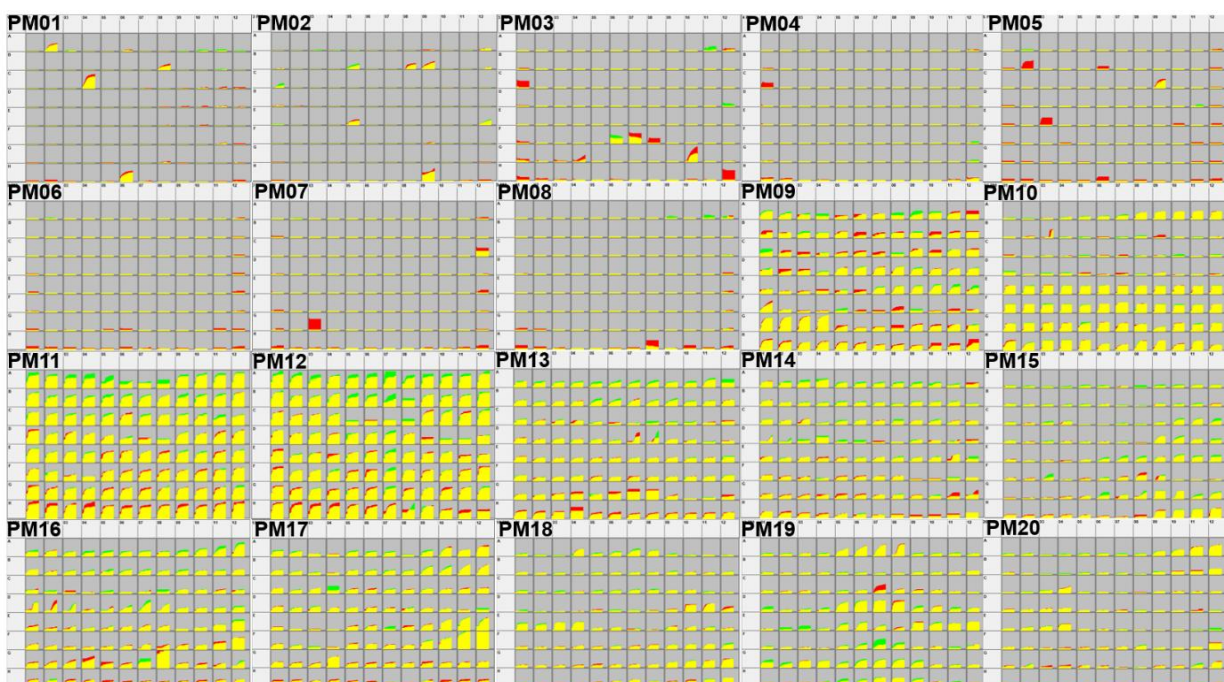


Figura 23 - Curvas de crescimento resultantes após 48h de incubação dos PM em *E. faecium* HBSJRP 18_2.7 (em verde, linhagem de referência) e HBSJRP 18_2.1 (em vermelho, linhagem mutada). Em amarelo mostra-se a convergência das duas curvas.

Fonte: Elaborada pela autora

Na placa PM 10 (Figura 24), que avalia o crescimento das linhagens frente a variações de pH se observou na linha A da placa que as duas linhagens crescem melhor conforme o pH do meio aumenta sem diferença significativa entre elas. Além disso, nos poços subsequentes com meio suplementado com os aminoácidos nos pH 4.5 e 9.5, observa-se que as duas linhagens apresentaram ótimo crescimento a pH 9.5 e, pelo contrário, nos poços de pH 4.5 as linhagens, em geral, não cresceram.

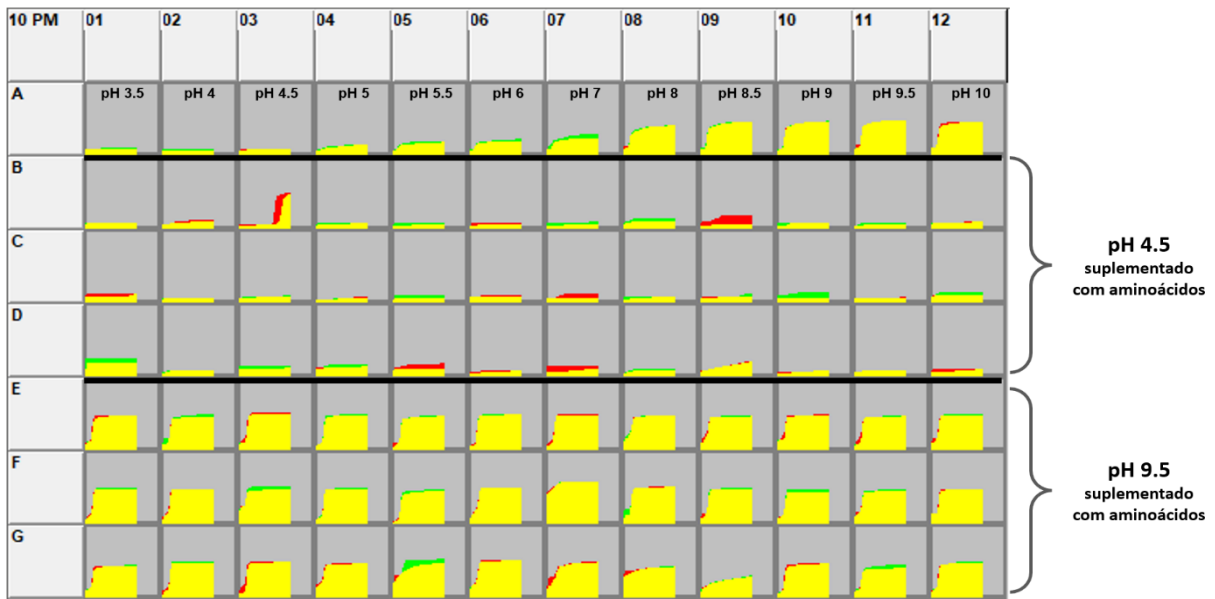


Figura 24 - Curvas metabólicas das linhagens de *E. faecium* HBSJRP 18 – 2.1 (Vermelho) e HBSJRP 18 – 2.7 (Verde). A. Umbeliferona, B. Blastocidin S. A área de interseção das curvas está representada em amarelo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Esses resultados são concordantes com a já relatada resistência de *Enterococcus spp.* a ambientes altamente alcalinos que normalmente inibiria o crescimento de outras bactérias.^{25,77-78} E além disso, os resultados reforçam a confiabilidade do experimento.

Nas placas de PM11 e PM12 que possuem antibióticos principalmente das famílias dos aminoglicosídeos, tetraciclina, penicilina, polimixinas, quinolonas e cefalosporinas (Anexo A) se observou o notório crescimento das duas linhagens, e não foi achada diferença significativa entre elas. O fato das linhagens crescerem apesar da presença desses antibióticos não é raro, pois esta espécie possui muita resistência intrínseca e este isolado é de origem clínica, com vários genes de resistência adquiridos.³⁸ Adicionalmente, os resultados mostram que a mutação em *lafB* não causou mudanças significativas na resistência da bactéria a esses compostos.

Por outro lado, o Software *OmniLog*[®] *PM* mostrou diferença metabólica significativa entre as linhagens, em presença de umbeliferona e blastocidin S, sendo que a linhagem HBSJRP 18_2.1 mutada cresceu melhor na presença do primeiro substrato. Já HBSJRP 18_2.1 cresceu significativamente menos na presença de blastocidin S. A umbeliferona ou também conhecida como 7-hydroxycoumarina é um composto aromático encontrado em várias espécies vegetais que possui atividade antimicrobiana e antifúngica.⁷⁹⁻⁸⁰ O mecanismo

de ação de este antimicrobiano ainda não foi dilucidado, mas, estudos com microscopia de transmissão mostraram que o composto age destruindo a membrana celular.⁸¹ Nossos resultados mostram que a linhagem mutada é significativamente mais resistente a este composto antimicrobiano e como a mutação acontece em uma proteína envolvida na formação do LTA da parede celular, consideramos razoável que as mudanças que acontecem na envoltura celular da bactéria tenham provocado esse ganho significativo de resistência em comparação à linhagem de referência HBSJRP 18_2.7.

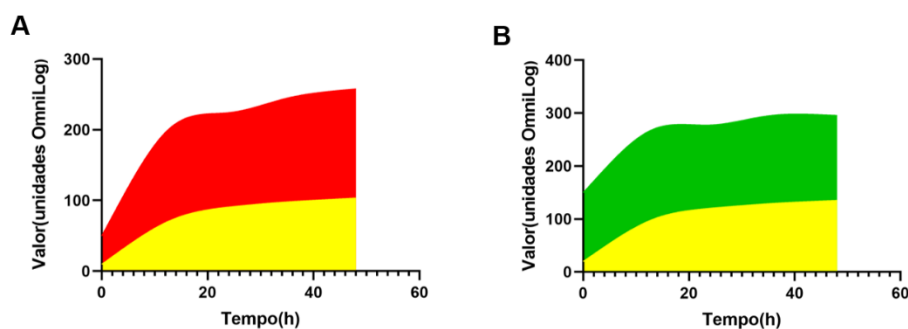


Figura 25 - Curvas metabólicas das linhagens de *E. faecium* HBSJRP 18 – 2.1 (Vermelho) e HBSJRP 18 – 2.7 (Verde). A. Umbeliferona, B. Blastidicin S. A área de interseção das curvas está representada em amarelo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em comparação à linhagem HBSJRP 18_2.7, a linhagem mutada apresentou um ganho significativo de sensibilidade a blasticidin S, que é um antibiótico produzido por *Streptomyces griseochromogenes* capaz de inibir o crescimento de bactérias e fungos utilizando o mecanismo de inibição da síntese proteica dobrando o extremo 3' do tRNA do sítio P ao sítio A da unidade ribossômica grande.⁸² Blasticidin S possui uma carga positiva geral a pH neutro, o que poderia ser utilizado (como na DAP), como mecanismo para se aproximar a membrana bacteriana. No entanto, para exercer sua ação, o antibiótico deve atravessar a membrana para agir no tRNA, usando transportadores de membrana específicos como NorA em *S. aureus*. Embora a bomba de efluxo NorA tenha sido considerada parte dos mecanismos de resistência a fármacos como levofloxacina, ciprofloxacina e norfloxacina, um estudo demonstrou que a blasticidin S aproveita essa bomba para atravessar a membrana e atingir seu alvo.⁸³ Em *E. faecalis* há uma bomba de efluxo chamada EmeA, homóloga a NorA,⁸⁴ e é provável que alterações no envoltório celular possa alterar sua atividade. No entanto, mais pesquisas são necessárias para entender como a mutação na LafB poderia estar envolvida no aumento de sensibilidade a blasticidin S em *E. faecium* HBSJRP 18_2.1. A

análise com o OmniLog[®] é uma triagem geral dos fenótipos e todas as implicações das diferenças metabólicas significativas achadas entre as linhagens HBSJRP 18_2.1 e HBSJRP 18_2.7 precisam ainda ser estudadas para entender melhor as mudanças metabólicas observadas.

4.2 Avaliação da virulência *in-vivo* em modelo de *Galleria mellonella*

Visto que o modelo de morte de larvas de *G. mellonella* é usualmente usado para avaliar a virulência de *E. faecalis*⁸⁵⁻⁸⁷ e *E. faecium*⁸⁸⁻⁸⁹ Experimentos foram feitos seguindo o mesmo modelo com as linhagens de *E. faecium* HBSJRP 18_2.1 e HBSJRP 18_2.7 para investigar se a mutação em *lafB* causou alguma mudança na virulência de *E. faecium*.

Os resultados mostraram que a linhagem mutada HBSJRP 18_2.1 sofreu uma perda significativa de virulência em comparação à linhagem HBSJRP 18_2.7 (Figura 26).

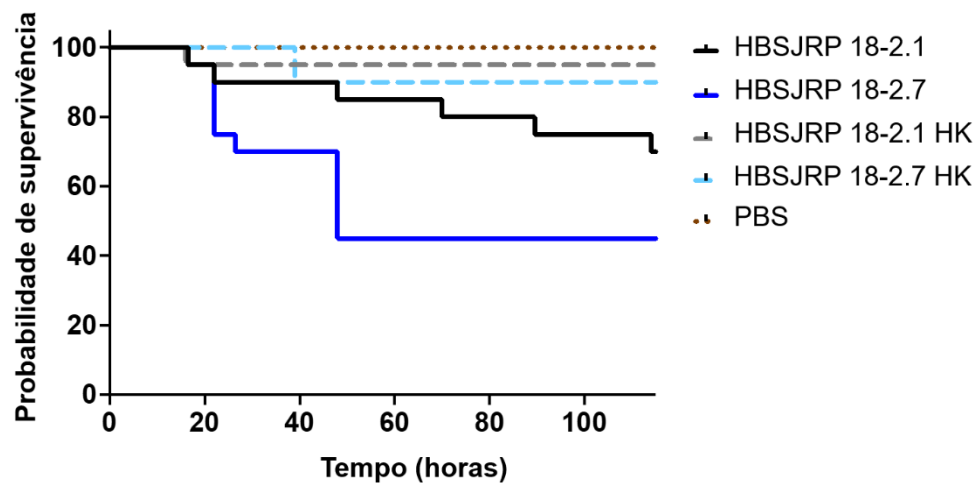


Figura 26 - Gráficos de Kaplan-Meier das larvas que receberam injeções de *E. faecium* HBSJRP 18_2.1 (mutada) e HBSJRP 18_2.7 (normal). Os experimentos foram realizados em triplicatas e os resultados são representativos de um experimento típico. Comparada com a linhagem normal HBSJRP 18_2.7, a linhagem com *lafB* mutado HBSJRP 18_2.1 demonstrou virulência atenuada com uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0.0001$).

Fonte: Elaborada pela autora.

Nossos resultados coincidem com o reportado por *Theilacker et al.*²¹ em um modelo de infecção de *E. faecalis* em camundongos, onde se observou uma diminuição significativa da virulência de uma linhagem de *E. faecalis* que não produzia a proteína (BgsA) homóloga à LafB de *E. faecium*, os resultados desse estudo²¹ sugerem que essa perda parece ser consequência do esgotamento do

DGlcDAG (molécula formada pelas proteínas BgsA e LafB) ou a alteração no comprimento do LTA, que ocorre na parede celular em ausência da glicosiltransferase BgsA.

4.3 Purificação da glicosiltransferase LafB para testes biofísicos

4.3.1 Purificação da glicosiltransferase LafB usando cromatografia por afinidade e cromatografia por exclusão de tamanho

As proteínas LafB nativa e mutada foram expressadas em níveis esperados, apesar de que, ao contrário da proteína nativa, a proteína mutada se apresentou em maior quantidade na fração insolúvel. Ainda assim, tentativas de purificação foram realizadas com a fração solúvel de ambas proteínas.

A proteína nativa foi purificada com sucesso nas eluições de 100 e 500 mM de imidazol (Figura 27A). Por outro lado, notou-se que a escassa fração solúvel da proteína mutada não interage suficientemente com o níquel imobilizado na resina e em consequência não foi eluída em nenhuma das concentrações de imidazol (Figura 27B). Foram realizadas tentativas de purificação utilizando cobalto imobilizado devido ao fato deste apresentar uma interação mais específica com as proteínas que possuem cauda de poli-histidinas e uma ligação menor a proteínas não específicas em comparação à resina de Ni^{2+} , o que resulta em maior pureza do produto de eluição.⁹⁰⁻⁹¹ Porém, ainda assim, a interação da proteína mutada com a coluna não mudou.

A**B**

Figura 27 - Expressão e purificação da proteína LafB. (A) SDS-PAGE 12% das frações coletadas durante a expressão e purificação da proteína LafB nativa (B) SDS-PAGE 12% das frações coletadas durante a expressão e purificação da proteína LafB mutada. M: marcador de masa molecular, P: fração insolúvel, S: fração solúvel, NL: proteínas que não interagem com o Níquel na resina, E1: eluição com Imidazol 10mM, E2: eluição com Imidazol 50mM, E3: eluição com Imidazol 100mM, E4: eluição com Imidazol 250mM, E5: eluição com Imidazol 500mM.

Fonte: Elaborada pela autora.

A fim de separar as proteínas inespecíficas, decorrentes da purificação por afinidade, da proteína LafB de interesse, o purificado da etapa anterior foi posteriormente purificado mediante SEC. O cromatograma mostrou dois picos, sendo o maior deles correspondente à proteína LafB. As alíquotas coletadas correspondentes ao pico da LafB foram combinadas e concentradas para os testes biofísicos (Figura 28).

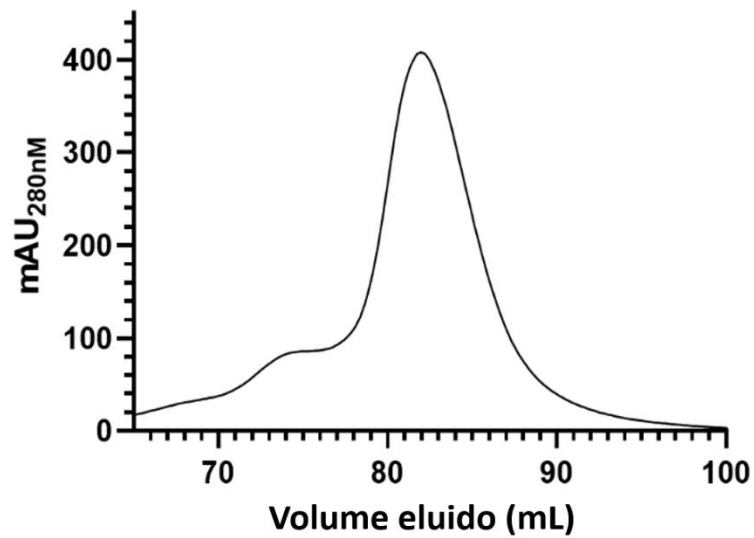


Figura 28 - Cromatograma da purificação por exclusão de tamanho (SEC) da proteína LafB.
Fonte: Elaborada pela autora

4.3.2 Cromatografia de exclusão de tamanho acoplada ao espalhamento de luz multiangulares (SEC-MALS)

A proteína LafB em tampão B foi submetida ao SEC-MALS, e se apresentou totalmente monomérica com uma massa molecular calculada de 42,6 kDa (Figura 29), considerando a cauda de seis poli-histidinas. Desconsiderando a massa teórica da poli-histidinas, a massa calculada da LafB é de 41,76 kDa.

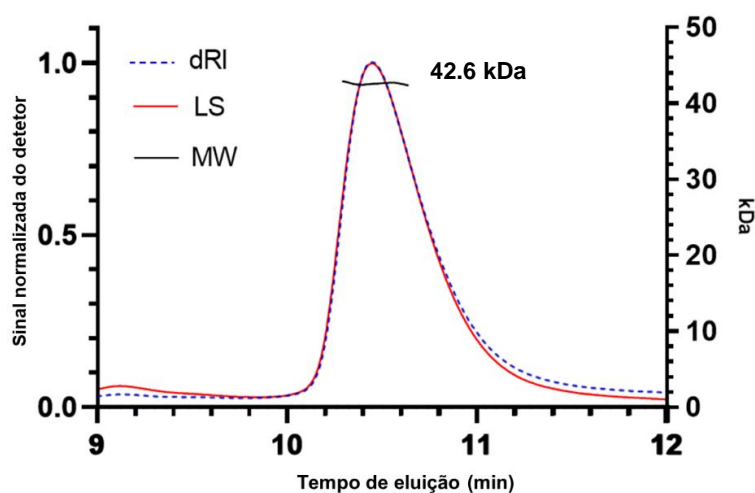


Figura 29 - Cromatogramas do SEC-MALS da proteína LafB em tampão B (25mM HEPES, 300mM NaCl, 10% glicerol, 5 mM β -Mercaptoetanol, pH 7,5) e massa calculada da proteína.
Fonte: Elaborada pela autora

Embora os estudos de caracterização de proteínas funcionalmente semelhantes a LafB em outras bactérias sejam escassos, existem estudos de glicosiltransferases da família GT-B de estrutura resolvida. Esta família está relacionada estruturalmente com a predição da LafB de *E. faecium* (como será apresentado na seção 4.4.1). Da lista de 8 proteínas relacionadas por *Albesa-Jové, et al* (2014),⁹² todas, exceto a polimerase TagF de ácido teicóico de *Staphylococcus epidermidis* (responsável por transferir fosfatidilglicerol), possuem massas moleculares entre 36 – 44 kDa, que são valores próximo ao peso calculado por SEC-MALS da LafB (41,76 kDa).⁹²

Tabela 8 - Pesos moleculares de algumas proteínas pertencentes à família GT-B das glicosiltransferases.

Glicosiltransferase	PM	Código
GT-B	(kDa)	PDB
WaaA	40,7	2XCI
WaaC	36,2	2GT1
WaaF	39,0	1PSW
WaaG	42,3	2IW1
MurG	37,8	1F0K
GumK	44,4	2Q6V
PimA	41,2	2GEK

Fonte: ALBESA-JOVÉ *et al.*⁹²

Das proteínas listadas da Tabela 8, a proteína LafB aqui estudada, compartilha 21.24% de identidade e 80% de cobertura com a proteína PimA de *Mycobacterium tuberculosis* envolvida na biossíntese de precursores dos lipomananos e lipoarabinomananos na parede celular.⁹³ Também possui homologia com a proteína WaaG de *Escherichia coli* (28.08% de identidade e 37% de cobertura), envolvida na síntese de lipopolisacarídeos em bactérias gram-negativas.⁹⁴ Tanto a Pim A quanto a WaaG são monoméricas,⁹²⁻⁹⁴ semelhante à proteína LafB de *E. faecium*.

Embora, evolutivamente, os monômeros e homo oligômeros de ordem superior das glicosiltransferases sejam igualmente antigos, em glicosiltransferases se tem relatado algumas vantagens da homo oligomerização. Alguma dessas vantagens envolvem proporcionar sítios de regulação alostérica, gerar novos sítios de ligação nas interfaces dos dímeros para aumentar especificidade, aumentar a afinidade da união multivalente e proporcionar a regulação através da transição entre formar estruturas ativas e não ativas da proteína que, por sua vez, dependem do estado oligomérico da mesma.⁹⁵ Esta última característica, em conjunto com antecedentes de que em algumas famílias de glicosiltransferases a oligomerização poderia ser necessária para a estabilidade e termoestabilidade da proteína,⁹⁶⁻⁹⁷ sugere que, embora nossos resultados mostrem que a LafB de *E. faecium* se apresenta em estado monomérico *in-vitro*, são necessários mais estudos para confirmar se ela é ativa e estável nesse estado oligomérico.

4.3.3 Dicroísmo circular (CD)

A proteína LafB exibiu um espectro CD que mostra mínimos negativos em 210 e 222 nm, apresentando o mínimo mais profundo no espectro de 222 nm (Figura 30). Essas características da curva são próprias de proteínas bem enoveladas que possuem hélices- α como elementos da sua estrutura secundária.⁹⁸⁻⁹⁹

Após a avaliação do espectro CD, a proteína foi, em seguida, testada frente a um gradiente de temperatura de desnaturação. A Figura 31 mostra quatro temperaturas representativas (24, 34, 38 e 54 °C) que permitem analisar como o espectro CD da proteína altera conforme esta se desnatura, em função do aumento de temperatura.

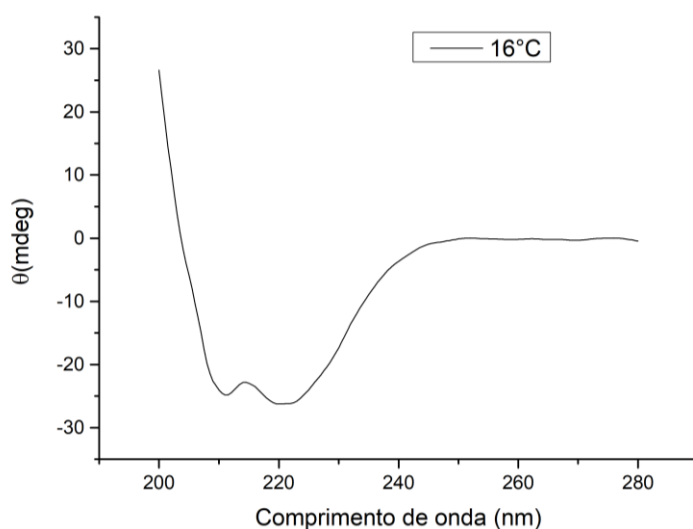


Figura 30 - Espectro CD da proteína LafB nativa em Tampão C (140mM NaCl, 7mM Na₂HPO₄, 2,5 mM NaH₂PO₄H₂O) medido a uma temperatura de 16°C.
Fonte: Elaborada pela autora.

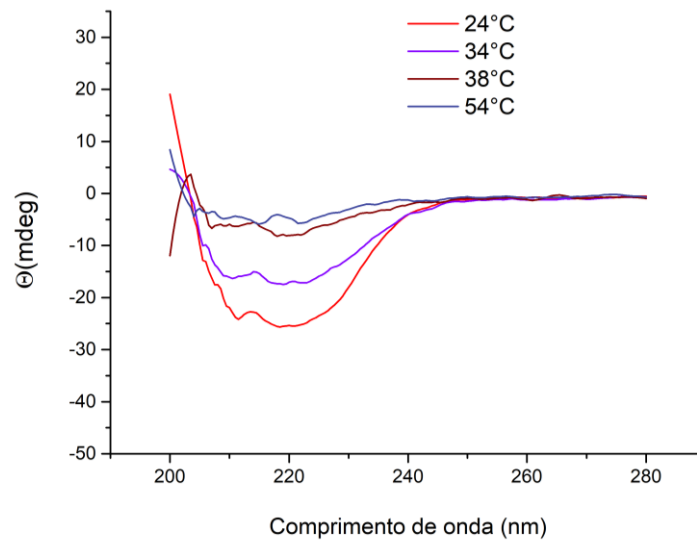


Figura 31 - Espectros CD da proteína LafB nativa em Tampão C (140mM NaCl, 7mM Na₂HPO₄, 2,5 mM NaH₂PO₄H₂O) sob quatro temperaturas de 24°C, 34°C, 38°C e 54°C.
Fonte: Elaborada pela autora

Para estudar melhor a termoestabilidade da proteína, esta foi exposta a um gradiente de temperatura desnaturante e monitorada a 222 nm. A temperatura de Melting (T_m) determinada foi de 37,17 °C (Figura 32) demonstrando uma baixa estabilidade da proteína sob essas condições de tampão. A seleção do tampão A de purificação da LafB foi baseada no tampão utilizado para purificar uma proteína da família 4 das glicosiltransferases, a mesma família relatada na anotação no GenBank (WP_002287604.1) do gene *lafB* de *E.facium*.¹⁰⁰

Figura 32 - Curva de desnaturação térmica da proteína LafB em tampão C (140 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 2,5 mM NaH₂PO₄H₂O). T_m =Temperatura de Melting.
Fonte: Elaborada pela autora

No entanto, embora a purificação da proteína LafB tenha sido bem sucedida em termos de solubilidade da proteína em tampão A, acreditamos que a T_m baixa pode ter sido influenciada pela dessalinização da amostra, deixando-a mais instável. Experimentos como DLS (*Dynamic Light Scattering*) e DSF (*Differential Scanning Fluorimetry*), que permitem determinar a T_m da proteína em diferentes condições, serão feitos em breve para uma melhor avaliação deste parâmetro.

4.3.4 Ensaio de cristalização

Em vista o fato de que a proteína LafB ainda não possui estrutura resolvida, ensaios de cristalização foram feitos a fim de permitir a elucidação da estrutura da LafB. No entanto, até o momento, não foi possível obter cristais de proteína.

Os ensaios que foram realizados com a proteína em concentrações de 1 mg/mL e 3 mg/mL não apresentaram crescimento de cristais em nenhuma das condições durante 15 dias, e os ensaios feitos com concentrações de 5, 7 e 12 mg/mL apresentaram uma rápida precipitação da proteína. Novas condições de expressão e purificação serão testadas no futuro buscando melhorar a estabilidade a proteína e assim permitir novos ensaios para a obtenção de cristais sob diversas condições de cristalização.

4.4 Análise *in-silico* da glicosiltransferase LafB

4.4.1 Predição da estrutura da proteína com *AlphaFold*

Em vista do recente lançamento do *software AlphaFold2*, que utiliza inteligência artificial para predizer a estrutura de uma proteína totalmente *in-silico*, foi feita uma predição da LafB de *E. faecium*.

A predição das estruturas LafB nativa (2.7) e mutada (2.1) foi realizada utilizando uma base de dados de 1600 sequências. A cobertura de identidade das sequências foi alta, assim como a pontuação do parâmetro de qualidade IDDT obtida por cada molécula apresentando valor >90 em uma escala de 1 a 100, considerado razoável para investigar cadeias laterais e detalhes do sítio ativo. Foram gerados também 5 modelos de predição de cada proteína e todos os modelos possuem valores baixos (<10) do parâmetro de qualidade PAE, indicando uma alta confiança nas posições relativas dos resíduos nos modelos gerados.

Uma busca de motivos na proteína utilizando MOTIF Search⁶⁹ mostrou que a enzima glicosiltransferase LafB de *E. faecium* possui três motivos conservados. O primeiro abriga o N-terminal até aproximadamente o resíduo 150 e pertence à família 4 das glicosiltransferases, o segundo motivo abriga os resíduos 162- 282 e pertence à família 1 das glicosiltransferases e o terceiro motivo abriga desde o resíduo 316 e contém o C-terminal.

Na estrutura da LafB é possível observar que a proteína está conformada por um total de 12 α -hélices e 11 fitas- β . Além disso, a cadeia polipeptídica inicia formando uma topologia do tipo $\beta\alpha\beta$ com dobramento similar ao do tipo Rossmann e continua para a região que contém o segundo motivo encontrado, formando também uma topologia do tipo $\beta\alpha\beta$ com dobramento similar ao do tipo Rossmann. Por fim, a cadeia polipeptídica cruza externamente a estrutura da proteína em orientação ao N-terminal formando uma única α -hélice que contém o C-terminal.

As últimas revisões, reportam que das dezenas de famílias de glicosiltransferases que possuem estruturas tridimensionais relatadas, se descrevem apenas três tipos de dobramentos estruturais: GT-A, GT-B, GT-C (Figura 33)¹⁰¹⁻¹⁰² A superfamília GT-B é considerada notavelmente diversa e inclui a maioria das enzimas procarióticas com função de glicosilação de metabólitos secundários e envolvida nas vias metabólicas procarióticas primárias como a biossíntese da parede celular.¹⁰³ A estrutura predita da glicosiltransferase LafB de *E. faecium* compartilha características estruturais como a topologia e similaridade de dobramento das regiões com as glicosiltransferases do tipo GT-B, que se caracterizam por possuir dois domínios similares ao do tipo Rossmann separados por uma cavidade profunda onde se

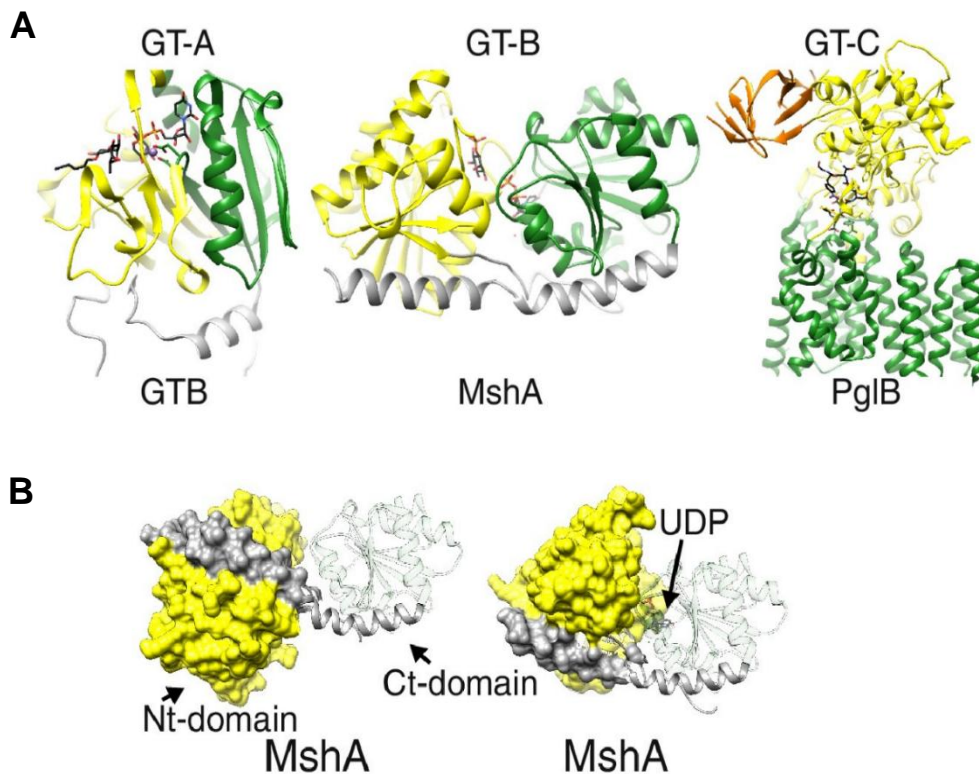


Figura 33 - Proteínas representativas dos três tipos de dobramentos estruturais reportados nas glicosiltransferases. (A) Enovelamentos do tipo GT-A, GT-B e GT-C. (B) Estrutura da proteína MshA, representativa do enovelamento do tipo GT-B, onde se observam seus dois domínios e entre eles o sítio catalítico (UDP) característica própria da família GT-B.
Fonte: Adaptada de ALBESA-JOVÉ; GUÉRIN.¹⁰¹

encontra o centro catalítico.^{92,101-104} Em geral, as proteínas da família GT-B apresentam uma alta conservação estrutural, particularmente no domínio C-terminal, que se liga aos doadores de açúcar nucleotídeos enquanto o domínio N-terminal está envolvido no reconhecimento do substrato aceptor e neste as variações estruturais são mais pronunciadas entre os membros da família.¹⁰⁵

Além das características estruturais, algumas pesquisas tem relatado também estudos sobre as mudanças conformacionais que as proteínas GT-B podem sofrer.⁹² Uma das melhores documentadas é uma pesquisa da glicosiltransferase PimA (Figura 34), uma proteína associada à membrana periférica das micobactérias, que possui um enovelamento semelhante ao predito da LafB de *E. faecium* (Figura 35).¹⁰⁶ Os estudos relatam um mecanismo de abertura e fechamento que estabiliza a enzima e que ocorre quando a molécula de nucleotídeo-açúcar (GDP-Man), transferida pela PimA, é ligada no seu sítio ativo. Essa estabilização é refletida em um aumento de $\sim 3,5$ °C da T_m (Temperatura de Melting), segundo o observado por calorimetria diferencial de varredura e CD.^{92,107} A hipótese de que LafB de *E. faecium* pertença a família GT-B poderia explicar a baixa T_m determinada mediante dicroísmo

circular. Em futuros experimentos, além de uma otimização dos tampões para aumentar a estabilidade da proteína *in-vitro*, seria interessante determinar a T_m da proteína ligada ao substrato.

Considerando as informações anteriormente relatadas, acreditamos que a estrutura predita da glicosiltransferase LafB de *E. faecium* poderia pertencer à família GT-B, e que possui também dois domínios representados na Figura 35. O primeiro, em cor ciano, que contém o N-terminal e o segundo domínio, na cor verde, contendo o C-terminal e a mutação de interesse Trp204Arg.

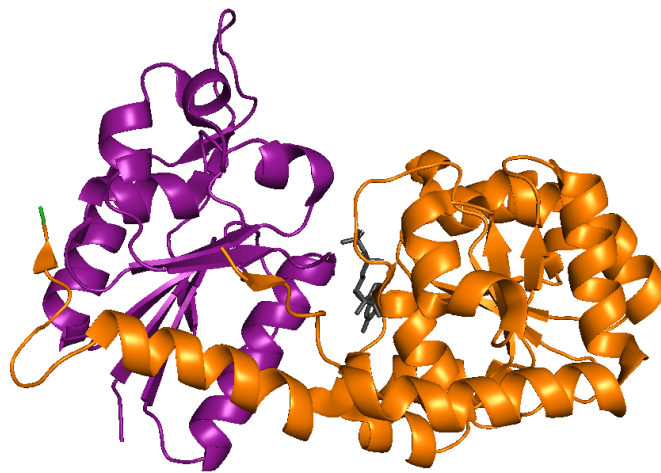


Figura 34 - Estrutura da proteína PimA (4N9W) que apresenta os domínios N-terminal (roxo) e C-terminal (laranja), e seu ligante GDP-manose (preto).
Fonte: GIGANTI *et al.*¹⁰⁶

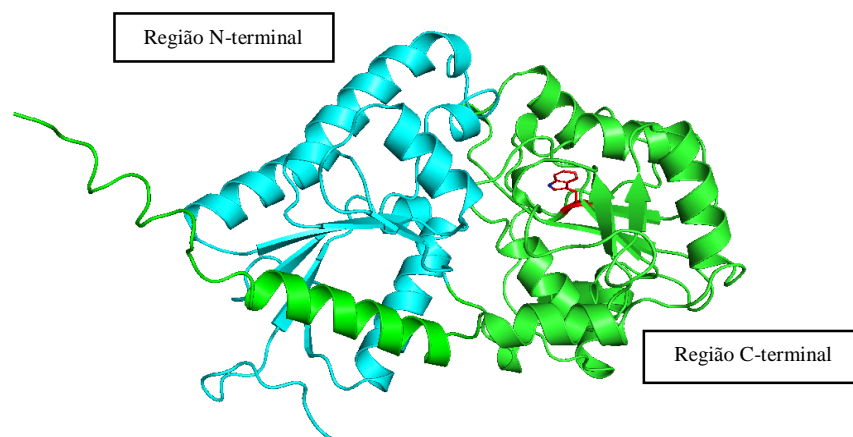


Figura 35 - Estrutura predita da proteína LafB de *E. faecium*. Se apresentam a regiões N-terminal e C-terminal em ciano e verde respectivamente. Em vermelho, se mostra o sítio da mutação.
Fonte: Elaborada pela autora.

A única mutação que diferencia as estruturas 2.7 (nativa) e 2.1 (mutada) é a troca de um aminoácido na posição 204 da sequência, sendo que nesta posição a proteína nativa possui um Trp enquanto a mutada apresenta uma Arg. O Trp está em um ambiente hidrofóbico

formado por sete aminoácidos (Figura 36), mais especificamente, em contato com Cys177, Phe181, Phe190, e Phe231, e três aminoácidos que complementam a formação do bolsão hidrofóbico: Phe251, Phe252 e Pro253. Além disso, existe uma ligação de hidrogênio entre a cadeia principal da Gly179, e o nitrogênio do anel indol do Trp que incrementa a estabilidade do Trp nessa posição.

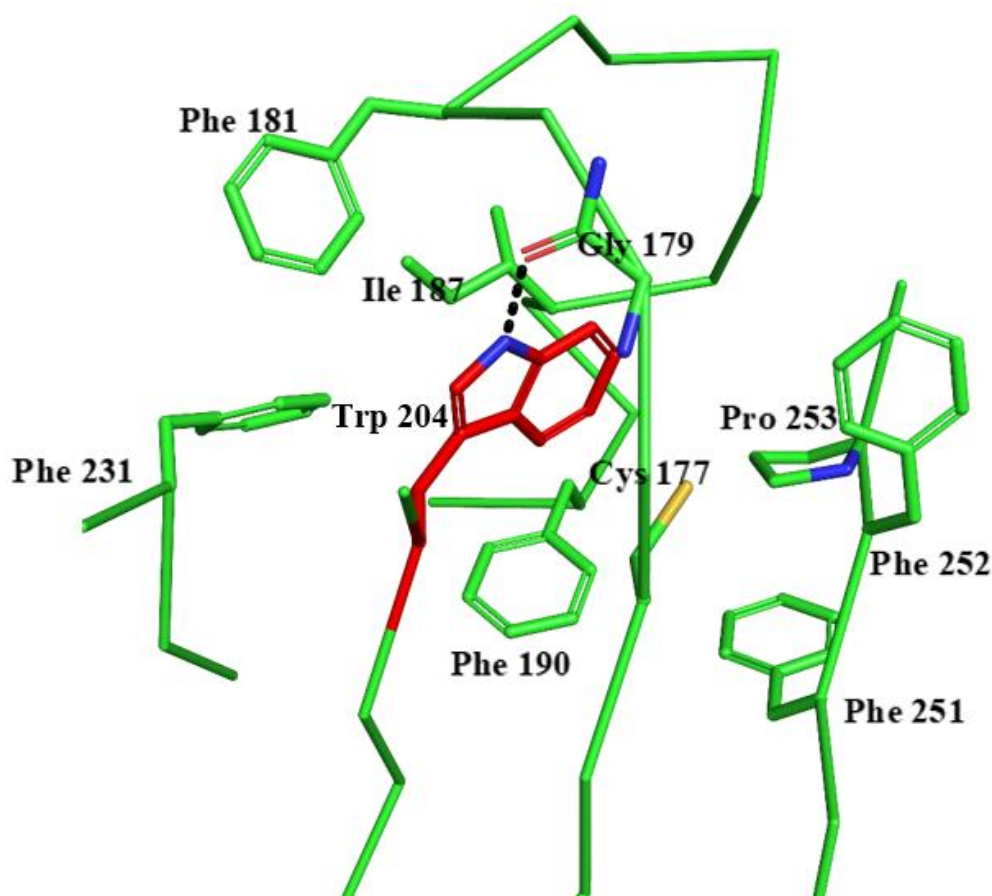


Figura 36 - Interações do Trp 204 (vermelho) na proteína LafB nativa (2.7).
Fonte: Elaborada pela autora.

Por outro lado, segundo a predição da proteína mutada, a Arg204 não provoca mudanças conformacionais importantes na estrutura proteica, mas mostra que a Arg204 é estabilizada por ligações de hidrogênio entre a Leu180 (cadeia principal) e Lys185 (Figura 37). No entanto, é importante levar em consideração que o AlphaFold ainda possui limitações para mostrar detalhadamente as mudanças causadas por mutações, especialmente quando o número de resíduos envolvidos é baixo. Como neste caso a mutação acontece em um único resíduo, e experimentalmente temos observado que a mutação gera uma queda importante na solubilidade da proteína, acreditamos que, embora não seja mostrada na predição, provavelmente existe uma importante mudança conformacional causada pela mutação,

especialmente pela substituição por um dos resíduos de aminoácidos mais hidrofílicos (Arg) em um ambiente altamente hidrofóbico.

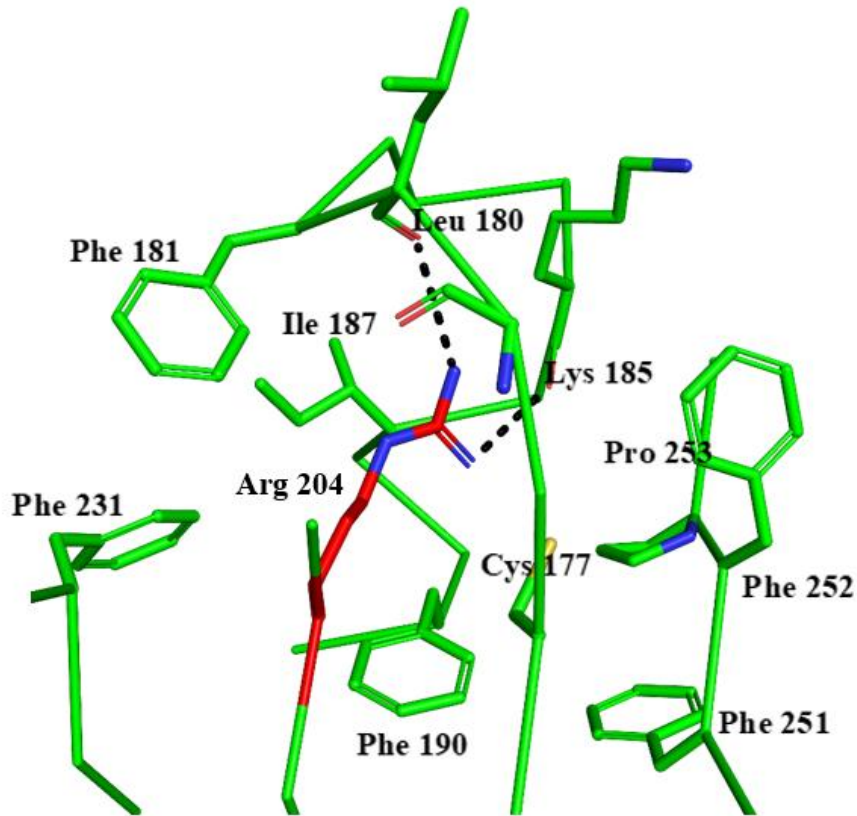


Figura 37 - Interações da Arg204 (vermelho) na proteína LafB mutada (2.1).
Fonte: Elaborada pela autora.

4.4.2 Docking molecular

A área de ligação (“*binding pockets*”) melhor pontuada (62.34 AS Score) na análise do software da estrutura da proteína LafB de *E. faecium* estava localizada entre as regiões que contém o N- terminal e o C-terminal e próxima ao sítio da mutação de interesse (Trp204). Esses resultados concordam com o relatado anteriormente com respeito à família GT-B das glicosiltransferases, cujos membros geralmente possuem o sítio catalítico localizado entre seus dois domínios⁹², reforçando assim a hipótese de que a proteína LafB de *E. faecium* pertence à família das GT-B. Em seguida, utilizando o mesmo software, foi feito o acoplamento de uma molécula de UDP-galactose, molécula que é candidata a ser ligante da glicosiltransferase LafB, no “*binding pocket*” melhor pontuado da proteína.

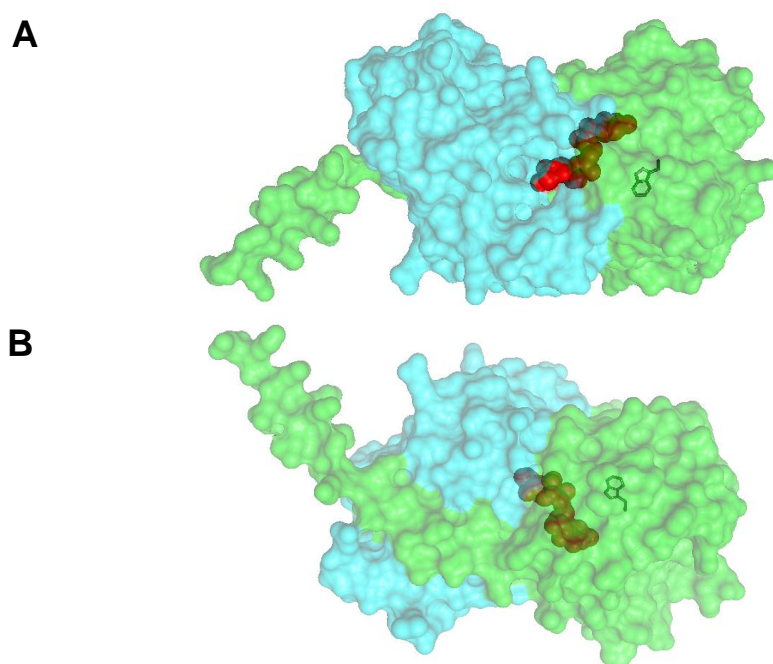


Figura 38 - Predição da LafB ligada ao UDP-Gal no hipotético sítio ativo determinado mediante análise *in-silico*. Regiões da estrutura da LafB em ciano (região N-terminal) e verde (região C-terminal), o ligante (UDP-Gal) em vermelho e Triptofano204 em verde escuro (A) Vista anterior (B) Vista posterior. Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 38 apresenta a orientação melhor pontuada em termos energéticos do ligante no “*binding pocket*” da proteína obtida através do software *AutoGridFR*. O ligante apresenta uma rede de interações entre as quais se encontram forças de van der Waals, pontes salinas, interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, ligações carbono e hidrogênio, pi-pi *T-shaped* e pi-alkyl (Figura 39). Entre os resíduos de aminoácidos que estabilizam o ligante,

estão a Phe205 e a Gly206 que embora interajam apenas por ligações van der Waals com o ligante, são aminoácidos que se encontram muito perto ao sítio da mutação (Trp204). Assim como a Leu180, que interage com o grupo guanidina da Arg204 na proteína mutada (Figura 37) e também com o ligante UDP-Gal na proteína nativa através de uma ligação de hidrogênio (Figura 39). Cabe a hipótese de que a troca de aminoácido faça com que a Leu180 perca interação com o ligante para tentar estabilizar a Arg180.

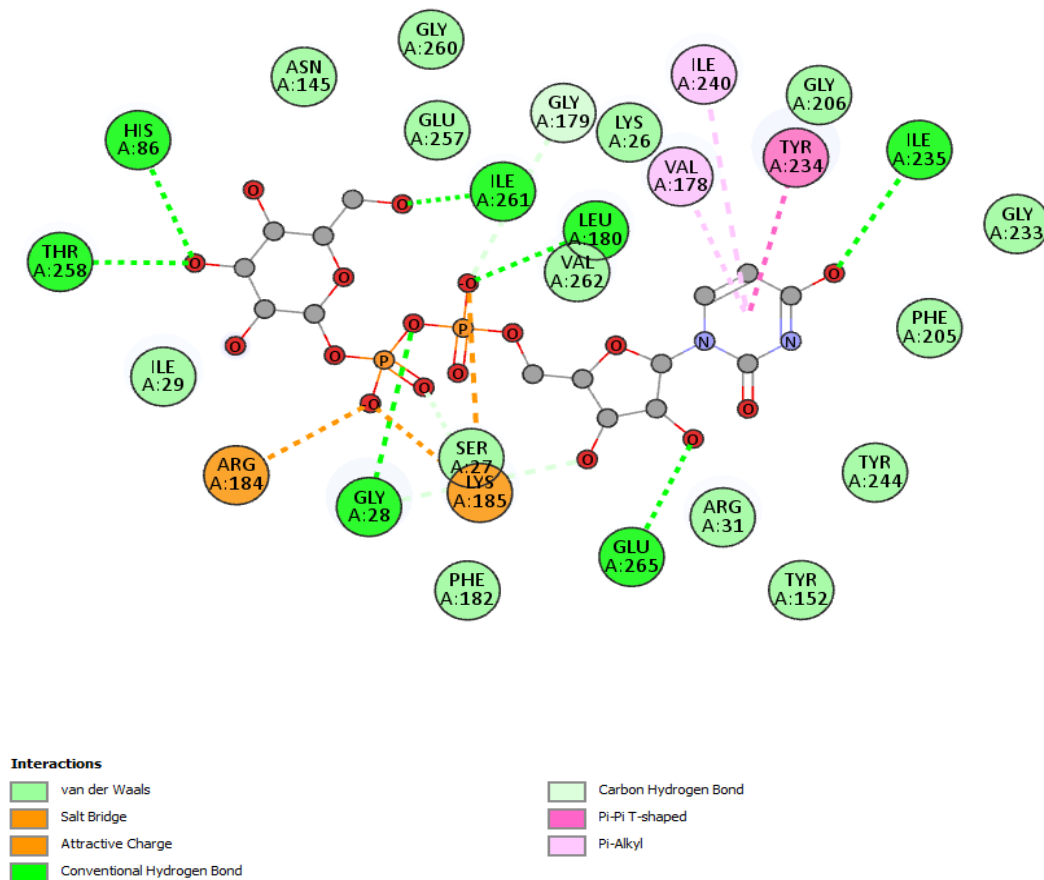


Figura 39 - Gráfico das interações ligante – proteína.

Fonte: Elaborada pela autora.*

* Software BIOVIA Discovery Studio

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Da análise fenotípica das linhagens HBSJRP 18_2.1 (supersensível a DAP) e HBSJRP 18_2.7 (com sensibilidade normal a DAP) se conclui que:

– Embora a mutação causou uma diminuição significativa no crescimento da linhagem supersensível a DAP, a capacidade de formação de biofilme não foi afetada pela mutação, e da mesma forma, em geral, o perfil metabólico das linhagens também não teve mudanças marcantes. No entanto, os substratos que apresentaram diferenças no metabolismo (os antimicrobianos umbeliferona e blasticidin S), serão testados de maneira individual a fim de se confirmar e entender como a mutação em *lafB* pode alterar o metabolismo da célula e a resposta a esses compostos.

– Os experimentos de virulência *in-vivo* sugerem que a mutação em *lafB* provocou mudanças na parede celular que resultam em virulência atenuada com uma diminuição estatisticamente significativa. Ainda são necessários estudos que avaliem a composição do LTA na bactéria mutada para entender o que acontece na estrutura da membrana ou parede celular que pudesse explicar a perda de virulência.

Dos estudos da proteína LafB 2.1 (mutada) e LafB 2.7 (nativa) se conclui que:

– O fato da proteína mutada não apresentar a mesma solubilidade sob as condições de purificação testadas para a proteína nativa, sugere que mudanças importantes acontecem a nível estrutural devido à mutação. Futuros experimentos testando diversas condições serão feitos para purificar a proteína mutada.

– A glicosiltransferase LafB sob condições *in-vitro* se apresenta monomérica com uma massa molecular de 41.76 kDa, possui estrutura secundária α -helicoidal e uma temperatura de *melting* igual a 37 °C, o que a torna altamente instável. Experimentos que testam diferentes condições de purificação serão feitos no futuro para conseguir estabilizá-la e cristalizá-la.

– A predição com *AlphaFold* mostrou que a proteína apresenta uma estrutura similar às glicosiltransferases da família GT-B, e que devido ao fato de a mutação estar próxima ao hipotético sítio catalítico, é provável que as mudanças nas interações que ocorrem entre os aminoácidos da proteína e ligante, sejam a causa das mudanças observadas no fenótipo da linhagem mutada.

REFERÊNCIAS

- 1 GARCÍA-SOLACHE; M.; RICE, L. B. The Enterococcus: a model of adaptability to its environment. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 2, p. e00058-18, 2019.
- 2 SVEC, P. *et al.* *Enterococcus haemoperoxidus* sp. nov. and *Enterococcus moraviensis* sp. nov., isolated from water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, pt 4, p. 1567–1574, 2001.
- 3 ŠVEC, P. *et al.* *Enterococcus aquimarinus* sp. nov., isolated from sea water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, pt 5, p. 2183–2187, 2005.
- 4 BARBOSA, J.; BORGES, S.; TEIXEIRA, P. Selection of potential probiotic *Enterococcus faecium* isolated from portuguese fermented food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 191, p. 144–148, 2014. DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.009](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.009).
- 5 MÜLLER, T. *et al.* Identification of plant-associated enterococci. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 2, p. 268–278, 2001.
- 6 MUNDT, J. O. Occurrence of enterococci on plants in a wild environment. **Journal of Applied Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 141–144, 1963.
- 7 NASER, S. M. *et al.* *Enterococcus canintestini* sp. nov., from faecal samples of healthy dogs. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 2177–2182, 2005.
- 8 MARTIN, J. D.; MUNDT, J. O. Enterococci in insects. **Journal of Applied Microbiology**, v. 24, n. 4, p. 575–580, 1972.
- 9 SHERMAN, J. M. The enterococci and related streptococci. **Journal of Bacteriology**, v. 35, n. 2, p. 81–93, 1938.
- 10 IWEN, P. C. *et al.* Change in prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* species isolated from blood cultures over an 8-year period. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 41, n. 2, p. 494–495, 1997.
- 11 LAM, M. M. *et al.* Comparative analysis of the first complete *Enterococcus faecium* genome. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 9, p. 2334–2341, 2012.
- 12 DE OLIVEIRA, D. M. P. *et al.* Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 3, p. e00181-19, 2020.
- 13 SHRIVASTAVA S. R.; SHRIVASTAVA, P. S.; RAMASAMY, J. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. **World Health Organization Releases**, v. 32, n. 1, p. 76–77, 2017.
- 14 FIEDLER, S. *et al.* Tigecycline resistance in clinical isolates of *Enterococcus faecium* is mediated by an upregulation of plasmid-encoded tetracycline determinants tet(L) and tet(M). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 4, p. 871–881, 2016.
- 15 MONTERO, C. I.; STOCK, F.; MURRAY, P. R. Mechanisms of resistance to daptomycin in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 3, p. 1167–1170, 2008.

- 16 EGAN, S. A. *et al.* Linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from hospitalized patients in Ireland: high prevalence of the MDR genes *optrA* and *poxtA* in isolates with diverse genetic backgrounds. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 7, p. 1704–1711, 2020.
- 17 MADIGAN, M. T. *et al.* **Brock biology of microorganisms**. New York: Pearson Education, 2016.
- 18 OREN, A.; GARRITY, G. M. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 71, n. 10, 2021. DOI: 10.1099/ijsem.0.005056.
- 19 PERCY, M. G.; GRÜNDLING, A. Lipoteichoic acid synthesis and function in gram-positive bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 81–100, 2014.
- 20 WEBB, A. J.; KARATSA-DODGSON, M.; GRÜNDLING, A. Two-enzyme systems for glycolipid and polyglycerolphosphate lipoteichoic acid synthesis in *Listeria monocytogenes*. **Molecular Microbiology**, v. 74, n. 2, p. 299–314, 2009.
- 21 THEILACKER, C. *et al.* Glycolipids are involved in biofilm accumulation and prolonged bacteraemia in *Enterococcus faecalis*. **Molecular Microbiology**, v. 71, n. 4, p. 1055–1069, 2009.
- 22 THEILACKER, C. *et al.* Deletion of the glycosyltransferase *bgsB* of *Enterococcus faecalis* leads to a complete loss of glycolipids from the cell membrane and to impaired biofilm formation. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 67, 2011.
- 23 PAGANELLI, F. L. *et al.* Lipoteichoic acid synthesis inhibition in combination with antibiotics abrogates growth of multidrug-resistant *Enterococcus faecium*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, n. 3, p. 355–363, 2017.
- 24 MOHAMED, J. A.; HUANG, D. B. Biofilm formation by enterococci. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 12, p. 1581–1588, 2007.
- 25 SHUJUN, R. *et al.* Transcriptome analysis of *Enterococcus faecalis* in response to alkaline stress. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00795.
- 26 CH'NG, J.-H. *et al.* Biofilm-associated infection by enterococci. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 82–94, 2019.
- 27 GULATI, M. *et al.* In Vitro culturing and screening of *Candida albicans* biofilms. **Current Protocols in Microbiology**, v. 50, n. 1, p. e60–e60, 2018.
- 28 DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881–890, 2002.
- 29 FRANCESCA, F. *et al.* Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 7, p. 4164–4171, 2006.
- 30 MILLER, W. R.; BAYER, A. S.; ARIAS, C. A. Mechanism of action and resistance to daptomycin in *Staphylococcus aureus* and enterococci. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 11, p. a026997, 2016.
- 31 BEIRAS-FERNANDEZ, A. *et al.* Daptomycin: a novel lipopeptide antibiotic against Gram-positive pathogens. **Infection and Drug Resistance**, v. 3, p. 95–101, 2010. DOI: 10.2147/IDR.S6961.

- 32 CANTÓN, R. *et al.* A potential role for daptomycin in enterococcal infections: what is the evidence? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 6, p. 1126–1136, 2010.
- 33 SATLIN, M. J. *et al.* Development of daptomycin susceptibility breakpoints for enterococcus faecium and revision of the breakpoints for other enterococcal species by the clinical and laboratory standards institute. **Clinical Infectious Diseases**, v. 70, n. 6, p. 1240–1246, 2020.
- 34 TAYLOR, S. D.; PALMER, M. The action mechanism of daptomycin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 24, p. 6253–6268, 2016.
- 35 ROBBEL, L.; MARAHIEL, M. A. Daptomycin, a bacterial lipopeptide synthesized by a nonribosomal machinery. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 36, p. 27501–27508, 2010.
- 36 ANNA-BARBARA, H. *et al.* Reduction in membrane phosphatidylglycerol content leads to daptomycin resistance in bacillus subtilis . **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 9, p. 4326–4337, 2011.
- 37 GREIN, F. *et al.* Ca²⁺-Daptomycin targets cell wall biosynthesis by forming a tripartite complex with undecaprenyl-coupled intermediates and membrane lipids. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1455, 2020.
- 38 MELLO, S. *et al.* A mutation in the glycosyltransferase gene *lafB* causes daptomycin hypersusceptibility in *Enterococcus faecium*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2019. DOI:10.1093/jac/dkz403
- 39 ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, Suppl 1, p. 5–16, 2001.
- 40 EMERY PHARMA. **Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) assay**. 2022. Disponível em: <https://emerypharma.com/biology/minimum-inhibitory-concentration/>. Acesso em: 22 jan. 2022.
- 41 CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. 2018. Disponível em: https://clsi.org/media/wi0pmpke/m100ed32_sample.pdf. Acesso em: 23 jan. 2021.
- 42 BIO-RESOURCE. **Bacterial growth calculation**. 2020. Disponível em: <http://technologyinscience.blogspot.com/2013/02/bacterial-growth-calculation.html#.YjOV2OrMLBU>. Acesso em: 20 jul. 2021.
- 43 BORGLIN, S. *et al.* Application of phenotypic microarrays to environmental microbiology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 41–48, 2012.
- 44 BLUMENSTEIN, K. *et al.* Phenotype microarrays as a complementary tool to next generation sequencing for characterization of tree endophytes. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p.1033, Sept. 2015. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01033.
- 45 GACA, A. O. *et al.* Global transcriptional analysis of the stringent response in *Enterococcus faecalis*. **Microbiology**, v. 158, pt 8, p. 1994–2004, 2012.
- 46 PALAZZO, I. C. V; REHDER, A. ; DARINI, A. L. C. Quantitative disk diffusion as a convenient method for determining minimum inhibitory concentrations of oxacillin for staphylococci strains. **Journal of Microbiological Methods**, v. 71, n. 3, p. 186–190, 2007.

- 47 PROMEGA CORPORATION. **pGEM(R)-T and pGEM(R)-T easy vector systems protocol** - technical manual TM042. 2010. Disponível em: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2021.
- 48 NOVAGEN. **pET system manual**. 2014. Disponível em: https://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/pET_vectors/pET-28a-c_map.pdf Acesso em: 10 jan. 2021.
- 49 SHILLING, P. J. *et al.* Improved designs for pET expression plasmids increase protein production yield in Escherichia coli. **Communications Biology**, v. 3, n. 1, p. 214, 2020.
- 50 DUBENDORF, J. W.; STUDIER, F. W. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. **Journal of Molecular Biology**, v. 219, n. 1, p. 45–59, 1991.
- 51 URH, M.; M.; SIMPSON, D.; ZHAO, K. **Affinity chromatography: general methods in guide to protein purification**. 2nd ed. New York: Academic Press, 2009. p. 417–438.
- 52 SUN, T. *et al.* A study of the separation principle in size exclusion chromatography. **Macromolecules**, v. 37, n. 11, p. 4304–4312, 2004.
- 53 CREATIVE PROTEOMICS. **Size exclusion chromatography (SEC) service**. 2022. Disponível em: <https://www.creative-proteomics.com/pronalyse/size-exclusion-chromatography-sec-service.html>. Acesso em: 30 jan. 2022.
- 54 SOME, D. *et al.* Characterization of proteins by size-exclusion chromatography coupled to multi-angle light scattering (SEC-MALS). **JoVE**, n. 148, p. e59615, 2019. DOI: 10.3791/59615.
- 55 SOME, D. **Wyatt technology latest advancements in absolute characterization of proteins, polymers and nanoparticles**. 2019. Disponível em: <https://www.wyatt.com/library/webinars/latest-advancements-in-absolute-characterization-of-proteins-polymers-and-nanoparticles.html>. Acesso em: 31 jan. 2022.
- 56 RODGER, A. ; NORDEN, B. **Circular dichroism & linear dichroism**. Oxford: Oxford University Press, 1997.
- 57 MILES, A. J.; WALLACE, B. A. Circular dichroism spectroscopy for protein characterization: biopharmaceutical applications. **Biophysical Characterization of Proteins in Developing Biopharmaceuticals**, p. 109–137, 2015. DOI: 10.1016/B978-0-444-59573-7.00006-3.
- 58 PIGNATARO, M. F.; HERRERA, M. G.; DODERO, V. I. Evaluation of peptide/protein self-assembly and aggregation by spectroscopic methods. **Molecules**, v. 25, n. 20, p.4854 2020.
- 59 MILES, A. J.; JANES, R. W.; WALLACE, B. A. Tools and methods for circular dichroism spectroscopy of proteins: a tutorial review. **Chemical Society Reviews**, v. 50, n. 15, p. 8400–8413, 2021.
- 60 RANJBAR, B.; GILL, P. Circular dichroism techniques: biomolecular and nanostructural analyses- a review. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 74, n. 2, p. 101–120, 2009.
- 61 MARK, B. L.; MCKENNA, S. A.; KHAJEHPUR, M. Protein structural analysis. *In*: MOO-YOUNG, M. (ed.). **Comprehensive biotechnology**. Amsterdam: Elsevier, 2011. v.1, p. 139–153.

- 62 JUMPER, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, v. 596, n. 7873, p. 583–589, 2021.
- 63 NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). **Glycosyltransferase family 4 protein [Enterococcus faecium]**. 2021. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_002287604.1/ Acesso em: 30 jul. 2021.
- 64 MIRDITA, M.; OVCHINNIKOV, S.; STEINEGGER, M. ColabFold - making protein folding accessible to all. **bioRxiv**, 2021. DOI:10.1101/2021.08.15.456425.
- 65 MARIANI, V. *et al.* IDDT: a local superposition-free score for comparing protein structures and models using distance difference tests. **Bioinformatics**, v. 29, n. 21, p. 2722–2728, 2013.
- 66 EISENBERG, D.; LÜTHY, R. ; BOWIE, J. U. VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Methods in Enzymology**, v. 277, p. 396–404, 1997.
- 67 LÜTHY, R.; BOWIE, J. U.; EISENBERG, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature**, v. 356, n. 6364, p. 83–85, 1992.
- 68 SCHRÖDINGER, L. **The PyMOL molecular graphics system**. Disponível em: <https://www.schrodinger.com/products/pymol>. Acesso em: 14 oct. 2021
- 69 KYOTO UNIVERSITY BIOINFORMATICS CENTER. **MOTIF search**. 1991. Disponível em: <https://www.genome.jp/tools/motif/> . Acesso em: 15 feb. 2022.
- 70 REICHMANN, N. T.; GRÜNDLING, A. Location, synthesis and function of glycolipids and polyglycerolphosphate lipoteichoic acid in Gram-positive bacteria of the phylum Firmicutes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 319, n. 2, p. 97–105, 2011.
- 71 ZHANG, Y. *et al.* AutoGridFR: improvements on autodock affinity maps and associated software tools. **Journal of Computational Chemistry**, v. 40, n. 32, p. 2882–2886, 2019.
- 72 BIOVIA, D. S. **Discovery studio visualizer V21.1.0**. Disponível em: <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>. Acesso em: 14 jan. 2022
- 73 TURNIDGE, J. *et al.* Daptomycin in the treatment of enterococcal bloodstream infections and endocarditis: a EUCAST position paper. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 26, n. 8, p. 1039–1043, 2020.
- 74 ROYAL LIVERPOOL UNIVERSITY HOSPITAL. Guideline for daptomycin usage within Liverpool Clinical Laboratories. **Daptomycin guidelines**, p. 8, 2021. Disponível em: <https://secure.rlbuht.nhs.uk>. Acesso em: 21 jan. 2022
- 75 STREIT, J. M.; JONES, R. N.; SADER, H. S. Daptomycin activity and spectrum: a worldwide sample of 6737 clinical Gram-positive organisms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 4, p. 669–674, 2004.
- 76 HUMPHRIES, R. M.; POLLETT, S.; SAKOULAS, G. A current perspective on daptomycin for the clinical microbiologist. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 759–780, 2013.
- 77 WECKWERTH, P. H. *et al.* In Vitro alkaline pH resistance of *Enterococcus faecalis*. **Brazilian Dental Journal**, v. 24, n. 5, p. 474–476, 2013.
- 78 ITOYAMA, S. *et al.* *Enterococcus spp.* have higher fitness for survival, in a pH-dependent manner, in pancreatic juice among duodenal bacterial flora. **JGH Open**, v. 6, n. 1, p. 85–90,

2022.

79 MAZIMBA, O. Umbelliferone: sources, chemistry and bioactivities review. **Bulletin of Faculty of Pharmacy**, v. 55, n. 2, p. 223–232, 2017.

80 RANJAN SAHOO, C. *et al.* Coumarin derivatives as promising antibacterial agent(s). **Arabian Journal of Chemistry**, v. 14, n. 2, p. 102922, 2021.

81 LIN, P.-Y. *et al.* Synthesis and antibacterial activities of novel 4-hydroxy-7-hydroxy- and 3-carboxycoumarin derivatives. **Molecules**, v. 17, n. 9, p. 10846, 2012.

82 SVIDRITSKIY, E. *et al.* Blastocidin S inhibits translation by trapping deformed tRNA on the ribosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 30, p. 12283–12288, 2013.

83 DAVISON, J. R. *et al.* A new natural product analog of blastocidin s reveals cellular uptake facilitated by the nra multidrug transporter. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. e02635-16, 2017.

84 JONAS, B. M.; MURRAY, B. E.; WEINSTOCK, G. M. Characterization of emeA, a NorA homolog and multidrug resistance efflux pump, in *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 12, p. 3574–3579, 2001.

85 LEBRETON, F. *et al.* ace, Which encodes an adhesin in *Enterococcus faecalis*, is regulated by Ers and is involved in virulence. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 7, p. 2832–2839, 2009.

86 DE OLIVEIRA, N. E. M. *et al.* clpB, a class III heat-shock gene regulated by CtsR, is involved in thermotolerance and virulence of *Enterococcus faecalis*. **Microbiology**, v. 157, pt 3, p. 656–665, 2011.

87 ZHAO, C. *et al.* Role of methionine sulfoxide reductases A and B of *Enterococcus faecalis* in oxidative stress and virulence. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 9, p. 3889–3897, 2010.

88 LEBRETON, F. *et al.* *Galleria mellonella* as a model for studying *Enterococcus faecium* host persistence. **Microbial Physiology**, v. 21, n. 3–4, p. 191–196, 2011.

89 CHIBEBE JUNIOR, J. *et al.* Photodynamic and antibiotic therapy impair the pathogenesis of *Enterococcus faecium* in a whole animal insect model. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e55926, 2013.

90 RIGUERO, V. *et al.* Immobilized metal affinity chromatography optimization for poly-histidine tagged proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 1629, p. 461505, 2020. DOI: 10.1016/j.chroma.2020.461505.

91 BORNHORST, J. A.; FALKE, J. J. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. **Methods in Enzymology**, v. 326, p. 245–254, 2000.

92 ALBESA-JOVÉ, D. *et al.* Structure–function relationships of membrane-associated GT-B glycosyltransferases. **Glycobiology**, v. 24, n. 2, p. 108–124, 2014.

93 DEVINDER, K. *et al.* Biosynthesis of mycobacterial lipoarabinomannan: Role of a branching mannosyltransferase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 37, p. 13664–13669, 2006.

94 LIEBAU, J. *et al.* New insights into the membrane association mechanism of the glycosyltransferase WaaG from *Escherichia coli*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1860, n.

3, p. 683–690, 2018.

95 HASHIMOTO, K. *et al.* Functional states of homooligomers: insights from the evolution of glycosyltransferases. **Journal of Molecular Biology**, v. 399, n. 1, p. 196–206, 2010.

96 FULTON, Z. *et al.* Crystal Structure of a UDP-glucose-specific Glycosyltransferase from a *Mycobacterium* Species.* **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 41, p. 27881–27890, 2008.

97 FLINT, J. *et al.* Structural dissection and high-throughput screening of mannosylglycerate synthase. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 12, n. 7, p. 608–614, 2005.

98 GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2527–2535, 2006.

99 GREENFIELD, N. J. ; FASMAN, G. D. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. **Biochemistry**, v. 8, n. 10, p. 4108–4116, 1969.

100 MARTINEZ-FLEITES, C. *et al.* Insights into the synthesis of lipopolysaccharide and antibiotics through the structures of two retaining glycosyltransferases from family GT4. **Chemical Biology**, v. 13, n. 11, p. 1143–1152, 2006.

101 ALBESA-JOVÉ, D.; GUERIN, M. E. The conformational plasticity of glycosyltransferases. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 40, p. 23–32, 2016. DOI: 10.1016/j.sbi.2016.07.007.

102 GLOSTER, T. M. Advances in understanding glycosyltransferases from a structural perspective. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 28, p. 131–141, 2014. DOI: 10.1016/j.sbi.2014.08.012.

103 HU, Y.; WALKER, S. Remarkable structural similarities between diverse glycosyltransferases. **Chemistry & Biology**, v. 9, n. 12, p. 1287–1296, 2002.

104 BRETON, C.; FOURNEL-GIGLEUX, S.; PALCIC, M. M. Recent structures, evolution and mechanisms of glycosyltransferases. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 22, n. 5, p. 540–549, 2012.

105 BRETON, C. *et al.* Structures and mechanisms of glycosyltransferases. **Glycobiology**, v. 16, n. 2, p. 29R–37R, 2006.

106 GIGANTI, D. *et al.* Secondary structure reshuffling modulates glycosyltransferase function at the membrane. **Nature Chemical Biology**, v. 11, n. 1, p. 16–18, 2015.

107 GUERIN, M. E. *et al.* New insights into the early steps of phosphatidylinositol mannoside biosynthesis in mycobacteria: PimB. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 38, p. 25687–25696, 2009.

ANEXO A – PM usados para análise metabólica das linhagens *E. faecium* HBSJRP
18_2.1 e HBSJRP 18_2.7 no Biolog



Phenotype MicroArrays™

PM1 MicroPlate™ Carbon Sources

A1 Negative Control	A2 L-Arabinose	A3 N-Acetyl-D-Glucosamine	A4 D-Saccharic Acid	A5 Succinic Acid	A6 D-Galactose	A7 L-Aspartic Acid	A8 L-Proline	A9 D-Alanine	A10 D-Trehalose	A11 D-Mannose	A12 Dulcitol
B1 D-Serine	B2 D-Sorbitol	B3 Glycerol	B4 L-Fucose	B5 D-Glucuronic Acid	B6 D-Gluconic Acid	B7 D,L- α -Glycerol-Phosphate	B8 D-Xylose	B9 L-Lactic Acid	B10 Formic Acid	B11 D-Mannitol	B12 L-Glutamic Acid
C1 D-Glucose-6-Phosphate	C2 D-Galactonic Acid- γ -Lactone	C3 D,L-Malic Acid	C4 D-Ribose	C5 Tween 20	C6 L-Rhamnose	C7 D-Fructose	C8 Acetic Acid	C9 α -D-Glucose	C10 Maltose	C11 D-Melibiose	C12 Thymidine
D-1 L-Asparagine	D2 D-Aspartic Acid	D3 D-Glucosaminic Acid	D4 1,2-Propanediol	D5 Tween 40	D6 α -Keto-Glutaric Acid	D7 α -Keto-Butyric Acid	D8 α -Methyl-D-Galactoside	D9 α -D-Lactose	D10 Lactulose	D11 Sucrose	D12 Uridine
E1 L-Glutamine	E2 m-Tartaric Acid	E3 D-Glucose-1-Phosphate	E4 D-Fructose-6-Phosphate	E5 Tween 80	E6 α -Hydroxy Glutaric Acid- γ -Lactone	E7 α -Hydroxy Butyric Acid	E8 β -Methyl-D-Glucoside	E9 Adonitol	E10 Maltotriose	E11 2-Deoxy Adenosine	E12 Adenosine
F1 Glycyl-L-Aspartic Acid	F2 Citric Acid	F3 myo-Inositol	F4 D-Threonine	F5 Fumaric Acid	F6 D,L-Succinic Acid	F7 Propionic Acid	F8 Mucic Acid	F9 Glycolic Acid	F10 Glyoxylic Acid	F11 D-Cellobiose	F12 Inosine
G1 Glycyl-L-Glutamic Acid	G2 Tricarballic Acid	G3 L-Serine	G4 L-Threonine	G5 L-Alanine	G6 L-Alanyl-Glycine	G7 Acetoacetic Acid	G8 N-Acetyl- β -D-Mannosamine	G9 Mono Methyl Succinate	G10 Methyl Pyruvate	G11 D-Malic Acid	G12 L-Malic Acid
H1 Glycyl-L-Proline	H2 p-Hydroxy Phenyl Acetic Acid	H3 m-Hydroxy Phenyl Acetic Acid	H4 Tyramine	H5 D-Psicose	H6 L-Lyxose	H7 Glucuronamide	H8 Pyruvic Acid	H9 L-Galactonic Acid- γ -Lactone	H10 D-Galacturonic Acid	H11 Phenylethylamine	H12 2-Aminoethanol

PM2A MicroPlate™ Carbon Sources

A1 Negative Control	A2 Chondroitin Sulfate C	A3 α -Cyclodextrin	A4 β -Cyclodextrin	A5 γ -Cyclodextrin	A6 Dextrin	A7 Gelatin	A8 Glycogen	A9 Inulin	A10 Laminarin	A11 Mannan	A12 Pectin
B1 N-Acetyl-D-Galactosamine	B2 N-Acetyl-Neuraminic Acid	B3 β -D-Allose	B4 Amygdalin	B5 D-Arabinose	B6 D-Arabitol	B7 L-Arabitol	B8 Arbutin	B9 2-Deoxy-D-Ribose	B10 i-Erythritol	B11 D-Fucose	B12 3-O- β -D-Galactopyranosyl-D-Arabinose
C1 Gentiobiose	C2 L-Glucose	C3 Lactitol	C4 D-Melezitose	C5 Maltitol	C6 α -Methyl-D-Glucoside	C7 β -Methyl-D-Galactoside	C8 3-Methyl Glucose	C9 β -Methyl-D-Glucuronic Acid	C10 α -Methyl-D-Mannoside	C11 β -Methyl-D-Xyloside	C12 Palatinose
D1 D-Raffinose	D2 Salicin	D3 Sedoheptulosan	D4 L-Sorbose	D5 Stachyose	D6 D-Tagatose	D7 Turannose	D8 Xylitol	D9 N-Acetyl-D-Glucosaminitol	D10 γ -Amino Butyric Acid	D11 δ -Amino Valeric Acid	D12 Butyric Acid
E1 Capric Acid	E2 Caproic Acid	E3 Citraconic Acid	E4 Citramalic Acid	E5 D-Glucosamine	E6 2-Hydroxy Benzoic Acid	E7 4-Hydroxy Benzoic Acid	E8 α -Hydroxy Butyric Acid	E9 Glycolic Acid	E10 α -Keto-Valeric Acid	E11 Itaconic Acid	E12 5-Keto-D-Gluconic Acid
F1 D-Lactic Acid Methyl Ester	F2 Malonic Acid	F3 Melibionnic Acid	F4 Oxalic Acid	F5 Oxalomalic Acid	F6 Quinic Acid	F7 D-Ribono-1,4-Lactone	F8 Sebacic Acid	F9 Sorbic Acid	F10 Succinamic Acid	F11 D-Tartaric Acid	F12 L-Tartaric Acid
G1 Acetamide	G2 L-Alaninamide	G3 N-Acetyl-L-Glutamic Acid	G4 L-Arginine	G5 Glycine	G6 L-Histidine	G7 L-Homoserine	G8 Hydroxy-L-Proline	G9 L-Isoleucine	G10 L-Leucine	G11 L-Lysine	G12 L-Methionine
H1 L-Ornithine	H2 L-Phenylalanine	H3 L-Pyroglutamic Acid	H4 L-Valine	H5 D,L-Carnitine	H6 Sec-Butylamine	H7 D,L-Octopamine	H8 Putrescine	H9 Dihydroxy Acetone	H10 2,3-Butanediol	H11 2,3-Butanedione	H12 3-Hydroxy-2-Butanone



PM3B MicroPlate™ Nitrogen Sources

A1 Negative Control	A2 Ammonia	A3 Nitrite	A4 Nitrate	A5 Urea	A6 Biuret	A7 L-Alanine	A8 L-Arginine	A9 L-Asparagine	A10 L-Aspartic Acid	A11 L-Cysteine	A12 L-Glutamic Acid
B1 L-Glutamine	B2 Glycine	B3 L-Histidine	B4 L-Isoleucine	B5 L-Leucine	B6 L-Lysine	B7 L-Methionine	B8 L-Phenylalanine	B9 L-Proline	B10 L-Serine	B11 L-Threonine	B12 L-Tryptophan
C1 L-Tyrosine	C2 L-Valine	C3 D-Alanine	C4 D-Asparagine	C5 D-Aspartic Acid	C6 D-Glutamic Acid	C7 D-Lysine	C8 D-Serine	C9 D-Valine	C10 L-Citrulline	C11 L-Homoserine	C12 L-Ornithine
D1 N-Acetyl-L-Glutamic Acid	D2 N-Phthaloyl-L-Glutamic Acid	D3 L-Pyroglutamic Acid	D4 Hydroxylamine	D5 Methylamine	D6 N-Amylamine	D7 N-Butylamine	D8 Ethylamine	D9 Ethanolamine	D10 Ethylenediamine	D11 Putrescine	D12 Agmatine
E1 Histamine	E2 β-Phenylethylamine	E3 Tyramine	E4 Acetamide	E5 Formamide	E6 Glucuronamide	E7 D,L-Lactamide	E8 D-Glucosamine	E9 D-Galactosamine	E10 D-Mannosamine	E11 N-Acetyl-D-Glucosamine	E12 N-Acetyl-D-Galactosamine
F1 N-Acetyl-D-Mannosamine	F2 Adenine	F3 Adenosine	F4 Cytidine	F5 Cytosine	F6 Guanine	F7 Guanosine	F8 Thymine	F9 Thymidine	F10 Uracil	F11 Uridine	F12 Inosine
G1 Xanthine	G2 Xanthosine	G3 Uric Acid	G4 Alloxan	G5 Allantoin	G6 Parabanic Acid	G7 D,L-α-Amino-N-Butyric Acid	G8 D-Amino-N-Butyric Acid	G9 α-Amino-N-Caproic Acid	G10 D,L-α-Amino-Caprylic Acid	G11 β-Amino-N-Valeric Acid	G12 α-Amino-N-Valeric Acid
H1 Ala-Asp	H2 Ala-Gln	H3 Ala-Glu	H4 Ala-Gly	H5 Ala-His	H6 Ala-Leu	H7 Ala-Thr	H8 Gly-Asn	H9 Gly-Gln	H10 Gly-Glu	H11 Gly-Met	H12 Met-Ala

PM4A MicroPlate™ Phosphorus and Sulfur Sources

A1 Negative Control	A2 Phosphate	A3 Pyrophosphate	A4 Trimeta Phosphate	A5 Tripoly Phosphate	A6 Triethyl Phosphate	A7 Hypophosphite	A8 Adenosine-2'-monophosphate	A9 Adenosine-3'-monophosphate	A10 Adenosine-5'-monophosphate	A11 Adenosine-2',3'-cyclic monophosphate	A12 Adenosine-3',5'-cyclic monophosphate
B1 Thiophosphate	B2 Dithiophosphate	B3 D,L-α-Glycerol Phosphate	B4 β-Glycerol Phosphate	B5 Carbamyl Phosphate	B6 D-2-Phospho-Glyceric Acid	B7 D-3-Phospho-Glyceric Acid	B8 Guanosine-2'-monophosphate	B9 Guanosine-3'-monophosphate	B10 Guanosine-5'-monophosphate	B11 Guanosine-2',3'-cyclic monophosphate	B12 Guanosine-3',5'-cyclic monophosphate
C1 Phosphoenol Pyruvate	C2 Phospho-Glycolic Acid	C3 D-Glucose-1-Phosphate	C4 D-Glucose-6-Phosphate	C5 2-Deoxy-D-Glucose-6-Phosphate	C6 D-Glucosamine-6-Phosphate	C7 6-Phospho-Gluconic Acid	C8 Cytidine-2'-monophosphate	C9 Cytidine-3'-monophosphate	C10 Cytidine-5'-monophosphate	C11 Cytidine-2',3'-cyclic monophosphate	C12 Cytidine-3',5'-cyclic monophosphate
D1 D-Mannose-1-Phosphate	D2 D-Mannose-6-Phosphate	D3 Cysteamine-S-Phosphate	D4 Phospho-L-Arginine	D5 O-Phospho-D-Serine	D6 O-Phospho-L-Serine	D7 O-Phospho-L-Threonine	D8 Uridine-2'-monophosphate	D9 Uridine-3'-monophosphate	D10 Uridine-5'-monophosphate	D11 Uridine-2',3'-cyclic monophosphate	D12 Uridine-3',5'-cyclic monophosphate
E1 O-Phospho-D-Tyrosine	E2 O-Phospho-L-Tyrosine	E3 Phosphocreatine	E4 Phosphoryl-Choline	E5 O-Phosphoryl-Ethanolamine	E6 Phosphono Acetic Acid	E7 2-Aminoethyl Phosphonic Acid	E8 Methylene Diphosphonic Acid	E9 Thymidine-3'-monophosphate	E10 Thymidine-5'-monophosphate	E11 Inositol Hexaphosphate	E12 Thymidine 3',5'-cyclic monophosphate
F1 Negative Control	F2 Sulfate	F3 Thiosulfate	F4 Tetrathionate	F5 Thiophosphate	F6 Dithiophosphate	F7 L-Cysteine	F8 D-Cysteine	F9 L-Cysteinyl-Glycine	F10 L-Cysteic Acid	F11 Cysteamine	F12 L-Cysteine Sulfonic Acid
G1 N-Acetyl-L-Cysteine	G2 S-Methyl-L-Cysteine	G3 Cystathionine	G4 Lanthionine	G5 Glutathione	G6 D,L-Ethionine	G7 L-Methionine	G8 D-Methionine	G9 Glycyl-L-Methionine	G10 N-Acetyl-D,L-Methionine	G11 L-Methionine Sulfoxide	G12 L-Methionine Sulfone
H1 L-Djenkolic Acid	H2 Thiourea	H3 1-Thio-β-D-Glucose	H4 D,L-Lipoamide	H5 Taurocholic Acid	H6 Taurine	H7 Hypotaurine	H8 P-Amino Benzene Sulfonic Acid	H9 Butane Sulfonic Acid	H10 2-Hydroxyethane Sulfonic Acid	H11 Methane Sulfonic Acid	H12 Tetramethylene Sulfone



PM5 MicroPlate™ Nutrient Supplements

A1 Negative Control	A2 Positive Control	A3 L-Alanine	A4 L-Arginine	A5 L-Asparagine	A6 L-Aspartic Acid	A7 L-Cysteine	A8 L-Glutamic Acid	A9 Adenosine-3',5'-cyclic monophosphate	A10 Adenine	A11 Adenosine	A12 2'-Deoxy Adenosine
B1 L-Glutamine	B2 Glycine	B3 L-Histidine	B4 L-Isoleucine	B5 L-Leucine	B6 L-Lysine	B7 L-Methionine	B8 L-Phenylalanine	B9 Guanosine-3',5'-cyclic monophosphate	B10 Guanine	B11 Guanosine	B12 2'-Deoxy Guanosine
C1 L-Proline	C2 L-Serine	C3 L-Threonine	C4 L-Tryptophan	C5 L-Tyrosine	C6 L-Valine	C7 L-Isoleucine + L-Valine	C8 trans-4-Hydroxy L-Proline	C9 (5) 4-Amino Imidazole-4(5)-Carboxamide	C10 Hypoxanthine	C11 Inosine	C12 2'-Deoxy Inosine
D1 L-Ornithine	D2 L-Citrulline	D3 Chorismic Acid	D4 (-)Shikimic Acid	D5 L-Homoserine Lactone	D6 D-Alanine	D7 D-Aspartic Acid	D8 D-Glutamic Acid	D9 D,L- α,ϵ -Disminopimelic Acid	D10 Cytosine	D11 Cytidine	D12 2'-Deoxy Cytidine
E1 Putrescine	E2 Spermidine	E3 Spermine	E4 Pyridoxine	E5 Pyridoxal	E6 Pyridoxamine	E7 β -Alanine	E8 D-Pantothenic Acid	E9 Orotic Acid	E10 Uracil	E11 Uridine	E12 2'-Deoxy Uridine
F1 Quinolinic Acid	F2 Nicotinic Acid	F3 Nicotinamide	F4 β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide	F5 β -Amino-Levulinic Acid	F6 Hematin	F7 Deferoxamine Mesylate	F8 D-(+)-Glucose	F9 N-Acetyl D-Glucosamine	F10 Thymine	F11 Glutathione (reduced form)	F12 Thymidine
G1 Oxaloacetic Acid	G2 D-Biotin	G3 Cyano-Cobalamin	G4 p-Amino-Benzoic Acid	G5 Folic Acid	G6 Inosine + Thiamine	G7 Thiamine	G8 Thiamine Pyrophosphate	G9 Riboflavin	G10 Pyrrolo-Quinoline Quinone	G11 Menadione	G12 myo-Inositol
H1 Butyric Acid	H2 D,L- α -Hydroxy-Butyric Acid	H3 α -Keto- Butyric Acid	H4 Caprylic Acid	H5 D,L- α -Lipoic Acid (oxidized form)	H6 D,L-Mevelonic Acid	H7 D,L-Carnitine	H8 Choline	H9 Tween 20	H10 Tween 40	H11 Tween 60	H12 Tween 80

PM6 MicroPlate™ Peptide Nitrogen sources

A1 Negative Control	A2 Positive Control- L-Glutamine	A3 Ala-Ala	A4 Ala-Arg	A5 Ala-Asn	A6 Ala-Glu	A7 Ala-Gly	A8 Ala-His	A9 Ala-Leu	A10 Ala-Lys	A11 Ala-Phe	A12 Ala-Pro
B1 Ala-Ser	B2 Ala-Thr	B3 Ala-Trp	B4 Ala-Tyr	B5 Arg-Ala	B6 Arg-Arg	B7 Arg-Asp	B8 Arg-Gln	B9 Arg-Glu	B10 Arg-Ile	B11 Arg-Leu	B12 Arg-Lys
C1 Arg-Met	C2 Arg-Phe	C3 Arg-Ser	C4 Arg-Trp	C5 Arg-Tyr	C6 Arg-Val	C7 Asn-Glu	C8 Asn-Val	C9 Asp-Asp	C10 Asp-Glu	C11 Asp-Leu	C12 Asp-Lys
D1 Asp-Phe	D2 Asp-Trp	D3 Asp-Val	D4 Cys-Gly	D5 Gln-Gln	D6 Gln-Gly	D7 Glu-Asp	D8 Glu-Glu	D9 Glu-Gly	D10 Glu-Ser	D11 Glu-Trp	D12 Glu-Tyr
E1 Glu-Val	E2 Gly-Ala	E3 Gly-Arg	E4 Gly-Cys	E5 Gly-Gly	E6 Gly-His	E7 Gly-Leu	E8 Gly-Lys	E9 Gly-Met	E10 Gly-Phe	E11 Gly-Pro	E12 Gly-Ser
F1 Gly-Thr	F2 Gly-Trp	F3 Gly-Tyr	F4 Gly-Val	F5 His-Asp	F6 His-Gly	F7 His-Leu	F8 His-Lys	F9 His-Met	F10 His-Pro	F11 His-Ser	F12 His-Trp
G1 His-Tyr	G2 His-Val	G3 Ile-Ala	G4 Ile-Arg	G5 Ile-Gln	G6 Ile-Gly	G7 Ile-His	G8 Ile-Ile	G9 Ile-Met	G10 Ile-Phe	G11 Ile-Pro	G12 Ile-Ser
H1 Ile-Trp	H2 Ile-Tyr	H3 Ile-Val	H4 Leu-Ala	H5 Leu-Arg	H6 Leu-Asp	H7 Leu-Glu	H8 Leu-Gly	H9 Leu-Ile	H10 Leu-Leu	H11 Leu-Met	H12 Leu-Phe


PM7 MicroPlate™ Peptide Nitrogen sources

A1 Negative Control	A2 Positive Control: L-Glutamine	A3 Leu-Ser	A4 Leu-Trp	A5 Leu-Val	A6 Lys-Ala	A7 Lys-Arg	A8 Lys-Glu	A9 Lys-Ile	A10 Lys-Leu	A11 Lys-Lys	A12 Lys-Phe
B1 Lys-Pro	B2 Lys-Ser	B3 Lys-Thr	B4 Lys-Trp	B5 Lys-Tyr	B6 Lys-Val	B7 Met-Arg	B8 Met-Asp	B9 Met-Gln	B10 Met-Glu	B11 Met-Gly	B12 Met-His
C1 Met-Ile	C2 Met-Leu	C3 Met-Lys	C4 Met-Met	C5 Met-Phe	C6 Met-Pro	C7 Met-Trp	C8 Met-Val	C9 Phe-Ala	C10 Phe-Gly	C11 Phe-Ile	C12 Phe-Phe
D1 Phe-Pro	D2 Phe-Ser	D3 Phe-Trp	D4 Pro-Ala	D5 Pro-Asp	D6 Pro-Gln	D7 Pro-Gly	D8 Pro-Hyp	D9 Pro-Leu	D10 Pro-Phe	D11 Pro-Pro	D12 Pro-Tyr
E1 Ser-Ala	E2 Ser-Gly	E3 Ser-His	E4 Ser-Leu	E5 Ser-Met	E6 Ser-Phe	E7 Ser-Pro	E8 Ser-Ser	E9 Ser-Tyr	E10 Ser-Val	E11 Thr-Ala	E12 Thr-Arg
F1 Thr-Glu	F2 Thr-Gly	F3 Thr-Leu	F4 Thr-Met	F5 Thr-Pro	F6 Trp-Ala	F7 Trp-Arg	F8 Trp-Asp	F9 Trp-Glu	F10 Trp-Gly	F11 Trp-Leu	F12 Trp-Lys
G1 Trp-Phe	G2 Trp-Ser	G3 Trp-Trp	G4 Tyr-Tyr	G5 Tyr-Ala	G6 Tyr-Gln	G7 Tyr-Glu	G8 Tyr-Gly	G9 Tyr-His	G10 Tyr-Leu	G11 Tyr-Lys	G12 Tyr-Phe
H1 Tyr-Trp	H2 Tyr-Tyr	H3 Val-Arg	H4 Val-Asn	H5 Val-Asp	H6 Val-Gly	H7 Val-His	H8 Val-Ile	H9 Val-Leu	H10 Val-Tyr	H11 Val-Val	H12 γ-Glu-Gly

PM8 MicroPlate™ Peptide Nitrogen sources

A1 Negative Control	A2 Positive Control: L-Glutamine	A3 Ala-Asp	A4 Ala-Gln	A5 Ala-Ile	A6 Ala-Met	A7 Ala-Val	A8 Asp-Ala	A9 Asp-Gln	A10 Asp-Gly	A11 Glu-Ala	A12 Gly-Asn
B1 Gly-Asp	B2 Gly-Ile	B3 His-Ala	B4 His-Glu	B5 His-His	B6 Ile-Asn	B7 Ile-Leu	B8 Leu-Asn	B9 Leu-His	B10 Leu-Pro	B11 Leu-Tyr	B12 Lys-Asp
C1 Lys-Gly	C2 Lys-Met	C3 Met-Thr	C4 Met-Tyr	C5 Phe-Asp	C6 Phe-Glu	C7 Gln-Glu	C8 Phe-Met	C9 Phe-Tyr	C10 Phe-Val	C11 Pro-Arg	C12 Pro-Asn
D1 Pro-Glu	D2 Pro-Ile	D3 Pro-Lys	D4 Pro-Ser	D5 Pro-Trp	D6 Pro-Val	D7 Ser-Asn	D8 Ser-Asp	D9 Ser-Gln	D10 Ser-Glu	D11 Thr-Asp	D12 Thr-Gln
E1 Thr-Phe	E2 Thr-Ser	E3 Trp-Val	E4 Tyr-Ile	E5 Tyr-Val	E6 Val-Ala	E7 Val-Gln	E8 Val-Glu	E9 Val-Lys	E10 Val-Met	E11 Val-Phe	E12 Val-Pro
F1 Val-Ser	F2 β-Ala-Ala	F3 β-Ala-Gly	F4 β-Ala-His	F5 Met-β-Ala	F6 β-Ala-Phe	F7 D-Ala-D-Ala	F8 D-Ala-Gly	F9 D-Ala-Leu	F10 D-Leu-D-Leu	F11 D-Leu-Gly	F12 D-Leu-Tyr
G1 γ-Glu-Gly	G2 γ-D-Glu-Gly	G3 Gly-D-Ala	G4 Gly-D-Asp	G5 Gly-D-Ser	G6 Gly-D-Thr	G7 Gly-D-Val	G8 Leu-β-Ala	G9 Leu-D-Leu	G10 Phe-β-Ala	G11 Ala-Ala-Ala	G12 D-Ala-Gly-Gly
H1 Gly-Gly-Ala	H2 Gly-Gly-D-Leu	H3 Gly-Gly-Gly	H4 Gly-Gly-Ile	H5 Gly-Gly-Leu	H6 Gly-Gly-Phe	H7 Val-Tyr-Val	H8 Gly-Phe-Phe	H9 Leu-Gly-Gly	H10 Leu-Leu-Leu	H11 Phe-Gly-Gly	H12 Tyr-Gly-Gly

PM9 MicroPlate™ Osmolytes

A1 NaCl 1%	A2 NaCl 2%	A3 NaCl 3%	A4 NaCl 4%	A5 NaCl 5%	A6 NaCl 5.5%	A7 NaCl 6%	A8 NaCl 6.5%	A9 NaCl 7%	A10 NaCl 8%	A11 NaCl 9%	A12 NaCl 10%
B1 NaCl 6%	B2 NaCl 6% + Betaine	B3 NaCl 6% + N-N Dimethyl Glycine	B4 NaCl 6% + Sarcosine	B5 NaCl 6% + Dimethyl sulphonyl propionate	B6 NaCl 6% + MOPS	B7 NaCl 6% + Ectoioine	B8 NaCl 6% + Choline	B9 NaCl 6% + Phosphoryl Choline	B10 NaCl 6% + Creatine	B11 NaCl 6% + Creatinine	B12 NaCl 6% + L- Carnitine
C1 NaCl 6% + KCl	C2 NaCl 6% + L-Proline	C3 NaCl 6% + N-Acetyl L-Glutamine	C4 NaCl 6% + β-Glutamic Acid	C5 NaCl 6% + γ-Amino-N-Butyric Acid	C6 NaCl 6% + Glutathione	C7 NaCl 6% + Glycerol	C8 NaCl 6% + Trehalose	C9 NaCl 6% + Trimethylamine-N-oxide	C10 NaCl 6% + Trimethylamine	C11 NaCl 6% + Octopine	C12 NaCl 6% + Trigonaline
D1 Potassium chloride 3%	D2 Potassium chloride 4%	D3 Potassium chloride 5%	D4 Potassium chloride 6%	D5 Sodium sulfate 2%	D6 Sodium sulfate 3%	D7 Sodium sulfate 4%	D8 Sodium sulfate 5%	D9 Ethylene glycol 5%	D10 Ethylene glycol 10%	D11 Ethylene glycol 15%	D12 Ethylene glycol 20%
E1 Sodium formate 1%	E2 Sodium formate 2%	E3 Sodium formate 3%	E4 Sodium formate 4%	E5 Sodium formate 5%	E6 Sodium formate 6%	E7 Urea 2%	E8 Urea 3%	E9 Urea 4%	E10 Urea 5%	E11 Urea 6%	E12 Urea 7%
F1 Sodium Lactate 1%	F2 Sodium Lactate 2%	F3 Sodium Lactate 3%	F4 Sodium Lactate 4%	F5 Sodium Lactate 5%	F6 Sodium Lactate 6%	F7 Sodium Lactate 7%	F8 Sodium Lactate 8%	F9 Sodium Lactate 9%	F10 Sodium Lactate 10%	F11 Sodium Lactate 11%	F12 Sodium Lactate 12%
G1 Sodium Phosphate pH 7 20mM	G2 Sodium Phosphate pH 7 50mM	G3 Sodium Phosphate pH 7 100mM	G4 Sodium Phosphate pH 7 200mM	G5 Sodium Benzoate pH 5.2 20mM	G6 Sodium Benzoate pH 5.2 50mM	G7 Sodium Benzoate pH 5.2 100mM	G8 Sodium Benzoate pH 5.2 200mM	G9 Ammonium sulfate pH 9 10mM	G10 Ammonium sulfate pH 8 20mM	G11 Ammonium sulfate pH 6 50mM	G12 Ammonium sulfate pH 8 100mM
H1 Sodium Nitrate 10mM	H2 Sodium Nitrate 20mM	H3 Sodium Nitrate 40mM	H4 Sodium Nitrate 60mM	H5 Sodium Nitrate 80mM	H6 Sodium Nitrate 100mM	H7 Sodium Nitrite 10mM	H8 Sodium Nitrite 20mM	H9 Sodium Nitrite 40mM	H10 Sodium Nitrite 60mM	H11 Sodium Nitrite 80mM	H12 Sodium Nitrite 100mM

PM10 MicroPlate™ pH

A1 pH 3.5	A2 pH 4	A3 pH 4.5	A4 pH 5	A5 pH 5.5	A6 pH 6	A7 pH 7	A8 pH 8	A9 pH 8.5	A10 pH 9	A11 pH 9.5	A12 pH 10
B1 pH 4.5	B2 pH 4.5 + L-Alanine	B3 pH 4.5 + L-Arginine	B4 pH 4.5 + L-Asparagine	B5 pH 4.5 + L-Aspartic Acid	B6 pH 4.5 + L-Glutamic Acid	B7 pH 4.5 + L-Glutamine	B8 pH 4.5 + Glycine	B9 pH 4.5 + L-Histidine	B10 pH 4.5 + L-Isoleucine	B11 pH 4.5 + L-Leucine	B12 pH 4.5 + L-Lysine
C1 pH 4.5 + L-Methionine	C2 pH 4.5 + L-Phenylalanine	C3 pH 4.5 + L-Proline	C4 pH 4.5 + L-Serine	C5 pH 4.5 + L-Threonine	C6 pH 4.5 + L-Tryptophan	C7 pH 4.5 + L-Citrulline	C8 pH 4.5 + L-Valine	C9 pH 4.5 + Hydroxy-L-Proline	C10 pH 4.5 + L-Ornithine	C11 pH 4.5 + L-Homoarginine	C12 pH 4.5 + L-Homoserine
D-1 pH 4.5 + Anthranilic Acid	D2 pH 4.5 + L-Norleucine	D3 pH 4.5 + L-Norvaline	D4 pH 4.5 + α-Amino-N-Butyric Acid	D5 pH 4.5 + p-Amino-Benzoic Acid	D6 pH 4.5 + L-Cysteic Acid	D7 pH 4.5 + D-Lysine	D8 pH 4.5 + 5-Hydroxy Lysine	D9 pH 4.5 + 5-Hydroxy Tryptophan	D10 pH 4.5 + D,L-Diamino-Pimelic Acid	D11 pH 4.5 + Trimethylamine-N-oxide	D12 pH 4.5 + Urea
E1 pH 9.5	E2 pH 9.5 + L-Alanine	E3 pH 9.5 + L-Arginine	E4 pH 9.5 + L-Asparagine	E5 pH 9.5 + L-Aspartic Acid	E6 pH 9.5 + L-Glutamic Acid	E7 pH 9.5 + L-Glutamine	E8 pH 9.5 + Glycine	E9 pH 9.5 + L-Histidine	E10 pH 9.5 + L-Isoleucine	E11 pH 9.5 + L-Leucine	E12 pH 9.5 + L-Lysine
F1 pH 9.5 + L-Methionine	F2 pH 9.5 + L-Phenylalanine	F3 pH 9.5 + L-Proline	F4 pH 9.5 + L-Serine	F5 pH 9.5 + L-Threonine	F6 pH 9.5 + L-Tryptophan	F7 pH 9.5 + L-Tyrosine	F8 pH 9.5 + L-Valine	F9 pH 9.5 + Hydroxy-L-Proline	F10 pH 9.5 + L-Ornithine	F11 pH 9.5 + L-Homoarginine	F12 pH 9.5 + L-Homoserine
G1 pH 9.5 + Anthranilic Acid	G2 pH 9.5 + L-Norleucine	G3 pH 9.5 + L-Norvaline	G4 pH 9.5 + Agmatine	G5 pH 9.5 + Cadaverine	G6 pH 9.5 + Putrescine	G7 pH 9.5 + Histamine	G8 pH 9.5 + Phenylethylamine	G9 pH 9.5 + Tyramine	G10 pH 9.5 + Creatine	G11 pH 9.5 + Trimethylamine-N-oxide	G12 pH 9.5 + Urea
H1 X-Caprylate	H2 X-α-D-Glucoside	H3 X-β-D-Glucoside	H4 X-α-D-Galactoside	H5 X-β-D-Galactoside	H6 X-α-D-Glucuronide	H7 X-β-D-Glucuronide	H8 X-β-D-Glucosaminide	H9 X-β-D-Galactosaminide	H10 X-α-D-Mannoside	H11 X-PO4	H12 X-SO4

PM11C MicroPlate™

A1 Amikacin	A2 Amikacin	A3 Amikacin	A4 Amikacin	A5 Chlortetracycline	A6 Chlortetracycline	A7 Chlortetracycline	A8 Chlortetracycline	A9 Lincomycin	A10 Lincomycin	A11 Lincomycin	A12 Lincomycin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
B1 Amoxicillin	B2 Amoxicillin	B3 Amoxicillin	B4 Amoxicillin	B5 Cloxacillin	B6 Cloxacillin	B7 Cloxacillin	B8 Cloxacillin	B9 Lomefloxacin	B10 Lomefloxacin	B11 Lomefloxacin	B12 Lomefloxacin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
C1 Bleomycin	C2 Bleomycin	C3 Bleomycin	C4 Bleomycin	C5 Colistin	C6 Colistin	C7 Colistin	C8 Colistin	C9 Minocycline	C10 Minocycline	C11 Minocycline	C12 Minocycline
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
D1 Capreomycin	D2 Capreomycin	D3 Capreomycin	D4 Capreomycin	D5 Demeclocycline	D6 Demeclocycline	D7 Demeclocycline	D8 Demeclocycline	D9 Nafcillin	D10 Nafcillin	D11 Nafcillin	D12 Nafcillin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E1 Cefazolin	E2 Cefazolin	E3 Cefazolin	E4 Cefazolin	E5 Enoxacin	E6 Enoxacin	E7 Enoxacin	E8 Enoxacin	E9 Nalidixic acid	E10 Nalidixic acid	E11 Nalidixic acid	E12 Nalidixic acid
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
F1 Chloramphenicol	F2 Chloramphenicol	F3 Chloramphenicol	F4 Chloramphenicol	F5 Erythromycin	F6 Erythromycin	F7 Erythromycin	F8 Erythromycin	F9 Neomycin	F10 Neomycin	F11 Neomycin	F12 Neomycin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
G1 Ceftriaxone	G2 Ceftriaxone	G3 Ceftriaxone	G4 Ceftriaxone	G5 Gentamicin	G6 Gentamicin	G7 Gentamicin	G8 Gentamicin	G9 Potassium tellurite	G10 Potassium tellurite	G11 Potassium tellurite	G12 Potassium tellurite
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
H1 Cephalothin	H2 Cephalothin	H3 Cephalothin	H4 Cephalothin	H5 Kanamycin	H6 Kanamycin	H7 Kanamycin	H8 Kanamycin	H9 Ofloxacin	H10 Ofloxacin	H11 Ofloxacin	H12 Ofloxacin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

PM12B MicroPlate™

A1 Penicillin G	A2 Penicillin G	A3 Penicillin G	A4 Penicillin G	A5 Tetracycline	A6 Tetracycline	A7 Tetracycline	A8 Tetracycline	A9 Carbenicillin	A10 Carbenicillin	A11 Carbenicillin	A12 Carbenicillin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
B1 Oxacillin	B2 Oxacillin	B3 Oxacillin	B4 Oxacillin	B5 Penimepicycline	B6 Penimepicycline	B7 Penimepicycline	B8 Penimepicycline	B9 Polymyxin B	B10 Polymyxin B	B11 Polymyxin B	B12 Polymyxin B
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
C1 Paromomycin	C2 Paromomycin	C3 Paromomycin	C4 Paromomycin	C5 Vancomycin	C6 Vancomycin	C7 Vancomycin	C8 Vancomycin	C9 D,L-Serine hydroxamate	C10 D,L-Serine hydroxamate	C11 D,L-Serine hydroxamate	C12 D,L-Serine hydroxamate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
D1 Sisomicin	D2 Sisomicin	D3 Sisomicin	D4 Sisomicin	D5 Sulfamethazine	D6 Sulfamethazine	D7 Sulfamethazine	D8 Sulfamethazine	D9 Novobiocin	D10 Novobiocin	D11 Novobiocin	D12 Novobiocin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E1 2,4-Diamino-6,7-disopropyl-pteridine	E2 2,4-Diamino-6,7-disopropyl-pteridine	E3 2,4-Diamino-6,7-disopropyl-pteridine	E4 2,4-Diamino-6,7-disopropyl-pteridine	E5 Sulfadiazine	E6 Sulfadiazine	E7 Sulfadiazine	E8 Sulfadiazine	E9 Benzethonium chloride	E10 Benzethonium chloride	E11 Benzethonium chloride	E12 Benzethonium chloride
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
F1 Tobramycin	F2 Tobramycin	F3 Tobramycin	F4 Tobramycin	F5 Sulfathiazole	F6 Sulfathiazole	F7 Sulfathiazole	F8 Sulfathiazole	F9 5-Fluoroorotic acid	F10 5-Fluoroorotic acid	F11 5-Fluoroorotic acid	F12 5-Fluoroorotic acid
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
G1 Spectinomycin	G2 Spectinomycin	G3 Spectinomycin	G4 Spectinomycin	G5 Sulfamethoxazole	G6 Sulfamethoxazole	G7 Sulfamethoxazole	G8 Sulfamethoxazole	G9 L-Aspartic- β -hydroxamate	G10 L-Aspartic- β -hydroxamate	G11 L-Aspartic- β -hydroxamate	G12 L-Aspartic- β -hydroxamate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
H1 Spiramycin	H2 Spiramycin	H3 Spiramycin	H4 Spiramycin	H5 Rifampicin	H6 Rifampicin	H7 Rifampicin	H8 Rifampicin	H9 Dodecyltrimethyl ammonium bromide	H10 Dodecyltrimethyl ammonium bromide	H11 Dodecyltrimethyl ammonium bromide	H12 Dodecyltrimethyl ammonium bromide
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

PM13B MicroPlate™

A1 Ampicillin 1	A2 Ampicillin 2	A3 Ampicillin 3	A4 Ampicillin 4	A5 Dequalinium chloride 1	A6 Dequalinium chloride 2	A7 Dequalinium chloride 3	A8 Dequalinium chloride 4	A9 Nickel chloride 1	A10 Nickel chloride 2	A11 Nickel chloride 3	A12 Nickel chloride 4
B1 Azlocillin 1	B2 Azlocillin 2	B3 Azlocillin 3	B4 Azlocillin 4	B5 2, 2'-Dipyridyl 1	B6 2, 2'-Dipyridyl 2	B7 2, 2'-Dipyridyl 3	B8 2, 2'-Dipyridyl 4	B9 Oxolinic acid 1	B10 Oxolinic acid 2	B11 Oxolinic acid 3	B12 Oxolinic acid 4
C1 S-Mercapto- purine 1	C2 S-Mercapto- purine 2	C3 S-Mercapto- purine 3	C4 S-Mercapto- purine 4	C5 Doxycycline 1	C6 Doxycycline 2	C7 Doxycycline 3	C8 Doxycycline 4	C9 Potassium chromate 1	C10 Potassium chromate 2	C11 Potassium chromate 3	C12 Potassium chromate 4
D1 Cefuroxime 1	D2 Cefuroxime 2	D3 Cefuroxime 3	D4 Cefuroxime 4	D5 5-Fluorouracil 1	D6 5-Fluorouracil 2	D7 5-Fluorouracil 3	D8 5-Fluorouracil 4	D9 Rolitetracycline 1	D10 Rolitetracycline 2	D11 Rolitetracycline 3	D12 Rolitetracycline 4
E1 Cytosine-1-beta- D-arabino- furanoside 1	E2 Cytosine-1-beta- D-arabino- furanoside 2	E3 Cytosine-1-beta- D-arabino- furanoside 3	E4 Cytosine-1-beta- D-arabino- furanoside 4	E5 Geneticin (G418) 1	E6 Geneticin (G418) 2	E7 Geneticin (G418) 3	E8 Geneticin (G418) 4	E9 Ruthenium red 1	E10 Ruthenium red 2	E11 Ruthenium red 3	E12 Ruthenium red 4
F1 Cesium chloride 1	F2 Cesium chloride 2	F3 Cesium chloride 3	F4 Cesium chloride 4	F5 Glycine 1	F6 Glycine 2	F7 Glycine 3	F8 Glycine 4	F9 Thallium (I) acetate 1	F10 Thallium (I) acetate 2	F11 Thallium (I) acetate 3	F12 Thallium (I) acetate 4
G1 Cobalt chloride 1	G2 Cobalt chloride 2	G3 Cobalt chloride 3	G4 Cobalt chloride 4	G5 Manganese chloride 1	G6 Manganese chloride 2	G7 Manganese chloride 3	G8 Manganese chloride 4	G9 Trifluoperazine 1	G10 Trifluoperazine 2	G11 Trifluoperazine 3	G12 Trifluoperazine 4
H1 Cupric chloride 1	H2 Cupric chloride 2	H3 Cupric chloride 3	H4 Cupric chloride 4	H5 Moxalactam 1	H6 Moxalactam 2	H7 Moxalactam 3	H8 Moxalactam 4	H9 Tylosin 1	H10 Tylosin 2	H11 Tylosin 3	H12 Tylosin 4

PM14A MicroPlate™

A1 Acriflavine 1	A2 Acriflavine 2	A3 Acriflavine 3	A4 Acriflavine 4	A5 Furaltadone 1	A6 Furaltadone 2	A7 Furaltadone 3	A8 Furaltadone 4	A9 Sanguinarine 1	A10 Sanguinarine 2	A11 Sanguinarine 3	A12 Sanguinarine 4
B1 9-Aminoacridine 1	B2 9-Aminoacridine 2	B3 9-Aminoacridine 3	B4 9-Aminoacridine 4	B5 Fusaric acid 1	B6 Fusaric acid 2	B7 Fusaric acid 3	B8 Fusaric acid 4	B9 Sodium arsenate 1	B10 Sodium arsenate 2	B11 Sodium arsenate 3	B12 Sodium arsenate 4
C1 Boric Acid 1	C2 Boric Acid 2	C3 Boric Acid 3	C4 Boric Acid 4	C5 1-Hydroxy- pyridine-2- thione 1	C6 1-Hydroxy- pyridine-2- thione 2	C7 1-Hydroxy- pyridine-2- thione 3	C8 1-Hydroxy- pyridine-2- thione 4	C9 Sodium cyanate 1	C10 Sodium cyanate 2	C11 Sodium cyanate 3	C12 Sodium cyanate 4
D1 Cadmium chloride 1	D2 Cadmium chloride 2	D3 Cadmium chloride 3	D4 Cadmium chloride 4	D5 Iodoacetate 1	D6 Iodoacetate 2	D7 Iodoacetate 3	D8 Iodoacetate 4	D9 Sodium dichromate 1	D10 Sodium dichromate 2	D11 Sodium dichromate 3	D12 Sodium dichromate 4
E1 Cefoxitin 1	E2 Cefoxitin 2	E3 Cefoxitin 3	E4 Cefoxitin 4	E5 Nitrofurantoin 1	E6 Nitrofurantoin 2	E7 Nitrofurantoin 3	E8 Nitrofurantoin 4	E9 Sodium metaborate 1	E10 Sodium metaborate 2	E11 Sodium metaborate 3	E12 Sodium metaborate 4
F1 Chloramphenicol 1	F2 Chloramphenicol 2	F3 Chloramphenicol 3	F4 Chloramphenicol 4	F5 Piperacillin 1	F6 Piperacillin 2	F7 Piperacillin 3	F8 Piperacillin 4	F9 Sodium metavanadate 1	F10 Sodium metavanadate 2	F11 Sodium metavanadate 3	F12 Sodium metavanadate 4
G1 Chelerythrine 1	G2 Chelerythrine 2	G3 Chelerythrine 3	G4 Chelerythrine 4	G5 Carbenicillin 1	G6 Carbenicillin 2	G7 Carbenicillin 3	G8 Carbenicillin 4	G9 Sodium nitrite 1	G10 Sodium nitrite 2	G11 Sodium nitrite 3	G12 Sodium nitrite 4
H1 EGTA 1	H2 EGTA 2	H3 EGTA 3	H4 EGTA 4	H5 Promethazine 1	H6 Promethazine 2	H7 Promethazine 3	H8 Promethazine 4	H9 Sodium orthovanadate 1	H10 Sodium orthovanadate 2	H11 Sodium orthovanadate 3	H12 Sodium orthovanadate 4

PM15B MicroPlate™

A1 Procaine 1	A2 Procaine 2	A3 Procaine 3	A4 Procaine 4	A5 Guanidine hydrochloride 1	A6 Guanidine hydrochloride 2	A7 Guanidine hydrochloride 3	A8 Guanidine hydrochloride 4	A9 Cefmetazole 1	A10 Cefmetazole 2	A11 Cefmetazole 3	A12 Cefmetazole 4
B1 D-Cycloserine 1	B2 D-Cycloserine 2	B3 D-Cycloserine 3	B4 D-Cycloserine 4	B5 EDTA 1	B6 EDTA 2	B7 EDTA 3	B8 EDTA 4	B9 5,7-Dichloro-8- hydroxy- quinaldine 1	B10 5,7-Dichloro-8- hydroxy- quinaldine 2	B11 5,7-Dichloro-8- hydroxy- quinaldine 3	B12 5,7-Dichloro-8- hydroxy- quinaldine 4
C1 5,7-Dichloro-8- hydroxyquinoline 1	C2 5,7-Dichloro-8- hydroxyquinoline 2	C3 5,7-Dichloro-8- hydroxyquinoline 3	C4 5,7-Dichloro-8- hydroxyquinoline 4	C5 Fusidic acid 1	C6 Fusidic acid 2	C7 Fusidic acid 3	C8 Fusidic acid 4	C9 1,10- Phenanthroline 1	C10 1,10- Phenanthroline 2	C11 1,10- Phenanthroline 3	C12 1,10- Phenanthroline 4
D1 Phleomycin 1	D2 Phleomycin 2	D3 Phleomycin 3	D4 Phleomycin 4	D5 Domiphen bromide 1	D6 Domiphen bromide 2	D7 Domiphen bromide 3	D8 Domiphen bromide 4	D9 Nordihydroguaia retic acid 1	D10 Nordihydroguaia retic acid 2	D11 Nordihydroguaia retic acid 3	D12 Nordihydroguaia retic acid 4
E1 Alexidine 1	E2 Alexidine 2	E3 Alexidine 3	E4 Alexidine 4	E5 5-Nitro-2- furaldehyde semicarbazone 1	E6 5-Nitro-2- furaldehyde semicarbazone 2	E7 5-Nitro-2- furaldehyde semicarbazone 3	E8 5-Nitro-2- furaldehyde semicarbazone 4	E9 Methyl viologen 1	E10 Methyl viologen 2	E11 Methyl viologen 3	E12 Methyl viologen 4
F1 3,4-Dimethoxy- benzyl alcohol 1	F2 3,4-Dimethoxy- benzyl alcohol 2	F3 3,4-Dimethoxy- benzyl alcohol 3	F4 3,4-Dimethoxy- benzyl alcohol 4	F5 Oleandomycin 1	F6 Oleandomycin 2	F7 Oleandomycin 3	F8 Oleandomycin 4	F9 Puromycin 1	F10 Puromycin 2	F11 Puromycin 3	F12 Puromycin 4
G1 CCCP 1	G2 CCCP 2	G3 CCCP 3	G4 CCCP 4	G5 Sodium azide 1	G6 Sodium azide 2	G7 Sodium azide 3	G8 Sodium azide 4	G9 Menadione 1	G10 Menadione 2	G11 Menadione 3	G12 Menadione 4
H1 2-Nitroimidazole 1	H2 2-Nitroimidazole 2	H3 2-Nitroimidazole 3	H4 2-Nitroimidazole 4	H5 Hydroxyurea 1	H6 Hydroxyurea 2	H7 Hydroxyurea 3	H8 Hydroxyurea 4	H9 Zinc chloride 1	H10 Zinc chloride 2	H11 Zinc chloride 3	H12 Zinc chloride 4

PM16A MicroPlate™

A1 Cefotaxime 1	A2 Cefotaxime 2	A3 Cefotaxime 3	A4 Cefotaxime 4	A5 Phosphomycin 1	A6 Phosphomycin 2	A7 Phosphomycin 3	A8 Phosphomycin 4	A9 5-Chloro-7-iodo- 8-hydroxy- quinoline 1	A10 5-Chloro-7-iodo- 8-hydroxy- quinoline 2	A11 5-Chloro-7-iodo- 8-hydroxy- quinoline 3	A12 5-Chloro-7-iodo- 8-hydroxy- quinoline 4
B1 Norfloxacin 1	B2 Norfloxacin 2	B3 Norfloxacin 3	B4 Norfloxacin 4	B5 Sulfanilamide 1	B6 Sulfanilamide 2	B7 Sulfanilamide 3	B8 Sulfanilamide 4	B9 Trimethoprim 1	B10 Trimethoprim 2	B11 Trimethoprim 3	B12 Trimethoprim 4
C1 Dichlofluandil 1	C2 Dichlofluandil 2	C3 Dichlofluandil 3	C4 Dichlofluandil 4	C5 Protamine sulfate 1	C6 Protamine sulfate 2	C7 Protamine sulfate 3	C8 Protamine sulfate 4	C9 Cetylpyridinium chloride 1	C10 Cetylpyridinium chloride 2	C11 Cetylpyridinium chloride 3	C12 Cetylpyridinium chloride 4
D1 1-Chloro-2,4- dinitrobenzene 1	D2 1-Chloro-2,4- dinitrobenzene 2	D3 1-Chloro-2,4- dinitrobenzene 3	D4 1-Chloro-2,4- dinitrobenzene 4	D5 Diamide 1	D6 Diamide 2	D7 Diamide 3	D8 Diamide 4	D9 Cinoxacin 1	D10 Cinoxacin 2	D11 Cinoxacin 3	D12 Cinoxacin 4
E1 Streptomycin 1	E2 Streptomycin 2	E3 Streptomycin 3	E4 Streptomycin 4	E5 5-Azacytidine 1	E6 5-Azacytidine 2	E7 5-Azacytidine 3	E8 5-Azacytidine 4	E9 Rifamycin SV 1	E10 Rifamycin SV 2	E11 Rifamycin SV 3	E12 Rifamycin SV 4
F1 Potassium tellurite 1	F2 Potassium tellurite 2	F3 Potassium tellurite 3	F4 Potassium tellurite 4	F5 Sodium selenite 1	F6 Sodium selenite 2	F7 Sodium selenite 3	F8 Sodium selenite 4	F9 Aluminum sulfate 1	F10 Aluminum sulfate 2	F11 Aluminum sulfate 3	F12 Aluminum sulfate 4
G1 Chromium chloride 1	G2 Chromium chloride 2	G3 Chromium chloride 3	G4 Chromium chloride 4	G5 Ferric chloride 1	G6 Ferric chloride 2	G7 Ferric chloride 3	G8 Ferric chloride 4	G9 L-Glutamic-g- hydroxamate 1	G10 L-Glutamic-g- hydroxamate 2	G11 L-Glutamic-g- hydroxamate 3	G12 L-Glutamic-g- hydroxamate 4
H1 Glycine hydroxamate 1	H2 Glycine hydroxamate 2	H3 Glycine hydroxamate 3	H4 Glycine hydroxamate 4	H5 Chloroxylenol 1	H6 Chloroxylenol 2	H7 Chloroxylenol 3	H8 Chloroxylenol 4	H9 Sorbic acid 1	H10 Sorbic acid 2	H11 Sorbic acid 3	H12 Sorbic acid 4

PM17A MicroPlate™

A1 D-Serine 1	A2 D-Serine 2	A3 D-Serine 3	A4 D-Serine 4	A5 β-Chloro-L-alanine hydrochloride 1	A6 β-Chloro-L-alanine hydrochloride 2	A7 β-Chloro-L-alanine hydrochloride 3	A8 β-Chloro-L-alanine hydrochloride 4	A9 Thiosalicylic acid 1	A10 Thiosalicylic acid 2	A11 Thiosalicylic acid 3	A12 Thiosalicylic acid 4
B1 Sodium salicylate 1	B2 Sodium salicylate 2	B3 Sodium salicylate 3	B4 Sodium salicylate 4	B5 Hygromycin B 1	B6 Hygromycin B 2	B7 Hygromycin B 3	B8 Hygromycin B 4	B9 Ethionamide 1	B10 Ethionamide 2	B11 Ethionamide 3	B12 Ethionamide 4
C1 4-Aminopyridine 1	C2 4-Aminopyridine 2	C3 4-Aminopyridine 3	C4 4-Aminopyridine 4	C5 Sulfachloropyridazine 1	C6 Sulfachloropyridazine 2	C7 Sulfachloropyridazine 3	C8 Sulfachloropyridazine 4	C9 Sulfamonomethoxine 1	C10 Sulfamonomethoxine 2	C11 Sulfamonomethoxine 3	C12 Sulfamonomethoxine 4
D1 Oxycarboxin 1	D2 Oxycarboxin 2	D3 Oxycarboxin 3	D4 Oxycarboxin 4	D5 3-Amino-1,2,4-triazole 1	D6 3-Amino-1,2,4-triazole 2	D7 3-Amino-1,2,4-triazole 3	D8 3-Amino-1,2,4-triazole 4	D9 Chlorpromazine 1	D10 Chlorpromazine 2	D11 Chlorpromazine 3	D12 Chlorpromazine 4
E1 Niaproof 1	E2 Niaproof 2	E3 Niaproof 3	E4 Niaproof 4	E5 Compound 48/80 1	E6 Compound 48/80 2	E7 Compound 48/80 3	E8 Compound 48/80 4	E9 Sodium tungstate 1	E10 Sodium tungstate 2	E11 Sodium tungstate 3	E12 Sodium tungstate 4
F1 Lithium chloride 1	F2 Lithium chloride 2	F3 Lithium chloride 3	F4 Lithium chloride 4	F5 DL-Methionine hydroxamate 1	F6 DL-Methionine hydroxamate 2	F7 DL-Methionine hydroxamate 3	F8 DL-Methionine hydroxamate 4	F9 Tannic acid 1	F10 Tannic acid 2	F11 Tannic acid 3	F12 Tannic acid 4
G1 Chlorambucil 1	G2 Chlorambucil 2	G3 Chlorambucil 3	G4 Chlorambucil 4	G5 Cefamandole nafate 1	G6 Cefamandole nafate 2	G7 Cefamandole nafate 3	G8 Cefamandole nafate 4	G9 Cefoperazone 1	G10 Cefoperazone 2	G11 Cefoperazone 3	G12 Cefoperazone 4
H1 Cefsulodin 1	H2 Cefsulodin 2	H3 Cefsulodin 3	H4 Cefsulodin 4	H5 Caffeine 1	H6 Caffeine 2	H7 Caffeine 3	H8 Caffeine 4	H9 Phenylarsine oxide 1	H10 Phenylarsine oxide 2	H11 Phenylarsine oxide 3	H12 Phenylarsine oxide 4

PM18C MicroPlate™

A1 Ketoprofen 1	A2 Ketoprofen 2	A3 Ketoprofen 3	A4 Ketoprofen 4	A5 Sodium pyrophosphate decahydrate 1	A6 Sodium pyrophosphate decahydrate 2	A7 Sodium pyrophosphate decahydrate 3	A8 Sodium pyrophosphate decahydrate 4	A9 Thiamphenicol 1	A10 Thiamphenicol 2	A11 Thiamphenicol 3	A12 Thiamphenicol 4
B1 Trifluorothymidine 1	B2 Trifluorothymidine 2	B3 Trifluorothymidine 3	B4 Trifluorothymidine 4	B5 Pipemidic Acid 1	B6 Pipemidic Acid 2	B7 Pipemidic Acid 3	B8 Pipemidic Acid 4	B9 Azathioprine 1	B10 Azathioprine 2	B11 Azathioprine 3	B12 Azathioprine 4
C1 Poly-L-lysine 1	C2 Poly-L-lysine 2	C3 Poly-L-lysine 3	C4 Poly-L-lysine 4	C5 Sulfisoxazole 1	C6 Sulfisoxazole 2	C7 Sulfisoxazole 3	C8 Sulfisoxazole 4	C9 Pentachlorophenol 1	C10 Pentachlorophenol 2	C11 Pentachlorophenol 3	C12 Pentachlorophenol 4
D1 Sodium m-arsenite 1	D2 Sodium m-arsenite 2	D3 Sodium m-arsenite 3	D4 Sodium m-arsenite 4	D5 Sodium bromate 1	D6 Sodium bromate 2	D7 Sodium bromate 3	D8 Sodium bromate 4	D9 Lidocaine 1	D10 Lidocaine 2	D11 Lidocaine 3	D12 Lidocaine 4
E1 Sodium metasilicate 1	E2 Sodium metasilicate 2	E3 Sodium metasilicate 3	E4 Sodium metasilicate 4	E5 Sodium m-periodate 1	E6 Sodium m-periodate 2	E7 Sodium m-periodate 3	E8 Sodium m-periodate 4	E9 Antimony (III) chloride 1	E10 Antimony (III) chloride 2	E11 Antimony (III) chloride 3	E12 Antimony (III) chloride 4
F1 Semicarbazide 1	F2 Semicarbazide 2	F3 Semicarbazide 3	F4 Semicarbazide 4	F5 Tinidazole 1	F6 Tinidazole 2	F7 Tinidazole 3	F8 Tinidazole 4	F9 Aztreonam 1	F10 Aztreonam 2	F11 Aztreonam 3	F12 Aztreonam 4
G1 Triclosan 1	G2 Triclosan 2	G3 Triclosan 3	G4 Triclosan 4	G5 3,5-Diamino-1,2,4-triazole (Guanazole) 1	G6 3,5-Diamino-1,2,4-triazole (Guanazole) 2	G7 3,5-Diamino-1,2,4-triazole (Guanazole) 3	G8 3,5-Diamino-1,2,4-triazole (Guanazole) 4	G9 Myricetin 1	G10 Myricetin 2	G11 Myricetin 3	G12 Myricetin 4
H1 5-fluoro-5'-deoxyuridine 1	H2 5-fluoro-5'-deoxyuridine 2	H3 5-fluoro-5'-deoxyuridine 3	H4 5-fluoro-5'-deoxyuridine 4	H5 2-Phenylphenol 1	H6 2-Phenylphenol 2	H7 2-Phenylphenol 3	H8 2-Phenylphenol 4	H9 Plumbagin 1	H10 Plumbagin 2	H11 Plumbagin 3	H12 Plumbagin 4

PM19 MicroPlate™

A1 Josamycin 1	A2 Josamycin 2	A3 Josamycin 3	A4 Josamycin 4	A5 Gallic acid 1	A6 Gallic acid 2	A7 Gallic acid 3	A8 Gallic acid 4	A9 Coumarin 1	A10 Coumarin 2	A11 Coumarin 3	A12 Coumarin 4
B1 Methyltriocetyl- ammonium chloride 1	B2 Methyltriocetyl- ammonium chloride 2	B3 Methyltriocetyl- ammonium chloride 3	B4 Methyltriocetyl- ammonium chloride 4	B5 Harmone 1	B6 Harmone 2	B7 Harmone 3	B8 Harmone 4	B9 2,4-Dinitrophenol 1	B10 2,4-Dinitrophenol 2	B11 2,4-Dinitrophenol 3	B12 2,4-Dinitrophenol 4
C1 Chlorhexidine 1	C2 Chlorhexidine 2	C3 Chlorhexidine 3	C4 Chlorhexidine 4	C5 Umbelliferone 1	C6 Umbelliferone 2	C7 Umbelliferone 3	C8 Umbelliferone 4	C9 Cinnamic acid 1	C10 Cinnamic acid 2	C11 Cinnamic acid 3	C12 Cinnamic acid 4
D1 Disulphiram 1	D2 Disulphiram 2	D3 Disulphiram 3	D4 Disulphiram 4	D5 Iodonitro Tetrazolium Violet 1	D6 Iodonitro Tetrazolium Violet 2	D7 Iodonitro Tetrazolium Violet 3	D8 Iodonitro Tetrazolium Violet 4	D9 Phenyl- methyl- sulfonyl- fluoride (PMSF) 1	D10 Phenyl- methyl- sulfonyl- fluoride (PMSF) 2	D11 Phenyl- methyl- sulfonyl- fluoride (PMSF) 3	D12 Phenyl- methyl- sulfonyl- fluoride (PMSF) 4
E1 FCCP 1	E2 FCCP 2	E3 FCCP 3	E4 FCCP 4	E5 D,L-Thioctic Acid 1	E6 D,L-Thioctic Acid 2	E7 D,L-Thioctic Acid 3	E8 D,L-Thioctic Acid 4	E9 Lawsonone 1	E10 Lawsonone 2	E11 Lawsonone 3	E12 Lawsonone 4
F1 Pheneticillin 1	F2 Pheneticillin 2	F3 Pheneticillin 3	F4 Pheneticillin 4	F5 Blasticidin S 1	F6 Blasticidin S 2	F7 Blasticidin S 3	F8 Blasticidin S 4	F9 Sodium caprylate 1	F10 Sodium caprylate 2	F11 Sodium caprylate 3	F12 Sodium caprylate 4
G1 Lauryl sulfobetaine 1	G2 Lauryl sulfobetaine 2	G3 Lauryl sulfobetaine 3	G4 Lauryl sulfobetaine 4	G5 Dihydro- streptomycin 1	G6 Dihydro- streptomycin 2	G7 Dihydro- streptomycin 3	G8 Dihydro- streptomycin 4	G9 Hydroxylamine 1	G10 Hydroxylamine 2	G11 Hydroxylamine 3	G12 Hydroxylamine 4
H1 Hexamine cobalt (III) chloride 1	H2 Hexamine cobalt (III) chloride 2	H3 Hexamine cobalt (III) chloride 3	H4 Hexamine cobalt (III) chloride 4	H5 Thioglycerol 1	H6 Thioglycerol 2	H7 Thioglycerol 3	H8 Thioglycerol 4	H9 Polymyxin B 1	H10 Polymyxin B 2	H11 Polymyxin B 3	H12 Polymyxin B 4

PM20B MicroPlate™

A1 Amitriptyline 1	A2 Amitriptyline 2	A3 Amitriptyline 3	A4 Amitriptyline 4	A5 Apramycin 1	A6 Apramycin 2	A7 Apramycin 3	A8 Apramycin 4	A9 Benserazide 1	A10 Benserazide 2	A11 Benserazide 3	A12 Benserazide 4
B1 Orphenadrine 1	B2 Orphenadrine 2	B3 Orphenadrine 3	B4 Orphenadrine 4	B5 D,L-Propranolol 1	B6 D,L-Propranolol 2	B7 D,L-Propranolol 3	B8 D,L-Propranolol 4	B9 Tetrazolium violet 1	B10 Tetrazolium violet 2	B11 Tetrazolium violet 3	B12 Tetrazolium violet 4
C1 Thioridazine 1	C2 Thioridazine 2	C3 Thioridazine 3	C4 Thioridazine 4	C5 Atropine 1	C6 Atropine 2	C7 Atropine 3	C8 Atropine 4	C9 Ornidazole 1	C10 Ornidazole 2	C11 Ornidazole 3	C12 Ornidazole 4
D1 Proflavine 1	D2 Proflavine 2	D3 Proflavine 3	D4 Proflavine 4	D5 Ciprofloxacin 1	D6 Ciprofloxacin 2	D7 Ciprofloxacin 3	D8 Ciprofloxacin 4	D9 18-Crown-6 ether 1	D10 18-Crown-6 ether 2	D11 18-Crown-6 ether 3	D12 18-Crown-6 ether 4
E1 Crystal violet 1	E2 Crystal violet 2	E3 Crystal violet 3	E4 Crystal violet 4	E5 Dodine 1	E6 Dodine 2	E7 Dodine 3	E8 Dodine 4	E9 Hexa- chlorophene 1	E10 Hexa- chlorophene 2	E11 Hexa- chlorophene 3	E12 Hexa- chlorophene 4
F1 4-Hydroxy- coumarin 1	F2 4-Hydroxy- coumarin 2	F3 4-Hydroxy- coumarin 3	F4 4-Hydroxy- coumarin 4	F5 Oxytetracycline 1	F6 Oxytetracycline 2	F7 Oxytetracycline 3	F8 Oxytetracycline 4	F9 Pridinol 1	F10 Pridinol 2	F11 Pridinol 3	F12 Pridinol 4
G1 Captan 1	G2 Captan 2	G3 Captan 3	G4 Captan 4	G5 3,5-Dinitro- benzene 1	G6 3,5-Dinitro- benzene 2	G7 3,5-Dinitro- benzene 3	G8 3,5-Dinitro- benzene 4	G9 8-Hydroxy- quinoline 1	G10 8-Hydroxy- quinoline 2	G11 8-Hydroxy- quinoline 3	G12 8-Hydroxy- quinoline 4
H1 Patulin 1	H2 Patulin 2	H3 Patulin 3	H4 Patulin 4	H5 Tolyfluamid 1	H6 Tolyfluamid 2	H7 Tolyfluamid 3	H8 Tolyfluamid 4	H9 Troleandomycin 1	H10 Troleandomycin 2	H11 Troleandomycin 3	H12 Troleandomycin 4