



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

MAYARA MAYELE MIYACHIRO

CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DE COMPONENTES DE UM  
COMPLEXO ESSENCIAL PARA A FORMAÇÃO DA PAREDE  
BACTERIANA

BIOPHYSICAL CHARACTERIZATION OF AN ESSENTIAL  
PROTEIN COMPLEX FOR BACTERIAL CELL WALL  
FORMATION

CAMPINAS

2018

**MAYARA MAYELE MIYACHIRO**

**CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DE COMPONENTES DE UM  
COMPLEXO ESSENCIAL PARA A FORMAÇÃO DA PAREDE  
BACTERIANA**

**BIOPHYSICAL CHARACTERIZATION OF AN ESSENTIAL PROTEIN  
COMPLEX FOR BACTERIAL CELL WALL FORMATION**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Genética e Biologia Molecular na área de concentração de microbiologia.*

*Thesis presented to the Institute of Biology of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Genetics and Molecular Biology in the concentration area of microbiology.*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE A VERSÃO  
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA MAYARA  
MAYELE MIYACHIRO E ORIENTADA PELA DRA.  
ANDRÉA DESSEN DE SOUZA E SILVA.

*Orientadora:* Dra. Andréa Dessen de Souza e Silva

**CAMPINAS**

**2018**

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** FAPESP, 2013/02451-0

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

M699c Miyachiro, Mayara Mayele, 1989-  
Caracterização biofísica de componentes de um complexo essencial para a formação da parede bacteriana / Mayara Mayele Miyachiro. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Andréa Dessen de Souza e Silva.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Peptidoglicano - Biossíntese. 2. Parede celular bacteriana. 3. Proteínas de bactérias. 4. Oligômeros. 5. Interação proteína-proteína. I. Dessen, Andréa. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Biophysical characterization of an essential protein complex for bacterial cell wall formation

**Palavras-chave em inglês:**

Peptidoglycan - Biosynthesis

Bacterial cell walls

Mur enzymes

Oligomers

Protein-protein interaction

**Área de concentração:** Genética de Microorganismos

**Titulação:** Doutora em Genética e Biologia Molecular

**Banca examinadora:**

Andréa Dessen de Souza e Silva [Orientador]

Juliana Helena Costa Smetana

André Luis Berteli Ambrósio

Ana Carolina de Mattos Zeri

Gustavo Fernando Mercaldi

**Data de defesa:** 03-01-2018

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular

Campinas, 03 de Janeiro de 2018

**COMISSÃO EXAMINADORA**

Dra. Andréa Dessen de Souza e Silva

Dra. Juliana Helena Costa Smetana

Dr. André Luis Berteli Ambrósio

Dra. Ana Carolina de Mattos Zeri

Dr. Gustavo Fernando Mercaldi

*Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.*

## AGRADECIMENTOS

A experiência de fazer um doutorado, sem dúvidas foi única e incrível. Durante todos esses anos tive a inestimável oportunidade de trabalhar com pessoas incríveis e altamente capacitadas, além disso estes anos me proporcionaram conhecer grandes pesquisadores e criar amizades duradouras que vão além das fronteiras do nosso país. Primeiramente, gostaria de agradecer profundamente a minha orientadora Dra. Andréa Dessen que dedicou devocionalmente seu tempo para me guiar e me incentivar em todos os momentos bons e ruins que percorri no meu doutorado. Andréa, obrigada pelo positivismo e entusiasmo para fazer ciência, seus conselhos ultrapassaram uma simples orientação e sem você a conclusão deste doutorado não seria possível. Sou muito grata por ter trabalhado com você e por causa da sua orientação nunca me esquecerei como é ser uma verdadeira líder de grupo.

Quando cheguei no grupo PATBAC tive a melhor recepção que poderia imaginar pelo Dr. David Neves. Obrigada David por estar sempre motivado e sorridente, por ter me ajudado em tudo no primeiro ano do meu doutorado. Mesmo que esteja longe sei que se importa muito com meu sucesso e sou grata por ter sua amizade.

Este trabalho também não seria possível sem os conselhos e ajuda do Dr. Daniel Trindade. Dani, você merece meus mais sinceros agradecimentos por todas as dicas e incríveis conselhos que compartilhou comigo. Obrigada pela paciência e disposição para me ensinar biologia molecular e além disso, me mostrar que um cientista deve desconfiar de tudo!

Samira merci pour tout! Sou grata por seus conselhos sobre ciência e principalmente sobre a vida. Sua amizade foi um grande presente e meu doutorado não teria tido tanta graça sem você no laboratório.

Quero agradecer a todos do grupo PATBAC - Brasil. Paulo, Lucas, Fernanda, Caique. Obrigada pelo incentivo e por tornar nosso grupo um ambiente agradável e divertido. E também nosso grupo PATBAC – França. Grazie Federica (Fedex)! Danke Ioulia (Iou Iou)! Merci Quentin (Q)! Obrigada Alex! Merci Charlotte! Спасибо Marko! Gracias Carlos!

Esse trabalho não teria sido possível sem a ajuda dos nossos colaboradores Dra. Martina Hrast, por ceder os substratos para as enzimas deste trabalho. Dra. Adriana Paes Leme e Dra. Daniela Granato pelas análises de espectrometria de massas. E Dr. Carlos Contreras-

Martel, cristalógrafo do nosso grupo, que me ensinou com paciência e entusiasmo a cristalografia de proteínas.

Durante esse tempo tive a sorte de trabalhar no LNBio que me proporcionou fazer pesquisa de qualidade em um ambiente muito agradável. Sou grata a todos os funcionários que me ajudaram da melhor forma possível. Também gostaria de agradecer a todas as pessoas que trabalham nas plataformas de ensaios do LNBio pelo suporte diário. Obrigada Gi e Celiza (Robolab) e muitíssimo obrigada Fer (LEC) sua ajuda foi inestimável e meu tempo no LEC teria sido chato sem você!

Andréa (Llamita) muchas gracias por su amistad! O fim do mundo parece mais legal com as nossas conversas! Fer Büchli e Angelinha obrigada por todo carinho e apoio. Maria Eugênia (GG) obrigada por ser essa pessoa linda e amável, minhas tardes não seriam a mesma sem você! Nadia obrigada por seus incríveis conselhos sobre a pesquisa e sobre a vida, te admiro muito e nesse pouco tempo que te conheço aprendi muito com você.

Sou extremamente grata à minha mãe “Maria Cecília” por todo amor e cuidado durante toda a minha vida, e dedico esse trabalho em memória do meu Pai “Sérgio Miyachiro” que teria ficado extremamente orgulhoso de ver mais uma etapa da minha vida concluída. Também agradeço ao meu irmão Juan e minha irmã de coração Elizabete pelo amor e respeito por meu trabalho. Obrigada Robert, por sua amizade, carinho e companheirismo; sou grata por você fazer parte da minha vida. Amo todos vocês e quero dizer que esta etapa da minha vida não teria sido possível sem a ajuda de cada um.

Meus sinceros agradecimentos à minha família, colegas e amigos que fizeram esse momento se tornar especial e único.

## RESUMO

As interações entre proteínas desempenham papéis biológicos importantes nas células, como no caso da biossíntese do peptidoglicano (PG), maior componente da parede celular bacteriana e responsável por definir a morfologia e proteger a célula do estresse causado pela alta pressão osmótica intracelular presente tanto em bactérias Gram-negativas como Gram-positivas. A síntese do PG é um processo dinâmico e altamente complexo, consistente de muitos passos de síntese que são orquestrados por diferentes enzimas localizadas em diferentes espaços na célula. As ligases Mur (MurC a MurF) são as proteínas responsáveis por catalisar a síntese dos precursores de PG no citoplasma juntamente com as proteínas MurG e MraY, as quais também estão relacionadas com a síntese dos precursores do PG na membrana, lipídeo I e lipídeo II, respectivamente. Esse grupo de proteínas são essenciais para a sobrevivência da bactéria e são encontradas somente em células de organismos procariota, deste modo, tornando-se alvos potenciais para o desenvolvimento de novos antibióticos. No presente trabalho foi realizada a expressão e purificação de MraY de *Streptococcus pneumoniae*, proteína integral de membrana, e foi analisada a sua possível interação com a enzima MurF. Existem muitas evidências sobre a formação de complexos entre essas proteínas, no entanto este trabalho descreve de forma inédita a interação direta entre as ligases Mur de *Streptococcus pneumoniae*, as quais formam um mega-complexo em solução. Também observamos que a interação entre essas proteínas está fortemente relacionada com a presença dos seus estados oligoméricos. Outro achado inédito é a habilidade de MurG de se auto associar em diferentes espécies, dependendo da concentração de detergente em solução, representando um processo dinâmico, importante para a montagem do mega-complexo entre as ligases Mur, uma vez que a interação entre essas proteínas também foi observada neste estudo. Assim, a formação do mega-complexo pode ser explorada como um mecanismo regulatório espacial e temporal da síntese do peptidoglicano.

**Palavras-chave:** Interações, Peptidoglicano, Enzimas Mur, Oligômeros, *Streptococcus pneumoniae*, Complexo de proteínas.

## ABSTRACT

Protein interactions play important biological roles for cells, as in the case of the biosynthesis of peptidoglycan (PG), the major component of the bacterial cell wall. The PG is involved in the determination of cell morphology and protection against osmotic stress, both in Gram-negative and Gram-positive bacteria. The synthesis of PG is a dynamic and highly complex process, which requires many steps mediated by different enzymes located in different compartments of the cell. The Mur (MurC to MurF) ligases are responsible for the catalysis of the synthesis of PG precursors in the cytoplasm, together with the MurG and MraY proteins, which are related to the synthesis of lipid I and lipid II respectively. These proteins are essential for bacterial survival and are found only in prokaryotic organisms, and are thus potential targets for the development of new antibiotics. Here we present the expression and purification of MraY from *Streptococcus pneumoniae*, an integral membrane protein, as well as its analysis of the interaction with MurF. There is vast evidence regarding the formation of complexes between these proteins; however, this work describes, for the first time, the direct interaction between the Mur ligases of *Streptococcus pneumoniae*, which form a mega-complex in solution. We also observed that the interaction between these proteins is strongly related to the presence of their oligomeric forms. Interestingly, we have found that *S. pneumoniae* MurG is able to self-associate and form different oligomeric species in solution. This fact represents a dynamic process, important for the assembly of a mega-complex within the cytoplasm, and could be representative of a spatial and temporal PG-regulatory mechanism.

**Keywords:** Interactions, Peptidoglycan, Mur enzymes, *Streptococcus pneumoniae*, Mur complex, protein complex.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D: Tridimensional (*three-dimensional*)

A2pm: ácido meso-diaminopimélico (*meso-diaminopimelic acid*)

AMPPNP: Adenilil- imidodifosfato (*Adenylyl-imidodiphosphate*)

A.U.: Unidade de absorbância (*Absorbance Units*)

BSA: Albumina de soro bovino (*Bovine serum albumin*)

CMC: Concentração crítica micelar (*Critical micelle concentration*)

C-ter: C-terminal ou carboxi-terminal

DDM: n-Dodecil-  $\beta$ -D-Maltopiranosídeo (*n-Dodecyl  $\beta$ -D-Maltopyranoside*)

DTT: Ditioneitol (*Dithiothreitol*)

DSS: suberato de disuccimidilo (*disuccinimidyl suberate*)

EMBL: European Molecular Biology Laboratory

*E. coli*: *Escherichia coli*

ESI: Ionização por eletro-spray (*ElectroSpray Ionisation*)

ESRF: European Synchrotron Radiation Facility

GlcNAc: N-acetilglucosamina (*N -acetylglucosamine*)

*H. influenzae*: *Haemophilus influenza*

HEPES: 4- (2-hidroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

IBS: Institut de Biologie Structurale

IPTG: Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosida (*Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside*)

LB: Lysogeny broth

LPS: Lipopolissacarídeo (*Lipopolysaccharide*)

*L. monocytogenes*: *Listeria monocytogenes*

LNBio: Laboratório Nacional de Biociências

LNLS: Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

LCP: Fase cúbica lipídica (*Lipid Cubic Phase*)

MALDI: Desorção a laser por matrix assistida (*Matrix-Assisted Laser Desorption*)

MS: Mass Spectrometry

*M. tuberculosis*: *Mycobacterium tuberculosis*

MBP: Proteína que se liga à Maltose (*Maltose Binding-Protein*)

N-ter: N-terminal ou amino-terminal

NADPH: Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

NEB: New England Bio labs

NHS: N-hidroxissuccinimida (*N-Hydroxysuccinimide*)

D.O.: Densidade óptica

PBP: Proteínas que se ligam à penicilina (*Penicillin Binding Protein*)

PCR: Reação de Polimerase em Cadeia (*Polymerase Chain Reaction*)

PDB: Protein Data Bank (Banco de dados de proteína)

PG: Peptideoglicano

pI: ponto isoelétrico (*Isoelectric Point*)

*P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*

rpm: Rotações por minuto (*Revolutions per minute*)

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

SDS-PAGE: Eletroforese de dodecil-sulfato de sódio (SDS) de poliacrilamida (PAGE)  
(*Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*)

SEC: Cromatografia de exclusão molecular (*Size Exclusion Chromatography*)

SOC: Meio líquido com repressão de catabólitos (*Super Optimal broth medium with Catabolite repression*)

*S. pneumoniae: Streptococcus pneumoniae*

*S. flexneri: Shigella flexneri*

*T. maritima: Thermotoga marítima*

TBS-T: Tampão Tris - salina acrescido de Tween 20 (*Tris-buffered saline – Tween 20*)

UDP: Difosfato de uridina (*Uridine diphosphate*)

UDPGlcNAc: UDP-*N*-acetetilglucosamina (*UDP-N -acetylglucosamine*)

UDPMurNAc: ácido UDP- *N*-acetilmurâmico (*UDP-N -acetylmuramic acid*)

UMA: UDP-*N*- acetilmuramoil-*l*-alanina (*UDP-N -acetylmuramoyl-l-alanine*)

WB: Western Blot

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>5</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>9</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1 A parede celular bacteriana .....	17
1.2 O peptidoglicano.....	18
1.2.1 Estrutura química do peptidoglicano .....	19
1.2.2 Estrutura tridimensional do peptidoglicano .....	20
1.3 Síntese do peptidoglicano .....	21
1.3.1 Síntese de precursores do peptidoglicano no citoplasma pelas enzimas Mur .....	23
1.3.1.1 Estrutura cristalográfica das enzimas Mur .....	25
1.3.1.2 Domínio N-terminal (Domínio 1) .....	29
1.3.1.3 Domínio Central (Domínio 2) .....	30
1.3.1.4 Domínio C-terminal (Domínio 3).....	33
1.3.1.5 Mecanismo catalítico das enzimas Mur.....	34
1.3.1.6 Mudanças conformacionais das enzimas Mur.....	35
1.3.1.7 Desenvolvimento de inibidores das enzimas Mur.....	36
1.4 Síntese de precursores do peptidoglicano na membrana citoplasmática por <i>MraY</i> .....	37
1.4.1 Estrutura e função de <i>MraY</i> .....	37
1.5 Síntese de precursores do peptidoglicano na membrana citoplasmática por <i>MurG</i> .....	44
1.6 Síntese do peptidoglicano no periplasma: incorporação e polimerização do PG .....	49
1.7 Interações proteína-proteína na biossíntese do peptidoglicano .....	49
<b>PROJETO 1 – <i>MraY</i>: Proteína integral de membrana</b> .....	<b>52</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>52</b>
2.1 Objetivos gerais .....	52
2.2 Objetivos específicos.....	52
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>53</b>
3.1 Amostras bacterianas e plasmídeos .....	53
3.2 Clonagem do gene <i>mraY</i> .....	53
3.3 Transformação bacteriana.....	54
3.4 Testes de expressão de <i>MraY</i> .....	54

3.5 Western blotting .....	54
3.6 Métodos para expressão de proteínas de membrana .....	55
3.6.1 Detergentes para solubilização, purificação e estabilização de proteínas de membrana .....	58
3.6.2 Métodos para a cristalização de proteínas de membrana .....	60
3.6.3 Extração das proteínas de membrana .....	62
3.7 Cromatografia de filtração em gel .....	63
3.8 Clonagem de <i>mraY-murF</i> e <i>mraY-murF-murG</i> .....	63
3.9 Testes de expressão de MurF-MraY de <i>T. maritima</i> .....	64
3.10 Purificação do segmento do operon <i>murF-mraY</i> de <i>T. maritima</i> .....	64
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
<b>PROJETO 2: Enzimas Mur de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....</b>	<b>78</b>
<b>5. OBJETIVOS .....</b>	<b>78</b>
5.1 Objetivos gerais .....	78
5.2 Objetivos específicos .....	78
<b>6. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>80</b>
6.1 Clonagem dos genes que codificam para as proteínas MurC, MurD, MurE e MurF de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	80
6.2 Expressão das enzimas MurC, MurD, MurE e MurF .....	81
6.3 Purificação das enzimas Mur .....	81
6.4 Testes de expressão de MurG .....	82
6.5 Purificação de MurG .....	83
6.6 SEC- RALS/LALS e SEC-MALS .....	84
6.7 Ultracentrifugação analítica - método de velocidade de sedimentação .....	86
6.8 Termoforese em microescala (MST) .....	88
6.8.1 Marcação das proteínas .....	89
6.8.2 Análises de MST .....	89
6.9 Cross-linking químico utilizando DSS .....	90
6.10 Espectrometria de massas .....	91
6.11 Ensaio de Cristalização de MurG .....	93
6.12 Cristalização dos complexos binários das enzimas Mur .....	93
<b>7. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>94</b>
7.1 Expressão e purificação das enzimas Mur de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	94
7.2 Estados oligoméricos das proteínas MurC, MurD, MurE, MurF e MurG de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	96

7.3 Caracterização de MurG de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	102
7.4 Cristalização de MurG.....	110
7.5 Interações proteína – proteína .....	112
7.6 Ultracentrifugação analítica – método de velocidade de sedimentação .....	113
7.7 Termoforese em Micro-escala (MST) .....	116
7.8 Cross-linking/ Espectrometria de Massas.....	122
7.9 Cristalização de complexos entre as enzimas Mur .....	128
7.9.1 Ensaio de cristalização dos complexos das enzimas Mur.....	129
<b>8. CONCLUSÃO.....</b>	<b>136</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>139</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>152</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Este projeto de doutorado foi desenvolvido no Grupo de Patogênese Bacteriana em duas localidades, Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) – Campinas, Brasil e Institut de Biologie Structurale (IBS) – Grenoble, França, sob supervisão da Dra. Andréa Dessen.

Diversas técnicas foram empregadas para o desenvolvimento dessa tese que englobam estudos desde a biologia molecular até a bioquímica, biofísica e biologia estrutural de proteínas de membrana e proteínas solúveis. Os ensaios de biologia molecular foram realizados com o auxílio do Dr. Daniel Maragno Trindade. As plataformas disponíveis em ambos os centros de pesquisa foram extensivamente utilizadas para a caracterização das proteínas desse estudo. Além disso, os experimentos de biologia estrutural foram realizados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) – Campinas, Brasil e o European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) – Grenoble, França sob supervisão do Dr. Carlos Contreras-Martel. As análises espectroscópicas foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria no LNBio e as análises de espectrometria de massas foram realizadas em colaboração com o grupo de Espectrometria de Massas do LNBio sob supervisão da Dra. Adriana Paes Lemes. As análises de SEC-MALS foram realizadas no laboratório de espectroscopia do EMBL de Grenoble com o auxílio da Dra. Caroline Mas. Os substratos das enzimas utilizadas nessa tese para a cristalografia foram gentilmente cedidos por nossa colaboradora Dra. Martina Hrast - University of Ljubljana.

Nesta tese primeiramente é descrito uma introdução geral sobre a parede celular bacteriana e o peptidoglicano, o qual é considerado o principal componente estrutural celular. Também é descrita a síntese do peptidoglicano detalhadamente em três estágios através das enzimas Mur no citoplasma e posteriormente pela formação do lipídeo I e Lipídeo II na membrana citoplasmática pelas enzimas MraY e MurG, respectivamente. Posteriormente, são descritos os trabalhos referentes a dois projetos diferentes que foram realizados durante este doutorado, mas que estão intimamente relacionados. O primeiro projeto está relacionado com a proteína integral de membrana MraY. A segunda parte desta tese está envolvida com a caracterização individual das enzimas Mur, assim como a rede de interações que são formadas entre elas.

Durante este doutorado também foi publicado um artigo de revisão na revista *Antibiotics* intitulado “Structural Insights into Protein-Protein Interactions Involved in Bacterial Cell Wall Biogenesis” e um segundo artigo intitulado “MurG is an oligomeric scaffold for the cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis in *Bordetella pertussis*” que está nas etapas finais para sua submissão, em ambos os artigos tenho a co-autoria. Também tenho a participação no artigo da Dra. Ioulia Nikolaidis intitulado “Lipid II transport and Mur ligase binding by RodA from *Streptococcus pneumoniae*” que está na fase final para ser submetido. Além disso, um quarto artigo de minha autoria está em fase de preparação para a publicação, o qual descreve parte dos resultados desta tese.

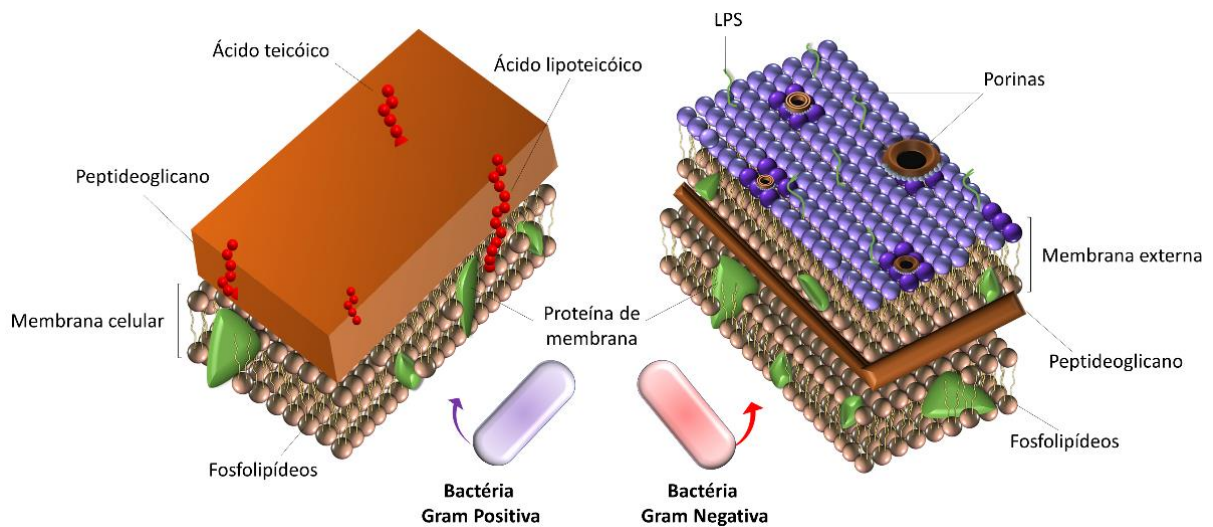


## 1.1 A parede celular bacteriana

As bactérias têm diferentes formatos celulares que podem variar desde esferas (cocos) e bastonetes (bacilo) até as formas mais variadas tais como, curvaturas e hélices. Também podem produzir uma variedade de apêndices, como pilus e flagelo. Além disso, muitas bactérias podem alterar sua morfologia no momento da colonização do hospedeiro e provavelmente existe uma pressão seletiva para os diferentes formatos celulares uma vez que isso pode ser considerado um mecanismo de virulência (Yang et al., 2016).

A parede celular bacteriana é uma estrutura elástica que define a morfologia da bactéria e a protege do estresse causado pela alta pressão osmótica intracelular impedindo sua lise. A síntese da parede celular é um processo complexo que é coordenado cuidadosamente através de enzimas que permitem sua remodelação para o crescimento e divisão celular. Além disso sua integridade é crítica para a viabilidade celular. Em ambos grupos de bactérias, Gram-negativas e Gram-positivas, o principal elemento que compõe a parede celular é o peptidoglicano (PG). Pelo fato deste elemento essencial ser uma estrutura comum à maioria das bactérias o PG torna-se um alvo atrativo para o desenvolvimento de agentes antimicrobianos de amplo espectro (Rogers et al., 1980; Park, 1996; Nanninga, 1998; Mengin-Lecreulx & Lemaitre, 2005; Scheffers e Pinho, 2005; Vollmer, et al., 2008; Bugg et al., 2011; Braun, 2015).

Em bactérias Gram-negativas, o PG se encontra no periplasma entre as membranas externa e interna. Muitas linhas de pesquisa sugerem que o PG em bactérias Gram-negativas é relativamente fino e provavelmente composto de uma única camada. Por este motivo, a membrana externa destas bactérias serve como mecanismo de proteção contra as enzimas líticas produzidas pelo hospedeiro ou por outros micro-organismos (Bos et al., 2007; Typas et al., 2011). Por outro lado, as bactérias Gram-positivas não apresentam a membrana externa e, talvez por esse motivo apresentem uma camada múltipla e espessa de PG que está exposta ao ambiente externo. Além disso, o PG destas bactérias atua como um sítio de ligação de componentes estruturais extras, tais como, ácidos teicóicos e ácidos micólicos (**Fig 1.1**).



**Figura 1.1.** Parede celular bacteriana. Composição estrutural da parede celular de bactérias Gram-positivas (esquerda) e Gram-negativas (direita). A parede celular de bactérias Gram-positivas é composta por um peptidoglicano espesso, o qual apresenta várias camadas e está exposto ao ambiente externo. Os ácidos teicóicos estão conectados e incorporados ao PG, enquanto que os ácidos lipoteicóicos se estendem para a membrana citoplasmática. As bactérias Gram-negativas possuem uma camada única e fina de peptidoglicano que está envolto pelas membranas internas e externas. A membrana externa possui porinas e lipopolissacarídeos. Adaptado de Hajipour et al., (2012) e McGraW-Hill Companies.

Geralmente as bactérias empregam uma variedade de estratégias para combater as defesas da célula hospedeira. Uma dessas estratégias está relacionada com a morfologia celular, na qual as bactérias têm a capacidade de aumentar ou diminuir consideravelmente o tamanho da célula com a finalidade de evitar a fagocitose pelos macrófagos e facilitar a ligação na célula eucariótica (Bos et al., 2007)

## 1.2 O peptidoglicano

A principal função do PG é preservar a integridade celular, pois desempenha um papel importante na manutenção da morfologia e na resposta ao estresse ambiental, devido a diferenças na pressão osmótica. Além disso, qualquer inibição de sua biossíntese ou uma específica degradação durante os processos de crescimento e divisão da célula resulta na lise celular.

O PG também participa do processo de alongação e divisão celular e atua como uma âncora para a montagem de outros componentes celulares, tais como proteínas envolvidas na adesão e processos infecciosos (Marraffini et al., 2006; Dramsi et al., 2008), e polissacarídeos (Neuhaus & Baddiley, 2003).

### 1.2.1 Estrutura química do peptidoglicano

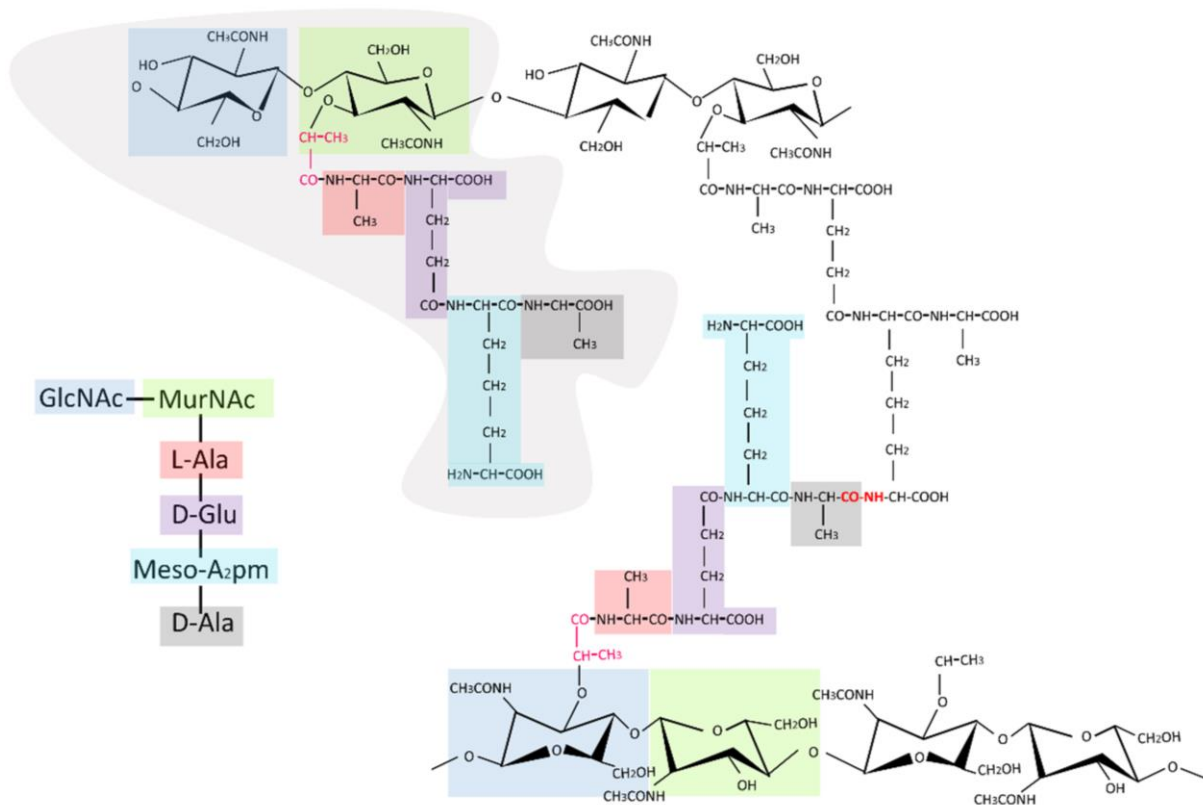
O PG é um heteropolímero organizado espacialmente por uma malha tridimensional, reticulada, constituída por subunidades alternadas e repetidas de N-acetilglucosamina (GlcNAc) e N-acetilmurâmico (MurNAc) que estão conectadas por ligações  $\beta$ 1-4. Este, por sua vez, faz ligações com cadeias curtas de cinco peptídeos compostos pelos aminoácidos L-alanina na posição 1, ácido D-glutâmico na posição 2, ácido meso-diaminopimélico ou L-lisina na posição 3 e D-alanina-D-alanina nas posições 4 e 5 (Rogers et al., 1980; Park, 1996; Scheffers et al., 2005; Solapure et al., 2005; Vollmer et al., 2008).

As ligações cruzadas nas cadeias de glicano geralmente ocorrem entre o grupo carboxila do aminoácido D-Ala na posição 4 e o grupo amina do ácido diaminopimélico na posição 3. Essas ligações podem ser diretas, ou conectadas por pontes de peptídeos (Vollmer et al., 2008).

A principal variação que ocorre no PG é a forma como as ligações cruzadas ocorrem na ponte formada pelos interpeptídeos. Existem dois principais grupos: o primeiro grupo tem ligações cruzadas entre os peptídeos 3 e 4 de cada cadeia, ou seja, a ligação cruzada estende-se do grupo amina da cadeia lateral do resíduo na posição 3 de uma unidade peptídica até o grupo carboxila do D-Ala na posição 4. Esse é o tipo mais comum de ligações cruzadas entre as cadeias de peptídeos. Além disso, essas conexões entre as cadeias podem ser diretas no caso da grande maioria de bactérias Gram-negativas (**Fig 1.2**) ou através de uma ponte interpeptídica no caso de bactérias Gram-positivas (Vollmer et al., 2008). O Segundo grupo é caracterizado pelas ligações 2-4 que são encontradas somente em corineobactérias, na qual a ponte interpeptídeos estende-se entre o grupo alfa carboxila do D-Glu na posição 2 de uma das unidades peptídicas até o grupo carboxila do D-Ala na posição 4 do outro peptídeo.

### 1.2.2 Estrutura tridimensional do peptideoglicano

O grupo D-lactil da unidade monomérica do MurNAc é substituído por um pentapeptídeo. O último resíduo de D-Alanina da cauda do pentapeptídeo é clivado durante as reações de cross-linking que ocorrem no periplasma e, portanto não está presente na conformação final do peptideoglicano (Braun and Wolff, 1970). A formação de pontes cruzadas ocorre na maioria dos casos entre o grupo carboxila do D-Ala na posição 4 e o grupo amina do di-aminoácido na posição 3 ou em alguns casos através de uma ponte peptídica curta (Vollmer, 2012).



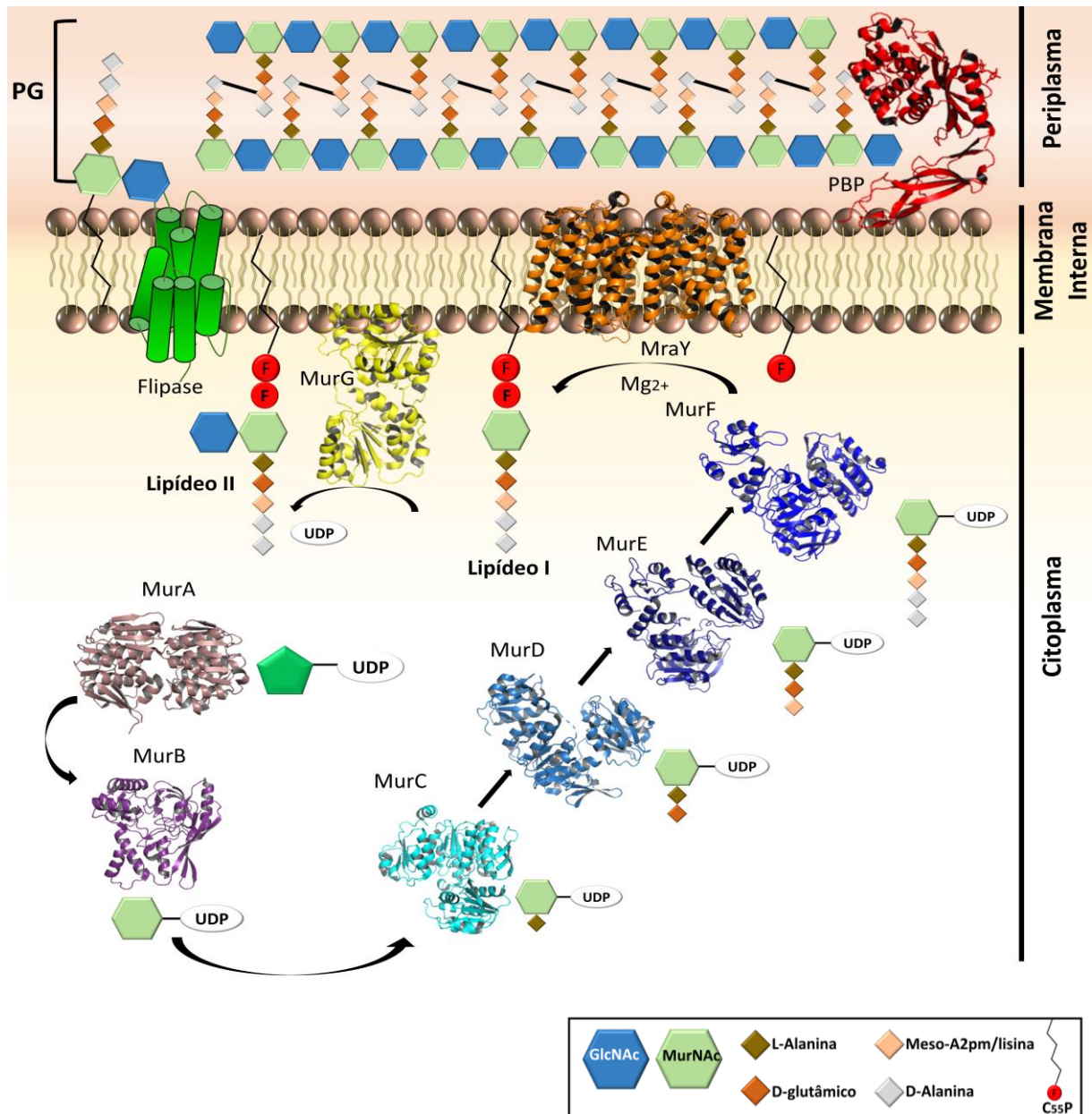
**Figura 1.2.** Estrutura do peptideoglicano de *Escherichia coli*. As cadeias de glicano consistem em resíduos alternados de GlcNAc e MurNAc conectados por uma ligação β- (1,4). A estrutura na porção hachurada representa a subunidade tetrapeptídica (monômero do PG), o qual está abreviado de forma convencional do lado esquerdo do painel. A parte do meio mostra os peptídeos que se conectam por ligações cruzadas com o grupo amina conectando a policauda de peptídeos (aminoácidos escritos em vermelho). Adaptado de Stenbak *et al.*, (2004) e Vollmer *et al.*, (2008).

Interessantemente a arquitetura do PG e a composição química do pentapeptídeo apresentam amplas variações entre as diferentes espécies de bactérias (Schleifer and Kandler, 1972, Vollmer et al., 2008). Essas variações também podem ser ditadas pelo crescimento bacteriano na presença de antibióticos (Vollmer et al., 2008).

Nas últimas décadas muitos esforços foram feitos para desvendar a arquitetura tridimensional do peptidoglicano através de técnicas de alta resolução. No entanto, as principais dificuldades encontrada para a determinação estrutural do PG incluem a íntinseca heterogeneidade estrutural, bem como sua flexibilidade e a dinâmica para a formação do maior componente da parede celular. Por outro lado, as cadeias de glicano e os peptídeos são pequenos demais para serem visualizados por microscopia eletrônica convencional. Mesmo com todas essas dificuldades muitas informações físicas já são conhecidas, como a quantidade aproximada e a largura do peptidoglicano. O peptidoglicano de bactérias Gram-positivas constitui aproximadamente 95% da parede celular, enquanto que em bactérias Gram-negativas, o PG ocupa somente 5 a 10% da parede celular (Egan e Vollmer, 2013). Essas informações são valiosas para a melhor compreensão do mecanismo de crescimento e divisão celular das bactérias.

### 1.3 Síntese do peptideoglicano

A síntese do PG requer três etapas principais para sua formação: citoplasmática, membranária e periplasmática (Matteï et al., 2010). Ainda no citoplasma, o precursor do PG, UDP-Nacetilmuramoil (MurNAc)-pentapeptídeo (ácido L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-diaminopimérico / L-Lys-D-Ala-D-Ala) é sintetizado através de reações em cascata desempenhadas pelas enzimas Mur (MurA a MurF) atuando como catalisadores para as seguintes reações de síntese (Barreateau et al., 2008). Em seguida, o pentapeptídeo formado pelas enzimas Mur é ligado à membrana através do carreador lipídico undecaprenil-fosfato (C<sub>55</sub>-P ou bactoprenol) para a formação do lipídio I através da proteína integral de membrana MraY (Chung et al., 2013) e, conseqüentemente levando a formação do lipídeo II pela glicosiltransferase MurG (van Heijenoort, 2001; Bouhss et al., 2004). Posteriormente, o lipídeo II é enviado para o periplasma, onde ocorrerá a polimerização entre as cadeias de glicano e os peptídeos através das “Penicilin-Binding Proteins” (PBPs) (**Fig 1.3**) (Vollmer et al., 2008; Macheboeuf et al., 2006; Matteï et al., 2010).



**Figura 1.3. Via de biossíntese do peptidoglicano.** A figura representa a síntese do peptidoglicano com ênfase nas diferentes enzimas envolvidas nesse processo biológico. O primeiro passo inicia-se no citoplasma através de uma molécula de uridina difosfato (UDP) ligada à molécula de N-acetilmurâmico. Nessa etapa as enzimas Mur são as responsáveis pela inserção de aminoácidos que formarão o pentapeptídeo. O segundo passo de biossíntese do peptidoglicano ocorre na membrana plasmática, e nessa fase a proteína MraY é a responsável pela formação do lipídeo I e posteriormente, MurG é responsável pela formação do lipídeo II. Finalmente, ocorre a síntese do peptidoglicano no periplasma pela ação das PBPs (Penicillin-Binding Proteins) através de reações de polimerização e transpeptidação (Adaptado de Laddomada et al., 2016).

O surgimento crescente de bactérias patogênicas multidroga resistentes, tais como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *S. aureus* resistente à vancomicina

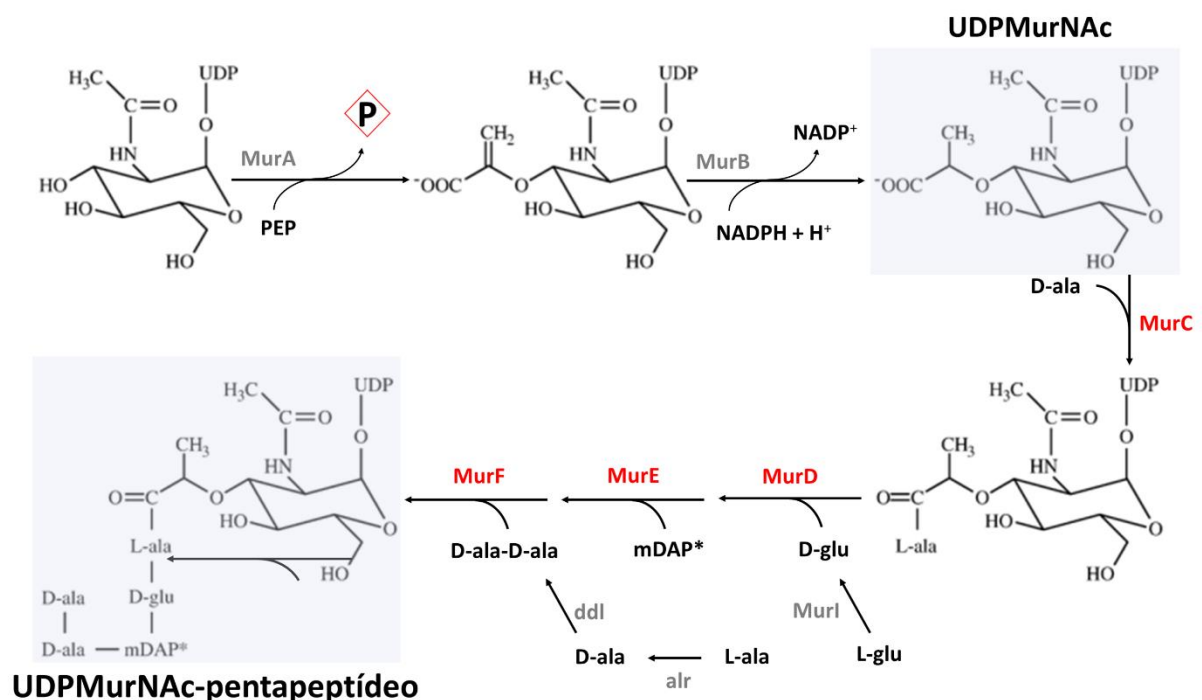
(VRSA) estabeleceu um grave problema de saúde pública e, conseqüentemente, exigiu o desenvolvimento de novos compostos terapêuticos e a identificação e exploração de novos alvos moleculares (Mravljak et al., 2011; Mayrink Assis et al., 2017). As enzimas que participam da via de síntese da parede celular e formação do peptidoglicano são essenciais para a viabilidade celular e são encontradas somente em eubactérias constituindo um conjunto de possíveis alvos potenciais para o desenvolvimento de novos antibióticos (Scheffers e Pinho, 2005; Bugg et al., 2011; Braun, 2015). Por estas razões, a identificação e caracterização macromolecular de outros alvos antimicrobianos é essencial para o desenvolvimento de inibidores da biossíntese do peptidoglicano.

### **1.3.1 Síntese de precursores do peptidoglicano no citoplasma pelas enzimas Mur**

A síntese dos precursores do peptidoglicano (PG) se inicia no citoplasma através de um conjunto de enzimas chamadas de ligases Mur. As enzimas Mur desempenham um papel fundamental na formação da parede celular, pois são essenciais para a síntese dos lipídeos I e II, unidades de formação do peptidoglicano. São responsáveis por catalisar a reação de adição de grupos de aminoácidos ou peptídeos na molécula de açúcar UDP-MurNAC através de uma reação catalítica que depende de ATP e de cátions divalentes de magnésio/mangânês produzindo simultaneamente ADP e fosfato inorgânico (Pi) a partir do ATP (El Zoeiby et al., 2003; Smith, 2006; Barreteau et al., 2008). As ligases Mur possuem seqüências altamente conservadas entre as espécies bacterianas e não há homólogos em células de eucariotos. Estas enzimas são essenciais para a manutenção da integridade celular e para a resistência contra a variação de pressão osmótica (Kouidmi et al., 2014). A deleção dos genes que codificam essas proteínas é letal para a sobrevivência de bactérias mostrando que são importantes alvos para o desenvolvimento de novas moléculas capazes de inibir a síntese do PG (Ruane et al., 2013). Além disso, as estruturas de todas as enzimas Mur são bem conhecidas, assim como o mecanismo de ação (Gordon et al., 2001; Mol et al., 2003; Šink et al., 2016).

Primeiramente, a molécula UDP-GluNAc é sintetizada através da via de biossíntese das hexosaminas a partir de glicose, glucosamina e uridina (Moraes et al., 2015) e uma série de reações ocorrem no citoplasma para a formação do UDPMurNAC-pentapeptídeo.

Posteriormente, a enzima MurA catalisa a reação que envolve a adição de fosfo-enolpiruvato (PEP) no carbono 3 do anel de glucosamina, produzindo o enolpiruvato-UDP-N-acetilglucosamina e a liberação de fosfato. Em seguida a enzima MurB catalisa uma reação de redução, na qual a porção piruvil é reduzida a um grupo lactil através de NADPH produzindo o ácido UDP-N-acetilmurâmico (UDPMurNAc). Uma cauda polipeptídica é formada pela adição de aminoácidos através das enzimas MurC (Ligase UDP-N-acetilmuramoil; L-alanina); MurD (Ligase UDP-N-acetilmuramoil-L-alanina; D-glutamase); MurE (Ligase UDP-N-acetilmuramoil-L-alanina; D-glutamase; meso-diaminopimélico/ L-lisina). Neste caso pode ocorrer a ligação de diferentes aminoácidos dependendo do grupo de bactérias; por exemplo, em bactérias Gram-negativas a enzima MurE irá adicionar à cadeia polipeptídica o ácido meso-diaminopimélico, porém no caso de bactérias Gram-positivas o aminoácido L-lisina é adicionado, embora existam espécies de bactérias que possam incorporar outros tipos de aminoácidos, tais como L-ornitina ou serina (McGroty et al., 2013). Enfim, a ligase MurF adiciona o grupo D-alanil-D-alanina (Fig. 1.4) (Neuhaus e Struve, 1965; Anderson et al., 1965, Mengin-Lecreulx e van Heijenoort, 1994, Mengin-Lecreulx et al., 1996, Halouska et al., 2014).



**Figura 1.4. Etapas de biossíntese do peptidoglicano no citoplasma.** A síntese do PG é iniciada por um grupo de enzimas localizadas no citoplasma bacteriano. Depois que a molécula UDP-MurNAc é formada pelas enzimas MurA e MurB, as enzimas MurC-MurF com o auxílio das enzimas Arl e Ddl adicionam aminoácidos gerando uma cauda polipeptídica conhecida como o precursor citoplasmático do PG (Smith, 2006 com modificações).

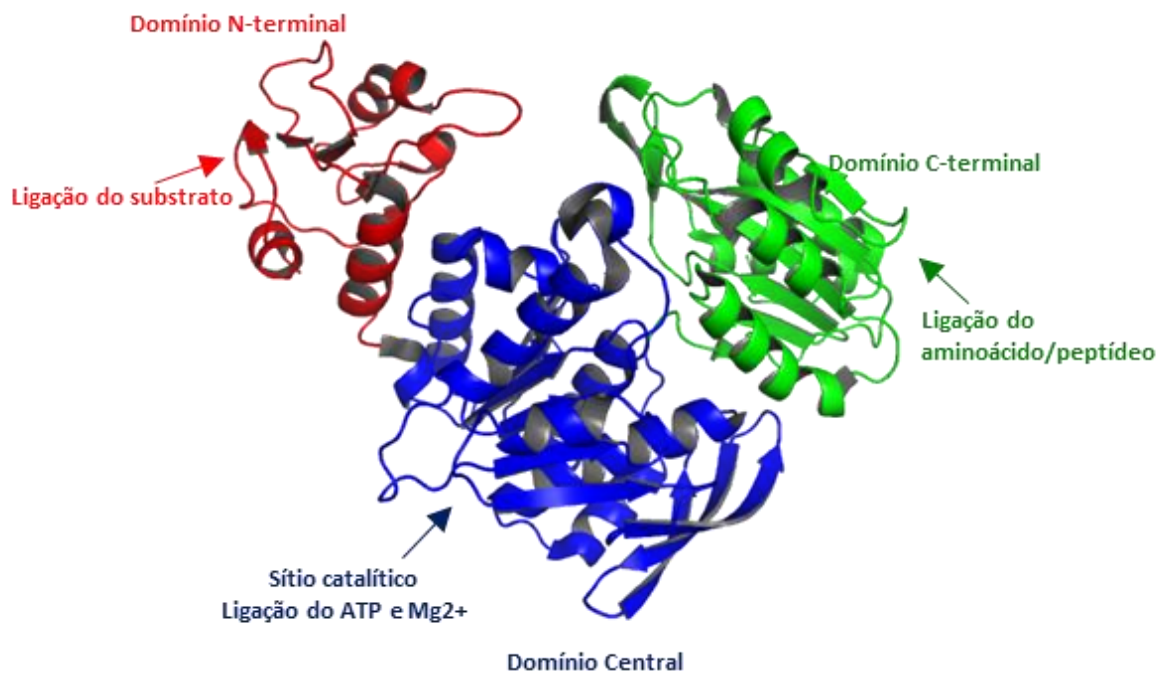


Para as reações de catalisação das enzimas Mur, o produto do passo anterior torna-se o substrato para a próxima enzima com exceção de MurC (**Fig. 1.4**). As enzimas apresentam diferentes modos de ligar o substrato, pois este está em constante mudança durante a síntese do PG. A cauda de polipeptídeo cresce a cada passo da adição de um aminoácido pelas enzimas Mur e para que a reação seja catalisada é necessário que o C-terminal da enzima esteja em contato com moléculas de ATP para que ocorra a sua ativação (Bouhss et al., 2002, Barreteau et al., 2008).

O pentapeptídeo produzido pelas enzimas Mur é utilizado no periplasma pelas Penicillin Binding-Proteins (PBP) que catalisam reações de glicosiltransferase e transpeptidação (Matteï et al., 2010), especificamente entre o grupo amina dos resíduos de mDAP/L-lisina adicionado pela enzima MurE no citoplasma. A inserção do terceiro aminoácido na cauda de polipeptídeo crescente na fase citoplasmática é um importante evento na via de biossíntese do PG. Além disso, foi demonstrado que a super-expressão do gene *murE* de *Staphylococcus aureus* (Gram Positiva) em *Escherichia coli* (Gram Negativa) é letal para a bactéria, pois o terceiro substrato adicionado na cadeia de polipeptídeo deve ser específico para os dois diferentes grupos de bactérias (Ruane et al., 2013).

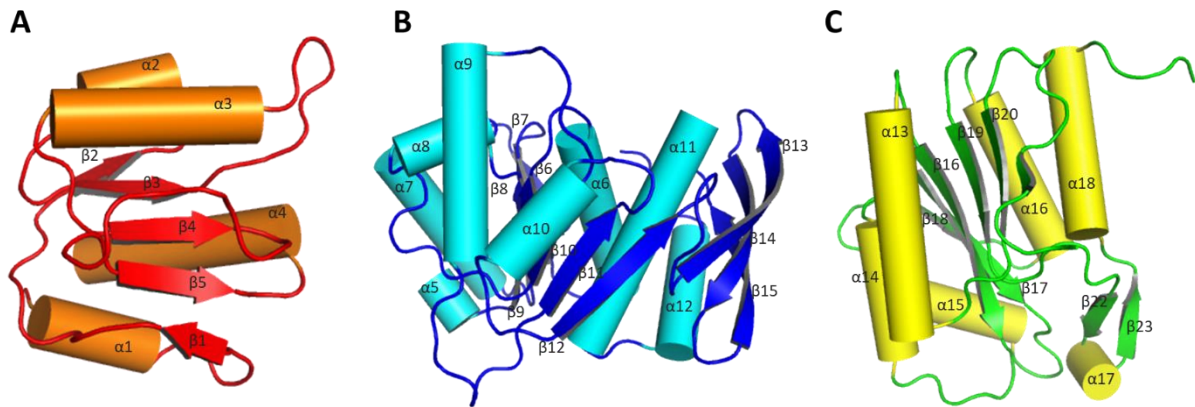
### 1.3.1.1 Estrutura cristalográfica das enzimas Mur

As enzimas Mur são compostas por três domínios estruturais. O domínio N-terminal é responsável por ligar o substrato UDPMurNAc, o domínio central é responsável pela ligação do ATP e o domínio C-terminal provavelmente está associado com a ligação do aminoácido que se ligará em sequência para formar o produto que será substrato para a próxima enzima (**Fig.1.5**) (Bugg e Walsh, 1992; Deva et al., 2006; Zidar et al., 2011).



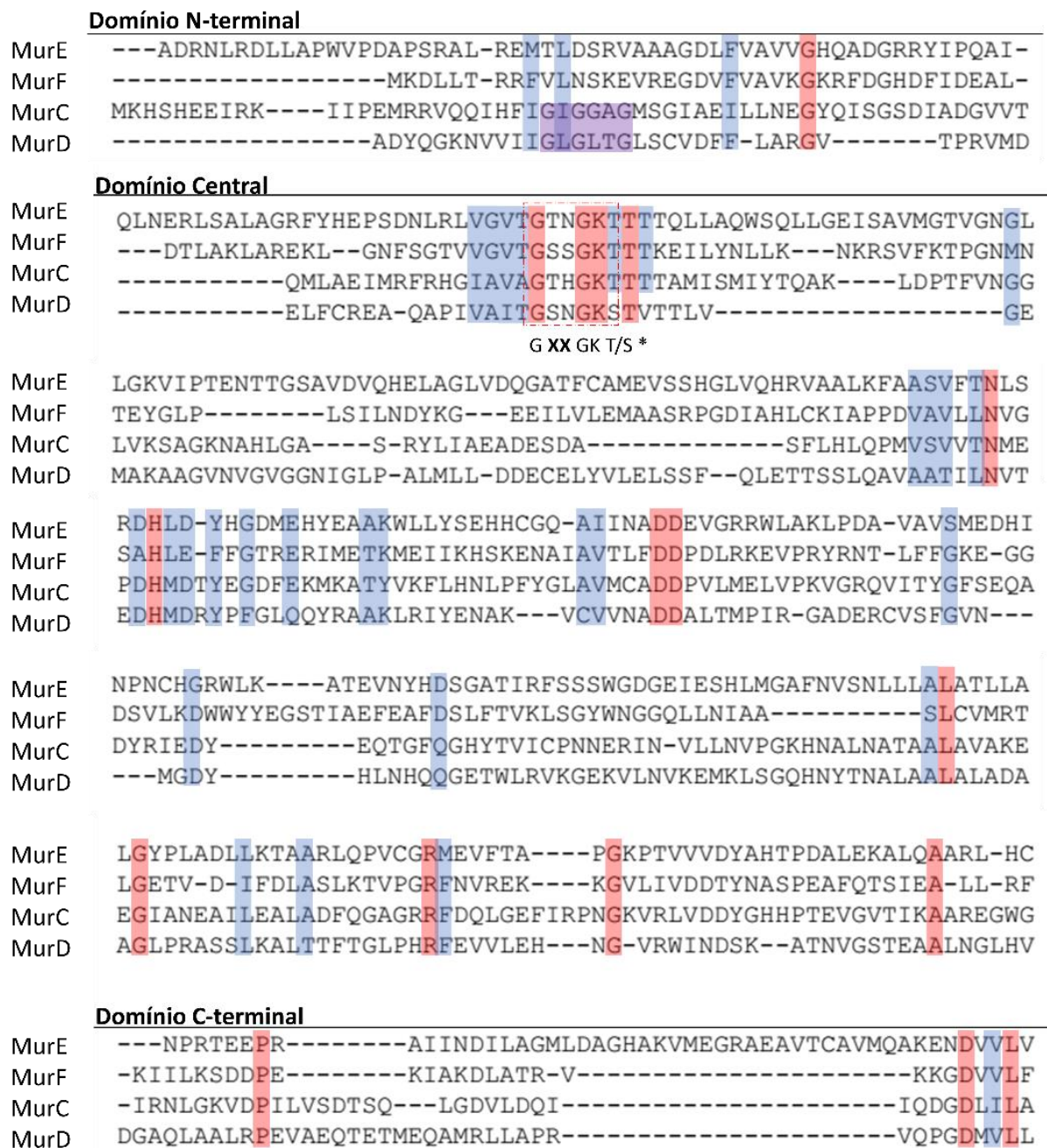
**Figura 1.5. Estrutura cristalográfica geral das enzimas Mur.** No geral as enzimas Mur apresentam três domínios. O N-terminal da proteína encontra-se no domínio 1 (vermelho). O sítio catalítico da enzima está no domínio 2 (azul), o qual é responsável pela ligação do ATP e moléculas de Mg<sup>2+</sup>, bem como a ligação do substrato. O C-terminal da enzima está no domínio 3. MurE *S. aureus* (código PDB: 4C12).

Todos os domínios das enzimas Mur são compostos por hélices  $\alpha$  e folhas  $\beta$  (**Fig 3**), no entanto, o número de componentes estruturais pode variar entre estas proteínas (Smith, 2006). Por exemplo, em MurE de *S. aureus* o domínio 1 é composto por quatro hélices  $\alpha$  flanqueadas por 1 folha  $\beta$  de cinco cadeias, assim como em MurC e MurD de *E. coli*, no entanto MurF de *E. coli* apresenta somente três hélices  $\alpha$ . O domínio 2 é o maior de todos, composto por oito hélices  $\alpha$  flanqueadas por duas folhas  $\beta$  paralelas em forma de barril aberto (Ruane et al., 2013), esse mesmo número de componentes é observado para MurF de *E. coli*, mas difere para MurE de *E. coli* que apresenta somente sete hélices  $\alpha$ . O domínio 3 apresenta uma folha  $\beta$  paralela flanqueada por quatro hélices  $\alpha$  seguida por folhas  $\beta$  antiparalelas circundadas por duas hélices  $\alpha$  (**Fig. 1.6**) (Bertrand et al., 1997; Kouidmi et al., 2014).



**Figura 1.6. Topologia dos domínios da enzima MurE de *S. aureus*.** As quatro enzimas Mur no sentido geral, apresentam três domínios estruturais composto por folhas  $\beta$  e hélices  $\alpha$  com algumas diferenças no número de componentes estruturais e formas de ligação do substrato. **(A)** Domínio N-terminal ou Domínio 1, responsável pela ligação do substrato. **(B)** Domínio Central ou Domínio 2, onde se encontra o sítio catalítico da enzima, sendo o domínio com a sequência aminoacídica mais conservada entre todas as enzimas Mur. **(C)** Domínio C-terminal ou Domínio 3, onde encontra-se o produto formado por cada enzima. Código PDB: 4c12.

O alinhamento estrutural das sequências de aminoácidos mostra que o domínio central é o mais conservado, enquanto que os domínios N- e C-terminal podem variar consideravelmente devido à constante mudança de conformação para permitir a ligação do produto e substrato (**Fig. 1.7**).

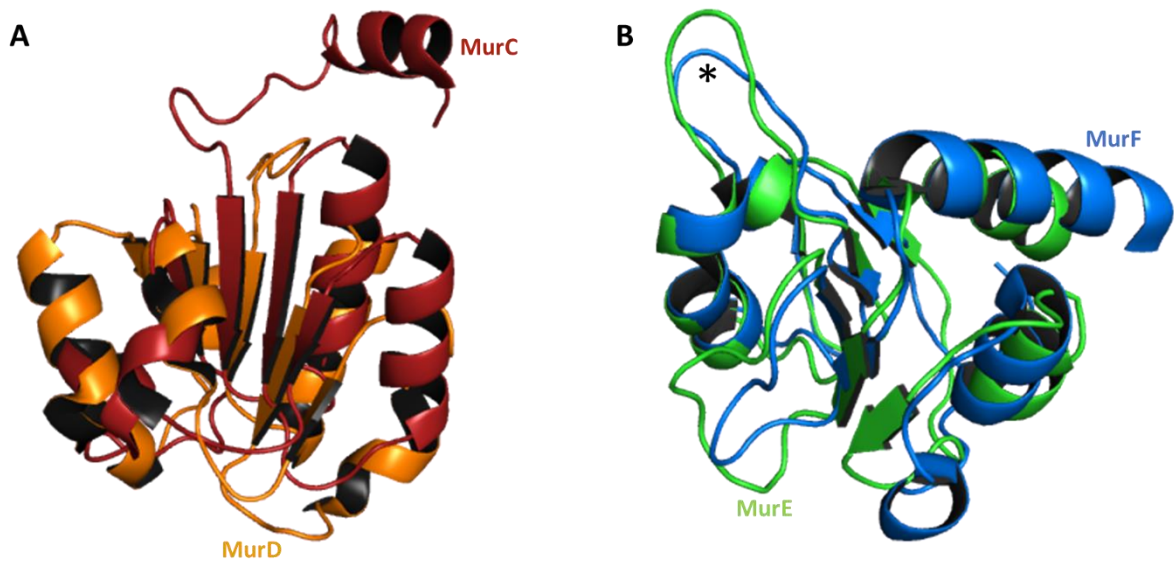


**Figura 1.7. Alinhamento estrutural das enzimas Mur de diferentes espécies bacterianas.** MurE de *E. coli* (1E8C), MurF de *T. maritima* (3ZL8), MurC de *H. influenzae* (1GQY), MurD de *E. coli* (5A5E). As caixas em vermelho representam os aminoácidos presentes em todas as enzimas Mur. As caixas em azul mostram aminoácidos idênticos em pelo menos três das quatro enzimas. O domínio N-terminal de MurC e MurD apresenta um loop rico em glicina responsável por reconhecer o precursor do substrato (caixa roxa). O domínio central é o maior dos três domínios e também o que apresenta maior homologia entre as enzimas. Este domínio é marcado pela presença do P-loop, responsável pela ligação do ATP e ativação da enzima (caixa pontilhada em vermelho) que tem uma sequência consenso conservada para todas as quatro enzimas, GXXGKT/S, no qual os XX são os aminoácidos que variam entre elas. Os aminoácidos conservados no domínio C-terminal também estão envolvidos na ligação do ATP bem como na formação do produto que será substrato para a próxima enzima.

### 1.3.1.2 Domínio N-terminal (Domínio 1)

Em todas as ligases Mur o domínio N-terminal tem o maior grau de diversidade estrutural e de sequência entre os três domínios. Esse domínio é responsável por ligar o precursor crescente do peptidoglicano (Smith, 2006; Mol et al., 2003).

O N-terminal de MurC de *H. influenzae* contém um dobramento comum do tipo Rossmann, essa topologia conservada também está presente em MurD (**Fig 1.8a**). Além disso, MurC e MurD compartilham uma estrutura idêntica no domínio 1 e ambas contêm uma porção invariante GxGxxG considerada a impressão digital de domínios que ligam dinucleotídeos (**Fig. 1.7**) (Bouhss et al., 1997). Embora MurE e MurF também tenham o dobramento  $\alpha/\beta$  (**Fig. 1.8b**) para o domínio N-terminal nenhum equivalente da porção rica em glicina é encontrado no N-terminal dessas proteínas.

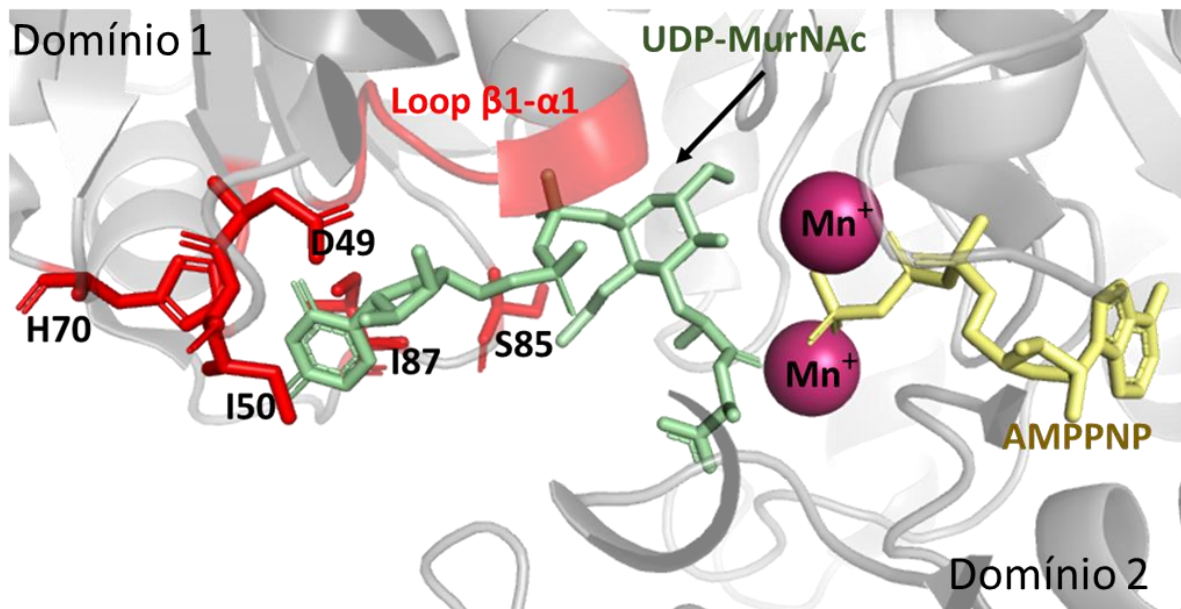


**Figura 1.8. Alinhamento estrutural do Domínio 1 das enzimas Mur de diferentes espécies.** (A) Superimposição do domínio 1 de MurC (vermelho) de *H. influenzae* e MurD (Laranja) de *E. coli*. (B) Superimposição do domínio 1 de MurE de *S. aureus* (verde) e MurF de *S. pneumoniae* (azul). \* Loop importante para a ligação do substrato. A ligase MurC diferente das outras enzimas Mur apresenta uma hélice extra no domínio N-terminal.

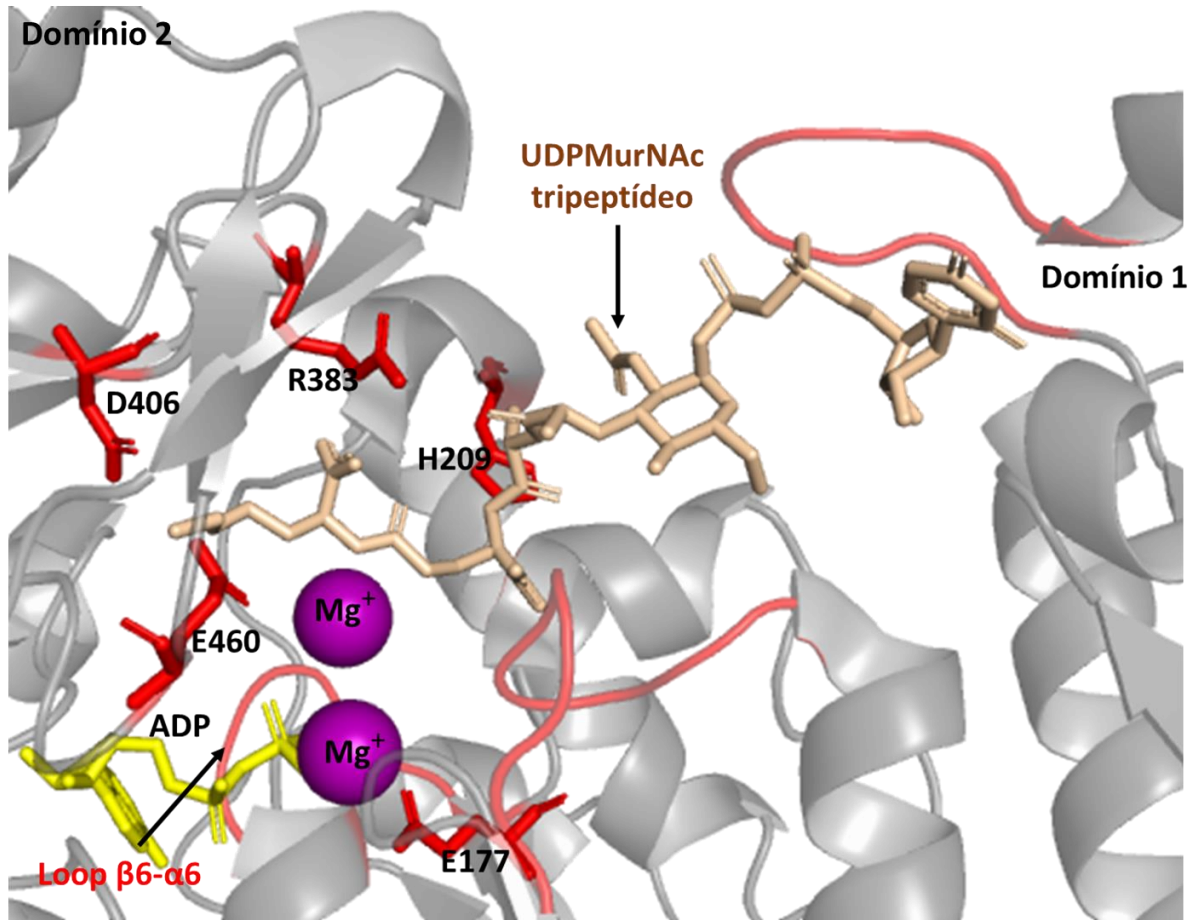
### 1.3.1.3 Domínio Central (Domínio 2)

O domínio central é o que tem níveis mais altos de homologia e semelhança estrutural, com identidades de sequência que variam de 22% a 26%, isto deve-se a que as quatro enzimas usam esse domínio para ligar o ATP que é o substrato comum às quatro ligases.

Em MurC e MurD o substrato não faz nenhuma interação com o domínio central (Fig.1.9) (Mol et al., 2003). Por outro lado, MurE e MurF ligam a porção que contém o UDP através de um loop entre a fita  $\beta 2$  e a hélice  $\alpha 2$  estendendo-se através do domínio C-terminal (Fig. 1.10) (Yan et al., 2000, Gordon, 2001, Smith, 2006; Basavannacharya et al., 2010; Ruane et al., 2013; Kouidmi et al., 2014).



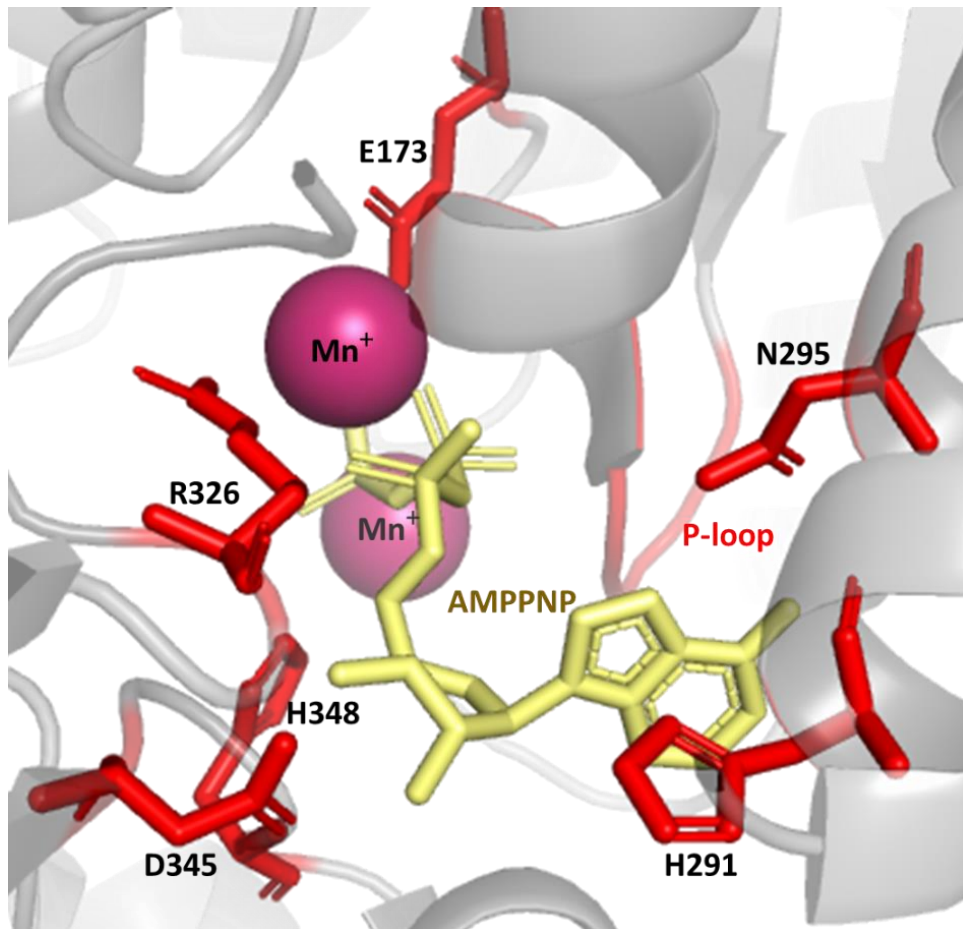
**Figura 1.9. Ligação do substrato por MurC e MurD.** O anel de uracila está entre dois loops hidrofóbicos, Loop  $\beta 2-\alpha 2$  que contém aminoácidos importantes para a ligação do substrato como o aspartato 49 (D49), Isoleucina 50 (I50) e Loop  $\beta 4-\alpha 4$  com os aminoácidos Isoleucina 87 (I87) e Serina 85 (S85). Os dois loops formam um bolso para a uridina. O resíduo Histidina 70 (H70) faz parte do loop responsável por ancorar o anel de uracila através de uma ponte de hidrogênio. O loop  $\beta 1-\alpha 1$  é rico em resíduos de glicina e faz o contato com o grupo fosfato do UDP. O Aspartato 49 (D49) forma pontes de hidrogênio com o grupo hidroxila da ribose. Uma porção do ácido murâmico não faz interações com a proteína, porém a cadeia lateral estende-se através do sítio catalítico e interage com o íon  $Mn^{2+}$ . Código PDB: 1p3d.



**Figura 1.10. Ligação do substrato por MurE e MurF.** Diferentemente de MurC e MurD no qual o substrato não faz contato com o domínio central, em MurE e MurF um loop no domínio 1 (vermelho) acomoda-se ao longo do grupo uridina e através de pontes de hidrogênio interage com a porção di-fosfato. Os resíduos de aminoácidos presentes no domínio central Aspartato 406 (D406), Arginina 383 (R383) e Glutamato 460 (E460) (nomenclatura para MurE de *S. aureus*; código PDB: 4c12) são os responsáveis pelo sítio de ligação do produto de MurE (UDP-MurNac-tripeptídeo). Os resíduos Histidina 209 (H209) e Glutamato 177 (E177) são conservados em todas as enzimas Mur, e são importantes para a ligação do produto e interação com o íon magnésio, respectivamente.

Em todas as quatro Mur a interação com ATP ocorre tanto no domínio central quando no domínio C-terminal. O ATP é ligado a um loop com uma sequência bem conservada rico em resíduos de glicina, chamado de P-loop que contém a sequência consenso GXXGKT/S. A estrutura 3D de MurC de *H. influenza* em complexo com AMP-PNP mostra que o anel de adenina do AMP-PNP se insere dentro de um bolso superficial entre o P-loop e um resíduo de histidina His 291 altamente conservado formando pontes de hidrogênio envolvendo também o resíduo conservado de Asn 295 (Mol et al., 2003; Ruane et al., 2013).

O domínio C-terminal fornece contatos adicionais para o AMP-PNP, os quais auxiliam na orientação e posição do aminoácido que será ligado na cadeia de polipeptídeo crescente (Mol et al., 2003; Smith, 2006) (**Fig. 1.11**). Os resíduos que promovem essas interações são bem conservados nas quatro enzimas Mur (Smith, 2006).

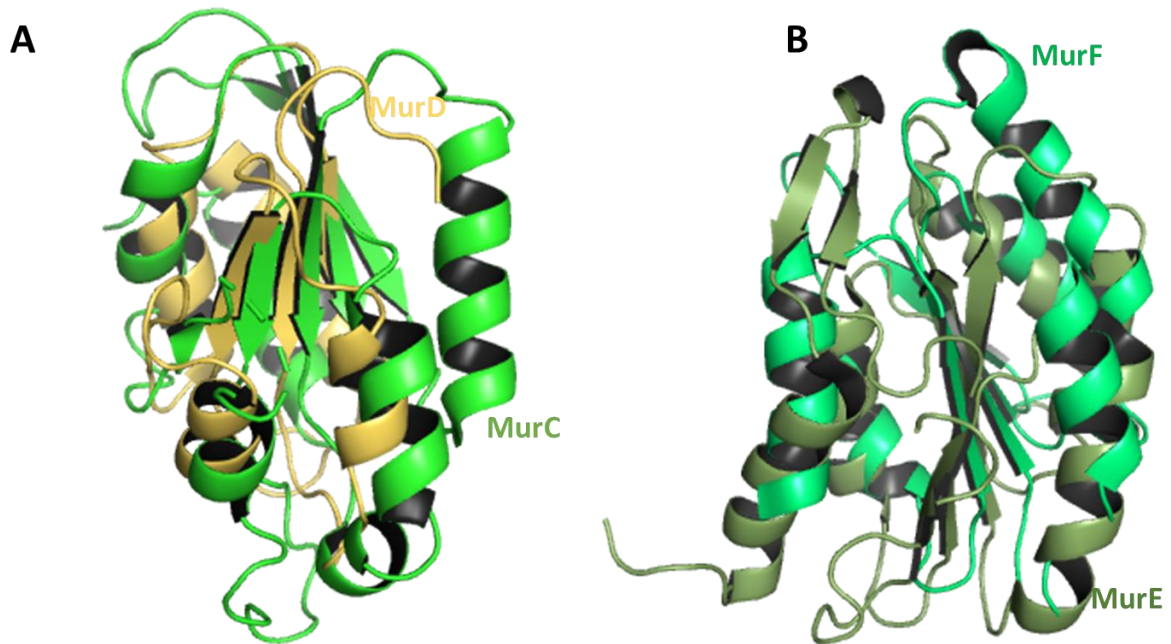


**Figura 1.11. Sítio de ligação do ATP.** Para as quatro enzimas Mur o sítio de ligação do ATP está entre o domínio 2 e domínio 3. No entanto, no domínio 2 é onde ocorre as reações mais importantes para a ativação da enzima. Primeiramente a porção trifosfato é estabilizada com o P-loop através de pontes de hidrogênio. Em seguida, o anel do AMP-PNP se insere em um bolso superficial entre o P-loop e o resíduo Histidina 291 (H291) e assim forma-se pontes de hidrogênio que interagem estritamente com o resíduo de Asparagina 295 (N295). Para a ligação do ATP e ativação da enzima é requerida a direta interação de íons  $Mg^{2+}/Mn^{2+}$  no domínio 2. Todas as enzimas apresentam um resíduo conservado de Glutamato (E173) que está adjacente ao P-loop e juntos formam a base de ligação dos íons  $Mg^{2+}/Mn^{2+}$ , estabilizando a interação do nucleotídeo.



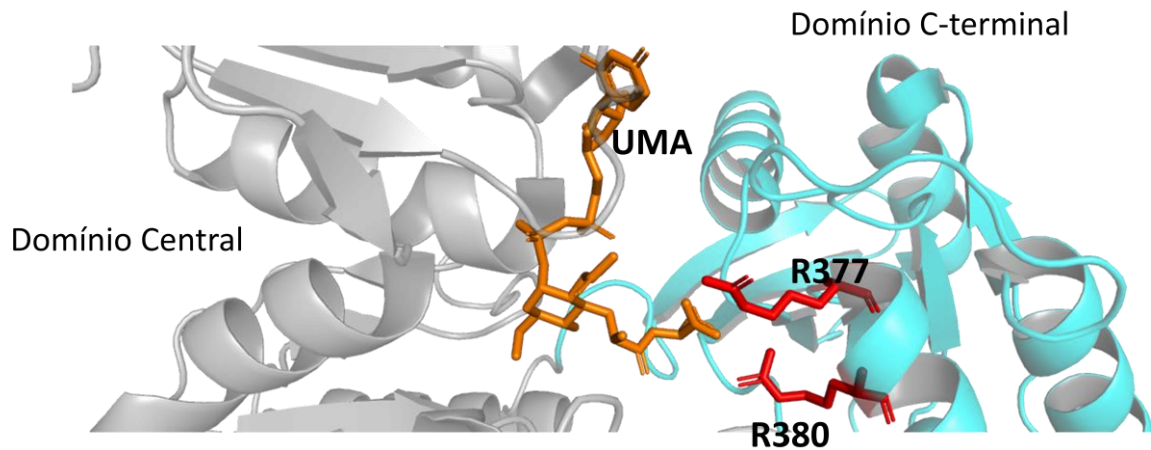
### 1.3.1.4 Domínio C-terminal (Domínio 3)

O domínio C-terminal também possui um dobramento de tipo Rossmann embora não tenha a impressão digital GxGXXG (**Fig. 1.12**) (Bertrand et al., 1997; Kouidmi et al., 2014). Os domínios periféricos têm sequências que variam mais entre as espécies, pois estão em constante mudanças na orientação para a ligação dos outros substratos.



**Figura 1.12. Alinhamento estrutural do Domínio 3 das enzimas Mur de diferentes espécies. (A)** Superimposição do domínio 3 de MurC (verde) e MurD (amarelo) de *E. coli*. **(B)** Superimposição do domínio 3 de MurE de *S. aureus* (verde escuro) e MurF de *S. pneumoniae* (verde claro).

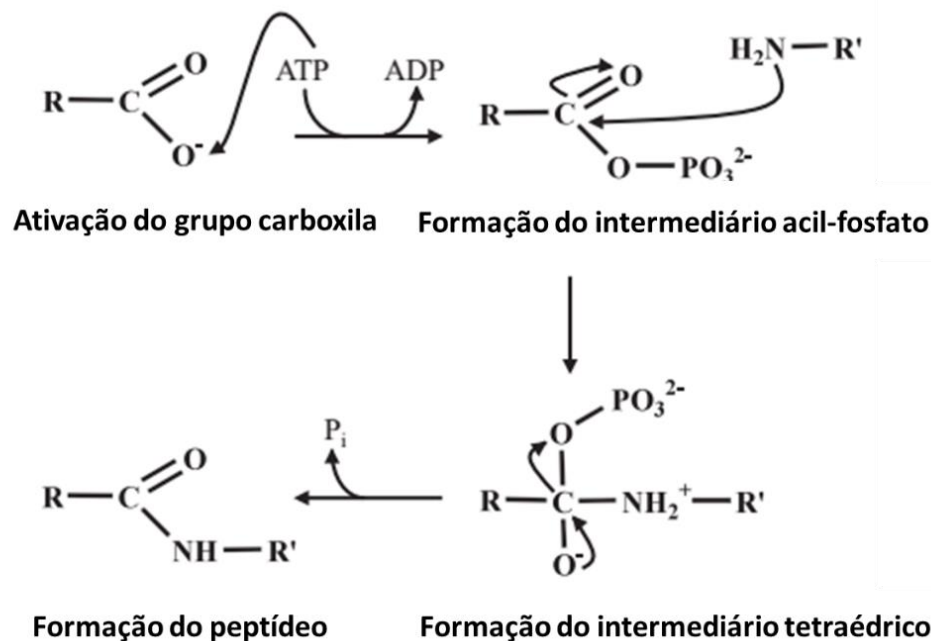
Está bem estabelecido que o produto de cada enzima se liga no domínio C-terminal, embora a exata posição do sítio de ligação não esteja ainda definida nas estruturas cristalográficas de nenhuma das ligases. Apesar disso, a estrutura de MurC em complexo com o produto (UDP-MurNAc-L-Alanina) mostra o resíduo de alanina posicionado entre dois resíduos de arginina (Arg 377 e Arg 380) do domínio C-terminal formando pontes de hidrogênio com a alanina (**Fig. 1.13**) (Mol et al., 2003, Kurokawa et al., 2008).



**Figura 1.13. MurC em complexo com seu produto UDP-N-Acetylmuramoil-L-Alanina (UMA).** O produto de MurC encontra-se entre os resíduos de Arginina R380 e R377 que são altamente conservados em todas as enzimas Mur. Código PDB: 1p3d.

#### 1.3.1.5 Mecanismo catalítico das enzimas Mur

As enzimas Mur utilizam a energia da ligação do fosfato para catalisar a reação que liga os aminoácidos na cauda do polipeptídeo crescente. O mecanismo de ação consiste na ativação do grupo carboxila do substrato nucleotídico através de ATP e conseqüentemente há a formação do intermediário acil-fosfato e liberação de ADP. O grupo acil sofre um ataque nucleofílico no grupamento amina do peptídeo produzindo o intermediário tetraédrico, no qual é quebrado em amina e Pi. A reação necessita de dois cátions de  $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$  (Bouhss et al., 2002, Barreteau et al., 2008), um deles é alocado entre o ADP e o substrato nucleotídico enquanto o outro íon permanece no grupo fosfato do ATP, deste modo forma-se uma ponte negativamente carregada facilitando a ligação e fosforilação do substrato nucleotídico que se encontra no C-terminal da enzima (**Fig. 1.14**) (Kouidmi et al., 2014).



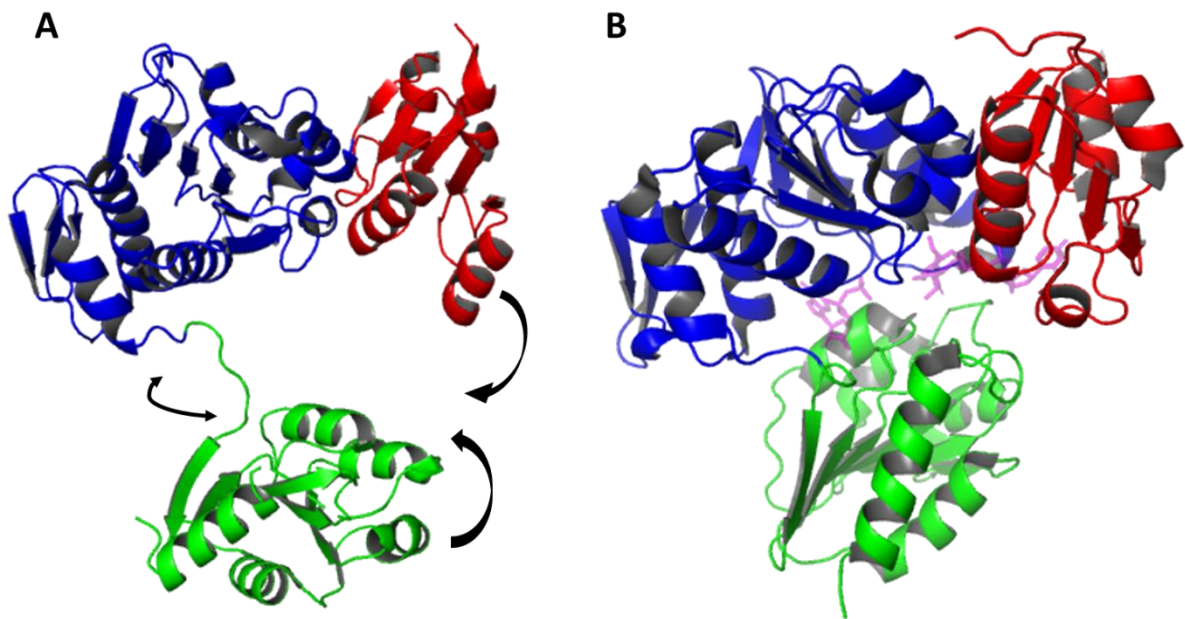
**Figura 1.14.** As enzimas Mur têm um mecanismo enzimático similar que envolve a ativação do carboxilato livre pela transferência do grupo fosforil do ATP formando um intermediário acil-fosfato seguido pela formação de uma nova ligação amina e a produção de um subsequente peptídeo (Adaptado de Kouidmi et al., 2014).

### 1.3.1.6 Mudanças conformacionais das enzimas Mur

As reações individuais são idênticas para as enzimas Mur, embora para cada uma delas uma nova ligação aminoacídica seja formada através da ativação de ATP para produzir a cauda polipeptídica ligada ao UDPMurNAc. O produto formado por uma enzima torna-se o substrato para a enzima seguinte. Deste modo, o substrato que está em constante crescimento impõe certas restrições no posicionamento dos diferentes domínios de cada enzima. No entanto, as enzimas MurC e MurD orientam diferentemente seus respectivos substratos para se ligarem nos domínios e em seguida, MurE e MurF alternam para um domínio de ligação com um substrato diferente. Estas adaptações permitem a essas enzimas permanecerem com um sítio ativo altamente similar entre elas (Bertrand et al., 2000; Yan et al., 2000; Gordon, 2001; Mol et al., 2003; Perdih et al., 2007).

A molécula de ATP provavelmente é a primeira a ser ligada na enzima e isto induz uma mudança na conformação estrutural, em que a enzima passa de um estado aberto para um

estado mais fechado e, deste modo ocorre a ativação da enzima (**Fig. 1.15**). Quando a molécula de ATP e o substrato estão corretamente posicionados ocorre uma rotação do domínio C-terminal e a molécula torna-se ativa e mais compacta (Perdih *et al.*, 2007). No caso de MurE e MurF a rotação do domínio C-terminal é mais pronunciada devido ao substrato ser mais alongado (Mol *et al.*, 2003; Longenecker *et al.*, 2005). Por outro lado, existem dados publicados da enzima MurD de *E. coli*, os quais mostram que a enzima pode se apresentar em conformações intermediárias do estado aberto e fechado mesmo na ausência do substrato (Šink *et al.*, 2016).



**Figura 1.15. Mudanças de conformação das enzimas Mur.** (A) MurD “apo” na conformação aberta (Código PDB: 4buc). (B) MurD com seu substrato na conformação fechada (Código PDB: 2jfg). Os domínios N- e C-terminal se aproximam para que ocorra a ativação da enzima.

### 1.3.1.7 Desenvolvimento de inibidores das enzimas Mur

O fato de que as enzimas Mur possuem sequências de aminoácidos conservadas no sítio ativo para a ligação do substrato e compartilham o mesmo mecanismo de ação as tornam importantes alvos para o desenvolvimento de novas moléculas que sejam capazes de atingir eficientemente diferentes Mur ao mesmo tempo. Para isto, muitas estratégias podem ser adotadas, como por exemplo, utilizar uma região bem conservada entre as enzimas como o P-

loop que é o responsável pela ligação do ATP e não tem nenhuma similaridade com o clássico loop de ligação de ATP em humanos; assim como utilizar algum composto que mantenha a enzima na conformação inativa (aberta) incapacitando deste modo a proteína de capturar o substrato, evitando a formação da policauda de peptídeos (El Zoeiby et al., 2003; Hameed et al., 2014; Kouidmi et al., 2014).

No entanto, é necessário produzir moléculas que sejam capazes de ultrapassar a membrana plasmática, para conseguir interromper a atividade dessas enzimas. Por outro lado, diversos dados na literatura relatam as interações das enzimas Mur com outras proteínas no citoplasma da célula (White et al., 2010; Gaballah et al., 2011; Favini et al., 2013; Munshi et al., 2013) e, portanto, uma melhor compreensão do mecanismo de ação das enzimas Mur *in vivo* e a interação proteína-proteína na biossíntese da parede celular é de grande importância para o desenvolvimento de novos inibidores dessas enzimas (Kouidmi et al., 2014).

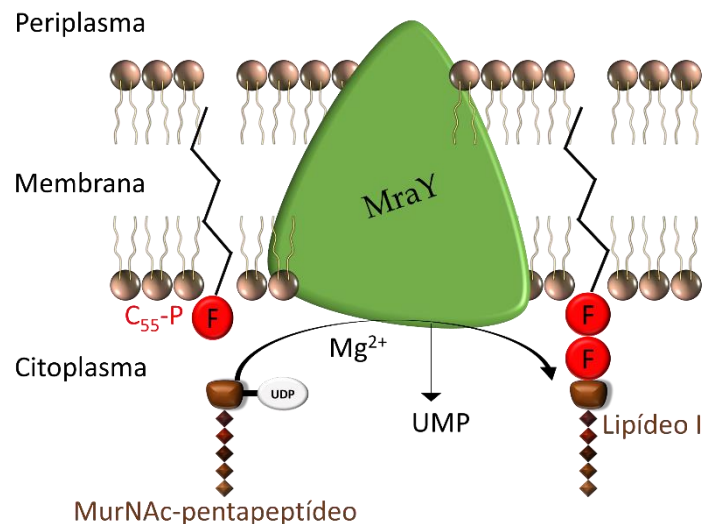
## 1.4 Síntese de precursores do peptidoglicano na membrana citoplasmática por *MraY*

### 1.4.1 Estrutura e função de *MraY*

O primeiro passo na síntese de peptidoglicano associado à membrana é a transferência da porção fosfoMurNac-pentapeptídeo para o C<sub>55</sub>-P, produzindo C<sub>55</sub>-PPMurNac pentapeptídeo (lipídeo I), em uma reação reversível e dependente de Mg<sup>+</sup> catalisada pela enzima *MraY* (**Fig. 1.16**) (Struve e Neuhaus 1965; Bouhss et al., 2004). Uma vez que esta reação consiste na translocação de uma fração precursora do peptidoglicano do citoplasma para a membrana, a enzima recebeu o nome de *MraY* "translocase" (Heydanek et al., 1970, Bouhss et al., 2004, Chung et al., 2013). Embora a reação catalisada por *MraY* seja reversível, na bactéria esta reação ocorre em cascata acoplada à glicosiltransferase MurG, gerando o lipídeo II.

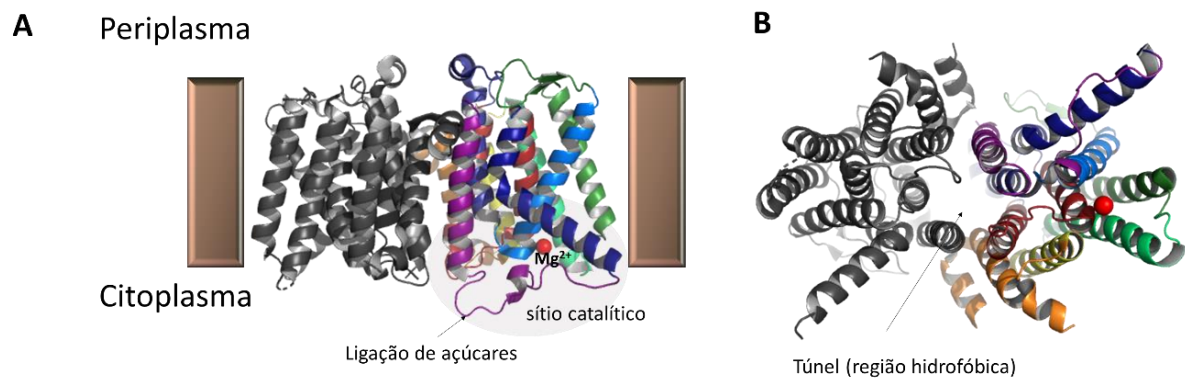
*MraY* é uma proteína integral de membrana essencial para o crescimento bacteriano. Mutações de inativação de *mraY* em *Escherichia coli* e *Streptococcus pneumoniae* resultaram em um fenótipo letal para as bactérias, demonstrando assim a função essencial dessa enzima para a viabilidade celular (Boyle e Donachie, 1998). Consequentemente, *MraY* constitui um alvo interessante para o desenvolvimento de novos antibióticos. Esta enzima é um

membro da superfamília de transferases poliprenil-fosfato *N*-acetilhexosamina 1-fosfatase (PNPT) que sintetiza monossacarídeos ligados à poliprenil na parede celular de bactérias. *MraY* é a única proteína desta família que já foi purificada e cristalizada (Lovering et al., 2012; Chung et al., 2016). Além disto, é alvo de diferentes classes de inibidores naturais com atividade antibacteriana, tais como a capuramicina e a tunicamicina (Heydanek et al., 1970; Mravljak et al., 2011; Chung et al., 2013; Hakulinen et al., 2017) e é acessível a partir do espaço periplasmático. Todas estas características intrínsecas à *MraY* explicam o interesse por esse alvo através de recentes identificações de inibidores naturais para essa enzima (Bouhss et al., 2004), embora não seja alvo de nenhum antibiótico em uso clínico até o momento (Lecerclé et al., 2010).



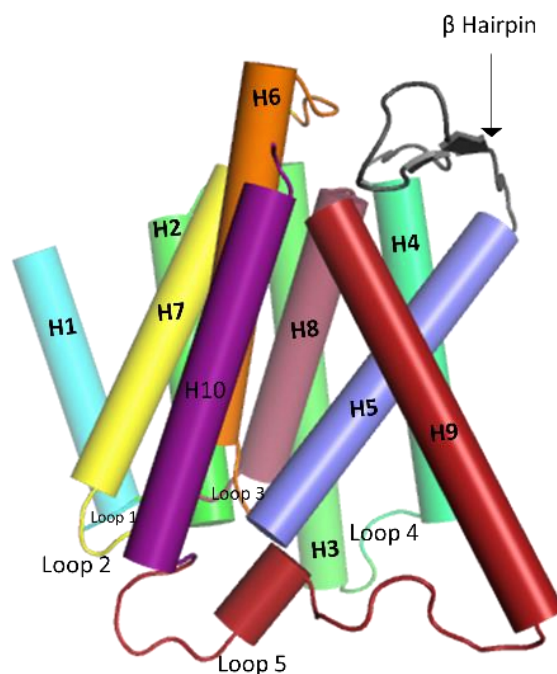
**Figura 1.16. Esquema da translocação do MurNAc-pentapeptídeo mediado por *MraY*.** A estrutura marrom representa MurNAc e os cinco losangos anexados representam o pentapeptídeo. *MraY* é mostrada em verde e os fosfatos são representados por círculos vermelhos (Chung et al., 2013 com modificações).

*MraY* de *A. aeolicus* foi cristalizada como um dímero na unidade assimétrica (**Fig. 1.17a**) (Chung et al., 2013). No centro do dímero é formado um túnel oval (**Fig. 1.17b**), circundado por aminoácidos hidrofóbicos, e suficientemente grande para acomodar lipídios.



**Figura 1.17. Estrutura cristalográfica da proteína MraY na membrana.** (A) Dímero de MraY na membrana citoplasmática. Tanto o N- quanto o C- terminal são acessíveis a partir do lado periplasmático. (B) Vista de cima que mostra o túnel hidrofóbico entre os monômeros de MraY que é suficientemente grande para acomodar lipídeos. Figura adaptada de Chung et al. (2013)

Cada monômero de MraY é composto por dez hélices transmembranárias, uma hélice interfacial, um  $\beta$  hairpin periplasmático, uma hélice periplasmática e cinco loops citoplasmáticos. Tanto o N- quanto o C- terminal da estrutura estão localizados no periplasma (**Fig. 1.18**) (Al-Dabbagh et al., 2008; Chung et al., 2013; Hakulinen et al., 2017).



**Figura 1.18. Esquema ilustrativo da estrutura cristalográfica de MraY (*Aquifex aeolicus*).** Na imagem é mostrado o monômero da proteína com as dez hélices transmembranárias, cinco loops citoplasmáticos e um  $\beta$  hairpin periplasmático. O loop 5 apresenta resíduos conservados responsáveis pelo reconhecimento de açúcares (Imagem inspirada por Chung et al., 2013).

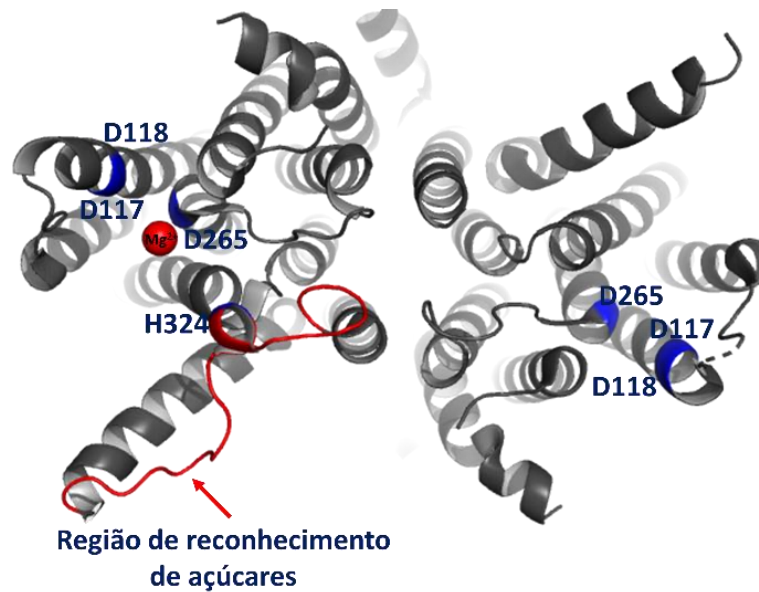
A região da estrutura que contém os resíduos mais conservados é uma fenda que está localizada no lado citoplasmático da membrana. Estudos mutacionais em *MraY* de *Bacillus subtilis* mostraram a existência de alguns aminoácidos polares que são essenciais para a atividade da enzima. Chung et al., (2013) e Hakulinen et al., (2017) observaram que a maioria destes resíduos está localizado na mesma fenda onde foram encontrados os aminoácidos conservados em *B. subtilis*, sugerindo que esta região serve como sítio ativo da enzima.

Através do mapeamento mutacional foram identificados vários aminoácidos importantes para a atividade catalítica da enzima: Asp117, Asp118 e Asp265, os quais são conservados entre a família PNPT (Lloyd et al., 2004; Chung et al., 2013; Hakulinen et al., 2017), e His324 e His325, que são invariáveis (**Fig. 1.19**).

A partir da mutação individual de todos os aminoácidos invariáveis foi observado através do ensaio de translocação do pentapeptídeo fosfo-MurNAc catalisado por *MraY* para formar o lipídeo I que a modificação dos ácidos aspárticos e do His324 ocasionaram a completa perda da atividade enzimática. A mutação pontual do His325 não ocasionou a perda de atividade de *MraY*. Deste modo, acredita-se que pelo menos estes quatro aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima sejam importantes para a reação de catalisação do lipídeo I (Chung et al., 2013; Chung et al., 2016).

Foi predito que *MraY* contém cinco loops citoplasmáticos conservados a partir de análises topológicas. A maioria dos loops estão localizados entre as hélices transmembranares. O loop mostrado na **Figura 1.19** está entre as hélices transmembranares H9 e H10 e através das análises de sequências conservadas foi possível observar que este loop apresenta resíduos de sequências conservadas entre a superfamília PNPT, os quais são responsáveis pelo reconhecimento de açúcares. Deste modo, este loop que está no possível sítio catalítico de *MraY* poderia ser o responsável pelo reconhecimento do pentapeptídeo fosfo-MurNAc.

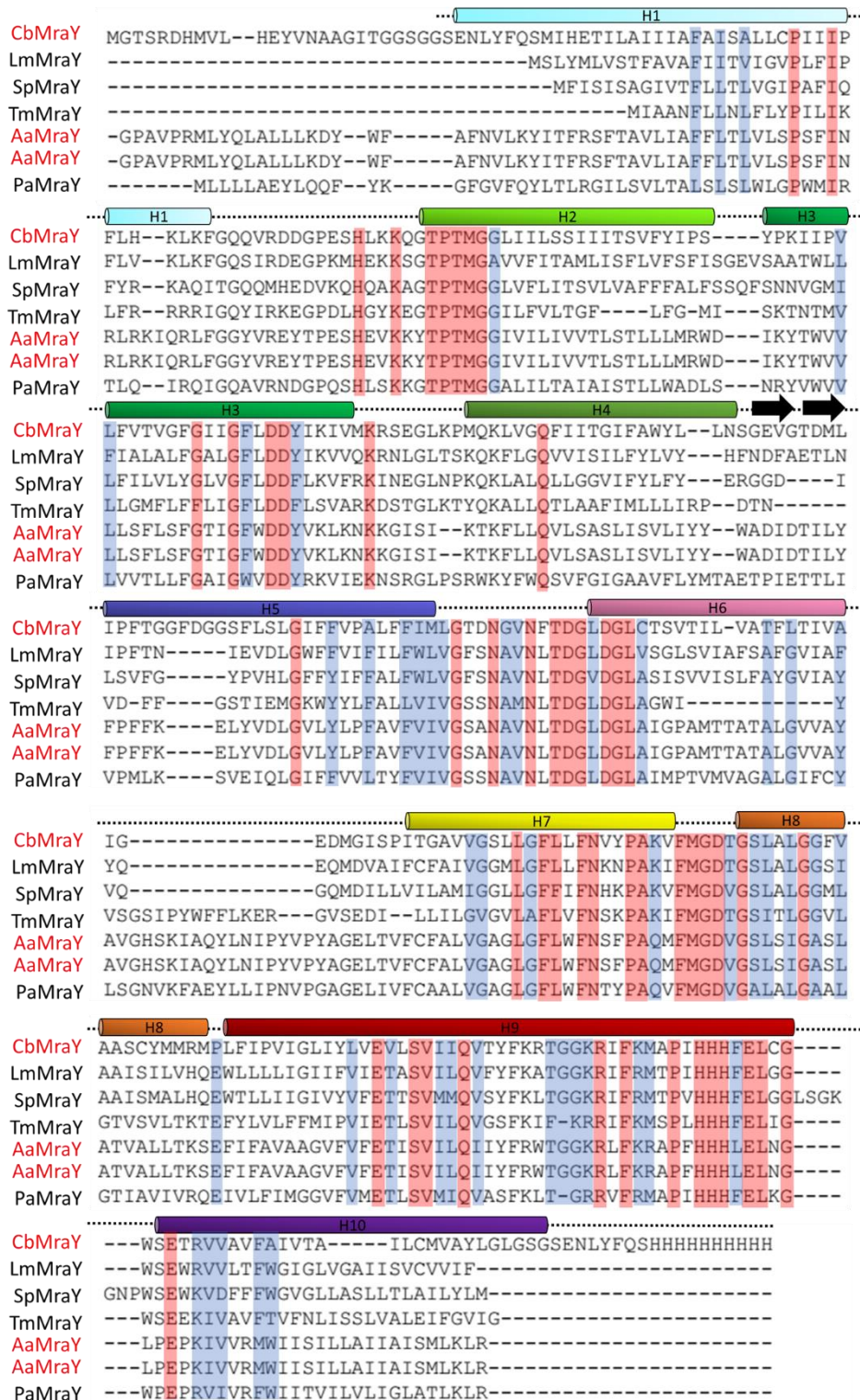




**Figura 1.19. Representação das hélices transmembranares de Mray.** Em azul são mostrados os resíduos conservados Asp117, Asp118, Asp265 e His324 fundamentais para a atividade catalítica da enzima. Em vermelho é mostrado o loop citoplasmático que apresenta uma sequência conservada na superfamília PNPT responsável pelo reconhecimento de açúcares.

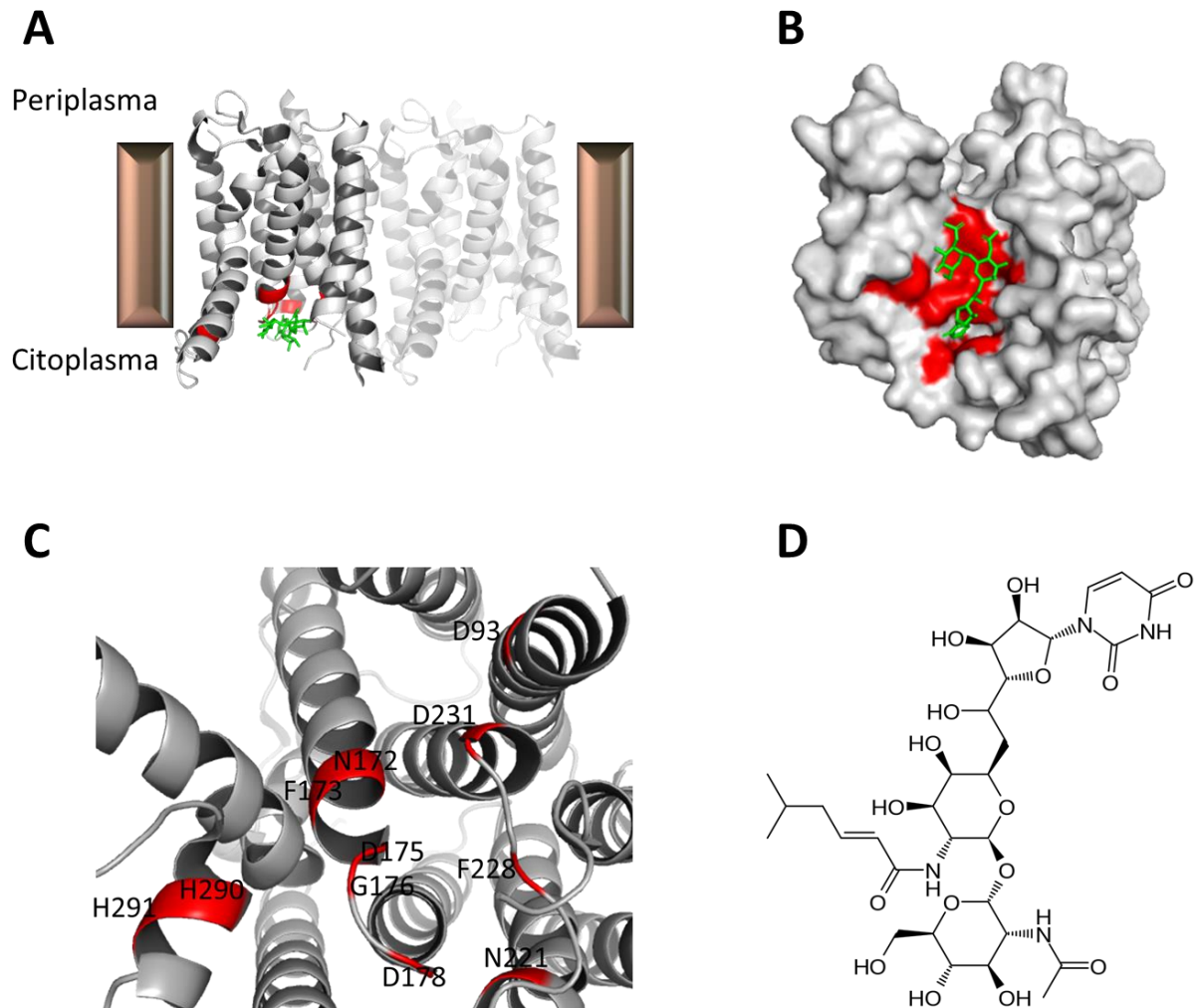
Posteriormente, Mray de *Clostridium bolteae* (cbMray), bactéria Gram-positiva, foi cristalizada com a molécula de tunicamicina, inibidor natural da proteína. cbMray apresenta 34% de identidade com Mray de *Aquifex aeolicus*. Também foi cristalizada como um dímero e apresenta as mesmas características estruturais tais como foram descritas por Chung et al., (2013).

Segundo os estudos realizados por Chung et al., (2013) e Hakulinen et al., (2017) existe uma forte conservação das sequências entre a família Mray, sugerindo que a geometria do sítio ativo seja similar entre as enzimas (**Fig. 1.20**).



**Figura 1.20. Alinhamento estrutural de Mray de diferentes espécies de bactérias.** Mray de *Clostridium boltae* (CbMraY; código PDB 5JNQ), Mray de *Aquifex aeolicus* (AaMraY; código PDB 5CKR e 4J72), Mray de *Listeria monocytogenes* J2818 (LmMraY), Mray de *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (PaMraY), Mray de *Streptococcus pneumoniae* R6 (SpMraY) e Mray de *Thermotoga maritima* (TmMraY). Para LmMraY, SpMraY, TmMraY e PaMraY foi realizado um alinhamento estrutural hipotético, pois não apresentam estrutura cristalográfica até o momento. As sequências em vermelho apresentam 100% de homologia entre as espécies bacterianas. As sequências em azul apresentam mais de 50% de homologia. H, hélice; setas,  $\beta$ Hairpin; pontilhados, loops.

A molécula de tunicamicina foi encontrada na ampla cavidade citoplasmática (**Fig. 1.21a**) interagindo com as cadeias laterais dos resíduos F173, G176, N221, F228, N172, D175, D178, D231, H290 e H291 (**Fig. 1.21b e 1.21c**). Através de estudos mutacionais, estes resíduos foram deletados levando à baixa atividade de *MraY*.



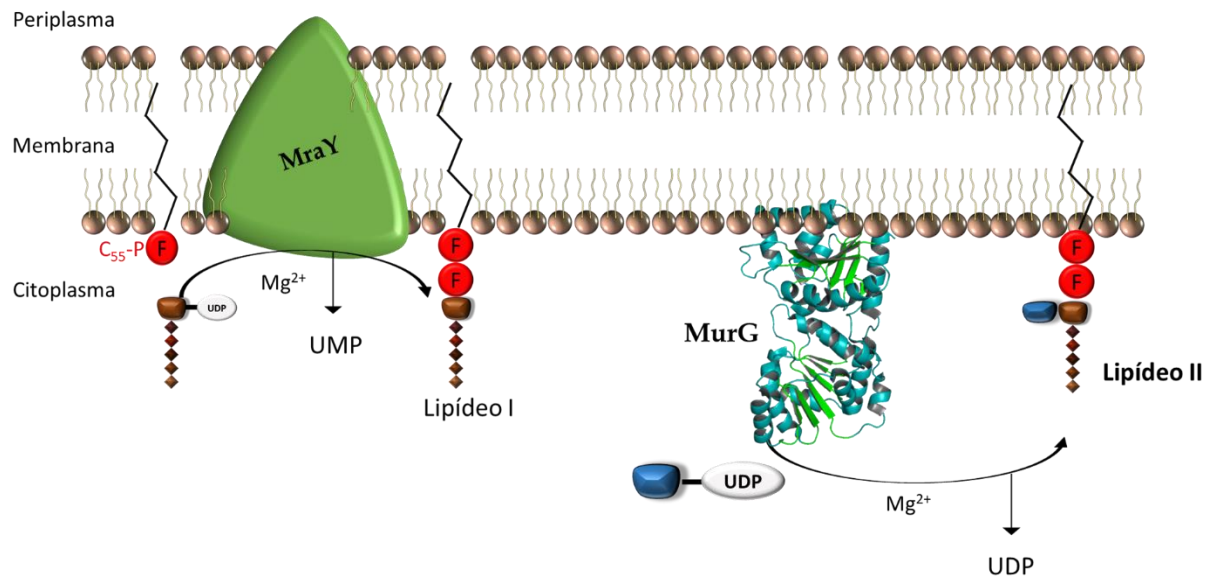
**Figura 1.21. Ilustração da estrutura cristalográfica de *MraY* de *Clostridium bolteae*.** (A) Visão geral do dímero de *cbMraY* na membrana celular. (B) Representação da superfície de *cbMraY* mostrando a molécula de tunicamicina (verde) dentro da cavidade citoplasmática em contato com os resíduos que fazem parte do sítio ativo da enzima (vermelho). (C) Imagem ampliada do sítio ativo mostrando todos os resíduos da cavidade citoplasmática importantes para a atividade catalítica de *cbMraY*. O resíduo de ácido aspártico (D93) pode ser o responsável pela desprotonação de um dos hidróxidos de C<sub>55</sub>-P para formar o lipídeo I. (D) Estrutura química da tunicamicina. (Figura Inspirada por Hakulinen et al., 2017).

Para a melhor compreensão de como ocorre a ligação do substrato por *MraY* foram realizados ensaios de modelagem computacional (docking). Os açúcares UDP-GlcNAc e UDP-MurNAc L-Ala foram introduzidos no sítio ativo de *CbMraY*, o qual apresenta resíduos altamente conservados no reconhecimento de açúcares. Foi observado que as porções de uracil e ribose do UDP-GlcNAc se ligaram de uma maneira similar à tunicamicina (antibiótico homólogo dos nucleosídeos) que também foi encontrada próximo ao sítio catalítico da enzima (Hakulinen et al., 2017).

Um dos objetivos principais desta tese, em seu início em 2013, era a cristalização e a resolução da estrutura de *MraY*. Porém, seis meses após seu início, foi publicada uma estrutura cristalográfica de *MraY* de uma bactéria Gram-negativa, *Aquifex aeolicus* (Chung et al., 2013). Em consequência, os objetivos originais da tese foram modificados, e as proteínas *Mur*, descritas nos próximos capítulos, foram incluídas nos estudos, já que são parceiras de *MraY*. Porém, os esforços visando a expressão e purificação de *MraY* foram continuados, já que tínhamos o objetivo de compreender a formação de complexos entre *MraY* e enzimas *Mur*.

## 1.5 Síntese de precursores do peptidoglicano na membrana citoplasmática por *MurG*

A proteína *MurG* pertence à superfamília das glicosiltransferases. Esta enzima é essencial para a sobrevivência das bactérias e está envolvida na última etapa da síntese do peptidoglicano no citoplasma e membrana da célula (Hu et al., 2003). Sua função é catalisar a transferência do UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) para o lipídeo I, produzindo o Lipídeo II (**Fig. 1.25**) (Men et al, 1998).

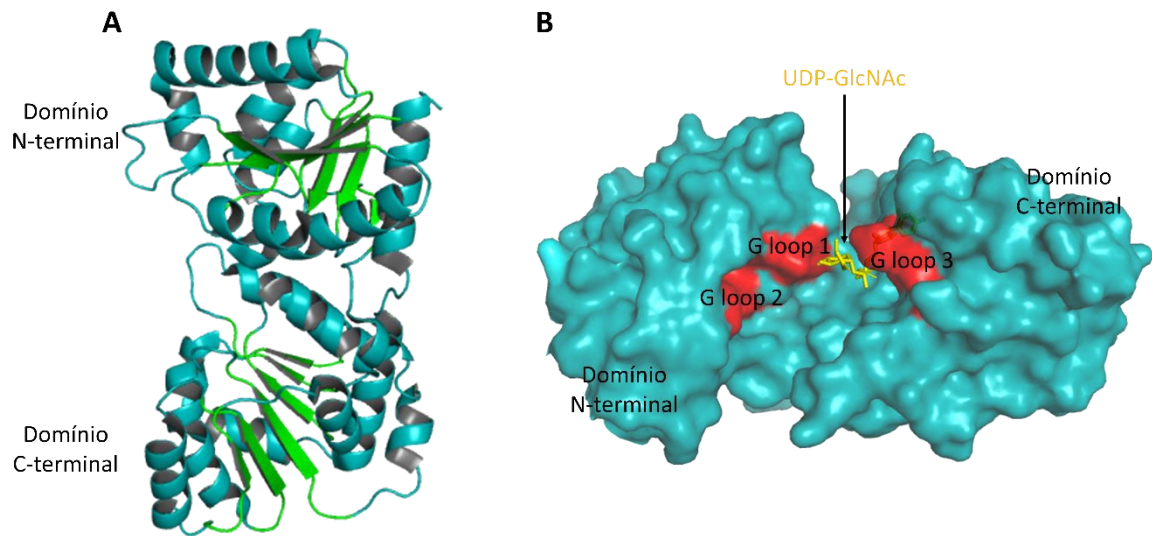


**Figura 1.25.** A proteína MurG está anexada a membrana plasmática e é responsável por catalisar a reação para a formação do lipídeo II. Depois que a enzima MraY catalisa a reação de formação do lipídeo I, MurG adiciona a molécula GLcNAc ao lipídeo I e, conseqüentemente, ocorre a liberação de UDP.

Diversas análises bioquímicas sugerem que o mecanismo de ação de MurG está relacionado com a desprotonação do grupo hidroxila do carbono 4 do MurNAc-pentapeptídeo (Lipídeo I) produzindo um oxiânion que ataca o carbono 1 do substrato GlcNAc para formar um estado transitório, posteriormente o UDP é liberado produzindo o Lipídeo II. Também se sugere que a porção UDP-GlcNAc é a primeira a se ligar em MurG e posteriormente o Lipídeo I (Kim et al., 1988, Takayama et al., 1999, Bouhss et al., 2008).

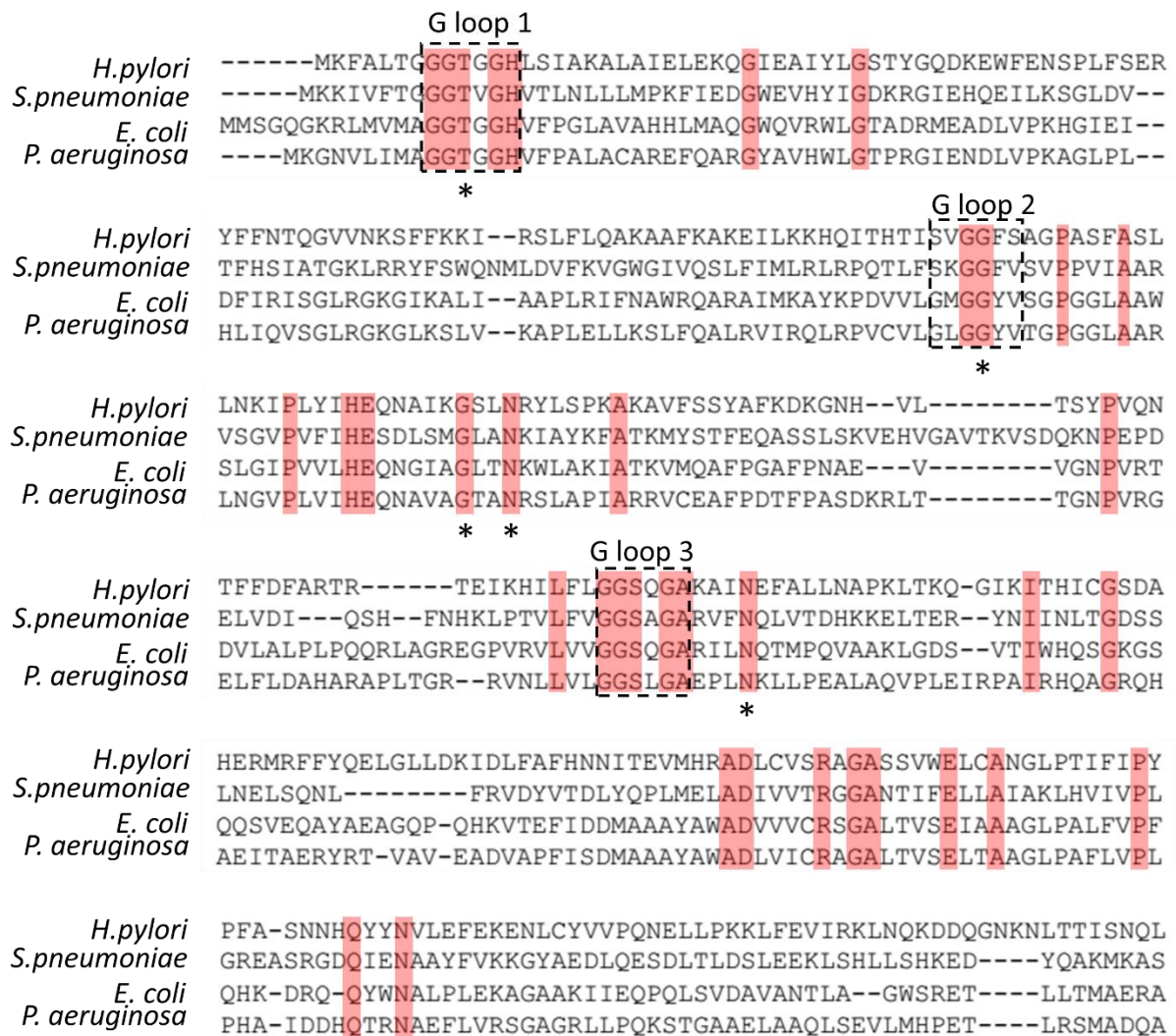
As proteínas MurG de *E. coli* e *P. aeruginosa* foram cristalizadas na conformação nativa “apo” e com o ligante UDP-GlcNAc. A enzima contém dois domínios principais, domínio N-terminal e domínio C-terminal, separados por uma fenda hidrofóbica (Hu et al., 2003, Brown et al., 2013).

A estrutura contém folhas  $\beta$  e hélices  $\alpha$  com um dobramento do tipo Rossmann, assim como o domínio N-terminal das enzimas MurC e MurD (Rosén et al., 2004). O domínio N-terminal é composto por sete fitas  $\beta$  paralelas e seis hélices  $\alpha$ . O domínio C-terminal possui seis fitas  $\beta$  paralelas e oito hélices  $\alpha$  incluindo uma hélice bipartida que conecta o domínio N-terminal à primeira fita  $\beta$  do domínio C-terminal (**Fig. 1.26**) (Hu et al., 2003).



**Figura 1.26. Estrutura cristalográfica de MurG de *E.coli*.** (A) MurG apresenta dois domínios (N- e C-terminal) do tipo  $\beta/\alpha$ . O C-terminal inclui uma hélice bipartida que conecta o domínio N-terminal à primeira fita  $\beta$  do C-terminal. (Código PDB:1f0k) (B) Superfície da proteína MurG mostrando a interação do UDP-GlcNAc com os G loops na fenda entre os dois domínios (Código PDB: 1nlm).

Através do alinhamento de sequências de MurG de diferentes espécies foi possível identificar a presença de regiões aminoacídicas altamente conservadas localizadas entre os dois domínios (Hu et al., 2003). Esses resíduos incluem três loops ricos em glicina, chamados de G loop 1, G loop 2 e G loop 3, além de outros aminoácidos que estão envolvidos na ligação do substrato e atividade catalítica (**Fig. 1.27**). Análises estruturais sugerem que o domínio N-terminal é o responsável por acomodar o lipídeo I, embora não exista nenhuma estrutura 3D de MurG em complexo com o substrato (Hu et al., 2003).

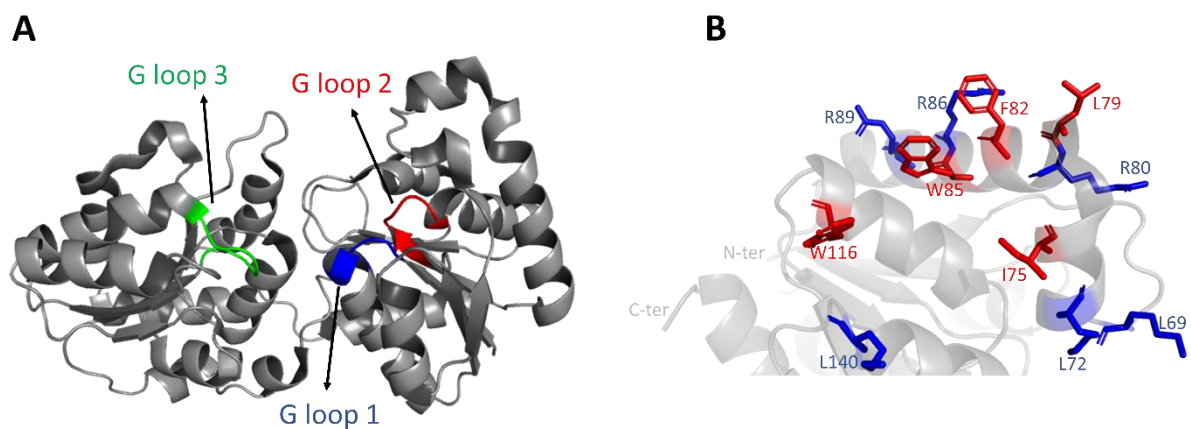


**Figura 1.27. Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína MurG de diferentes espécies de bactérias.** Os aminoácidos que apresentam identidade de 100% (seqüência consenso) nas diferentes bactérias estão marcados em vermelho. Os G loops, que se encontram próximos a fenda que se forma entre os domínios N- e C-terminal estão marcados com pontilhados pretos. É possível observar que o G loop 2 é que o apresenta a menor homologia entre as bactérias. Os aminoácidos envolvidos na ligação do UDP são identificados com (\*).

Como mostrado na estrutura de MurG, a molécula de UDP-GlcNAc interage com o domínio C-terminal através de uma região rica em resíduos de prolina e glicina localizada na fenda entre os dois domínios (Fig. 1.28). Os domínios N- e C-terminal são estruturalmente similares na presença ou ausência do substrato, embora após a ligação do UDP-MurNAc, MurG adota uma conformação mais fechada (Hu et al., 2003). Essa mudança na conformação pode ser importante para a ligação do lipídeo II. No entanto, não há evidências que mostrem isso,

mas o G loop 1 e G loop 2 parecem desempenhar um papel importante na ligação do segundo substrato.

A proteína MurG está localizada no citoplasma, no entanto análises estruturais mostram que esta enzima está associada à membrana interna (Mengin-Lecreulx et al., 1991, Crouvoisier et al., 1999). Além disso, outros estudos realizados com essa proteína mostraram a necessidade do uso de detergentes para a solubilização de MurG sugerindo sua alta hidrofobicidade (Bupp e van Heijenoort, 1993). Por outro lado, a estrutura de MurG revela a presença de uma porção hidrofóbica composta pelos resíduos I75, L79, F82, W85 e W116 no domínio N-terminal, flanqueado por resíduos de aminoácidos básicos K72, K140, K69, R80, R86 e R89 (Ha et al., 2000) sugerindo sua associação com a membrana devido à presença de interações hidrofóbicas e eletrostáticas com a membrana, a qual é negativamente carregada. Outra evidência da associação de MurG à membrana é mostrada através de estudos enzimáticos que provam que MurG de *E. coli* aumenta sua atividade na presença de vesículas de lipídeos (van den Brink-van der Laan et al., 2003).



**Figura 1.28. Estrutura 3D de MurG.** (A) O domínio N-terminal de MurG apresenta dois G loops e o domínio C-terminal apresenta o G loop 3. Esses loops são ricos em glicina e são responsáveis pela ligação do UDP-GlcNAc para que ocorra a ativação da enzima e consequentemente a formação do lipídeo II. (B) Vista ampliada do domínio N-terminal mostrando os resíduos que provavelmente fazem interação com a membrana plasmática. Os resíduos hidrofóbicos (vermelho) estão rodeados por resíduos básicos (azul).



## **1.6 Síntese do peptidoglicano no periplasma: incorporação e polimerização do PG**

O lipídeo II é translocado através da membrana citoplasmática através das proteínas integrais de membrana que pertencem à família SEDS (do inglês shape, elongation, division and sporulation), tais como RodA e FtsW (van Dam et al., 2007); posteriormente o peptidoglicano é incorporado dentro de uma camada crescente através da formação de pontes glicosídicas entre unidades de dissacarídeos e peptídeos de cadeias curtas, além disso ocorre a clivagem do lipídeo carreador pelas transpeptidases, endopeptidases e Penicillin-Binding Proteins (PBPs), sendo estas últimas os principais alvos de antibióticos de uso clínico (Sauvage et al., 2008). Cada bactéria apresenta diversas PBPs, as quais podem ser classificadas em dois grupos principais: Classe A que inclui enzimas com função de transpeptidases e transglicosilases e Classe B que são monofuncionais apresentando somente a função de transpeptidases.

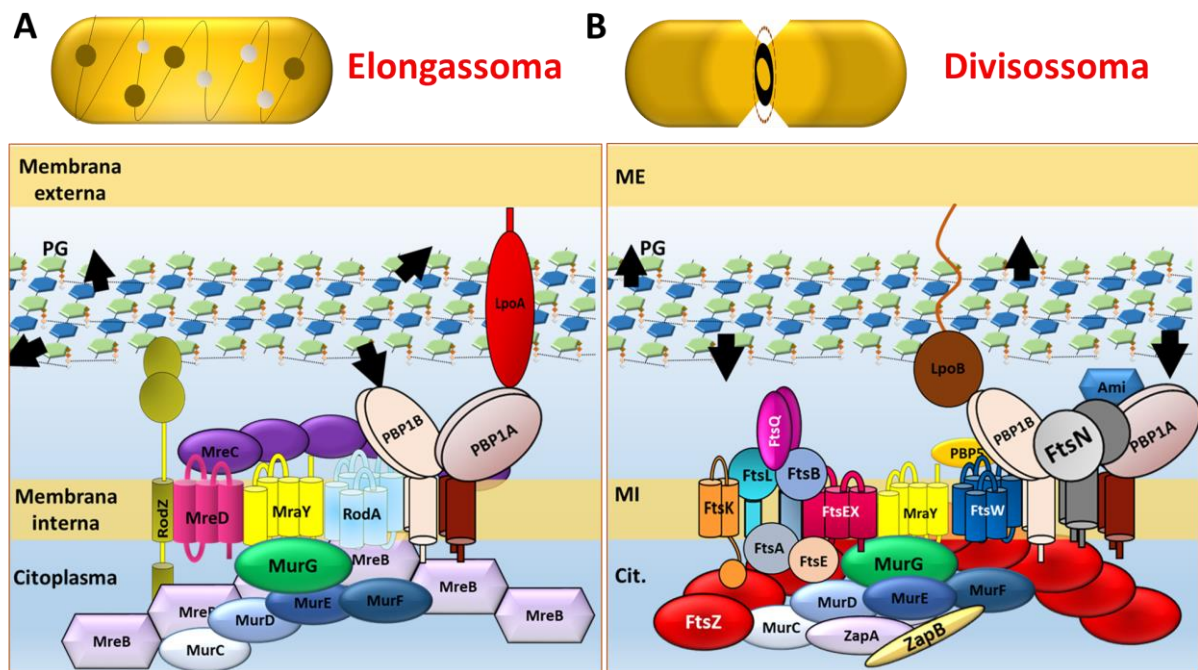
## **1.7 Interações proteína-proteína na biossíntese do peptidoglicano**

As interações entre proteínas desempenham papéis biológicos importantes em células, como na biossíntese do PG em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, na qual diversas proteínas localizadas em diferentes regiões da célula formam uma rede de interações para formar o PG. Essas interações proteína-proteína podem se comportar de maneiras diferentes e são classificadas em dois grupos diferentes: interações permanentes, nas quais as ligações são fortes e estáveis; e interações transientes, que podem ser subdivididas em dois grupos adicionais, aqueles com ligações fortes e os que apresentam ligações fracas e instáveis (Perkins et al, 2010).

A biossíntese do PG é um processo rápido e dinâmico, e as interações proteína-proteína geralmente são transientes, para assegurar a rápida síntese e produção de diversos substratos assim como os precursores necessários para a sobrevivência e funções celulares.

A morfogênese das bactérias que apresentam a forma de bastonete está ligada a duas fases distintas da biossíntese do PG: A primeira fase é de alongamento da parede celular, que ocorre ao longo do eixo longitudinal da célula; a segunda fase é a divisão celular que ocorre quando o comprimento bacteriano específico é alcançado na fase de alongamento e, a partir deste momento se inicia a síntese do PG no centro da célula (Mattei et al., 2010).

As duas fases de síntese requerem a remodelação contínua do PG, incluindo síntese, hidrólise, modificação e sincronização da invaginação de todas as camadas do envelope celular para garantir a manutenção da integridade celular durante todo o processo de biossíntese (Vollmer e Bertsche, 2008). Quaisquer desequilíbrios dessas atividades de síntese resultam na lise bacteriana e morte celular (den Blaauwen et al., 2014). A coordenação entre a morfogênese celular e a formação da parede celular pode ser mediada através de dois multi-complexos conhecidos como "Elongassoma" e "Divisossoma" (**Fig. 1.29**). Ambos sistemas incluem um conjunto de proteínas presentes no citoplasma, na membrana e no periplasma da célula, e também incluem o citoesqueleto bacteriano (MreB e FtsZ, **Fig. 1.29b**) (Mattei et al., 2010).



**Figura 1.29. Representação esquemática dos processos de alongamento e divisão celular de uma bactéria com morfologia de bastonete. (A) Complexo do Elongassoma e (B) Complexo do Divisossoma, ambos compostos por diversas enzimas que interagem entre si no momento da biossíntese da parede celular. As enzimas Mur juntamente com as proteínas MraY e MurG atuam em ambos os processos de alongamento e divisão celular (Hugonnet et al., 2016 com modificações).**

Muitas das proteínas que fazem parte desse multi-complexo não serão descritas nesta tese, no entanto, como pode ser observado na **Figura 1.29**, as enzimas que catalisam as reações referentes ao passo intracelular da biossíntese de peptidoglicano (Enzimas Mur e

MraY) e que levam à formação do bloco de construção do PG (Lipídeo I e II) participam de ambos os complexos e são o foco deste trabalho. Estas enzimas têm sido caracterizadas por mais de uma década, porém existem poucas informações sobre a localização espacial e temporal dessas proteínas assim como, a coordenação de suas atividades e o reconhecimento dos parceiros enzimáticos potenciais durante o ciclo celular.

Existem evidências de que as enzimas Mur podem interagir com outras enzimas envolvidas na síntese do peptidoglicano incluindo proteínas responsáveis pela divisão celular, porém nenhum dado da literatura mostra a interação direta entre as ligases Mur (Kouidmi et al., 2014). Os experimentos de duplo híbrido em bactérias indicaram que MurF interage com MraY em *Caulobacter crescentus*. Também, há evidências que as proteínas MurA, MurB, MurC, MurD, MurE, MurF, MurG e MraY formam complexos no citoplasma quando a célula bacteriana é exposta a compostos que inibem a polimerização de MreB, proteína responsável por sintetizar o citoesqueleto da célula bacteriana (White et al., 2010). Além disso, Gaballah et al., (2011) mostraram que a enzima MurF de *Chlamydia pneumoniae* interage com MreB fazendo com que a quantidade de polímeros produzidos por essa proteína aumente na célula.

Estudos biofísicos realizados com as ligases Mur de *Thermotoga maritima*, efetuados pelo nosso grupo de pesquisa, mostraram as interações individuais entre MurD, MurE e MurF com as proteínas MurG e MreB, no entanto não foi observado nenhuma interação entre as próprias enzimas MurD, MurE e MurF (Favini et al., 2013). Os resultados apresentados por Munshi et al., (2013) corroboram os resultados observados pelos outros autores, os quais mostram que as ligases Mur de *M. tuberculosis* não interagem entre elas, no entanto, interagem com as proteínas FtsZ, FtsW, FtsQ e Wag31 que estão envolvidas na divisão celular. Assim, uma melhor compreensão do modo de ação das enzimas Mur e a interação proteína – proteína no contexto biológico da síntese da parede celular bacteriana é de fundamental importância para entender os processos biológicos e também para o desenvolvimento de novos inibidores.

## PROJETO 1 – *MraY*: Proteína integral de membrana

### 2. OBJETIVOS

#### 2.1 Objetivos gerais

Nossos objetivos iniciais foram clonar, expressar e purificar a proteína integral de membrana *MraY* de diferentes espécies bacterianas. Todos os protocolos de extração e solubilização foram otimizados para a obtenção de *MraY* na forma solúvel.

Posteriormente, decidimos analisar as possíveis interações entre *MraY* (proteína membranária) com *MurF* (proteína citoplasmática) e *MurG* (proteína associada à membrana) com a finalidade de detectar a formação de multi-complexos importantes para a síntese dos precursores do peptidoglicano.

#### 2.2 Objetivos específicos

- Clonagem dos genes *mraY*, *murF* e *murG* de *Thermotoga maritima*. Para estas análises decidimos trabalhar com os genes de *T. maritima*, pois estes genes fazem parte do mesmo operon nessa bactéria e deste modo, foi possível realizar a clonagem em um único vetor.
- Expressão e purificação das proteínas *MurF-MraY-MurG* com a finalidade de detectar as interações entre elas.

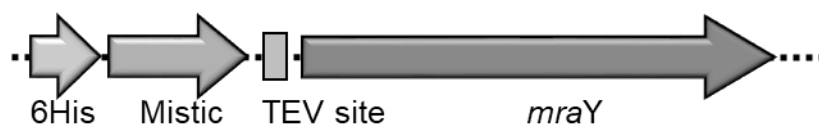
### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Amostras bacterianas e plasmídeos

O DNA genômico de *Listeria monocytogenes* (DSM 20600), *Pseudomonas aeruginosa* (PA01), *Shigella flexneri* (DSM 4782), *Streptococcus pneumoniae* (R6) e *Thermotoga maritima* (DSM 3109) foi utilizado para a amplificação do gene que codifica a proteína *MraY*. Os fragmentos gênicos amplificados foram clonados no vetor pLIM-14 (Kan<sup>R</sup>) (**Fig. 3.1**) que contém a sequência que codifica a proteína *Mistic*, a qual contribui para a solubilização da proteína-alvo. Os mesmos fragmentos gênicos foram clonados no vetor pMAL (Amp<sup>R</sup>) que contém a sequência codificadora da proteína *MBP* (Maltose Binding-Protein), a qual auxilia na solubilização de proteínas de membrana e possui um peptídeo sinal para exportá-las ao periplasma.

#### 3.2 Clonagem do gene *mraY*

A clonagem foi realizada usando primers específicos para amplificar a região gênica que codifica a proteína *MraY* das diferentes cepas bacterianas utilizadas. Os fragmentos amplificados foram clonados usando sítios de restrição das enzimas *Bam*HI/*Hind*III. Após a amplificação dos fragmentos gênicos foi realizada a digestão enzimática dos insertos e vetores com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III a 37 °C durante 3h. Os produtos digeridos foram purificados usando o kit NucleoSpin® PCR Clean-up (Macherey-Nagel), de acordo com as instruções do fabricante. Uma vez que os insertos e os plasmídeos foram digeridos, foi realizada a reação de ligação usando *T4* DNA Ligase na razão molar de 4:1 (inserto-vetor). Os produtos de ligação foram transformados em *E. coli* NEB5α. Todas as informações sobre as construções estão descritas na **Tabela 3.3**.



**Figura 3.1. Esquema ilustrativo da construção de *mraY* no vetor pLIM-14.** Foram clonados os genes que codificam para *MraY* de *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae*, *S. flexneri* e *T. maritima*.

### 3.3 Transformação bacteriana

O DNA plasmidial foi incubado com células quimio-competentes de *E. coli* NEB5 $\alpha$  durante 30 minutos em gelo. Após este passo as amostras foram submetidas a choque térmico a 42 °C durante 40 segundos e as células foram incubadas em gelo novamente durante 2 minutos. Posteriormente, foi adicionado meio SOC e as células foram incubadas a 37 °C sob agitação (200 rpm) durante 1 hora. Subsequentemente as células foram centrifugadas a 4.000 rpm a 4 °C durante 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram semeadas em placas de LB ágar acrescida de kanamicina (50  $\mu$ g/ml) e incubadas a 37 °C durante 16 horas. Posteriormente, três colônias isoladas foram usadas para realizar testes de expressão de Mystic-MraY.

### 3.4 Testes de expressão de MraY

Foram realizados testes iniciais de expressão da proteína Mystic-MraY usando as cepas de *E. coli*: C41 (DE3), C43 (DE3), BL21(DE3) pLysS, BL21 (DE3), BL21-CodonPlus-RIL e BL21 Star. Os testes foram realizados em meio Terrific Broth (TB), Lysogeny Broth (LB) e meio de auto-indução com kanamicina (50  $\mu$ g/ml). No momento em que a cultura bacteriana atingiu densidade óptica 600 nm = 1,0 foi realizada a indução com 0,5 mM e 1 mM de IPTG. Foram testadas três diferentes temperaturas de indução: 18 °C e 20 °C (16 horas) e 37 °C (3 horas) sob agitação de 200 rpm. Posteriormente, a cultura bacteriana foi centrifugada a 6.000 rpm a 4 °C durante 30 minutos, o sobrenadante descartado e as células usadas para a extração das proteínas totais de membrana.

### 3.5 Western blotting

As amostras de proteínas foram aplicadas em gel de poliacrilamida 15% em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e transferidas para membrana de nitrocelulose usando tampão contendo 25 mM Tris-HCl pH 7,6, 190 mM glicina, 0,1 % de SDS e 20 % de metanol, durante duas horas a 200V. Posteriormente, foi realizada a etapa de bloqueio com BSA e incubação durante 1 hora a temperatura ambiente seguida de lavagem com TBS-T. Depois a membrana foi incubada com anticorpo anti-His conjugado com peroxidase de rabanete (HRP) (5 Prime-

Penta- kit Conjugado HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente. Novamente, a membrana foi lavada com TBS-T para remover o excesso de anticorpo e a reação foi revelada usando o substrato SIGMA FAST Diaminobenzidina (SIGMA®).

### 3.6 Métodos para expressão de proteínas de membrana

As proteínas de membrana desempenham papéis fundamentais em diversos processos celulares, incluindo transporte de moléculas (Dassa e Hofnung, 1985; Dobrovostsky et al., 2005), transdução de energia (Schulze et al., 2014), efluxo multidrogas (Abdali et al., 2017) e exportação de proteínas em sistemas de secreção (Schwarz et al., 2014). A imensa variedade de funções chave que essas proteínas desempenham em bactérias as tornam potenciais alvos moleculares para o desenvolvimento de antibióticos (von Heijne, 2007). Aproximadamente 30% do genoma de organismos procarióticos e eucarióticos é constituído por regiões relacionadas com a síntese de proteínas de membrana, embora compreendam uma pequena fração de apenas 2% no banco de dados estruturais “Protein Data Bank” (Bruni e Kloss, 2013). O maior interesse na caracterização funcional e estrutural de proteínas de membrana é devido ao fato que representam mais de 60% dos alvos de drogas atuais (Prince e Jia, 2013). Diversas características intrínsecas das proteínas de membrana as mantêm como alvos desafiadores para os estudos estruturais, dentre as quais a mais importante é a dificuldade em obter quantidades significativas de proteína pura, homogênea e estável durante o processo de expressão e purificação (Engel e Gaub, 2008).

As dificuldades referentes à obtenção de quantidades significativas de proteínas de membrana puras devem-se à sua abundância limitada em membranas biológicas naturais e, uma vez super-expressas em sistemas heterólogos, muitas vezes geram toxicidade para a célula hospedeira, levando a formação de corpos de inclusão (Grishammer e Tate, 1995; Schlegel et al., 2010). Por este motivo é necessária a junção de vários fatores, como por exemplo, o uso de diversas cepas de expressão, vetores, tags de purificação que auxiliem na solubilização da proteína-alvo e técnicas de crescimento celular otimizadas para permitir a superprodução destas proteínas (Seddon et al., 2004; Mus-Veteau et al., 2014).

A abundância natural de proteínas de membrana frequentemente é muito baixa e este fato dificulta a produção e o isolamento *in vitro* para estudos estruturais e funcionais.

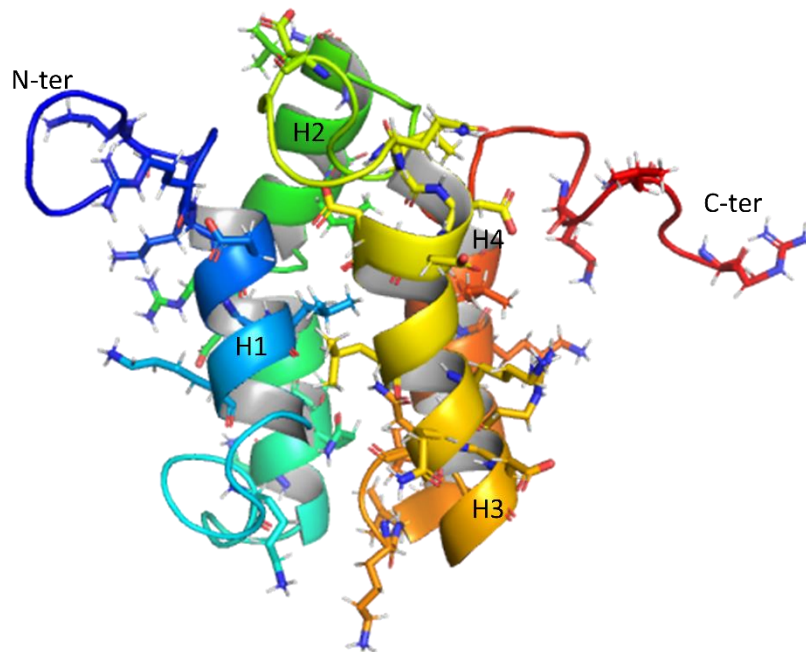
Geralmente, as proteínas de membrana podem ser expressas em sistema de expressão de *E. coli*, porém devem ser inseridas corretamente na membrana para que possam ser produzidas e purificadas (Schlegel et al., 2014).

Os sistemas de expressão de proteínas de membrana em *E. coli* têm mostrado sucesso na obtenção de quantidades suficientes de amostras para estudos cristalográficos. Além da sua facilidade de manipulação genética e geração de clones relativamente rápida. Atualmente, existem diferentes cepas de *E. coli*, tais como C41 (DE3) e C43 (DE3) e BL21-Codon Plus-Ril, as quais ajudam a diminuir a toxicidade causada pela superprodução da proteína-alvo (Schlegel et al., 2010; Schlegel et al., 2014). Além disso, cada vetor de expressão também deve conter um sítio de clivagem por protease para remoção do tag usado para a purificação, se for necessário. A protease TEV (do inglês *Tobacco Etch Virus*) é frequentemente empregada nestes casos devido a sua fácil produção no laboratório e alta estabilidade para os ensaios de clivagem (Bruni e Kloss, 2013). Além disto, a expressão de proteínas de membrana pode ser otimizada pela introdução de tags de fusão como a tioredoxina (Trx), Maltose-Binding Protein (MBP) e Mystic (Therien et al., 2002; Ishihara et al., 2005; Roosild et al., 2005; Neophytou et al., 2007).

A proteína Mystic foi descrita pela primeira vez por Roosild e colaboradores (Roosild, Greenwald et al., 2005). Mystic é uma proteína de *Bacillus subtilis* de 13 kDa que é altamente hidrofílica, o que poderia aumentar o nível de expressão de proteínas de membrana quando usada como tag de fusão na região N-terminal (Kefala, Kwiatkowski et al., 2007; Dvir e Choe, 2009; Chowdhury, Feng et al., 2012; Xu, Kong et al., 2013; Broecker et al., 2014). Mystic não possui qualquer sequência sinal identificada, que seria reconhecida pelo sistema Sec translocon e tem a capacidade de se enovelar de forma autônoma na bicamada lipídica (Roosild et al., 2005).



Mistic tem 110 resíduos que estão arranjados dentro de quatro hélices  $\alpha$  que expõem inúmeros resíduos polares e carregados (**Fig. 3.2**), características que são incompatíveis com a topologia de transmembrana. No entanto, Mistic associa-se fortemente às membranas *in vivo* e aos sistemas miméticos de membrana *in vitro*, qualificando-a, operacionalmente, como uma proteína integral de membrana. Estudos de RMN confirmaram que essa proteína é incorporada dentro de micelas de detergente, a qual depende fortemente de detergentes para sua solubilização (Broecker et al., 2014).



**Figura 3.2.** Estrutura RMN da proteína Mistic de *Bacillus subtilis*. Esta proteína apresenta somente quatro hélices  $\alpha$ , as quais expõem vários resíduos polares e carregados (sticks).

A proteína Mistic tem sido utilizada com sucesso como proteína de fusão para expressão de proteínas de membrana de bactérias (Lee et al., 2015) e proteínas de membrana humana GPCR em sistema de expressão de *E. coli* (Marino et al., 2015). Também foi utilizada para expressão de proteína humana para a produção de anticorpos policlonais (Alves et al., 2017). Esta proteína foi utilizada como tag de fusão da proteína MraY neste trabalho, e os resultados estão incluídos nas seções seguintes.

Como uma abordagem alternativa para contornar a toxicidade causada pela superprodução de proteínas de membrana, o sistema de expressão livre de células (Cell Free) têm a vantagem de controlar condições de expressão sem necessidade de manter a viabilidade celular (Lyukmanova et al., 2012; Proverbio et al., 2014). É um método que tem tido sucesso

em alguns casos de expressão de proteínas de organismos procarióticos (Ishihara et al., 2005; Klammt et al., 2005; Wu e Swartz;2008; Schneider et al., 2010; Tosi et al., 2014), embora ainda seja um sistema que tenha um custo elevado.

### **3.6.1 Detergentes para solubilização, purificação e estabilização de proteínas de membrana**

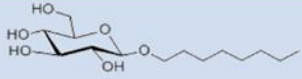
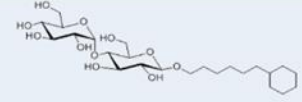
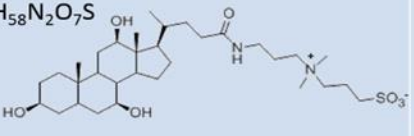
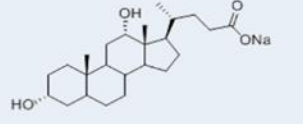
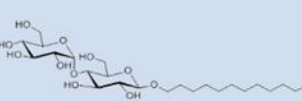
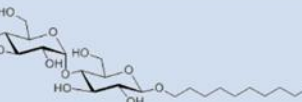
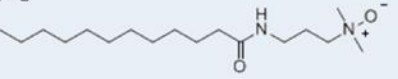


Por definição, as proteínas integrais de membrana estão envolvidas pelas membranas biológicas *in vivo*. Durante os passos de solubilização e purificação as proteínas são removidas da membrana biológica e os lipídeos que as envolvem devem ser substituídos por um agente de características similares que as mantenham solúveis; na maioria dos casos, esta função é atribuída a detergentes (Wiener, 2004). Os detergentes são essenciais devido à sua característica anfipática que solubilizam as membranas enquanto protegem as superfícies hidrofóbicas das proteínas (Carpenter, Beis et al., 2008). Os detergentes são importantes desde a extração das proteínas da membrana celular até a cristalização, e por este motivo são necessárias diversas triagens para a determinação do detergente correto para cada tipo de proteína de membrana. A escolha correta do detergente irá impactar diretamente na integridade funcional e na estabilidade da amostra, bem como na possibilidade da formação de cristais (Ostermeier e Michel, 1997).

Alguns dos detergentes mais comuns encontrados nos protocolos de purificação e cristalização de proteínas de membrana depositadas no banco de dados PDB são n-dodecyl  $\beta$ -D-maltopyranoside (DDM), n-decyl- $\beta$ -D-maltopyranoside (DM), n-nonyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (NG), n-octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (OG) e n-dodecyl-N,N dimethylamine-N-oxide (LDAO) (Vergis et al., 2010) (**Tabela 3.1**).

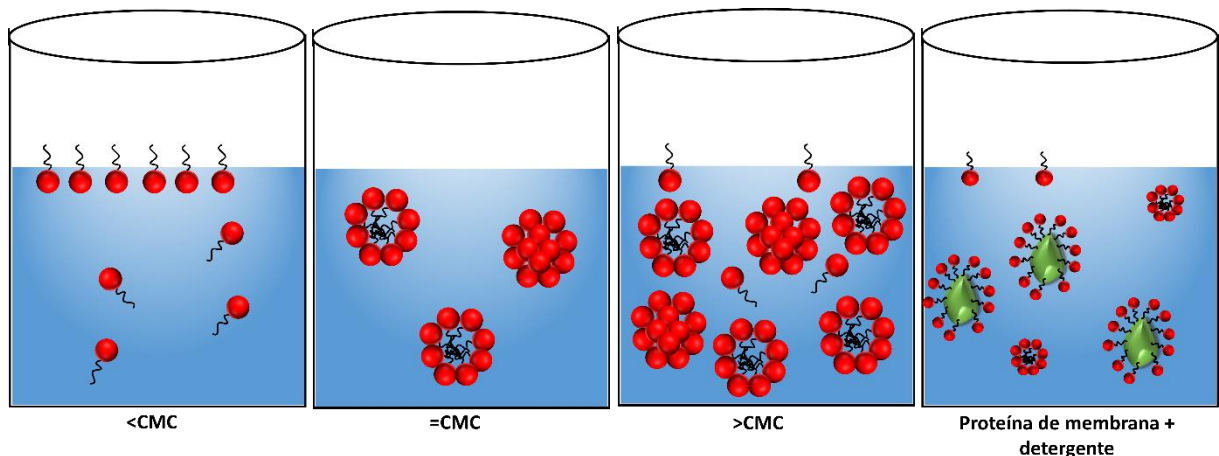
A escolha do detergente para um novo protocolo de purificação de proteínas de membrana é a etapa crucial do experimento e como não existe um detergente ideal para a solubilização de cada proteína de membrana é necessária a triagem com diferentes classes de detergentes. Estes podem ser detergentes não-iônicos, como  $\beta$ -OG, DDM e Triton-X100, considerados detergentes “suaves” com menor propensão de desnaturar proteínas, bem como os detergentes zwitteriônicos e aniônicos como FOS12, LAPAO e Sarcosine que são considerados mais agressivos do que os detergentes não-iônicos, pois tendem a desestabilizar a

proteína devido à carga que possuem (Prive, 2007). O detergente ideal é aquele que permite a recuperação da proteína em forma solúvel, homogênea, estável e funcional (Carpenter, Beis et al., 2008).

**Tabela 3.1.** Principais detergentes utilizados para extração e solubilização de proteínas de membrana

Detergentes		Fórmula molecular	Peso molecular	CMC: (H <sub>2</sub> O)
OG (Glicosídeo)	n-Octyl-β-D-Glucopyranoside	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub> 	292.4	~ 18-20 mM <sup>(1)</sup> (0.53%)
Cymal-6 (classe neopentil glicol)	6-Cyclohexyl-1-Hexyl-β-D-Maltoside	C <sub>24</sub> H <sub>44</sub> O <sub>11</sub> 	508.5	~ 0.56 mM <sup>(2)</sup> (0.028%)
CHAPS (Zwitterionic)	3-[(3-Cholamidopropyl)-Dimethylammonio]-1-Propane Sulfonate]	C <sub>32</sub> H <sub>58</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S 	614.9	~ 8 mM <sup>(1)</sup> (0.49%)
Deoxycholate acid (iônico)	(3α,12α-Dihydroxy-5β-Cholan-24-oic Acid, Monosodium Salt)	C <sub>24</sub> H <sub>39</sub> O <sub>4</sub> Na 	414.6	~ 6 mM <sup>(1)</sup> (0.24%)
DDM (não-iônico) maltosídeo	n-Dodecyl-β-D-Maltoside	C <sub>24</sub> H <sub>46</sub> O <sub>11</sub> 	510.6	~ 0.17 mM <sup>(1)</sup> (0.0087%)
DM (maltosídeo)	n-Decyl-β-D-Maltoside	C <sub>22</sub> H <sub>42</sub> O <sub>11</sub> 	482.6	~ 1.8 mM <sup>(1)</sup> (0.087%)
LAPAO (Zwitterionic)	3-Dodecylamid o-N,N'-Dimethylpropyl Amine Oxide	C <sub>17</sub> H <sub>36</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 	300.6	~ 1.56 mM <sup>(1)</sup> (0.052%)
Sodium Lauroyl Sarcosine	N-Methyl-N-(1-Oxododecyl)-Glycine)	C <sub>15</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>3</sub> Na 	293.4	~ 14.4 mM <sup>(1)</sup> (0.42%)
Fos-choline-12 (classe NG)	(n-Dodecylphosphocholine)	C <sub>17</sub> H <sub>38</sub> NO <sub>4</sub> P 	351.5	~ 1.5 mM <sup>(1)</sup> (0.047%)

Todo detergente possui uma concentração micelar crítica (CMC) que pode variar de acordo com o solvente. Nas concentrações abaixo da CMC, o detergente se encontra como monômero em solução. Nas concentrações iguais a CMC, o detergente se agrega formando micelas. E nas concentrações acima da CMC existe um equilíbrio entre os monômeros de detergentes e um aumento na concentração de micelas. Na presença de proteínas de membrana, os detergentes apresentam três estados de equilíbrio: monômeros de detergente, micelas sem proteínas e detergente ligado à proteína (Wiener, 2004; Loll, 2014). O detergente ligado à proteína mimetiza o ambiente hidrofóbico das membranas naturais permitindo que as proteínas permaneçam solúveis em solução (**Fig 3.3**) (Møller e le Maire, 1993).



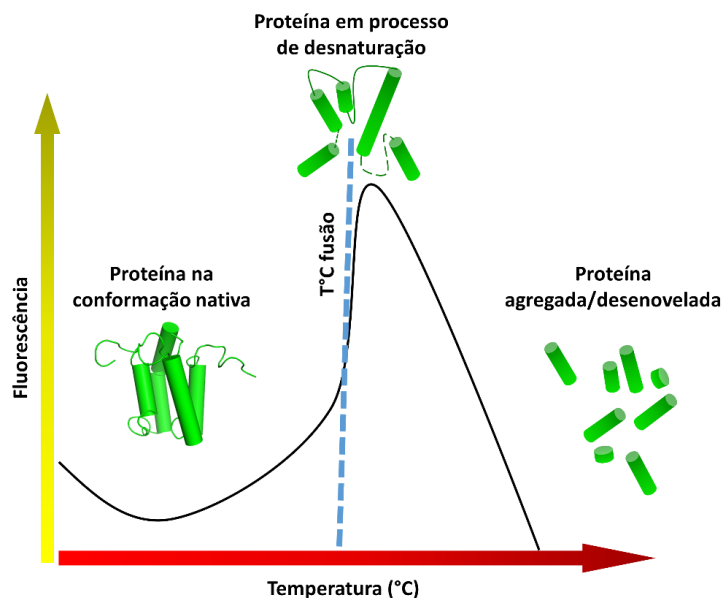
**Figura 3.3.** As concentrações de detergente determinam a maneira como os detergentes irão se organizar em solução. Os monômeros de detergentes são observados quando a concentração de detergente está abaixo da CMC, as micelas se formam quando a concentração é igual ou maior que a CMC. Quando as proteínas de membrana são adicionadas à uma solução contendo detergentes ocorre a organização das micelas ao redor das proteínas.

### 3.6.2 Métodos para a cristalização de proteínas de membrana

Os melhores indicadores para obter cristais de proteína de membrana são monodispersidade e termo-estabilidade. Uma amostra monodispersa apresenta na solução uma única espécie oligomérica da proteína, como por exemplo, monômero ou dímero. A monodispersidade da amostra é alcançada através de triagens em torno do tipo de tampão

utilizado durante a purificação, bem como o pH, a tag de purificação e a escolha do detergente ideal para a solubilização e estabilização da proteína na forma solúvel.

A termo estabilidade da proteína é caracterizada pela temperatura de fusão/desnaturação, que pode ser mensurada através do ensaio de “Thermal Shift”, no qual gradientes de temperatura são aplicados sobre a amostra proteica até o momento da sua desnaturação, deste modo é possível realizar a escolha do tampão e pH mais adequados para a estabilidade da proteína (**Fig 3.4**). Proteínas que apresentam alta estabilidade podem ser mais facilmente purificadas em detergentes mais agressivos que apresentam micelas pequenas e, assim possuem maior chance de serem cristalizadas, uma vez que esses detergentes permitem a formação de cristais bem ordenados (Mancusso et al., 2011; Prince e Jia, 2013).



**Figura 3.4.** Esquema ilustrativo do ensaio de termo estabilidade de proteínas. Com o aumento da temperatura a proteína passa da conformação nativa através de um processo de desnaturação até sua agregação/desenovelamento em altas concentrações. Este ensaio permite analisar as melhores condições para manter a proteína solúvel em solução. A fluorescência pode ser observada através de sondas fluorescentes (SYPRO-Orange, por exemplo) ou também pela fluorescência intrínseca da proteína a 280nm.

O complexo proteína-detergente é a mistura usada na cristalização. No entanto, o equilíbrio entre proteína e detergente durante a purificação pode ser crítico para a obtenção dos cristais. Ou seja, altas concentrações de detergente podem desnaturar as proteínas ou impedir a separação de fase durante a cristalização. Isto normalmente ocorre depois da purificação da

proteína, no qual é necessário a concentração através de centrifugação. O método de diálise pode ser usado para tentar resolver o problema de altas concentrações de detergente na solução, porém detergentes que possuem baixos valores de CMC apresentam micelas grandes e, neste caso a diálise não é eficaz, pois o tamanho dos poros das membranas não permitem a passagem do detergente para o meio exterior. Por outro lado, baixas concentrações do detergente podem tornar as proteínas insolúveis (Wiener, 2004).

Outro ponto importante a ser mencionado é a falta de reprodutibilidade das concentrações finais de detergente para os ensaios de cristalização. Por este motivo é necessário o uso de técnicas específicas que determinem as concentrações da mistura entre detergente-proteína. Entre essas técnicas a mais confiável é a cromatografia de filtração em gel acoplada a detectores de espalhamento de luz e índice de refração (Wiener, 2004).

No entanto, os detergentes nem sempre são capazes de mimetizar adequadamente as membranas nativas, resultando em uma limitada estabilidade da proteína. Conseqüentemente, foram feitos esforços significativos para estabelecer novas técnicas que permitem a cristalização das proteínas de membrana em um ambiente nativo, como a fase cúbica lipídica (LCP) (Landau e Rosenbusch, 1996) e Bicelas (Ujwal e Bowie, 2011; Lorieau et al., 2013). Ambas abordagens são baseadas na reconstituição da proteína de membrana em um ambiente lipídico que pode contribuir para a sua maior estabilidade e a formação de contatos proteína-proteína que são necessários para nucleação e crescimento do cristal.

### **3.6.3 Extração das proteínas de membrana**

Para a obtenção de Mystic-MraY na forma solúvel realizamos ensaios de solubilização utilizando os seguintes detergentes: n-Octyl- $\beta$ -D-Maltoside, CHAPS, Cymal-6, Deoxycholate, n-Dodecyl- $\alpha$ -D-Maltoside (DDM), Foscholine, LAPAO e N-Lauroyl Sarcosine. Para este ensaio, foram centrifugados 500 mL de cultura bacteriana a 6.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C e o pellet bacteriano foi ressuspensão em tampão de lise, contendo lisozima e inibidores de protease. Posteriormente, a amostra foi lisada no Microfluidizer a 15.000 psi e em seguida centrifugada a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 40.000 rpm durante 90 minutos a 4 °C para a obtenção das membranas totais. A amostra foi ajustada até uma  $DO_{600nm} = 1,0$  e solubilizada com LAPAO 1%. Uma vez solubilizadas, as membranas foram centrifugadas a 40.000 rpm durante 45 minutos a 4 °C e o

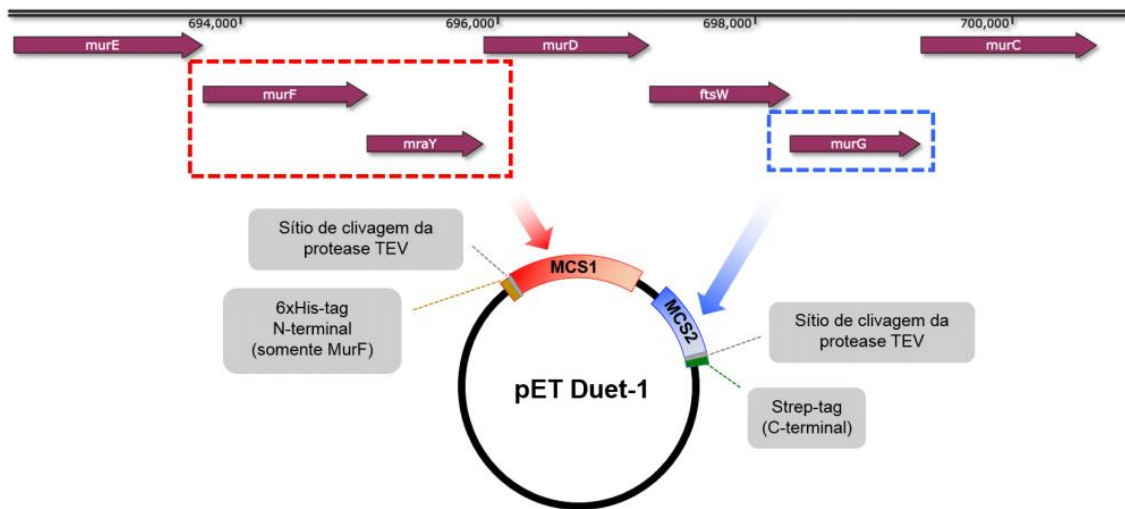
sobrenadante diluído na proporção de 1:5 em tampão de lise. A purificação da proteína recombinante Mystic-MraY foi feita através de *cromatografia de afinidade* por íons metálicos imobilizados (IMAC) utilizando resina de níquel agarose Ni-NTA (QIAGEN®). As membranas foram incubadas com a resina durante a noite a 4 °C sob agitação suave. A resina foi lavada com tampão de lise acrescido de DDM 0,51 mM. A proteína foi eluída com uma solução de 300 mM de imidazol e as frações dialisadas antes de serem analisadas em SDS-PAGE para visualizar a banda correspondente à proteína de interesse. A proteína purificada foi quantificada por espectrofotometria e procedeu-se a clivagem da porção His-Mistic usando a protease TEV, na proporção de 1: 2 (Mistic-MraY: TEV) a temperatura ambiente durante duas horas. Todos os tampões utilizados estão listados na **Tabela 3.3**.

### 3.7 Cromatografia de filtração em gel

Após a clivagem de Mystic-MraY, a amostra foi concentrada (Vivaspin-GE MWCO 100 kDa) e ajustada até 5 mg/ml, e aplicada em colunas Superose® 6 10/300 GL e Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences) usando tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0 contendo DDM a 0,17 mM. Após a eluição, as frações foram analisadas por SDS-PAGE e as frações contendo a proteína foram concentradas até aproximadamente 1 mg/ml.

### 3.8 Clonagem de *mraY-murF* e *mraY-murF-murG*

Foi realizada a clonagem do segmento do operon que codifica para as proteínas MraY e MurF de *Thermotoga maritima* no MCS-1 do vetor pET Duet-1, a qual apresenta a protease TEV na região C-terminal. Foram utilizadas as enzimas de restrição BamHI e NotI. Para a clonagem do operon MraY-MurF-MurG o mesmo procedimento anterior foi realizado e o gene que codifica para a proteína MurG foi inserido no MCS-2 usando as enzimas de restrição NdeI e Sall (**Fig. 3.5**).



**Figura 3.5. Estratégia de clonagem entre MraY e enzimas Mur.** Construção do operon MraY-MurF e MraY-MurF-MurG em pET Duet-1. Foi utilizado o programa SnapGene para realizar o modelo da clonagem.

### 3.9 Testes de expressão de MurF-MraY de *T. maritima*

Foram realizados testes de expressão do segmento *murF-mraY* e *murG* usando as cepas de *E. coli*: BL21 (DE3), BL21 Ril, BL21 Star, LEMO e Roseta 2. Os testes foram realizados em meio Terrific Broth (TB) com ampicilina (100 µg/ml). Quando a cultura bacteriana atingiu D.O.<sub>600nm</sub>=1,0 foi realizada a indução com 0,5 mM e 1mM de IPTG. Foram testadas três temperaturas de indução diferentes: 18 °C (durante a noite), 20 °C (durante a noite) e 37 °C (3 horas) sob agitação de 200 rpm. Posteriormente, a cultura bacteriana foi centrifugada a 6.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C, o sobrenadante descartado e as células usadas para a extração das proteínas totais.

### 3.10 Purificação do segmento do operon *murF-mraY* de *T. maritima*

Primeiramente, as células foram incubadas em tampão contendo 50 mM de HEPES pH 7,5, 200 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, glicerol 10%, juntamente com lisozima, inibidores de protease e benzonase durante 1 hora a 4 °C sob agitação. As células foram lisadas utilizando microfluidizer a 25.000 psi, centrifugadas a 18.000 rpm e o sobrenadante utilizado na cromatografia de



afinidade com coluna Histrap (1ml) e cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200 10/300 GL.

**Tabela 3.2.** Características gerais das proteínas usadas nesse trabalho

Vetor	Características do vetor	Proteína	Peso molecular (kDa)	Ponto isoelétrico (pI)
pLIM-14	6His Nter> Mystic > sítio TEV protease > proteína recombinante (KanR)	Mistic-tmMraY	46.6	5.55
		tmMraY	33.8	9.28
		Mistic-ImMraY	48.5	5.13
		ImMraY	35.7	6.59
		Mistic-paMraY	52.4	5.96
		paMraY	39.6	9.51
		Mistic-sfMraY	52.6	6.81
		sfMraY	39.8	9.65
		Mistic-spMraY	48.9	5.5
pETDuet-1	MurG>Strep Cter (MSC1) 8His Nter Mur-MraY(MSC2) (AmpR)	MurG	37.7	8.83
		MurF	49.7	7
		Mistic	12.8	4.51
		TEV protease	27.5	8.99

**Tabela 3.3.** Tampões utilizados durante os passos de expressão e purificação de MraY

	Tampão	Reagentes
Purificação em coluna de níquel	Lise celular	Tris-HCl 50mM pH 8, 200mM NaCl, glicerol 10%
	Lavagem	Tris-HCl 50mM pH 8, 200mM NaCl, glicerol 10%, DDM 0,51mM
	Gradiente de eluição 1	Tris-HCl 50mM pH 8, 200mM NaCl, glicerol 10%, DDM 0,51mM, imidazol 20mM
	Gradiente de eluição 2	Tris-HCl 50mM pH 8, 200mM NaCl, glicerol 10%, DDM 0,51mM, imidazol 50mM
	Gradiente de eluição 3	Tris-HCl 50mM pH 8, 200mM NaCl, glicerol 10%, DDM 0,51mM, imidazol 300mM
Western Blotting	Tampão de transferência	Tris 25mM, Glicine 190mM, SDS 0,1%, Metanol 20%
	TBS-T	Tris 20mM pH 7,6, 130mM NaCl, Tween-20 10%
	Solução de bloqueio	BSA 5% diluído em TBS-T
	Revelação da membrana	SIGMA FAST®
Filtração em gel	Filtração em gel	Tris-HCl 50mM pH 8, 100mM NaCl, glicerol 5%, DDM 0,17mM
Diluições	TEV	Tris-HCl 50mM pH 8, 200mM NaCl, glicerol 10%, DDM 0,51mM
	Filtração em gel	Tris-HCl 50mM pH 8, 100mM NaCl, glicerol 5%, DDM 0,17mM

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As proteínas da membrana representam cerca de 20 a 30% das proteínas totais descritas para todas as espécies e mais de 60% dessas proteínas são usadas como alvos farmacêuticos (Arachea et al., 2012). Existem muitos desafios no estudo de proteínas de membrana, mas a elucidação das suas estruturas é de grande importância para a compreensão de muitas doenças como o câncer, fibrose cística, hipertensão, Alzheimer, entre outros (Moraes et al., 2014; Mus Veteau et al., 2014). A resolução de estruturas macromoleculares deste grupo de proteínas representa um importante desafio científico e essas dificuldades estão presentes em diferentes fases do seu estudo. Além disso, em alguns casos, a super-expressão de proteínas de membrana recombinante torna-se uma tarefa difícil quando comparada com a expressão de proteínas solúveis (Whitelegge, 2013).

O gene que codifica a proteína *MraY* foi clonado nas cepas de expressão de *E. coli* no vetor pMAL e foram realizados testes de expressão de acordo com os parâmetros descritos na **Tabela 4.1**. No entanto, apesar das otimizações nos protocolos de expressão não foi possível obter níveis significativos de expressão de *MraY*. De acordo com Bhandari e Gowrishankar (1997) a toxicidade induzida pela super-expressão de proteínas recombinantes pode alterar as funções dos vetores de expressão ou de seus promotores, afetando, assim, a expressão da proteína alvo. Além disso, Corchero e Villaverde (1998) e Paulsson e Ehrenberg (2001) relatam que a presença de plasmídeos impõe uma elevada carga metabólica para a célula hospedeira, levando ao aumento na demanda metabólica celular, o qual pode provocar um atraso no tempo de multiplicação das células contendo o plasmídeo e assim, diminuindo o nível de expressão da proteína alvo. Existem outros problemas associados à diminuição ou ausência de expressão de proteínas recombinantes e estão relacionados com a toxicidade induzida por IPTG, a formação de corpos de inclusão e a indução da expressão de várias proteases devido ao choque térmico, segundo foi descrito em *E. coli* (Garland Science, 2014).

Por outro lado, a expressão de *MraY* de todos os organismos que foram clonados no vetor pLIM-14 nesse trabalho apresentaram quantidades significativas de proteína. No entanto, para otimizar a expressão de *MraY* utilizou-se meio de cultura acrescido de glicose 1%, uma vez que a expressão basal do promotor Lac pode ser minimizada pela incorporação de catabólitos tais como glicose no meio de cultura. A inibição dos níveis de expressão basal do

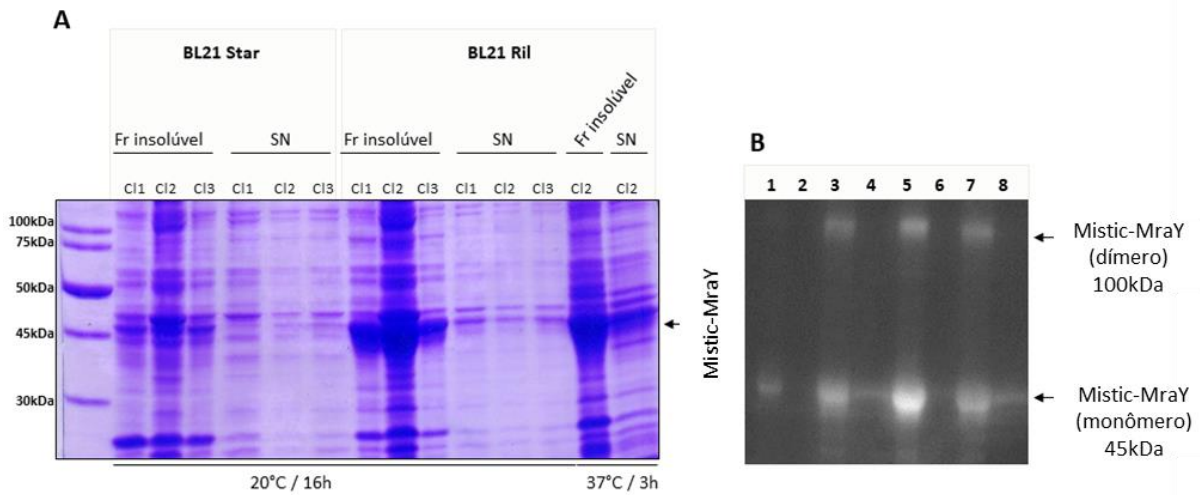
promotor Lac não afeta a expressão da proteína alvo após a indução com IPTG. Assim, recomenda-se que os passos de transformação e de pré-cultura sejam realizados na presença de glicose para minimizar os efeitos da expressão basal (Saluta e Bell, 1998). Deste modo, nossos resultados mostraram que o nível de expressão da proteína foi aumentado.

**Tabela 4.1.** Testes de expressão da proteína recombinante Mystic-MraY.

Vetor	Cepa de expressão (E.coli)	Meio de cultura	IPTG	Temperatura e Tempo de indução
pMAL pLIM-14	BL21 (DE3)	Terrific Broth (TB) Lysogeny Broth (LB)	0.5mM 1mM	18 °C / 16h
	BL21 Ril			20°C / 16h
	BL21 Star			37°C / 3h
	BL21(DE3)pLysS			
	C43 C41	Auto-indução	-	25°C / 25h

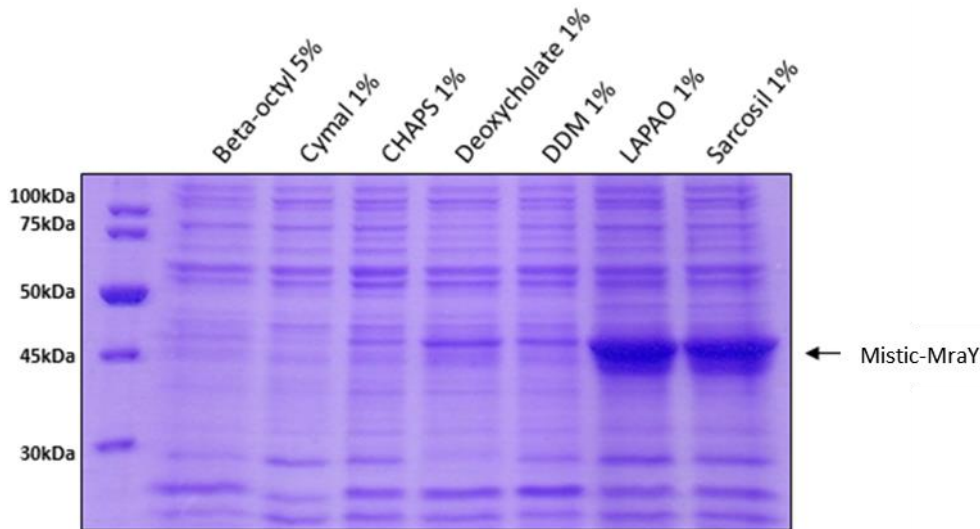
As análises em gel de poli-acrilamida dos lisados celulares mostraram bandas de alta intensidade para as frações insolúveis em comparação com frações solúveis. Entre as seis cepas bacterianas testadas, BL21 Ril foi a mais adequada para a expressão de Mystic-MraY de *T. maritima* (tmMraY) (**Fig. 4.1a**). Para confirmar a presença de Mystic-MraY foi realizado Western blotting utilizando anticorpo anti-His (**Fig. 4.1b**). Os testes de expressão demonstraram que Mystic-MraY é expressa como uma proteína insolúvel devido à sua natureza de membrana. Além disso, não foram obtidas quantidades expressivas de tmMraY com as outras cepas de expressão de *E. coli* testadas.

Interessantemente, os testes de expressão indicaram a presença de Mystic-MraY monomérica e também em uma forma que poderia representar um dímero. Estes resultados são compatíveis aos estudos de cross-linking realizados com MraY de *Aquifex aeolicus*. Chung et al., (2013) mostraram que MraY forma um dímero tanto na presença de micelas de detergente quanto na membrana, também há evidências através de ensaio duplo híbrido em MraY de *Caulobacter crescentus* que mostram a formação de dímeros (White et al., 2010).



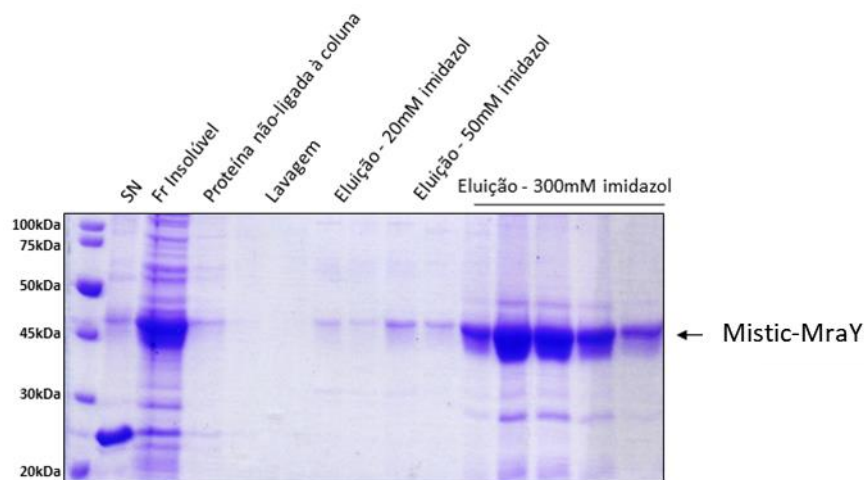
**Figura 4.1. Análise do lisado celular após a indução com IPTG.** (A) Análise da expressão de Mystic-tmMraY em gel SDS-PAGE 15%. Para cada cepa de *E. coli* foram utilizados três diferentes clones (Cl). (B) Western Blot das frações solúveis e insolúveis após indução com IPTG usando anticorpo anti-His. BL21 star clone 2 (20 °C) pellet após sonicar (1); BL21 star clone 2 (20 °C) SN após sonicar (2); BL21 Ril clone 1 (37°C) pellet após sonicar(3); BL21 Ril clone 1 (37 °C) SN após sonicar (4); BL21 Ril clone 2 (20°C) pellet após sonicar (5); BL21 Ril clone 2 (20°C) SN após sonicar (6); BL21 Ril clone 2 (37°C) pellet após sonicar (7); BL21 Ril clone 2 (37 °C) SN após sonicar (8).

A **Figura 4.2** apresenta o gel de SDS-PAGE com os resultados dos testes de solubilização dos lisados de células de BL21 Ril que expressaram Mystic-MraY. As análises das frações revelaram que apenas LAPAO (1%) e N-lauroilsarcosina (1%) foram capazes de solubilizar a proteína.



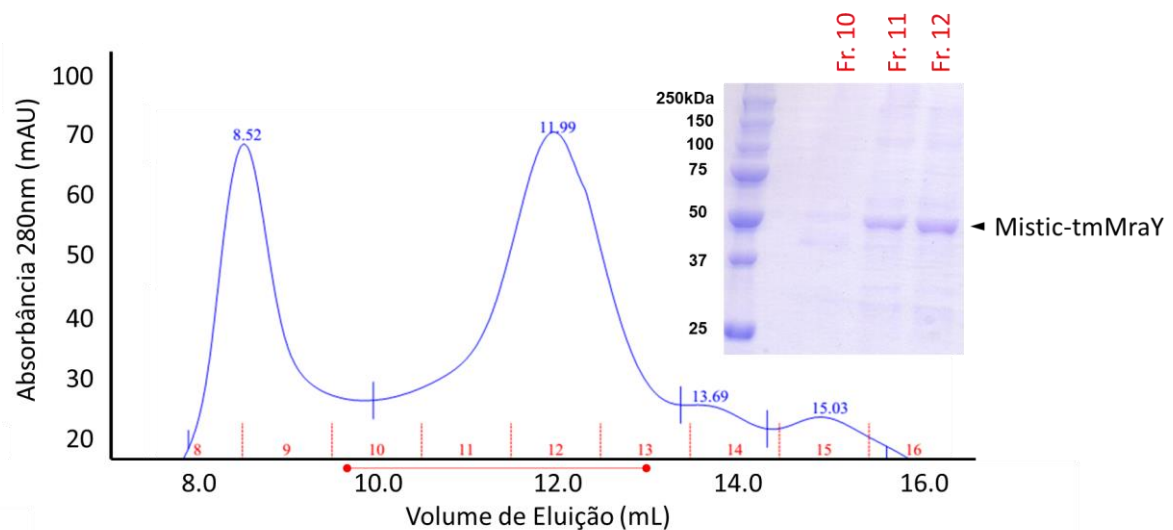
**Figura 4.2.** Análise do lisado celular após solubilização de Mystic-MraY com diferentes detergentes. Gel SDS-PAGE (15%). Foi observado que os detergentes LAPAO e Sarcosil foram os mais eficientes para extrair Mystic-MraY da membrana citoplasmática. Os detergentes foram usados numa concentração 10 vezes maior à sua concentração micelar crítica (CMC).

Após a solubilização, Mystic-tmMraY foi purificada com sucesso através de cromatografia de afinidade realizada com resina de níquel. As frações foram analisadas por gel SDS-PAGE 15% (**Fig. 4.3**) e posteriormente, as frações que continham a proteína foram reunidas para serem dialisadas com o propósito de diminuir as concentrações de imidazol na amostra, uma vez que Mystic é sensível a altas concentrações de imidazol.



**Figura 4.3.** Solubilização e purificação de Mystic-MraY (*T. maritima*) com LAPAO (1%) em gel de SDS-PAGE 15%.

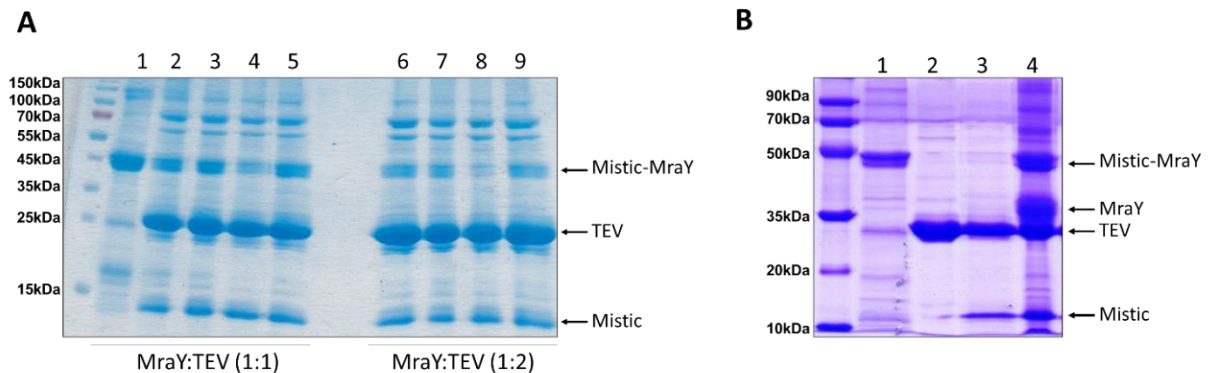
Após a diálise, a amostra foi concentrada e injetada em coluna Superdex 200 10/300 GL. A análise do perfil cromatográfico permitiu visualizar que uma parte da fração foi eluída no volume morto da coluna, mostrando que a proteína não permaneceu estável durante os primeiros passos de purificação. No entanto, também foi observado um segundo pico de eluição correspondente a proteína Mystic-MraY na forma solúvel (**Fig. 4.4**).



**Figura 4.4. Cromatografia de filtração em gel em coluna Superdex 200 10/300 GL.** O primeiro pico eluído ( $\approx 8$ ml;  $V_0$ ) corresponde a agregados de Mystic-MraY. O segundo pico corresponde a Mystic-MraY solúvel. No gel de SDS é possível observar as bandas da proteína que foram eluídas do segundo pico com aproximadamente 12 ml.

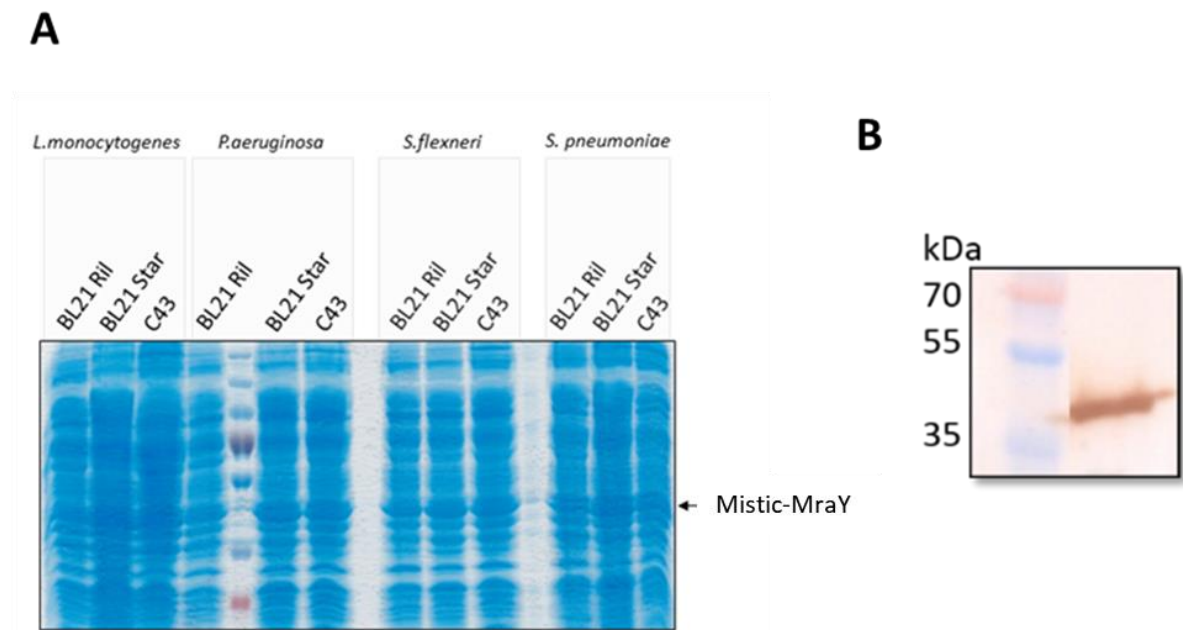
Uma vez estabelecido o protocolo de purificação de Mystic-MraY, prosseguimos com os testes de clivagem. O passo de clivagem para obter somente MraY foi realizada com a protease TEV. Na primeira tentativa de clivagem utilizou-se TEV na proporção de 2: 1 (Mistic-MraY: TEV) com 16 h de incubação a 4 °C, porém durante a clivagem da porção His-Mistic, foi observada precipitação da proteína (**Fig. 4.5b**). Estes resultados mostraram a instabilidade de MraY frente aos tampões e detergentes utilizados ou pela retirada de Mistic, que quando presente poderia estar auxiliando na estabilidade da proteína. No entanto, novas condições de clivagem foram realizadas com diferentes proporções nas concentrações de Mystic-MraY:TEV (**Fig. 4.5a**).

Contudo, mesmo após as otimizações na etapa de clivagem observamos a degradação da proteína após a clivagem com TEV. A análise em gel de SDS-PAGE mostrou a presença de duas bandas, uma com aproximadamente 27kDa correspondente a TEV e outra banda de aproximadamente 13kDa referente a Mystic. No entanto, nenhuma banda com 35 kDa correspondendo a *MraY* foi observada. (**Fig. 4.5a**)



**Figura 4.5. Resultado da clivagem de *MraY*-*Mistic* de *T. maritima* usando protease TEV a 4 °C e a temperatura ambiente.** Poço 1: *MraY*-*Mistic* antes da clivagem. Poços 2,3,4,5: *Mistic*-*MraY*:TEV (1:1). Poço 2: 1h de clivagem; Poço 3: 2h de clivagem; Poço 4: 18h de clivagem a temperatura ambiente; Poço 5: 18 h de clivagem a 4°C. Poços 6,7,8,9: *Mistic*-*MraY*:TEV (1:2). Poço 6: 1h de clivagem; Poço 7: 2h de clivagem; Poço 8: 18h de clivagem a temperatura ambiente; Poço 9: 18h de clivagem a 4°C. (**B**) poço 1: *Mistic*-*MraY*; poço 2: TEV; Poço 3: Sobrenadante da amostra após a clivagem com TEV; poço 4: Fração insolúvel após a clivagem com TEV. Após a retirada de *Mistic*, *MraY* torna-se insolúvel.

Devido à instabilidade de *tmMraY* após a retirada de *Mistic*, a estratégia empregada foi a clonagem de *Mistic*-*MraY* (em pLIM14) de diferentes espécies de bactérias, pois a instabilidade da proteína poderia ser intrínseca de *MraY* de *Thermotoga maritima*. Foram realizados novos ensaios de expressão utilizando as mesmas condições anteriores descritas na **Tabela 4.1** e foram obtidas quantidades expressivas de *Mistic*-*MraY* de todas as espécies (**Fig. 4.6a**).

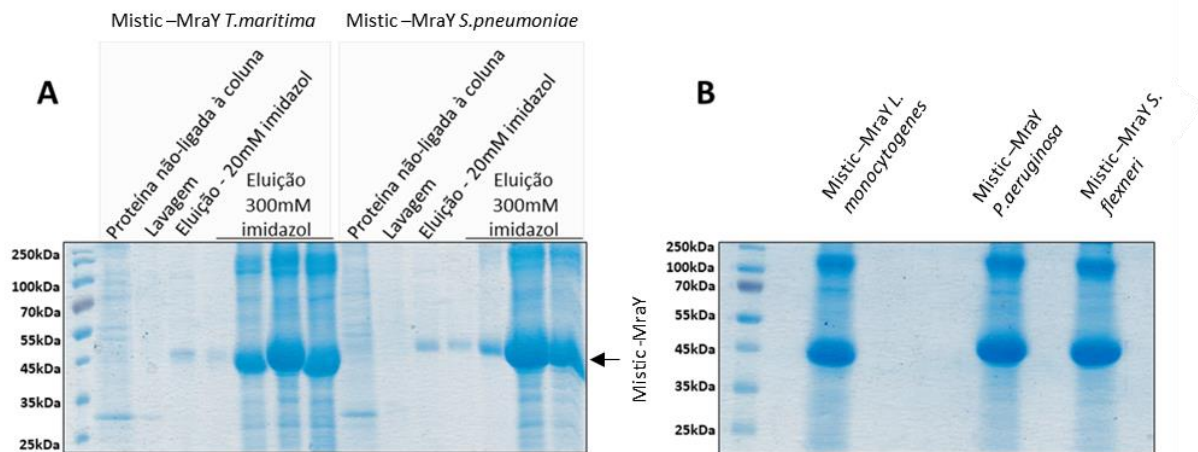


**Figura 4.6. Expressão de MraY-Mistic.** (A) Os testes de expressão foram realizados em meio de cultura TB com indução de 0,5 mM de IPTG a 37 °C durante 3 horas sob agitação de 200rpm. Essa imagem mostra as frações induzidas de Mistic-MraY de *Listeria monocytogenes* (*L.m.*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P.a.*), *Shigella flexneri* (*S.f.*) e *Streptococcus pneumoniae* (*S.p.*). (B) Western blot da fração insolúvel de Mistic-MraY de *S. pneumoniae*.

Uma vez padronizado o ensaio de expressão das proteínas, iniciamos o processo de purificação de Mistic-MraY de *Listeria monocytogenes* (lmMraY), *Pseudomonas aeruginosa* (paMraY), *Shigella flexnerii* (sfMraY) e *Streptococcus pneumoniae* (spMraY). Para a extração e solubilização das proteínas de membrana foram realizados os mesmos protocolos utilizados anteriormente para tmMraY. Após a eluição das proteínas as amostras foram dialisadas para remover o tampão contendo 300mM de imidazol, mas foi observada a presença de agregados e opacidade da amostra durante a diálise, os quais são indicativos de precipitação. Além disto, quando as amostras foram aplicadas em gel de SDS-PAGE uma parte significativa da proteína permaneceu na fração insolúvel. Assim, para tentar resolver este problema foi realizado o processo de purificação com o detergente n-Decyl- $\beta$ -D-maltosídeo anagrade (DM) (Chung et al., 2013) mas sem resultados satisfatórios, pois novamente foi observada a precipitação das proteínas. Decidimos então aumentar a concentração do detergente DDM para  $3 \times \text{CMC}$  (0,51 mM), e nestas condições as proteínas permaneceram solúveis permitindo a



obtenção de quantidades significativas de Mystic-MraY solúvel de diferentes espécies (**Fig. 4.7**).



**Figura 4.7. Purificação de MraY-Mistic através de cromatografia de afinidade em resina de níquel. (A)** Eluição de Mystic-MraY de *T. maritima* e *S. pneumoniae*. **(B)** Eluição de Mystic-MraY de *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa* e *S. flexneri*. Os experimentos foram realizados a 4 °C. Todas as proteínas foram confirmadas através de Western blotting. Mystic-MraY de todas as espécies apresenta peso molecular de aproximadamente 45kDa.

O mesmo problema de instabilidade da proteína ao retirar a proteína Mystic foi observado para os novos clones. No entanto, foram realizados testes de cristalização de Mystic-MraY das diferentes espécies de bactérias purificadas, mas não foi observada a formação de cristais. Uma das prováveis causas desse resultado poderia ter sido devido à baixa concentração de proteína utilizada. Além disso, as regiões hidrofílicas das proteínas integrais de membrana (IMP) são essenciais para a formação de cristais, porém o uso de DDM, que apresenta micelas relativamente grandes, pode impedir a interação destas regiões hidrofílicas e a posterior formação de cristais. Em contraste com este fato, os detergentes que apresentam micelas de cadeias curtas são mais susceptíveis à desnaturação pela proteína alvo (MusVeteau et al., 2014).

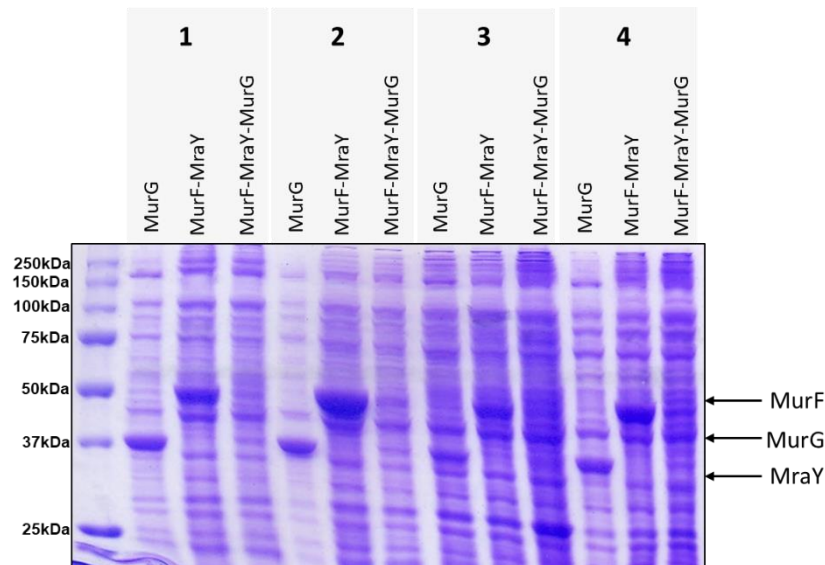
Na tentativa de solucionar os problemas relacionados à clivagem de Mystic e estabilização de MraY foi realizada uma nova abordagem pela adição de enzimas Mur através da clonagem da região do operon de tmMraY que contém as enzimas MraY, MurF e MurG como “parceiros para estabilização” no vetor pET Duet 1. White e Gober (2012) demonstraram uma possível interação entre MraY em complexo com as enzimas Mur, além disso, Zoeiby et al., (2003) e Favini-Stabile et al., (2013) mostraram a alta solubilidade e estabilidade das

enzimas Mur e a interação com MurG. Por outro lado, o genoma de *tmMraY* contém as proteínas MraY, MurF e MurG em sequência ordenada, o que facilitou a abordagem no momento da clonagem.

Além de clonar os genes *murF-mraY* e *murG* no vetor pET Duet-1, outras duas clonagens foram realizadas: operon *murF-mraY* em pETDuet-1 e *murG* também em pETDuet-1 afim de aumentar nossas possibilidades de análises de interações entre essas proteínas. Posteriormente a clonagem, ensaios de expressão foram realizados utilizando diferentes cepas de *E. coli*, tais como, BL21 Ril, BL21 Star (pRARE), Roseta 2, LEMO e foram testadas em diferentes temperaturas (18, 25 e 37 °C) e concentrações de indução de IPTG (0.5 mM e 1 mM). Também foram realizados ensaios de expressão através da auto-indução. Nossos melhores resultados de expressão foram com as células BL21 Ril e BL21 Star em meio TB induzidas com 0.5 mM de IPTG (**Fig. 4.8**).

A partir das análises através dos géis de poli-acrilamida observamos que a expressão de MurG em pETDuet 1 foi satisfatória em todas as condições testadas, porém nosso objetivo era a expressão do complexo entre as proteínas MurF-MraY e MurG e, portanto, não prosseguimos com os trabalhos com a construção de MurG sozinha.

Por outro lado, os genes *murF-mraY* foram expressados somente no meio de cultura Terrific Broth (TB) a 37 °C durante 3 horas como mostrado na **Figura 4.8**. E finalmente, quando foram induzidas as três proteínas no mesmo vetor (*murF-mraY-murG*), observou-se que não houve expressão significativa para nenhuma das proteínas em análise, por este motivo decidimos não trabalhar com essa construção.

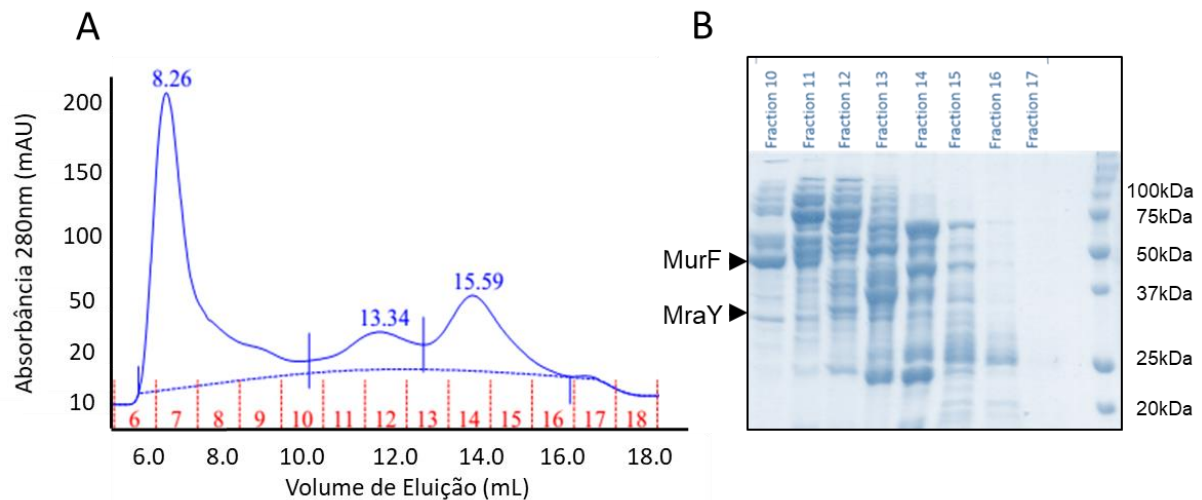


**Figura 4.8.** Expressão de MurG, MurF-MraY e MurF-MraY-MurG de *Thermotoga maritima* em pET Duet. (1) BL21 Ril, TB 37 °C/3h/0,5mM IPTG. (2) BL21 Star, TB 37 °C/3h/0,5mM IPTG. (3) BL21 Ril, TB 18°C/16h/0,5mM IPTG. (4) BL21 Star, TB 18 °C/16h/0,5mM IPTG. MurF-MraY (1) apresenta uma banda na altura de 50 kDa referente a MurF e outra banda entre os marcadores de 37 kDa e 25 kDa que poderia ser referente à MraY que apresenta aproximadamente 34kDa.

Embora seja possível observar a banda de aproximadamente 50 kDa referente à MurF e uma banda referente à MraY de aproximadamente 34kDa entre os marcadores de 37 e 25 kDa, tivemos dificuldade em confirmar os resultados de expressão de *murF-mraY*, uma vez que somente o gene *murF* apresenta cauda de poli-His na porção N-terminal. Deste modo, não conseguimos analisar satisfatoriamente a expressão de MraY através de Western blotting com anticorpo anti-His.

No entanto, decidimos prosseguir com as próximas etapas de purificação das proteínas MurF-MraY e, para isso primeiramente foi realizada uma cromatografia de afinidade com resina de níquel e depois cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200 10/300 GL (**Fig. 4.9**).

Na **Figura 4.9** é possível observar a presença de duas bandas nos dois primeiros poços do gel de SDS PAGE (esquerda para direita) que possivelmente representem as proteínas MurF (50 kDa) e MraY (34 kDa) eluídas com aproximadamente 10 ml. No entanto, é necessário a confirmação da identidade dessas proteínas através de espectrometria de massas.



**Figura 4.9. Purificação de MurF-MraY de *Thermotoga maritima*.** (A) Perfil cromatográfico da eluição de MurF-MraY em coluna Superdex 200 10/300 GL ( $V_0 \approx 8$ ). (B) Gel SDS-PAGE 15% das frações de MurF-MraY eluídas na coluna de filtração em gel. O primeiro e o segundo poço (esquerda para direita) representam a fração que foi eluída com aproximadamente 10mL na coluna de filtração em gel. Nesse poço é possível observar a presença de duas bandas. Talvez a primeira se refira à MurF com 50kDa e a segunda se refira à MraY que se encontra entre as bandas de 37 kDa e 25 kDa do padrão de peso molecular, porém não é possível afirmar uma vez que não foi realizado nenhum tipo de confirmação das proteínas. Os demais poços são referentes as frações eluídas nos volumes aproximados entre 13 e 16 ml.

Se as identidades das proteínas forem confirmadas positivamente como MurF-MraY poderemos otimizar nosso protocolo de expressão e purificação com a finalidade de obter maiores quantidades das duas proteínas puras. Uma vez alcançado esses objetivos será possível iniciar os estudos estruturais e biofísicos para analisar a interação entre o complexo formado entre essas proteínas.

No sentido geral, os dados apresentados nesse projeto relatam a expressão e purificação bem-sucedida de MraY, porém ainda são necessários experimentos de otimização que permitam a estabilidade da proteína. Por outro lado, a expressão e a purificação de MurF-MraY mostraram resultados promissores para o estudo da interação entre essas proteínas que estão intimamente relacionadas na formação do lipídio I.

Contudo, durante o desenvolvimento deste projeto houveram problemas de reprodutibilidade entre os ensaios de expressão e, além disso, não foi possível a obtenção de

quantidades suficientes dos complexos para as análises posteriores. Este trabalho está em processo de otimização no nosso grupo.

Devido aos motivos explicitados acima decidimos prosseguir nossos estudos com as enzimas Mur, proteínas essenciais para a sobrevivência das bactérias, as quais estão envolvidas nos primeiros passos da biossíntese do peptidoglicano.

## PROJETO 2: Enzimas Mur de *Streptococcus pneumoniae*

### 5. OBJETIVOS

#### 5.1 Objetivos gerais

Os objetivos deste projeto de pesquisa foram detectar e caracterizar as interações entre as enzimas que atuam na via de biossíntese do peptidoglicano através de métodos biofísicos.

As enzimas Mur são proteínas altamente solúveis e estudos prévios com essas proteínas de *Thermotoga maritima* (bactéria Gram-negativa) desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que MurG e MreB se comportam como proteínas-âncora para as enzimas Mur, porém nenhuma interação direta entre as ligases Mur foi observada (Favini et al., 2013).

Por estes motivos decidimos estudar as interações diretas entre as enzimas MurC, MurD, MurE e MurF, bem como suas interações com a proteína MurG, porém utilizamos as proteínas de *Streptococcus pneumoniae* como modelo *in vitro*, bactéria Gram-positiva e patogênica, a fim de compreender se essas interações são conservadas entre os diferentes grupos de bactérias.

#### 5.2 Objetivos específicos

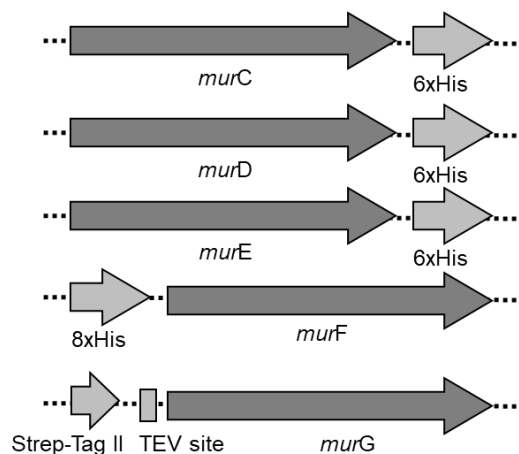
- Clonagem dos genes que codificam para as proteínas MurC, MurD, MurE e MurF de *Streptococcus pneumoniae* no vetor pET30b;
- Expressão e purificação das enzimas MurC a MurG para obtenção de quantidades significativas de proteínas para as análises posteriores;
- Caracterização individual de cada uma das enzimas Mur;

- Detecção e caracterização da interação direta entre as enzimas MurC, MurD, MurE e MurF;
- Detecção e caracterização da interação entre MurG e as ligases Mur;
- Cristalização do complexo entre as enzimas MurC-MurF, MurC-MurD e MurD-MurF.

## 6. MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1 Clonagem dos genes que codificam para as proteínas MurC, MurD, MurE e MurF de *Streptococcus pneumoniae*

Para analisar a rede de interações entre as enzimas Mur, os genes de *Streptococcus pneumoniae* (cepa R6) que codificam as proteínas MurC, MurD, MurE e MurF foram primeiramente subclonados no vetor pJET (Thermo Fisher Scientific) e pGEM-T Easy (Promega Corporation) segundo as instruções dos fabricantes. Após a subclonagem, foi realizada a digestão enzimática dos insertos e do vetor pET30b (Kan<sup>R</sup>) com as enzimas de restrição NdeI e SalI para os genes *murC* e *murD*; NdeI e XhoI para o gene *murE*; BglII e SalI para *murF*. A digestão enzimática foi realizada a 37 °C durante 16 horas. Os produtos digeridos foram purificados usando o kit NucleoSpin® PCR Clean-up (Macherey-Nagel), de acordo com as instruções do fabricante. Uma vez digeridos os insertos e os plasmídeos, foi feita a ligação usando T4 DNA Ligase na razão molar de 4:1 (inserto-vetor). Os produtos de ligação foram transformados em *E. coli* DH5α. O gene responsável pela expressão de MurG de *S. pneumoniae* foi adquirido comercialmente. As clonagens foram confirmadas por sequenciamento para verificar a presença dos insertos corretos que codificam para as proteínas de interesse (**Fig. 6.1**).



**Figura 6.1.** Estratégia de clonagem dos genes que codificam para MurC, MurD, MurE e MurF de *S. pneumoniae* em pET30b. Foi utilizado o programa SnapGene para realizar os modelos da clonagem.



## 6.2 Expressão das enzimas MurC, MurD, MurE e MurF

Os testes iniciais de expressão dos quatro clones das proteínas Mur (~50kDa) foram realizados utilizando as seguintes cepas bacterianas derivadas de *E. coli*: BL21 RIL, BL21 (DE3) e C43. Os testes foram realizados utilizando os meios de cultura Terrific Broth (TB) e Lysogeny Broth (LB) acrescido de kanamicina (50 µg/ml). No momento em que a cultura bacteriana atingiu D.O.<sub>600nm</sub> = 0.6-0.8 foi realizada a indução com 1 mM de IPTG. Além disso, foram testadas diferentes temperaturas de indução: 37 °C (durante 3 horas) e 20 °C (durante 16 horas) sob agitação de 200 rpm (**Tabela 6.1**). Posteriormente, a cultura bacteriana foi centrifugada a 6.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C, o sobrenadante descartado e as células usadas para purificação da proteína-alvo. Foram utilizados três diferentes clones de cada proteína para o teste de expressão.

**Tabela 6.1.** Teste de expressão das enzimas Mur de *S. pneumoniae*

Vetor	Cepas ( <i>E.coli</i> )	Meios de cultura	[IPTG] mM	Tempo de indução (horas)	T(°C)	Velocidade (RPM)
pET30b	BL21 DE3	Terrific Broth (TB)	1	3	37	200
pET30-8xHis	BL21 RIL C43	Lysogeny broth (LB)		16	20	

## 6.3 Purificação das enzimas Mur

Primeiramente, as células bacterianas contendo as proteínas-alvo super-expressadas foram incubadas com lisozima, inibidores de protease e benzonase durante 1 hora a 4 °C sob agitação. Depois, as células foram lisadas por sonicação e centrifugadas a 18.000 rpm durante 1 hora a 4 °C. Posteriormente, o sobrenadante foi utilizado para a purificação em duas etapas, uma primeira de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) em coluna His-trap 5mL, seguido de uma segunda etapa de cromatografia de filtração em gel (SEC) em coluna Hi-Load Superdex 200 16/600 (GE). Para a lise celular e afinidade foi utilizado tampão contendo 50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM imidazol e 10% de

glicerol. As proteínas foram eluídas no mesmo tampão da afinidade, porém contendo 300 mM de imidazol. Para a filtração em gel foi utilizado tampão contendo 50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl e 10 mM MgCl<sub>2</sub>.

Para a purificação de MurE foi necessária a adição do detergente n-Decyl- $\beta$ -D-Maltopyranoside (DM) na concentração de 0.5 % durante a etapa de lise celular. Além disso, MurE possui duas cisteínas na sua composição aminoacídica, motivo pelo qual foi adicionado 15 mM de  $\beta$ -Mercaptoetanol nas etapas de lise celular e IMAC e 5 mM na etapa de filtração em gel. A **Tabela 6.2** descreve características importantes de cada proteína estimadas através da ferramenta ProtParam disponível no servidor ExPasy (<https://web.expasy.org/protparam/>).

**Tabela 6.2.** Principais características das enzimas Mur que são importantes para a purificação e análises biofísicas

Proteína	Número de aa	Massa Molecular (Da)	pI teórico
<b>MurC</b>	452	50925.02	5.63
<b>MurD</b>	458	49630.58	5.14
<b>MurE</b>	489	54893.19	5.47
<b>MurF</b>	468	51974.07	5.23
<b>MurG</b>	371	41766.97	6.54

#### 6.4 Testes de expressão de MurG

O vetor pET30b com o gene que codifica para MurG de *Streptococcus pneumoniae* (R6) foi adquirido comercialmente.

Os testes iniciais de expressão da proteína MurG foram realizados usando a cepa de *E. coli* BL21 Star, utilizando os seguintes meios de cultura: TB, LB, Meio Mínimo e meio de auto-indução acrescidos de kanamicina (50  $\mu$ g/ml). Quando a cultura bacteriana atingiu D.O.<sub>600nm</sub> = 0.8 foi realizada a indução com 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM de IPTG. Além disso, foram testadas diferentes temperaturas de indução: 18 °C (16 horas), 25 °C (16 horas), 30 °C (4 horas) e 37 °C (3 horas) sob agitação de 200 rpm (**Tabela 6.3**). Posteriormente, a cultura bacteriana foi

centrifugada a 6.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C, o sobrenadante descartado e as células usadas para purificação da proteína-alvo.

**Tabela 6.3.** Condições de expressão da proteína MurG

Meios	IPTG (mM)			Tempo (h)			Temperatura (°C)				OD <sub>600</sub>	
<b>LB</b>	0,1	0,5	1	3	4	16	18	25	30	37	0,5	1
<b>TB</b>	0,1	0,5	1	3	4	16	18	25	30	37	0,5	1
<b>MM</b>	0,1	0,5	1	3	4	16	18	25	30	37	0,5	1
<b>A.I.</b>	-	-	-	+30				25				

## 6.5 Purificação de MurG

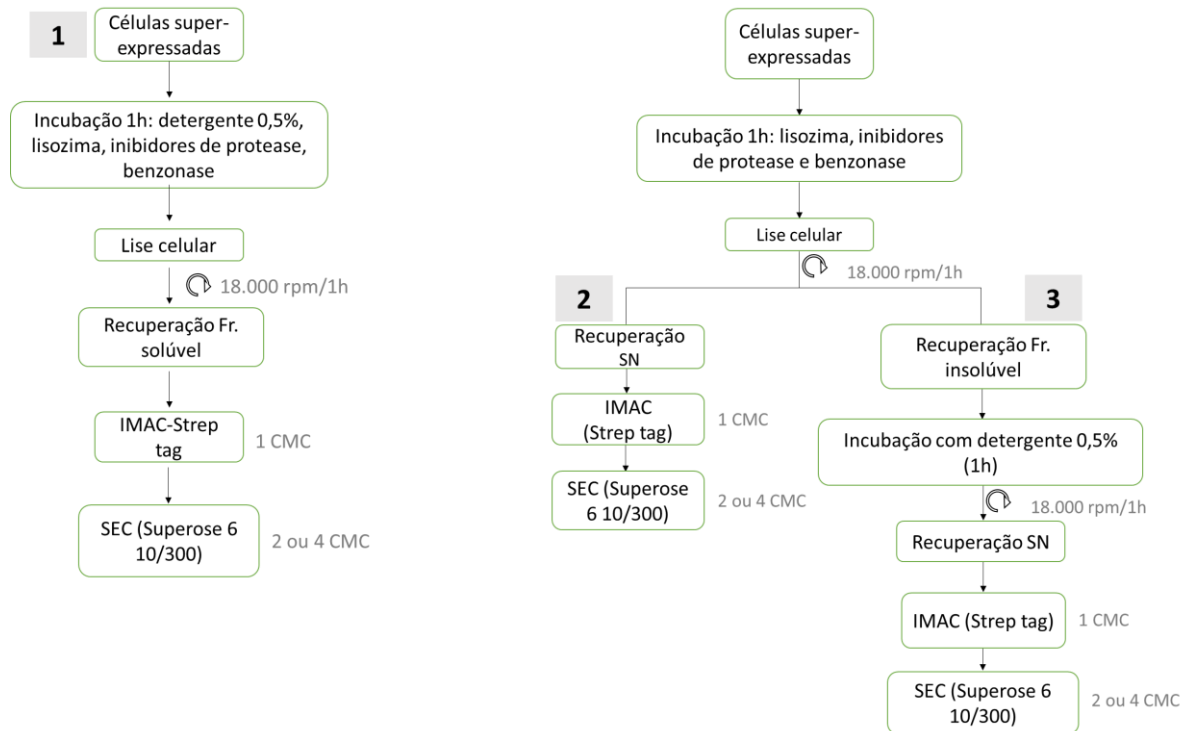
Foram realizadas diferentes abordagens de purificação para MurG (**Fig. 6.2**), pois essa proteína está anexada à membrana celular e, portanto, foi necessária a padronização do protocolo de purificação com diferentes detergentes para a extração e solubilização da proteína.

Primeiramente, as células foram incubadas com lisozima, inibidores de protease, benzonase e 0,5 % de detergente DM/DDM durante 1 hora a 4 °C sob agitação. As células foram lisadas por sonicação, depois centrifugadas a 18.000 rpm e o sobrenadante utilizado na cromatografia de afinidade com resina StrepTrap (1ml) e cromatografia de exclusão molecular em coluna Superose 6 10/300 GL.

Na segunda abordagem as células foram incubadas com lisozima, inibidores de protease e benzonase durante 1 hora a 4 °C sob agitação. As células foram lisadas por sonicação, depois centrifugadas a 18.000 rpm e o sobrenadante utilizado nas etapas de purificação descritas na primeira abordagem.

A terceira abordagem foi recuperar o pellet após a lise, e posteriormente, incubá-lo com 0,5 % de detergente DM ou DDM para a solubilização da proteína-alvo. Após 1 hora de incubação a 4 °C foi realizada uma nova centrifugação a 18.000 rpm e o sobrenadante utilizado no processo de purificação.

Finalmente, as amostras proteicas foram injetadas em coluna Superose 6 10/300 GL (GE) em tampão contendo 50mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5% glicerol. Também foi utilizado o mesmo tampão com 0,2, 0,5, 1,2 e 4 CMC de DM para analisar os diferentes estados de oligomerização da proteína.



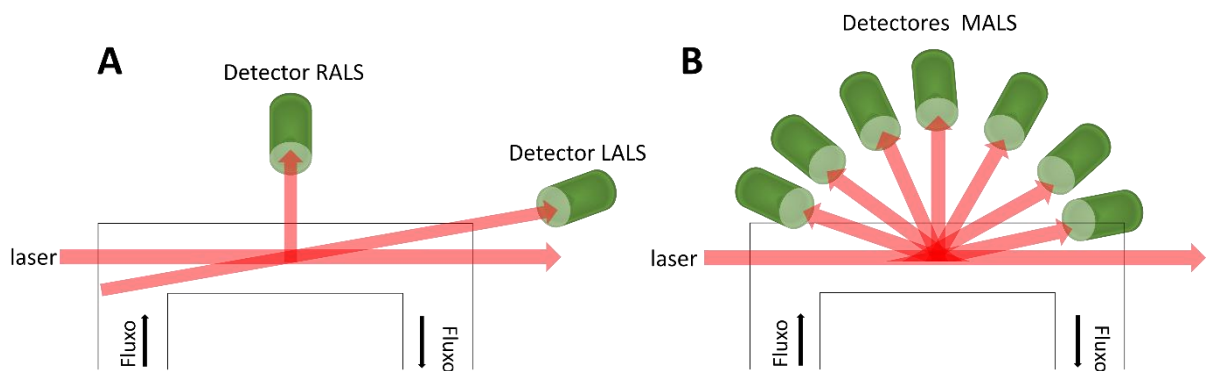
**Figura 6.2.** Representação esquemática das abordagens utilizadas para a purificação de MurG. Para a purificação da proteína-alvo foi utilizado um tampão contendo 50 mM HEPES pH 7,5, 500 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 % de glicerol. Também foram utilizados os detergentes DM e DDM em diferentes concentrações.

## 6.6 SEC- RALS/LALS e SEC-MALS

O Espalhamento de luz é uma técnica espectroscópica para a determinação da massa molar de moléculas em solução e quando combinado com um refratômetro e um detector de absorvância oferece uma abordagem mais rigorosa para a determinação da massa molar e oligomerização de proteínas em solução. A abordagem de detecção utilizando SEC-UV/LS/RI indica a presença de um detector de absorvância (UV), um detector de espalhamento de luz (LS) e um detector de índice de refração (RI) no qual são acoplados a uma coluna de

cromatografia de exclusão molecular (SEC). O detector de UV monitora a absorbância a 280 nm, o detector RI monitora as mudanças nos índices de refração durante a cromatografia e o detector LS mensura o excesso de espalhamento de luz da amostra, enquanto que a coluna de filtração em gel serve somente como um passo de separação de moléculas por tamanho. Como o espalhamento de luz fornece a média da massa molar da espécie em solução, a separação fornecida pela SEC desempenha um papel fundamental na análise geral. No entanto, a eluição da molécula não necessariamente se correlaciona com sua massa molar. O sucesso do estudo de formas oligoméricas em solução requer somente que esses vários oligômeros presentes na solução sejam fisicamente bem separados antes que atinjam o detector LS. O sistema deve ser calibrado no tampão de escolha e a resposta dos três detectores é utilizada para calcular a massa molar da proteína (Tarazona e Saiz, 2003; Folta-Stogniew, 2006; Sahin e Roberts, 2012).

As quantidades de detectores podem variar de acordo com o equipamento a ser utilizado. Normalmente, existem equipamentos com os detectores de espalhamento de luz de ângulo reto (RALS) e espalhamento de luz de baixo ângulo (LALS) (**Fig. 6.3a**), assim como equipamentos com detectores de espalhamento de luz em múltiplos ângulos (MALS) (**Fig. 6.3b**). Geralmente, o número de ângulos em um sistema MALS pode variar entre 2 e 20, na qual a dispersão é detectada simultaneamente em cada ângulo fornecendo assim uma precisa massa molar da proteína e seus estados oligoméricos (Nobmann, 2014).

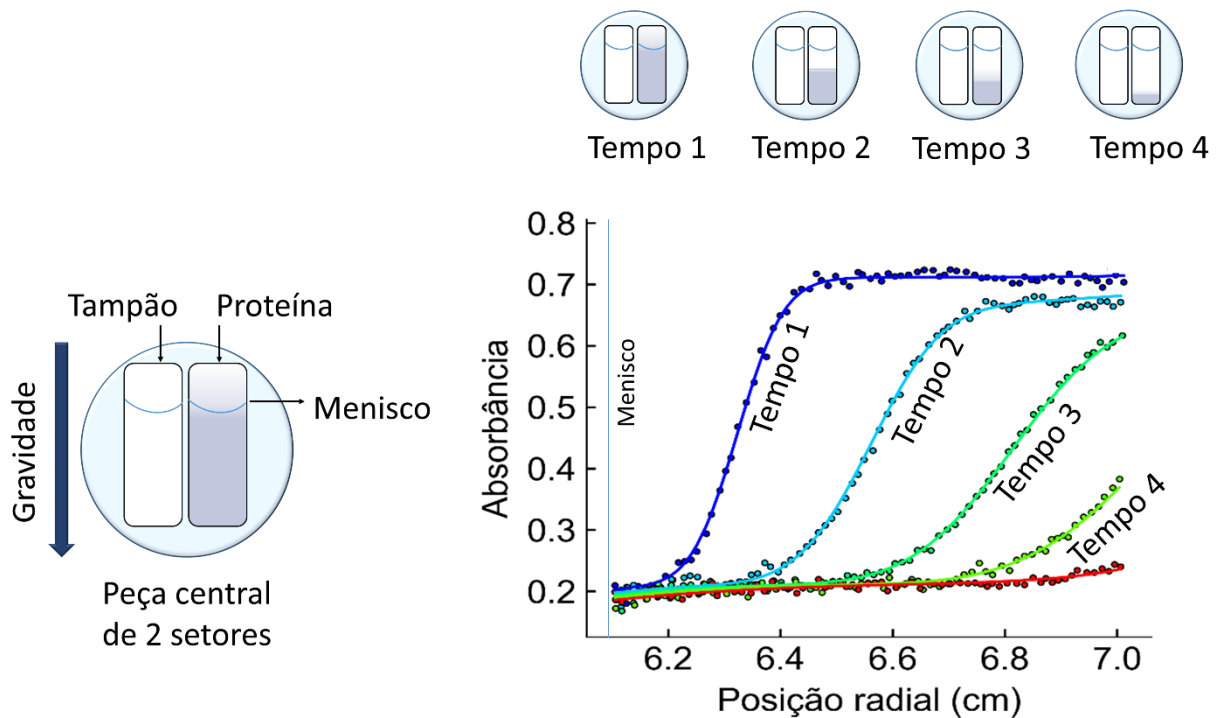


**Figura 6.3. SEC-RALS/LALS e SEC-MALS para a análise do peso molecular de proteínas.** Existem diferentes equipamentos para determinar o peso molecular de proteínas. Na imagem **A** o equipamento é composto pelos detectores RALS e LALS, enquanto que na imagem **B** o equipamento apresenta vários detectores em diferentes direções. Ambos os aparelhos são acoplados à uma coluna de filtração em gel para a separação das proteínas através do peso molecular (Malvern Instruments 2014 com modificações).

Para a correta determinação do peso molecular das enzimas Mur foi realizado os ensaios de OMNISEC – Malvern® (Laboratório de Espectrometria e Calorimetria –LNBio) com as enzimas MurE e MurG na concentração de 5 mg/ml em coluna Superose 6 10/300 GL; e SEC-MALS – Wyatt Technologies (EMBL-Grenoble) com as enzimas MurC, MurD e MurF nas concentrações de 2 mg/ml, 10 mg/ml, 25 mg/ml em coluna Superdex 200 10/300 GL. Foram injetados 50 µL de cada proteína.

### **6.7 Ultracentrifugação analítica - método de velocidade de sedimentação**

A ultracentrifugação analítica (AUC) é um método clássico baseado na termodinâmica da solução que permite a observação em tempo real da redistribuição de proteínas diluídas em solução após a aplicação de uma força centrífuga (**Fig. 6.4**). O método de velocidade de sedimentação fornece muitos aspectos do comportamento da proteína em solução, incluindo a massa molecular, a forma hidrodinâmica, e pureza. Além disso, é uma técnica sensível para detectar a formação de multi-complexos e as fracas interações que ocorrem entre proteínas (Zhao et al., 2013). Outra vantagem que essa técnica fornece são a ampla faixa de tamanhos moleculares que podem ser analisadas e a ausência de superfície em contato com a amostra a ser analisada. Através do ajuste da velocidade é possível detectar massas molares de 100 g/mol até  $10^8$  g/mol e também permite analisar interações com constante de dissociação (Kd) entre 10 nM e 10 mM. A difusão das partículas e o processo de sedimentação é descrito pela equação de Lamm (Schuck et al., 2002), no qual é estimado o coeficiente friccional que pode ser considerado como uma representação do atrito da proteína em relação à solução aquosa e, depende da massa, volume e geometria molecular de cada molécula.

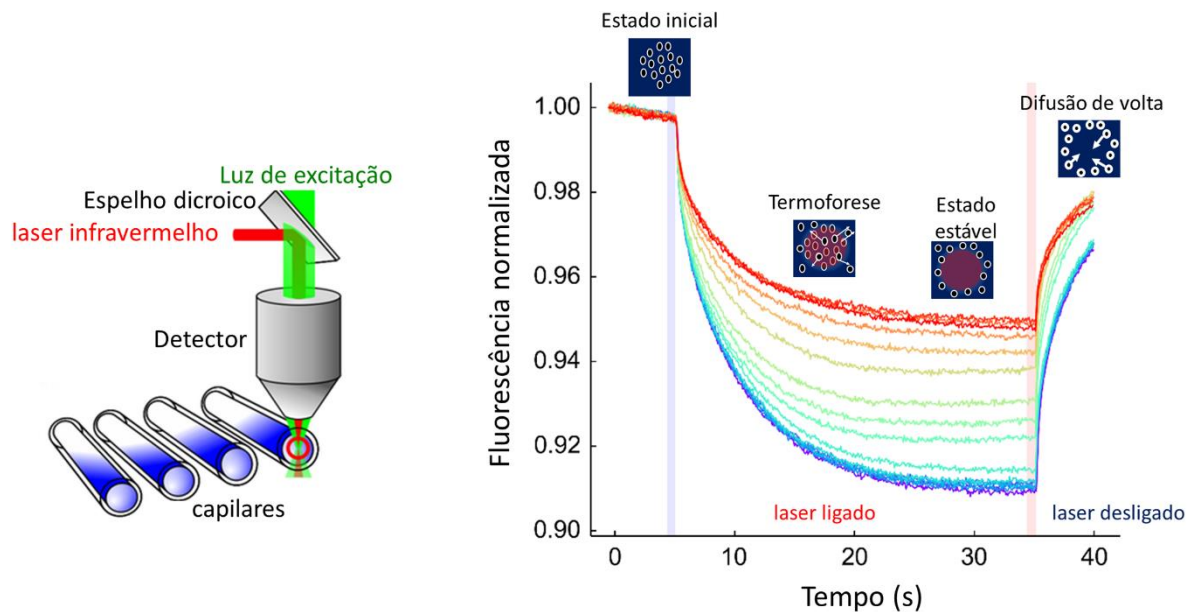


**Figura 6.4. Ultracentrifugação analítica através do método de velocidade de sedimentação.** A figura da esquerda mostra uma seção transversal da peça central de dois setores que contém um espaço para o tampão de diluição da proteína e outro espaço para a amostra a ser analisada. No momento em que a força centrífuga é aplicada as moléculas sedimentam-se gradativamente. A figura da direita ilustra a evolução do processo de sedimentação das partículas ao longo do tempo, o qual depende do tamanho e forma das moléculas (Coriolis Pharma 2017, com adaptações).

Para analisar a possível formação dos complexos binários, foi realizada a técnica de ultracentrifugação analítica usando o método de velocidade de sedimentação. Após as proteínas terem sido submetidas à filtração em gel, as amostras MurC, MurD, MurE, MurF e MurG e os complexos: MurC:MurD, MurC:MurE, MurC:MurF, MurC:MurG, MurD:MurE, MurD:MurF, MurD:MurG, MurE:MurF, MurE:MurG, MurF:MurG foram incubados durante 1 hora em gelo e centrifugadas a 30.000 rpm utilizando uma ultracentrífuga Beckman a 20 °C com monitoramento da absorbância a 280 nm. Os espectros gerados foram registrados automaticamente em intervalos regulares e analisados utilizando o software Sedfit com o método de análise contínua de distribuição de  $c(s)$  para determinar os coeficientes de sedimentação  $s_{20,w}$ . As proteínas foram analisadas em três concentrações diferentes: 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL e 1 mg/mL.

## 6.8 Termoforese em microescala (MST)

A Termoforese em Micro-escala (MST) é uma técnica poderosa para quantificar a constante de dissociação ( $K_d$ ) entre diferentes moléculas. Esta técnica é baseada no movimento das moléculas de acordo com gradientes de temperatura, na qual depende de diversas propriedades intrínsecas de cada molécula, tais como tamanho, conformação e superfície de hidratação, e portanto, torna extremamente sensível a praticamente qualquer alteração nas propriedades moleculares permitindo uma precisa quantificação dos eventos moleculares independente do tamanho ou natureza das moléculas a serem analisadas (**Fig. 6.5**). A principal característica do MST é a possibilidade de trabalhar próximo das condições nativas de cada molécula, pois não há restrições de tampões. Além disso, esta técnica permite a detecção de uma ampla faixa de constante de dissociação que variam de sub-nanomolar até mili-molar (Wienken et al., 2010; Jerabek-Willemsen et al., 2011).



**Figura 6.5. Termoforese em microescala – Monolith NT-115.** A imagem à esquerda mostra a mensuração do MST feito em capilares. A fluorescência dentro do capilar é excitada e detectada pelo mesmo detector (objetiva óptica 40X), também é utilizado um laser infravermelho para permitir a incidência de calor localizado nas amostras e, deste modo a termoforese das moléculas fluorescentes é detectada através de gradientes de temperatura. A imagem a direita mostra um sinal típico de moléculas que interagem através da termoforese. Inicialmente é detectado um sinal constante de moléculas homogeneamente distribuídas no capilar (estado inicial). Nos primeiros segundos após o laser infravermelho ser ligado observa-se o T-jump (mudança abrupta de temperatura), o que corresponde a uma mudança rápida nas propriedades do fluoróforo devido à rápida mudança de temperatura. Posteriormente, o



movimento das moléculas previamente marcadas com um fluoróforo pode ser detectado (Termoforese). Normalmente, as mudanças de fluorescência são medidas por 30 segundos para permitir um estado estável das moléculas na mesma temperatura. Finalmente, o laser é desligado e ocorre um T-jump inverso (difusão de volta) e as moléculas retornam ao estado inicial. Imagem adapta de “User Manual for the Monolith NT.115 – Nanotemper Technologies”.

### 6.8.1 Marcação das proteínas

Os experimentos para avaliar o  $K_d$  das proteínas foram conduzidos usando o equipamento Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies, Munique, Alemanha). A marcação fluorescente das proteínas foi realizada com corante NT647 (NanoTemper Technologies) para resíduos de lisina.

O corante reativo NT-647-NHS contém N-Hydroxysuccinimide (*NHS*)-éster que reage de forma eficiente com aminas primárias formando assim conjugados proteína:corante altamente estáveis. Esses grupos de aminas primárias são encontrados em resíduos de lisina e geralmente são acessíveis por solventes e, portanto, adequadas para reações que necessitam de marcação. NT-647-NHS tem excitação e emissão de fluorescência de aproximadamente 650 e 670 nm, respectivamente.

Para a marcação das proteínas, primeiramente foram misturados 100 $\mu$ l de uma solução contendo 50  $\mu$ M da proteína purificada no tampão de marcação (HEPES 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM ) com 100  $\mu$ l de fluoróforo NT647 a 100  $\mu$ M e incubadas durante 16 horas a 4 °C no escuro. Os fluoróforos não ligados à proteína foram removidos por cromatografia de filtração em gel em coluna PD-10 (Desalting column – GE) com tampão MST (HEPES 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7,4, DM a 0,17 %) como tampão de corrida. Posteriormente, a concentração real da marcação da proteína foi mensurada usando NanoDrop. Foi utilizado o coeficiente de extinção  $\epsilon_{280}$  de cada proteína e  $\epsilon_{650}$  para o corante NT647. O grau de marcação entre proteína/fluoróforo foi de 1:1.

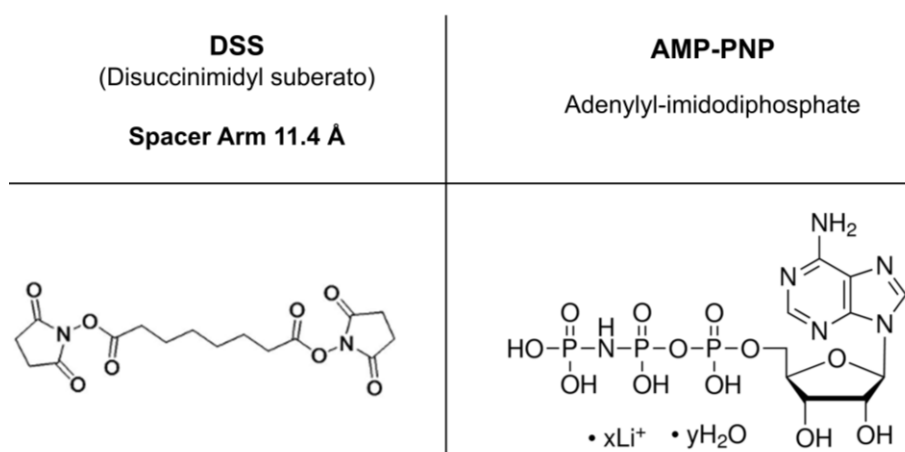
### 6.8.2 Análises de MST

A proteína marcada foi diluída em uma concentração final de 50  $\mu$ M para MurF e 100  $\mu$ M para MurC, MurD, MurE e MurG com tampão MST. A proteína a ser titulada foi adicionada em

tubos de PCR fornecido pela NanoTemper Technologies e procedeu-se a diluição seriada 1:1 (16 vezes) no tampão MST em um volume final de 15 $\mu$ L. Depois foi adicionada a proteína marcada (1:1) para cada tubo contendo o titulante em um volume final de 30  $\mu$ L. Essas amostras foram introduzidas em 16 capilares Standard e inseridos no equipamento de MST (Monolith NT.115) para as análises de termoforese e obtenção dos valores de  $K_d$ . Os sinais de MST foram analisados com MST e intensidade do LED a 20%. O experimento foi realizado a 22°C.

### 6.9 Cross-linking químico utilizando DSS

As proteínas purificadas (50  $\mu$ M/cada) foram incubadas primeiramente com AMP-PNP, o qual é um análogo do ATP que não é hidrolisável e, portanto, a enzima permanece ativa, durante 1 hora no gelo. Depois, foi adicionada a proteína parceira na proporção molar 1:1 e essa solução foi incubada novamente durante 1 hora no gelo. Ao final desta etapa, foi adicionado DSS, crosslinker químico que apresenta um grupo imidoéster com aminas reativas e possui um braço espaçador de 11.4 Å, cuja reação é irreversível por se tratar de uma ligação covalente entre as lisinas que estão na superfície da proteína (**Fig. 6.6**). O DSS foi utilizado na proporção molar de complexo/crosslinker de 1:50. A reação de cross-linking foi realizada durante duas horas a 25 °C. Posteriormente a reação foi interrompida com 100 mM de Tris-HCl pH 8 conforme as instruções do fabricante Thermo Fisher Scientific®. As amostras foram utilizadas para análises em gel de SDS-PAGE e espectrometria de massas.



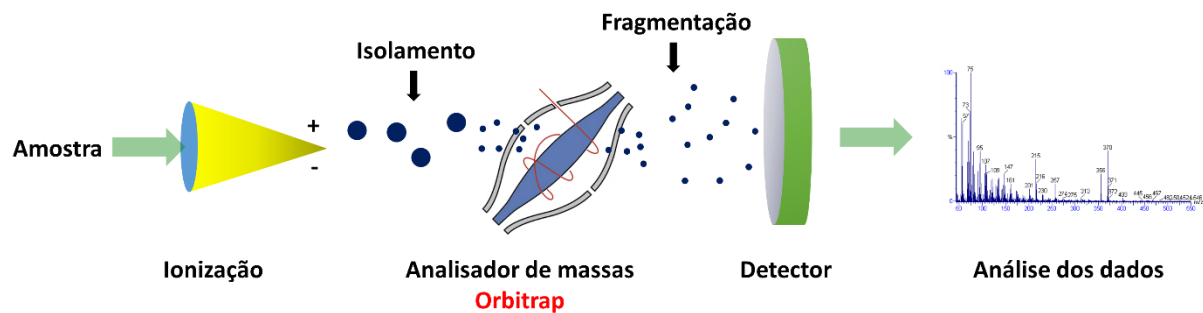
**Figura 6.6.** Fórmula química do DSS e AMP-PNP utilizados nos ensaios de cross-linking químico.

## 6.10 Espectrometria de massas

Espectrometria de massas é uma técnica analítica de elevada acurácia, na qual moléculas em uma amostra complexa de proteínas são convertidas em íons em fase gasosa, que são subsequentemente separados através de um espectrômetro de massas de acordo com sua razão massa ( $m$ ) sobre a carga ( $z$ ),  $m/z$ . Isto permite a determinação das massas exatas das moléculas contidas em uma solução complexa (Paré e Yaylayan, 1997; Bugni, 2017).

Existem duas técnicas de ionização: (1) electrospray (ESI, electrospray ionization) que é caracterizada pela produção de íons através da formação de um spray da solução a ser analisada dentro de um campo elétrico. Essa técnica permite a análise de biomoléculas grandes na sua forma intacta, como proteínas e DNA; e (2) ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI, **m**atrix-**a**ssisted **l**aser **d**esorption/ionization), que produz íons protonados em fase gasosa pela excitação da molécula em análise. A energia para a excitação da molécula é proveniente da absorção da energia do laser pelo composto orgânico presente na matriz. Os íons são produzidos a partir de uma molécula neutra pela remoção ou adição de um elétron ou próton (Bugni, 2017).

Além disso, existem diferentes tipos de analisadores de massas que separam os íons através do campo magnético ou elétrico. O tempo que os íons de diferentes massas levam para migrar certas distâncias pode ser mensurado por um analisador de massas do tipo “tempo de voo” (TOF, time-of-flight). Atualmente, o analisador de massas mais potente é o Orbitrap (**Fig. 6.7**) que é caracterizado pela captura de íons e sua análise é feita através das transformadas de Fourier. Este analisador permite calcular a massa exata da molécula, tem alto poder de resolução e alta sensibilidade (Bugni, 2017).



**Figura 6.7. Esquema ilustrativo do espectrômetro de massas.** Primeiramente a amostra em análise é ionizada através de ESI ou MALDI, em seguida as moléculas são isoladas e passam através de um analisador de massas que pode ser do tipo TOF ou Orbitrap, por exemplo. Então ocorre a fragmentação e detecção dos peptídeos e, finalmente os dados podem ser analisados por diferentes softwares. Imagem inspirada em Bugni (2017).

Uma vez realizado o cross-linking entre os complexos binários, as proteínas purificadas foram submetidas às reações de redução e alquilação das cisteínas utilizando 0.24 mM de DTT (dithiothreitol) em 0.1 M de bicarbonato de amônio durante 30 minutos a 25 °C. Posteriormente, foi realizada a reação de alquilação com 1.4 mM de IAA (iodoacetamida) em 0.1M de bicarbonato de amônio durante 30 minutos a temperatura ambiente, no escuro. Finalmente, as amostras foram digeridas com tripsina 20  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  para uma razão final de 1:20 tripsina/proteína. As proteínas digeridas foram secadas à vácuo e depois reconstituídas com 0.1 % de ácido fórmico. A mistura de peptídeos foi analisada primeiramente no equipamento “NanoAcquity Ultra Performance LC coupled with nanoelectrospray source on Q-TOF Ultima mass spectrometer, Waters” e posteriormente no equipamento “NanoLC PROXEON EASY-nLC II coupled with LTQ Orbitrap Velos ETD mass spectrometer, Thermo Scientific”. O ensaio foi realizado em colaboração com o grupo da Dr. Adriana Paes Leme no Laboratório de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio).

Para análise dos cross-links, os arquivos de dados brutos foram gerados pelo Software Xcalibur versão 2.1 (Thermo Fisher Scientific) e foram convertidos para um formato de picos (mgf) usando o programa Proteome Discoverer versão 1.4. Os arquivos genéricos do Mascot foram analisados usando o software MassMatrix (Xu e Freitas, 2007) para pesquisar automaticamente contra a sequência de cross-links. Os parâmetros para a análise de cross-linking foram a carbamidometilação (+57.021 Da) como modificação fixa, oxidação de metionina (+15.995 Da) como modificação variável e cross-link químico com suberato de disuccinimidilo (DSS)

(138.06808 Da) (Aragão et al., 2012). Os resultados da pesquisa que produziram potenciais peptídeos foram validados manualmente para as séries de íons b e y contendo cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ .

### **6.11 Ensaio de Cristalização de MurG**

Os ensaios de cristalização foram realizados usando o método de difusão em vapor pela técnica de sitting drop com a proteína MurG purificada a 20 mg/ml em tampão contendo 50mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5% glicerol e 2 CMC de DM e utilizando seis kits comerciais: Classics Suite, JCSG, PACT, PEGs-I, Salt Grid, Wizard I&II. Estes ensaios foram realizados na plataforma de cristalização ROBOLAB do Laboratório Nacional de Biociências - LNBio, assim como no Laboratório High-Throughput Crystallisation (HTX) –EMBL (Grenoble).

### **6.12 Cristalização dos complexos binários das enzimas Mur**

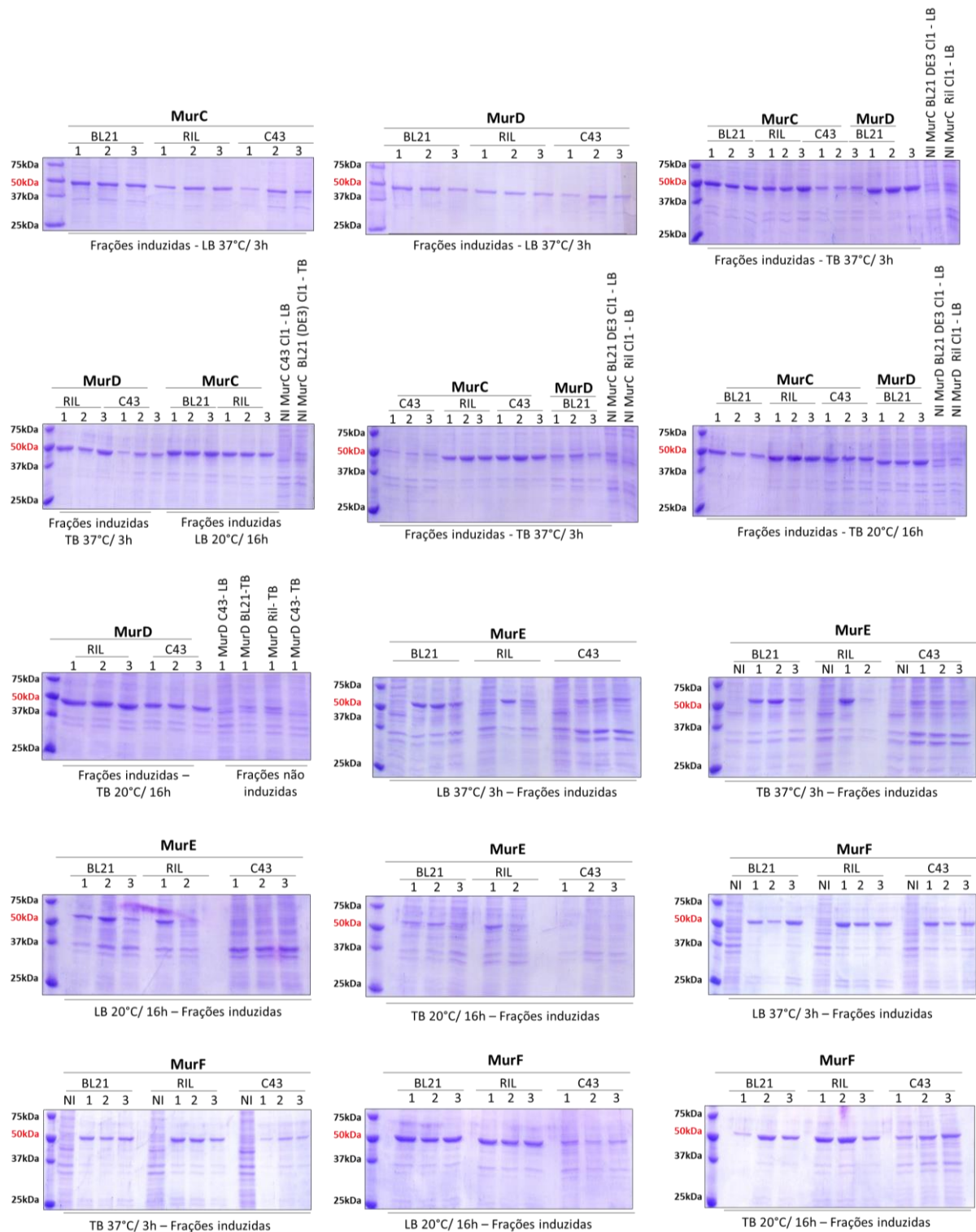
As proteínas purificadas foram incubadas com AMP-PNP durante 1 hora em gelo. Depois, pares de proteínas foram incubadas na razão molar 1:1 e novamente foram incubados no gelo durante 1 hora. Os testes iniciais de cristalização foram realizados na plataforma de High-throughput do Laboratório Nacional de Biociências, RoboLab. Para a formação dos cristais foi utilizado o método de difusão em vapor a 18 °C. Foram testadas diversas soluções de cristalização disponíveis na plataforma do centro.

Os testes de cristalização dos complexos MurC:MurD, MurC:MurF e MurD:MurF também foram realizados no HTX (EMBL-Grenoble). Primeiramente, as amostras purificadas a 5 mg/ml cada foram incubadas com o substrato de cada enzima (1mM) e com AMP-PNP (2mM) e enviadas para a plataforma de cristalização. Foram testados 6 diferentes kits de cristalização. Foi utilizado o método sitting drop a 18 °C. Os substratos de cada enzima foram fornecidos pela Dra. Martina Hrast (University of Ljubljana, Faculty of Pharmacy, Slovenia). Substrato de MurC: UDP-N-acetilmuramoil (UM); Substrato de MurD: UDP-N-acetilmuramoil-Alanina (UMA); Substrato de MurF: UDP-N-acetilmuramoil-3-ácido diaminopimélico (UM-3-DAP).

## 7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.1 Expressão e purificação das enzimas Mur de *Streptococcus pneumoniae*

Os testes de expressão das enzimas Mur mostraram que as proteínas podem ser expressas em diferentes condições de cultura. No entanto, as cepas de *E. coli* mais apropriadas para a expressão foram BL21 (DE3) e BL21 Ril. A cepa C43, no geral, não apresentou níveis altos de expressão e por esse motivo continuamos nosso protocolo com as cepas BL21 (DE3) e BL21 Ril. Para MurC, MurE e MurF utilizamos o clone número 1 de BL21 (DE3), em meio LB. As culturas bacterianas foram induzidas com 1 mM de IPTG durante 16 horas a 20 °C. Por outro lado, para MurD foi escolhido o clone número 2 de BL21 Ril, foi utilizado o meio TB e as culturas foram induzidas com 1 mM de IPTG durante 16 horas a 20 °C. Na **Figura 7.1** podemos observar as respectivas bandas das proteínas-alvo em gel de SDS PAGE no tamanho aproximado de 50 kDa (identificado em vermelho).



**Figura 7.1. Teste de expressão de MurC, MurD, MurE e MurF.** O experimento foi realizado usando três clones diferentes de cada bactéria. Os géis SDS-PAGE 15% mostram níveis mais altos de expressão das proteínas em BL21 (DE3) e BL21 Ril.

As proteínas MurC, MurD e MurF são altamente solúveis e estáveis. No entanto, a purificação de MurE exigiu condições mais rigorosas, possivelmente devido à hidrofobicidade ou à natureza parcialmente insolúvel dessa proteína. Embora MurE esteja localizada no citoplasma da célula, sua purificação foi possível somente com a utilização de detergentes para manter sua solubilidade. Apesar deste tratamento, foi observada uma certa degradação intrínseca da proteína durante o processo de purificação.

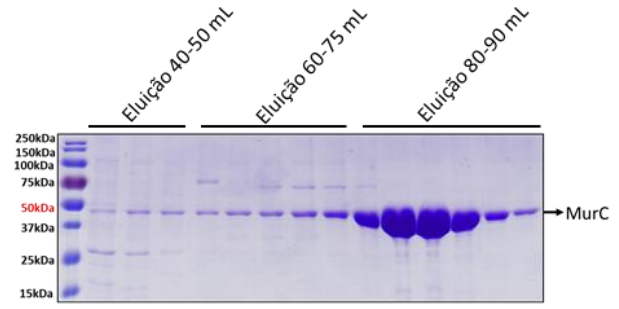
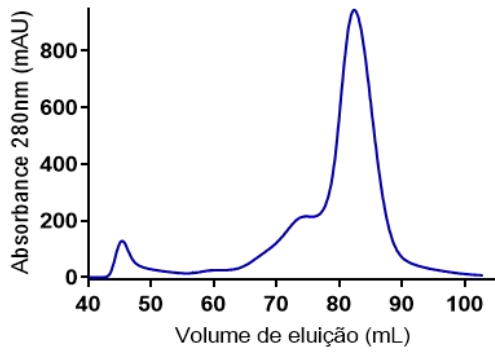
## **7.2 Estados oligoméricos das proteínas MurC, MurD, MurE, MurF e MurG de *Streptococcus pneumoniae***

Durante a purificação das enzimas Mur em coluna de filtração em gel (**Fig. 7.2**) foi observado o comportamento oligomérico destas proteínas e por esse motivo foram realizados ensaios de SEC-MALS/OMNISEC para caracterizar o tamanho dos oligômeros formados em solução.

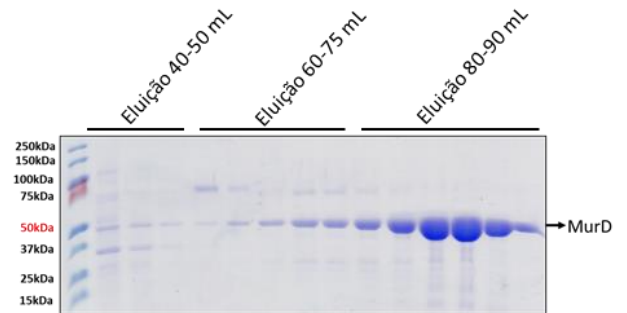
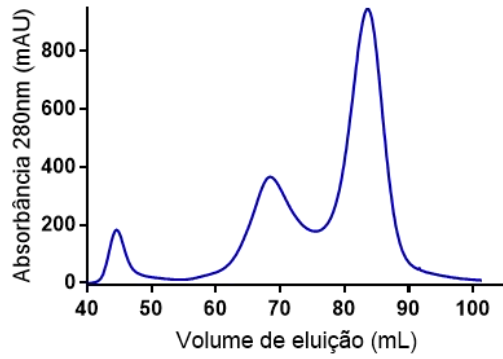
A oligomerização é uma propriedade comum das proteínas e está presente em todos os sistemas biológicos. É estimado que pelo menos 35% de todas as proteínas nas células são oligoméricas. Além disso, algumas proteínas somente apresentam atividade quando estão na forma oligomérica. Portanto, a modulação desse processo de oligomerização é crucial para o desenvolvimento de novas estratégias de inibidores devido ao papel biológico que apresentam na célula (Gabizon e Friedler, 2014).



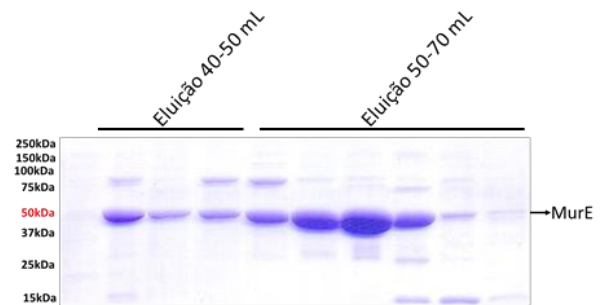
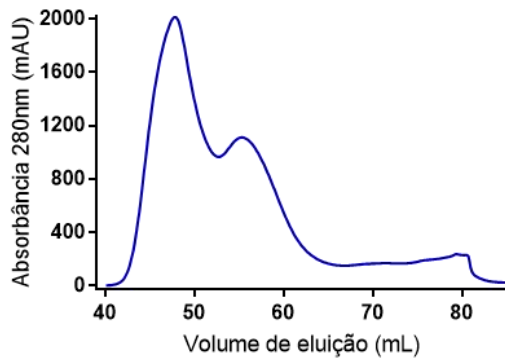
**A**



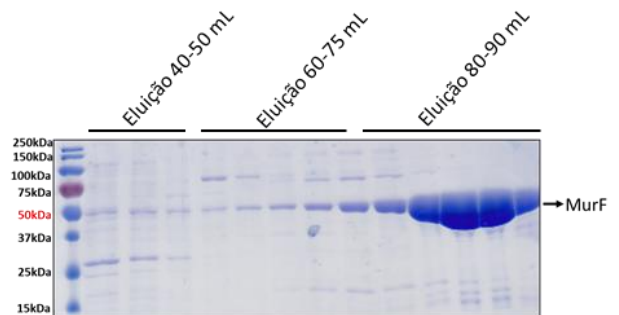
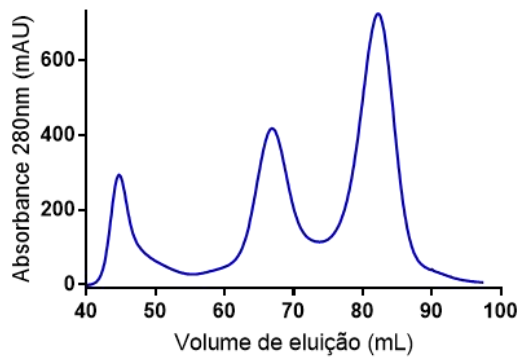
**B**



**C**

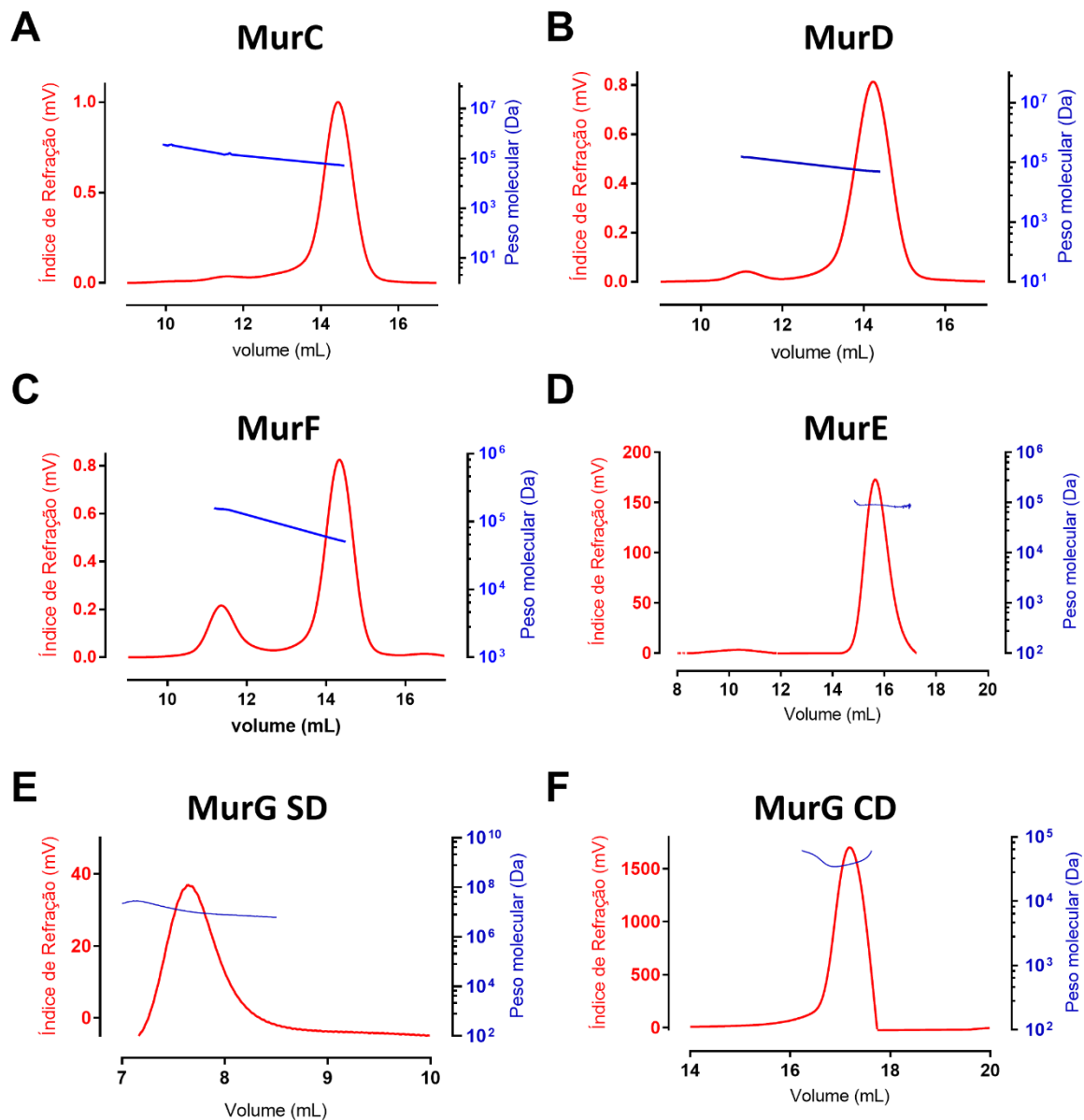


**D**



**Figura 7.2.** Purificação de enzimas MurC, MurD, MurE e MurF de *S. pneumoniae* através de cromatografia de filtração em gel em coluna HiLoad Superdex 200 16/600. À esquerda, são mostrados os perfis cromatográficos de cada proteína. À direita, os géis SDS-PAGE mostram as frações eluídas de cada proteína-alvo.

Os resultados das análises individuais das enzimas Mur através das técnicas SEC-RALS/LALS e SEC-MALS confirmaram que essas enzimas formam oligômeros em solução (**Fig 7.3**). Além disso, o comportamento oligomérico dessas proteínas é dependente da concentração proteica, como por exemplo, no caso de MurC na qual em baixas concentrações apresenta somente a forma monomérica, embora em concentrações acima de 2mg/mL seja possível observar a formação de diferentes oligômeros (**Tabela 7.1**).



**Figura 7.3. SEC-RALS/LALS e SEC-MALS das enzimas Mur de *Streptococcus pneumoniae*.** (A) Enzima MurC, (B) Enzima MurD, (C) Enzima MurF, (D) Enzima MurE, (E) Enzima MurG sem o detergente DM (SD) e (F) Enzima MurG com detergente DM a 2CMC (CD). O perfil das análises mostra o índice de refração em vermelho e o peso molecular em azul. As amostras MurC, MurD e MurF (50  $\mu$ L/cada) foram injetadas em coluna Superdex 200 10/300 GL acoplada aos detectores de UV, RI e LS em SEC-MALS. As enzimas MurE e MurG foram injetadas em coluna Superose 6 10/300 GL acoplada aos detectores RALS e LALS (OMNISEC).

No gráfico de MurC (**Fig. 7.3a**) é possível observar claramente somente um pico de índice de refração com eluição de aproximadamente 14 mL (chamado de Pico 3 na tabela 4). Porém, as análises mostraram que também existem dois picos de menor intensidade, o primeiro que elui a 10 mL (Pico 1) e o segundo a 11 mL (Pico 2). Os picos 1 e 2 estão presentes somente em experimentos nos quais a concentração inicial de MurC empregada foi superior a 2 mg/mL. Já para MurD (**Fig. 7.3b**) e MurF (**Fig. 7.3c**) observamos dois picos, também de intensidades diferentes: o primeiro que elui a 11 mL (Pico 1) e o segundo a 14 mL (Pico 2). A análise da enzima MurE (**Fig. 7.3d**) mostrou um único pico e a proteína encontra-se somente no estado dimérico.

A proteína MurG (**Fig. 7.3 e/f**) pode se apresentar em diferentes estados oligoméricos dependentes da concentração de detergente, sendo que as análises através do SEC-RALS/LALS mostraram que a proteína sem detergente (**Fig. 7.3e**) forma grandes agregados ou oligômeros, embora quando purificada com 2CMC de DM se apresenta como um monômero.

A agregação de MurG *in vitro* na ausência de detergente suporta a hipótese da presença de uma região hidrofóbica que, *in vivo* poderia ser responsável pela ligação com a membrana plasmática (Ha et al., 2000; Mohammadi et al., 2007), assim como é sugerido para MurG de *E. coli* (Hu et al., 2003). Esta região hidrofóbica pode também ser responsável pela associação de monômeros de MurG em formas de maior peso molecular, tais como oligômeros e/ou agregados.

**Tabela 7.1** Resultados de SEC-MALS e SEC- RALS/LALS das enzimas Mur em diferentes concentrações

Proteína	Concentração	Peso Molecular (kDa)			Polidispersidade		
		Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 1	Pico 2	Pico 3
MurC	2 mg/ml	-	-	51.3 (±2.8%)	-	-	1.001 (±4.0%)
	10 mg/ml	286.7 (±5.3%)	130.5 (±2.7%)	52.9 (±3.4%)	1.013 (±7.5%)	1.002 (±3.8%)	1.002 (±4.8%)
	25 mg/ml	349.5 (±5.8%)	153.7 (±4.0%)	55.9 (±2.9%)	1.001 (±8.2%)	1.002 (±5.6%)	1.001 (±4.1%)
MurD	2 mg/ml	-	182.3 (±7.5%)	50.9 (±3.1%)	-	1.003 (±10.7%)	1.002 (±4.3%)
	10 mg/ml	-	154.8 (±1.7%)	50.1 (±3.6%)	-	1.001 (±2.4%)	1.004 (±4.9%)
	25 mg/ml	-	149.9 (±1.7%)	50.8 (±2.5%)	-	1.000 (±2.5%)	1.001 (±3.6%)
MurE	5 mg/mL	-	97.5	-	-	1.007	-
MurF	2 mg/ml	-	152.7 (±2.1%)	52.9 (±3.6%)	-	1.000 (±2.9%)	1.003 (±5.0%)
	10 mg/ml	-	153.9 (±2.0%)	52.8 (±4.2%)	-	1.001 (±2.8%)	1.004 (±5.7%)
	25 mg/ml	-	153.5 (±1.7%)	53.7 (±3.3%)	-	1.000 (±2.4%)	1.002 (±4.6%)
MurG SD	5 mg/ml	885.0	-	-	1.006	-	-
MurG CD	5 mg/ml	-	-	43.0	-	-	-

Merten et al., (2012) mostraram através de ensaios de cross-linking e espalhamento de luz dinâmico (DLS) que a proteína LptA, responsável pelo transporte do LPS em bactérias Gram-negativas, como por exemplo *E. coli*, tende a formar oligômeros que são dependentes da concentração da proteína em solução. Provavelmente, o comportamento oligomérico desta proteína está envolvido na execução do transporte de LPS através da membrana externa de bactérias Gram-negativas, aumentando assim sua virulência contra a célula hospedeira.

Deste modo, acreditamos que a formação de oligômeros pelas enzimas Mur tenha uma importante relevância no contexto biológico para a formação dos precursores do peptidoglicano, uma vez que a oligomerização é um processo de adaptação das proteínas para produzir redes de interações e assim facilitar os processos celulares (Kimata-Arigo et al., 2013).

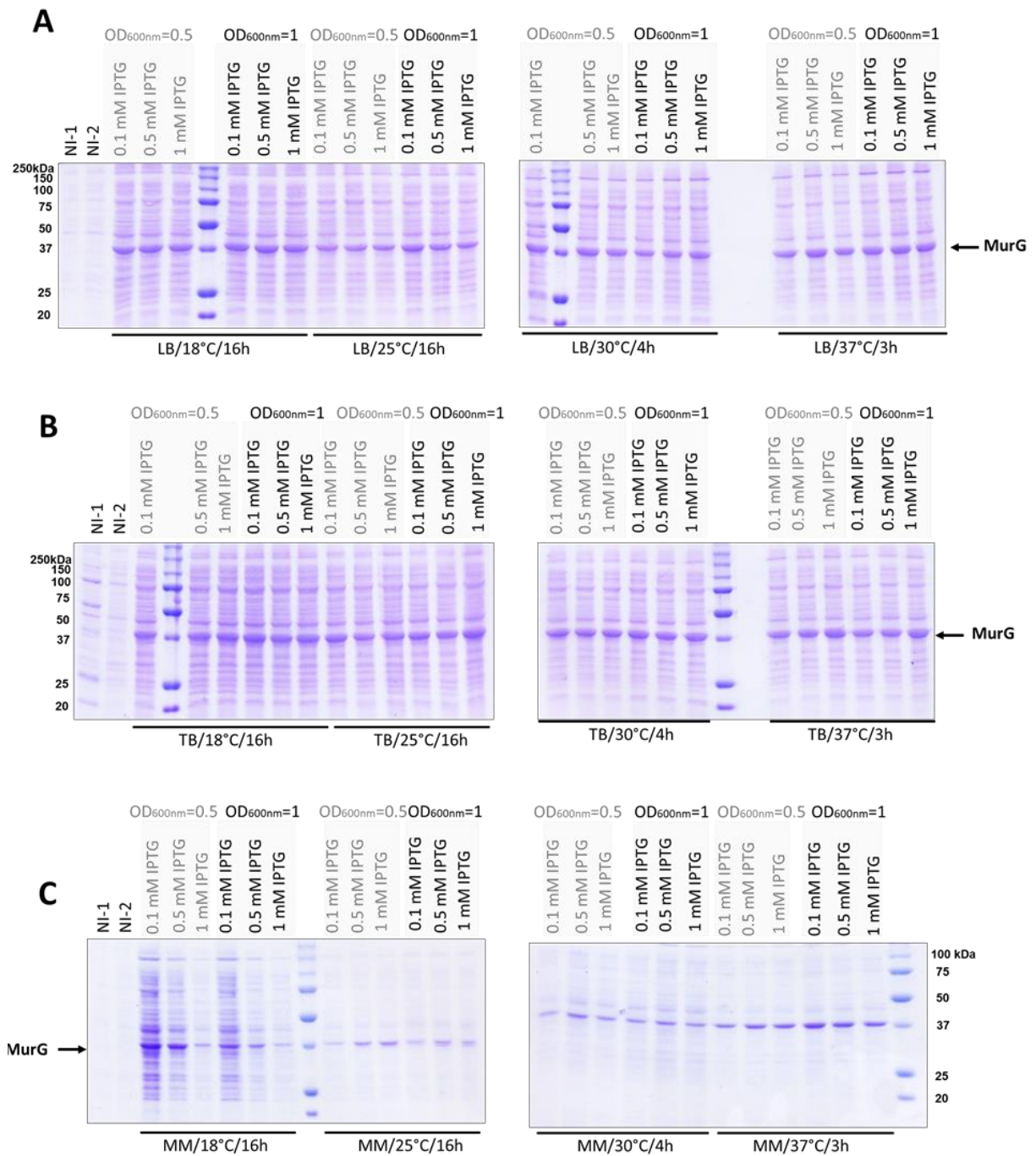
Este fato é essencial para os processos de divisão celular em bactérias, já que é um processo dinâmico e que exige a coordenação de vários complexos celulares em um curto espaço de tempo (Typas et al., 2015).

Além disso, também acreditamos que o comportamento oligomérico destas proteínas seja um mecanismo de ação para que possam interagir entre elas e, desta forma otimizar a produção dos precursores do peptidoglicano no citoplasma durante as etapas de alongação e divisão celular. Muitos autores mostraram que as enzimas Mur podem interagir com outras enzimas envolvidas na síntese do peptidoglicano (White et al., 2010; Gaballah et al., 2011; Favini et al., 2013; Kouidmi et al., 2014).

No entanto, atualmente não existem dados na literatura que mostrem a interação proteína-proteína direta entre as ligases Mur (Munshi et al., 2013; Kouidmi et al., 2014), o qual representa uma verdadeira lacuna para a síntese do peptidoglicano. Deste modo, isto se torna especialmente importante para a compreensão detalhada do processo biológico da formação do Lipideo II, e também para o desenvolvimento de novos fármacos que possam bloquear este processo essencial para a célula. Sendo assim, e apoiados pelos resultados acima que indicaram que as enzimas Murs formam oligômeros, os quais são dependentes da concentração de proteína utilizada, continuamos os nossos estudos caracterizando a interação entre as enzimas Mur individuais e também com MurG, enzima proposta como sendo um alicerce para todas as outras enzimas Mur citoplasmáticas.

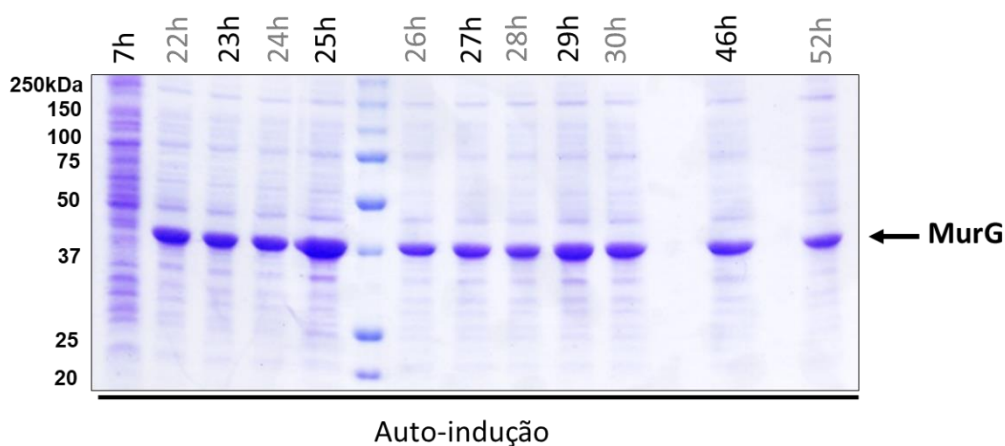
### **7.3 Caracterização de MurG de *Streptococcus pneumoniae***

Os ensaios de expressão da proteína MurG foram realizados de acordo com as condições descritas nos materiais e métodos. Todas as amostras foram padronizadas com a mesma OD<sub>600</sub> para analisar os resultados em gel de poliacrilamida (**Fig. 7.4**).



**Figura 7.4. Teste de expressão da proteína MurG de *S. pneumoniae*.** Para este ensaio foi utilizada a cepa de expressão BL21 Star nos meios de cultura LB, TB e meio mínimo com temperaturas e tempos variados. Também foram testadas três concentrações de IPTG em tempos diferentes da cultura bacteriana.

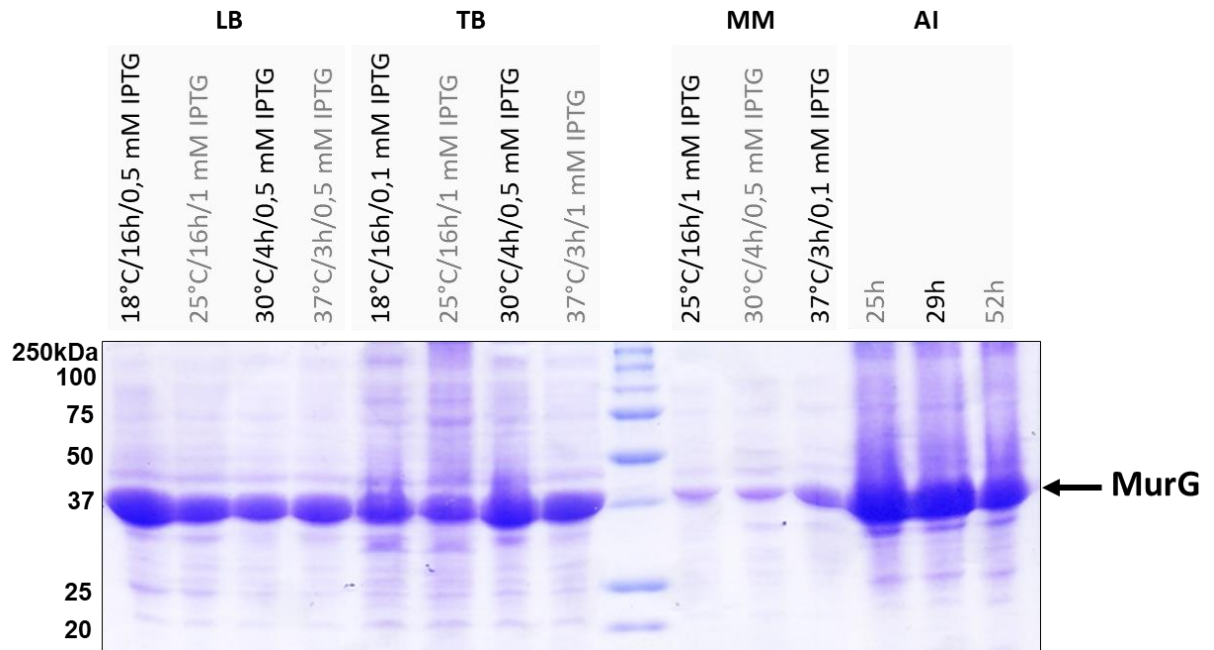
Depois de realizar diferentes testes de expressão foi observado que o meio de auto-indução foi o mais apropriado para a expressão de MurG, pois diferente dos outros meios de cultura utilizados, esse meio permitiu a expressão de grandes quantidades da proteína recombinante sem a interferência de muitos contaminantes. Somente após 20 horas de crescimento bacteriano as células iniciaram a produção de MurG. Como padronização do ensaio de expressão utilizamos o tempo de indução de 25 horas (**Fig. 7.5**).



**Figura 7.5.** Teste de expressão de MurG de *Streptococcus pneumoniae* utilizando meio de auto-indução. Os resultados analisados em gel de SDS-PAGE mostraram que, após 22 horas de auto-indução a proteína recombinante começou a ser expressa por BL21 Star.

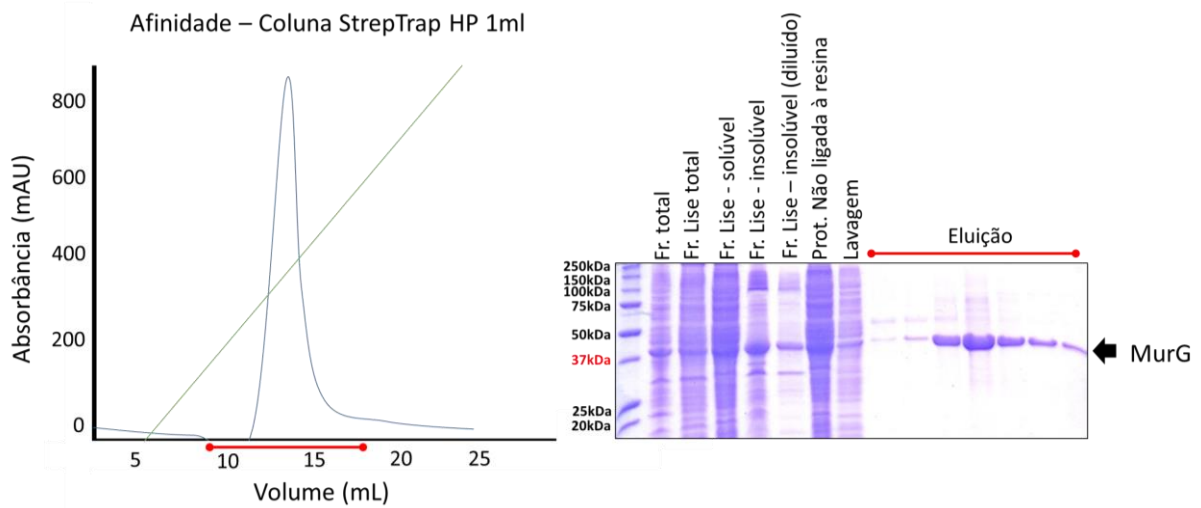
Por outro lado, a análise da fração insolúvel dos testes de expressão de MurG através de gel de poliácridamida (**Fig. 7.6**) mostraram que uma parte significativa da proteína permanece na fração insolúvel, uma vez que MurG está associada com a superfície citoplasmática da membrana celular.



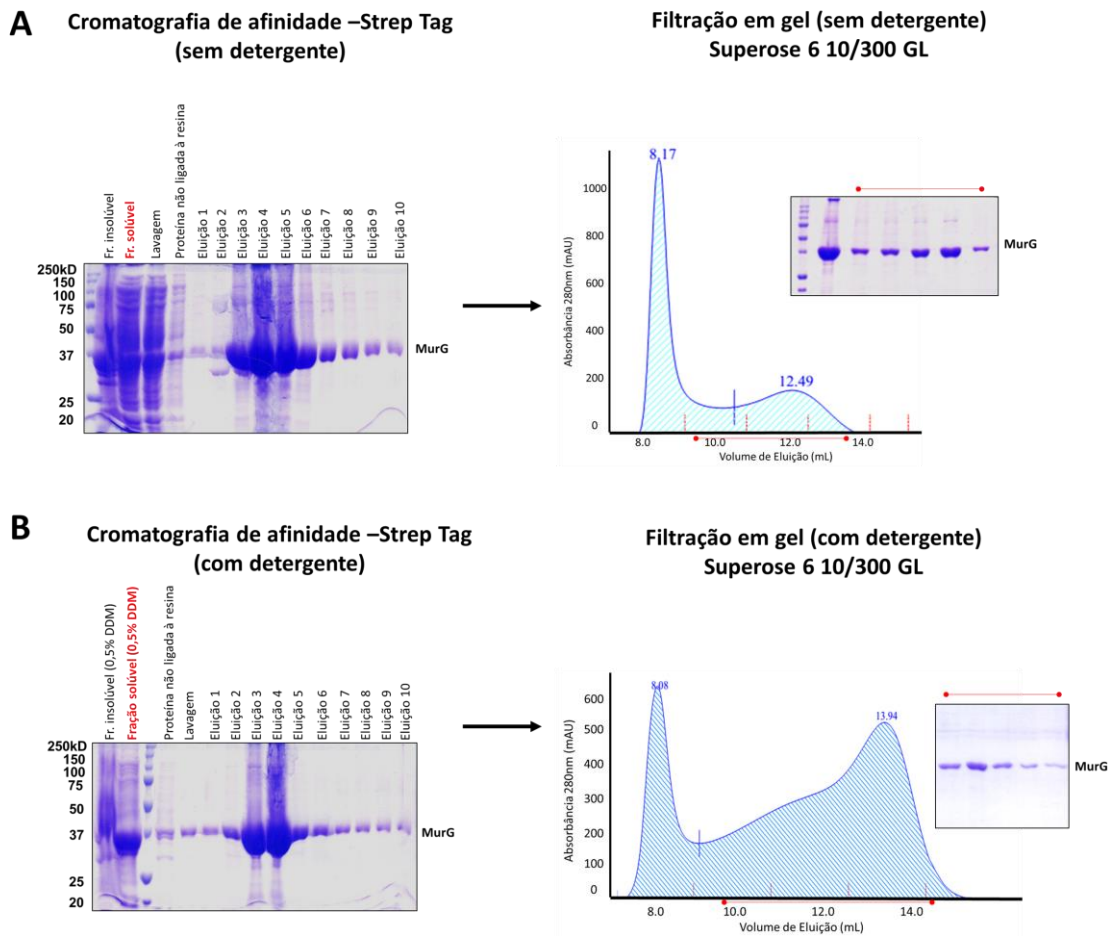


**Figura 7.6.** Análise das frações insolúveis de MurG de *Streptococcus pneumoniae* nos diferentes métodos de expressão utilizados previamente.

Após a análise dos resultados obtidos na padronização do ensaio de expressão de MurG foi necessária a utilização de detergentes para a extração da proteína da membrana plasmática, para isto utilizamos dois detergentes diferentes: DDM e DM. A proteína foi purificada utilizando coluna de afinidade StrepTrap (**Fig. 7.7**) e coluna de exclusão molecular Superose 6 10/300 GL. Além disso, diferentes valores de CMC (Concentração Micelar Crítica) de cada detergente foram testadas com a finalidade de caracterizar os estados de oligomerização de MurG (**Fig. 7.8 e 7.9**).

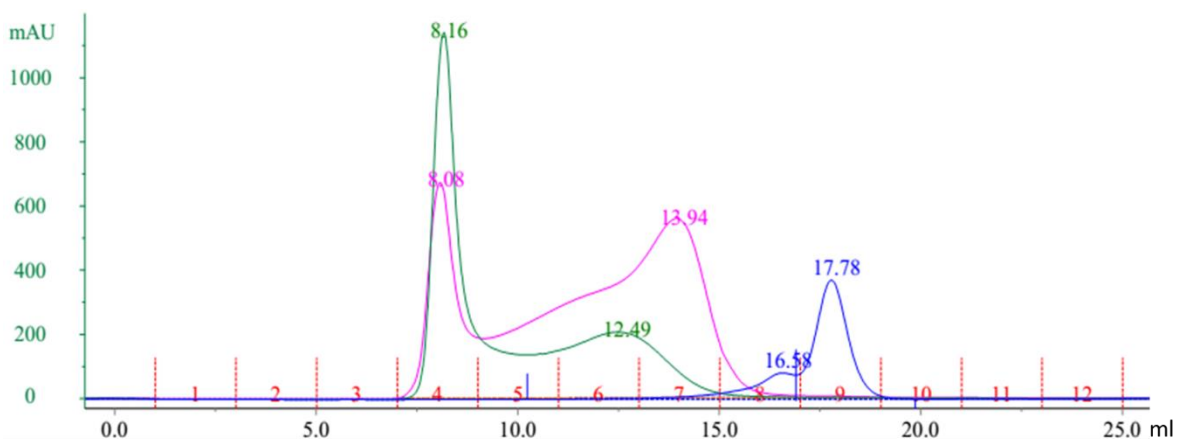


**Figura 7.7.** Purificação de MurG de *S. pneumoniae*. A primeira imagem mostra o perfil cromatográfico da proteína purificada por coluna Strep-Trap e no lado direito é mostrado o gel de SDS-PAGE correspondente aos passos de purificação.



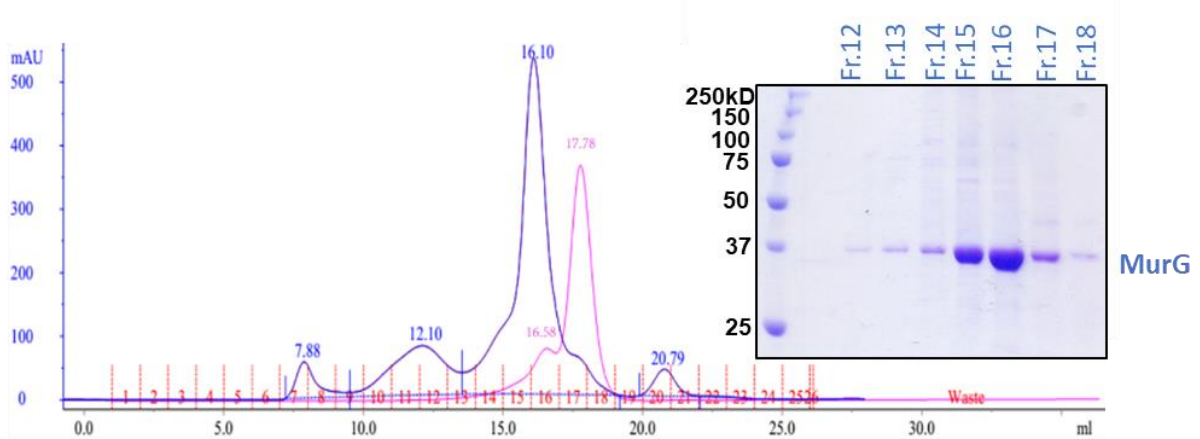
**Figura 7.8.** Abordagens de purificação de MurG. Na primeira abordagem (A) foi utilizado tampão sem detergente enquanto que na segunda abordagem foi realizada a purificação da

fração insolúvel utilizando 0,5 % de DDM. É possível observar que existe uma grande quantidade de proteína sendo eluída no volume morto da coluna ( $\approx 8$  mL) em ambas as imagens, porém a **imagem B** mostra que o volume de eluição de MurG sofre um deslocamento para a direita indicando a presença de formas menores da proteína na presença de detergente.



**Figura 7.9. Superimposição dos perfis cromatográficos das purificações de MurG com e sem detergente.** Purificação de MurG sem detergente (verde). Purificação de MurG com detergente (rosa). Ovalbumina ( $\approx 40$  kDa) foi utilizado como controle para estimar a massa molecular de MurG (azul).

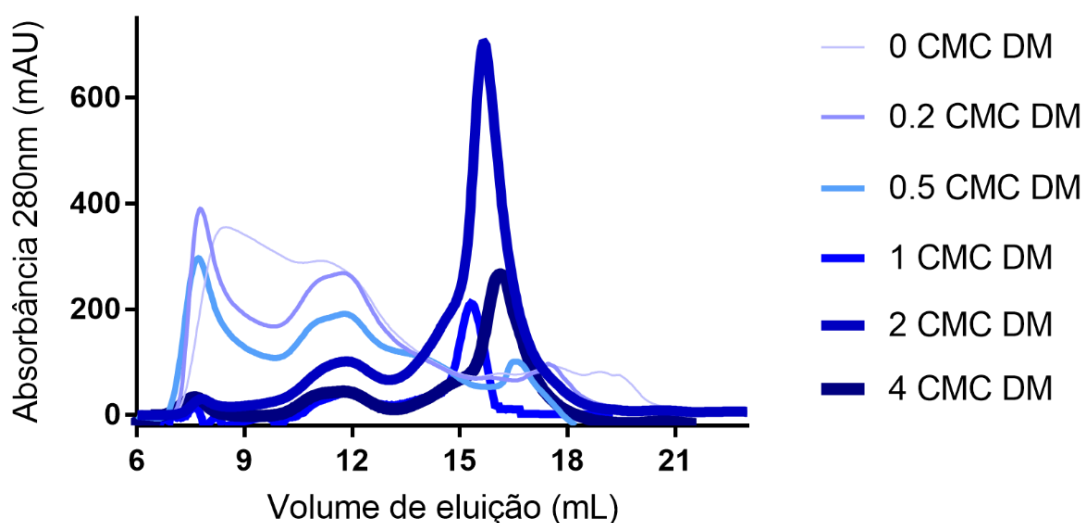
Deste modo, concluímos que com a utilização de DDM para a solubilização da proteína durante a fase inicial de extração da proteína da membrana foi mais eficiente e, além disso, foi possível observar a menor quantidade da proteína no volume morto da coluna de filtração em gel (**Fig 7.10**).



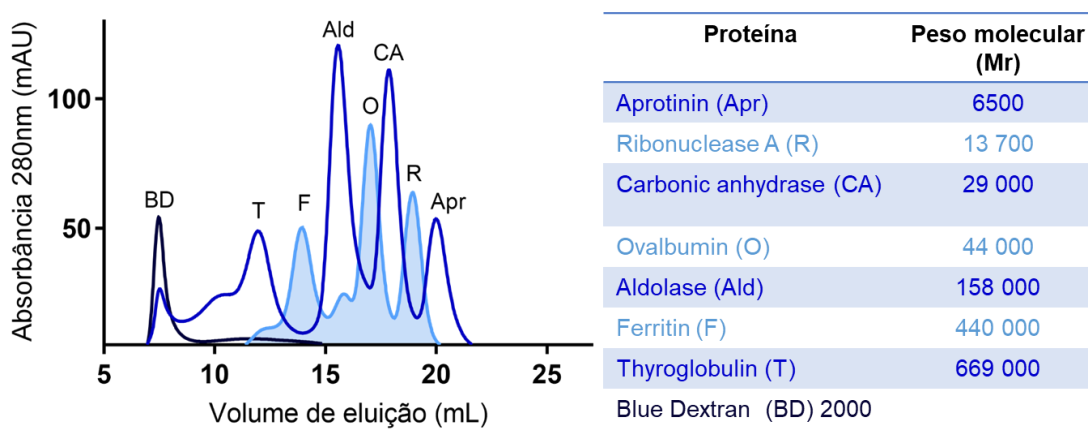
**Figura 7.10.** Purificação de MurG através de cromatografia de exclusão molecular em coluna Superose 6 10/300. Ovoalbumina foi utilizada como controle para estimar o peso molecular da proteína alvo. MurG (azul) Ovalbumina (rosa).

Comparando o perfil cromatográfico da purificação de MurG (**Fig. 7.11a**) em relação à curva de calibração da coluna (**Fig. 7.11b**), podemos observar três picos, o primeiro correspondente ao volume morto da coluna, ou seja, neste caso a proteína está agregada. O segundo pico apresenta uma massa molecular correspondente aos valores de Tireoglobulina (669 kDa) e Ferritina (440 kDa). O terceiro pico corresponde ao monômero de MurG. Neste caso, podemos afirmar que o estado de oligomerização de MurG é inversamente proporcional à quantidade de detergente usado no tampão de purificação. Assim, é possível estabelecer a relação entre detergente e estado de oligomerização, ou seja, quanto mais detergente é usado na purificação menos oligômeros de MurG são formados em solução. A situação inversa também é verdadeira, ou seja, quanto menor a concentração de detergente no tampão maior é a concentração de MurG na forma oligomérica. Porém, mesmo que a concentração de detergente seja alta, por exemplo 4 CMC, não é possível extinguir as formas oligoméricas de MurG.

A



B



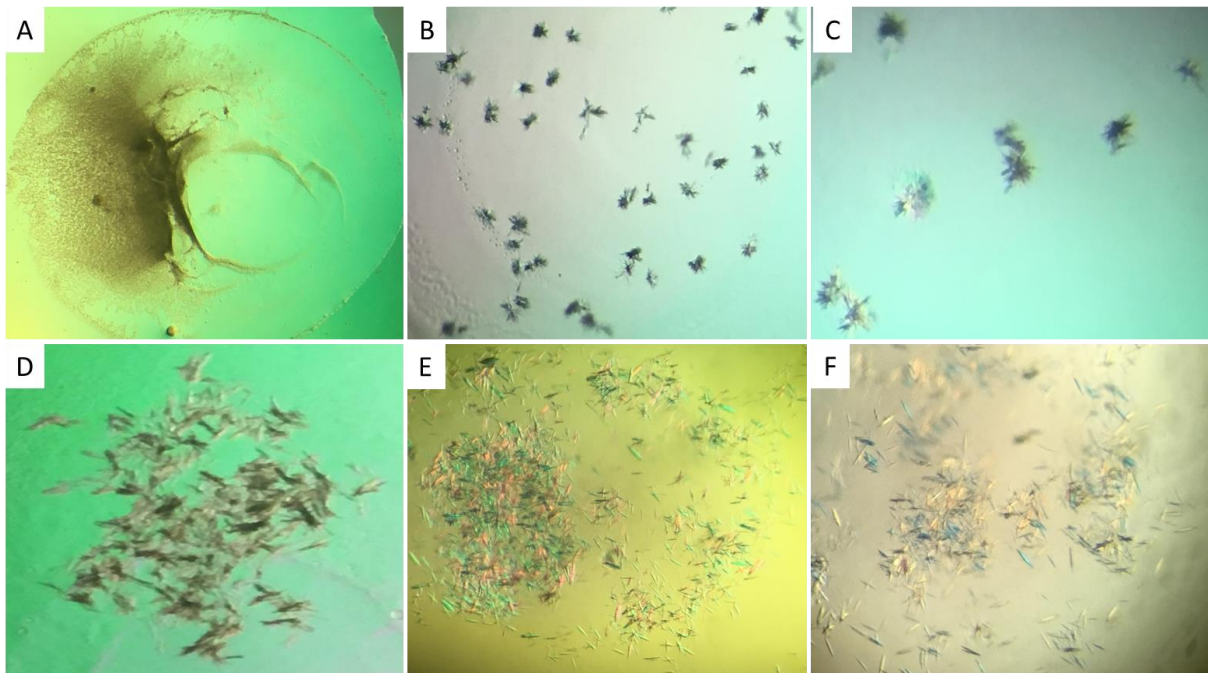
**Figura 7.11.** Gel filtração analítica da proteína MurG utilizando diferentes concentrações de detergente (DM): 0.2 CMC, 0.5 CMC, 1 CMC, 2 CMC e 4 CMC. Também foi feita a purificação sem detergente (Imagem A). A imagem (B) mostra as curvas de calibração da coluna Superose 6 10/300 GL (volume morto da coluna  $\approx$  8 mL).

A observação da multimerização de MurG maiores que dímeros é inédita, pois até o presente momento MurG foi identificada somente como monômero e dímero através da cristalografia de raios-X (Ha et al., 2000; Brown et al., 2013). No entanto, outras proteínas pertencentes à família das glicosiltransferases mostraram a capacidade de multimerização,

podendo ser dímeros ou grandes oligômeros (Evans and O'reilly, 1998; Peters et al., 1989; Ariga, 2011). A habilidade de MurG de se auto associar pode ser considerada um processo dinâmico, importante para a montagem do mega-complexo entre as ligases Mur e isso pode ser explorado como um mecanismo regulatório espacial e temporal do controle celular para a síntese do peptidoglicano. O comportamento de oligomerização pode corresponder a diferentes estados de ativação da enzima, embora sejam necessários mais estudos com a finalidade de compreender a relevância biológica estrutural e funcional para a formação desses grandes oligômeros e sua dinâmica.

#### 7.4 Cristalização de MurG

Depois que MurG foi purificada através de cromatografia de filtração em gel, a proteína foi concentrada a 20 mg/ml e utilizada para ensaios de cristalização na plataforma RoboLab (LNBio), utilizando o método sitting drop. Depois de analisar os resultados da triagem, selecionamos algumas condições experimentais para realizar o refinamento manual (**Fig. 7.12**).



**Figura 7.12.** Refinamento manual dos cristais de MurG de *S. pneumoniae* pelo método hanging drop em placas de 24 poços. (A) Cristais de MurG usando uma solução de 0,2 M de formato de magnésio, (B) 0,3 M de formato de magnésio, (C) 0,4 M de formato de magnésio; (D) 0,5 M de formato de magnésio, (E) 0,8 M de formato de magnésio e (F) 1 M de formato de magnésio. As placas de cristalização foram incubadas a 18°C.

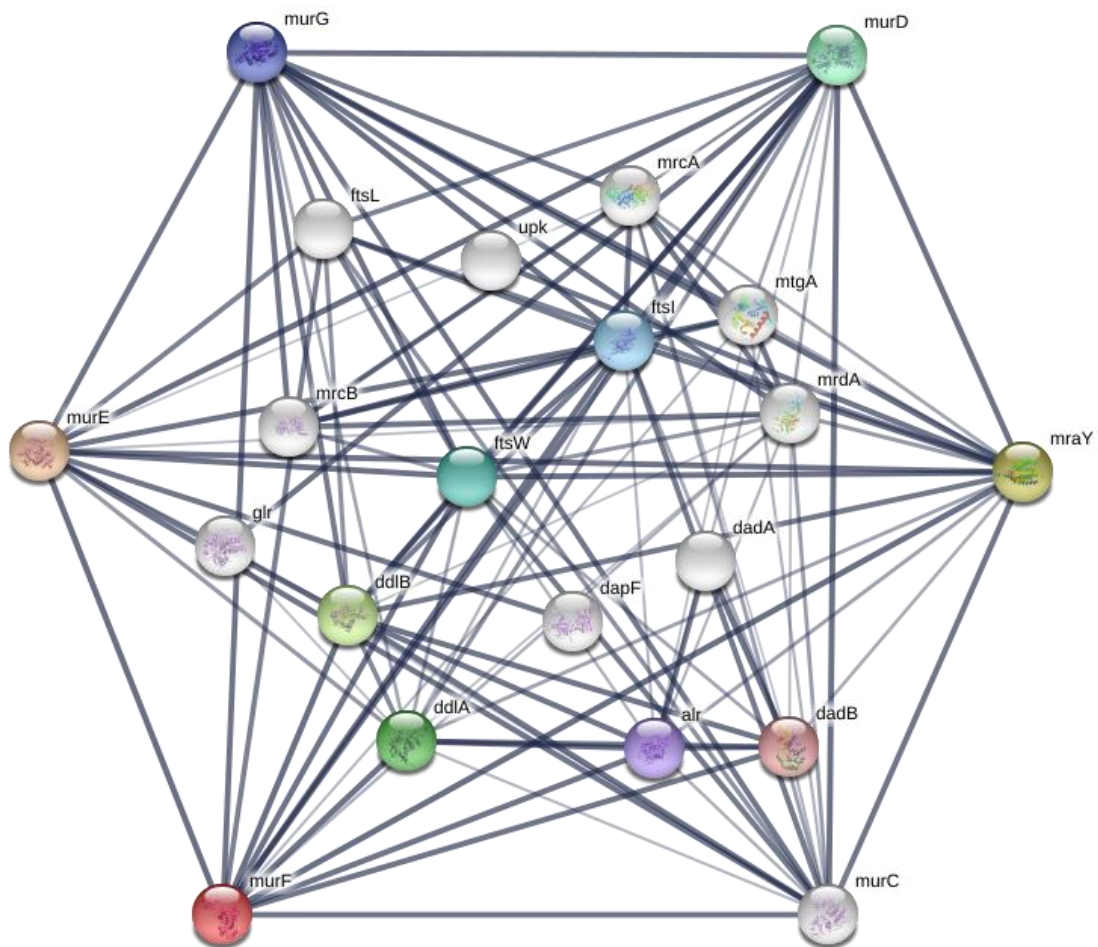
Os cristais de MurG apresentados na figura acima cresceram em aproximadamente 14 dias após a realização das placas de cristalização a 18 °C. A qualidade dos cristais foi substancialmente melhorada com o aumento da concentração de formato de magnésio até 1 M, mas permaneceram demasiadamente pequenos para serem difratados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) devido ao tamanho do feixe de luz da linha MX2 não ser compatível com cristais muito pequenos. Por este motivo, os cristais de MurG (**Fig. 7.12f**) foram enviados para o European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) de Grenoble, França. A coleta dos cristais foi realizada e o padrão de difração foi compatível com o padrão de difração de proteínas, embora tenha difratado com aproximadamente 4 Å e não tenha sido possível a análise dos dados.

Para a otimização dos cristais de MurG foram utilizadas diferentes soluções, tais como tampão (HEPES pH 6 – 7.5), sais (0.2M de Sulfato de magnésio e cloreto de sódio) agentes precipitantes (PEG 400 e PEG 8000 em uma faixa de 15 a 20%) e aditivos (detergentes DM e DDM) juntamente com a solução inicial de 1M de formato de magnésio. Mesmo com essas otimizações ainda não foi possível obter cristais únicos e maiores. Devido a isto, o processo de otimização ainda está em fase de desenvolvimento. Estão sendo testadas diferentes concentrações de proteína, assim como a proporção dos volumes finais entre solução de cristalização e proteína. Além disso, as placas de cristalização foram incubadas em diferentes temperaturas com a finalidade de diminuir a taxa de nucleação dos cristais.

Os processos de padronização de purificação de MurG com os diferentes protocolos foram realizados com sucesso. Foi possível observar que o estado de oligomerização da proteína é dependente da concentração final de detergente na solução. Sendo assim, as diferentes formas de MurG foram testadas utilizando técnicas biofísicas diferentes para analisar a capacidade de interação com as ligases Mur. Estes resultados são essenciais para a compreensão e caracterização de um mega-complexo formado pelas proteínas Mur no citoplasma bacteriano.

## 7.5 Interações proteína – proteína

As interações entre proteínas desempenham importantes funções nas células das bactérias. A síntese do peptidoglicano é um processo dinâmico e temporário que exige a participação de diversas enzimas que formam uma rede complexa de interação proteína-proteína para que ocorra a divisão e alongação da bactéria (**Fig. 7.13**).



**Figura 7.13. Esquema ilustrativo da rede de interações entre diversas proteínas responsáveis pela síntese do PG.** Através desse esquema as proteínas MurG, MraY e MurC-F são identificadas interagindo umas com as outras. Modelo gerado pelo software STRING (versão 10.5) através dos índices de confiança, os quais são baseados em dados experimentais, fusão de genes, vizinhança dos genes e banco de dados.

Uma vez que as proteínas foram purificadas, iniciamos a análise dos complexos binários através de filtração em gel em coluna analítica Superdex 200 10/300 GL, com o

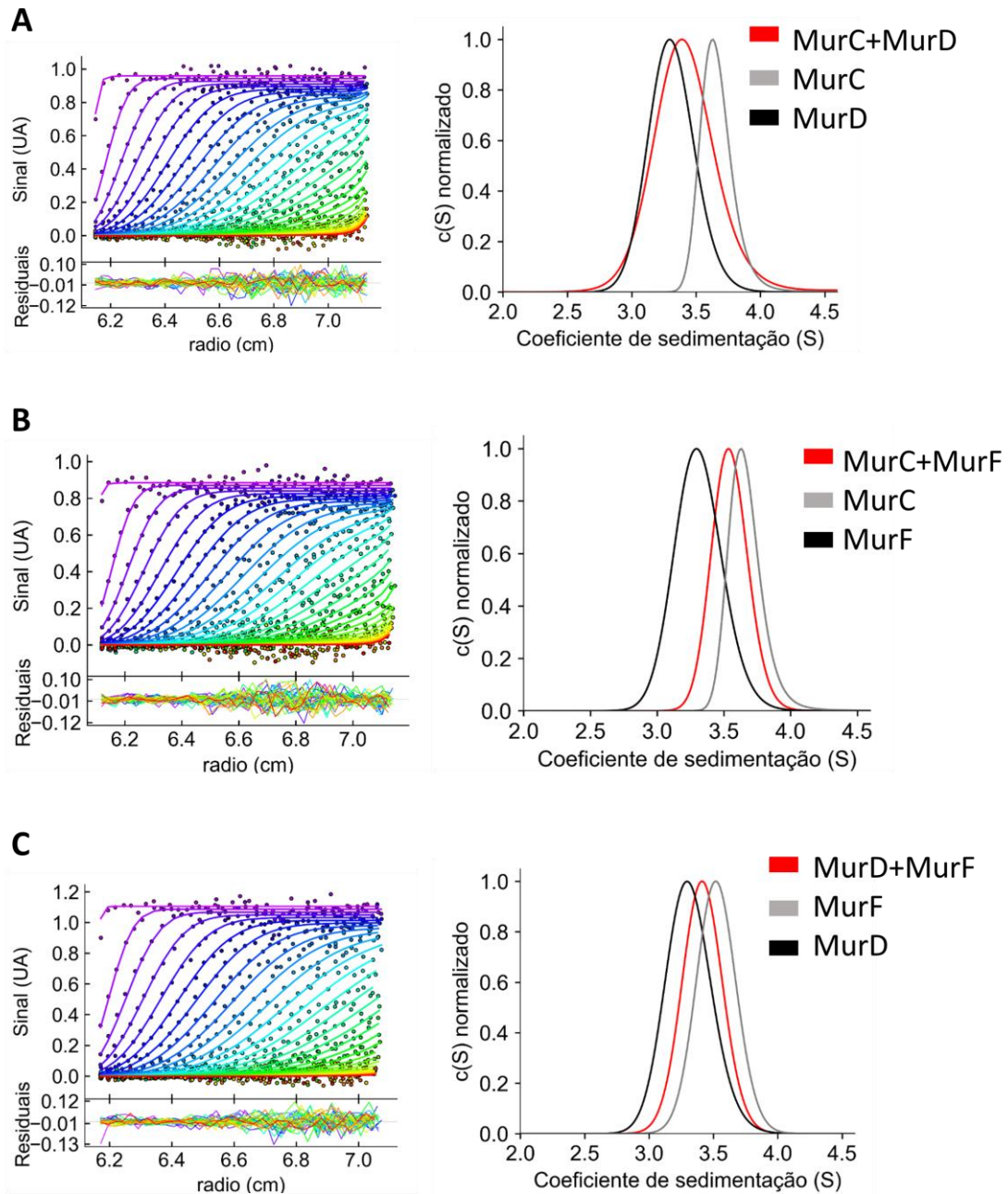


objetivo de detectar a formação dos complexos. Depois de várias tentativas usando diferentes condições, não conseguimos obter nenhum complexo à medida que as proteínas continuavam eluindo no mesmo volume. No entanto, a falta de formação de um complexo das enzimas Mur utilizando a técnica de gel filtração suporta a teoria existente de que as interações entre essas proteínas são fracas e transientes na natureza. Portanto, o uso de outras técnicas biofísicas que poderiam detectar e medir interações proteína-proteína ou dissociação em relação ao período de tempo selecionado seriam críticas para identificar interações transientes entre essas proteínas. Pelos motivos descritos no texto decidimos analisar as possíveis interações entre as enzimas Mur através de técnicas biofísicas como ultracentrifugação analítica, termoforese em micro-escala e crosslinking químico associado à espectrometria de massas.

#### **7.6 Ultracentrifugação analítica – método de velocidade de sedimentação**

Foi realizada a técnica de ultracentrifugação analítica pelo método de velocidade de sedimentação dos complexos binários MurC-MurD, MurC-MurF e MurD-MurF com a finalidade de caracterizar a formação desses possíveis complexos em solução. Os complexos que envolviam as proteínas MurG e MurE não foram conclusivos devido ao baixo sinal de absorvância das amostras e também pelos diversos valores de coeficiente de sedimentação para as proteínas individuais. Por este motivo, estes dados não são apresentados neste trabalho.

Os picos referentes ao coeficiente de sedimentação  $c$  ( $s$ ) de cada proteína individual MurC, MurD e MurF bem como os complexos binários formados entre essas proteínas são mostrados na **Figura 7.14**.



**Figura 7.14.** Resultados de ultracentrifugação analítica pelo método de velocidade de sedimentação  $c(s)$  dos complexos binários de Mur. Perfis de sedimentação de velocidade de MurC, MurD e MurF usando o software Sedfit. Resultados da análise de  $c(s)$  para os complexos MurC + MurF (A), MurD + MurF (B), MurD + MurC (C). A imagem D ilustra os resíduos de MurD + MurF. As amostras foram analisadas a 0,2 mg/ml, 0,5 mg/ml e 1 mg/ml, a 20 °C com uma velocidade de 30.000 rpm e um monitoramento da absorbância a 280 nm. Para a análise dos dados foram utilizados os softwares SEDFIT versão 150.1b e GUSI versão 1.3.2.

Podemos observar que os picos referentes ao coeficiente de sedimentação dos complexos binários possuem um valor intermediário em relação às proteínas individuais (**Fig. 7.14**). Normalmente, é esperado que o complexo entre duas proteínas apresente uma massa molecular maior e, portanto, apresente um maior valor de  $c$  (s). No entanto, Zhao et al., (2013) explicam como os valores de  $c$  (s) intermediários podem representar as interações proteína-proteína que são fracas, porém significativas. De acordo com esses mesmos autores, em situações onde as reações de associação-dissociação são rápidas em comparação com a escala de tempo da separação, apenas um único pico em  $c(s)$  é observado, o que representa um limite de interação. Assim, a amostra analisada pode ser uma mistura heterogênea e dinâmica dos dois monômeros e um complexo. A **Tabela 7.2** mostra os resultados obtidos através da Ultracentrifugação analítica pelo método de velocidade de sedimentação.

**Tabela 7.2.** Resultados das análises dos complexos binários das enzimas Mur obtidos através das análises de ultracentrifugação analítica (método de velocidade)

Proteína	Vbar	Massa teórica (kDa)	Valor de -S <sub>20,w</sub>	Razão friccional
MurC	0.73	50.9	4.0 ± 0.3	1.16
MurD	0.74	49.6	3.6 ± 0.18	1.24
MurF	0.74	51.8	3.8 ± 0.19	1.20
MurC:MurD	0.73	100.5	3.6 ± 0.25	1.23
MurC:MurF	0.73	102.8	3.8 ± 0.11	1.15
MurD:MurF	0.74	101.5	3.8 ± 0.08	1.30

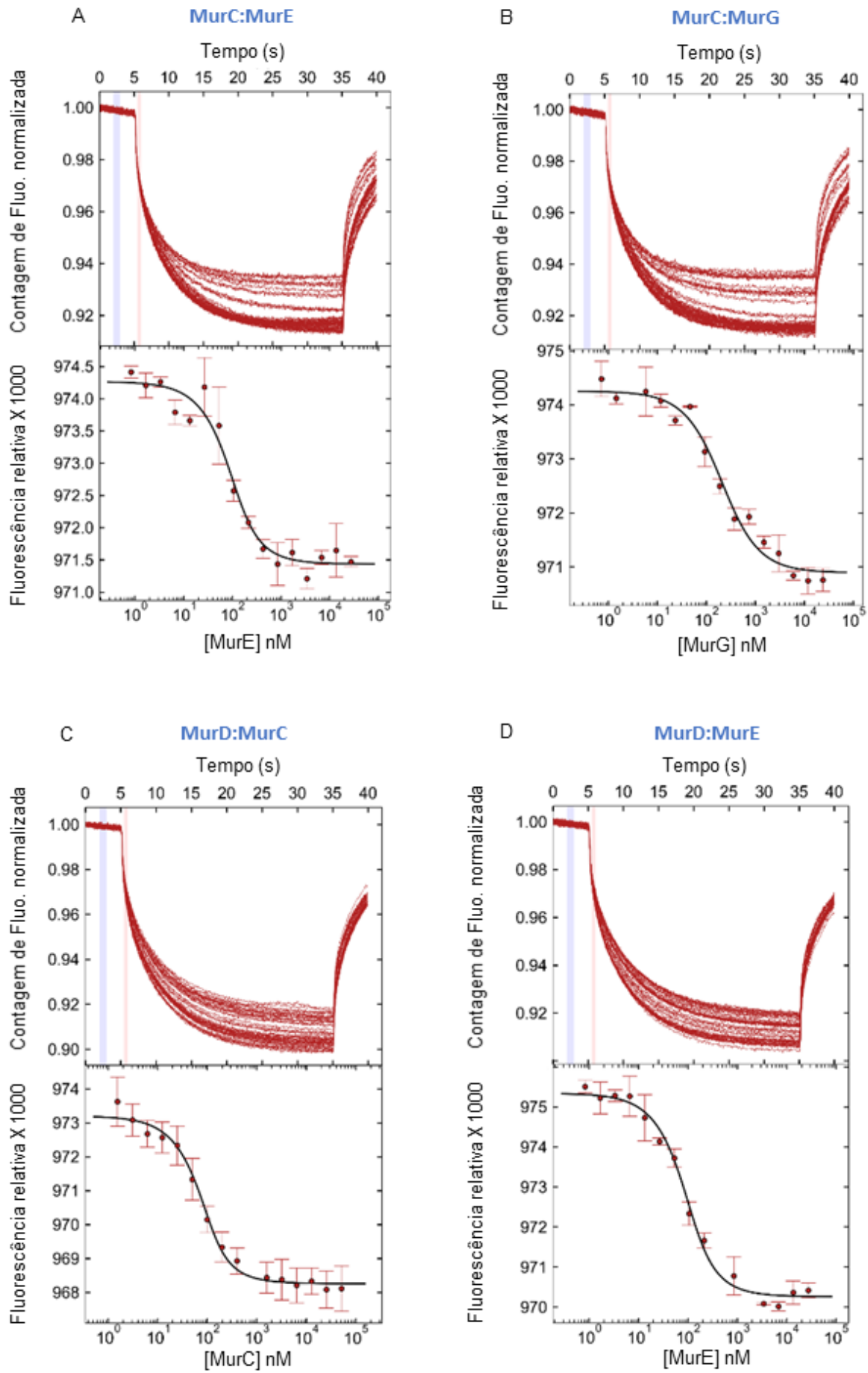
É possível observar que o volume parcial específico da partícula (Vbar) dos complexos binários é menor ou intermediário ao Vbar da proteína individual. Além disto, o coeficiente friccional do complexo é menor ou igual ao da proteína quando analisada individualmente. Esses dados corroboram nossa hipótese que as interações entre as Mur ligases possam ser transientes. Também, quando estas proteínas estão complexadas a conformação estrutural pode se tornar mais compacta e, por este motivo podemos observar esses valores intermediários de Vbar e coeficiente friccional.

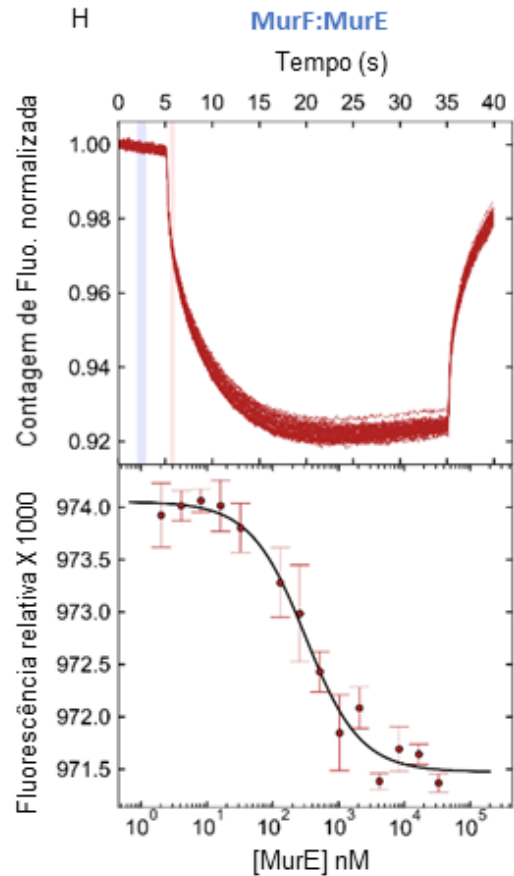
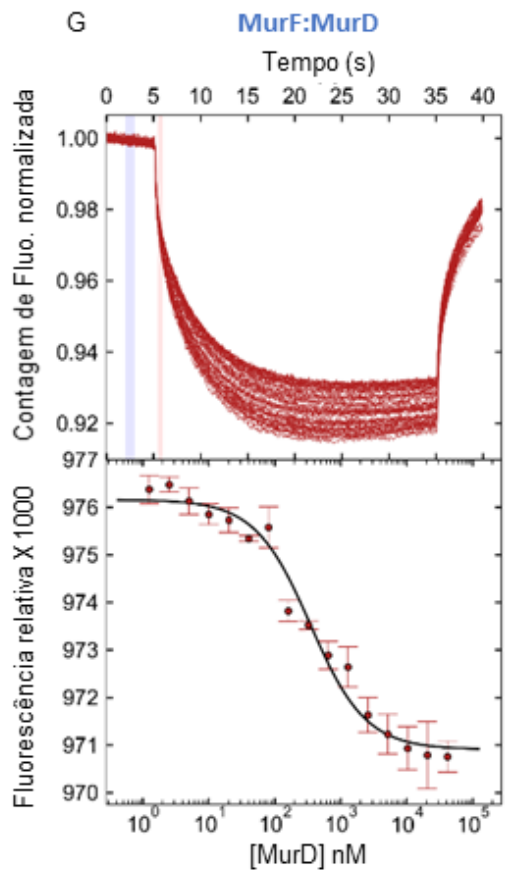
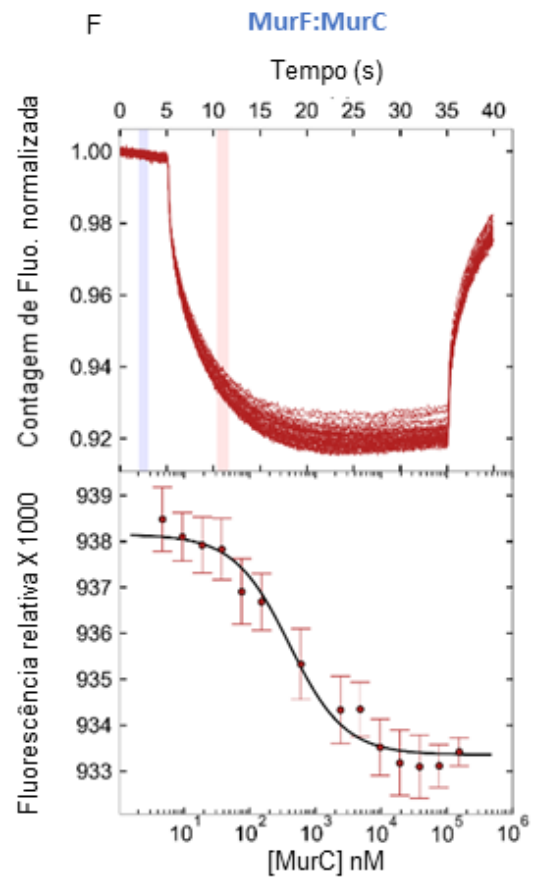
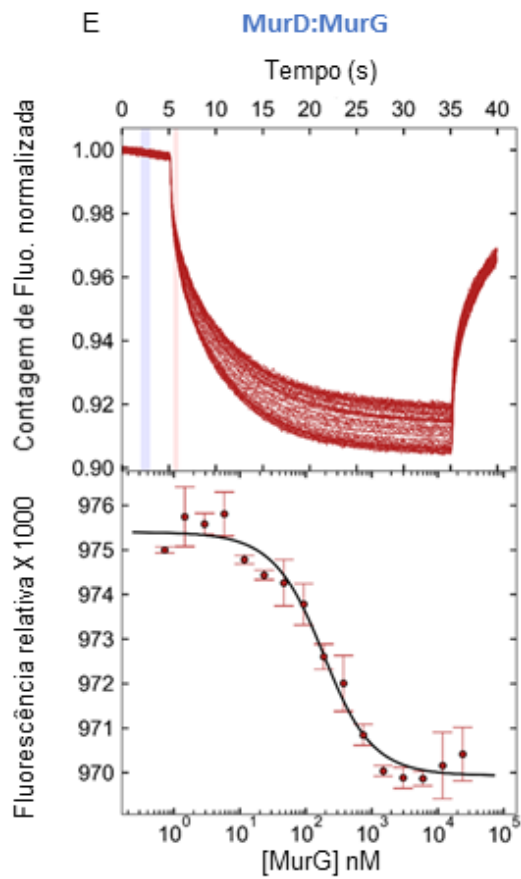
Estes resultados foram os primeiros indícios de que as ligases Mur poderiam, efetivamente ter afinidade uma pelas outras. Deste modo, decidimos continuar com as análises

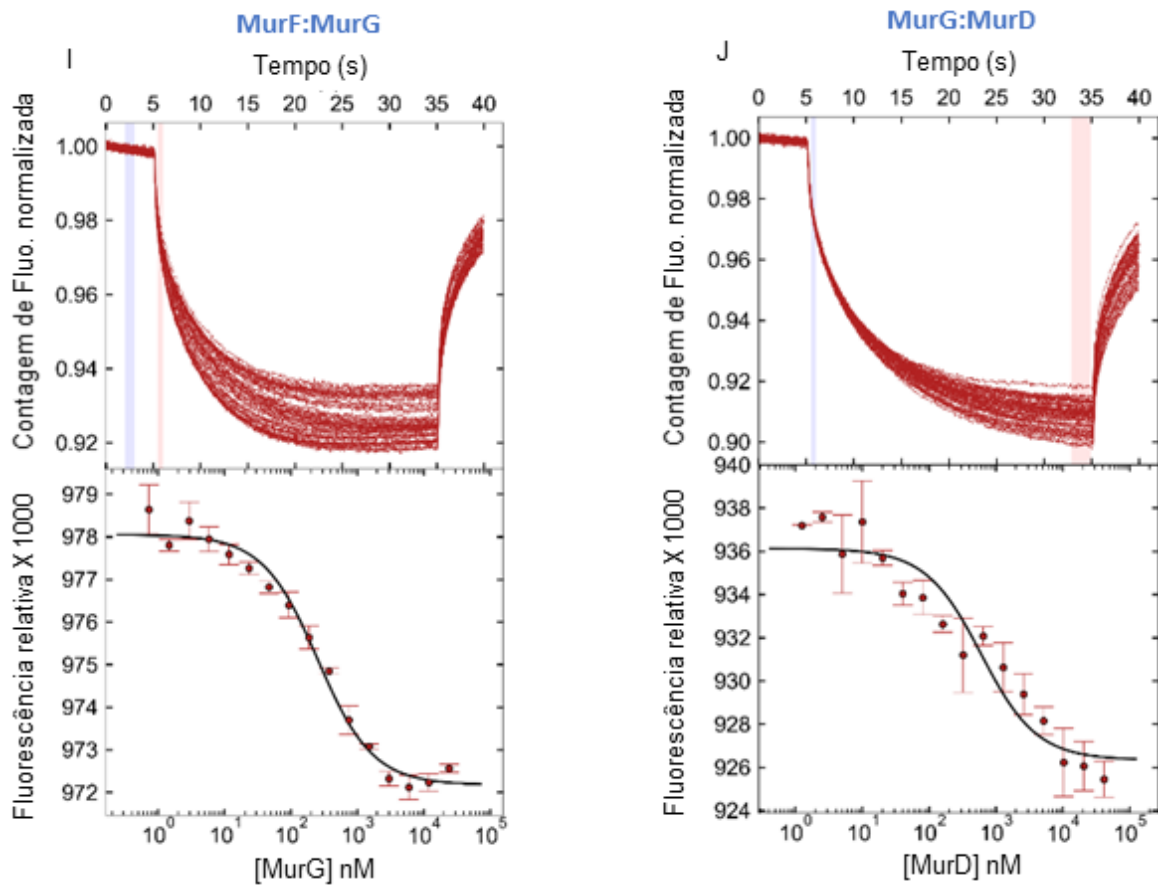
para investigar a formação dos complexos e também medir as constantes de dissociação entre essas proteínas através da técnica de termoforese em micro-escala (MST).

### **7.7 Termoforese em Micro-escala (MST)**

A técnica de MST é altamente sensível para determinar quaisquer alterações no tamanho, carga e solvente da molécula, permitindo a detecção de interações entre duas proteínas (Jerabek-Willemsen et al, 2011). Este ensaio foi realizado com dois corantes fluorescentes que se ligam à lisinas: FITC e NT647. Os primeiros experimentos estabelecidos foram realizados usando FITC, mas a marcação fluorescente das proteínas não foi satisfatória devido ao auto-quenching do corante. Por este motivo, o segundo conjunto de dados de MST foi realizado usando NT647, o qual permitiu a detecção de potenciais complexos binários entre as enzimas Mur (**Fig. 7.15**).







**Figura 7.15. Análise de MST.** Detecção dos complexos binários entre as proteínas Mur de *S. pneumoniae* utilizando o equipamento Monolith® NT.115. O eixo X mostra a concentração da proteína titulada (ligante) em nM. O eixo Y mostra os valores de absorbância para a proteína marcada. As barras de erro correspondem ao desvio padrão; todas as análises foram realizadas em triplicata. (A) MurC:MurE (B) MurC:MurG (C) MurD:MurC (D) MurD:MurE (E) MurD:MurG (F) MurF:MurC (G) MurF:MurD (H) MurF:MurE (I) MurF:MurG (J) MurG:MurD. Para a análise dos dados foram utilizados os softwares GUSSEI versão 1.3.2 e Monolith NT.115 data analysis. Foi utilizado lisozima como controle negativo de todas as reações de MST.

A **Tabela 7.3** mostra os parâmetros utilizados no experimento de MST e os resultados, incluindo a constante de dissociação encontrada para cada complexo binário.

**Tabela 7.3.** Análise dos resultados de MST dos complexos binários das enzimas Mur

Proteína marcada (NT-647)	Ligante	Concentração ligante	Kd (nM)	Kd (desvio padrão)
MurC_100nM	MurE	66 $\mu$ M – 2 nM (3 mg/ml – 90 ng/ml)	39.8	$\pm$ 12.3
MurC_100nM	MurG	121 $\mu$ M – 3nM (5 mg/ml – 152 ng/ml)	278.7	$\pm$ 51.6
MurD_100nM	MurC	154 $\mu$ M – 4 nM 7 mg/ml – 213 ng/ml	23.3	$\pm$ 4.1
MurD_100nM	MurE	66 $\mu$ M – 2 nM (3 mg/ml – 90 ng/ml)	40.6	$\pm$ 12.0
MurD_100nM	MurG	121 $\mu$ M – 3nM (5 mg/ml – 152 ng/ml)	175.0	$\pm$ 33.1
MurF_50nM	MurC	154 $\mu$ M – 4 nM 7 mg/ml – 213 ng/ml	144.0	$\pm$ 22.7
MurF_50nM	MurD	141 $\mu$ M – 4 nM 7 mg/ml – 213 ng/ml	258.4	$\pm$ 27.4
MurF_50nM	MurE	66 $\mu$ M – 2 nM (3 mg/ml – 90 ng/ml)	283.0	$\pm$ 34.0
MurF_50nM	MurG	121 $\mu$ M – 3nM (5 mg/ml – 152 ng/ml)	270.9	$\pm$ 31.9
MurG_100nM	MurD	141 $\mu$ M – 4 nM 7 mg/ml – 213 ng/ml	566.8	$\pm$ 184.1

Embora nossos dados de filtração em gel para a análise dos complexos binários tenham indicado que não há interação entre essas proteínas, os dados de AUC mostraram os primeiros indícios de interações transientes entre as enzimas Mur. Os resultados de MST, descritos acima, confirmam que as enzimas Mur interagem entre si. De uma maneira bastante interessante, observa-se que as constantes de dissociação para a associação entre as ligases ‘puramente citoplasmáticas’ tem tendência a ser mais forte do que destas com MurG, proteína associada a membrana e proposta como sendo o alicerce do complexo. Mesmo assim, é surpreendente que os KDs determinados por esta técnica sejam da ordem do nanomolar, enquanto que outras técnicas biofísicas empregadas neste estudo sugerem que as afinidades sejam transientes.

O que poderia explicar essa discrepância entre as duas diferentes análises de AUC e MST? Imaginamos que seja a concentração da amostra empregada em cada teste. A técnica de AUC não permite que altas concentrações de proteína sejam analisadas e deste modo, os ensaios realizados com os complexos binários não permitiram a formação de um complexo estável entre as enzimas Mur. Por este motivo, observamos picos de sedimentação



intermediários que poderiam representar os monômeros de ambas as proteínas e o complexo entre elas. No entanto, para os ensaios de MST as proteínas foram concentradas acima de 2 mg/ml e, de acordo com os resultados de SEC-MALS as enzimas Mur formam oligômeros.

Nossa hipótese é que existe um subcomplexo entre as Mur ligases (MurC-MurE) quando se encontram na forma oligomérica. Além disso, nossos dados estão de acordo com os dados apresentados por Favini et al., (2013) no qual é mostrado a interação de MurG com as Mur ligases, porém com uma constante de dissociação mais baixa na ordem de 0.3 a 0.5  $\mu\text{M}$ .

A formação de oligômeros pelas proteínas garante imensas vantagens para as funções biológicas, tais como aumentar os locais de sítio ativo, aumentar as superfícies de interação e além disso, produzir redes de interações entre proteínas que as permitem desempenhar os diversos processos celulares de uma forma rápida e dinâmica (Kimata-Arigo et al., 2013).

Os resultados de MST apresentados por Batoulis et al., (2016) mostraram que a interação da proteína de membrana SNAP25, responsável pelo transporte de íons pela membrana, com o  $\text{Ca}^{2+}$  é dependente da sua concentração em solução, ou seja, a proteína se oligomeriza quando as concentrações de cálcio na célula aumentam e deste modo, é desencadeado o transporte deste íon através da membrana. Então, a oligomerização de proteínas pode ser desencadeada por diversos fatores, sejam eles relacionados à íons ou a concentração de proteínas na solução. Esse processo de oligomerização é dinâmico e pode ser reversível de acordo com a demanda biológica da célula.

Por outro lado, Kimata-Arigo et al., (2013) mostram que a formação do complexo *in vitro* entre a ferredoxina e a redutase ferredoxina-NADP<sup>+</sup> é dependente da oligomerização, que por sua vez é dependente da concentração de proteína na solução. Originalmente, acreditava-se que esse complexo era proveniente de um fenômeno artificial observado somente na estrutura cristalográfica, pois nos ensaios biofísicos não era possível observar a formação de complexos. No entanto, estes mesmos autores mostraram pela primeira vez que a concentração de ambas proteínas utilizadas para formar o complexo era muito menor do que a necessária para formar um complexo *in vivo*. Assim, quando a concentração de ambas proteínas foi aumentada iniciou-se o processo de oligomerização desencadeando a formação do complexo entre elas.

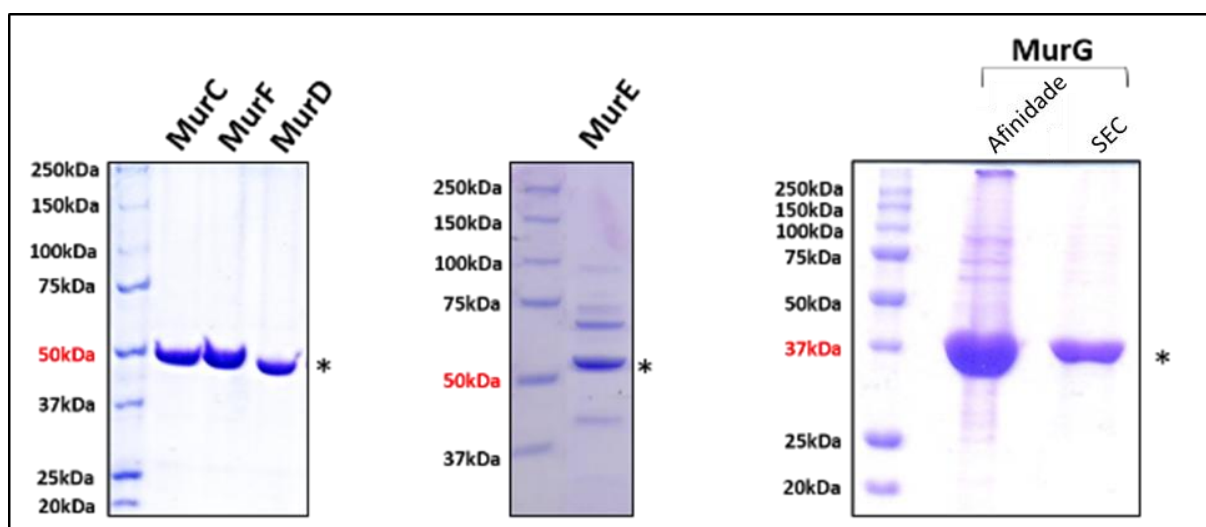
Tendo em vista todos os resultados provenientes de AUC e MST decidimos investigar a formação dos complexos entre as enzimas Mur através da técnica de cross-linking

utilizando DSS juntamente com a análise por espectrometria de massas, com a finalidade de analisar precisamente a superfície de interação que são responsáveis pelas interações proteína-proteína.

## 7.8 Cross-linking/ Espectrometria de Massas

Para confirmar a formação de complexos entre as proteínas desse estudo também utilizamos a técnica de cross-linking químico com suberato de disuccinimidilo (DSS) com um braço espaçador de 11,4 Å que tem a capacidade de reagir com grupos de amina, e geralmente é usado para identificar as possíveis interfaces entre proteínas (Zhou, Li e Wang, 2016).

Antes de iniciarmos os ensaios com DSS as amostras de todas as enzimas Mur purificadas foram analisadas através de gel SDS PAGE como controle da reação de crosslink para evitar falsos-positivos. Deste modo garantimos que as amostras estavam puras e não apresentavam massas moleculares superiores a 100 kDa, o qual representaria a massa molecular aproximada de duas moléculas complexadas (**Fig. 7.16**).



**Figura 7.16.** Proteínas MurC, MurD, MurE, MurF e MurG purificadas através de cromatografia de afinidade e SEC. As proteínas têm aproximadamente 50 kDa e estão identificadas pelo (\*).

As proteínas Mur purificadas foram incubadas com DSS em combinações diferentes e foram submetidas a SDS PAGE. As bandas de proteína com massa molecular

superior a 50 kDa no gel mostraram que a reação de cross-linking foi bem sucedida, no entanto, não foi possível identificar se o complexo formado pertencia a duas proteínas idênticas ou diferentes, uma vez que os pesos moleculares de todas as enzimas Mur são semelhantes, tornando difícil visualizá-los separadamente através do gel. Por esse motivo, decidimos analisar as amostras através de espectrometria de massas para averiguar se os complexos formados entre as enzimas Mur eram entre duas proteínas diferentes ou entre a mesma proteína.

Uma vez que as reações de cross-linking entre as enzimas Mur foram realizadas as amostras foram aplicadas em gel de gradiente SDS PAGE para a correta separação dos complexos formados e monômeros de proteínas. Posteriormente, as bandas do gel contendo os complexos foram digeridas com tripsina e enviadas para análise de espectrometria de massas no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio).

A espectrometria de massas tem emergido nesses últimos anos como uma das principais técnicas para identificar e quantificar proteínas além da determinação de complexos de proteínas. Vários métodos podem ser empregados para essa análise, como por exemplo o cross-linking químico de proteínas seguido pela identificação dos peptídeos através da espectrometria de massas. Esse novo método combinado com a cristalografia, por exemplo, fornece novas estratégias para a validação das interações entre complexos proteicos relevantes para os processos biológicos (Sinz, 2003; Rappsilber, 2011; Holding, 2015; Leitner, 2016).

As análises dos peptídeos provenientes do cross-linking através de espectrometria de massas possuem muitas vantagens (Sinz, 2003):

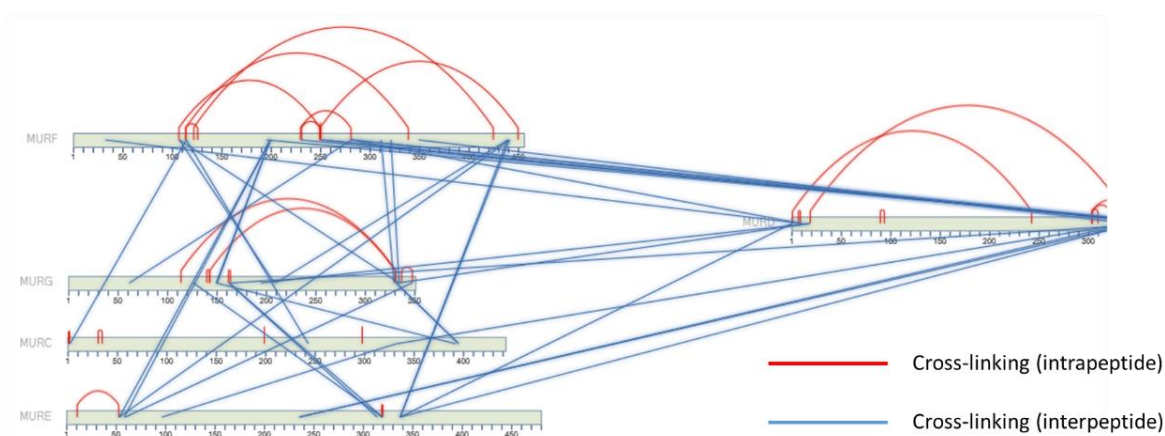
- A massa da proteína ou do complexo de proteínas é teoricamente ilimitada, pois os peptídeos em análise são fragmentados;
- As análises são rápidas e normalmente são necessárias pequenas quantidades de proteína;
- É possível obter informações sobre a estrutura tridimensional das proteínas em solução, e as regiões flexíveis da proteína são prontamente identificadas.

A técnica de cross-linking acoplada à espectrometria de massas é um método experimental e pode produzir dados com erros. No entanto, em um estudo realizado por Chen

et al., (2010) com a RNA polimerase II, apresentou erros menores que 1% tanto nas análises com baixo quanto com altos índices de confiabilidade.

A validação dessa técnica de cross-linking/espectrometria de massas tem sido marcada pela identificação de complexos entre várias proteínas. Por exemplo, essa técnica foi utilizada para fornecer um mapa topológico do complexo de proteínas humanas “Nup84” através da separação dos complexos por gel SDS PAGE e identificação das proteínas que sofreram crosslink (Rappsilber et al., 2000). Também foi usada para a identificação do complexo de proteínas bacterianas “Ffh.FtsY” (Chu et al., 2004), o complexo das proteínas humanas “Ndc80” (Maiolica et al., 2007), e o complexo entre a proteína MunC13 e calmodulina (Dimova et al., 2009). Também foi realizada a modelagem computacional do complexo phi29 (Fu et al., 2010). Além disso, essa técnica foi usada com sucesso através da comparação entre os dados de crosslinks associados à estrutura cristalográfica do complexo entre a RNA polimerase II juntamente com seu fator de transcrição IIF (Chen et al., 2010). E por fim, foram identificados crosslinks entre os membros do complexo ribossomal 80S (Liu et al., 2015).

No caso dos experimentos efetuados nesta tese, a primeira análise das amostras foi realizada no equipamento Q-TOF para confirmar a identidade das proteínas Mur. Nesse ensaio foram detectados crosslinks intra-peptídeos e inter-peptídeos como mostrado na **Figura 7.17**.



**Figura 7.17.** Representação esquemática dos crosslinks intra e inter-peptídeos encontrados através da análise de espectrometria de massa no equipamento Q-TOF. A imagem foi gerada pelo software Spectrum Identification Machine.

A primeira evidência de crosslinks inter-peptídeos foi proveniente das análises das amostras através de um analisador de massas de peptídeos de baixa resolução. Portanto, decidimos usar o equipamento com analisador de massas do tipo Orbitrap que apresenta alta resolução para confirmar a formação de complexos entre as proteínas. Uma nova reação de cross-linking foi realizada em triplicata técnica, usando uma mistura contendo 50  $\mu$ M de cada uma das proteínas Mur em cada reação. As proteínas foram digeridas com tripsina e foram enviadas para a identificação das massas fragmentadas de cada peptídeo. Depois de analisar os espectros foi possível identificar crosslinks entre peptídeos de proteínas diferentes (crosslink inter-peptídeo) e crosslinks entre proteínas iguais (crosslink intra-peptídeo). Os resultados obtidos das análises são mostrados na **Tabela 7.4**. A validação manual de cada espectro gerado pelas fragmentações dos peptídeos está em andamento sob a supervisão da Dra. Adriana Paes Leme e Dra. Daniela Granato do grupo de espectrometria de massas do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio).

**Tabela 7.4.** Principais cross-links encontrados nas análises dos complexos das enzimas Mur

	Proteínas	Sequência peptídica [posição do cross-linking]
	Cross-linking inter-peptídeo	MurC:MurD
MurC:MurF		EHLK(\$1)TFAGVK K(\$1)DSLTFK [MurC 290:299; MurF 262:268] TFAGVK(\$1)R YK(\$1)TYK [MurC 294:300; MurF 137:141]
MurC:MurG		MK(\$1)ASKELK TFAGVK(\$1)R + OxiM(1) [MurC 294:300; MurG 350:357]
MurD:MurF		K(\$1)MVLGQSAER K(\$1)DSLTFK [MurD 374:384; MurF 262:268] K(\$1)MVLGQSAER K(\$1)VVR [MurD 374:384; MurF 243:246] VIDQFK(\$1)NK K(\$1)VVR [MurD 3:10; MurF 243:246] NPGIPYNNPMIEK(\$1)ALAK K(\$1)VVR [MurD 79:95; MurF 243:246] DLTSK(\$1)TEATVVPFSTLEK K(\$1)VVR [Mur D231:248; MurF 243:246]
Cross-linking intra-peptídeo	MurC	EVDHGDVK(\$1)VEDLANK VQGS DVEK(\$1)YYFTQR [MurC 379:393; MurC 29:42] TFAGVK(\$1)R QK(\$1)YPSK [MurC 294:300; MurC 332:337] EVDHGDVK(\$1)VEDLANK INK(\$1)K [MurC 379:393; MurC 394:397] EVDHGDVK(\$1)VEDLANK VQGS DVEK(\$1)YYFTQR [MurC 379:393; MurC 29:42]
	MurF	LVESLENE DK(\$1) K(\$1)DSLTFK [MurF 459:468; MurF 262:268] LVESLENE DK(\$1) K(\$1)VVR [MurF 459:468; MurF 243:246] K(\$1)DSLTFK TEWK(\$1)K [MurF 262:268; MurF 320:324] K(\$1)DSLTFK YK(\$1)TYK [MurF 262:268; MurF 137:141]
	MurG	VFNQLVTDHK (\$1)K K(\$1)ELTER [MurG 219:229; MurG 229:234]

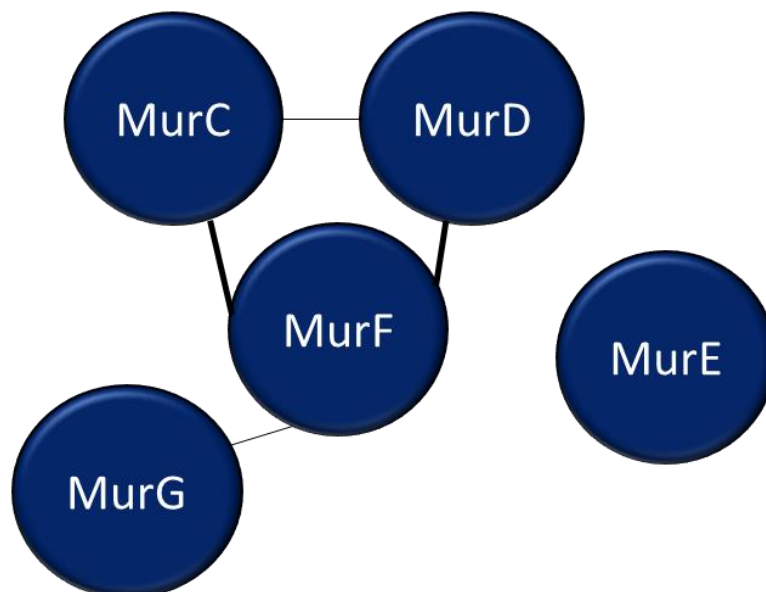
Se observamos a posição dos crosslinks encontrados entre as enzimas MurC:MurD por exemplo, o crosslink ocorre entre a lisina 396 de MurC (K396) e lisina 95 de MurD (K95). Neste caso, o resíduo K396 de MurC faz parte do domínio C-terminal, responsável pela liberação do produto que será o substrato para a próxima enzima, MurD. Além disso, o resíduo K95 de MurD está localizado no domínio N-terminal da proteína sendo o responsável por receber o substrato de MurC. Ou seja, o crosslink identificado faz sentido biológico e foi encontrado em duas das três triplicatas técnicas, mostrando que não é uma ligação eventual ocasionada pela alta concentração de proteínas na solução.

Também foram encontrados muitos crosslink intra-peptídeos, sugerindo que essas proteínas têm a capacidade de formar oligômeros, e portanto, esses resultados corroboram com os dados de SEC-MALS que também mostram a formação de oligômeros dependentes da concentração de proteína em solução.

Sendo assim, a partir dos resultados obtidos através das análises dos crosslinks foi possível esquematizar um modelo de interação entre as enzimas Mur (**Fig. 7.18**). O modelo do mega-complexo é conectado por linhas, as quais representam os crosslinks encontrados entre duas diferentes proteínas. As linhas mais grossas mostram que mais crosslinks foram encontrados entre as proteínas, enquanto que as linhas finas mostram um menor número de crosslinks encontrados entre os complexos binários.

Neste modelo, MurE não faz parte do mega-complexo Mur. Acreditamos que as análises com MurE não apresentam resultados positivos com esta técnica por que durante os experimentos de cross-linking com DSS a proteína precipitou em grande quantidade, talvez pelo uso de DMSO que é o solvente do DSS e também por que a reação ocorre a temperatura ambiente e, desta forma a proteína está propensa à instabilidade, gerando degradação e precipitação.

Por outro lado, como descrito por Rappsilber, (2011) nem todos os crosslinks que foram formados entre os peptídeos podem ser identificados, uma vez que a detecção de grandes peptídeos pode mascarar outros picos de peptídeos menores. Além disso, os peptídeos hidrofóbicos podem ser perdidos durante o preparo das amostras.



**Figura 7.18.** Esquema que mostra as possíveis interações entre as proteínas Mur com base nos resultados da análise da espectrometria de massa no equipamento Orbitrap. As linhas grossas que ligam MurF com MurC e MurD representam um número elevado de crosslinks encontrados entre eles.

Este modelo esquemático, baseado nos resultados de espectrometria de massas, mostra de forma inédita a existência de um mega-complexo entre as enzimas Mur. Além disso, esses dados estão de acordo com nossas análises de MST que também mostram a interação entre essas proteínas. Também podemos observar que a presença dos oligômeros que são dependentes da concentração de proteína na solução são essenciais para a interação entre as enzimas Mur. Hipoteticamente, esses oligômeros podem ser formados na célula para desencadear uma rede de interações proteína-proteína com a finalidade de otimizar a produção dos precursores do peptidoglicano durante a divisão celular e assim, garantir a sobrevivência da bactéria durante esse ciclo celular.

A técnica de cross-linking químico/espectrometria de massas fornece oportunidades para a modelagem de mapas estruturais detalhados para o estudo funcional dos complexos entre proteínas formados em solução. Nos últimos anos protocolos foram otimizados e novas ferramentas computacionais para análises confiáveis resultaram em avanços significativos para essa nova tecnologia. Esses avanços contribuíram para o aumento do uso dessa técnica, a qual está sendo empregada com sucesso para a determinação de complexos proteína-proteína. Porém, será necessário que os métodos computacionais de modelagem

estrutural sejam melhorados também com a finalidade da integralização desses métodos para o estudo de complexos biológicos (Rappsilber, 2011; Tran et al., 2016).

## 7.9 Cristalização de complexos entre as enzimas Mur

O último ensaio que realizamos para analisar as interações entre as enzimas Mur foi a cristalização dos complexos binários realizada na plataforma de cristalização de alto rendimento no LNBio, RoboLab. Os cristais foram obtidos em diferentes condições por difusão de vapor (sitting drop) a 18 °C. Devido ao tamanho dos cristais não foi possível realizar a coleta de dados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) devido às limitações do tamanho do feixe na linha MX2. Além disso, não foi possível a reprodução manual desses cristais através do método hanging drop.

A cristalização de complexos proteína-proteína ainda é um novo campo a ser explorado. O número de estruturas de complexos depositadas no PDB ainda é relativamente baixo embora a maioria dos processos celulares sejam dependentes dessas interações. A estrutura de complexos de proteínas permite não somente a confirmação de uma interação, mas também representa informações valiosas para o desenvolvimento de novas drogas (Sergei et al., 2006).

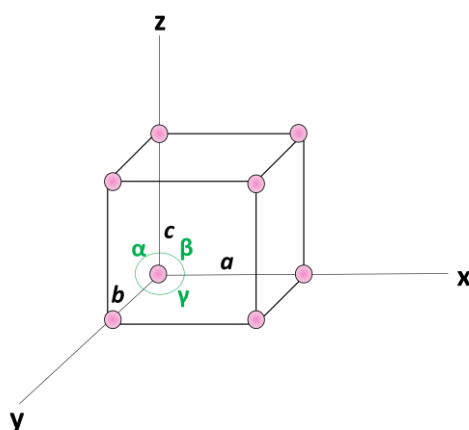
As condições de cristalização de complexos proteína – proteína são ainda mais difíceis de serem controladas se comparadas com a cristalização de uma única proteína, pois é necessário encontrar uma condição na qual a interação é suficientemente estável. Além disso, essa condição precisa ser favorável para as espécies complexadas e desfavorável para as proteínas não complexadas. Isso explica o porquê temos poucos dados na literatura das estruturas de complexos entre proteínas.

Por outro lado, existe uma ampla variedade de condições de cristalização na qual uma única proteína pode formar cristais, como por exemplo, algumas proteínas cristalizam com altas concentrações de sal e precipitantes ou extremos valores de pH. No entanto, para complexos entre proteínas essa variedade de condições torna-se limitada uma vez que, altas concentrações de sal ou valores de pH extremos podem desestabilizar essas interações. Sergei e Radaev et al (2006) observaram que a maioria dos complexos proteína-proteína cristalizaram em uma faixa pequena de pH e com baixas concentrações de precipitante.



O processo de nucleação é o ponto inicial da cristalização, no qual começam a aparecer pequenos cristais que não se dissolvem em solução. Enquanto que altos níveis de supersaturação favorecem o processo de nucleação na cristalização, um baixo nível de supersaturação é necessário para o crescimento de cristais de boa qualidade. Embora as condições que favoreçam a nucleação nem sempre são as mesmas que favorecem o crescimento dos cristais. Portanto, a cristalização é o perfeito equilíbrio entre a nucleação e o crescimento dos cristais (Garc-Ruiz, 2003).

O cristal de proteína é constituído basicamente pelas células unitárias dos cristais, os quais estão arranados de forma periódica em três dimensões. A célula unitária contém todas as informações estruturais e de simetria do cristal que são necessárias para descrever o cristal inteiro e podem ser descritas através dos vetores **a**, **b** e **c**, e através dos ângulos formados entre os vetores ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) (Fig 7.19).

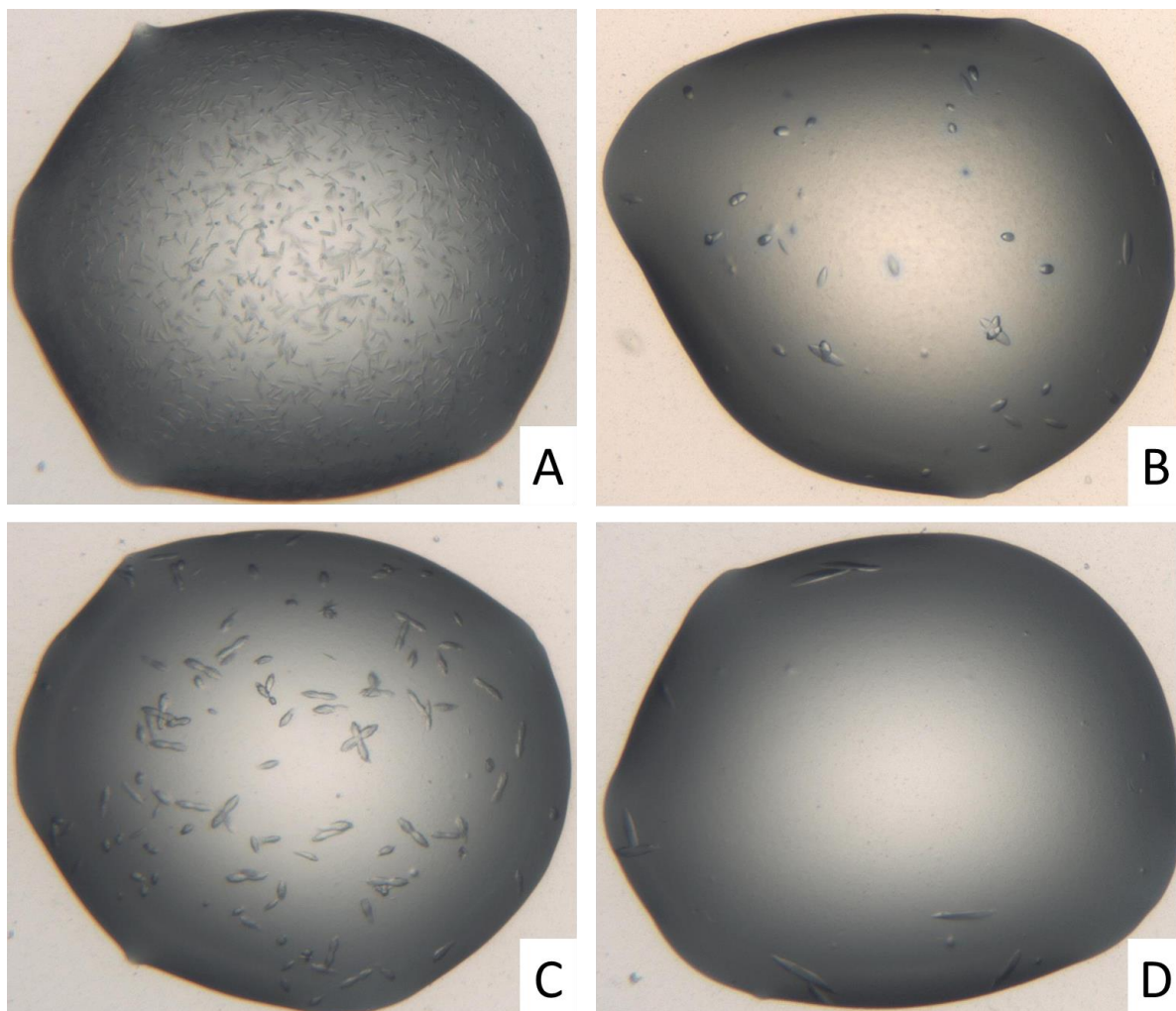


**Figura 7.19.** Célula unitária do cristal

### 7.9.1 Ensaios de cristalização dos complexos das enzimas Mur

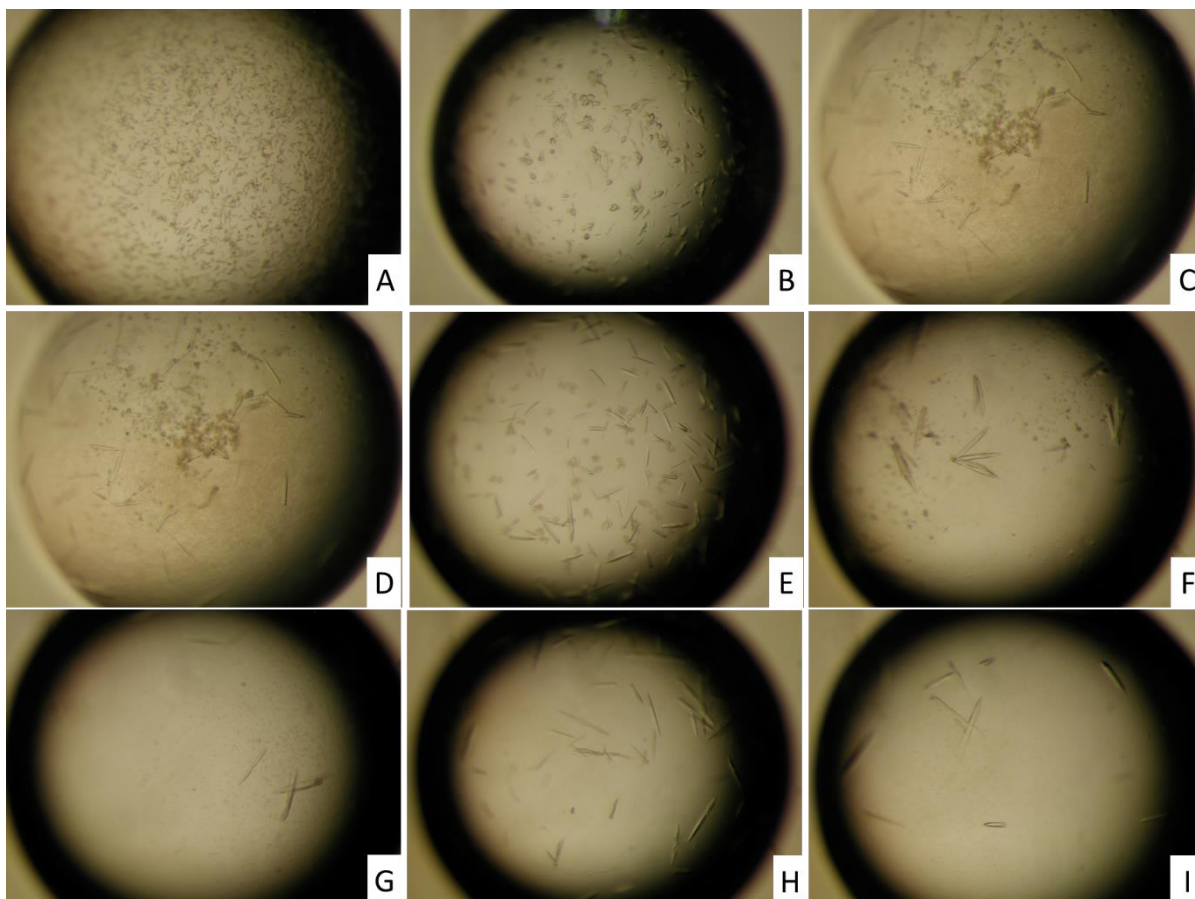
As proteínas MurC, MurD e MurF com o substrato de cada enzima e AMP-PNP assim como os complexos MurC:MurF, MurC:MurD e MurD:MurF foram enviadas à plataforma de cristalização HTX –EMBL em Grenoble, França. Foram testados seis diferentes kits comerciais de cristalização através do método sitting drop a 18 °C. Após três dias começamos a observar os primeiros cristais de MurC:MurF e após 14 dias observamos uma

única condição com cristais de MurC:MurD (**Fig. 7.20**). Nenhum cristal foi observado para as proteínas separadamente nem para o complexo MurD:MurF após 30 dias.



**Figura 7.20. Cristais das enzimas Mur com o método sitting drop.** (A) Cristal de MurC:MurF (1:1) na condição: 0.2 M Tiocianato de potássio, 0.1 M Bis Tris propano pH 6.5, 20 % (p/v) PEG 3350. (B) Cristal de MurC:MurF (1:1) na condição: 0.2 M Acetato de amônio, PEG 3,350 20 % (p/v). (C) Cristal de MurC:MurF (1:1) na condição: 0,2 M Nitrato de amônio, PEG 3350 20% (p/v). (D) Cristal de MurC:MurD (1:1) na condição: 0,2 M Tiocianato de potássio, 0,1 M Bis Tris propano pH 6.5, PEG 3350 20% (p/v). Os experimentos foram realizados na plataforma HTX do EMBL.

A grande maioria das condições nas quais foram observados os cristais continham somente sal, tais como, acetato de amônio e nitrato de amônio e o agente precipitante mais comum foi PEG 3350. Uma vez obtidos os cristais através da plataforma de cristalização foram iniciados os ensaios de otimização manual com placas de 24 poços através do método hanging drop (Fig. 7.21).



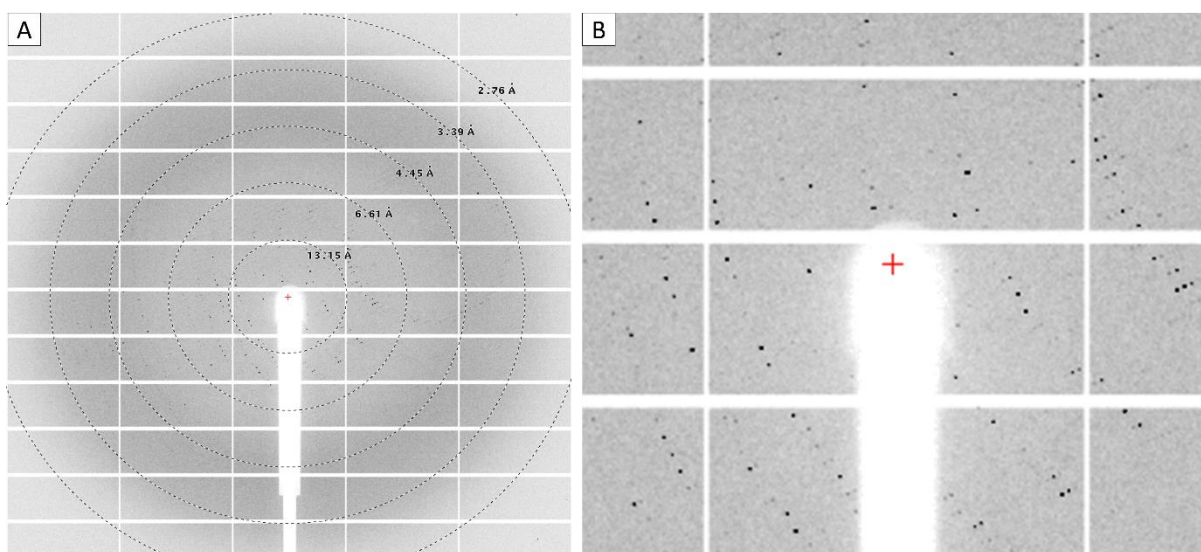
**Figura 7.21. Otimização manual dos cristais das enzimas MurC:MurF com o método hanging drop. (A)** Acetato de amônio 0,2 M e PEG 3350 20%. **(B)** Acetato de amônio 0,2M e PEG 3350 18%. **(C)** Acetato de amônio 0,2 M e PEG 3350 16%. **(D)** Nitrato de amônio 0,2M e PEG 3350 18%. **(E)** Nitrato de amônio 0,2 M e PEG 3350 17%. **(F)** Nitrato de amônio 0,2M e PEG 3350 16%. **(G)** Nitrato de amônio 0,2 M, 0,05M NaCl e PEG 3350 16,1%. **(H)** Nitrato de amônio 0,2M, 0,05 M NaCl e PEG 3350 16,5%. **(I)** Nitrato de amônio 0,2 M, 0,05 M NaCl e PEG 3350 16,8%.

Os cristais de MurC:MurF foram congelados com Paratone-N (Hampton), agente crioprotetor para evitar a formação de anéis de gelo ao redor dos cristais na presença do feixe de nitrogênio líquido. A coleta dos dados foi realizada no European Synchrotron Radiation

Facility (ESRF) de Grenoble na linha de luz ID30B, equipada com um detector Pilatus de microfoco, com o auxílio do Dr. Carlos Contreras-Martel, membro do nosso grupo (Patogênese Bacteriana) do Institut de Biologie Structurale (IBS).

Os potenciais cristais de ‘MurC:MurF’ difrataram a uma resolução de aproximadamente 3 Å, o qual consideramos que são resultados promissores tendo em vista que este foi o primeiro teste realizado desde as etapas iniciais de purificação, triagens de cristalização e otimização dos cristais (**Tabela 7.5**).

Os pontos de difração para estes cristais são bem definidos (**Fig. 7.22**), embora tenha sido necessário aumentar a intensidade de transmissão do feixe para 25% com a finalidade de obter um padrão de difração. Com o aumento da transmissão do feixe os cristais sofreram danos devido à radiação, no entanto foi possível obter o possível grupo espacial e a estratégia de coleta.



**Figura 7.22.** Padrão de difração do potencial cristal de ‘MurC:MurF’ coletado na linha de luz ID30B equipada com detector Pilatus do ESRF- Grenoble, França. (A) Imagem da face do detector mostrando os pontos de difração até aproximadamente 3.3 Å. (B) Imagem ampliada da face do detector. É possível observar o padrão de difração de proteínas, além disso, os pontos de difração são bem definidos.

**Tabela 7.5. Processamento final dos dados com XDS**

Resolution limit	Number of reflections			Completeness data	R-factor observed	R-factor expected	Compared	I/SIGMA	R-meas	CC (1/2)	Anomal corr	SigAno	Nano
	Observed	Unique	Possible										
8.98	9027	2201	2344	93.90%	2.40%	2.30%	9026	51.49	2.80%	100.0*	-1	0.852	760
6.4	19443	3637	3771	96.40%	7.30%	6.80%	19434	24.66	8.10%	99.8*	-1	0.826	2076
5.24	28528	4408	4740	93.00%	16.40%	15.40%	28528	13.39	17.80%	98.9*	0	0.792	3201
4.55	33706	5120	5538	92.50%	18.90%	17.80%	33706	11.99	20.50%	98.8*	1	0.796	3787
4.07	38107	5467	6198	88.20%	25.90%	24.30%	38105	9.16	28.00%	97.8*	0	0.782	4289
3.72	40704	5659	6827	82.90%	36.40%	34.40%	40702	6.7	39.20%	96.7*	0	0.747	4506
3.44	44187	5810	7365	78.90%	48.10%	45.30%	44183	5.27	51.60%	94.3*	0	0.726	4830
3.22	44864	5915	7911	74.80%	58.90%	55.40%	44864	4.11	63.20%	91.1*	1	0.697	4977
3.04	44681	6000	8375	71.60%	68.40%	64.30%	44664	3.42	73.50%	89.7*	1	0.679	4931
<b>total</b>	<b>303247</b>	<b>44217</b>	<b>53069</b>	<b>83.30%</b>	<b>27.00%</b>	<b>25.40%</b>	<b>303212</b>	<b>11.01</b>	<b>29.20%</b>	<b>99.1*</b>	<b>0</b>	<b>0.748</b>	<b>33357</b>

A partir da análise dos dados com o programa XDS podemos observar que:

- A completeza dos dados é maior do que 90% a baixa resolução, contudo esse valor decresce para 71% com uma resolução de aproximadamente 3 Å. A completeza total dos dados é de 83%, pois o cristal sofreu devido à problemas de radiação. No entanto, este valor de completeza é suficiente para os testes de substituição molecular e, além disso, outros dados já foram coletados com a finalidade de melhorar nossos índices de completeza.
- O valor de I/sigma para a resolução de 3 Å é de 3.4. Este valor está acima do mínimo recomendado (2.0), o qual indica que a qualidade dos dados coletados é razoável.
- O R-factor está relativamente alto, com valor de 27% (total), porém com o uso do programa de substituição molecular “Phaser” é possível manter os valores de I/Sigma acima de 2.0 para as análises dos dados.

Os cristais de MurC:MurF possuem alta simetria, pois pertencem ao grupo espacial P6(2)22, ou seja apresentam simetria hexagonal. Isto significa que a estratégia de coleta para os próximos cristais pode ser alterada, pois para esse grupo somente é necessária a coleta de 30° ao invés da coleta de 360° realizada para cristais com baixa simetria como por exemplo o grupo espacial P1.

Por outro lado, um fato interessante que distingue os cristais de ‘MurC:MurF’ dos outros cristais das enzimas Mur individuais é o tamanho da célula unitária. Os cristais de ‘MurC:MurF’ apresentam dimensões celulares de  $a=162.32$   $b=162.32$  e  $c=347.5$  (Å) nos ângulos  $\alpha=90$ ,  $\beta=90$ ,  $\gamma=120$  o qual representa o dobro do tamanho das enzimas Mur individuais depositadas no PDB. No entanto, são necessárias mais análises que permitam concluir se o cristal é formado pelas proteínas MurC e MurF ou somente por umas das proteínas individuais.

Como existem muitas estruturas publicadas das enzimas Mur foi possível proceder à substituição molecular. O primeiro passo para iniciar a substituição molecular é encontrar uma estrutura cristalográfica com no mínimo 30% de similaridade em relação a nova estrutura a ser resolvida, posteriormente é necessário localizar e orientar o modelo dentro da célula unitária do cristal da estrutura desconhecida a fim de correlacionar os dados do modelo com os dados experimentais. Os programas de substituição molecular, como por exemplo o programa Phaser usa algoritmos baseados na máxima semelhança entre os modelos.

As enzimas Mur podem se apresentar em diferentes conformações dependendo da presença ou ausência do substrato e ATP. Neste caso dos ligantes estarem presentes, ocorre uma rotação do domínio C-terminal e a molécula torna-se mais compacta, porém na sua ausência a proteína está completamente aberta, ou seja, os domínios N- e C-terminal estão completamente afastados (Perdih *et al.*, 2007).

Teoricamente, os cristais ‘MurC:MurF’ deveriam estar em uma conformação mais fechada, pois foram previamente incubados com o substrato de cada enzima e AMP-PNP. Deste modo, um teste de substituição molecular foi realizado com o modelo da enzima MurF de *S. pneumoniae* (código PDB 3ZM5) que se apresenta na conformação fechada. Como não há estrutura de MurC de *S. pneumoniae*, foi necessário utilizar as estruturas de MurC de outras espécies depositadas no PDB.

No entanto, não é possível afirmar que MurC e MurF no cristal se apresentam na conformação fechada, pois podem haver conformações intermediárias que também são cristalizáveis como relatado por Šink *et al.*, (2016) que mostraram pela primeira vez que a enzima MurD mesmo na ausência de ligantes não está completamente aberta. Este fato foi quantificado pela determinação dos valores de RMSD (do inglês “Root Mean Square deviation”) de todas as estruturas de MurD sobrepostas.

Atualmente, nossos dados de substituição molecular estão sendo processados no IBS pelo cristalógrafo do nosso grupo Dr. Carlos Contreras-Martel. Para isto, estão sendo utilizadas diferentes estratégias, tais como o processamento de seis moléculas de MurC/MurF ou três moléculas de MurC e três de MurF. Além disso, também está sendo processado somente os domínios mais conservados de cada Mur, ou seja, domínios 1 e 2, já que o domínio C-terminal pode se apresentar em diferentes conformações estruturais.

Por outro lado, está sendo realizado o refinamento manual dos cristais em placas de 24 poços utilizando diferentes estratégias, tais como:

- Variação da concentração da proteína. Uma vez que a nucleação desses cristais é muito rápida e isso promove a formação de poli-cristais extremamente pequenos.
- Mudanças na temperatura de cristalização. Estão sendo testadas três diferentes 4, 14 e 18 °C com a finalidade de produzir cristais únicos e maiores.
- Macro-seeding. Esta técnica está sendo empregada a fim de diminuir a nucleação e formar cristais únicos a partir de um cristal de boa qualidade.

No caso destes cristais em análise realmente pertencerem ao complexo entre as enzimas MurC e MurF permitirá o avanço na compreensão de como estas proteínas atuam no momento da biossíntese do peptidoglicano e será possível esclarecer quais são as interações pelas quais os complexos são formados. Deste modo, ensaios de mutação sítio dirigida podem ser realizados com a finalidade de bloquear a formação dos complexos e impedir a divisão celular bacteriana.

## 8. CONCLUSÃO

As Enzimas Mur juntamente com MraY e MurG participam da mesma via metabólica essencial para a sobrevivência da célula bacteriana, a qual conduz à formação do lipídeo II, unidade formadora do peptidoglicano. Embora existam muitos trabalhos que descrevam a função das proteínas nas células, como já foi descrito anteriormente, pouco se sabe sobre a organização espaço-temporal destas enzimas que coordenam os processos de alongação e divisão celular.

A formação de um mega-complexo formado entre os oligômeros das enzimas Mur em associação com MurG e possivelmente com MraY, pode indicar que esta rede de interações oferece vantagens em termos de eficiência celular, uma vez que auxiliaria na dinâmica do processo de síntese garantindo que o ciclo celular se mantenha funcional. Este trabalho permitiu a caracterização de um potencial mega-complexo formado por diferentes enzimas (**Fig. 8.1**) e além disso, permitirá a abertura de um novo caminho para a compreensão deste sistema complexo.

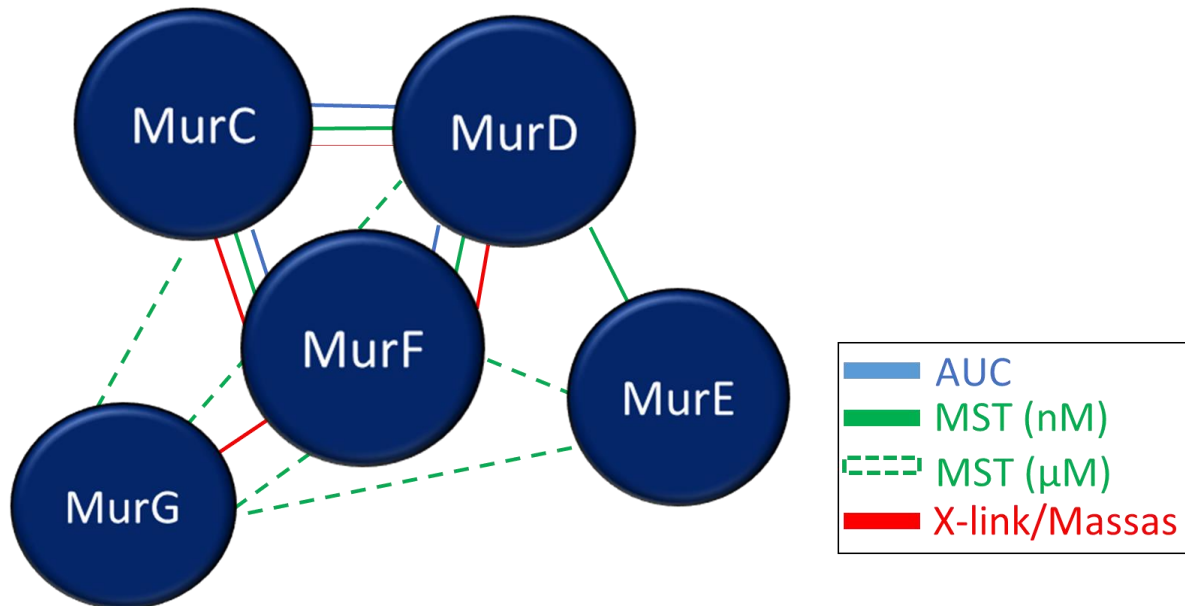
O estudo com a proteína integral de membrana MraY fusionada à Mystic nos permitiu concluir que a proteína pode ser produzida em grandes quantidades no sistema de expressão de *E. coli*, bem como ser purificada satisfatoriamente e mantida solúvel com o uso do detergente DDM. Além disso, estudos com o operon *murF-mraY* de *Thermotoga maritima* mostraram que possivelmente estas proteínas possam interagir, embora sejam necessários experimentos que confirmem nossa hipótese.

A partir das diversas análises biofísicas que foram realizadas ao decorrer deste trabalho, com realizadas com as enzimas Mur e a proteína MurG observamos pela primeira vez que:

- As enzimas Mur são capazes de formar oligômeros que são dependentes da concentração de proteína em solução, os quais estão altamente relacionados com a formação de um mega-complexo entre as ligases Mur e a proteína MurG;



- A proteína MurG tem a capacidade de se auto-associar para formar grandes oligômeros solúveis, os quais são dependentes da concentração de detergente na solução. Isto pode ser considerado um processo dinâmico para a montagem do mega-complexo entre o citoplasma e a membrana celular;



**Figura 8.1. Modelo esquemático das interações entre as enzimas Mur.** Cada linha representa diferentes ensaios que foram realizados para as análises dos complexos das proteínas mur. As linhas azuis representam as interações que foram observadas através da técnica de ultracentrifugação analítica pelo método de velocidade (AUC). As linhas verdes inteiras representam as interações através do ensaio de termoforese em micro-escala (MST); as linhas verdes inteiras mostram interações na ordem de nM, enquanto que as linhas verdes tracejadas representam interações na ordem de μM. E as linhas vermelhas representam as interações das enzimas Mur que foram observadas nos ensaios de cross-linking químico com DSS acoplado ao ensaio de espectrometria de massas.

Os resultados apresentados neste trabalho certamente irão auxiliar na compreensão de como ocorrem as interações em diferentes etapas da formação do peptidoglicano, tendo em vista que MurC-MurF estão localizadas no citoplasma e participam nos primeiros passos de formação da parede celular, enquanto que MurG está anexada à membrana citoplasmática e está envolvida nos passos finais de formação do peptidoglicano na membrana.

Além disso, os resultados apresentados fornecem novas informações sobre a interação direta das proteínas Mur e marca um importante passo na caracterização de um mega-

complexo para o primeiro estágio de síntese do peptideoglicano no citoplasma. Por fim, esse estudo suporta a hipótese de que processos celulares não devem ser encarados como vias independentes, mas como maquinarias que executam funções através de multi-complexos altamente coordenados, e deste modo, permite-se novas possibilidades para o desenvolvimento de drogas que inibam a formação desses complexos e impeçam a formação da parede celular bacteriana.

## REFERÊNCIAS

Abdali, N., Parks, J.M., Haynes, K.M., Chaney, J.L., Green, A.T., Wolloscheck, D., Walker, J.K., Rybenkov, V.V., Baudry, J., Smith, J.C., et al. (2017). Reviving Antibiotics: Efflux Pump Inhibitors That Interact with AcrA, a Membrane Fusion Protein of the AcrAB-TolC Multidrug Efflux Pump. *ACS Infect. Dis.* 3, 89–98.

Al-Dabbagh, B., Henry, X., El Ghachi, M., Auger, G., Blanot, D., Parquet, C., Mengin-Lecreulx, D., and Bouhss, A. (2008). Active site mapping of MraY, a member of the polyprenyl-phosphate N-acetylhexosamine 1-phosphate transferase superfamily, catalyzing the first membrane step of peptidoglycan biosynthesis. *Biochemistry* 47, 8919–8928.

Alves, N.S., Astrinidis, S.A., Eisenhardt, N., Sieverding, C., Redolfi, J., Lorenz, M., Weberruss, M., Moreno-Andrés, D., and Antonin, W. (2017). MISTIC-fusion proteins as antigens for high quality membrane protein antibodies. *Sci Rep* 7, 41519.

Anderson, J.S., Matsushashi, M., Haskin, M.A., and Strominger, J.L. (1965). LIPID PHOSPHOACETYLMURAMYL-PENTAPEPTIDE AND LIPID PHOSPHODISACCHARIDE-PENTAPEPTIDE: PRESUMED MEMBRANE TRANSPORT INTERMEDIATES IN CELL WALL SYNTHESIS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 53, 881–889.

Arachea B.T, Sun Z, Potente N, Malik R, Isailovic D, Viola R.E. (2012) Detergent selection for enhanced extraction of membrane proteins *Protein Expr Purif.* 86(1):12-20.

Aragao, A., Belloni, M., Simabuco, F., R Zanetti, M., Yokoo, S., Domingues, R., Kawahara, R., Pauletti, B., Gonçalves, A., Agostini, M., et al. (2012). Novel Processed Form of Syndecan-1 Shed from SCC-9 Cells Plays a Role in Cell Migration. *PloS One* 7, e43521.

ARIGA, T. (2011). The role of sulfoglucuronosyl glycosphingolipids in the pathogenesis of monoclonal IgM paraproteinemia and peripheral neuropathy. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 87, 386–404

Assis, L.M., Nedeljković, M., and Dessen, A. (2017). New strategies for targeting and treatment of multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. *Drug Resist. Updat.* 31, 1–14.

AUC Service: Protein aggregation analysis by SV-AUC (Sedimentation Velocity Analytical Ultracentrifugation) | Coriolis Pharma ([http://www.coriolis-pharma.com/contract-analytical-services/analytical-ultracentrifugation-\(sv-auc\)/](http://www.coriolis-pharma.com/contract-analytical-services/analytical-ultracentrifugation-(sv-auc)/)).

Barreteau, H., Kovac, A., Boniface, A., Sova, M., Gobec, S., and Blanot, D. (2008). Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 168–207.

Basavannacharya, C., Moody, P.R., Munshi, T., Cronin, N., Keep, N.H., and Bhakta, S. (2010). Essential residues for the enzyme activity of ATP-dependent MurE ligase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Cell* 1, 1011–1022.

- Basavannacharya, C., Robertson, G., Munshi, T., Keep, N.H., and Bhakta, S. (2010). ATP-dependent MurE ligase in *Mycobacterium tuberculosis*: biochemical and structural characterisation. *Tuberculosis (Edinb)* 90, 16–24.
- Batoulis, H., Schmidt, T.H., Weber, P., Schloetel, J.-G., Kandt, C., and Lang, T. (2016). Concentration Dependent Ion-Protein Interaction Patterns Underlying Protein Oligomerization Behaviours. *Scientific Reports* 6, 24131.
- Bertrand, J. A., Auger, G., Martin, L., Fanchon, E., Blanot, D., Le Beller, D., van Heijenoort, J. & Dideberg, O. (1999). *J. Mol. Biol.* 289, 579–590.
- Bertrand, J.A., Fanchon, E., Martin, L., Chantalat, L., Auger, G., Blanot, D., van Heijenoort, J., and Dideberg, O. (2000). “Open” structures of MurD: domain movements and structural similarities with folylpolyglutamate synthetase. *J. Mol. Biol.* 301, 1257–1266.
- Bhandari, P. ; Gowrishankar, J. (1997) An *Escherichia coli* host strain useful for efficient overproduction of cloned gene products with NaCl as the inducer *Journal of Bacteriology*, 179 (13). pp. 4403-4406.
- Bos, M.P., Robert, V., and Tommassen, J. (2007). Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 191–214.
- Bouhss, A., Mengin-Lecreulx, D., Blanot, D., van Heijenoort, J., and Parquet, C. (1997). Invariant amino acids in the Mur peptide synthetases of bacterial peptidoglycan synthesis and their modification by site-directed mutagenesis in the UDP-MurNAc:L-alanine ligase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 36, 11556–11563.
- Bouhss, A., Josseaume, N., Severin, A., Tabei, K., Hugonnet, J.-E., Shlaes, D., Mengin-Lecreulx, D., Van Heijenoort, J., and Arthur, M. (2002). Synthesis of the L-alanyl-L-alanine cross-bridge of *Enterococcus faecalis* peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* 277, 45935–45941.
- Bouhss, A., Crouvoisier, M., Blanot, D., and Mengin-Lecreulx, D. (2004). Purification and characterization of the bacterial *MraY* translocase catalyzing the first membrane step of peptidoglycan biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 279, 29974–29980.
- Bouhss, A., Trunkfield, A.E., Bugg, T.D.H., and Mengin-Lecreulx, D. (2008). The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 208–233.
- Boyle, D.S., and Donachie, W.D. (1998). *mraY* is an essential gene for cell growth in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180, 6429–6432.
- Braun, V., and Wolff, H. (1970). The murein-lipoprotein linkage in the cell wall of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 14, 387–391.
- Braun, V. (2015). Bacterial cell wall research in Tübingen: A brief historical account. *International Journal of Medical Microbiology* 305, 178–182.
- Broecker, J., Fiedler, S., Gimpl, K., and Keller, S. (2014). Polar interactions trump hydrophobicity in stabilizing the self-inserting membrane protein *MistC*. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 13761–13768.

- Brown, L., Wolf, J.M., Prados-Rosales, R., and Casadevall, A. (2015). Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* *13*, 620–630.
- Bruni, R., and Kloss, B. (2013). High-throughput cloning and expression of integral membrane proteins in *Escherichia coli*. *Curr Protoc Protein Sci* *74*, Unit 29.6.
- Bugg, T.D., and Walsh, C.T. (1992). Intracellular steps of bacterial cell wall peptidoglycan biosynthesis: enzymology, antibiotics, and antibiotic resistance. *Nat Prod Rep* *9*, 199–215.
- Bugg, T.D.H., Braddick, D., Dowson, C.G., and Roper, D.I. (2011). Bacterial cell wall assembly: still an attractive antibacterial target. *Trends Biotechnol.* *29*, 167–173.
- Bugni, T.S. (2017). Review of Mass Spectrometry: Instrumentation, Interpretation, and Applications. *J. Nat. Prod.* *80*, 574–575.
- Bupp, K., and van Heijenoort, J. (1993). The final step of peptidoglycan subunit assembly in *Escherichia coli* occurs in the cytoplasm. *J. Bacteriol.* *175*, 1841–1843.
- Carpenter, E. P., et al. (2008). "Overcoming the challenges of membrane protein crystallography." *Curr Opin Struct Biol* *18*(5): 581-586.
- Chen, Z.A., Jawhari, A., Fischer, L., Buchen, C., Tahir, S., Kamenski, T., Rasmussen, M., Lariviere, L., Bukowski-Wills, J.-C., Nilges, M., et al. (2010). Architecture of the RNA polymerase II-TFIIF complex revealed by cross-linking and mass spectrometry. *EMBO J.* *29*, 717–726.
- Chowdhury, A., et al. (2012). "Mistic and TarCF as fusion protein partners for functional expression of the cannabinoid receptor 2 in *Escherichia coli*." *Protein Expr Purif* *83*(2): 128-134.
- Chu, F., Shan, S., Moustakas, D.T., Alber, F., Egea, P.F., Stroud, R.M., Walter, P., and Burlingame, A.L. (2004). Unraveling the interface of signal recognition particle and its receptor by using chemical cross-linking and tandem mass spectrometry. *PNAS* *101*, 16454–16459.
- Chung, B.C., Zhao, J., Gillespie, R.A., Kwon, D.-Y., Guan, Z., Hong, J., Zhou, P., and Lee, S.-Y. (2013). Crystal structure of MraY, an essential membrane enzyme for bacterial cell wall synthesis. *Science* *341*, 1012–1016.
- Chung, B.C., Mashalidis, E.H., Tanino, T., Kim, M., Matsuda, A., Hong, J., Ichikawa, S., and Lee, S.-Y. (2016). Structural insights into inhibition of Lipid I production in bacterial cell wall synthesis. *Nature* *533*, 557–560.
- Corchero, J. L. and Villaverde, A. (1998) Plasmid maintenance in *Escherichia coli* recombinant cultures is dramatically, steadily, and specifically influenced by features of the encoded proteins. *Biotechnol. Bioeng.* *58*, 625–632.

Crouvoisier, M., Mengin-Lecreulx, D., and van Heijenoort, J. (1999). UDP-N-acetylglucosamine:N-acetylmuramoyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl undecaprenol N-acetylglucosamine transferase from *Escherichia coli*: overproduction, solubilization, and purification. *FEBS Lett.* *449*, 289–292.

Dassa, E., and Hofnung, M. (1985). Sequence of gene *malG* in *E. coli* K12: homologies between integral membrane components from binding protein-dependent transport systems. *EMBO J* *4*, 2287–2293.

Deva, T., Baker, E.N., Squire, C.J., and Smith, C.A. (2006). Structure of *Escherichia coli* UDP-N-acetylmuramoyl:L-alanine ligase (MurC). *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *62*, 1466–1474.

Dimova, K., Kalkhof, S., Pottratz, I., Ihling, C., Rodriguez-Castaneda, F., Liepold, T., Griesinger, C., Brose, N., Sinz, A., and Jahn, O. (2009). Structural Insights into the Calmodulin–Munc13 Interaction Obtained by Cross-Linking and Mass Spectrometry. *Biochemistry* *48*, 5908–5921.

Dobrovetsky, E., Lu, M.L., Andorn-Broza, R., Khutoreskaya, G., Bray, J.E., Savchenko, A., Arrowsmith, C.H., Edwards, A.M., and Koth, C.M. (2005). High-throughput production of prokaryotic membrane proteins. *J. Struct. Funct. Genomics* *6*, 33–50.

Dramsi, S., Magnet, S., Davison, S., and Arthur, M. (2008). Covalent attachment of proteins to peptidoglycan. *FEMS Microbiology Reviews* *32*, 307–320.

Dvir, H. and S. Choe (2009). "Bacterial expression of a eukaryotic membrane protein in fusion to various Mistic orthologs." *Protein Expr Purif* **68**(1): 28-33.

Egan, A.J.F., and Vollmer, W. (2013). The physiology of bacterial cell division. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1277*, 8–28.

El Zoeiby, A., Sanschagrin, F., and Levesque, R.C. (2003). Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors. *Mol. Microbiol.* *47*, 1–12.

Engel, A., and Gaub, H.E. (2008). Structure and mechanics of membrane proteins. *Annu. Rev. Biochem.* *77*, 127–148.

Evans, O., and O'reilly, D. (1998). Purification and kinetic analysis of a baculovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase. *Biochem. J.* *332*, 807–808.

Favini-Stabile, S., Contreras-Martel, C., Thielens, N., and Dessen, A. (2013). MreB and MurG as scaffolds for the cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *Environ. Microbiol.* *15*, 3218–3228.

Folta-Stogniew, E. (2006). Oligomeric States of Proteins Determined by Size-Exclusion Chromatography Coupled With Light Scattering, Absorbance, and Refractive Index Detectors. In *New and Emerging Proteomic Techniques*, (Humana Press), pp. 97–112.

Fu, C., Uetrecht, C., Kang, S., Morais, M.C., Heck, A.J.R., Walter, M.R., and Prevelige, P.E. (2010). A Docking Model Based on Mass Spectrometric and Biochemical Data Describes Phage Packaging Motor Incorporation. *Mol Cell Proteomics* *9*, 1764–1773.

Gaballah, A., Kloeckner, A., Otten, C., Sahl, H.-G., and Henrichfreise, B. (2011). Functional analysis of the cytoskeleton protein MreB from *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS ONE* 6, e25129.

Gabizon, R., and Friedler, A. (2014). Allosteric modulation of protein oligomerization: an emerging approach to drug design. *Front Chem* 2.

Garland Science. Production of Proteins from Cloned Genes. [http://www.garlandscience.com/res/pdf/9780815341383\\_ch9.pdf](http://www.garlandscience.com/res/pdf/9780815341383_ch9.pdf).

Gordon, E., Flouret, B., Chantalat, L., van Heijenoort, J., Mengin-Lecreulx, D., and Dideberg, O. (2001). Crystal structure of UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate: meso-diaminopimelate ligase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 276, 10999–11006.

Grisshammer, R., and Tate, C.G. (1995). Overexpression of integral membrane proteins for structural studies. *Q. Rev. Biophys.* 28, 315–422.

Ha, S., Walker, D., Shi, Y., and Walker, S. (2000). The 1.9 Å crystal structure of *Escherichia coli* MurG, a membrane-associated glycosyltransferase involved in peptidoglycan biosynthesis. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 9, 1045–1052.

Hajipour, M.J., Fromm, K.M., Ashkarran, A.A., Jimenez de Aberasturi, D., de Larramendi, I.R., Rojo, T., Serpooshan, V., Parak, W.J., and Mahmoudi, M. (2012). Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol.* 30, 499–511.

Hakulinen, J.K., Hering, J., Brändén, G., Chen, H., Snijder, A., Ek, M., and Johansson, P. (2017). MraY-antibiotic complex reveals details of tunicamycin mode of action. *Nat. Chem. Biol.* 13, 265–267.

Halouska, S., Fenton, R.J., Zinniel, D.K., Marshall, D.D., Barletta, R.G., and Powers, R. (2014). Metabolomics Analysis Identifies D-Alanine-D-alanine Ligase as the Primary Lethal Target of D-cycloserine in *Mycobacteria*. *J Proteome Res* 13, 1065–1076.

Hameed P, S., Manjrekar, P., Chinnapattu, M., Humnabadkar, V., Shanbhag, G., Kedari, C., Mudugal, N.V., Ambady, A., de Jonge, B.L.M., Sadler, C., et al. (2014). Pyrazolopyrimidines establish MurC as a vulnerable target in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *ACS Chem. Biol.* 9, 2274–2282.

Heydanek, M.G., Linzer, R., Pless, D.D., and Neuhaus, F.C. (1970). Initial stage in peptidoglycan synthesis. Mechanism of activation of phospho-N acetylmuramylpentapeptide translocase by potassium ions. *Biochemistry (Mosc.)* 9, 3618–3623.

Holding, A.N. (2015). XL-MS: Protein cross-linking coupled with mass spectrometry. *Methods* 89, 54–63.

- Hu, Y., Chen, L., Ha, S., Gross, B., Falcone, B., Walker, D., Mokhtarzadeh, M., and Walker, S. (2003). Crystal structure of the MurG:UDP-GlcNAc complex reveals common structural principles of a superfamily of glycosyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 845–849.
- Hugonnet, J.-E., Mengin-Lecreulx, D., Monton, A., den Blaauwen, T., Carbonnelle, E., Veckerlé, C., Brun, Y.V., van Nieuwenhze, M., Bouchier, C., Tu, K., et al. (2016). Factors essential for L,D-transpeptidase-mediated peptidoglycan cross-linking and  $\beta$ -lactam resistance in *Escherichia coli*. *eLife* *5*.
- Ishihara, G., et al. (2005). "Expression of G protein coupled receptors in a cellfree translational system using detergents and thioredoxin-fusion vectors." *Protein Expr Purif* **41**(1): 27-37.
- Jerabek-Willemsen, M., André, T., Wanner, R., Roth, H.M., Duhr, S., Baaske, P., and Breitsprecher, D. (2014). MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *Journal of Molecular Structure* *1077*, 101–113.
- Jerabek-Willemsen, M., Wienken, C.J., Braun, D., Baaske, P., and Duhr, S. (2011). Molecular Interaction Studies Using Microscale Thermophoresis. *Assay Drug Dev Technol* *9*, 342–353.
- Kefala, G., et al. (2007). "Application of Mistic to improving the expression and membrane integration of histidine kinase receptors from *Escherichia coli*." *J Struct Funct Genomics* **8**(4): 167-172.
- Kim, S.C., Singh, A.N., and Raushel, F.M. (1988). Analysis of the galactosyltransferase reaction by positional isotope exchange and secondary deuterium isotope effects. *Arch. Biochem. Biophys.* *267*, 54–59.
- Kimata-Arigo, Y., Kubota-Kawai, H., Lee, Y.-H., Muraki, N., Ikegami, T., Kurisu, G., and Hase, T. (2013). Concentration-dependent oligomerization of cross-linked complexes between ferredoxin and ferredoxin–NADP<sup>+</sup> reductase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *434*, 867–872.
- Klammt, C., et al. (2005). "Evaluation of detergents for the soluble expression of alpha-helical and beta-barrel-type integral membrane proteins by a preparative scale individual cell-free expression system." *FEBS J* **272**(23): 6024- 6038.
- Kouidmi, I., Levesque, R., and Paradis-Bleau, C. (2014). The biology of Mur ligases as an antibacterial target. *Molecular Microbiology* *94*.
- Kurokawa, K., Nishida, S., Ishibashi, M., Mizumura, H., Ueno, K., Yutsudo, T., Maki, H., Murakami, K., and Sekimizu, K. (2008). *Staphylococcus aureus* MurC participates in L-alanine recognition via histidine 343, a conserved motif in the shallow hydrophobic pocket. *J. Biochem.* *143*, 417–424.
- Laddomada, F., Miyachiro, M.M., and Dessen, A. (2016). Structural Insights into Protein-Protein Interactions Involved in Bacterial Cell Wall Biogenesis. *Antibiotics (Basel)* *5*.
- Landau, E. M. and J. P. Rosenbusch (1996). "Lipidic cubic phases: a novel concept for the crystallization of membrane proteins." *Proc Natl Acad Sci USA* **93**(25): 14532-14535.



Lecerclé, D., Clouet, A., Al-Dabbagh, B., Crouvoisier, M., Bouhss, A., Gravier-Pelletier, C., and Le Merrer, Y. (2010). Bacterial transferase MraY inhibitors: synthesis and biological evaluation. *Bioorg. Med. Chem.* *18*, 4560–4569.

Lee, K.A., Lee, S.-S., Kim, S.Y., Choi, A.R., Lee, J.-H., and Jung, K.-H. (2015). Mistic-fused expression of algal rhodopsins in *Escherichia coli* and its photochemical properties. *Biochim. Biophys. Acta* *1850*, 1694–1703.

Leitner, A. (2016). Cross-linking and other structural proteomics techniques: how chemistry is enabling mass spectrometry applications in structural biology. *Chemical Science* *7*, 4792–4803.

Liu, F., Rijkers, D.T.S., Post, H., and Heck, A.J.R. (2015). Proteome-wide profiling of protein assemblies by cross-linking mass spectrometry. *Nature Methods* *12*, 1179.

Lloyd, A.J., Brandish, P.E., Gilbey, A.M., and Bugg, T.D.H. (2004). Phospho-N-acetylmuramyl-pentapeptide translocase from *Escherichia coli*: catalytic role of conserved aspartic acid residues. *J. Bacteriol.* *186*, 1747–1757.

Loll, P.J. (2014). Membrane proteins, detergents and crystals: what is the state of the art? *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* *70*, 1576–1583.

Longenecker, K.L., Stamper, G.F., Hajduk, P.J., Fry, E.H., Jakob, C.G., Harlan, J.E., Edalji, R., Bartley, D.M., Walter, K.A., Solomon, L.R., et al. (2005). Structure of MurF from *Streptococcus pneumoniae* co-crystallized with a small molecule inhibitor exhibits interdomain closure. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *14*, 3039–3047.

Lorieau J.L, Maltsev A.S, Louis J.M, Bax A. (2013) Modulating alignment of membrane proteins in liquid-crystalline and oriented gel media by changing the size and charge of phospholipid bicelles *J Biomol NMR.* *55*(4):369-77.

Lovering, A.L., Safadi, S.S., and Strynadka, N.C.J. (2012). Structural perspective of peptidoglycan biosynthesis and assembly. *Annu. Rev. Biochem.* *81*, 451–478.

Lyukmanova, E.N., Shenkarev, Z.O., Khabibullina, N.F., Kopeina, G.S., Shulepko, M.A., Paramonov, A.S., Mineev, K.S., Tikhonov, R.V., Shingarova, L.N., Petrovskaya, L.E., et al. (2012). Lipid-protein nanodiscs for cell-free production of integral membrane proteins in a soluble and folded state: comparison with detergent micelles, bicelles and liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* *1818*, 349–358.

Macheboeuf, P., Contreras-Martel, C., Job, V., Dideberg, O., and Dessen, A. (2006). Penicillin Binding Proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS Microbiology Reviews* *30*, 673–691.

Mancusso, R., Karpowich, N.K., Czyzewski, B.K., and Wang, D.-N. (2011). Simple screening method for improving membrane protein thermostability. *Methods* *55*, 324–329.

Manuel García-Ruiz, J. (2003). Nucleation of protein crystals. *Journal of Structural Biology* *142*, 22–31.

Marraffini, L.A., Dedent, A.C., and Schneewind, O. (2006). Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *70*, 192–221.

Mattei, P.-J., Neves, D., and Dessen, A. (2010). Bridging cell wall biosynthesis and bacterial morphogenesis. *Current Opinion in Structural Biology* *20*, 749–755.

McGroty, S.E., Pattaniyil, D.T., Patin, D., Blanot, D., Ravichandran, A.C., Suzuki, H., Dobson, R.C.J., Savka, M.A., and Hudson, A.O. (2013). Biochemical Characterization of UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate: meso-2,6-diaminopimelate ligase (MurE) from *Verrucomicrobium spinosum* DSM 4136T. *PLOS ONE* *8*, e66458.

Men, H., Park, P., Ge, M., and Walker, S. (1998). Substrate Synthesis and Activity Assay for MurG. *J. Am. Chem. Soc.* *120*, 2484–2485.

Mengin-Lecreux, D., Texier, L., Rousseau, M., and van Heijenoort, J. (1991). The murG gene of *Escherichia coli* codes for the UDP-N-acetylglucosamine: N-acetylmuramyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol Nacetylglucosamine transferase involved in the membrane steps of peptidoglycan synthesis. *J. Bacteriol.* *173*, 4625–4636.

Mengin-Lecreux, D., and van Heijenoort, J. (1994). Copurification of glucosamine-1-phosphate acetyltransferase and N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase activities of *Escherichia coli*: characterization of the glmU gene product as a bifunctional enzyme catalyzing two subsequent steps in the pathway for UDP-N-acetylglucosamine synthesis. *J. Bacteriol.* *176*, 5788–5795.

Mengin-Lecreux, D., van Heijenoort, J., and Park, J.T. (1996). Identification of the mpl gene encoding UDP-N-acetylmuramate: L-alanyl-gamma-D-glutamyl mesodiaminopimelate ligase in *Escherichia coli* and its role in recycling of cell wall peptidoglycan. *J. Bacteriol.* *178*, 5347–5352.

Mengin-Lecreux, D., and Lemaitre, B. (2005). Structure and metabolism of peptidoglycan and molecular requirements allowing its detection by the *Drosophila* innate immune system. *J. Endotoxin Res.* *11*, 105–111.

Mohammadi, T., Karczmarek, A., Crouvoisier, M., Bouhss, A., Mengin-Lecreux, D., and den Blaauwen, T. (2007). The essential peptidoglycan glycosyltransferase MurG forms a complex with proteins involved in lateral envelope growth as well as with proteins involved in cell division in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *65*, 1106–1121.

Mol, C.D., Brooun, A., Dougan, D.R., Hilgers, M.T., Tari, L.W., Wijnands, R.A., Knuth, M.W., McRee, D.E., and Swanson, R.V. (2003). Crystal Structures of Active Fully Assembled Substrate- and Product-Bound Complexes of UDP-N-Acetylmuramic Acid:l-Alanine Ligase (MurC) from *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol.* *185*, 4152–4162.

Møller, J.V., and le Maire, M. (1993). Detergent binding as a measure of hydrophobic surface area of integral membrane proteins. *J. Biol. Chem.* *268*, 18659–18672.

Moraes I, Evans G, Sanchez-Weatherby J, Newstead S, Stewart P.D. (2014) Membrane protein structure determination - the next generation *Biochim Biophys Acta.* *1838(1 Pt A):78-87.*

Moraes, G.L., Gomes, G.C., de Sousa, P.R.M., Alves, C.N., Govender, T., Kruger, H.G., Maguire, G.E.M., Lamichhane, G., and Lameira, J. (2015). Structural and functional features of enzymes of *Mycobacterium tuberculosis* peptidoglycan biosynthesis as targets for drug development. *Tuberc. Edinb. Scotl.* 95, 95–111.

Mravljak, J., Monasson, O., Al-Dabbagh, B., Crouvoisier, M., Bouhss, A., Gravier-Pelletier, C., and Le Merrer, Y. (2011). Synthesis and biological evaluation of a diazepamone-based library of liposidomycins analogs as MraY inhibitors. *Eur J Med Chem* 46, 1582–1592.

Munshi, T., Gupta, A., Evangelopoulos, D., Guzman, J.D., Gibbons, S., Keep, N.H., and Bhakta, S. (2013) Characterisation of ATP-dependent Mur ligases involved in the biogenesis of cell wall peptidoglycan in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE* 8: e60143.

Mus-Veteau, I., Demange P., Zito, F. (2014) Chapter 1. Membrane Protein Production for Structural Analysis. Springer.

Nanninga, N. (1991). Cell division and peptidoglycan assembly in *Eschenchia coli*. *Molecular Microbiology* 5, 791–795.

Neophytou, I., et al. (2007). "Eukaryotic integral membrane protein expression utilizing the *Escherichia coli* glycerol-conducting channel protein (GlpF)." *Appl Microbiol Biotechnol* 77(2): 375-381.

Neuhaus, F.C., and Baddiley, J. (2003). A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 686–723.

Neuhaus, F.C., and Struve, W.G. (1965). Enzymatic Synthesis of Analogs of the Cell-Wall Precursor. I. Kinetics and Specificity of Uridine Diphospho-N-acetylmuramyl-L-alanyl Dglutamyl-L-lysine:D-Alanyl-D-alanine Ligase (Adenosine Diphosphate) from *Streptococcus faecalis* R\*. *Biochemistry (Mosc.)* 4, 120–131.

Ostermeier, C. and H. Michel (1997). "Crystallization of membrane proteins." *Curr Opin Struct Biol* 7(5): 697-701.

Paré, J.R., and Yaylayan, V. (1997). Chapter 7 Mass spectrometry: Principles and applications. In *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, J.R.J. Paré, and J.M.R. Bélanger, eds. (Elsevier), pp. 239–266.

Paulsson, J. and Ehrenberg, M. (2001) Noise in a minimal regulatory network: plasmid copy number control. *Q. Rev. Biophys.* 34,1–59.

Perdih, A., Kotnik, M., Hodoscek, M., and Solmajer, T. (2007). Targeted molecular dynamics simulation studies of binding and conformational changes in *E. coli* MurD. *Proteins* 68, 243–254.

Perkins, J.R., Diboun, I., Dessailly, B.H., Lees, J.G., and Orengo, C. (2010). Transient Protein-Protein Interactions: Structural, Functional, and Network Properties. *Structure* 18, 1233–1243.

Peters, W.H.M., Nagengast, F.M., and Tongeren, J.H.M. van (1989). Glutathione S-transferase, cytochrome P450, and uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransferase in human small intestine and liver. *Gastroenterology* 96, 783–789.

Prince, C.C., and Jia, Z. (2013). Detergent quantification in membrane protein samples and its application to crystallization experiments. *Amino Acids* 45, 1293–1302.

Prive, G. G. (2007). "Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins." *Methods* 41(4): 388-397.

Proverbio, D., Roos, C., Beyermann, M., Orbán, E., Dötsch, V., and Bernhard, F. (2013). Functional properties of cell-free expressed human endothelin A and endothelin B receptors in artificial membrane environments. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 2182–2192.

Radaev, S., Li, S., and Sun, P.D. (2006). A survey of protein-protein complex crystallizations. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 62, 605–612.

Rappsilber, J., Siniosoglou, S., Hurt, E.C., and Mann, M. (2000). A generic strategy to analyze the spatial organization of multi-protein complexes by cross-linking and mass spectrometry. *Anal. Chem.* 72, 267–275.

Rappsilber, J. (2011). The beginning of a beautiful friendship: Cross-linking/mass spectrometry and modelling of proteins and multi-protein complexes. *J Struct Biol* 173, 530–540.

Rogers, H.J., Perkins, H.R., and Ward, J.B. (1980). *Microbial Cell Walls and Membranes* J. MED. MICROBIOL.-VOL. 14, 501-508.

Roosild, T. P., et al. (2005). "NMR structure of Mistic, a membrane-integrating protein for membrane protein expression." *Science* 307(5713): 1317-1321.

Ruane, K.M., Lloyd, A.J., Fülöp, V., Dowson, C.G., Barreteau, H., Boniface, A., Dementin, S., Blanot, D., Mengin-Lecreulx, D., Gobec, S., et al. (2013). Specificity Determinants for Lysine Incorporation in Staphylococcus aureus Peptidoglycan as Revealed by the Structure of a MurE Enzyme Ternary Complex. *J Biol Chem* 288, 33439–33448.

Sahin, E., and Roberts, C.J. (2012). Size-exclusion chromatography with multi-angle light scattering for elucidating protein aggregation mechanisms. *Methods Mol. Biol.* 899, 403–423.

Saluta, M. and Bell, P. A. (1998) *Troubleshooting GST fusion protein expression in E. coli*. Life Science News, Amersham Biosciences.

Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J.A., and Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 234–258.

Scheffers, D.-J., and Pinho, M.G. (2005). Bacterial Cell Wall Synthesis: New Insights from Localization Studies. *Microbiol Mol Biol Rev* 69, 585–607.

Schlegel, S., Klepsch, M., Gialama, D., Wickström, D., Slotboom, D.J., and De Gier, J. (2010). Revolutionizing membrane protein overexpression in bacteria. *Microb Biotechnol* 3, 403–411.

Schlegel, S., Hjelm, A., Baumgarten, T., Vikström, D., and de Gier, J.-W. (2014). Bacterial-based membrane protein production. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1843, 1739–1749.

Schleifer, K.H., and Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev* 36, 407–477.

Schuck, P., Perugini, M.A., Gonzales, N.R., Howlett, G.J., and Schubert, D. (2002). Size-distribution analysis of proteins by analytical ultracentrifugation: strategies and application to model systems. *Biophys. J.* 82, 1096–1111.

Schulze, R.J., Komar, J., Botte, M., Allen, W.J., Whitehouse, S., Gold, V.A.M., Lycklama A Nijeholt, J.A., Huard, K., Berger, I., Schaffitzel, C., et al. (2014). Membrane protein insertion and proton-motive-force-dependent secretion through the bacterial holo-translocon SecYEG-SecDF-YajC-YidC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 4844–4849.

Schwarz, S., Singh, P., Robertson, J.D., LeRoux, M., Skerrett, S.J., Goodlett, D.R., West, T.E., and Mougous, J.D. (2014). VgrG-5 Is a Burkholderia Type VI Secretion System-Exported Protein Required for Multinucleated Giant Cell Formation and Virulence. *Infect. Immun.* 82, 1445–1452.

Seddon, A.M., Curnow, P., and Booth, P.J. (2004). Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim. Biophys. Acta* 1666, 105–117.

Šink, R., Kotnik, M., Zega, A., Barreteau, H., Gobec, S., Blanot, D., Dessen, A., and Contreras-Martel, C. (2016). Crystallographic Study of Peptidoglycan Biosynthesis Enzyme MurD: Domain Movement Revisited. *PLoS ONE* 11, e0152075.

Sinz, A. (2003). Chemical cross-linking and mass spectrometry for mapping three-dimensional structures of proteins and protein complexes. *J. Mass Spectrom.* 38, 1225–1237.

Smith CA (2006) Structure, function and dynamics in the mur family of bacterial cell wall ligases. *J Mol Biol* 362: 640–655.

Solapure, S.M., Raphael, P., Gayathri, C.N., Barde, S.P., Chandrakala, B., Das, K.S., and De Sousa, S.M. (2005). Development of a microplate-based scintillation proximity assay for MraY using a modified substrate. *J Biomol Screen* 10, 149–156.

Stenbak, C.R., Ryu, J.-H., Leulier, F., Pili-Floury, S., Parquet, C., Hervé, M., Chaput, C., Boneca, I.G., Lee, W.-J., Lemaitre, B., et al. (2004). Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by the Drosophila immune deficiency pathway. *J. Immunol.* 173, 7339–7348.

Takayama, S., Chung, S.J., Igarashi, Y., Ichikawa, Y., Sepp, A., Lechler, R.I., Wu, J., Hayashi, T., Siuzdak, G., and Wong, C.H. (1999). Selective inhibition of beta-1,4- and alpha-1,3-galactosyltransferases: donor sugar-nucleotide based approach. *Bioorg. Med. Chem.* 7, 401–409.

Tarazona, M.P., and Saiz, E. (2003). Combination of SEC/MALS experimental procedures and theoretical analysis for studying the solution properties of macromolecules. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 56, 95–116.

Therien, A.G., Glibowicka, M., and Deber, C.M. (2002). Expression and purification of two hydrophobic double-spanning membrane proteins derived from the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Protein Expr. Purif.* 25, 81–86.

Tosi, T., et al. (2014). "Structural similarity of secretins from type II and type III secretion systems." *Structure* 22(9): 1348-1355.

Tran, B.Q., Goodlett, D.R., and Goo, Y.A. (2016). Advances in protein complex analysis by chemical cross-linking coupled with mass spectrometry (CXMS) and bioinformatics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1864, 123–129.

Typas, A., Banzhaf, M., Gross, C.A., and Vollmer, W. (2011). From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat Rev Microbiol* 10, 123–136.

Typas, A., and Sourjik, V. (2015). Bacterial protein networks: properties and functions. *Nature Reviews Microbiology* 13, 559.

Ujwal, R. and J. U. Bowie (2011). "Crystallizing membrane proteins using lipidic bicelles." *Methods* 55(4): 337-341.

Ulf Nobbmann (2014) What is MALS / MALLS multiangle light scattering for SEC? Malvern – Materials Talks (<http://www.materials-talks.com/blog/2014/08/12/multi-angle-light-scattering-mals/>).

User Manual for the Monolith NT.115 – Nanotemper Technologies ([https://www.google.fr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjxvr2w94rYAhVEOZAKHSCpBWkQFgg1MAM&url=http%3A%2F%2Fwww.helsinki.fi%2Fbiosciences%2Fcorefacilities%2Fmicroscalethermophoresis%2FManual\\_NT115.pdf&usg=AOvVaw2rXTduB8NkemZq4XSiI-I4](https://www.google.fr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjxvr2w94rYAhVEOZAKHSCpBWkQFgg1MAM&url=http%3A%2F%2Fwww.helsinki.fi%2Fbiosciences%2Fcorefacilities%2Fmicroscalethermophoresis%2FManual_NT115.pdf&usg=AOvVaw2rXTduB8NkemZq4XSiI-I4)).

van Dam, V., et al. (2007). "Transmembrane transport of peptidoglycan precursors across model and bacterial membranes." *Mol Microbiol* 64(4): 1105-1114.

van den Brink-van der Laan, E., Boots, J.-W.P., Spelbrink, R.E.J., Kool, G.M., Breukink, E., Killian, J.A., and de Kruijff, B. (2003). Membrane interaction of the glycosyltransferase MurG: a special role for cardiolipin. *J. Bacteriol.* 185, 3773–3779.

Vergis, J.M., Purdy, M.D., and Wiener, M.C. (2010). A high-throughput differential filtration assay to screen and select detergents for membrane proteins. *Anal. Biochem.* 407, 1–11.

Vollmer, W., Blanot, D., and De Pedro, M.A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews* 32, 149–167.

Vollmer, W. (2011). Bacterial outer membrane evolution via sporulation? *Nat. Chem. Biol.* 8, 14–18.

von Heijne, G. (2007). The membrane protein universe: what's out there and why bother? *J. Intern. Med.* *261*, 543–557.

White, C.L., Kitich, A., and Gober, J.W. (2010). Positioning cell wall synthetic complexes by the bacterial morphogenetic proteins MreB and MreD. *Mol. Microbiol.* *76*, 616–633.

White, C.L., and Gober, J.W. (2012). MreB: pilot or passenger of cell wall synthesis? *Trends Microbiol.* *20*, 74–79.

Whitelegge, J. P. (2013) Integral Membrane Proteins and Bilayer Proteomics *Anal. Chem.* *85* (5), pp 2558–2568.

Wiener, M.C. (2004). A pedestrian guide to membrane protein crystallization. *Methods* *34*, 364–372.

Wienken, C.J., Baaske, P., Rothbauer, U., Braun, D., and Duhr, S. (2010). Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. *Nature Communications* *1*, 100.

Wuu, J. J. and J. R. Swartz (2008). "High yield cell-free production of integral membrane proteins without refolding or detergents." *Biochim Biophys Acta* **1778**(5): 1237-1250.

Xu, Y., et al. (2013). "Improved membrane protein expression in *Lactococcus lactis* by fusion to Mistic." *Microbiology* **159**(Pt 6): 1002-1009.

Yan, Y., Munshi, S., Leiting, B., Anderson, M.S., Chrzas, J., and Chen, Z. (2000). Crystal structure of *Escherichia coli* UDPMurNAc-tripeptide d-alanyl-d-alanine-adding enzyme (MurF) at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* *304*, 435–445.

Yang, D.C., Blair, K.M., and Salama, N.R. (2016). Staying in Shape: the Impact of Cell Shape on Bacterial Survival in Diverse Environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *80*, 187–203.

Zidar, N., Tomasić, T., Sink, R., Rupnik, V., Kovac, A., Turk, S., Patin, D., Blanot, D., Contreras Martel, C., Dessen, A., et al. (2010). Discovery of novel 5-benzylidenerhodanine and 5-benzylidenethiazolidine-2,4-dione inhibitors of MurD ligase. *J. Med. Chem.* *53*, 6584–6594.

Zhao, H., Brautigam, C.A., Ghirlando, R., and Schuck, P. (2013). Current Methods in Sedimentation Velocity and Sedimentation Equilibrium Analytical Ultracentrifugation. *Curr Protoc Protein Sci* *0* *20*.

Zhou, M., Li, Q., and Wang, R. (2016). Current Experimental Methods for Characterizing Protein–Protein Interactions. *ChemMedChem* *11*, 738–756.

## ANEXOS

Uso exclusivo da CIBio:

Número de projeto / processo: 2015-13

**Formulário de encaminhamento de projetos de pesquisa para análise pela CIBio - Comissão Interna de Biossegurança do CNPEM – Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais**

**Título do projeto:** Caracterização estrutural de componentes de um complexo essencial para a formação da parede bacteriana

**Pesquisador responsável:** Andrea Dessen de Souza e Silva

**Experimentador:** Mayara Mayele Miyachiro

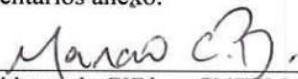
**Classe de risco do OGM:**  Risco I  Risco II

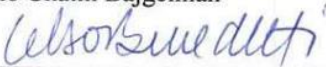
Nível do treinamento do experimentador:  -Iniciação científica,  -mestrado,  -doutorado,  -doutorado direto,  -pós-doutorado,  -nível técnico,  -outro, especifique: \_\_\_\_\_

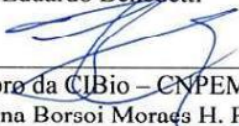
**Resumo do projeto:** A biossíntese da parede bacteriana tem sido estudada há várias décadas para a identificação de alvos para o desenvolvimento de antimicrobianos. No entanto, o aparecimento de bactérias multi-drogas resistentes leva à necessidade de pesquisar e caracterizar novos alvos moleculares. A síntese do peptidoglicano, componente principal da parede celular bacteriana, envolve a participação de complexos macromoleculares que podem incluir proteínas citoplasmáticas, periplasmáticas e de membrana. O objetivo do presente projeto é caracterizar estruturalmente o complexo periplasmático solúvel (PBP2: MreC) e a proteína de membrana MraY transferase, pois são componentes essenciais para a síntese do peptidoglicano. As técnicas que serão utilizadas incluem a expressão e purificação de proteínas recombinantes solúveis e de membrana, cristalização, análise em síncrotron e resolução de estruturas proteicas. O grupo de pesquisa dirigido pela Andréa Dessen está dividido em duas localidades: Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) em Campinas-Brasil (4 pesquisadores), e Institut de Biologie Structurale em Grenoble-França (10 pesquisadores). O Projeto Temático intitulado "Estruturação de complexos macromoleculares da parede bacteriana" será realizado em Campinas, onde a aluna Mayara Mayele Miyachiro desenvolverá a maior parte do trabalho de tese. No entanto, nossos pesquisadores de Grenoble têm muita experiência na produção e purificação de proteínas de membrana e, portanto, consideramos que será extremamente proveitoso para a aluna realizar algumas etapas do projeto em Grenoble. Os resultados do presente projeto ajudarão a identificar a nível atômico novos alvos macromoleculares que poderão ser utilizados para o desenvolvimento de fármacos com atividade antibacteriana mais eficientes.

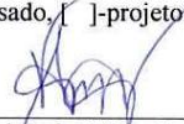
A CIBio analisou este projeto em reunião realizada no dia: 09.02.2015.

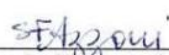
**Parecer final:**  -projeto aprovado,  -projeto recusado,  -projeto com deficiências, comentários anexo.

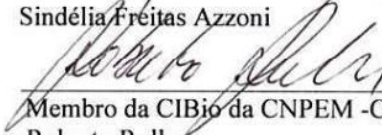
  
Presidente da CIBio – CNPEM-LNBio  
Marcio Chaim Bajgelman

  
Membro da CIBio – CNPEM -LNBio  
Celso Eduardo Benedetti

  
Membro da CIBio – CNPEM -LNBio  
Carolina Borsoi Moraes H. Freitas

  
Membro da CIBio da CNPEM -CTBE  
Fabio Márcio Squina

  
Membro da CIBio da CNPEM -CTBE  
Sindélia Freitas Azzoni

  
Membro da CIBio da CNPEM -CTBE  
Roberto Ruller



### Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DE COMPONENTES DE UM COMPLEXO ESSENCIAL PARA A FORMAÇÃO DA PAREDE BACTERIANA**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 03 de Janeiro de 2018

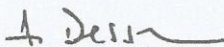
Assinatura : \_\_\_\_\_



Nome do(a) autor(a): **Mayara Mayele Miyachiro**

RG n.º 44.745.004-9

Assinatura : \_\_\_\_\_



Nome do(a) orientador(a): **Andréa Dessen de Souza e Silva**

RG n.º 43479773/ RJ