



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Liege Abdallah Kawai

Mecanismo de ação e infecção *por Corynebacterium
pseudotuberculosis*: expressão, purificação e caracterização de
proteínas relacionadas ao metabolismo central ou à sua virulência

São José do Rio Preto
2017

Liege Abdallah Kawai

Mecanismo de ação e infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis*: expressão, purificação e caracterização de proteínas relacionadas ao metabolismo central ou à sua virulência

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de Concentração em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Raghuvir K. Arni

São José do Rio Preto
2017

Kawai, Liege Abdallah.

Mecanismo de ação e infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* : expressão, purificação e caracterização de proteínas relacionadas ao metabolismo central ou à sua virulência / Liege Abdallah Kawai. -- São José do Rio Preto, 2017
126 f. : il., tabs.

Orientador: Raghuvir K. Arni

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia molecular. 2. Biofísica. 3. *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 4. Linfadenite caseosa. 5. Proteínas de bactérias – Purificação. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 577.3

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Liege Abdallah Kawai

Mecanismo de ação e infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis*: expressão, purificação e caracterização de proteínas relacionadas ao metabolismo central ou à sua virulência

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de Concentração em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Raghuvir Krishnaswamy Arni
UNESP – São José do Rio Preto, SP
Orientador

Profa. Dra. Ljubica Tasic
UNICAMP – Campinas, SP

Prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes
UNESP - Botucatu, SP

Dr. Fábio Rogério de Moraes
UNESP – São José do Rio Preto, SP

Profa. Dra. Lisandra Marques Gava Borges
UNESP – São José do Rio Preto, SP

São José do Rio Preto
22 de novembro de 2017

Epígrafe

“Nada acontece por acaso.
Não existe a sorte.
Há um significado por detrás
de cada pequeno ato.
Talvez não possa ser visto
com clareza imediatamente,
mas sê-lo-á antes que
se passe muito tempo”.

Richard Bach

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha mãe, Najla e minha irmã, Bruna.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por todas as experiências e superações que vivi.

Aos meus pais, Najla e Anderson (*in memoriam*) que sempre se dedicaram a proporcionar a melhor educação e a me incentivar a seguir as oportunidades que tive.

Aos meus amigos, por serem irmãos que consegui encontrar nos caminhos que segui.

Ao professor R. K. Arni pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e pela compreensão e auxílio nos momentos que precisei.

Aos colegas de laboratório, Ricardo B. Mariutti, Raphael J. Eberle e Monika A. Coronado pela ajuda, paciência e dedicação em me instruir.

À Prof. Dra. Ljubica Tasic, ao Prof. Dr. Vitor B. P. Leite e ao Prof. Dr. Vasco A. de C. Azevedo, pelo suporte e pelas colaborações realizadas neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcos R. de M. Fontes, por ter gentilmente cedido seu laboratório e disponibilizado sua equipe para nos auxiliar durante alguns experimentos realizados em seu laboratório.

Ao Dr. Fábio R. de Moraes por todo o apoio nas análises de RMN, além de inúmeras contribuições durante o projeto, e por todos os *insights* durante e após o exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Ramon B Abrego pela oportunidade de realizar o estágio de docência na disciplina ministrada por ele, permitindo que eu conhecesse um pouco desta área tão complexa para mim e pela participação no exame de qualificação, contribuindo para o aprimoramento do trabalho.

À ELarissa (Larissa Lacerda, *in memoriam*), que nos deixou muito cedo, mas que sempre estará presente em nossas vidas.

A todos que tornaram minha caminhada mais leve ao longo desses anos.

À CAPES e ao programa de pós-graduação em Microbiologia, pela bolsa concedida.

Lista de Abreviações e Siglas

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BSA: *Bovine Serum Albumin*

C. pseudotuberculosis: *Corynebacterium pseudotuberculosis*

CMNR: *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*

CoASH: Coenzima A

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento

Cp-DtxR: Diphtheria toxin repressor de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Cp-TrxA1: Tioredoxina A1 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Cp-TrxR: Tioredoxina redutase de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

DC: dicroísmo circular

DSC: Differential scanning calorimetry

DTT: Ditioneitol

Dtx: *diphtheria toxin*

DtxR: *Diphtheria toxin repressor*

E. coli: *Escherichia coli*

EBDA: Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola S.A.

ELD: Espalhamento de Luz Dinâmico

ESH: Ergotionina

FAD: Flavina Adenina Dinucleotídeo

G+C: guanina+citosina

GSH: Glutathione

Hsp: Hesperidina

Hst: Hesperetina

LB: Luria-Bertani

LC: Linfadenite caseosa

M. smegmatis: *Mycobacterium smegmatis*

M. tuberculosis: *Mycobacterium tuberculosis*

M: Marcador molecular

mRNAs: RNAs mensageiros

MSH: Micotiol

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

OMS: Organização Mundial de Saúde

PBS: Tampão fosfato contendo NaCl

PDB: Protein Data Bank

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

rRNA: RNA ribossomal

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

STD: Saturation Transfer Difference

Trx(s): Tioredoxina(s)

Trx-(SH)₂: Tioredoxina redutase reduzida

Trx-(SH)₂: Tioredoxina reduzida

Trx: Tioredoxina

TrxA1: Tioredoxina A1

TrxR(s): Tioredoxina redutase(s)

TrxR: Tioredoxina redutase

TrxR-S₂: Tioredoxina redutase oxidada

Trxs: Tioredoxinas

Trx-S₂: Tioredoxina oxidada

Resumo

Corynebacterium pseudotuberculosis (*C. pseudotuberculosis*), é uma bactéria gram positiva anaeróbia facultativa, pleomórfica, que não esporula, não forma cápsula, e que apresenta 2 biotipos ou biovars, sendo o biovar equi capaz de infectar preferencialmente equinos, enquanto o biótipo denominado ovis acomete pequenos ruminantes. Esta bactéria faz parte do grupo CMNR (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*), que demonstra grande importância veterinária e médica, uma vez que estes micro-organismos comumente infectam animais, podendo infectar o homem, causando perdas econômicas pela ineficácia ou alto custo de terapias existentes. Um exemplo seria a linfadenite caseosa (LC) causada por *C. pseudotuberculosis*, que afeta particularmente a pecuária de caprinos e ovinos, com a condenação da carcaça e redução da produção de lã e de carne. A transmissão da doença e contágio dos animais é direta, muitas vezes através da alimentação e ingestão de água em local contaminado por animais doentes. Essa doença possui incidência na pecuária mundial, principalmente de caprinos e ovinos, havendo registros de ocorrência no Brasil, Europa, Oriente Médio, Austrália, Nova Zelândia, África do Sul, Canadá e Estados Unidos e mesmo com todos os avanços tecnológicos, ainda não há métodos de prevenção totalmente eficazes, como vacinas e medicamentos, tampouco para o tratamento de animais infectados, que geralmente são de custo elevado, por longos períodos e sem a garantia de cura ou de isenção de reincidência da LC. Deste modo, técnicas mais rápidas e fáceis para detecção e diagnóstico da doença, bem como para seu tratamento, se tornam imprescindíveis, evitando não só a disseminação da doença, mas também suas consequentes perdas econômicas. Atualmente, devido ao uso indiscriminado de antibióticos para o tratamento de infecções de origem bacteriana, bem como à constante exposição destes micro-organismos a essas drogas em ambientes hospitalares, observa-se o desenvolvimento de micro-organismos resistentes às terapias disponíveis, sendo um desafio mundial a descoberta e elaboração de tratamentos eficazes para a prevenção, controle e eliminação destes patógenos, como alternativa aos já existentes. Visando terapias alternativas e direcionadas para infecção por *C. pseudotuberculosis*, as proteínas tioredoxina, tioredoxina redutase e *diphtheria toxin repressor* foram estudadas no presente trabalho, a fim de melhor compreender este micro-organismo.

Palavras-chave: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. pseudotuberculosis*, linfadenite caseosa, LC, tioredoxina redutase, tioredoxinas, *diphtheria toxin repressor*.

Abstract

Corynebacterium pseudotuberculosis (*C. pseudotuberculosis*), is a gram-positive, facultative anaerobe, pleomorphic, non-sporulating bacterium with two biotopes or biovars, being the biovar equi capable of infecting horses, whereas the biotype called ovis infects small ruminants. It is part of the CMNR group (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* and *Rhodococcus*), which demonstrates great veterinary and medical importance, since these common microorganisms infect animals and can infect humans, causing economic losses due to the inefficiency or high cost of existing therapies. An example is a caseous lymphadenitis (LC) caused by *C. pseudotuberculosis*, which particularly affects the goats and sheep livestock, with carcass condemnation and reduction of wool and meat production. The transmission of disease and the contagion of animals is direct, often through feeding and drinking water in places contaminated by sick animals. This disease has an incidence in the world livestock, mainly of goats and sheep, with occurrence records in Brazil, Europe, the Middle East, Australia, New Zealand, South Africa, Canada and the United States and even with all technological advances, still there are no totally effective prevention methods, such as vaccines and medications, nor for the treatment of infected animals, which are usually of a high cost, for long periods and without guarantee of cure or exemption from recurrence of LC. In this way, faster and easier techniques for the detection of the diagnosis of this disease as well as for its treatment become essential, avoiding not only a spread of the disease, but also its consequent economic losses. Currently, the use of indiscriminate antibiotics for the treatment of infections of bacterial origin, as well as the constant exposure of these microorganisms to these drugs in hospital environments, shows the development of microorganisms resistant to the available therapies, being one world-wide challenge the elaboration of effective treatments for the prevention, control and elimination of these pathogens, as an alternative to the existing ones. Aiming alternative therapies for infection by *C. pseudotuberculosis*, proteins such as thioredoxin, thioredoxin reductase, diphtheria toxin repressor, were studied in the present work, for a better comprehension of this microorganism.

Key-words: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. pseudotuberculosis*, caseous lymphadenitis, LC, thioredoxin reductase, thioredoxin, diphtheria toxin repressor.

Prefácio

Esta tese está escrita em capítulos, estruturada conforme breve descritivo a seguir. A numeração dos itens de cada capítulo, bem como das figuras está escrita em números cardinais, precedidos por números em algarismos romanos, referentes ao capítulo em que estão inseridos. Exemplo: “II.2. Objetivos”: este item é o item 2, presente no Capítulo II.

Capítulo I: Introdução, Revisão da Literatura e Objetivos

Neste capítulo consta uma breve introdução, que descreve o micro-organismo utilizado para estudo e sua patogenicidade, seguida da revisão de literatura, que discorre sobre o panorama geral e a problemática deste micro-organismo e elucida o estado da arte da profilaxia e tratamentos da doença. De acordo com o exposto, foram determinados os objetivos gerais que proporcionaram o desenvolvimento e conclusão do presente trabalho.

Capítulo II: Caracterização bioquímica e biofísica de Tioredoxina A1 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Foi realizada a expressão e purificação da *thioredoxin* recombinante de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, seguida da avaliação da estabilidade de sua estrutura secundária, bem como de sua interação com possíveis ligantes e inibidores. Para tal, técnicas como dicroísmo circular, ensaio enzimático e ressonância magnética nuclear foram utilizadas para caracterização bioquímica desta proteína.

Capítulo III: Expressão, purificação e cristalização da proteína Tioredoxina Redutase de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Este capítulo descreve a expressão, purificação e cristalização da proteína recombinante tioredoxina redutase (TrxR) de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, que utiliza NADPH para reduzir a Trx oxidada, tornando-a ativa e auxiliando na manutenção redox celular bacteriana.

Capítulo IV: Expressão e purificação da proteína *Diphtheria Toxin Repressor* de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

A proteína *diphtheria toxin repressor* é repressora da expressão da proteína

diphtheria toxin, a qual confere virulência ao micro-organismo por seu ciclo lisogênico.

Capítulo V: Considerações finais

A conclusão geral do trabalho e sugestões para trabalhos futuros estão presentes neste capítulo.

Adendo: Publicações realizadas por colaborações durante o doutorado

Neste adendo, estão disponíveis duas publicações realizadas por colaborações que realizei durante o período do doutorado, em paralelo aos resultados do projeto. A minha contribuição para o artigo “*Biochemical and biophysical characterization of a mycoredoxin protein Glutaredoxin A1 from Corynebacterium pseudotuberculosis*” foi a expressão, purificação e realização dos experimentos com Tioredoxina A1 de *C. pseudotuberculosis* para a comparação com os resultados obtidos com *Glutaredoxin A1* de *C. pseudotuberculosis*. Com relação ao artigo “*Cold Shock Protein A from Corynebacterium pseudotuberculosis: Role of Electrostatic Forces in the Stability of the Secondary Structure*”, minha contribuição foi realizada na revisão final, onde auxiliei na correção da língua inglesa.

Sumário

Capítulo I

Introdução, Revisão de Literatura e Objetivos

I.1. Introdução	17
I.1.1. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	17
I.1.2. Linfadenite caseosa.....	18
I.2. Revisão de literatura.....	19
I.2.1. Epidemiologia e impacto econômico	19
I.2.2. Combate da LC sem a utilização de antibióticos	22
I.2.2.1. Tioredoxina	23
I.2.2.2. Tioredoxina redutase	23
I.2.2.3. Diphtheria toxin repressor	23
I.3. Objetivos	24
I.4. Referências bibliográficas	24

Capítulo II

Caracterização bioquímica e biofísica de Tioredoxina A1 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

II.1. Introdução.....	30
II.2. Objetivos.....	31
II.3. Material e Métodos.....	32
II.3.1. Linhagem bacteriana e vetor com inserto da tioredoxina A1 de <i>C. pseudotuberculosis</i>	32
II.3.2. Análises <i>in silico</i>	32
II.3.2.1. Alinhamentos	32
II.3.2.2. Modelagem da estrutura de Cp-TrxA1 por homologia	32
II.3.3. Superexpressão e purificação da proteína Cp-TrxA1	33
II.3.4. Western Blot	34
II.3.5. Dicroísmo circular (DC)	34
II.3.6. Espalhamento de Luz Dinâmico (ELD)	35
II.3.7. Ensaio turbidimétrico de redução da insulina	35
II.3.7.1. Determinação do pH ideal para a atividade de Cp-TrxA1	35
II.3.7.2. Avaliação de outros agentes redutores e um agente oxidante para Cp-TrxA1	36
II.3.7.3. Avaliação de possíveis interações de moléculas com Cp-TrxA1 afetando sua atividade redutora.....	36
II.3.8. Saturation Transfer Difference por Ressonância Magnética Nuclear (STD-RMN)	36
II.4. Resultados e Discussão	37
II.4.1. Análises <i>in silico</i>	37
II.4.1.1. Alinhamento da sequência de aminoácidos de Cp-TrxA1 com o PDB	37
II.4.1.2. Modelagem da estrutura de Cp-TrxA1.....	38
II.4.2. Purificação da proteína Cp-TrxA1.....	39
II.4.3. Western Blot	40
II.4.4. Espalhamento de Luz Dinâmico (ELD)	41
II.4.5. Ensaio turbidimétrico de redução da insulina	42
II.4.5.1. Determinação do pH ideal para a atividade de Cp-TrxA1	42

II.4.5.2. Avaliação de outros agentes redutores e um agente oxidante para <i>Cp-TrxA1</i>	43
II.4.5.3. Avaliação de possíveis interações de moléculas com <i>Cp-TrxA1</i> afetando sua atividade redutora.....	45
II.4.5. Dicroísmo circular.....	47
II.4.6. Saturation Transfer Difference por Ressonância Magnética Nuclear (STD-RMN)	50
II.5. Conclusão	52
II.6. Referências	52

Capítulo III

Expressão, purificação e cristalização da proteína Tioredoxina Redutase de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

III.1. Introdução	61
III.2. Objetivos	62
III.3. Material e Métodos	62
III.3.1. Linhagem bacteriana.....	62
III.3.2. Análises <i>in silico</i> de <i>Cp-TrxR</i>	62
III.3.3. Vetor contendo <i>Cp-TrxR</i>	62
III.3.4. Superexpressão e purificação da <i>Cp-TrxR</i>	63
III.3.5. Western Blot	63
III.3.6. Dicroísmo circular (DC).....	63
III.3.7. Espalhamento de Luz Dinâmico	64
III.3.8. Cristalização.....	64
III.4. Resultados e Discussão	64
III.4.1. Análises <i>in silico</i> de <i>Cp-TrxR</i>	64
III.4.1.1. Alinhamento da Proteína <i>Cp-TrxR</i>	64
III.4.1.2. Modelagem da estrutura de <i>Cp-TrxR</i>	65
III.4.2. Purificação da proteína <i>Cp-TrxR</i>	66
III.4.3. Western blot.....	67
III.4.5. Dicroísmo circular	68
III.4.6. Espalhamento de Luz Dinâmico.....	68
III.4.7. Cristalização.....	69
III.5. Conclusão.....	70
III.6. Referências	70

Capítulo IV

Expressão e purificação da proteína *Diphtheria Toxin Repressor* de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

IV.1. Introdução.....	73
IV.2. Objetivos	74
IV.3. Material e Métodos	74
IV.3.1. Linhagem bacteriana	74

IV.3.2. Análises <i>in silico</i> de <i>Cp-DtxR</i>	74
IV.3.3. Vetor contendo <i>Cp-DtxR</i>	75
IV.3.4. Expressão e purificação da <i>Cp-DtxR</i>	75
IV.3.5. Western Blott	76
IV.3.6. Dicroísmo circular (DC)	76
IV.3.7. Espalhamento de Luz Dinâmico	76
IV.4.0. Resultados e Discussão	76
IV.4.1. Análises <i>in silico</i> de <i>Cp-DtxR</i>	76
III.4.1.1. Alinhamento da Proteína <i>Cp-DtxR</i>	76
IV.4.2. Purificação da proteína <i>Cp-DtxR</i>	78
IV.4.3. Western blot	78
IV.4.4. Dicroísmo Circular	79
IV.4.5. Espalhamento de Luz Dinâmico	80
IV.5. Conclusão	80
IV.6. Referências	81

Capítulo V

Considerações finais

V.1. Considerações Finais	84
V.1.1. Conclusão geral	84
V.1.2. Sugestões para trabalhos futuros	85
Adendo	86

Capítulo I

Introdução, Revisão de Literatura e Objetivos

I.1. Introdução

I.1.1. *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Os actinomicetes são um grupo supragenérico fisiologicamente e ecologicamente heterogêneo e abrangem os gêneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*, conhecidos por grupo CMNR (HARD, 1969; SONGER et al., 1988; SONGER, 1997; PAULE et al., 2004). Apesar dessa diversidade, estas bactérias gram positivas possuem características em comum, como a organização da parede celular composta por polímeros de peptidoglicano, arabinogalactano e ácidos micólicos (HARD et al., 1975; COLLINS; GOODFELLOW; MINNIKIN, 1982; FUNKE; LAWSON; COLLINS, 1995; COLLINS et al., 1998; CONNOR et al., ‘2000; BAYAN et al., 2003; HALL et al., 2003; DORELLA et al., 2006) e pela alta porcentagem de G+C (47-74%) em seu material genômico (GARG; NAIN; CHANDIRAMANI, 1985; GOODFELLOW, 1989; FUNKE; LAWSON; COLLINS, 1995; NAVAS, 1996; BARH et al., 2011). Para a identificação a nível de espécie, a abordagem tradicional utilizando o rRNA 16S é ineficaz, uma vez que CMNR apresenta pouco polimorfismo nessa região e seria necessário o sequenciamento total do rRNA 16S para atingir este propósito, inviável pelo tamanho do fragmento (aproximadamente 1.500 pb). Ao invés disso, foi desenvolvida uma ferramenta complementar para identificação de espécies desse grupo, que possui uma relação filogenética muito próxima de acordo com uma subunidade de sua RNA polimerase, o gene *rpoB*, proporcionando maior acurácia e facilidade para a identificação destas espécies (KHAMIS; RAOULT; SCOLA, 2005; HASSAN et al., 2016). Essa é uma informação importante e relevante, pois apesar de toda a importância médica, veterinária e econômica de algumas espécies do grupo CMNR, nem todas as espécies são patogênicas e além disso, as terapias para tratamento de organismos infectados por eles se tornam mais eficazes quando são patógeno-específicas (KHAMIS; RAOULT; SCOLA, 2005; HASSAN et al., 2016).

O grupo CMNR demonstra grande importância veterinária e médica, uma vez que estes micro-organismos comumente infectam animais, podendo infectar o homem, causando perdas econômicas pela ineficácia ou alto custo de terapias existentes, por exemplo para a linfadenite caseosa (LC) causada por *C. pseudotuberculosis*, que afeta particularmente a pecuária de caprinos e ovinos, com a condenação da carcaça, redução da produção de lã e de carne. Na Austrália, por exemplo, essas perdas podem chegar a 30 milhões de dólares australianos, pois a infecção dos animais por *C. pseudotuberculosis*

muitas vezes leva ao abate do animal e aos outros prejuízos econômicos mencionados (CETINKAYA et al., 2002; BAIRD; FONTAINE, 2007; HASSAN et al., 2014).

Corynebacterium pseudotuberculosis (*C. pseudotuberculosis*), é uma bactéria gram positiva anaeróbia facultativa, pleomórfica (sua forma varia de cocóide a bacilos filamentosos), que não esporula, não forma cápsula, com tamanhos compreendendo de 0,5 a 0,6 µm de largura e 1,0 a 3,0 µm de comprimento (BUXTON et al., 1977; CONNOR et al., 2000; MERCHANT; PACKER, 1967) e que não apresenta motilidade, apesar de possuir fimbrias (BUXTON et al., 1977; MERCHANT; PACKER, 1967). Demonstra crescimento ótimo a 37 °C, pH neutro ou próximo ao neutro (7,0-7,2) (BUXTON et al., 1977, MERCHANT; PACKER, 1967). *C. pseudotuberculosis* apresenta 2 biótipos ou biovars, sendo o biovar equi capaz de infectar preferencialmente equinos, enquanto o biótipo denominado ovis acomete pequenos ruminantes (BATEY, 1986; ARSENAULT et al., 2003; BELCHIOR et al., 2006; BAIRD; FONTAINE, 2007).

I.1.2. Linfadenite caseosa

A LC é uma doença infecciosa crônica, causada pela infecção de diversos animais e raramente do ser humano por *C. pseudotuberculosis* (micro-organismo isolado pela primeira vez em 1888 por Edward Nocard), caracterizada por abscessos supurativos e hipertrofia de linfonodos superficiais e de órgãos internos em pequenos ruminantes (WILLIAMSON, 2001; CETINKAYA et al., 2002; DORELLA, 2009). A transmissão da doença e contágio dos animais é direta, muitas vezes através da alimentação e ingestão de água em local contaminado por animais doentes (DORELLA et al., 2006; BAIRD; FONTAINE, 2007; CHAPMAN; KENNEDY, 2017). Outra forma de contaminação é através do manuseio e manutenção destes animais, pois durante procedimentos veterinários como a vacinação com mesma agulha, castração com materiais contaminados, tratamento do cordão umbilical de neonatos ou qualquer outro procedimento, como a tosquia, pode proporcionar a contaminação cruzada entre os animais infectados e os saudáveis (DORELLA et al., 2006; BAIRD; FONTAINE, 2007; CHAPMAN; KENNEDY, 2017). Essa doença possui incidência na pecuária mundial, principalmente de caprinos e ovinos, havendo registros de ocorrência no Brasil, Europa, Oriente Médio, Austrália, Nova Zelândia, África do Sul, Canadá e Estados Unidos (CONNOR et al., 2000; WILLIAMSON, 2001; PATON et al., 2003; DORELLA et al., 2006; BAIRD; FONTAINE, 2007; HASSAN et al., 2014).

Atualmente, mesmo com todos os avanços tecnológicos, ainda não há métodos de

prevenção totalmente eficazes, como vacinas e medicamentos, tampouco para o tratamento de animais infectados, que geralmente são de custo elevado, por longos períodos e sem a garantia de cura ou de isenção de reincidência da LC (DORELLA, 2009). Em culturas *in vitro* de *C. pseudotuberculosis*, foi possível evidenciar a eficácia de muitos antibióticos para o controle e erradicação deste micro-organismo, entretanto os resultados *in vivo* com os mesmos medicamentos não são promissores, devido à formação de uma espessa membrana envolvendo os abscessos e do pus presente, dificultando a penetração da droga e atenuação sobre o patógeno (BAIRD; FONTAINE, 2007; DORELLA, 2009). Além disso, a detecção e diagnóstico da doença podem muitas vezes serem tardios, pela presença de poucos sinais clínicos dos animais infectados, o que pode gerar um aumento significativo de animais doentes no rebanho, e o principal método identificação do agente infeccioso é realizada através de testes bioquímicos ou moleculares de culturas provenientes do material purulento coletado de animais doentes (BAIRD; FONTAINE, 2007; DORELLA, 2009).

A profilaxia da LC é dada através de cuidados como a assepsia de ferimentos e esterilização de ambientes contaminados por *C. pseudotuberculosis*, uma vez que este micro-organismo pode permanecer viável no solo por até dois anos, mesmo em climas secos e com alta incidência de luz solar, bem como pelo monitoramento e avaliação criteriosos do rebanho, a fim de evitar contato entre animais possivelmente infectados e sadios (WILLIAMSON, 2001; DORELLA et al., 2009; CHAPMAN; KENNEDY, 2017). No caso de vacinas licenciadas, estas podem apresentar eficácia para determinados hospedeiros e para outros não, como por exemplo, se adequarem à prevenção de LC em caprinos, mas não em ovinos e vice-versa, sendo necessária uma avaliação da aplicabilidade específica para cada caso, além de considerar que nem sempre é realizado o uso correto destas vacinas pelos pecuaristas (WILLIAMSON, 2001; DORELLA et al., 2009). Técnicas mais rápidas e fáceis para detecção e diagnóstico da doença, bem como alternativas de tratamento, se tornam imprescindíveis, evitando não só a disseminação da doença, mas também suas conseqüentes perdas econômicas.

I.2. Revisão de literatura

I.2.1. Epidemiologia e impacto econômico

A LC está mundialmente distribuída, conforme mencionado, geralmente com maior incidência em áreas com pecuária caprina e ovina, mas também podendo atingir

bovinos, suínos, equinos, coelhos, veados, animais de ambiente laboratorial (como ratos), e raramente, até mesmo humanos (CHAPMAN; KENNEDY, 2017). Considerando o rebanho de caprinos e ovinos, o Brasil está em 14º lugar a China é quem possui o maior número de cabeças, estando a Índia em segundo lugar e a Austrália em terceiro (ALVES; SANTIAGO; PINHEIRO, 2007). A estimativa de aumento de produção de carne ovina e caprina entre 2003 e 2004 foi de 2,5%, o que corresponde passar a produção de 2,3 para 2,6 milhões de toneladas no mercado mundial (ANDERSON; RINGS; PUGH, 2005). Em 2015, estimativa de rebanho mundial de caprinos e ovinos foi de 1.006.785.725 milhões e 1,2 bilhões de animais, com aumento de 1% e 1,5% anual, respectivamente, durante os últimos 5 anos, de acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2015). No contexto nacional brasileiro, a totalidade de caprinos em 2015 foi de 9,61 milhões e de 18,41 milhões de ovinos, em sua maioria concentrados na região nordeste, com aproximadamente 29% de ovinos na região sul (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2016), apresentados na A Figura 1 pela distribuição geográfica de ovinos no Brasil, no ano de 2009.

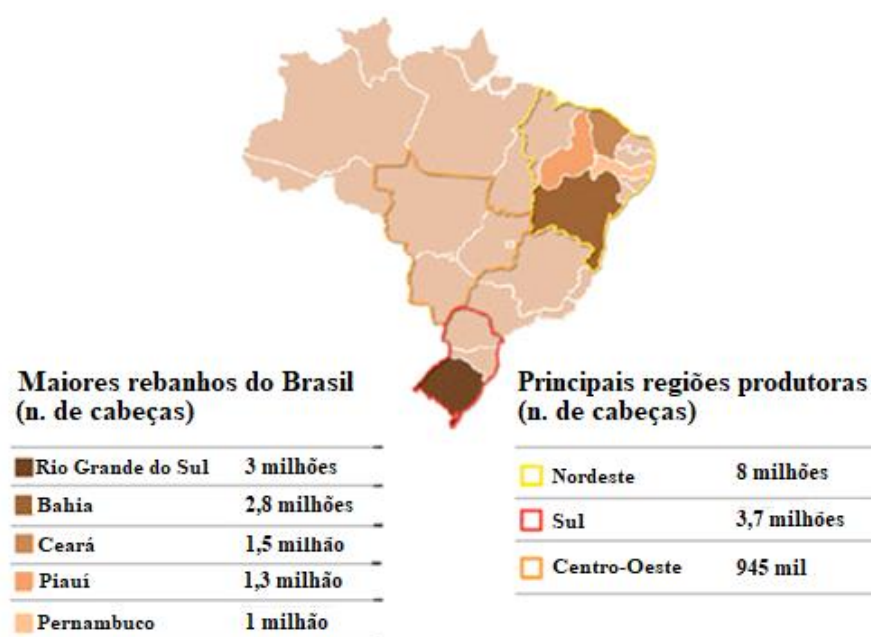


Figura 1.1. Distribuição geográfica de ovinos no Brasil. Fonte: Revista Globo Rural. Disponível em: http://revistagloborural.globo.com/EditoraGlobo/componentes/article/edg_article_print/0,3916,1698669-1484-2,00.html

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recebeu relatórios de 201 países referentes à década de 1996 e 2004, em que 64 destes países constataram a presença de LC em seu território, distribuídos 19 nas Américas, 18 na África, 11 na Ásia, 14 na Europa e 2 na Oceania (DE SÁ GUIMARÃES et al., 2011). Sabe-se que muitas vezes as

autoridades oficialmente responsáveis por estes relatórios nem sempre são fiéis em reportar estes incidentes, como é o caso do Brasil, o qual possui publicações científicas afirmando a ocorrência destas doenças, mas que está ausente nesta estimativa da OMS, dificultando uma obtenção do real panorama da LC e subestimando o problema (DE SÁ GUIMARÃES et al., 2011). Um estudo com caprinos no estado do Ceará, Brasil, mostrou que 66,9% dos rebanhos apresentavam sinais clínicos de linfadenite caseosa, enquanto em outro na Paraíba, 15,9% dos ovinos apresentaram lesões similares a LC (PINHEIRO; ALVES; HADDAD, 2000), com *C. pseudotuberculosis* sendo isolada de 74,5% dos abscessos (SOUZA et al., 2011). A prevalência da LC muitas vezes está relacionada às condições inadequadas de manutenção dos animais e/ou pela diminuição da defesa natural de seus organismos (BLOOD; HENDERSON, 1999, ALVES; SANTIAGO; PINHEIRO, 2007).

Mesmo países que utilizam a vacinação contra LC como uma das formas de profilaxia, ainda apresentam um índice de 20 a 30% de permanência clínica da doença (DE SÁ GUIMARÃES et al., 2011). De acordo com Dorella (2009), há vacinas disponíveis no Brasil, como a vacina viva de *C. pseudotuberculosis* 1002 atenuada, desenvolvida pela empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola S.A. (EBDA) para caprinos e a Biodectin® (Fort Dodge) para ovinos, a qual apresenta toxóides de diversos micro-organismos, incluindo *C. pseudotuberculosis*. Apesar de disponíveis, não há uma avaliação quanto à eficácia destas vacinas e nem uma estimativa da porcentagem que já utilizam como método preventivo. Como estimativa, avaliando um criadouro de porte médio (em média 114 animais), se 15% dos animais apresentarem em média 1,2 abscessos com tamanho aproximado de uma laranja por animal, o custo para tratamento seria em torno de R\$10,06 reais por abscesso, o que totalizaria R\$ 205,20 para esse proprietário, não contabilizando prejuízos na produção de couro, leite, lã, e/ou condenação total da carcaça quando o tratamento é ineficaz, causando grande impacto para este pecuarista (FACCIOLI; ALVES; PINHEIRO, 2014).

Além de riscos para animais, há relatos de LC em humanos, o que é preocupante devido à ausência de tratamentos ineficazes contra *C. pseudotuberculosis*. Até 1997, foram encontrados na literatura 22 casos de linfadenite caseosa em humanos, em que a maioria a maioria dos pacientes havia sido exposta a ovinos, mas que, entretanto, nenhum possuía problemas secundários de saúde ou predisposição à doença. A remoção cirúrgica das glândulas linfáticas infectadas foi a principal terapia utilizada e a ingestão de antibióticos a terapia suplementar. Alguns destes pacientes tiveram recorrência de

infecção, enquanto outros apresentaram uma recuperação muito lenta (PEEL et al., 1997).

I.2.2. Combate da LC sem a utilização de antibióticos

Atualmente, devido ao uso indiscriminado de antibióticos para o tratamento de infecções de origem bacteriana, bem como à constante exposição destes micro-organismos a essas drogas em ambientes hospitalares, observa-se o desenvolvimento de micro-organismos resistentes às terapias disponíveis, sendo um desafio mundial a descoberta e elaboração de tratamentos eficazes para a prevenção, controle e eliminação destes patógenos, como alternativa aos já existentes (HASSAN et al., 2014).

As vacinas tradicionais são elaboradas através de antígenos que irão gerar uma resposta imune e consequente produção de anticorpos pelo organismo que recebeu a dose do antígeno. Muitas vacinas baseadas em peptídeos, proteínas e DNA não são suficientemente imunogênicas e precisam ser administradas com um adjuvante, para estimular uma resposta imune suficiente para eliminar patógenos (FOGED; SUNDBLAD; HOVGAARD; 2002). O desenvolvimento de vacinas, durante muitos anos tem sido dificultado pela carência de adjuvantes e até recentemente, o alúmen havia sido o único aprovado para a utilização em humanos. Diversas abordagens estão sendo realizadas para cumprir este objetivo, como, por exemplo, BARH e colaboradores, 2011 estudaram o genoma de *C. pseudotuberculosis* 1002, a fim de detectar alvos potenciais para o desenvolvimento de tratamento e drogas direcionadas especificamente para estas espécies. De acordo com este trabalho, o gene *ubiA* comum à via metabólica hospedeiro-patógeno e um transportador do tipo ABC de vias metabólicas específicas podem ser alvos para o desenvolvimento tanto de drogas quanto de vacinas contra *C. pseudotuberculosis*. Um estudo realizado com *C. pseudotuberculosis* do biovar ovis, envolveu a mutação do gene cromossomal que codifica a fosfolipase D, posteriormente inoculando em cabras a cepa contendo o gene selvagem e em outras a cepa contendo o gene mutante, onde verificou-se a diminuição da habilidade de estabelecer uma infecção primária e incapacidade de disseminação pelas cepas mutantes (MCNAMAR; BRADLEY; SONGER, 1994).

Visando terapias alternativas e direcionadas para infecção por *C. pseudotuberculosis*, as proteínas tioredoxina, *diphtheria toxin repressor* e tioredoxina redutase foram utilizadas no presente estudo, a fim de melhor compreender este micro-organismo.

I.2.2.1. Tioredoxina

As tioredoxinas (Trx) são proteínas pequenas, amplamente presentes nos sistemas vivos, com sítio ativo apresentando duas cisteínas, geralmente com a sequência conservada dos aminoácidos cisteína, glicina, prolina, cisteína (-Cys-Gly-Pro-Cys-). Essa proteína pode estar em sua forma reduzida, com um ditiol, ou em sua forma oxidada, quando as cisteínas formam uma ligação dissulfeto (HOLMGREN, 1985). Devido a estas características, estas proteínas participam de reações redox reversíveis e sua forma oxidada (Trx-S₂) é geralmente reduzida por NADPH e a flavoproteína tioredoxina redutase. Estudos de sua estrutura e função são de extrema importância, pois promovem a compreensão de seus diversos papéis no organismo. Diversos estudos hoje são realizados em áreas distintas, como DNA e síntese proteica, estrutura e dobramento proteicos, evolução, mecanismos enzimáticos, fotossíntese, endocrinologia, virologia e câncer, com base em conhecimentos já adquiridos sobre esta proteína.

I.2.2.2. Tioredoxina redutase

As tioredoxinas redutases (TrxRs) são enzimas homodiméricas da família de flavoproteínas de oxidoredutases piridina nucleotídeo-dissulfídeo, que inclui a lipoamida desidrogenase, glutathione redutase, e íon mercúrio redutase, nas quais cada monômero possui um FAD como grupo prostético, sítio de ligação para NADPH, o qual possibilita a redução do substrato (MUSTACICH; POWIS, 2000). As TrxRs são conhecidas por sua habilidade em reduzir Trxs, etapa necessária para manutenção da atividade biológica destas proteínas, uma vez que as Trx só estão ativas quando em sua forma reduzida (MUSTACICH; POWIS, 2000). Estas enzimas são distintas considerando os organismos vivos em que se encontram presentes. TrxRs em organismos eucarióticos complexos são mais intimamente relacionadas à glutathione redutase do que à TrxR bacteriana, sendo maiores e possuindo especificidade de substrato (ARNÉR; HOLMGREN, 2000).

I.2.2.3. *Diphtheria toxin repressor*

Diphtheria toxin repressor (DtxR) é um regulador da *diphtheria toxin*, o qual é ativado na presença de ferro, e inativado quando a concentração deste metal se torna escassa, ativando assim a produção de *diphtheria toxin*. Além disso, a heme oxigenase em *Corynebacterium diphtheriae* também é regulada pela DtxR, além de outros cinco diferentes operadores identificados como reprimidos por esta proteína. Sendo assim, DtxR é uma proteína reguladora global para regular coordenadamente a expressão de

diphtheria toxin, com alta afinidade pelo sistema de captação de ferro, e outros genes sensíveis à resposta de ferro ambiental de *Corynebacterium diphtheriae* (SPIERING et al., 2003). Além disso, alguns autores demonstraram que DtxR é capaz de proteger o operador tox contra a digestão por DNase I (TAO; MURPHY, 1992; SCHMITT; HOLMES, 1993).

I.3. Objetivos

O objetivo deste projeto foi a expressão, purificação e caracterização de três proteínas codificadas por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, sendo uma delas relacionada à virulência do patógeno e às outras duas ao seu metabolismo central. Os objetivos específicos foram:

- Expressão e purificação das proteínas recombinantes Trx, DtxR e TrxR de *C. pseudotuberculosis*;
- Caracterização bioquímica e biofísica da proteína Trx de *C. pseudotuberculosis*;
- Caracterização biofísica das proteínas TrxR e DtxR de *C. pseudotuberculosis*;
- Cristalização da proteína TrxR de *C. pseudotuberculosis*;

I.4. Referências bibliográficas

ALVES, F. S. F.; SANTIAGO, L. B.; PINHEIRO, R. R. Linfadenite caseosa: o estado da arte. **Embrapa Caprinos e Ovinos-Docmentos (INFOTECA-E)**, 2007.

ANDERSON, D. E.; RINGS, D. M.; PUGH, D. G. Enfermidades do sistema tegumentar. **PUGH, DG Clínica de ovinos e caprinos. São Paulo: Roca**, p. 232-233, 2005.

ARNÉR, E. S. J.; HOLMGREN, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. **The FEBS Journal**, v. 267, n. 20, p. 6102-6109, 2000.

ARSENAULT, J. et al. Maedi-visna impact on productivity in Quebec sheep flocks (Canada). **Preventive veterinary medicine**, v. 59, n. 3, p. 125-137, 2003.

BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **Journal of comparative pathology**, v. 137, n. 4, p. 179-210, 2007.

BARH, D. et al. A novel comparative genomics analysis for common drug and vaccine targets in *Corynebacterium pseudotuberculosis* and other CMN group of human pathogens. **Chemical biology & drug design**, v. 78, n. 1, p. 73-84, 2011.

BATEY, R. G. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Australian veterinary journal**, v. 63, n. 9, p. 269-272, 1986.

BAYAN, N. et al. Mycomembrane and S-layer: two important structures of *Corynebacterium glutamicum* cell envelope with promising biotechnology applications. **Journal of biotechnology**, v. 104, n. 1, p. 55-67, 2003.

BELCHIOR, S. E. et al. Atualização sobre linfadenitis caseosa: el agente etiológico y la enfermedad. **Vet Arg**, v. 23, p. 258-78, 2006.

BUXTON, A. et al. **Animal microbiology. Volume 1: immunology, bacteriology, mycology, diseases of fish and laboratory methods**. Blackwell Scientific Publications, p. 177-183, 1977.

CETINKAYA, B. et al. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. **Veterinary microbiology**, v. 88, n. 1, p. 75-83, 2002.

CHAPMAN, C. K.; KENNEDY, M. J. Caseous Lymphadenitis Management in Goats. 2017.

COLLINS, M. D.; GOODFELLOW, M.; MINNIKIN, D. E. Fatty acid composition of some mycolic acid-containing coryneform bacteria. **Microbiology**, v. 128, n. 11, p. 2503-2509, 1982.

COLLINS, M. D. et al. Note: *Corynebacterium kroppenstedtii* sp. nov., a novel corynebacterium that does not contain mycolic acids. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1449-1454, 1998.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2016. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_07_29_16_55_32_caprin_ovinocultura_-_jun_2016_-_sureg_pe.pdf. Acesso em: 28/07/2017.

CONNOR, K. M. et al. Characterization of United Kingdom Isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 7, p. 2633-2637, 2000.

DE SÁ GUIMARÃES, Alessandro et al. Caseous lymphadenitis: epidemiology, diagnosis, and control. **HIOAB J**, v. 2, p. 33-43, 2011.

DORELLA, F. A. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Veterinary research**, v. 37, n. 2, p. 201-218, 2006.

DORELLA, F. A. Análise do potencial vacinal de linhagens recombinantes e selvagens inativadas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Tese**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

FAO. Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. 2015. Disponível em: <http://www.fao.org.br>>. Acesso em: 28/07/2017.

FOGED, C.; SUNDBLAD, A.; HOVGAARD, L. Targeting vaccines to dendritic cells. **Pharmaceutical research**, v. 19, n. 3, p. 229-238, 2002.

FUNKE, G.; LAWSON, P. A.; COLLINS, M. D. Heterogeneity within human-derived centers for disease control and prevention (CDC) coryneform group ANF-1-like bacteria and description of *Corynebacterium auris* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 735-739, 1995.

GARG, D. N.; NAIN, S. P. S.; CHANDIRAMANI, N. K. Isolation and characterization of *Corynebacterium ovis* from sheep and goats. **Indian Veterinary Journal**, 1985.

GOODFELLOW, M., Suprageneric classification of actinomycetes, in: Williams S.T. (Ed.), **Bergey's manual of systematic bacteriology**, Williams and Wilkins, Baltimore, p. 2333-2343, 1989.

HALL, V. et al. *Corynebacterium atypicum* sp. nov., from a human clinical source, does not contain corynomycolic acids. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 53, n. 4, p. 1065-1068, 2003.

HARD, G. C. Electron microscopic examination of *Corynebacterium ovis*. **Journal of bacteriology**, v. 97, n. 3, p. 1480-1485, 1969.

HARD, G. C. Comparative toxic effect of the surface lipid of *Corynebacterium ovis* on peritoneal macrophages. **Infection and immunity**, v. 12, n. 6, p. 1439-1449, 1975.

HASSAN, S. S. et al. Proteome scale comparative modeling for conserved drug and vaccine targets identification in *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **BMC genomics**, v. 15, n. 7, p. S3, 2014.

HOLMGREN, A. Thioredoxin. **Annual review of biochemistry**, v. 54, n. 1, p. 237-271, 1985.

JIANG, W.; HOU, Y.; INOUE, M. CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 1, p. 196-202, 1997.

LILLIG, C. H.; BERNDT, C. Glutaredoxins in thiol/disulfide exchange. **Antioxidants & redox signaling**, v. 18, n. 13, p. 1654-1665, 2013.

LILLIG, C. H.; BERNDT, C.; HOLMGREN, A. Glutaredoxin systems. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1780, n. 11, p. 1304-1317, 2008.

MERCHANT, I. A.; PACKER, R. A. The Genus *Corynebacterium*, in: Merchant I.A., Packer R.A. (Eds.), **Veterinary bacteriology and virology**, The Iowa State University Press, Iowa, pp. 425-440, 1967.

MUSTACICH, D.; POWIS, G. Thioredoxin reductase. **Biochemical Journal**, v. 346, n. 1, p. 1-8, 2000.

NAVAS, J. Genetic tools in pathogenic nocardio form actinomycetes. **Microbiologia (Madrid, Spain)**, v. 12, n. 2, p. 297-304, 1996.

PEEL, M. M. et al. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*:

report of ten cases from Australia and review. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, n. 2, p. 185-191, 1997.

PINHEIRO, R. R.; ALVES, F. S. F.; HADDAD, J. P. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. **Arquivo Brasileiro Med Veterinaria Zootecnia**, v. 52, n. 10, 2000.

SCHMITT, M. P.; HOLMES, R. K. Analysis of diphtheria toxin repressor-operator interactions and characterization of a mutant repressor with decreased binding activity for divalent metals. **Molecular microbiology**, v. 9, n. 1, p. 173-181, 1993.

SONGER, J. G. et al. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **American journal of veterinary research**, v. 49, n. 2, p. 223-226, 1988.

SONGER, J. Glenn. Bacterial phospholipases and their role in virulence. **Trends in microbiology**, v. 5, n. 4, p. 156-161, 1997.

SOUZA, Maria de F. et al. Linfadenite caseosa em ovinos deslanados abatidos em um frigorífico da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 224-230, 2011.

TAO, X.; MURPHY, J. R. Binding of the metalloregulatory protein DtxR to the diphtheria tox operator requires a divalent heavy metal ion and protects the palindromic sequence from DNase I digestion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 30, p. 21761-21764, 1992.

ULUSU, N. NURAY; TEZCAN, E. FERHAN. Cold shock proteins. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 31, n. 4, p. 283-290, 2001.

WILLIAMSON, L. H. Caseous lymphadenitis in small ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 17, n. 2, p. 359-371, 2001.

Capítulo II

Caracterização bioquímica e biofísica de Tioredoxina A1 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Caracterização bioquímica e biofísica de Tioredoxina A1 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Resumo

As tioredoxinas são oxidoredutases com baixa massa molecular (~12 kDa), e experimentos *in vitro* indicam que ligações dissulfeto em diversas proteínas são eficientemente reduzidas por estas proteínas. Através da redução de ligações dissulfeto, as Trx são oxidadas e devem subsequentemente ser reduzidas pelas tioredoxina redutases (TrxR), utilizando NADPH. Deste modo, as Trxs somente estão ativas quando em sua forma reduzida (T-(SH)₂), na qual as duas cisteínas presentes em seu sítio ativo estão cada uma ligada a um hidrogênio e em sua forma oxidada (T-S₂) não apresenta estes hidrogênios formando uma ligação dissulfeto, alterando a conformação do sítio ativo (HOLMGREN, 1995; STONE et al., 1993). Atualmente, o metabolismo redox representa um dos alvos mais promissores para controlar e/ou modular rapidamente o crescimento de patógenos como *C. pseudotuberculosis*. Tióis de baixa massa molecular, como a glutathiona (GSH), micotiol (MSH) em micobactérias, coenzima A (CoASH) em *Staphylococcus aureus* e γ -glutamilcisteína em Halobactéria, apresentam um papel importante na redução do ambiente intracelular, o que é necessário para as atividades metabólicas regulares.

Palavras-chave: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, tioredoxina A1, RMN, dicroísmo circular

II.1. Introdução

As tioredoxinas são oxidoreductases com baixa massa molecular (~12 kDa), com sua estrutura secundária geralmente contendo cinco folhas- β antiparalelas e quatro alfa-hélices (LOILLIG; BERNDT, 2013; MARTIN, 1995). Experimentos *in vitro* indicam que ligações dissulfeto em diversas proteínas são eficientemente reduzidas pelas tioredoxinas (PRINZ et al., 1997; HOLMGREN, 1985; HOLMGREN 1984). Através da redução de ligações dissulfeto, as Trx são oxidadas e devem subsequentemente ser reduzidas pelas tioredoxina redutases (TrxR), utilizando NADPH (Figura II.1) (ARNÉR; HOLMGREN, 2000; PRINZ et al., 1997).

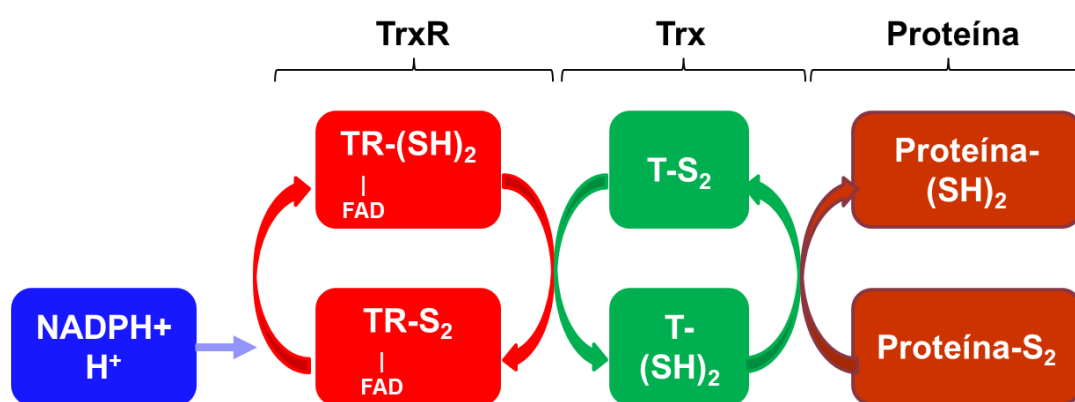


Figura II.1. Sistema de oxirredução da tioredoxina. NADPH+H⁺ reduzem a tioredoxina redutase oxidada (TR-S₂-FAD) e sua forma reduzida (TR-(SH)₂-FAD) reduz uma tioredoxina oxidada (TS₂). A tioredoxina reduzida (T-(SH)₂) então atua sobre a proteína oxidada (Proteína-S₂), reduzindo-a (Proteína (SH)₂). Figura adaptada de: ARNÉR; HOLMGREN (2000).

Sendo assim, as Trxs somente estão ativas quando em sua forma reduzida (T-(SH)₂), na qual as duas cisteínas presentes em seu sítio ativo estão cada uma ligada a um hidrogênio e em sua forma oxidada (T-S₂) não apresenta estes hidrogênios formando uma ligação dissulfeto, alterando a conformação do sítio ativo (HOLMGREN, 1995; STONE et al., 1993).

As Trxs apresentam papel crucial na regulação redox da homeostase celular em patógenos, como por exemplo em *Mycobacterium tuberculosis* e *C. pseudotuberculosis*. Isto inclui sua função altamente conservada, como a alta capacidade de sistema doador de elétrons para enzimas redutoras, também compartilhada pelas glutaredoxinas, para as funções especializadas na replicação do DNA do fago T7 ou na montagem do fago filamentoso de *Escherichia coli* (ARNÉR; HOLMGREN, 2000), e estudos recentes mostram também uma participação das Trxs na apoptose celular, através da

desnitrosilação (BENHAR et al., 2008; ARNÉR; HOLMGREN, 2000). Outros papéis importantes das Trxs são a proteção que ela confere a outras proteínas contra agregação oxidativa e inativação (HOLMGREN, 1995; HOLMGREN et al., 1989; HOLMGREN, 1985), auxílio às células quando em estresse ambiental (presença de oxigênio reativo, arsenato, peroxinitrito) (LANDINO; SKRESLET; ALSTON; 2004; MESSENS; SILVER, 2006). Apesar de as tioredoxinas possuírem a estrutura e sítio ativo conservados, algumas ainda apresentam outras atividades, como agirem como fator de crescimento (POWIS; MUSTACICH; COON, 2000), modularem a resposta inflamatória nos pulmões (NAKAMURA et al., 2005) ou promoverem o *folding* de proteínas com propriedades chaperonas (RENÉE et al., 2003). A maioria destas funções dependem da função de atividade dissulfeto-redutase das tioredoxinas (ARNÉR; HOLMGREN, 2000; HOLMGREN, 1985).

Atualmente, o metabolismo redox representa um dos alvos mais promissores para controlar e/ou modular rapidamente o crescimento de patógenos como *C. pseudotuberculosis*. Tióis de baixa massa molecular, como a glutationa (GSH), micotiol (MSH) em micobactérias, coenzima A (CoASH) em *Staphylococcus aureus* e γ -glutamilcisteína em Halobactéria, apresentam um papel importante na redução do ambiente intracelular, o que é necessário para as atividades metabólicas regulares (GABALLA et al., 2010; NEWTON et al. 1996). Outro tiol presente na família dos actinomicetos, incluindo *Corynebacterium*, é a ergotionina (ESH), uma 2-thiol-L-histidina betaína (RAWAT; AV-GAY, 2007; GENGHOF, 2010). A quantidade de ESH presente nos actinomicetos é dez vezes mais baixa do que a de MSH e, embora seja sugerida a função de ESH como um potencial antioxidante (FAHEY, 2001; CHEAH; HALLIWELL, 2012). Além dos tióis de baixa massa molecular, muitos organismos possuem tiol-dissulfeto oxidoreduases, como a tioredoxina (Trx) e a glutaredoxina (Grx), que podem agir como agentes redutores de ligações dissulfeto através de seu sítio ativo (COLLET; MESSENS, 2010; PRINZ et al., 1997).

II.2. Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram a expressão, purificação de tioredoxina A1 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, bem como sua caracterização bioquímica e biofísica.

II.3. Material e Métodos

II.3.1. Linhagem bacteriana e vetor com inserto da tioredoxina A1 de *C. pseudotuberculosis*

A linhagem bacteriana *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL foi utilizada para a expressão da proteína tioredoxina A1 de *C. pseudotuberculosis* (Cp-TrxA1, Uniprot: D9QDF8), utilizando o vetor pD441-SR, resistente à canamicina, com inserto da sequência desta proteína (DNA2.0 – EUA), contendo um sítio de restrição TEV (GGENLYFGQ, grifado em cinza) e seis histidinas (grifadas em preto) em sua extremidade C-terminal, apresentada na Figura II.2.

MNAPIALTEATFKTTVIDSDKPVLVDFWAEWCGPCKKLGPIIDEIAAEMGDEVVVGKVDVDAERNLGAMFQIMSIPTV
LIFKDGQKVAEFVGVPRPKSEIVAKLRSHQGGENLYFGQHHHHHH

Figura II.2. Sequência de aminoácidos da proteína Cp-TrxA1 (Uniprot: D9QDF8), contendo um sítio de restrição TEV (grifado em cinza) e seis histidinas (grifadas em preto).

II.3.2. Análises *in silico*

II.3.2.1. Alinhamentos

Os alinhamentos para a avaliação da sequência da proteína Cp-TrxA1 foram realizados através da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), disponibilizada pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), contrastando a sequência de aminoácidos desta proteína com o *Protein Data Bank* (PDB), para avaliar a identidade destas sequências com relação às estruturas de outras proteínas já resolvidas. Posteriormente, foi alinhada com as duas proteínas com maior identidade de acordo com o BLAST, utilizando os programas MUSCLE (EDGAR, 2004) e Box Shade (disponível em: http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.htm).

II.3.2.2. Modelagem da estrutura de Cp-TrxA1 por homologia

O programa Modeller 9v13 (ESWAR et al., 2007) foi utilizado para gerar o modelo da estrutura de Cp-TrxA1, utilizando como modelo as coordenadas atômicas da estrutura com maior identidade com Cp-TrxA1. Foram gerados modelos de Cp-TrxA1 reduzida e oxidada, para fins comparativos.

II.3.3. Superexpressão e purificação da proteína *Cp-TrxA1*

A linhagem bacteriana *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL foi transformada por choque térmico (FROGER; HALL, 2007) e cultivada por isolamento, em LB sólido contendo canamicina, para obtenção das colônias bacterianas recombinantes. Uma única colônia foi escolhida para realizar os experimentos e cultivada em meio líquido, sendo também preservada em freezer -80 °C, com glicerol 30 % (v/v) para continuidade do trabalho.

Para a expressão da proteína *Cp-TrxA1*, a linhagem recombinante contendo o vetor com inserto de *Cp-TrxA1* foi cultivada *overnight* em meio Luria-Bertani (LB) na presença de canamicina, sob agitação constante, a 37 °C. Esta cultura foi então utilizada como inóculo para um meio LB estéril, sob as condições anteriores e também com adição de canamicina, até atingir densidade óptica 0,6, visível em comprimento de onda de 600 nm. Neste momento, a cultura foi suplementada com 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ MgSO_4 e induzida com 0,35 mmol L^{-1} IPTG, com incubação durante 5h, a 30 °C, sob agitação.

A cultura foi centrifugada e o *pellet* celular ressuspendido em tampão A, composto por 20 mmol L^{-1} $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7,4, 500 mmol L^{-1} NaCl, 5% (v/v) glicerol. As células foram lisadas em quatro etapas, por sonicação com pulsos de 30% de amplitude, com 10 segundos de intervalo, seguidos por centrifugação a 8.000 x g, 6 °C, durante 40-90 minutos. O sobrenadante contendo a proteína recombinante *Cp-TrxA1* foi então colocado em uma coluna Ni-NTA, equilibrada com o mesmo tampão, para purificação por afinidade. Para que as proteínas que não se ligaram à coluna fossem removidas, a coluna foi lavada extensivamente com tampão A contendo 20 e 60 mmol L^{-1} de imidazol. Finalizando a purificação por afinidade, *Cp-TrxA1* foi eluída em tampão A contendo 500 mmol L^{-1} de imidazol.

Esta etapa de purificação foi avaliada por SDS-PAGE (20%) e em seguida, a fração contendo a *Cp-TrxA1* foi submetida à purificação por gel filtração no ÄKTA *purifier* (GE Healthcare), utilizando a coluna de exclusão por tamanho Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare), pré-equilibrada com tampão B, composto por 20 mmol L^{-1} $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7,4, 150 mmol L^{-1} NaCl. A pureza da amostra obtida após este procedimento também foi avaliada por SDS-PAGE (20%) e a concentração da proteína foi determinada espectrofotometricamente pela aplicação da lei de Lambert-Beer (GRIMSLEY; PACE, 2004).

II.3.4. Western Blot

Para confirmação da proteína apresentando o tamanho esperado em SDS-PAGE ser a proteína recombinante *Cp*-TrxA1, foi realizado o Western Blot, com anticorpos para reconhecimento da sequência de histidina da proteína recombinante. *Cp*-TrxA1 purificada por gel filtração foi aplicada em SDS-PAGE 20%, e então transferida a uma membrana de nitrocelulose com 22 mm de porosidade, a uma corrente constante de 80 mA durante 1h, imersa em tampão de transferência (14,37 g/L de glicina, 3,0 g/L de trizma base, 200 mL/L de metanol e água q.s.p. 1000 mL). Em seguida, foi utilizado tampão PBS (20 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 7,4, 150 mM NaCl) contendo 3% (m/v) de *Bovine Serum Albumin* (BSA) para incubar a membrana durante 1h, a fim de bloquear as partes da membrana sem proteína. Após lavar três vezes a membrana com PBS, esta foi encubada com o anticorpo primário anti-histidina pré-adsorvido, diluído com PBS-T contendo 0,3% de BSA e incubado por 1h. Em seguida, a membrana foi encubada com anticorpo secundário *goat-anti-rabbit* IgG conjugado com fosfatase alcalina (Sigma) em PBS contendo 0,3% de BSA durante 1h, em temperatura ambiente. Após este período, a membrana foi lavada 3 vezes com PBS e as bandas das proteínas recombinantes foram visualizadas utilizando 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP) e *nitro blue tetrazolium* (NBT) como substrato para gerar a coloração das regiões onde houve ligação dos anticorpos.

II.3.5. Dicroísmo circular (DC)

O dicroísmo circular foi realizado para a predição da estrutura secundária da *Cp*-TrxA1. Foi realizada uma repetição de 15 *scans*, sendo cinco deles utilizados para estabilizar a linha de base. Foi utilizado o espectropolarímetro J-107 (Jasco, Japão), com a utilização de 200 a 260 nm de comprimento de onda por espectro far-UV, em um tempo constante de 1 s e modo de scanner contínuo de 100 nm min⁻¹. A proteína *Cp*-TrxA1 foi diluída para 10 µmol L⁻¹ em tampão 20 mmol L⁻¹ K_2HPO_4/KH_2PO_4 . Para avaliar a influência do pH sobre a estrutura secundária desta proteína, foi utilizada uma amplitude de pHs de 7,0 a 9,0, também em tampão 20 mmol L⁻¹ K_2HPO_4/KH_2PO_4 . Além disso, foi avaliado o efeito de 1,4 µmol L⁻¹ de ditioneína (DTT), diamida, glutatona (GSH), coenzima A (CoASH) e ergotionina (ESH), bem como 0,14 µmol L das moléculas heparina, suramina, hesperidina (Hsp) e hesperitina (Hst), testados individualmente com 10 µmol L⁻¹ de *Cp*-TrxA1. A proteína foi encubada com estas moléculas durante 2h antes de realizar as medidas. Os resultados foram analisados com o software CDpro

(SREERAMA; WOODY, 2004).

II.3.6. Espalhamento de Luz Dinâmico (ELD)

As medidas de espalhamento de luz dinâmico (ELD) foram realizadas no Dynapro Molecular Dimension e as análises obtidas com o software Dynamics V6.3.40, o qual analisa a escala de tempo da intensidade da flutuação do espalhamento de luz, utilizando um processo matemático denominado autocorrelação (MORADIAN-OLDAK et al., 2000). A proteína *Cp-TrxA1* foi centrifugada durante 1h a 10.000 x g, a 4 °C. Os dados foram coletados a cada 20 s, com 15 medidas para cada proteína. Estas medidas permitiram a observação da dispersividade das amostras.

II.3.7. Ensaio turbidimétrico de redução da insulina

II.3.7.1. Determinação do pH ideal para a atividade de *Cp-TrxA1*

Trxs são capazes de reduzir ligações dissulfeto, conforme discutido anteriormente. Para a caracterização da atividade de *Cp-TrxA1* reduzindo ligações dissulfeto, foi utilizado o bem estabelecido e padronizado ensaio enzimático de redução da insulina por Trx (HOLMGREN, 1979; HOLMGREN, 1979b). Como a Trx precisa estar reduzida para que esteja ativa, foi utilizado o ditioneitol (DTT) como agente redutor, uma vez que a Trx reduz a insulina cinco mil vezes mais rápido que DTT e a redução da insulina pela Trx (HOLMGREN, 1995). A reação de redução da insulina foi monitorada turbidimetricamente por espectrofotometria, a 640 nm (RAHLFS; FISCHER; BECKER, 2001; KUROOKA et al., 1997; JORDAN et al., 1997; HOLMGREN, 1979), utilizando o espectrofotômetro Biomate UV-Visible (Thermo Fisher Scientific, EUA). A mistura para reação contém um volume total de 500 µL, com 0,2 mmol L⁻¹ de insulina, 50 mmol L⁻¹ de Tris/HCL, 2 mmol L⁻¹ de EDTA, e 5 µmol L⁻¹ de proteína e esta é denominada reação enzimática. O pH ideal para a atividade de *Cp-TrxA1* foi determinado utilizando tampão Tris/HCl 20 mmol L⁻¹ com diferentes pHs (7.0, 7.4, 7.8, 8.0, 8.4, 8.8 e 9.0). A reação foi conduzida a 25 °C pela adição de 1 mmol L⁻¹ de DTT. Além disso, uma reação sem a adição de *Cp-TrxA1*, mas contendo DTT também foi realizada como controle negativo, a fim de avaliar a influência do mesmo sobre a insulina e confirmar os dados obtidos na literatura. Esta reação é denominada não-enzimática e em caso de atividade, este valor é subtraído do valor obtido na reação enzimática.

II.3.7.2. Avaliação de outros agentes redutores e um agente oxidante para *Cp-TrxA1*

Para melhor caracterização da redução da *Cp-TrxA1* e avaliação de outros possíveis agentes redutores, em outro ensaio, ao invés do DTT foram testados a glutatona (GSH), ergotionina (ESH), coenzima A (CoASH) e o agente oxidante diamida, em concentração final de 1 mmol L⁻¹, a mesma utilizada para o DTT no experimento anterior. Além disso, todos estes agentes redutores e o agente oxidante foram em reação não enzimática, para também avaliar a ação destes agentes sobre a insulina.

II.3.7.3. Avaliação de possíveis interações de moléculas com *Cp-TrxA1* afetando sua atividade redutora

Além de avaliar o potencial redutor de *Cp-TrxA1* na presença de diferentes agentes redutores e do agente oxidante, foi também verificada a possibilidade de interação desta proteína com quatro moléculas, a heparina, suramina, Hst e Hsp, com concentração final de 0,14 µmol L⁻¹, avaliando se há influência da atividade enzimática de *Cp-TrxA1* na presença destas moléculas. Para tal, a proteína foi incubada individualmente com as moléculas *overnight* a 4 °C e em seguida submetidas a gel filtração no equipamento ÄKTA (GE Healthcare), utilizando a coluna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare), pré-equilibrada com tampão 20 mmol L⁻¹ de Tris/HCl, pH 7,4, 150 mmol L⁻¹ de NaCl, para remover as moléculas excedentes e então testados em reação enzimática na presença de 1 mmol L⁻¹ de DTT como agente redutor.

Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos uma vez, gerando seis resultados experimentais.

II.3.8. *Saturation Transfer Difference* por Ressonância Magnética Nuclear (STD-RMN)

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi utilizada para identificar a interação de *Cp-TrxA1* com potenciais moduladores. Todos os experimentos foram realizados utilizando um espectrômetro Bruker AVANCE III HD (Bruker, Alemanha) operando a 600 MHz para ¹H, equipado com uma sonda de tripla-ressonância, com gradiente de campo pulsado, no eixo z. Há diversas técnicas distintas que utilizam RMN para estudar a interação de proteínas com ligantes (BIERI et al., 2011), o que explora o monitoramento dos sinais da proteína com relação aos sinais do ligante. A técnica de *Saturation Transfer Difference* por Ressonância Magnética Nuclear (STD-RMN) é uma técnica bem estabelecida para o *screening* de ligantes (ANGULO et al.,

2008; MAYER; MEYER, 2001; MAYER; MEYER, 1999). Neste trabalho, foi escolhida uma *off-resonance* a 20 ppm, e as frequências de *on-resonance* foram selecionadas de acordo com os sinais do ligante. A sequência de pulso Bruker STDDIFFESGP foi utilizada para os experimentos de STD-NMR. A proteína foi saturada por 2 s, o atraso de reciclagem foi ajustado para 3 s e foi utilizado um poder de saturação de 35 dBW. Para suprimir o sinal de proteína, utilizou-se um filtro de bloqueio de rotação de 30 ms.

Assim, 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cada molécula (heparina, suramina, Hsp e Hst) foram testados com 20 μmol de Cp-TrxA1 eluídos em 20 mmol L^{-1} K_2HPO_4 / KH_2PO_4 , pH 7,4, e as possíveis interações foram avaliadas com base em STD-RMN.

II.4. Resultados e Discussão

II.4.1. Análises *in silico*

II.4.1.1. Alinhamento da sequência de aminoácidos de Cp-TrxA1 com o PDB

Foi realizado um BLAST da sequência de aminoácidos de Cp-TrxA1, contrastando com o PDB e as estruturas das proteínas com maior identidade foram a de *Mycobacterium avium* (PDB: 4WXT) e *Mycobacterium tuberculosis* (PDB: 2L4Q), com 50 % e 48% de identidade, respectivamente. Estas sequências foram alinhadas e apresentadas na Figura II.3.

		Identidade (%)
<i>C. pseudotuberculosis</i>	MN-----APIALTEATFKTIVIDSQKPVLVDFWAEWCGPCKKLGPIIDEIAEMCDEVVVGKVDVDAERNLCAMFOIMSIPTVLI FKDGQKVAEFVGVFPKSEIVAKLRSHQ----	
<i>M. avium</i>	MTDAEKAIATIEVSDASFSTDVLSNKPVLVDFWATWCGPCKMVAPVLEEIASERGDHLTVAKLDVDANPETAQNFQVVSIPITLILFKDGQPVKRIVGAKGKAALLRELSDAVPNLG	50%
<i>M. tuberculosis</i>	MTDSEKS-ATIKVTDASFATDVLSNKPVLVDFWATWCGPCKMVAPVLEEIAERATDLTVAKLDVDINPETARNFQVVSIPITLILFKDGQPVKRIVGAKGKAALLRELSDVVPNLN	48%

Figura II.3. Alinhamento da sequência de aminoácidos de Cp-TrxA1 (Uniprot: D9QDF8) com a sequência de tioredoxina de *M. avium* (PDB: 4WXT) e de tioredoxina de *M. tuberculosis* (PDB: 2L4Q), apresentando 50% e 48% de identidade com Cp-TrxA1, respectivamente. O sítio ativo (CGPC) conservado está representado pela barra vermelha acima das sequências.

Pode-se verificar uma alta conservação entre as sequências das três proteínas, apesar da identidade não muito alta de suas estruturas. Além disso, o sítio ativo (Trp31-Cys32-Gly-Pro-Cys35) é conservado para as Trxs, destacado na Figura II.3. por uma barra vermelha acima das sequências alinhadas,

II.4.1.2. Modelagem da estrutura de *Cp-TrxA1*

A modelagem por homologia da estrutura de *Cp-TrxA1* foi realizada de acordo com a metodologia descrita no item II.3.2.2. As estruturas de *M. avium* (PDB: 4WXT) e de *M. tuberculosis* (PDB: 2L4Q) apresentadas no alinhamento da Figura II.3, foram utilizadas para modelagem da estrutura de *Cp-TrxA1* oxidada e reduzida, respectivamente. A Figura II.4 mostra o modelo das estruturas de *Cp-TrxA1* sobrepostos, com destaque em seu sítio ativo oxidado ou reduzido. Este tipo de estrutura é conhecido por sanduíche de três camadas α - β - α , em que uma α -hélice intercala com uma folha- β .

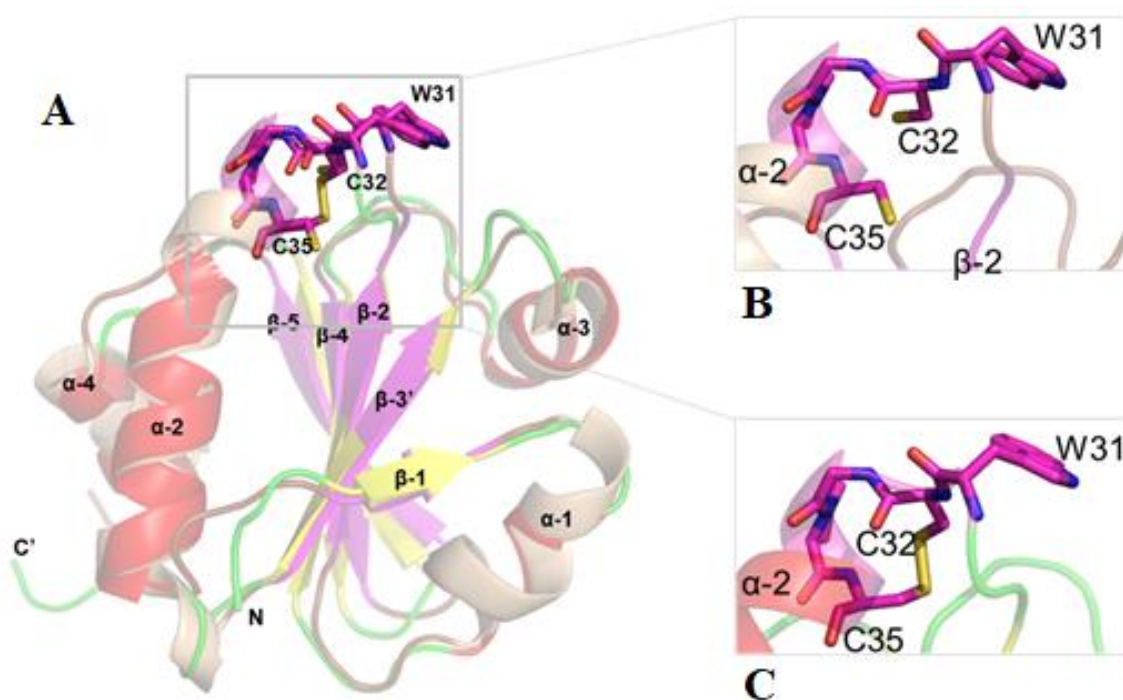


Figura II.4. Modelos por homologia da estrutura oxidada ou reduzida de *Cp-TrxA1*, sobrepostos, com foco em seu sítio ativo. **A.** Estruturas sobrepostas de *Cp-TrxA1* oxidada e *Cp-TrxA1* reduzida. **B.** Ampliação do sítio ativo de *Cp-TrxA1* reduzida, mostrando as duas cisteínas sem a formação da ligação dissulfeto. **C.** Ampliação do sítio ativo de *Cp-TrxA1* oxidada, mostrando a ligação dissulfeto.

De acordo com os modelos de *Cp-TrxA1* apresentados na Figura II.4., verifica-se a presença de 5 folhas- β e 4 α -hélices, o que corrobora com os dados obtidos na literatura

e com a estrutura utilizada como modelo, mantendo o dobramento típico da família das tioredoxinas. Além disso, o que se pode verificar é que não há alterações significativas na estrutura secundária desta proteína de acordo com o seu estado redox, com exceção de seu sítio ativo. As Trxs apresentam sítio ativo conservado (Trp31-Cys32-Gly-Pro-Cys35), importante para seu potencial redutor de ligações dissulfeto (HOLMGREN et al., 2005; HOLMGREN, 1995), uma vez que quando oxidadas, as cisteínas do sítio ativo formam uma ligação dissulfeto e quando reduzidas, cada enxofre presente nas cisteínas ganha um hidrogênio, rompendo esta ligação dissulfeto e alterando a conformação do sítio ativo (HOLMGREN, 1995; KRAUSE; HOLMGREN, 1991). Para que a Trx esteja em sua forma ativa, é essencial que esta esteja reduzida, pois somente deste modo será capaz de reduzir outras proteínas.

II.4.2. Purificação da proteína *Cp-TrxA1*

A *Cp-TrxA1* foi expressada e purificada por afinidade em coluna de Ni-NTA, de acordo com o protocolo do item II.3.3. Todas as etapas da purificação por afinidade foram avaliadas por SDS-PAGE (Figura II.5.).

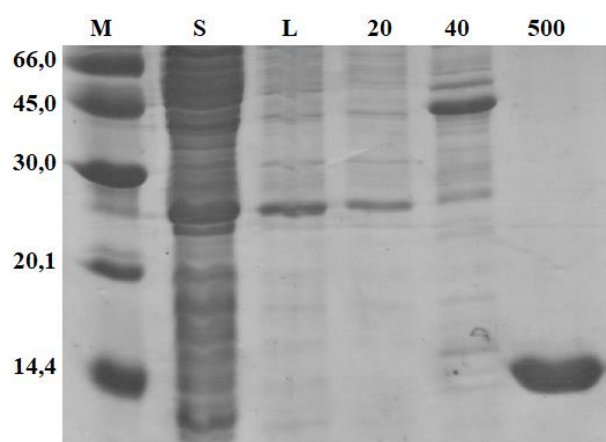


Figura II.5. SDS PAGE das etapas de purificação por afinidade, utilizando coluna Ni-NTA. **M:** marcador molecular; **S:** sobrenadante; **L:** lavagem da coluna com tampão A; **20:** lavagem da coluna com tampão A contendo 20 mmol L⁻¹ de imidazol; **40:** lavagem da coluna com tampão A contendo 40 mmol L⁻¹ de imidazol; **500:** lavagem da coluna com tampão A contendo 500 mmol L⁻¹ de imidazol (elução da *Cp-TrxA1*).

A proteína *Cp-TrxA1* foi eluída no tampão contendo 500 mmol L⁻¹ de imidazol, conforme pode-se verificar pela banda presente no SDS-PAGE, com aproximadamente 14 kDa, tamanho esperado para a proteína contendo a cauda de histidina e sítio de restrição TEV. Após a purificação por afinidade e a análise por SDS-PAGE, a proteína

foi concentrada em concentrador Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units (Merck, EUA), com porosidade de 3 kDa, e em seguida purificada por gel filtração, de acordo com o item II.3.3. A Figura II.6. mostra o cromatograma da gel filtração, bem como o SDS-PAGE após esta purificação de exclusão por tamanho.

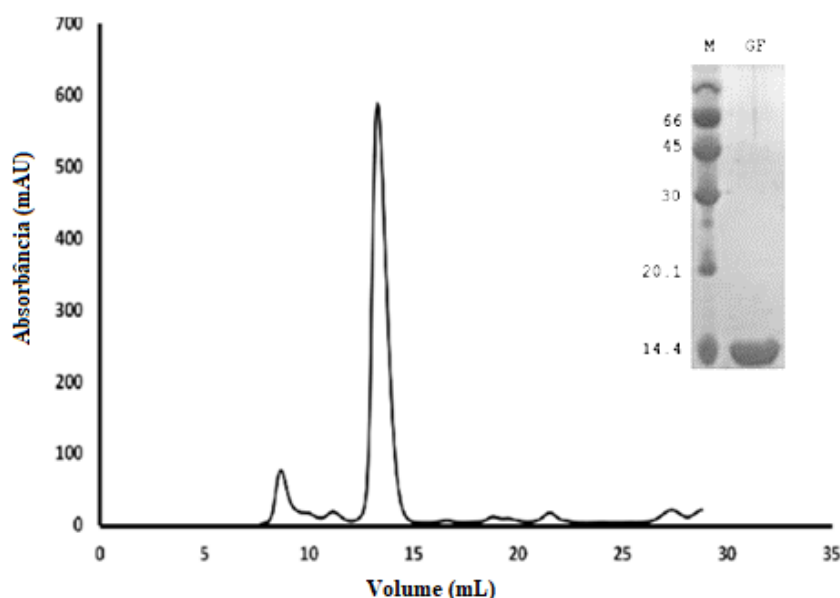


Figura II.6. Purificação da proteína *Cp-TrxA1* por gel filtração. À esquerda está o cromatograma obtido na gel filtração, utilizando a coluna Superdex 75 10/300 GL e à direita, no canto superior da figura, está o SDS-PAGE da amostra correspondente a 13-15 mL (eixo x) do volume da gel filtração, mostrando a *Cp-TrxA1* em alto grau de pureza. **M:** marcador; **GF:** gel filtração

De acordo com a Figura II.6, a amostra de *Cp-TrxA1* foi purificada com sucesso e obtida em alto grau de pureza.

II.4.3. Western Blot

A proteína com tamanho esperado (~14 kDa) foi obtida na etapa anterior, mas para a confirmação de que esta é realmente a proteína recombinante de interesse, a amostra obtida na gel filtração foi submetida ao Western Blot, de acordo com a metodologia do item II.3.4., utilizando anticorpos para reconhecimento da sequência de histidina, presente na proteína recombinante. A Figura II.7. mostra o resultado deste teste.

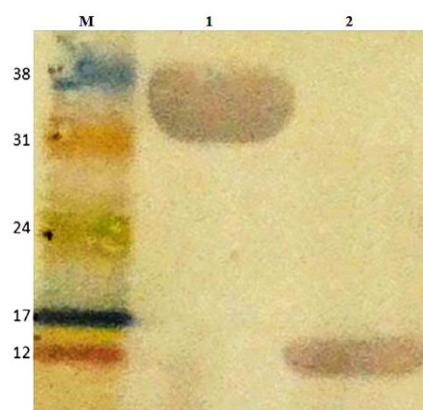


Figura II.7. Western blot para confirmação da obtenção da proteína recombinante *Cp-TrxA1*. **M:** marcador; **1:** controle positivo (proteína recombinante conhecida, de aproximadamente 35 kDa); **2:** *Cp-TrxA1* recombinante.

Como este teste foi realizado especificamente para reconhecimento da sequência de histidinas, foi possível a confirmação de que a proteína obtida é a proteína recombinante *Cp-TrxA1*.

II.4.4. Espalhamento de Luz Dinâmico (ELD)

De acordo com a metodologia descrita no item II.3.6, foi realizado o ELD da proteína recombinante *Cp-TrxA1*. A Figura II.8. apresenta o resultado deste teste, concluindo ser uma amostra monodispersa.

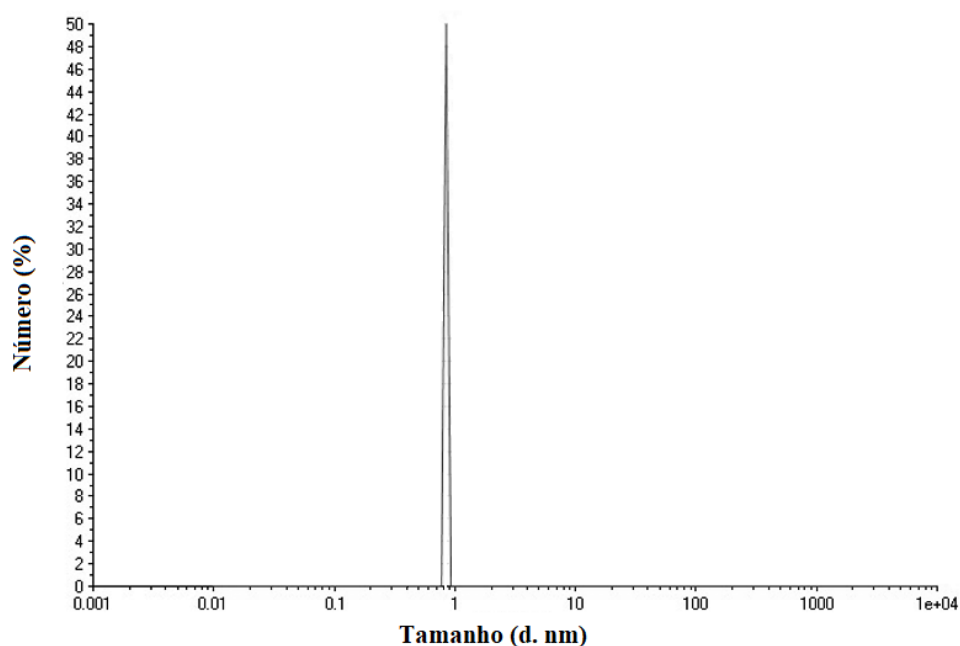


Figura II.8. Espalhamento de luz dinâmico da proteína recombinante *Cp-TrxA1*, mostrando a monodispersividade da amostra.

II.4.5. Ensaio turbidimétrico de redução da insulina

II.4.5.1. Determinação do pH ideal para a atividade de *Cp-TrxA1*

Conforme mencionado anteriormente, o protocolo do teste de redução de ligações dissulfeto da insulina por Trxs já está bem padronizado e documentado, entretanto o pH ótimo para a atividade enzimática apresentado na literatura varia de 6,8 a 7,5 (JUNG; THOMAS, 1996; KOSOWER; KOSOWER, 1995; HOLMGREN, 1984; HOLMGREN, 1979a; HOLMGREN, 1979b), de acordo com a origem da Trx em teste. Deste modo, foi necessária a utilização de uma faixa de pHs de 7,0 a 9,0 para encontrar o pH ideal para o ensaio enzimático utilizando *Cp-TrxA1*. Para tal, foi utilizada a *Cp-TrxA1* purificada, o DTT como agente redutor da Trx e a insulina humana a ser reduzida, de acordo com o protocolo do item II.3.7.1. Os resultados foram obtidos em absorbância, 650 nm. A reação de redução a insulina é possível ser quantificada através de espectrofotometria, pois cada monômero de insulina apresenta três ligações dissulfeto (Figura II.9). Quando os enxofres formando estas ligações dissulfeto são reduzidos pela *Cp-TrxA1*, estas ligações se rompem; causando a precipitação da insulina e consequentemente aumentando a absorbância da amostra.

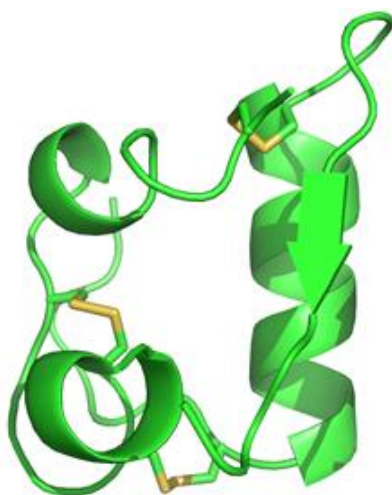


Figura II.9. Estrutura tridimensional da insulina humana (PDB: 4EWW). As três ligações dissulfeto estão representadas por linhas amarelas.

A Figura II.10. apresenta o gráfico dos resultados obtidos neste teste, considerando os diferentes pHs testados (eixo x) e a porcentagem de atividade da *Cp-TrxA1* (eixo y). Considerou-se 100% o pH em que foi obtida a maior atividade enzimática desta proteína (pH 7,4) e o restante dos resultados foi normalizado de acordo com este

resultado. A única variável deste ensaio enzimático foi o pH.

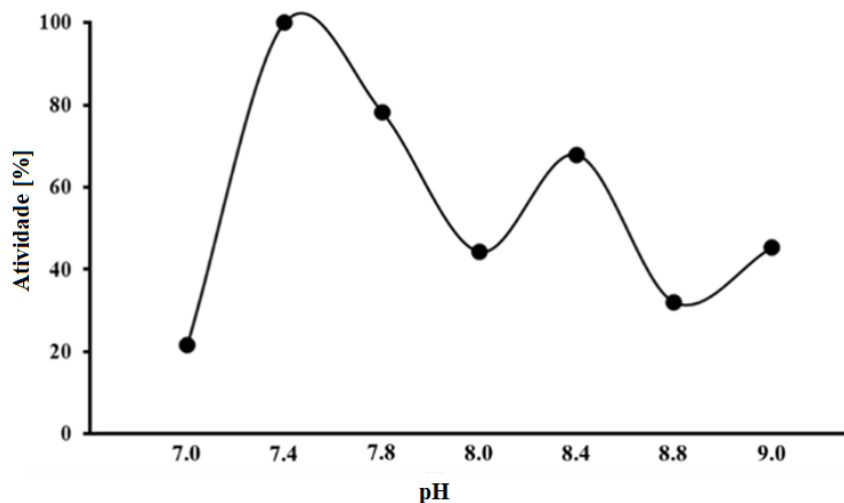


Figura II.10. Gráfico da atividade enzimática da *Cp-TrxA1* na redução da insulina em diferentes pHs.

Conforme pode-se observar, entre os pHs testados, o pH em que se obteve a maior atividade enzimática de *Cp-TrxA1* é 7,4. Os próximos ensaios para a redução da insulina foram realizados neste pH.

II.4.5.2. Avaliação de outros agentes redutores e um agente oxidante para *Cp-TrxA1*

Após a determinação do pH enzimático ideal para *Cp-TrxA1*, foi necessário o estabelecimento do tempo necessário para a reação. A absorbância (650nm) foi medida a cada cinco minutos e *Cp-TrxA1* foi testada durante 60 minutos consecutivos, em pH 7,4, utilizando DTT como agente redutor. Além disso, para avaliar o efeito do DTT sobre as ligações dissulfeto da insulina, o mesmo foi testado como controle negativo, ou seja, nas mesmas condições do ensaio enzimático, mas sem a adição de *Cp-TrxA1*. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura II.11., pelo gráfico mostrando a leitura da absorbância (650 nm) no eixo y e o tempo de reação (min), no eixo x.

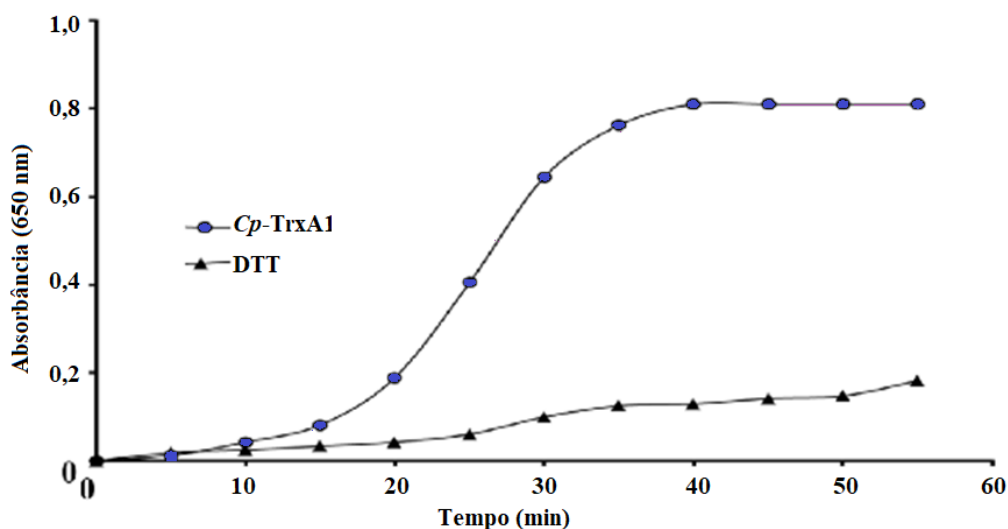


Figura II.11. Gráfico da redução de insulina por ensaio enzimático (com *Cp-TrxA1*) e não enzimático (sem *Cp-TrxA1*). No gráfico, o ensaio enzimático, sendo o DTT o agente redutor de *Cp-TrxA1* e esta a redutora da insulina está representado por bolinhas azuis; o ensaio não enzimático, sendo o DTT o agente redutor da insulina e sem a adição de *Cp-TrxA1* está representado por triângulos

Na Figura II.11. é possível observar que o DTT apresenta uma pequena atividade de redução da insulina, que não é significativa quando comparada à atividade de *Cp-TrxA1* para o mesmo propósito. DTT mostrou-se eficaz na redução de *Cp-TrxA1*, pois conforme discutido anteriormente, é necessário que esta proteína esteja reduzida para que esteja ativa e de acordo com o gráfico, houve a redução de insulina por *Cp-TrxA1*, em proporções extremamente superiores à redução da insulina na ausência desta proteína. Além disso, o tempo necessário para a redução da insulina de acordo com a concentração dos reagentes da mistura, foi de aproximadamente 38 minutos, quando a absorvância parou de aumentar, significando o término da reação.

No próximo ensaio enzimático, ao invés do DTT, foram testados a GSH, ESH, CoASH e o agente oxidante diamida, em concentração final de 1 mmol L^{-1} , a mesma concentração utilizada para o DTT no experimento anterior, para fins comparativos da atividade de redução da insulina por *Cp-TrxA1*. De acordo com os resultados obtidos anteriormente, estes testes foram realizados em pH 7,4, durante 38 minutos experimentais. Além disso, todos estes agentes redutores e o agente oxidante foram testados em reação não enzimática, para a avaliação da ação redutora destes agentes sobre a insulina e consequente interferência nos resultados experimentais. Em caso de atividade de redução da insulina por estes agentes, os valores obtidos na reação não enzimática são subtraídos do resultado geral de redução de insulina durante o ensaio enzimático. Os resultados estão apresentados na Figura II.12, e a tabela contendo todos os resultados

obtidos experimentalmente encontra-se no material suplementar (Tabela SII.1.).

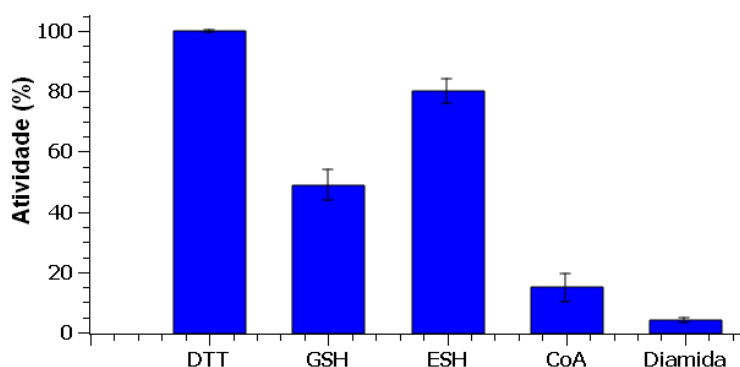


Figura II.12. Atividade de redução da insulina por *Cp-TrxA1* na presença de diferentes agentes redutores e agente oxidante.

Pode-se observar na Figura II.12 que a maior atividade enzimática de redução de insulina por *Cp-TrxA1* ocorreu na presença de DTT, seguida por ESH, mantendo 80 % da atividade de *Cp-TrxA1* com DTT (Figura II.12). A redução de *Cp-TrxA1* por ESH não havia sido previamente descrita na literatura. ESH é uma betaína de 2-tiol-L-histidina (RAWAT; AV-GAY, 2007; HOLMGREN, 1985), sendo considerado um antioxidante (CHEAH; HALLIWELL, 2012).

A adição do tripeptídeo GSH ao invés de DTT proporcionou uma queda na atividade enzimática de *Cp-TrxA1*, mantendo um pouco menos de 50 % da atividade desta proteína comparada à sua atividade na presença de DTT. GSH é conhecida por ser o agente redutor de glutaredoxinas, entretanto o fato de esta molécula ser capaz de também reduzir *Cp-TrxA1* indica não só a variabilidade de substratos de GSH, mas também a versatilidade de *Cp-TrxA1* quanto à moléculas que possam reduzi-la.

A oxidação de *Cp-TrxA1* por diamida resultou em menos de 5 % de atividade desta proteína, o que é justificado, pois conforme explicado anteriormente, Trxs precisam estar reduzidas para que estejam ativas e possam reduzir outros substratos; em seu estado oxidado, elas formam uma ligação dissulfeto em seu sítio ativo, impossibilitando a redução de outras proteínas por elas.

II.4.5.3. Avaliação de possíveis interações de moléculas com *Cp-TrxA1* afetando sua atividade redutora

Estes experimentos foram realizados de acordo com a metodologia descrita no item II.3.7.3 do presente trabalho. A insulina foi reduzida enzimaticamente por *Cp-TrxA1* com DTT como agente redutor, com a adição de heparina, suramina, Hst e Hsp, para

avaliar consequentes efeitos inibitórios em caso de interação da proteína com estas moléculas. A redução de insulina por Cp-TrxA1 na presença de DTT e sem as moléculas a serem testadas, foi considerada o controle positivo, estabelecendo ser este os 100 % de atividade. Os resultados estão dispostos na Figura II.13 e a tabela contendo todos os resultados obtidos experimentalmente encontra-se no material suplementar (Tabela SII.1.).

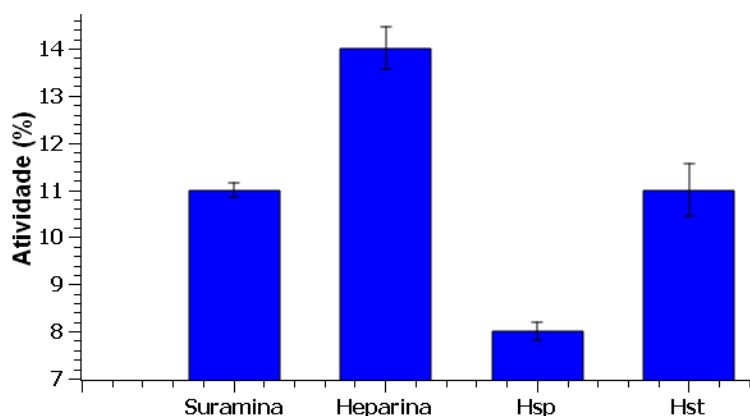


Figura II.13. Avaliação da inibição da atividade enzimática da redução de insulina por Cp-TrxA1 na presença de suramina, heparina, Hsp ou Hst.

Conforme pode-se observar na Figura II.13, as quatro moléculas testadas afetaram a atividade enzimática de redução da insulina por Cp-TrxA1, inibindo mais de 85 % desta reação em todas as condições testadas. As estruturas moleculares destas moléculas estão disponíveis na Figura II.SI (materiais suplementares deste capítulo).

A heparina é um polissacarídeo linear, polidisperso, constituído por unidades repetidas de ácido piranossilurônico (ligados por 1→4) e resíduos de 2-amino-2-desoxiglucopirranose (glucosamina) (COMPER, 1981). Geralmente, os grupos da heparina carregados negativamente, sulfo e carboxil, interagem com os aminoácidos naturalmente carregados positivamente nas proteínas (BENAVENTE-GARCIA; CASTILLO, 2008) e um modo de interação similar de interação é observado para a suramina, um análogo da heparina. Heparina vem sendo utilizada no tratamento de trombose venosa sinusal (GOULD et al., 1999), e no tratamento de câncer (LEBEAU, et al, 1994). No ensaio de inibição enzimática, a heparina inibiu em torno de 86 % da atividade de Cp-TrxA1, comparando com os resultados obtidos no controle positivo.

A suramina (Figura II.SI, materiais suplementares) é um derivado de naftiluréia polissulfonado altamente carregado (ARAGÃO, 2008). Esta molécula vem sendo utilizada como agente terapêutico sintético (ARAGÃO, 2008) em diversas áreas médicas,

como no tratamento da doença do sono (tripanossomíase) africana (ZHANG; GIROUD; BALTZ, 1991), na oncologia, visando o tratamento de câncer de mama (GRADISHAR et al., 2000); inibição de câncer pancreático (BHARGAVA, 2007), câncer de próstata (EISENBERGER, 1995), entre outros, e no tratamento filaríase denominada oncocercose ou “cegueira dos rios” (ARAGÃO, 2008; FORTE, 2007; BURCH; ASHBURN, 1951). Esta ação tão diversificada apresentada pela suramina pode ser explicada por ela conseguir interagir com diversas proteínas, geralmente competindo pela mesma região de interação (CAPILA, R. J. LINHARDT, 2002; BROWN, 2004; MANETTI; CORELLI; BOTTA, 2000). No ensaio de inibição enzimática, a suramina inibiu em torno de 89 % da atividade de *Cp-TrxA1*, comparando com os resultados obtidos no controle positivo.

A Hst e Hsp são flavonóides com propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e neuroprotetores (HWANG; YEN; 2012; BENAVENTE-GARCIA; CASTILLO, 2008; CHO, 2006; YU, 2005), utilizados também no tratamento da retinopatia diabética e de edema macular (SRIRANGAM; HIPPALGAONKAR; MAJUMDAR, 2012.), sendo Hsp uma flavanona glicosídeo (rutinose) e Hst é sua forma aglicona, ou seja, sem o dissacarídeo rutinose. No ensaio de inibição enzimática, Hsp e Hst inibiram cerca de 92 e 89 % da atividade de *Cp-TrxA1*, comparando com os resultados obtidos no controle positivo.

Deste modo, de acordo com os resultados, pode-se concluir que foram obtidas mudanças significativas na atividade redutora de *Cp-TrxA1* na presença destas quatro moléculas testadas. Na próxima etapa deste trabalho, as mesmas moléculas, bem como os agentes redox testados no ensaio enzimático de *Cp-TrxA1* foram testados quanto a sua influência na estrutura secundária desta proteína. Além disso, as quatro moléculas testadas como inibidores de *Cp-TrxA1* também tiveram sua interação com esta proteína avaliada por RMN, a fim de tentar elucidar os modos de interação do ligante. Estes resultados serão apresentados nas próximas sessões deste capítulo.

II.4.5. Dicroísmo circular

O DC foi utilizado primeiramente para prever a estrutura secundária de *Cp-TrxA1* e em segundo lugar, mas não menos importante, para avaliar as mudanças conformacionais desta estrutura na presença de diferentes pHs e dos agentes redox testados no ensaio anterior, bem como das quatro moléculas utilizadas no ensaio de atividade enzimática de redução da insulina por *Cp-TrxA1*. O protocolo para o DC está descrito no item II.3.5. deste capítulo, e foi utilizada a proteína *Cp-TrxA1* a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$

(sem adição de insulina), em tampão 20 mmol L⁻¹ K₂HPO₄/KH₂PO₄. Para avaliar a influência do pH sobre a estrutura secundária desta proteína, neste primeiro experimento foi utilizada uma amplitude de pHs de 7,0 a 9,0 e os resultados estão apresentados na Figura II.14.

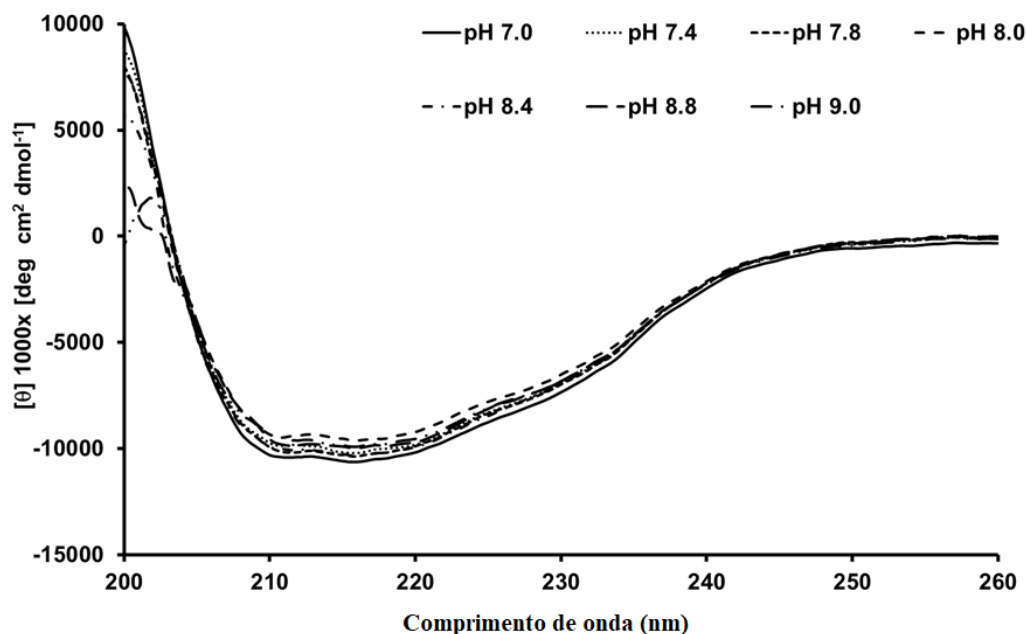


Figura II.14. Avaliação por dicroísmo circular da influência do pH na estrutura secundária de *Cp-TrxA1*.

Pode-se avaliar através do gráfico presente na Figura II.14. que os pHs não alteraram significativamente a estrutura secundária de *Cp-TrxA1*. Os dados de elipticidade molar obtidos em cada condição experimental foram utilizados para calcular a porcentagem dos componentes da estrutura secundária desta proteína através do programa CDpro e estas porcentagens estão dispostas na Tabela II.S2, no Material Suplementar deste capítulo.

Após esta avaliação da influência do pH na estrutura secundária de *Cp-TrxA1*, foi testada a influência dos agentes redox a 1,4 μmol L⁻¹ sobre a estrutura secundária desta proteína (a 10 μmol L⁻¹), em pH 7,4 (pH ótimo obtido no ensaio enzimático). Os resultados obtidos estão presentes na Figura II.15. A estrutura secundária de *Cp-TrxA1* sem a presença dos agentes redox foi utilizada como controle positivo, para fins comparativos dos resultados obtidos da estrutura secundária desta proteína na presença de agentes redox.

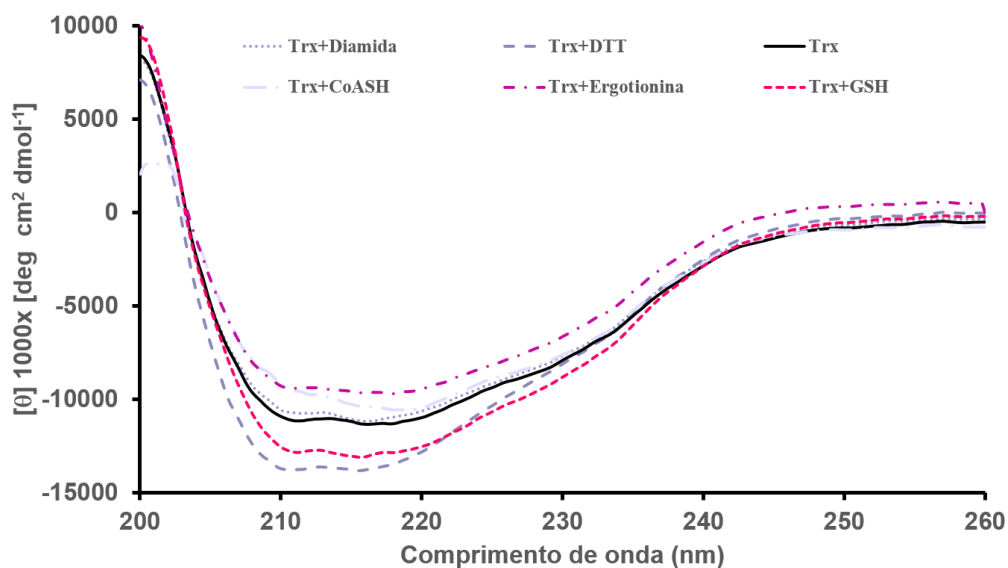


Figura II.15. Avaliação por dicroísmo circular da influência de agentes redox na estrutura secundária de *Cp-TrxA1*.

De acordo com os dados obtidos em elipticidade molar, contrastada com o comprimento de onda utilizado durante o DC (Figura II.15.), pode-se observar que todos os agentes redutores alteraram a estrutura secundária de *Cp-TrxA1*, de acordo com o controle positivo (Trx). O resultado experimental obtido para a diamida foi muito parecido aos dados experimentais do controle positivo, podendo-se sugerir que *Cp-TrxA1* do controle positivo esteja em seu estado oxidado. Assim como para os diferentes pHs, os cálculos da composição da estrutura secundária de *Cp-TrxA1* em cada condição experimental estão presentes na Tabela II.S2 (material suplementar).

O próximo experimento foi realizado para avaliar a influência de suramina, heparina, Hsp e Hst, todos na concentração $0,14 \mu\text{mol L}^{-1}$, na estrutura secundária de *Cp-TrxA1* ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$). Os resultados experimentais estão expressos em elipticidade molar com relação ao comprimento de onda (200-260 nm), na Figura II.16.

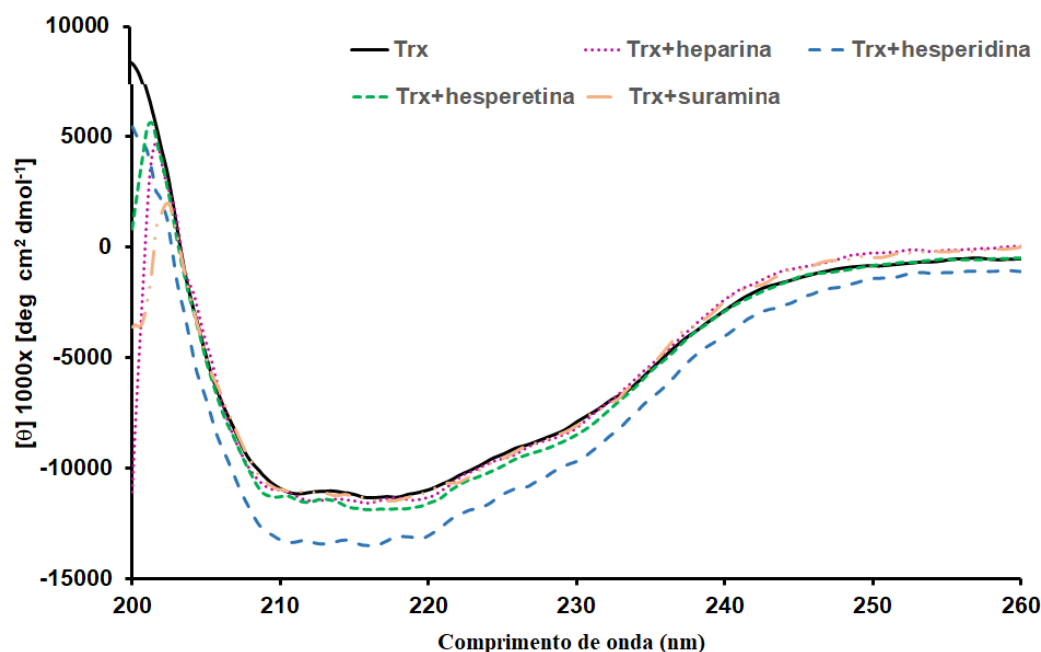


Figura II.16. Avaliação por dicroísmo circular da influência de suramina, heparina, Hsp e Hst na estrutura secundária de *Cp-TrxA1*.

Conforme é possível observar, a única molécula que altera a estrutura secundária de *Cp-TrxA1* é a Hsp e com base na comparação da predição da composição da estrutura secundária do controle positivo, com este resultado experimental, verifica-se uma alteração na porcentagem de α -hélices, de 34% (controle positivo) para 38;% (*Cp-TrxA1* com Hsp). De acordo com dados obtidos na literatura, a interação de diversas Trxs com inibidores ou ligantes pode causar mudanças conformacionais (HALL et al., 2011; CHARTRON et al., 2007; QIN et al., 2005), o que corrobora com o resultado obtido. Apesar de Hst, heparina e suramina inibirem a atividade de *Cp-TrxA1*, conforme demonstrado no experimento de atividade enzimática, estes inibidores não alteram a estrutura conformacional de *Cp-TrxA1*, o que sugere um modo de interação diferente do modo de interação com Hsp. Os cálculos da composição da estrutura secundária de *Cp-TrxA1* em cada condição experimental estão presentes na Tabela II.S2 (material suplementar).

II.4.6. Saturation Transfer Difference por Ressonância Magnética Nuclear (STD-RMN)

Foram realizados experimentos de STD-RMN para a tentativa de determinar o modo de interação dos ligantes com a proteína, de acordo com o item II.3.8 deste capítulo. A Figura II.17. mostra os fatores de relativos de amplificação STD (STD-AF) e os

epítos das ligações de *Cp*-TrxA1 com suramina e Hst.

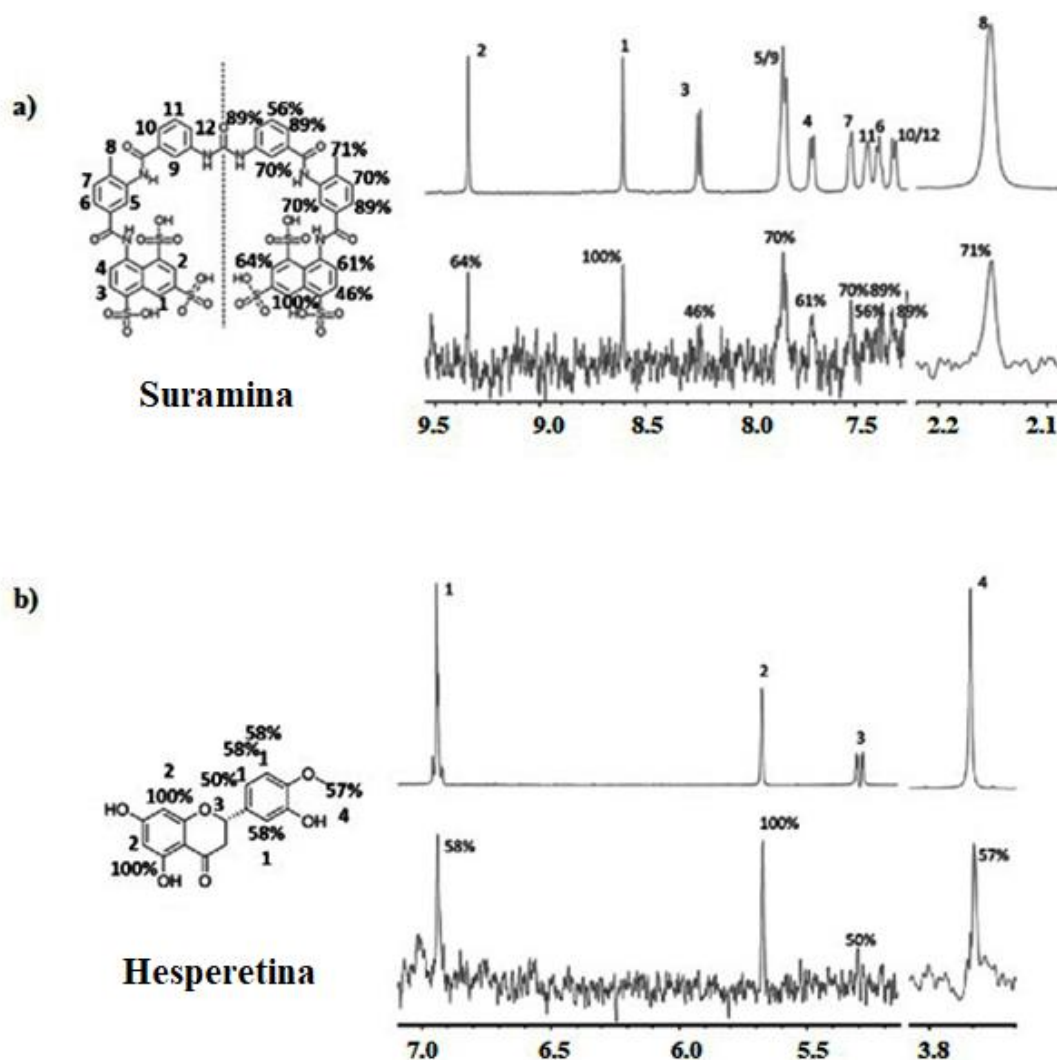


Figura II.17. Ilustração dos resultados de STD-RMN para *Cp*-TrxA1 com suramina e Hst. À direita estão os espectros de RMN e à esquerda, os modos de interação, com os STD-AF. **a)** Fatores de amplificação relativos STD e epítos da ligação de suramina interagindo com *Cp*-TrxA1. **b)** Fatores de amplificação relativos STD e epítos da ligação de Hst interagindo com *Cp*-TrxA1.

Os experimentos STD-NMR de *Cp*-TrxA1 confirmaram a interação da proteína com suramina e Hst, entretanto os experimentos envolvendo *Cp*-TrxA1 com heparina e Hsp não proporcionaram resultados possíveis de serem avaliados por esta técnica. Isto ocorre devido ao *cut-off* da afinidade em experimentos STD-NMR, que requerem que o ligante se dissocie do receptor da proteína para permitir uma avaliação desta ligação. Os complexos proteína-ligante com constante de dissociação menor do que poucos μmol não são diretamente observados em experimentos STD-RMN.

A suramina interage predominantemente com *Cp*-TrxA1 através dos grupos do

ácido sulfônico, devido ao fato de o STD-AF de 100 % ser observada nesta porção (Figura II.17.). A avaliação dos epítomos de ligação de Hst é bastante complicada, uma vez que todos os hidrogênios foram expostos ao efeito de STD, entretanto foi possível determinar que o STD-AF de 100 % corresponde aos hidrogênios do sistema de anel aromático desta molécula (Figura II.17.).

Hst e suramina mostraram efeitos inibidores bastante fortes (maiores do que 85% de inibição da atividade de *Cp-TrxA1*) e a identificação dos epítomos de ligação destas moléculas proporcionou informações úteis para experimentos de *docking* e para refinar as orientações relativas destas moléculas na estrutura da proteína.

II.5. Conclusão

As Trx participam de diversas regulações da homeostase redox celulares em patógenos, importante para sua sobrevivência em condições adversas. O alto nível de conservação do sítio ativo das Trxs bem como de seu *fold*, demonstram sua importância para esta classe de proteínas. Os agentes redutores testados apresentaram efeitos diferentes na atividade enzimática de *Cp-TrxA1*, sendo o melhor desempenho realizado na presença de DTT, seguido por ESH e GSH. A proteína oxidada não é capaz de realizar o rompimento das ligações dissulfeto de outras proteínas, resultado comprovado com a adição de diamida ao ensaio enzimático de *Cp-TrxA1*. As moléculas suramina, heparina, Hst e Hsp são capazes de inibir com eficácia a atividade de *Cp-TrxA1* e de acordo com os resultados obtidos tanto em DC quanto em RMN, sugere-se que interajam de modos diferentes com esta proteína. A inibição de proteínas como Trx representa um papel importante na viabilidade do patógeno e a caracterização bioquímica e biofísica de *Cp-TrxA1* proporciona um maior conhecimento sobre o comportamento desta proteína, fornecendo ferramentas para futuros estudos com o intuito de inibição da atividade desta proteína.

II.6. Referências

ANGULO, J. et al. Saturation Transfer Difference (STD) NMR spectroscopy characterization of dual binding mode of a mannose disaccharide to DC-SIGN. **ChemBioChem**, v. 9, n. 14, p. 2225-2227, 2008.

ARAGÃO, E. A. Efeito da suramina na atividade da fosfolipase A2 secretada humana do grupo IIA. 2008. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo.

ARNÉR, E. S. J; HOLMGREN, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. **Eur. J. Biochem.**, 267, p. 6102-6109 2000.

AYERS, J. L. Caseous lymphadenitis in goats and sheep: a review of diagnosis, pathogenesis, and immunity *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Journal of the American Veterinary Medical Association (USA)**, 1977.

BHARGAVA, S. et al. Suramin inhibits not only tumor growth and metastasis but also angiogenesis in experimental pancreatic cancer. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, v. 11, n. 2, p. 171-178, 2007.

BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 15, p. 6185-6205, 2008.

BENHAR, M. et al. Regulated protein denitrosylation by cytosolic and mitochondrial thioredoxins. **Science**, v. 320, n. 5879, p. 1050-1054, 2008.

BIERI, M. et al. Macromolecular NMR spectroscopy for the non-spectroscopist: beyond macromolecular solution structure determination. **The FEBS journal**, v. 278, n. 5, p. 704-715, 2011.

BROWN, T. A. et al. Adhesion or plasmin regulates tyrosine phosphorylation of a novel membrane glycoprotein p80/gp140/CUB domain-containing protein 1 in epithelia. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 15, p. 14772-14783, 2004.

BURCH, T. A.; ASHBURN, L. L. Experimental therapy of onchocerciasis with suramin and hetrazan; results of a three-year study. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 1, n. 5, p. 617-623, 1951.

CAPILA, I.; LINHARDT, R. J. Heparin–protein interactions. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 41, n. 3, p. 390-412, 2002.

CHARTRON, J. et al. 3 ‘-Phosphoadenosine-5 ‘-phosphosulfate Reductase in Complex with Thioredoxin: A Structural Snapshot in the Catalytic Cycle. **Biochemistry**, v. 46, n. 13, p. 3942-3951, 2007.

CHEAH, I. K.; HALLIWELL, B. Ergothioneine; antioxidant potential, physiological function and role in disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 5, p. 784-793, 2012.

CHO, J. Antioxidant and neuroprotective effects of hesperidin and its aglycone hesperetin. **Archives of pharmacal research**, v. 29, n. 8, p. 699-706, 2006.

COLLET, J.-F.; MESSENS, J. Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. **Antioxidants & redox signaling**, v. 13, n. 8, p. 1205-1216, 2010.

COMPER, Wayne D. **Heparin (and Related Polysaccharides): Structural and Functional Properties**. Gordon & Breach Publishing Group, 1981.

DORELLA, F. A. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Veterinary research**, v. 37, n. 2, p. 201-218, 2006.

EDGAR, R. C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. **BMC bioinformatics**, v. 5, p. 113, 2004.

EISENBERGER, Mario A. et al. Phase I and clinical evaluation of a pharmacologically guided regimen of suramin in patients with hormone-refractory prostate cancer. **Journal of clinical oncology**, v. 13, n. 9, p. 2174-2186, 1995.

ESWAR, N. et al. Comparative protein structure modeling with MODELLER. **Curr. Protoc. Bioinformatics**, v. 15, p. 1-30, 2007.

FAHEY, R. C. Novel thiols of prokaryotes. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 333-356, 2001.]

FORTE, J. A. G. M. Estudo clínico da oncocercose na Guiné-Bissau. 2007. **Tese de Doutorado**. Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências Médicas.

FROGER, A.; HALL, J. E. Transformation of plasmid DNA into E. coli using the Heat Shock Method. *Journal of Visualized Experiments*; v. 6, p. 253, 2007.

GABALLA, A. et al. Biosynthesis and functions of bacillithiol, a major low-molecular-weight thiol in Bacilli. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 14, p. 6482-6486, 2010.

GARG, A. et al. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 8, p. 655-669, 2001.

GENGHOF, D. S. Biosynthesis of ergothioneine and hercynine by fungi and Actinomycetales. **Journal of bacteriology**, v. 103, n. 2, p. 475-478, 1970.

GOULD, M. K. et al. Low-molecular-weight heparins compared with unfractionated heparin for treatment of acute deep venous thrombosis: a meta-analysis of randomized, controlled trials. **Annals of Internal Medicine**, v. 130, n. 10, p. 800-809, 1999.

GRADISHAR, W. J. et al. A pilot trial of suramin in metastatic breast cancer to assess antiangiogenic activity in individual patients. **Oncology**, v. 58, n. 4, p. 324-333, 2000.

GRIMSLEY, G. R.; PACE, C. N. Spectrophotometric determination of protein concentration. **Current protocols in protein science**, p. 3.1. 1-3.1. 9, 2004.

HALL, G. et al. Structure of *Mycobacterium tuberculosis* thioredoxin in complex with quinol inhibitor PMX464. **Protein Science**, v. 20, n. 1, p. 210-215, 2011.

HOLMGREN, A. Glutathione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides. **J. Biol. Chem**, v. 254, p. 3664-3671, 1979.

HOLMGREN, A. Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by

dithiothreitol and dihydrolipoamide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 19, p. 9627-9632, 1979a.

HOLMGREN, A. Reduction of disulfides by thioredoxin. Exceptional reactivity of insulin and suggested functions of thioredoxin in mechanism of hormone action. **Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 18, p. 9113-9119, 1979b.

HOLMGREN, A. Enzymatic reduction-oxidation of protein disulfides by thioredoxin. **Methods in enzymology**, v. 107, p. 295-300, 1984.

HOLMGREN, A. Thioredoxin. **Annual review of biochemistry**, v. 54, n. 1, p. 237-271, 1985.

HOLMGREN, A et al. Thioredoxin and glutaredoxin systems. **J Biol Chem**, v. 264, n. 24, p. 13963-13966, 1989.

HOLMGREN, A. Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. **Structure**, v. 3, n. 3, p. 239-243, 1995.

HOLMGREN, A. et al. **Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems**. 2005.

HWANG, S.-L.; SHIH, P.-H.; YEN, G.-C. Neuroprotective effects of citrus flavonoids. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, v. 60, n. 4, p. 877-885, 2012.

JORDAN, A. et al. Characterization of *Escherichia coli* NrdH a glutaredoxin-like protein with a thioredoxin-like activity profile. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 29, p. 18044-18050, 1997.

JUNG, C.-H.; THOMAS, J. A. S-glutathiolated hepatocyte proteins and insulin disulfides as substrates for reduction by glutaredoxin, thioredoxin, protein disulfide isomerase, and glutathione. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 335, n. 1, p. 61-72, 1996.

KOSOWER, N. S.; KOSOWER, E. M. Diamide: An oxidant probe for thiols. **Methods in enzymology**, v. 251, p. 123-133, 1995.

KRAUSE, G.; HOLMGREN, A. Substitution of the conserved tryptophan 31 in *Escherichia coli* thioredoxin by site-directed mutagenesis and structure-function analysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 7, p. 4056-4066, 1991.

KUROOKA, H. et al. Cloning and characterization of the nucleoredoxin gene that encodes a novel nuclear protein related to thioredoxin. **Genomics**, v. 39, n. 3, p. 331-339, 1997.

LANDINO, L. M.; SKRESLET, T. E.; ALSTON, J. A. Cysteine oxidation of tau and microtubule-associated protein-2 by peroxynitrite modulation of microtubule assembly kinetics by the thioredoxin reductase system. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 33, p. 35101-35105, 2004.

LILLIG, C. H.; BERNDT, C. Glutaredoxins in thiol/disulfide exchange. **Antioxidants & redox signaling**, v. 18, n. 13, p. 1654-1665, 2013.

MANETTI, F.; CORELLI, F.; BOTTA, M. Fibroblast growth factors and their inhibitors. **Current pharmaceutical design**, v. 6, n. 18, p. 1897-1924, 2000.

MANTHEY, J. A.; GUTHRIE, N.; GROHMANN, K. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. **Current medicinal chemistry**, v. 8, n. 2, p. 135-153, 2001.

MARTIN, J. L. Thioredoxin—a fold for all reasons. **Structure**, v. 3, n. 3, p. 245-250, 1995.

MAYER, M.; MEYER, B. Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 38, n. 12, p. 1784-1788, 1999.

MAYER, M.; MEYER, B. Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 25, p. 6108-6117, 2001.

MCGEARY, R. P. et al. Suramin: clinical uses and structure-activity relationships. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 8, n. 13, p. 1384-1394, 2008.

MCKEAN, S.; DAVIES, J.; MOORE, R. Identification of macrophage induced genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by differential fluorescence induction. **Microbes and infection**, v. 7, n. 13, p. 1352-1363, 2005.

MESSENS, J.; SILVER, S. Arsenate reduction: thiol cascade chemistry with convergent evolution. **Journal of molecular biology**, v. 362, n. 1, p. 1-17, 2006.

MORADIAN-OLDAK et al. Self-assembly properties of recombinant engineered amelogenin proteins analyzed by dynamic light scattering and atomic force microscopy. **Journal of Structural Biology**, v. 131, p. 27-37, 2000.

NAKAMURA, T. et al. Redox regulation of lung inflammation by thioredoxin. **Antioxidants & redox signaling**, v. 7, n. 1-2, p. 60-71, 2005.

NEWTON, G. L. et al. Distribution of thiols in microorganisms: mycothiol is a major thiol in most actinomycetes. **Journal of bacteriology**, v. 178, n. 7, p. 1990-1995, 1996.

PATON, M. W. et al. New infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* reduces wool production. **Australian veterinary journal**, v. 71, n. 2, p. 47-49, 1994.

PEEL, M. M. et al. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, n. 2, p. 185-191, 1997.

POWIS, G.; MUSTACICH, D.; COON, A. The role of the redox protein thioredoxin in cell growth and cancer. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n. 3, p. 312-322,

2000.

PRINZ, W. A. et al. the role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* Cytoplasm. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 25, p. 15661-15667, 1997.

QIN, J. et al. Solution structure of human thioredoxin in a mixed disulfide intermediate complex with its target peptide from the transcription factor NFκB. **Structure**, v. 3, n. 3, p. 289-297, 1995.

RAHLFS, S.; FISCHER, M.; BECKER, K. *Plasmodium falciparum* possesses a classical glutaredoxin and a second, glutaredoxin-like protein with a PICOT homology domain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 40, p. 37133-37140, 2001.

RAWAT, M.; AV-GAY, Y. Mycothiol-dependent proteins in actinomycetes. **FEMS microbiology reviews**, v. 31, n. 3, p. 278-292, 2007.

RENÉE, K. E. R. N. et al. Chaperone properties of *Escherichia coli* thioredoxin and thioredoxin reductase. **Biochemical Journal**, v. 371, n. 3, p. 965-972, 2003.

SREERAMA, N.; WOODY, Robert W. Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. **Methods in enzymology**, v. 383, p. 318-351, 2004.

SRIRANGAM, R.; HIPPALGAONKAR, K.; MAJUMDAR, S. Intravitreal kinetics of hesperidin, hesperetin, and hesperidin G: effect of dose and physicochemical properties. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 101, n. 4, p. 1631-1638, 2012.

STONE et al. Comparison of backbone and tryptophan side-chain dynamics of reduced and oxidized *Escherichia coli* Thioredoxin Using ¹⁵N NMR Relaxation measurements. **Biochemistry**, v. 32, p. 426-435, 1993.

TASIC, L. et al. Exploring bioactivity of hesperidin, naturally occurring flavanone glycoside, isolated from oranges. In: **Citrus Fruits**, Ed. Simmons, D. Nova Science Publishers, 2016.

YU, J. et al. Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 6, p. 2009-2014, 2005.

ZHANG, Z. Q.; GIROUD, C.; BALTZ, T. In vivo and in vitro sensitivity of *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum* to diminazene, suramin, MelCy, quinapyramine and isometamidium. **Acta tropica**, v. 50, n. 2, p. 101-110, 1991.

Material Suplementar

Tabela II.S1. Resultados da redução de insulina por *Cp-TrxA1* representados pela média, em porcentagem de atividade, com seus respectivos desvios padrão.

Proteína	Agente redox	Média da atividade (%)	Desvio padrão
<i>Cp-TrxA1</i>	DTT	100	± 0,3
<i>Cp-TrxA1</i>	GSH	49	± 5,0
<i>Cp-TrxA1</i>	ESH	80	± 4,1
<i>Cp-TrxA1</i>	CoA	15	± 4,7
<i>Cp-TrxA1</i>	diamida	4	± 0,7
Proteína	Molécula ligante	Média da atividade (%)	Desvio padrão
<i>Cp-TrxA1</i>	Suramina	89	± 6,7
<i>Cp-TrxA1</i>	Heparina	86	± 3,2
<i>Cp-TrxA1</i>	Hsp	92	± 2,1
<i>Cp-TrxA1</i>	Hst	89	± 5,0

Tabela II.S2. Predição da estrutura secundária de *Cp*-TrxA1, obtida por DC e análise dos resultados pelo programa CDpro.

	α-hélices (%)	Folhas-β (%)	turn (%)	coil (%)
Trx de <i>M. avium</i> (pdb 4WXT)	27	22	-	-
<i>Cp</i> -TrxA1	34	23	20	23
<i>Cp</i> -TrxA1+DTT	40	16	18	26
<i>Cp</i> -TrxA1+GSH	39	22	18	21
<i>Cp</i> -TrxA1+ESH	33	22	20	25
<i>Cp</i> -TrxA1+CoASH	27	20	24	29
<i>Cp</i> -TrxA1+diamida	34	23	20	23
<i>Cp</i> -TrxA1+suramina	27	23	20	30
<i>Cp</i> -TrxA1+heparina	26	23	19	31
<i>Cp</i> -TrxA1+Hst	26	24	20	30
<i>Cp</i> -TrxA1+Hsp	38	20	20	22
<i>Cp</i> -TrxA1 pH 7,0	35	23	20	22
<i>Cp</i> -TrxA1 pH 7,4	33	25	20	22
<i>Cp</i> -TrxA1 pH 7,8	33	24	20	23
<i>Cp</i> -TrxA1 pH 8,0	32	23	21	24
<i>Cp</i> -TrxA1 pH 8,4	32	23	21	24
<i>Cp</i> -TrxA1 pH 8,8	33	24	20	23
<i>Cp</i> -TrxA1 pH 9,0	33	23	21	23

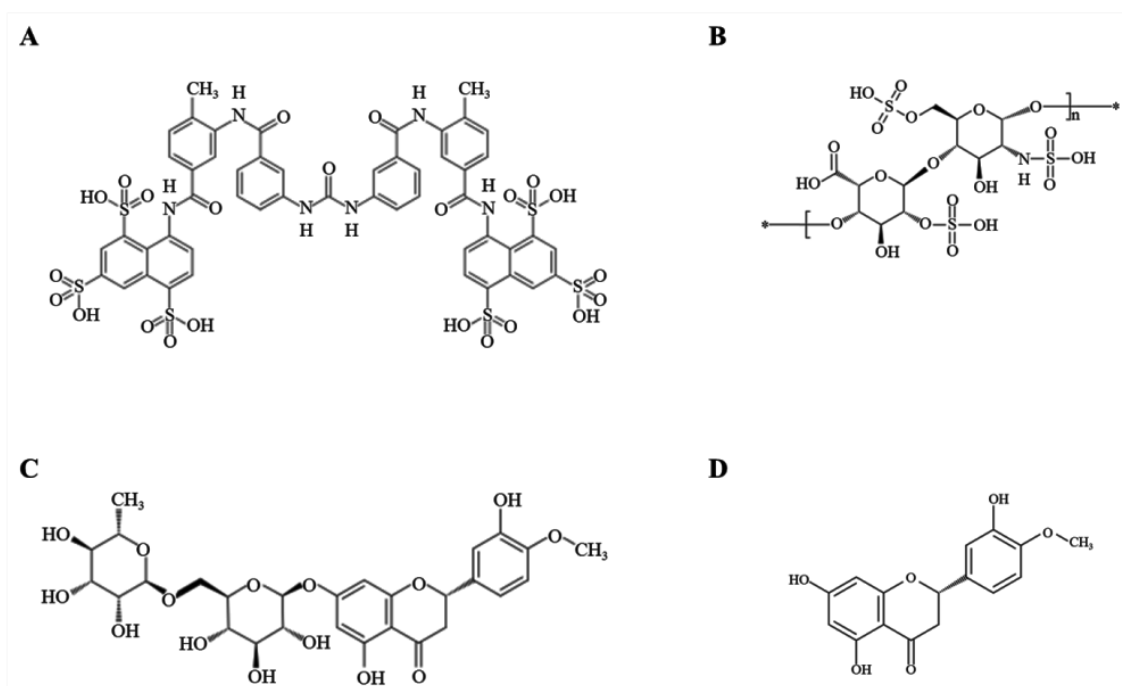


Figura II.S1. Estrutura das moléculas testadas quanto ao efeito inibitório da atividade de *Cp*-TrxA1. **A:** Suramina; **B:** Heparina; **C:** Hesperidina (Hsp); **B:** Hesperetina (Hst).

Capítulo III
Expressão, purificação e cristalização da proteína
Tioredoxina Redutase de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Expressão, purificação e cristalização da proteína Tioredoxina Redutase de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Resumo

Thioredoxin (Trx) e TrxR constituem o sistema bem conhecido denominado sistema tioredoxina, que está presente em procariotos e eucariotos, mantendo as condições redutoras intracelularmente. TrxR é uma enzima tiol oxido-redutase que contém duas subunidades idênticas, estando cada uma ligada a um FAD, o que confere uma coloração amarela a esta proteína. Esta enzima é responsável pela redução da Trx, reação especificamente dependente de NADPH, sendo de essencial para a atividade da Trx, que só é ativa em sua forma. O presente trabalho visa expressar, purificar e cristalizar a proteína TrxR de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Palavras-chave: expressão, purificação, cristalização, tioredoxina redutase, TrxR.

III.1. Introdução

Thioredoxin (Trx) e TrxR constituem o sistema bem conhecido denominado sistema tioredoxina, que está presente em procariotos e eucariotos, mantendo as condições redutoras no interior das células (ARNÉR; HOLMGREN, 2000). Isto é possível devido a um par de cisteínas conservadas presentes na Trx, a qual oxidada (Trx-S₂) apresenta uma ligação dissulfeto, enquanto um ditiol está presente em sua forma reduzida (Trx-(SH)₂) (ARNÉR; HOLMGREN, 2000; HOLMGREN; BJORNSTEDT, 1995). Neste contexto, TrxR é uma enzima tiol oxido-redutase que contém duas subunidades idênticas, estando cada uma ligada a um FAD, o que confere uma coloração amarela a esta proteína. Esta enzima é responsável pela redução da Trx, reação especificamente dependente de NADPH, sendo essencial para a atividade da Trx, que só é ativa em sua forma reduzida (HOLMGREN, 1985). Além da Trx, a TrxR é capaz de reduzir uma proteína semelhante à glutarredoxina em *Escherichia coli*, a NrdH, e substratos que não possuam ligações dissulfeto, como selenito, hidroperóxido lipídico e o H₂O₂ no caso da TrxR de mamíferos (AKIF et al., 2005, MUSTACICH; POWIS, 2000).

O sistema Trx age como doador de elétrons para a ribonucleotídeo redutase, o que é essencial para a síntese de DNA (HOLMGREN; BJORNSTEDT, 1995). Além disso, TrxR está indiretamente envolvida nas atividades realizadas pela Trx, uma vez que a atividade de TrxR sobre Trx possibilita que esta retorne à sua forma ativa (reduzida)

(MUSTACICH; POWIS, 2000). Para tentar obter um maior conhecimento sobre a proteína TrxR de *C. pseudotuberculosis*, o presente trabalho proporciona os estudos iniciais com esta proteína, visando expressar, purificar e cristalizar a proteína TrxR de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

III.2. Objetivos

Expressar, purificar e cristalizar a proteína TrxR de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

III.3. Material e Métodos

III.3.1. Linhagem bacteriana

A linhagem *E. coli* BL21 (DE3) T1 (Sigma-Aldrich, EUA) foi utilizada para a expressão da proteína Cp-TrxR (Uniprot: A0A1L6D393).

III.3.2. Análises *in silico* de Cp-TrxR

Estas análises foram realizadas de acordo com a metodologia descrita no item II.3.2. do presente trabalho, disponível no Capítulo II.

III.3.3. Vetor contendo Cp-TrxR

O *open reading frame* de TrxR de *C. pseudotuberculosis* foi clonado no vetor pD441-SR, pela empresa DNA 2.0 (EUA). A construção contém uma *tag* C-terminal de hexahistidina (6 histidinas) e um sítio de clivagem TEV (ENLYFQG), totalizando 330 aminoácidos e massa de ~35 kDa. A Figura III.1. mostra esta sequência, estando o sítio TEV grifado em cinza e a sequência de seis histidinas grifadas em preto.

```
MSEAPNATTVHDAIIGSGPAGYTAALYAARAELKPIVFEGIEFGGSLMTTTEVENFPGFPEGIMGPDLMNMRSAE
RFGADLRMELVTKVELEGEIKKIWVDDQEFHARSVILATGSAPRYIGAEGEQTLGRGVSACATCDGFFFRDHDIAVI
GGGDSAMEEATFLTKFAKSVTIVHREEFRASAIMLERAKNNDKIKFLTNKTVSKVLGENTVSGLELTDATGETSIL
DVTAMFVAIGHDPRSDLFRGVVDNDAGYVRVEEPSTRTNVPGVFAVGDLVDAHQQAITAAGSGCRGAIDAENYLAA
LDAGGENLYFQGHHHHHH
```

Figura III.1. Sequência de aminoácidos da proteína Cp-TrxR (Uniprot: A0A1L6D393), contendo um sítio de restrição TEV (grifado em cinza) e seis histidinas (grifadas em preto).

O vetor pD441-SR é resistente a kanamicina apresenta um promotor T5 induzível por IPTG e uma alta porcentagem de cópias fornecida pela origem de replicação pUC. A Figura III.2 A apresenta o vetor pD441-SR com inserto de Cp-TrxR.

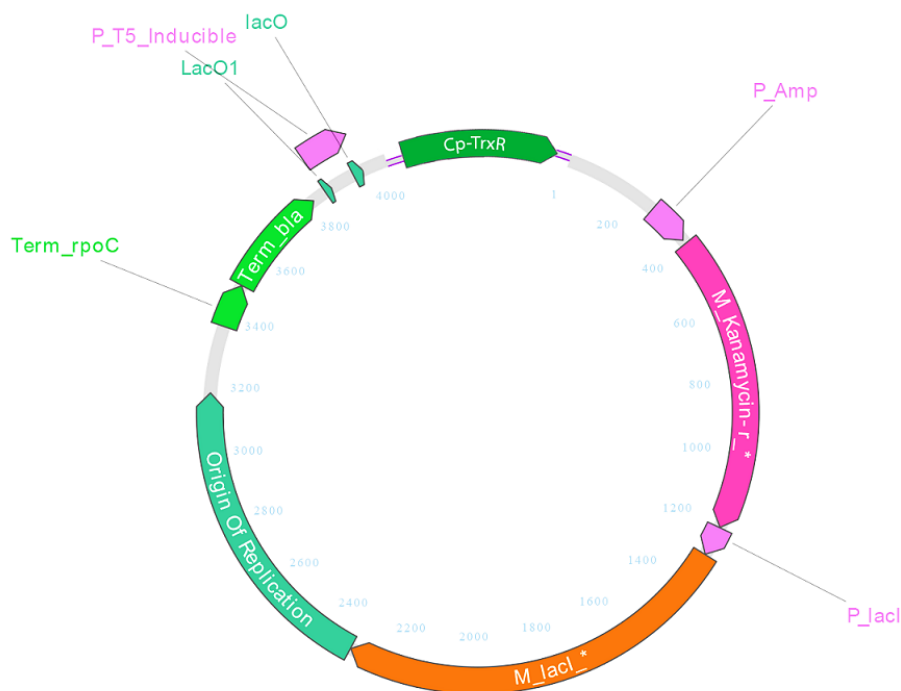


Figura III.2. Plasmídeo pD441-SR com inserto do gene TrxR (Uniprot: A0A1L6D393) de *C. pseudotuberculosis*. Inserto do gene *Cp-TrxR* em verde escuro. Figura adaptada de ATUM – DNA 2.0 (<https://www.atum.bio/eCommerce/catalog/datasheet/117>).

III.3.4. Superexpressão e purificação da *Cp-TrxR*

A metodologia utilizada para este procedimento está descrita no item II.3.3. do presente trabalho, disponível no Capítulo II.

III.3.5. Western Blot

O Western Blot foi realizado de acordo com o item II.3.4. deste trabalho, disponível no Capítulo II.

III.3.6. Dicroísmo circular (DC)

Para a avaliação da conformação da estrutura secundária da proteína *Cp-TrxR*, foi aplicado o DC (GREENFIELD; FASMAN1969). Para a amostra, foram realizados 10 scans repetidos, 5 deles para estabelecer a linha de base. O intervalo de comprimento de onda aplicado para os espectros de *far*-UV foi de 200 nm a 260 nm, em um tempo constante de 1 s e modo de varredura contínua de 100 nm / min, usando um espectropolarímetro Jasco J-107 (Jasco, Japão). *Cp-TrxR* foi diluída em 20 mmol L⁻¹ K₂HPO₄ / KH₂PO₄, pH 7,4. Os resultados foram analisados com o programa CDpro (SREERAMA; WOODY, 2004).

III.3.7. Espalhamento de Luz Dinâmico

As medidas de DLS foram realizadas no Dynapro Molecular Dimension e as análises feitas pelo software Dynamics V6.3.40, de acordo com o item II.3.6. do presente trabalho, disponível no Capítulo II.

III.3.8. Cristalização

Os testes para a tentativa de cristalização da proteína foram realizados com a proteína em alta concentração (acima de 10 mg mL⁻¹) eluída tanto em tampão KH₂PO₄/K₂HPO₄ 20 mmol L⁻¹, quanto em tampão Tris-HCl 20 mmol L⁻¹, pelo método *hanging-drop vapor diffusion* (MCPHERSON, 1982.), em placas contendo 24 poços e utilizando kits comerciais de precipitantes (Qiagen, Alemanha) para o *screening* inicial. Em caso de obtenção de cristais, estes foram submetidos à difração por raios-X, na linha de luz W01B-MX2, disponível no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS-Campinas, São Paulo, Brasil).

III.4. Resultados e Discussão

III.4.1. Análises *in silico* de Cp-TrxR

III.4.1.1. Alinhamento da Proteína Cp-TrxR

Foi realizado um BLAST da sequência de aminoácidos da proteína Cp-TrxR com o PDB e as duas sequências das estruturas resolvidas, com maior identidade foram alinhadas com a sequência de Cp-TrxR. De acordo com o Blast, a estrutura da tioredoxina redutase de *Mycobacterium smegmatis* (PDB: 5UTH) e de *Mycobacterium tuberculosis* (PDB: 2A87) apresentam respectivamente 98 e 95 % de *coverage* e 67 e 68 % de identidade com Cp-TrxR (Uniprot: A0A1L6D393). Os resultados do alinhamento estão apresentados na Figura III.3.

Pode-se verificar uma elevada conservação entre as estruturas destas três proteínas. Além disso, o sítio ativo (CxxC) está destacado por uma barra vermelha acima das sequências das TrxRs alinhadas (Figura III.3.).

						Identidade
<i>C.pseudotuberculosis</i>	1	MSEAFNATTVH----	DVA	IIGSGPAGYTAALYAARAELKPIVFEGIEFGGSLMTTTEVENTPGFPEGIMGP	LMDNMRSQ	
<i>M. smegmatis</i>	1	---MSTSQTIVH----	DVII	IIGSGPAGYTAA	YAARAQLKPLVFEGTQFGGALMTTTEVENYPGFREGITGPELMDQMREQ	67%
<i>M. tuberculosis</i>	1	MTAFVHVDRAHHPVR	DVI	IIGSGPAGYTAALYAARAQLAPLVFEGTSFGGALMTT	TVENYPGFRNGITGPELMDQMREQ	68%
						Identidade
<i>C.pseudotuberculosis</i>	77	AEFRGADLRMELVTKV	ELEGEIKKKIWVDD-QE	FAARSVILATGSAPRYTGAEGEQTL	LGRGVSA	CATCDGFFFRDHDIAV
<i>M. smegmatis</i>	74	ALRFGADLRMEDVD	AVOLEGPVKTVVVG	D-ETHQARAVILAMGAAARHLGVPGE	EALTCMGVST	CATCDGFFFRDQDIIV
<i>M. tuberculosis</i>	81	ALRFGADLRMEDV	ESVSLHGPLKSVVTADG	QTHRARAVILAMGAAARYLQVPGEQ	ELLGRGVSS	CATCDGFFFRDQDIIV
						Identidade
<i>C.pseudotuberculosis</i>	156	IGGGDSAMEEATFLTK	FAFSVTIVHRRDEF	FRASAIMLERAKNNDKIR	FLTNKTVSKVL	GENTVSGLELTDATGETSILD
<i>M. smegmatis</i>	153	VGGGDSAMEEATFLTR	FAFSVTILHRRDEF	FRASKIMLERARANKIT	FLTNTEITQLEGDPKVTG	RLRDTVTGEESKLD
<i>M. tuberculosis</i>	161	IGGGDSAMEEATFLTR	FAFSVTIVHRRDEF	FRASKIMLRARNNDKIR	FLTNHTVAVDGT	TVTGLRVRDNTGAETTL
						Identidade
<i>C.pseudotuberculosis</i>	236	VTAMFVAIGHDPRS	DLRGVVD	TNDAGYVFVEEPSTR	TNVPGVFAV	GDLDVAHYQQAITAAGSGCRCAIDAENYLAALDA
<i>M. smegmatis</i>	233	VTGVFVAIGHDPRS	DLRGVQVE	LDDEGYVFVQGR	TTYTSLDGVFAAGDLVD	HTYRQAITAAGSGCAASIDAERWLAEQD-
<i>M. tuberculosis</i>	241	VTGVFVAIGHDPRS	GLVREALD	VDPDGYVTVQGR	TTSTSLPGVFAAGDLVD	RTYRQAITAAGSGCAAIDAERWLAEHAA
						Identidade
<i>C.pseudotuberculosis</i>	316	-----				
<i>M. smegmatis</i>		-----				
<i>M. tuberculosis</i>	321	TGEADSTDALIGAQR				

Figura III.3. Alinhamento da sequência de aminoácidos de *Cp*-TrxR (Uniprot: A0A1L6D393) com a sequência de tioredoxina redutase de *M. smegmatis* (PDB: 4WXT) e de tioredoxina de *M. tuberculosis* (PDB: 2L4Q), apresentando 67% e 68% de identidade com *Cp*-TrxR, respectivamente. O sítio ativo (CxxC) conservado está representado pela barra vermelha acima das sequências.

III.4.1.2. Modelagem da estrutura de *Cp*-TrxR

A modelagem por homologia da estrutura de *Cp*-TrxR foi realizada de acordo com a metodologia descrita no item II.3.2.2. A estrutura da tioredoxina redutase de *M. smegmatis* (PDB: 5UTH) apresentada no alinhamento da Figura III.3, foi utilizada para modelagem da estrutura de *Cp*-

TrxR. Este tipo de estrutura é conhecido por sanduíche de três camadas β - β - α . A Figura III.4. mostra o modelo da estrutura de *Cp*-TrxR sobreposta à estrutura de *M. smegmatis*, com destaque em seu sítio ativo oxidado (ligação dissulfeto em amarelo) e ao FAD próximo ao sítio ativo desta proteína, ambos representados por bastões.

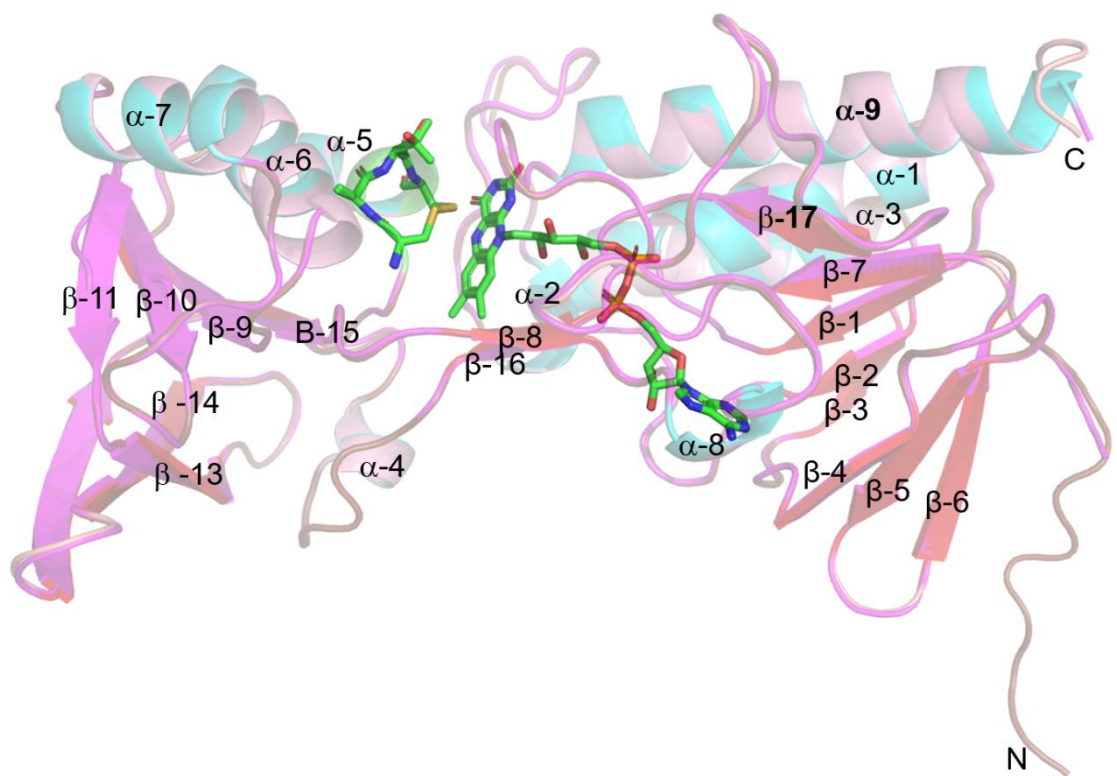


Figura II.4. Modelo por homologia da estrutura de *Cp*-TrxR, com foco em seu sítio ativo oxidado (ligação dissulfeto em amarelo) e ao FAD próximo ao sítio ativo desta proteína, ambos representados por bastões, sobreposto à estrutura de *M. smegmatis* PDB: 5UTH).

A Figura II.4. mostra a unidade monomérica da estrutura TrxR de *M. smegmatis* e do modelo da estrutura de *Cp*-TrxR, sobrepostos. Conforme explicado no capítulo II, o NADPH doa elétrons ao FAD presente na TrxR, deixando-o reduzido (FADH_2). O FADH_2 por sua vez, doa elétrons à tioredoxina redutase oxidada (TrxR-S_2), tornando-a reduzida (TrxR-(SH)_2), para que ela possa reduzir a Trx, tornando-a ativa (ARNÉR; HOLMGREN, 2000; WILLIAMS, 1995). Todo este processo é de extrema importância para as diversas atividades metabólicas exercidas pelo sistema das Trxs, o qual envolve as TrxRs (ARNÉR; HOLMGREN, 2000; WILLIAMS, 1995).

III.4.2. Purificação da proteína *Cp*-TrxR

A proteína *Cp*-TrxR foi expressada e purificada por afinidade, seguida por purificação de exclusão por tamanho (gel filtração), de acordo com a metodologia do item

II.3.3., obtendo a proteína em alto grau de pureza. O cromatograma obtido na gel filtração, bem como o SDS-PAGE (15%) compõem a Figura III.5.

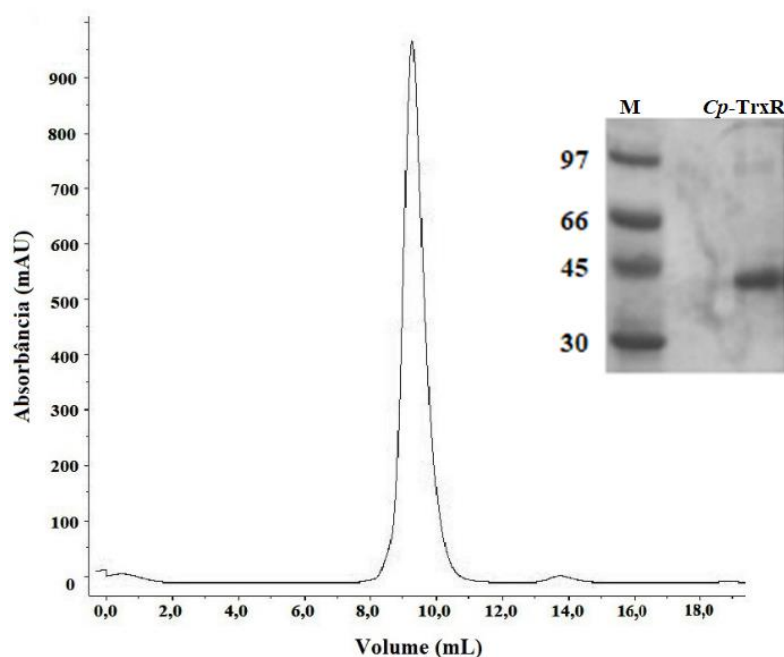


Figura III.5. Purificação da proteína *Cp-TrxR*. À direita está o cromatograma obtido na gel filtração e a amostra presente entre 8,0 e 10 mL neste cromatograma, foi colocada em SDS-Page (15%), presente do lado direito do cromatograma, visualizando uma única banda de ~35 kDa. **M:** marcador.

Na Figura III.5., observa-se uma banda de ~35 kDa com alto grau de pureza, tamanho esperado para *Cp-TrxR*. O cromatograma referente da mesma figura referente à gel filtração também observa-se um pico único, indicando a pureza da proteína.

III.4.3. Western blot

O teste de Western Blot permitiu a confirmação de que a proteína com o tamanho de aproximadamente 35 kDa presente no SDS-PAGE (Figura III.5.) é a proteína recombinante *Cp-TrxR*, uma vez que identificou somente proteínas que possuam a cauda de histidina, devido aos anticorpos utilizados. A membrana contendo o resultado deste teste está exposta na Figura III.6.

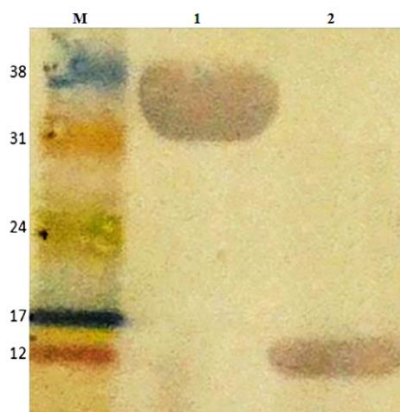


Figura III.6. Western blot de *Cp*-TrxR. **M:** marcador; **1:** *Cp*-TrxR; **2:** controle positivo (proteína conhecida).

III.4.5. Dicroísmo circular

O espectro de DC para *Cp*-TrxR com os cálculos das estimativas para cada componente de sua estrutura secundária, realizados pelo o programa CDpro estão presentes na Figura III.7.

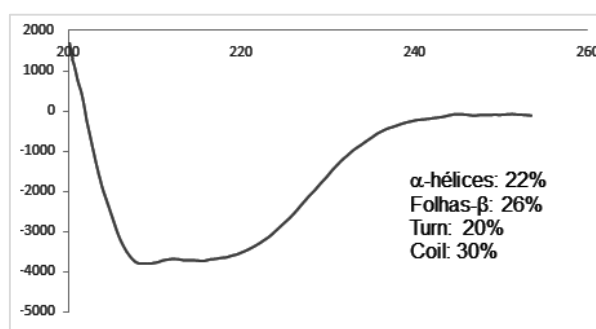


Figura III.7. Espectro de DC de *Cp*-TrxR, com as predições de estrutura secundária em porcentagem.

O BLAST da sequência de aminoácidos de *Cp*-TrxR com o PDB mostrou que a estrutura com 98% de cobertura e maior identidade (67%) com esta proteína é a TrxR de *Mycobacterium smegmatis*, a qual apresenta 26% de α -hélices e 26% de folhas- β na condição em que foi cristalizada, o que corrobora com a predição obtida para *Cp*-TrxR, a qual apresentou 22% de α -hélices e 26% de folhas- β durante as análises de CD.

III.4.6. Espalhamento de Luz Dinâmico

As medidas de ELD mostraram que a proteína estava homogênea e monodispersa, conforme observa-se na Figura III.8.

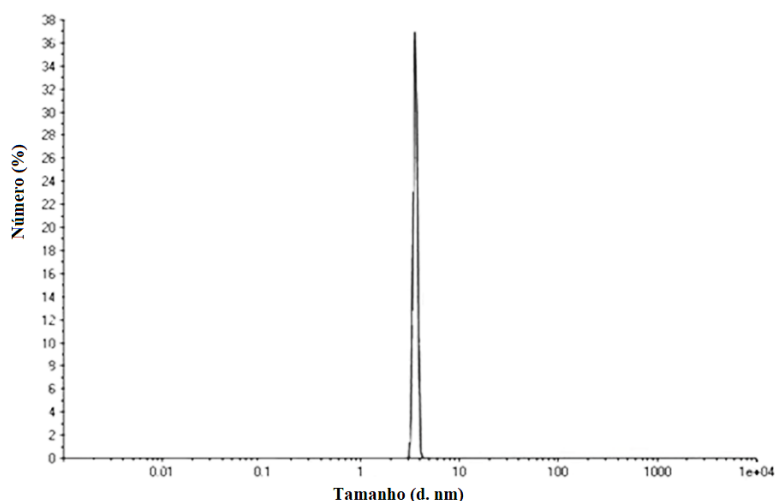


Figura III.8. ELD da proteína recombinante *Cp-TrxR*, mostrando a monodispersividade da amostra.

III.4.7. Cristalização

Após todos estes testes avaliando a obtenção da proteína recombinante *Cp-TrxR*, bem como sua pureza e sua dispersão, foram realizadas tentativas de cristalização, para que fosse possível resolver sua estrutura. Foram testados os seguintes kits de cristalização: NeXtal Tubes PEGs suite (Qiagen, Alemanha), NeXtal Tubes PEGs II suite (Qiagen, Alemanha) e NeXtal Tubes, AmSO₄ Suite (Qiagen, Alemanha). Foram obtidos cristais na presença da solução precipitante contendo Sulfato de amônio 2M, tris 0,1M (pH 8,5). Foram realizados os testes de cristalização com a proteína em concentração de aproximadamente 13 mg mL⁻¹, eluída tanto em tampão KH₂PO₄/K₂HPO₄ 20 mmol L⁻¹, quanto em tampão Tris-HCl 20 mmol L⁻¹, obtendo cristais nestas duas condições. A Figura III.9. mostra os cristais de *Cp-TrxR* obtidos, bem como o padrão de difração por raios-X. Os cristais apresentam coloração amarela claro, devido à presença do FAD ligado à esta proteína.

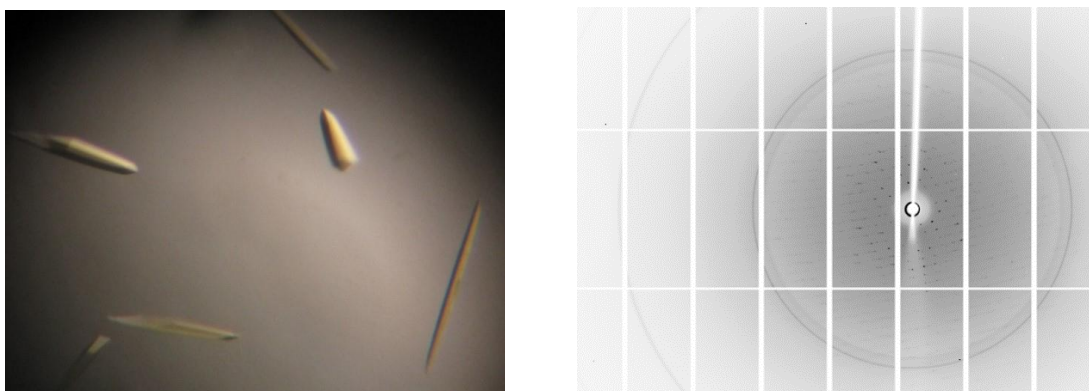


Figura III.9. Foto dos cristais de *Cp-TrxR* (à direita) e padrão de difração por raios-X de *Cp-TrxR* (à esquerda), de aproximadamente 5 Å.

Apesar da obtenção dos cristais de *Cp*-TrxR e das diversas tentativas de otimização de cristalização através da alteração da composição dos precipitantes, bem como adicionando aditivos como MgCl₂, ácido cítrico, DTT e diamida, não foi possível obter cristais que fornecessem um padrão de difração ideal para resolver a estrutura desta proteína. O padrão de difração obtido a partir dos cristais apresentados na Figura III.9. é de 5 Å.

III.5. Conclusão

A proteína recombinante TrxR de *C. pseudotuberculosis* foi expressada e purificada com sucesso. As análises por DC mostraram a possível estrutura secundária desta proteína em pH 7,4, o que corrobora com os resultados obtidos na literatura. Sugere-se como próxima etapa a caracterização bioquímica desta proteína, bem como uma otimização da cristalização, para obtenção de cristais que forneçam bom padrão de difração, possibilitando resolver sua estrutura. Assim, será possível obter uma maior compreensão de seus mecanismos de ação, e consequentemente, um maior conhecimento sobre *C. pseudotuberculosis*.

III.6. Referências

- AKIF et al. Conformational flexibility of *Mycobacterium tuberculosis* thioredoxin reductase: crystal structure and normal-mode analysis. **Biological Crystallography**, v. 61, p. 1603-1611, 2005.
- ARNÉR, E. S. J.; HOLMGREN, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. **The FEBS Journal**, v. 267, n. 20, p. 6102-6109, 2000.
- ATUM - DNA 2.0, p. 1. Acesso em 07/09/2017, disponível em: <https://www.atum.bio/eCommerce/catalog/datasheet/618>
- BERTANI, G. STUDIES ON LYSOGENESIS I.: The Mode of Phage Liberation by Lysogenic *Escherichia coli*1. **Journal of Bacteriology**, v. 62, n. 3, p. 293, 1951.
- EDGAR, R. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. **BMC Bioinformatics**, v.5, n. 113, 2004.
- FROGER, A.; HALL, J. E. Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 6, 2007.
- GREENFIELD, N. J.; FASMAN, G. D. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. **Biochemistry**, v. 8, n. 10, p. 4108-4116, 1969.
- HANAHAN, D. Techniques for transformation of *E. coli*. **DNA cloning**, v. 1, p. 109-135,

1985.

HOLMGREN, A. Thioredoxin. **Annual Review of Biochemistry**, v. 54, n. 1, p. 237-271, 1985.

HOLMGREN, A.; BJORNSTEDT, M. Thioredoxin and thioredoxin reductase. **Methods in Enzymology**, v. 252, p. 199-208, 1995.

MCPHERSON, Alexander. **Preparation and analysis of protein crystals**. John Wiley & Sons, 1982.

MORADIAN-OLDAK et al. Self-assembly properties of recombinant engineered amelogenin proteins analyzed by dynamic light scattering and atomic force microscopy. **Journal of Structural Biology**, v. 131, p. 27-37, 2000.

MUSTACICH, D.; POWIS, G. Thioredoxin reductase. **Biochem. Journal**, v. 346, p. 1-8, 2000.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. **Methods in Enzymology**, v. 383, p. 318-351, 2004.

WILLIAMS, C. H. Mechanism and structure of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. **The FASEB journal**, v. 9, n. 13, p. 1267-1276, 1995.

Capítulo IV
Expressão e purificação da proteína *Diphtheria Toxin*
Repressor de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Expressão e purificação da proteína *Diphtheria Toxin Repressor* de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Resumo

O ferro é um metal essencial às funções vitais dos organismos, entretanto em altas concentrações se torna tóxico às células. Para que ocorra a regulação da absorção e utilização deste metal, as bactérias desenvolveram mecanismos para obter a homeostase de ferro, evitando a restrição ou o excesso do mesmo. Geralmente, em algumas bactérias gram positivas essa regulação ocorre a nível transcricional, pela proteína *diphtheria toxin repressor* (DtxR). Quando a concentração de ferro é ideal, DtxR reprime a expressão de *diphtheria toxin* (Dtx), entretanto quando o ferro disponível se torna escasso, a tradução desta proteína é interrompida e inicia-se a tradução do gene *dtx*, a qual inicia o ciclo lisogênico de *C. diphtheriae*, proporcionando a consequente liberação de ferro das células mortas do hospedeiro para os patógenos. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, apresenta os genes *dtx* e *dtxR*, entretanto não há estudos para estes genes neste micro-organismo. Diante do exposto, este trabalho visa a expressão e purificação de DtxR de *C. pseudotuberculosis* (Cp-DtxR), para que possibilite futuros estudos desta proteína, fornecendo uma maior compreensão da virulência deste micro-organismo e possíveis alternativas para o tratamento e prevenção de linfadenite caseosa .

Palavras-Chave: *diphtheria toxin repressor*, DtxR, purificação

IV.1. Introdução

O ferro é um metal essencial às funções vitais dos organismos, uma vez que ele participa de importantes reações redox de biocatálise e de transporte de elétrons (MIETHKE; MARAHIEL, 2007), entretanto em altas concentrações se torna tóxico às células (D'AQUINO et al., 2007; DENG; ZHANG, 2015). Para que ocorra a regulação da absorção e utilização deste metal, as bactérias desenvolveram mecanismos para obter a homeostase de ferro, evitando a restrição ou o excesso do mesmo. Geralmente, essa regulação ocorre a nível transcricional, pelo repressor da absorção de ferro (Fur), geralmente presente em bactérias gram negativas ou em gram positivas com baixa concentração de G+C em seu DNA, ou pela proteína *diphtheria toxin repressor* (DtxR) em bactérias gram positivas com alta concentração de G+C (GUEDON; HELMANN, 2003; DENG; ZHANG, 2015).

Em *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium glutamicum*, DtxR é responsável por este mecanismo (D'AQUINO et al., 2007; DENG; ZHANG, 2015). Quando a concentração de ferro é ideal, DtxR reprime a expressão de *diphtheria toxin* (Dtx), entretanto quando o ferro disponível se torna escasso, a tradução desta proteína é interrompida e inicia-se a tradução do gene *dtx*, a qual inicia o ciclo lisogênico de *C. diphtheriae*, um dos principais fatores de virulência, proporcionando a consequente liberação de ferro das células mortas do hospedeiro para os patógenos (GUEDON; HELMANN, 2003).

A estrutura de DtxR de *C. diphtheriae* que foi resolvida é composta por duas subunidades de 25,3 kDa, e revela um domínio N-terminal de resíduos (1-73) que incluem um *motif* para a ligação da hélice-volta-hélice de DNA e um domínio para sua dimerização (resíduos 74 a 140) o qual contém dois sítios de ligação de metais (POHL; HOLMES; HOL, 1998).

Corynebacterium pseudotuberculosis, agente causador de linfadenite caseosa (LC), também apresenta os genes *dtx* e *dtxR*, entretanto não há estudos para estes genes neste micro-organismo. Diante do exposto, o presente trabalho visa a expressão e purificação de DtxR de *C. pseudotuberculosis* (Cp-DtxR), para que possibilite futuros estudos desta proteína, fornecendo uma maior compreensão da virulência deste micro-organismo e possíveis alternativas para o tratamento e prevenção de linfadenite caseosa, doença causada por *C. pseudotuberculosis*.

IV.2. Objetivos

Expressar e purificar a proteína DtxR de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

IV.3. Material e Métodos

IV.3.1. Linhagem bacteriana

A linhagem *E. coli* BL21 (DE3) T1 (Sigma-Aldrich, EUA) foi utilizada para a expressão da proteína Cp-DtxR (Uniprot: D9QAW1).

IV.3.2. Análises *in silico* de Cp-DtxR

Estas análises foram realizadas de acordo com a metodologia descrita no item II.2.2. do presente trabalho, disponível no Capítulo II.

IV.3.3. Vetor contendo *Cp-DtxR*

O *open reading frame* de DtxR de *C. pseudotuberculosis* (Uniprot: D9QAW1) foi clonado no vetor pD441-SR, pela empresa DNA 2.0 (EUA), de acordo com a mesma metodologia do item III.3.3, presente no Capítulo III deste trabalho. A Figura IV.1. apresenta a sequência de aminoácidos de *Cp-DtxR*, contendo o sítio TEV (grifado em cinza) e as seis histidinas (grifadas em preto) na extremidade C-terminal, totalizando 239 aminoácidos e massa de ≈ 27 kDa.

```

MKDLVDTTEMYLRTIYELEEEGVTPLRARIAERLDQSGPTVSQTVARMERDGLVVASDRSLQMTPTGRALATAVMRK
HRLAERLLTDIIGLDIHKVHDEACRWEHVMSDEVERRLVDVLEDVTRSPFGNPIPLDELGVSIKKKEGPGKRAVDVA
RATPRDVKIVQINEILQVSDSQFQALIDAGIRIGTTVTLSVDVGRVITTHGEKTVELIDDLAHAVRIEEIGGENLYFQ
GHHHHHHH
  
```

Figura IV.1. Sequência de aminoácidos da proteína *Cp-DtxR* (Uniprot: D9QAW1), contendo um sítio de restrição TEV (grifado em cinza) e seis histidinas (grifadas em preto).

A Figura IV.2 ilustra o vetor pD441-SR com inserto da sequência de *Cp-DtxR* apresentada na Figura IV.1.

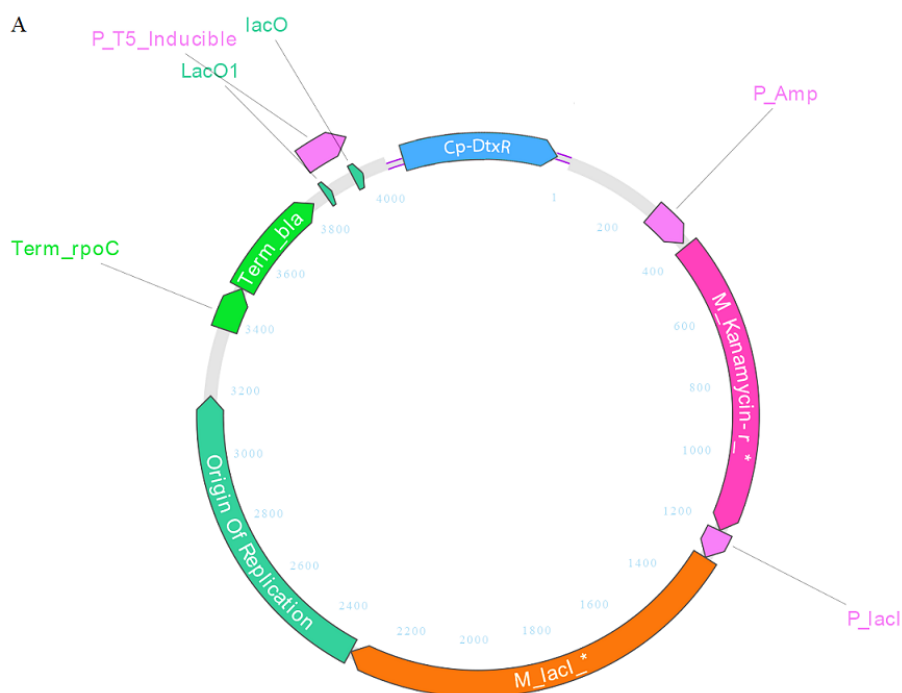


Figura IV.2. Plasmídeo pD441-SR com inserto do gene *Cp-DtxR* (Uniprot: D9QAW1). Inserto do gene *Cp-DtxR* em azul. Figura adaptada de ATUM – DNA 2.0 (<https://www.atum.bio/eCommerce/catalog/datasheet/117>).

IV.3.4. Expressão e purificação da *Cp-DtxR*

O protocolo para este procedimento está descrito no item II.3.3. do presente trabalho, disponível no Capítulo II. A única parte do protocolo que difere desta

metodologia é que no momento da expressão, ao invés da suplementação com 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MgSO_4 , o meio de cultura é suplementado com 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de FeCl_2 para a expressão de *Cp-DtxR*.

IV.3.5. Western Blott

O Western Blot foi realizado de acordo com o item II.3.4. deste trabalho, disponível no Capítulo II.

IV.3.6. Dicroísmo circular (DC)

Para a avaliação da conformação da estrutura secundária da proteína *Cp-DtxR*, foi utilizado o DC, de acordo com o item III.3.6. deste trabalho, disponível no Capítulo III.

IV.3.7. Espalhamento de Luz Dinâmico

As medidas de ELD foram realizadas no Dynapro Molecular Dimension e as análises feitas pelo software Dynamics V6.3.40, de acordo com o item II.3.6 do presente trabalho, disponível no Capítulo II.

IV.4.0. Resultados e Discussão

IV.4.1. Análises *in silico* de *Cp-DtxR*

III.4.1.1. Alinhamento da Proteína *Cp-DtxR*

Foi realizado um BLAST da sequência de aminoácidos da proteína *Cp-DtxR* com o PDB e as duas sequências das estruturas resolvidas, com maior identidade foram alinhadas com a sequência de *Cp-DtxR*. De acordo com o Blast, a estrutura da *diphtheria toxin repressor* de *Corynebacterium diphtheriae* (PDB: 1DPR) e de *Mycobacterium tuberculosis* (PDB: 1FX7) apresentam respectivamente 79 e 59 % de identidade com *Cp-DtxR* (Uniprot: A0A1L6D393). Os resultados do alinhamento realizado utilizando os programas Muscle e Box Shade estão apresentados na Figura IV.3.

			★	Identidade
C. pseudotuberculosis	1	MKDLVDTTEMYLRTIYELEEEGVTLPLRARIAERLDQSGPTVSQTVARMERDGLWVASDRSLQMTPTGRALATAVMRKHR		
C. diphtheriae	1	MKDLVDTTEMYLRTIYELEEEGVTLPLRARIAERLDQSGPTVSQTVARMERDGLWVASDRSLQMTPTGRIILATAVMRKHRL		79%
M. pseudotuberculosis	1	MNQLVDITTEMYLRTIYDELEEVTPLRARIAERLDQSGPTVSQTVSEMERDGLIRVAEDRHLETETEGRAIALTAMVRKHRR		59%

* * * *

				Identidade
C. pseudotuberculosis	81	LAERLLTDIIIGLDIHKKHVHDEACRWHEVMSDEVERRLVIVIEIDVTRSPFGNPPIGLDELGVSIKKKEEPCK--RANDVARRA		
C. diphtheriae	81	LAERLLTDIIIGLDINKHVHDEACRWHEVMSDEVERRLVKVIEDVERSPFGNPPIGLDELGVGNSDAAAPGT--RVLTDAITS		79%
M. pseudotuberculosis	81	LAERLIIVDIIGLPWEVVHAECRWHEVMSDEVERRLVKVINNETTSFPGNPPIGLDELGVGPPEADDANLRITELPAG		59%

				Identidade
C. pseudotuberculosis	159	TPRDVKIIVQINEILOVDSDOFOALLADAGI--RIGTTVLISDVDGRVIITHGEKTVELDDLAHAVRIEIEL		
C. diphtheriae	159	MPRKVKIIVQINEIFQVEIDQFTQLADADI--RVGSEVELVDRDGCHITLSHGKDVELDDLAHTIRIEELL		79%
M. pseudotuberculosis	161	SPVAVWRQITEHWQQDIDLITLKADAGVPNARVTVEIPGGCVTIVIPCHENVTLPHMAHAVKVBKV		59%

Figura IV.3. Alinhamento da sequência de aminoácidos de *Cp*-TrxR (Uniprot: A0A1L6D393) com a sequência de tioredoxina redutase de *M. smegmatis* (PDB: 4WXT) e de tioredoxina de *M. tuberculosis* (PDB: 2L4Q), apresentando 67% e 68% de identidade com *Cp*-TrxR, respectivamente. O sítio ativo (CxxC) conservado está representado pela barra vermelha acima das sequências.

A proteína DtxR contém dois sítios de ligação de metais (SPIERING, 2003; POHL; HOLMES; HOL, 1998) e através do alinhamento realizado, foi possível identificá-los em *Cp*-DtxR. O primeiro sítio de ligação de metais apresenta seus 3 aminoácidos (His79, Glu83, His98) com um asterisco vermelho acima das sequências do alinhamento e o segundo (Cys102-Glu105-His106), um asterisco marrom acima destes aminoácidos. Estes sítios são importantes, pois quando DtxR possui metais ligados a este sítio, a proteína se liga ao DNA do micro-organismo, reprimindo a transcrição de genes de virulência, como o gene *dtx*. Quando há ausência destes metais nestes sítios, a proteína se desliga do DNA do micro-organismo, permitindo a expressão dos genes de virulência, geralmente causando o ciclo lisogênico, que lisa as células do hospedeiro, liberando assim os metais necessários à manutenção celular do patógeno (SPIERING, 2003; POHL; HOLMES; HOL, 1998).

IV.4.2. Purificação da proteína *Cp-DtxR*

A proteína recombinante *Cp-DtxR* foi superexpressada e purificada com sucesso, de acordo com o item IV.3.4. A Figura II.4. mostra o SDS-PAGE da purificação por afinidade realizada na coluna Ni-NTA (Figura IV.4A.) e o cromatograma da purificação de exclusão por tamanho (Figura IV.4B.) da proteína *Cp-DtxR*.

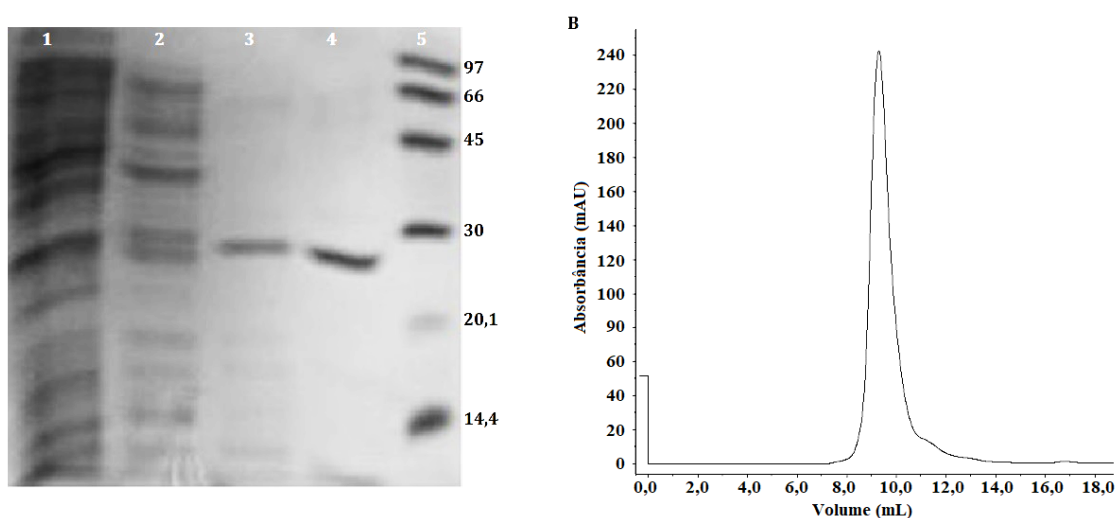


Figura IV.4. Purificação da proteína *Cp-DtxR*. **(A)** SDS-Page (15%) da purificação da proteína *Cp-DtxR* por afinidade, com coluna Ni-NTA. **1:** passagem do lisado por sonicação pela coluna Ni-NTA; **2:** lavagem com tampão A contendo 20 mmol de imidazole; **3:** lavagem com tampão A contendo 80 mmol de imidazole; **4:** eluição da proteína em tampão A contendo 500 mmol de imidazole; **5:** marcador. **(B)** Cromatograma da proteína *Cp-DtxR*, da cromatografia de exclusão por tamanho.

Conforme pode-se observar na amostra 4 da Figura IV.4A, *Cp-DtxR* apresenta ≈ 27 kDa, o que corrobora com o esperado (considerando o sítio TEV e 6-His) e na Figura 4B, o perfil cromatográfico da amostra em purificação de exclusão por tamanho com um pico único, indicando a pureza da proteína.

IV.4.3. Western blot

O teste de Western Blot permitiu a confirmação de que a proteína com tamanho esperado presente no SDS-PAGE é a proteína recombinante *Cp-DtxR*, uma vez que identificou somente as proteínas que possuem a cauda de histidina. A Figura IV.5. mostra a membrana contendo o resultado deste teste, com a amostra 2 correspondente à *Cp-DtxR* apresentando ≈ 27 kDa.

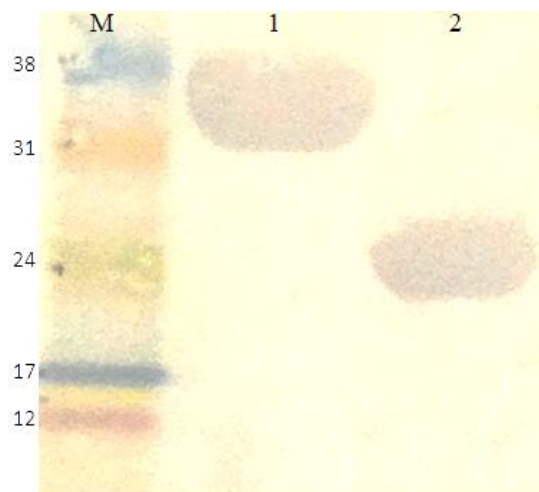


Figura IV.5. Western blot para *Cp-DtxR*. **M:** marcador; **1:** controle positivo (proteína conhecida) **2:** *Cp-DtxR*.

IV.4.4. Dicroísmo Circular

A Figura 3 mostra o espectro de DC para *Cp-DtxR*, com os cálculos das estimativas para cada componente de sua estrutura secundária, realizado com o programa CDpro.

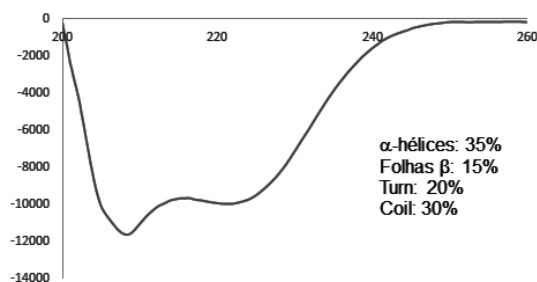


Figura IV.6. Espectro de DC com as previsões de estrutura secundária em porcentagem de *Cp-DtxR*

De acordo com o BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) do NCBI da sequência de *Cp-DtxR* com o PDB, a estrutura da DtxR de *Corynebacterium diphtheriae* (PDB: 1DPR) é a mais similar à *Cp-DtxR*, apresentando 100% de *coverage* e 79% de identidade. A DtxR de *C. diphtheriae* possui 32% de α -hélices e 1% de folhas- β na condição em que teve sua estrutura determinada, o que corrobora com a porcentagem de α -hélices de *Cp-DtxR*, a qual foi estimada em 35%, somente 3 % a mais do que para DtxR de *C. diphtheriae*. Essa análise é divergente com relação à porcentagem de folhas- β , pois estimou-se 15% para *Cp-DtxR* e 1% para DtxR de *C. diphtheriae*. Isso pode ter ocorrido pelo fato de as proteínas não serem completamente iguais apesar da alta identidade, e de que as condições em que se encontravam no momento da análise sejam diferentes, o que

pode alterar a estrutura secundária dessas proteínas. Já a segunda proteína mais similar à *Cp*-DtxR, a DtxR de *C. diphtheriae* em complexo com níquel (PDB: 3GLX), diverge em 10% a porcentagem de α -hélices (45%) com relação à *Cp*-DtxR (35% α -hélices) e se assimila muito na proporção de folhas- β , sendo 15% para *Cp*-DtxR e 14% para DtxR de *C. diphtheriae*. Considerando que a bactéria recombinante contendo *Cp*-DtxR recebeu suplementação de FeCl_2 no momento da expressão desta proteína, sugere-se que este metal, se presente após o procedimento de purificação, possa de alguma maneira alterar a estrutura secundária desta proteína recombinante.

IV.4.5. Espalhamento de Luz Dinâmico

As medidas de ELD mostraram que a proteína estava homogênea e monodispersa, conforme observa-se na Figura IV.7.

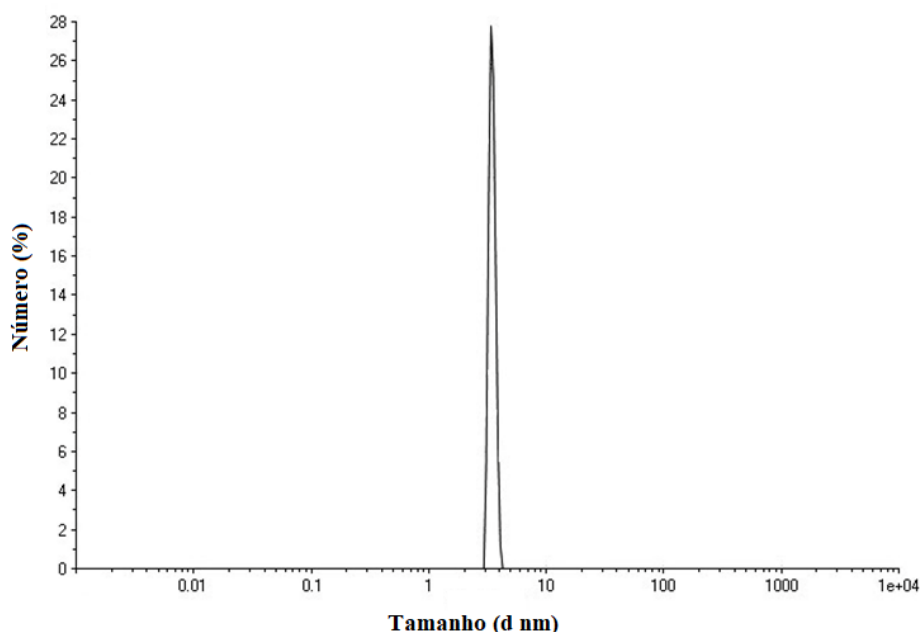


Figura IV.7. ELD da proteína *Cp*-DtxR, com pico único, mostrando a monodispersividade da amostra.

IV.5. Conclusão

A proteína recombinante DtxR de *C. pseudotuberculosis* foi expressada e purificada com sucesso. As análises por CD mostraram a possível estrutura secundária desta proteína em pH 7,4, o que corrobora com os resultados obtidos na literatura. Sugere-se como próxima etapa a caracterização bioquímica desta proteína, bem como a tentativa de cristalização para a determinação de sua estrutura, obtendo uma maior compreensão de seus mecanismos de ação, e consequentemente, um maior conhecimento sobre *C.*

pseudotuberculosis.

IV.6. Referências

ATUM - DNA 2.0, p. 1. Acesso em 07/09/2017, disponível em: <https://www.atum.bio/eCommerce/catalog/datasheet/618>

BERTANI, G. STUDIES ON LYSOGENESIS I.: The Mode of Phage Liberation by Lysogenic *Escherichia coli*1. **Journal of Bacteriology**, v. 62, n. 3, p. 293, 1951.

DENG, Y.; ZHANG, X. DtxR, an iron-dependent transcriptional repressor that regulates the expression of siderophore gene clusters in *Thermobifida fusca*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 362, n. 3, p. 1-6, 2015.

D'AQUINO, J. A. et al. Role of the N-terminal helix in the metal ion-induced activation of the diphtheria toxin repressor DtxR. **Biochemistry**, v. 46, n. 42, p. 11761-11770, 2007.

EDGAR, R. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. **BMC Bioinformatics**, v.5, n. 113, 2004.

FROGER, A.; HALL, J. E. Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 6, 2007.

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

GUEDON, E.; HELMANN, J. D. Origins of metal ion selectivity in the DtxR/MntR family of metalloregulators. **Molecular Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 495-506, 2003.

HANAHAN, D. Techniques for transformation of *E. coli*. **DNA cloning**, v. 1, p. 109-135, 1985.

HOLMGREN, A.; BJORNSTEDT, M. Thioredoxin and thioredoxin reductase. **Methods in Enzymology**, v. 252, p. 199-208, 1995.

MIETHKE, M.; MARAHIEL, M. A. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 3, p. 413-451, 2007.

MORADIAN-OLDAK et al. Self-assembly properties of recombinant engineered amelogenin proteins analyzed by dynamic light scattering and atomic force microscopy. **Journal of Structural Biology**, v. 131, p. 27-37, 2000.

POHL, E.; HOLMES, R. K.; HOL, W. G. J. Motion of the DNA-binding domain with respect to the core of the diphtheria toxin repressor (DtxR) revealed in the crystal structures of apo- and holo-DtxR. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 35, p. 22420-22427, 1998.

SPIERING, M. M. et al. Metal stoichiometry and functional studies of the diphtheria toxin repressor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 7, p. 3808-

3813, 2003.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. **Methods in Enzymology**, v. 383, p. 318-351, 2004.

WILLIAMSON, L. H. Caseous lymphadenitis in small ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 17, n. 2, p. 359-371, 2001.

Capítulo V

Considerações finais

V.1. Considerações Finais

V.1.1. Conclusão geral

- As proteínas *Cp-TrxA1*, *Cp-TrxR* e *Cp-DtxR* foram expressadas e purificadas;
- A família de proteínas Trx participa da regulação da homeostase redox celular em patógenos, essencial para sua sobrevivência em situações de stress ambiental;
- O alto nível de conservação do sítio ativo de Trx e de seu dobramento sugere sua importância para esta proteína;
- Na presença de DTT e ESH a atividade de redução de insulina por *Cp-TrxA1* não foi afetada ou foi muito pouco afetada, totalizando 100% e ~78%, respectivamente, com relação à redução de insulina por esta proteína, um resultado que não havia sido descrito por outros autores até o momento. Além disso, *Cp-TrxA1* na presença dos agentes GSH, CoASH apresentou uma atividade muito menor do que comparada à sua atividade sem aditivos, ~45, ~15 e ~5%, respectivamente, podendo-se sugerir uma forte influência destes agentes redox sobre esta proteína;
- Os flavonóides, Hsp, Hst, o polissacarídeo heparina e o poliânion suramina, inibiram a ação de *Cp-TrxA1* em 92, 89, 89 e 86%, respectivamente;
- A atividade de *Cp-TrxA1* é inibida quando interagindo individualmente com as quatro moléculas testadas (suramina, heparina, Hsp e Hst), entretanto somente sua interação com Hst e suramina puderam ser comprovadas por RMN, com as técnicas utilizadas. Outros estudos, com metodologias diferentes serão necessários para elucidar o problema, como a utilização de compostos marcados ou de outro tipo de análise, como por exemplo a calorimetria de titulação isotérmica;
- *Cp-TrxR* foi cristalizada, entretanto não foi possível resolver sua estrutura, devido ao padrão de difração por raios-X obtido ser muito alto (5 Å). Uma otimização das condições de cristalização é necessária para a obtenção de cristais com um padrão de difração por raios –X adequado;
- DtxR é uma proteína extremamente importante na regulação gênica de muitos micro-organismos, principalmente para genes de virulência como o *dtx* e a continuação de estudos para um maior conhecimento sobre esta proteína se torna necessária;
- Os dois sítios de ligação de metais de *Cp-DtxR* puderam ser determinados pelo alinhamento realizado com as outras DtxR homólogas encontradas pelo BLAST;

V.1.2. Sugestões para trabalhos futuros

Para a continuidade do trabalho realizado nesta tese, sugere-se:

- Caracterização bioquímica da proteína DtxR;
- Tentativa de cristalografia das proteínas estudadas e solução de suas estruturas;
- Estudos *in vivo* de DtxR para a tentativa de elaboração de vacinas contra *C. pseudotuberculosis*;
- Avaliação dos ligantes e inibidores da proteína Cp-TxrA1 através de outras abordagens, para possível elaboração de drogas ou vacinas com estes alvos;

Adendo
Publicações realizadas por colaborações durante o
doutorado

Accepted Manuscript

Title: Biochemical and biophysical characterization of a mycoredoxin protein glutaredoxin A1 from *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Authors: Raphael J. Eberle, Liege A. Kawai, Fabio R.de Moraes, Ljubica Tasic, Raghuvir K. Arni, Monika A. Coronado



PII: S0141-8130(17)32733-2
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.063>
Reference: BIOMAC 8358

To appear in: *International Journal of Biological Macromolecules*

Received date: 25-7-2017
Revised date: 6-10-2017
Accepted date: 11-10-2017

Please cite this article as: Raphael J.Eberle, Liege A.Kawai, Fabio R.de Moraes, Ljubica Tasic, Raghuvir K.Arni, Monika A.Coronado, Biochemical and biophysical characterization of a mycoredoxin protein glutaredoxin A1 from *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *International Journal of Biological Macromolecules* <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.063>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Biochemical and biophysical characterization of a mycoredoxin protein Glutaredoxin A1 from *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Raphael J. Eberle^a, Liege A. Kawai^a, Fabio R. de Moraes^a, Ljubica Tasic^b, Raghuvir K. Arni^a, Monika A. Coronado^{a#}

^aMultiuser Center for Biomolecular Innovation, Department of Physics, Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas (Ibilce), Universidade Estadual Paulista (UNESP), São Jose do Rio Preto-SP, 15054-000, Brazil. ^bInstitute of Chemistry, University of Campinas (UNICAMP), Campinas-SP, 13083-970, Brazil

eberleraphael@gmail.com (Raphael J. Eberle)
liegekawai@gmail.com (Liege A. Kawai)
fabiom@ibilce.unesp.br (Fabio R. de Moraes)
ljubica@iqm.unicamp.br (Ljubica Tasic)
arni@sjrp.unesp.br (Raghuvir K. Arni)

Corresponding author: Monika A. Coronado
Mail: monikacoronado@gmail.com
Phone: +55-17-32212707 fax +55-17-32212247
Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular,
Departamento de Física, Instituto de Biociências Letras e
Ciências Exatas (Ibilce), Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Rua Cristóvão Colombo 2265 São Jose do Rio
Preto-SP, 15054-000, Brazil

Highlights

- *Cp*-GrxA1 was identified as a mycoredoxin protein.
- Description of the *Cp*-GrxA1 reduction assay by ESH.
- Identification and characterization of inhibitory effects of suramin, heparin, hesperidin, and hesperetin on *Cp*-GrxA1 using biochemical and biophysical methods.

Abstract

Glutaredoxin A1 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* was shown to be a mycoredoxin protein. In this study, we established a process to overexpress and purify glutaredoxin A1. The aim of this study was the investigation of the Glutaredoxin A1 from *C. pseudotuberculosis* behavior under different redox environments and the identification of lead molecules, which can be used for specific inhibitor development for this protein family. A quantitative assay was performed measuring the rate of insulin reduction spectrophotometrically at 640 nm through turbidity formation from the precipitation of the free insulin. Glutaredoxin A1, at 5 μ M concentration, accelerated the reduction process of 0.2 mM insulin and 1mM DTT. The pH optimum of the reaction was 7.4. In the presence of DTT and ESH the glutaredoxin A1 presents similar activity, and its activity is reduced by 50% in the presence of GSH. Additional function for ESH in the redox metabolism of *C. pseudotuberculosis* is suggested. A combined STD and Chemical Shift - NMR approach was employed to study the effects of potential inhibitors on the structure of glutaredoxin A1 from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. The inhibitory potential of four ligands (heparin, suramin, hesperetin – Hst, and hesperidin - Hsp) against glutaredoxin A1 is discussed.

Abbreviation: CLA, Caseous lymphadenitis; CD, Circular dichroism; CoASH, Coenzyme-A; DTT, Dithiothreitol; ESH, Ergothioneine; Grx, Glutaredoxin; GSH, Glutathione; Hst, Hesperetin; Hsp, Hesperidin; LMW thiol, Low-molecular weight thiol; Mrx, Mycoredoxin; MSH, Mycothiol; Trx, Thioredoxin;

Keywords: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, glutaredoxin, NMR, CD spectroscopy, inhibitors

1. Introduction

C. pseudotuberculosis is a member of the heterogeneous CMNR-group of pathogens, which forms a cluster of Gram-positive bacteria along with the *Mycobacterium*, *Nocardia*, and *Rhodococcus* genus [1]. *C. pseudotuberculosis* is the causative agent of caseous lymphadenitis (CLA) that infects sheep, goats, equids (ulcerative lymphangitis) and cattle (cutaneous excoriated granulomas). CLA infection leads to dramatically reduced yields of wool and milk, weight loss, carcass condemnation and, eventually, results in death and considerable economic loss worldwide [2, 3]. Rare cases of infection have also been reported in humans [4]. As a facultative intracellular parasite, this bacterium is capable of survival and growth in macrophages, thus, being able to evade detection by host immune systems [5]. There has, therefore, a strong focus on vaccination and drug development in the fight against CLA.

Controlling redox metabolism is one of the most promising approaches for drug design since it is of primary importance in rapidly growing pathogens such as *C.*

pseudotuberculosis. Low molecular weight (LMW) thiols, such as glutathione (GSH), mycothiol (MSH) in mycobacteria, coenzyme-A (CoASH) in *Staphylococcus aureus* and γ -glutamylcysteine in halobacteria, play key roles in maintaining a reducing intracellular environment, which is crucial for the proper functioning of regular metabolic activities [6, 7]. Thus, thiols enable rapid adaptation of microorganisms to different environmental conditions and various endogenous and exogenous stresses [8].

In eukaryotes and Gram-negative bacteria, the tripeptide glutathione (GSH) is the dominant LMW thiol [8, 9]. GSH is usually present in high intracellular concentrations (approximately 5 mmol L⁻¹ in *Escherichia coli*, for example), primarily in its reduced form, functioning as a thiol-disulfide redox buffer [10]. However, most Gram-positive bacteria do not possess GSH, instead, the actinomycetes (e.g. mycobacteria, corynebacteria, and streptomyces) produce mycothiol (MSH) which is functionally analogous to GSH, as the main low-molecular weight thiol [11, 12]. GSH acts not only during the regulation of oxidative stress, but also in the presence of alkylating agents and antibiotics, thereby, maintaining and regulating intracellular thiol-disulfide homeostasis [13-15]. Similar to GSH, MSH contains a functional cysteine moiety but, *myo*-inositol and *N*-glucosamine [8] are present instead of the two amino acids, glycine and glutamic acid as in GSH. Another thiol present in the actinomycetes family, including *Corynebacterium*, is ergothioneine (ESH), a 2-thiol-L-histidine betaine [8, 16]. The concentration of ESH in actinomycetes is ten-fold lower than that of MSH and its exact function in these bacteria is unknown [8, 17]. Beside the important thiol group in the LMW thiols their molecular structures are very different as shown in Figure 1 for GSH, MSH and ESH.

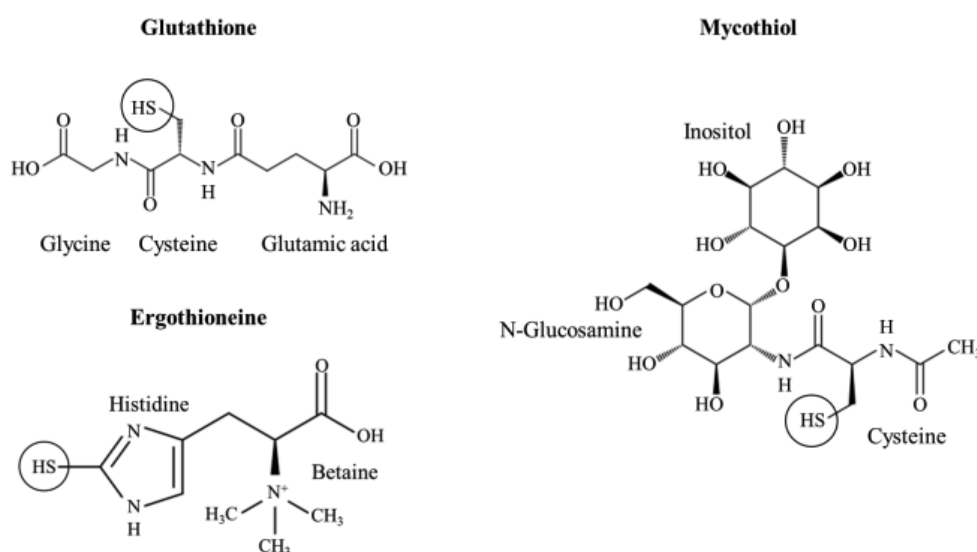


Fig. 1. Molecular structures of LMW thiols: glutathione, ergothioneine and mycothiol. Circles indicate the thiol groups.

In addition to LMW thiols, many organisms possess thiol-disulfide oxidoreductases such as thioredoxin, glutaredoxin 1, glutaredoxin 2, and glutaredoxin 3 that may function as reducing agents on protein disulfide bonds *via* their redox-active disulfides. Reduced active site thiols is essential for the catalysis of this protein. The oxidation of the cysteines inactivate the protein [18, 19].

Glutaredoxins (Grx) are low molecular oxidoreductases (9-12 kDa) with a basic motif consisting of a central four-stranded anti-parallel β -sheet surrounded by three α -helices and are structurally classified as proteins with a Trx fold [20, 21]. The active sites of Grx proteins (CxxC) and the glutathione binding site GGxxD motifs are conserved [20, 22]. Glutaredoxins, utilize the reducing power of glutathione to catalyze disulfide reductions in the presence of NAD(P)H and glutathione reductase [20]. Grx proteins, similar to thioredoxins, participate in numerous cellular functions such as in the formation of deoxyribonucleotides for DNA synthesis (by reducing the essential enzyme ribonucleotide reductase), the generation of reduced sulfur (via 3'-phosphoadenylylsulfate reductase), signal transduction, and in defense against oxidative stress [19]. Grx proteins are essential for a wide spectrum of organisms and the improper functioning of this system can be correlated with various cellular dysfunctions.

In this study, we present the mechanism of the glutaredoxin A1 from *C. pseudotuberculosis* as mycoredoxin, a small protein unique to actinomycetes. LMW thiols, that could reduce *Cp*-GrxA1 was the focus of our study. The LMW thiols were tested for their reductive capacity against *Cp*-GrxA1. The specificity of glutaredoxins is not determined by the CxxC active site; moreover, other amino acids in the contact area are important [23]. Blocking the contact area maybe will disturb the substrate interaction.

Inhibition of the protein can result in a number of bacterial physiological effects. Identification of ligands, which inhibit the protein activity and can be useful as lead compounds for forward drugs development, was the second aim of this study. The inhibitory effect of four molecules was identified by enzymatic assay, and further evaluated by NMR-based techniques.

Agricultural business is suffering economic losses due to the reduction of meat, milk, and wool production, caused by CLA. Up to date there is no effective treatment for the diseases, to control the illness it is recommended that infected animals should be euthanized [2]. Vaccination has been a strategy for the prevention of CLA, but up to now vaccines are not available. It is remarkable that the understanding of the biological mechanism of the bacteria will help to the better development of an effective drug.

2. Material and Methods

2.1. Materials

Diamide, dithiothreitol, coenzyme-A, ergothioneine, glutathione, low molecular weight heparin (MW: 6000 kDa), suramin, hesperetin, kanamycin, IPTG, MgSO₄, NaCl, Tris-HCl, glycerol, lysozyme, imidazole, K₂HPO₄, KH₂PO₄, EDTA, methanol, D₂O, 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid, DMSO, acetic acid and isopropanol were purchased from Sigma-Aldrich (USA). Human insulin were purchased from Eli Lilly do Brasil (Brazil). Hesperidin was produced and purified as described in section 2.6.

2.2. *In silico* analysis

Multiple Grx sequences were retrieved from NCBI and sequence alignments were performed, using MUSCLE [24] and Box Shade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.htm) web servers. The atomic coordinates from reduced *M. tuberculosis* Mrx1 (PDB: 2LQO) and oxidized *M. tuberculosis* Mrx1 (PDB: 2LQQ) were used as templates for comparative modeling by the satisfaction of spatial restraints as implemented in the program Modeller 9v13 [25]. The structure of reduced and oxidized *C. pseudotuberculosis* glutaredoxin A1 (*Cp*-GrxA1) (Gene ID: 12299035; Uniprot: D9Q987) was modeled.

2.3. Expression and purification of GrxA1

The open reading frame of *Cp*-GrxA1 was cloned into vector pD441-SR by DNA 2.0 (USA). The construct contained a N-terminal hexahistidine affinity tag. The kanamycin-resistant vector pD441-SR presents a T5 promoter inducible by IPTG and a high copy percentage provided by pUC origin of replication. Grx-pD441-SR (DNA 2.0) vectors were transformed into *E. coli* BL21 (DE3)T1 (Sigma-Aldrich, USA) competent cells, which were grown for 16 h (overnight) at 37 °C in LB medium containing sufficient amounts of kanamycin. Next, the bacterial cultures were transferred into fresh LB medium, grown for another 2.5 h at 37 °C until the A₆₀₀ reached 0.6. Then, *Cp*-GrxA1 was induced by 0.5 mmol L⁻¹ IPTG, and incubated for 4 h at 37 °C, being supplemented with 50 μmol L⁻¹ MgSO₄. Later, the culture was harvested by centrifugation at 4,000 g, 5 °C for 20 min, discarding the supernatant and re-suspending the *Cp*-GrxA1 cell pellet in 20 mmol L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0, 500 mmol L⁻¹ NaCl, 5% (v/v) glycerol. Then, the cell-suspension was incubated on ice for

1 h with lysozyme, subsequently being lysed by sonication in four sets of 30 s pulses of 30% amplitude, with 10 s intervals. This way obtained crude cell extract was centrifuged at 8,000 g, 6 °C for 90 min. The supernatant containing *Cp*-GrxA1 was loaded onto Ni-NTA column pre-equilibrated with 20 mmol L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0, 500 mmol L⁻¹ NaCl, 5% (v/v) glycerol, extensively washed with the same buffer containing 20 and 40 mmol L⁻¹ imidazole, *Cp*-GrxA1 eluted stepwise with 80 – 500 mmol L⁻¹ imidazole. The eluted fractions were individually pooled, and injected onto a Superdex 75 10/300 GL size exclusion column (GE Healthcare), pre-equilibrated with buffer 20 mmol L⁻¹ K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 7.4, 150 mmol L⁻¹ NaCl. Sample purity after each purification step was assessed by 20% SDS-PAGE gels. Fractions containing *Cp*-GrxA1 were pooled and concentrated in a micro concentrator (MWCO: 3,000 Da, GE Healthcare). Protein concentrations were determined spectrophotometrically, applying the Lambert-Beer law [26].

2.4. Circular dichroism spectroscopy (CD)

For all CD measurements, 15 repeated scans were performed, with 5 of them used to establish the baseline. The wavelength range applied for far-UV spectra was from 200 nm to 260 nm, in a time constant of 1 s and 100 nm/min continuous scanning mode, using a Jasco J-107 spectropolarimeter (Jasco, Japan). *Cp*-GrxA1 was separately diluted in 20 mmol L⁻¹ K₂HPO₄/KH₂PO₄ to a concentration of 10 µmol L⁻¹. pH, from 7.0 to 9.0, were used for evaluating the secondary structure features change of *Cp*-GrxA1. Then, 10 µmol L⁻¹ *Cp*-GrxA1 in 20 mmol L⁻¹ K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 7.4 was used to investigate the influence of 1.4 µmol L⁻¹ DTT, diamide, GSH, CoASH, ESH on the target protein secondary structure. In addition, 0.14 µmol L⁻¹ of the ligands heparin, suramin, Hsp and Hst were individually tested with 10 µmol L⁻¹ *Cp*-GrxA1. These agents and ligands were incubated with the protein for 2 h prior to the measurements. The results are presented in molar ellipticity [θ], according to:

$$[\theta]_{\lambda} = \frac{\theta}{c * l * 10 * n}$$

in which, θ is the ellipticity measured at a given wavelength λ (deg), c is the protein concentration (mol L⁻¹), l is the cell path length (cm) and n is the number of amino acids. CDpro software package was adopted to analyze the results [27].

2.5. Nuclear magnetic resonance (NMR)

2.5.1. Saturation Transfer Difference by Nuclear Magnetic Resonance (STD-NMR)

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy was used in order to map *Cp-GrxA1* interactions with its potential modulators. All experiments were performed in a Bruker AVANCE III HD spectrometer (Bruker, Germany) operating at 600 MHz for ^1H , equipped with a triple-resonance, pulsed-field, z-gradient probe. There are several different techniques using NMR for studying protein-ligand interactions [28], ranging from protein signals to ligand signals monitoring. Saturation Transfer Difference (STD) by NMR spectroscopy is a well-established technique for such purposes [29-31]. It comprises a series of 1D experiments, described as on- and off-resonance. In the on-resonance, chosen protein signals are selectively excited and saturated. It is important that ligand signals are at least 1000 Hz away from the chosen on-resonance frequency. As a reference experiment, the off-resonance is recorded using the same pulse sequence of the on-resonance experiment, but irradiating a region far from protein or ligand signals. Due to the spin diffusion, the protein may be fully saturated, including the ligand interaction site. Intermolecular nuclear Overhauser effect (nOe) in this condition transfers magnetization from the protein to the ligand atoms, reducing the ligand signal intensity when binding takes place in the fast chemical exchange regime.

For the present study, an off-resonance at 20 ppm was chosen, and the on-resonance frequencies were selected according to the ligand signals. The Bruker pulse sequence STDDIFFESGP was used for the STD-NMR spectroscopy experiments. The protein was saturated for 2 s, the recycle delay was set to 3 s and a saturation power of 35 dBW was used. To suppress the protein signal, a spin-lock filter of 30 ms was used. STD amplification factors (STD-AF) were calculated by:

$$\text{STD - AF} = \frac{I_{\text{off-resonance}} - I_{\text{on-resonance}}}{I_{\text{off-resonance}}}$$

where $I_{\text{off-resonance}}$ and $I_{\text{on-resonance}}$ are the intensity of the ligand signals in the off- and on-resonance spectra, respectively.

Hence, 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ suramin, 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Hsp and 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Hst were tested with 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of *Cp-GrxA1* diluted in 20 mmol L^{-1} $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7.4, 150 mmol L^{-1} NaCl, in order to evaluate possible interactions.

2.5.2. Chemical Shift Mapping by NMR

Protein-ligand interaction identification by STD-NMR is limited by affinity, i.e., ligands with dissociation constants in nmol L^{-1} range do not have a STD-AF in the difference spectra, since they are not in the fast chemical exchange regimes. Nevertheless, protein chemical shifts are sensitive to binding, especially in the nitrogen dimension, as checked throughout ^{15}N -HSQC experiment [28]. Although the proteins used in this study were not labeled, it was possible to observe chemical shift change in the protein signals following heparin titration into *Cp*-GrxA1. For this, a regular excitation sculpting experiment (ZGESGP) was recorded for a varying heparin concentration (from 10 - 350 $\mu\text{mol L}^{-1}$) on 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ *Cp*-GrxA1. Each spectrum was referenced to DSS (4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid), presented in 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ in the solution.

2.6. Turbidimetric Assay of Insulin Disulfide reduction

The rate of insulin disulfide reduction by *Cp*-GrxA1 was monitored spectrophotometrically following the turbidity of insulin at 640 nm [32-35], using a Biomate UV-Visible Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA). The reaction mixture A contained a total volume of 500 μL , with 0.2 mmol L^{-1} insulin, 50 mmol L^{-1} Tris-HCL, 2 mmol L^{-1} EDTA, 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ protein, and the optimum pH for *Cp*-GrxA1 was determined by using pH at 7.0, 7.4, 7.8, 8.0, 8.4, 8.8 and 9.0. The reaction occurred at 25 °C by adding 1 mmol L^{-1} DTT. As a control, the enzymatic reduction of insulin by *C. pseudotuberculosis* Thioredoxin A1 (*Cp*-TrxA1) was used; and, the non-enzymatic reduction of insulin by DTT. In another experiment, instead of DTT, the reductive agents GSH, ESH, CoASH and the oxidant diamide, all at 1 mmol L^{-1} final concentrations, were used. As a control, the non-enzymatic reduction of insulin with 1 mmol L^{-1} of the corresponding agent was applied.

The protein was tested in the presence of the ligands heparin, suramin, Hsp and Hst, all at final concentration of 0.14 $\mu\text{mol L}^{-1}$, to evaluate a possible inhibition on the activity of these proteins. *Cp*-GrxA1 were incubated with the ligands overnight at 4 °C and next, the samples were injected onto a Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) size exclusion column pre-equilibrated with 20 mM Tris-HCL pH 7.4, 150 mM NaCl, to remove exceeding ligands. The assay was performed as described before.

The experiments were performed as triplet measurement and repeated twice, each with a new purification batch of the proteins. All data points in figure 5 are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD), according to the following equation.

$$S = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}$$

2.7. Production and purification of Hesperidin(Hsp)

Oven dried (70 °C) sweet orange peels (*Citrus sinensis*) were put into the Soxhlet apparatus and were de-oiled by ethyl ether during reflux for 1.5 h. Hesperidin (Hsp) was then extracted using methanol under 3 h reflux. The methanol extract was concentrated into a syrup. Hsp was crystallized using a dilute acetic acid (6%), and pale-beige needles (crude Hsp) were obtained. The crude Hsp was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) forming a syrup at 60-80 °C, then, the same amount of water was added dropwise. The suspension was left to cool and Hsp crystals were removed after centrifugation and washed with small amounts of worm water and *iso*-propanol. This way, pure hesperidin was obtained and had its structure checked by NMR [36].

3. Results and Discussion

3.1. Sequence analysis and molecular modeling of Cp-GrxA1

A BLAST search for the *Cp*-GrxA1 sequence against the non-redundant protein sequences database [37] indicated that the protein sequence is highly conserved within the *Corynebacterium* genus with an identity of approximately 88% (*C. ulcerans*). On the other hand, the identity with the *E. coli* Grx1 sequence was less than 10% (Fig. 2A). The active site dithiol motif (CxxC) is conserved across the Grx/Trx protein family. The *E. coli* Grx1 sequence contains a GGxxD motif considered to be important for interaction with GSH [20, 22] which is absent in *Cp*-GrxA1 since *C. pseudotuberculosis* utilizes MSH [38, 13].

Although GSH and MSH are functionally similar [15, 39], they are structurally very different; GSH is a tripeptide, whereas; MSH carries the saccharides, *N*-glucosamine, *myo*-inositol and a cysteine moiety [40]. The *Cp*-GrxA1 sequence shares low sequence identity with other Grx proteins, but, it shares significant sequence identity with the mycoredoxin proteins (Fig. 2B).

The two motifs VPT and TNP in the Mrx1 of *M. tuberculosis* are located in the region where it can be implicated in recognition of the glucosamine inositol (GlcN-Ins) portion of MSH [15]. These motifs are conserved within the Mrx proteins and *Cp*-GrxA1 (Fig. 2A and B). However, the aforementioned GGxxD motif, important for interaction with GSH, is

absent, indicating that *Cp*-GrxA1 could function as a Mrx protein. Grx proteins contain a conserved *cis*-proline, which is implicated in stabilization of the active site and which also participates in catalysis [41, 42].

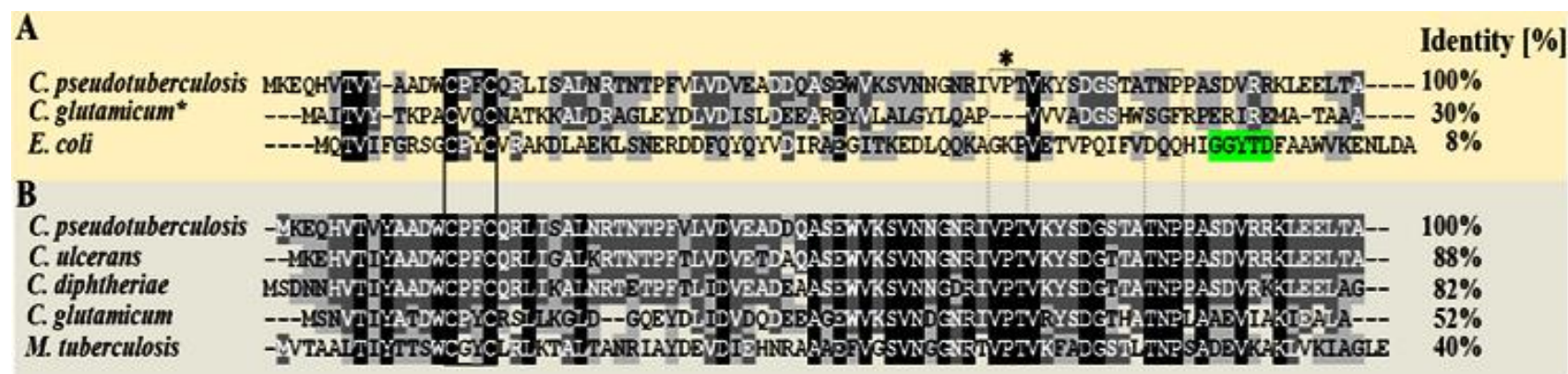


Fig. 2. Sequence comparisons of bacterial Grx proteins. **A:** sequence alignment of *Cp*-GrxA1, *C. glutamicum* Nrdh-redoxin (marked by star), and *E. coli* Grx1. **B:** Sequence BLAST of *Cp*-GrxA1 against mycoredoxin from *C. ulcerans* Grx, *C. diphtheriae* Grx, *C. glutamicum* Mrx1, *M. tuberculosis* Mrx1. The dithiol active site residues (CxxC) (black box). The VPT and TNP motifs in the Mrx and Mrx-like proteins (dashed boxes). The asterisk indicates the position of the *cis*-proline. The GGxxD motif, is highlighted in green.

Generally, Grx proteins, for example *E. coli* Grx, contain the CxxC motif without the presence of the adjacent Trp residue, which is conserved in Trx proteins [20, 43]. Interestingly, the Mrx sequences presented in Figure 2B contain this Trp residue. The importance of this amino acid in the *E. coli* Trx active site has been examined [44] and mutations decrease disulfide reduction by about 50%.

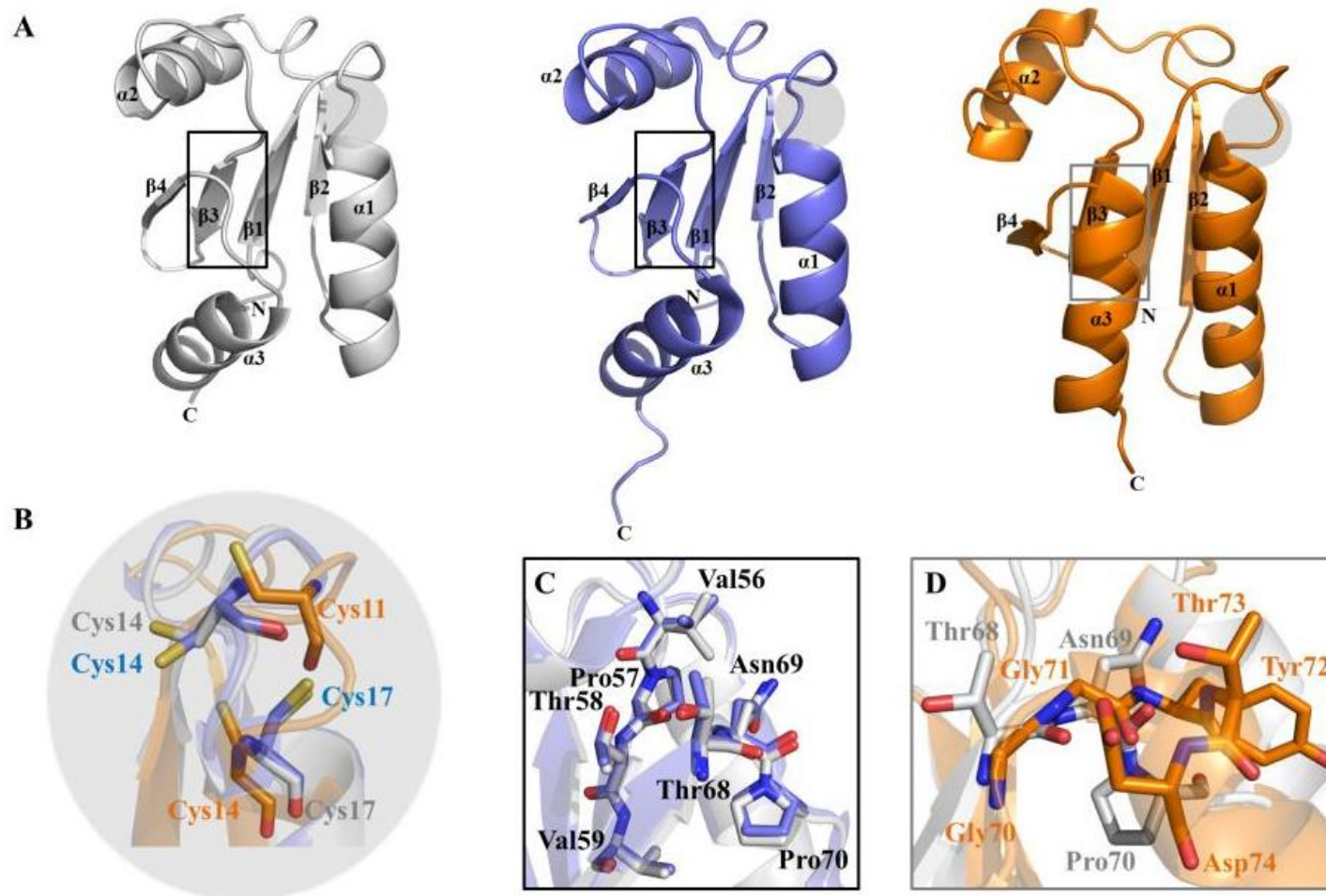


Fig. 3. Structural comparisons of the *Cp-GrxA1* homology model with *M. tuberculosis* Mrx1 (PDB: 2LQO) and *E. coli* Grx1 (PDB: 1EGR). **A:** *Cp-GrxA1*(grey), *M. tuberculosis* Mrx1 (blue), and *E. coli* Grx1 (orange). The grey spheres indicate the active sites. The black boxes mark the position of the VPT and TNP motifs in the Mrx proteins. The grey box labels the position of the GGxxD motif in the *E. coli* Grx1. **B:** Structural overlay of the active site motif of the three proteins. **C:** Structural overlay of the VPT and TNP motifs in *Cp-GrxA1* and *M. tuberculosis* Mrx1. **D:** Structural comparison of the *Cp-GrxA1* TNP motif and the *E. coli* Grx1 GGxxD motif.

The three proteins possess the typical fold, which is conserved across different bacterial species, consisting of a central twisted four-stranded anti-parallel central β -sheet flanked on three sides by α -helices [21]. α -helix one and the four β -strands are in the same relative orientations in the three structures. α -helices two and three present significant differences in Mrx and Grx, which can be correlated with the variation in the molecular structure of the substrates as indicated previously in Figure 1. The mycoredoxin proteins contain a long linker peptide between β -strand four and α -helix three and in the *E. coli* Grx structure this loop is truncated. The dithiol active site of those proteins is conserved (Fig. 3B) and is located in α -helix one and the following loop connection with β -sheet one. The VPT and TNP motifs in *Cp*-GrxA1 and *M. tuberculosis* Mrx1 are located in the same region of the proteins and structural overlays of these motifs indicate structural conservation (Fig. 3C). The VPT motif is located in the loop connecting α -helix two and β -sheet three and the TNP motif in the loop connecting β -sheet four and α -helix three, both motifs are located near the active site.

A structural comparison between the *Cp*-GrxA1 model and the *E. coli* Grx1 protein structure indicates that the TNP and the GGxxD motifs overlap in their positions (Fig. 3D). The location of the TNP and VPT motifs in *Cp*-GrxA1 is similar to the position of GGxxD motif in the *E. coli* Grx1, indicating the participation of this region in the MSH binding [15].

3.2. Expression and purification

99 amino acids comprise the protein sequence of *Cp*-GrxA1 with a molecular weight of ~11,155.3 Da. Cloning, expression and purification protocols are described in detail in item 2.2 of this article. The protein presented a single band on a SDS-PAGE gel following size exclusion chromatography (Figure S1, Supplementary material) with a mass of approximately 11 kDa.

3.3 Insulin Reduction by *Cp*-GrxA1

To test the general *Cp*-GrxA1 thiol-disulfide oxidoreductase activity, a classical insulin reduction assay was performed. In this assay, the putative redox-active proteins reducing insulin disulfide bonds and the subsequent precipitation of insulin was followed turbidimetrically at 640 nm [32-35]. Two control experiments were performed, the first one without *Cp*-GrxA1 and no precipitation was observed up to 20 min. The second control experiment was realized with Thioredoxin A1 from *C. pseudotuberculosis* (*Cp*-TrxA1), which was prepared in our lab.

The general thiol-disulfide oxidoreductase activity of both proteins tested indicates significant differences. *Cp*-TrxA1 reaches a saturation level after 38 min and *Cp*-GrxA1 does not follow this pathway (Fig. 4A).

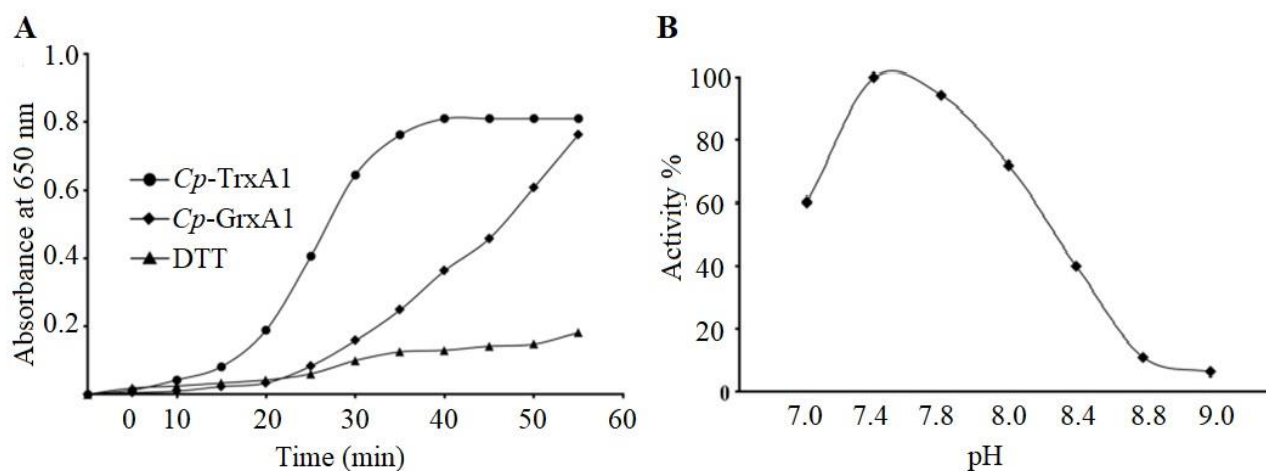


Fig. 4. Insulin reductase activity by *Cp*-GrxA1. **A:** Reduction of insulin by *Cp*-GrxA1. As control served *Cp*-TrxA1 and 1 mmol L⁻¹ DTT. **B:** pH profile of *Cp*-GrxA1 using the assay of reduction of insulin in pH range from 7.0 to 9.0.

The function of thioredoxin is the reduction of oxidized cysteines in proteins with electrons obtained from NAD(P)H via the NAD(P)H-dependent flavoenzyme - Thioredoxin reductase pathway [45]. Insulin in this reduction assay is a typical substrate for *Cp*-TrxA1. In contrast, Grx proteins specifically reduce oxidized GSH and in the case of *Cp*-GrxA1, MSH. The differences in the substrate preference of both proteins are observable in Figure 4A. *Cp*-GrxA1 has the potential to reduce insulin, but saturation of the catalysis is not attained. *Cp*-TrxA1 attains saturation after approximately 35 min. The evaluation of redox agents and ligands on the enzymatic reduction of insulin by *Cp*-GrxA1 were performed at pH 7.4 since the highest reductase activity is at pH 7.4 for *Cp*-GrxA1 (Fig. 4B).

Cp-GrxA1 presents a similar activity in the presence of DTT and ESH, the activity was lowered by 50% in the presence of GSH. CoASH or diamide had the lowest effect on the protein activity compared with the results in the presence of DTT (Fig. 5A).

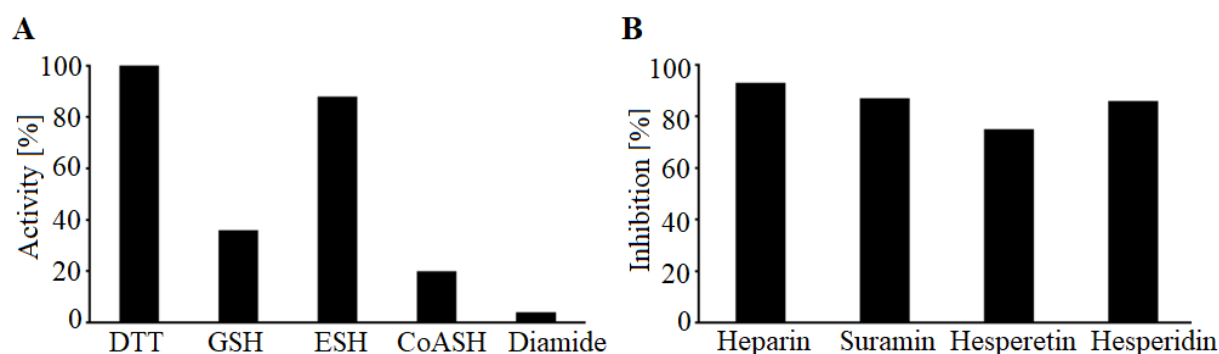


Fig. 5. Influence of redox agents and ligands on the insulin reduction by *Cp-GrxA1*. **A:** Activity [%] of *Cp-GrxA1* on the reduction of insulin in the presence of DTT, GSH, ESH, CoASH, and diamide. **B:** Inhibition of *Cp-GrxA1* activity [%] on the reduction of insulin in the presence of one of these ligands: heparin, suramin, hesperetin, hesperidin.

Diamide leads to the oxidation of cysteines at the active site, rendering them unavailable to reduce insulin thereby reducing the target-enzyme activity significantly.

DTT is a relatively small molecule when compared with GSH, ESH and CoA, so that steric hindrance of the protein is unlikely to influence the reduction of the active site residues. The absence of the GGxxD motif in *Cp-GrxA1*, which is important for the interaction with GSH [20, 22], may account for the low reduction capacity.

Besides DTT, ESH showed the strongest effect on the insulin reduction by *Cp-GrxA1*, which has not been described previously. The ability of ESH to reduce *Cp-GrxA1* indicates an additional function for this compound in the redox metabolism in *C. pseudotuberculosis*. Data bank analysis of the *Corynebacterium* species genome demonstrates the presence of genes involved in the ESH synthesis, *egtA*, *egtB*, *egtC*, *egtD* and *egtE*.

Four ligands (heparin, suramin, hesperetin - Hst and hesperidin - Hsp), were tested for their inhibitory potentials of *Cp-GrxA1* (Fig. 5B). The assays were performed as described above and the proteins were reduced with 1 mmol L⁻¹ DTT. To overcome the effects of the free ligands on insulin, the proteins were incubated with the ligands for 16 h (overnight) and subsequently the unbound ligands were eliminated by size-exclusion chromatography. All compounds tested inhibited protein activity by greater than 80%. The greatest inhibition observed was for heparin followed by suramin, Hsp and Hst.

Heparin is a linear, polydisperse polysaccharide consisting of repeating units of 1→4-linked pyranosyluronic acid and 2-amino-2-deoxyglucopyranose (glucosamine) residues [46]. Heparin-binding sites in proteins are characterized by the presence of clusters of positively charged basic amino acids that form ion pairs with spatially defined negatively charged sulfo- or carboxyl groups of heparin [47]. Additionally, *Cp-GrxA1* contains the

VPT and TNP motifs which interact with the GlcN-Ins segment of MSH and the sugar moieties of heparin probably bind to this region is high.

Suramin, a symmetric divalent molecule, containing two naphthalene-trisulfonic acid head groups, is a well characterized analogue of heparin and it has been shown that both compete for the same binding region of the protein [48, 49].

Hsp and Hst are citrus flavonoids that show interesting biological activities. Hsp is a flavanone glycoside and its aglycone form is Hst [50]. Some properties of these compounds include anticancer, cancer preventive, anti-inflammatory, neuroprotective and antioxidant properties, which are well-known and promising properties [51-54].

Hst is the aglyconated form of hesperidin and the disaccharide rutinose is absent, this disaccharide consists of glucose and rhamnose molecules. It is assumed that this disaccharide promotes the interaction with *Cp*-GrxA1, probably due to the presence of the VPT and TNP motifs.

3.4. Circular Dichroism

CD-measurements were conducted to evaluate changes in the protein secondary structure features as a function of pH and concentration of reducing/oxidizing agents, and ligands. The results were evaluated by utilizing the CDpro software (Table S2, Supplementary material).

The secondary structure of *Cp*-GrxA1 (Fig. 6A) was sensitive to changes in pH; at pH 7.0, the α -helical and β -sheet contents were around 30% and 22% respectively. Increasing the pH to 9.0 resulted in an increase of the α -helical content to around 37% and a concomitant decrease in the β -sheet content to around 15%. This is in good agreement with the crystal structure of *M. tuberculosis* Mrx1 (PDB: 2LQO), which has α -helical and a β -sheet content of 34% and 17% respectively.

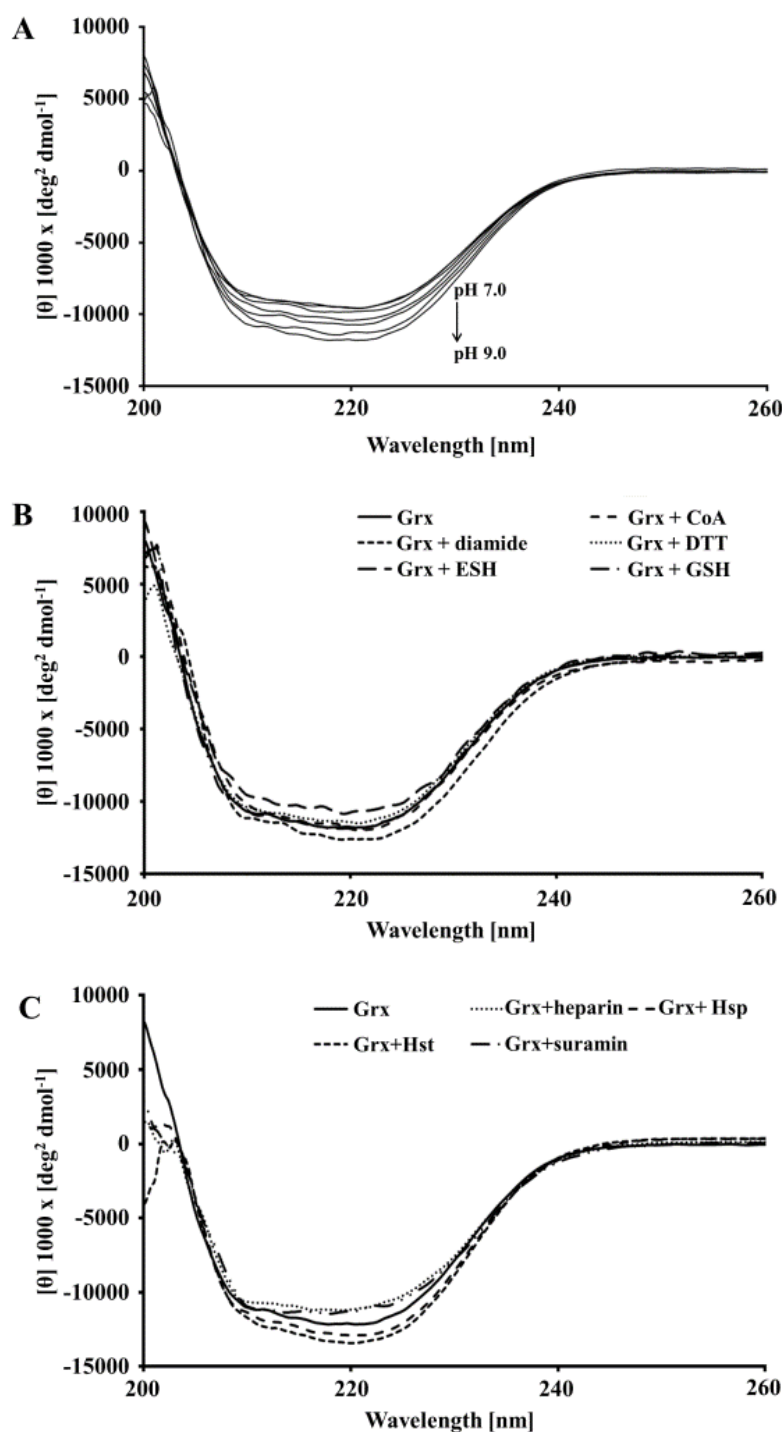


Fig. 6. Far-UV CD-spectra from 200 to 260 nm of *Cp*-GrxA1 under different conditions. **A:** CD-spectra of *Cp*-GrxA1 in the pH range from 7.0 to 9.0. **B:** CD-spectra of *Cp*-GrxA1 incubated with diamide, ESH, DTT, CoA, or GSH. **C:** Influence of heparin, suramin, Hsp or Hst on the CD-spectra of *Cp*-GrxA1.

In the presence of diamide, these values changed to 40% α -helix, 14% β -sheet, 18% turn, and 28% random coil (Fig. 6B). Treatment with DTT and GSH showed a similar spectrum to the untreated protein (Figure 6B and Table S2 Supplementary material). To visualize the changes in the secondary structure of the protein, homology models of reduced and oxidized *Cp*-GrxA1 were generated based on the coordinates of reduced (PDB: 2LQO)

and oxidized (PDB: 2LQQ) Mrx1 from *M. tuberculosis* (Figure S2, Supplementary material).

In the presence of CoASH, the CD spectrum of *Cp*-GrxA1 undergoes a weak signal reduction. Since the results of the insulin reduction assay also indicate a weak effect on the protein activity, we can conclude that CoASH does not have a strong influence on the protein activity or secondary structure.

Contrary to the significant changes induced by GSH and DTT, ESH presented only a slight modification of the protein CD signal probably by reducing the active site residues. The insulin reduction assay for *Cp*-GrxA1 indicated that ESH has a strong effect however, further investigations are necessary to determine its binding mode.

The ligands, tested for their inhibitory potential in the insulin reduction assay were investigated regarding their effects on the secondary structure of the proteins, as presented in Figure 6C. The results confirmed that the tested ligands possess no denaturation or unfolding effect on the protein. The *Cp*-GrxA1 secondary structure was influenced by Hst and Hsp in a similar fashion and showed an inverse effect compared with the suramin and heparin CD signals. Hsp binding can induce conformational changes in proteins [55, 56], similar to the CD results of *Cp*-grxA1 described above.

Suramin and heparin are agonists and generally compete for the same binding sites in proteins and have a similar effect on the CD spectra of *Cp*-GrxA1 [38-40].

3.5. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

Saturation Transfer Difference (STD) NMR experiments were performed to identify the interactions and to investigate the binding epitopes of the four inhibitors with *Cp*-GrxA1.

Evaluating the Hst binding epitopes (Fig. S3, Supplementary material) was the most challenging since all observed hydrogens were subjected to the STD effects. The highest relative STD amplification factors (STD-AF), rated with 100% and determined for the hydrogens of the aromatic ring system (Fig. S3, Supplementary material). The flavonoid Hst showed a strong inhibitory effect on the insulin reduction activity of *Cp*-GrxA1, the identification of the binding epitopes of this ligand provide useful information for docking experiments and refining possible poses, to determine the binding region of this molecule to *Cp*-GrxA1.

Cp-GrxA1 interaction with Hsp could be confirmed (Fig. S3, Supplementary material), and interestingly, the binding epitopes of Hsp and Hst indicated significant differences in their interactions with *Cp*-GrxA1. In Hsp the relative STD-AF of the CH₃

group next to the ether-bond changes from 57% to around 87%. The aromatic ring systems in Hsp are not involved in the interaction with *Cp*-GrxA1, in contrast to Hst. The CH₃ group of the rhamnose moiety of rutinose in the Hsp molecule shows the highest relative STD-AF. The disaccharide rutinose strongly affects the binding behavior of the molecule probably due to the VPT and TNP motifs which can support this interaction. Compared with the sugar moieties of MSH, inositol and *N*-glucosamine, rhamnose is similar to *N*-acetyl glucosamine as illustrated in Figure 7.

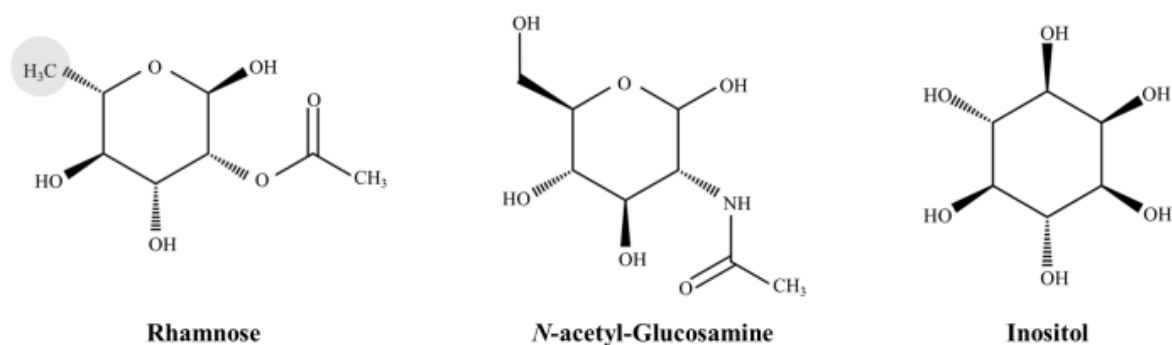


Fig. 7. Molecular structures of rhamnose (part of rutinose), *N*-acetyl-glucosamine and inositol (part of MSH). The grey sphere indicates the CH₃ group, which interacts with *Cp*-GrxA1.

Currently, the details of the mode of interaction of MSH/Mrx is unknown, however, as mentioned earlier, the VPT and TNP motifs seem to have an impact on MSH binding by recognizing the GlcN-Ins portion of MSH [15]. Our results demonstrate that Hsp interacts with *Cp*-GrxA1 and the interaction has an influence on the active site, because of the observed inhibition of the protein in the insulin reduction assay. Based on these observations, we may conclude that Hsp binds on, or very near, to the VPT and TNP motifs. Additional experiments are necessary to confirm this and to test Hsp as a potential lead compound to generate specific *Cp*-GrxA1 inhibitors.

Binding between suramin and *Cp*-GrxA1 is induced by the aromatic rings of the compound, which receive most of the transferred magnetization as observed in the STD experiments (Fig. S4, Supplementary material).

The interaction of heparin with *Cp*-GrxA1 could not be verified using STD-NMR experiments. This is potentially due the associated affinity cut-off necessary to dissociate heparin from the protein for the measurement of the binding event. Protein-ligand complexes with dissociation constants lower than a few micromols are not observable in STD-NMR experiments. Nevertheless, using the chemical shift changes after ligand titration by NMR 1-D spectra of the protein, this interaction could be confirmed (Fig. S5, Supplementary

material). Unfortunately, ligand titration could not provide information about the binding epitopes of the ligand.

4. Conclusion

Intracellular pathogens, like *C. pseudotuberculosis*, survive in very challenging environments, where the host cells attack them continuously. Notwithstanding, they still present themselves as rapidly-growing cells, with high metabolism rates. The pathogen has to deal with high amounts of cell-toxic reactive oxygen species created by these origins. A disharmony in the detoxification of these molecules can strongly influence the cellular redox homeostasis. Thus, pathogens' redox metabolism represents one of the most promising targets for drug design.

Cp-GrxA1 is a member of the Grx protein family and shows similarities in the core structure and the CxxC active site. Sequence analysis of *Cp*-GrxA1 showed that the protein contains two carbohydrate binding regions (VPT and TPN), typical for Mrx proteins. In contrast, the typical GGxxD motif for Grx is absent from the *Cp*-GrxA1, which give us a clear cue that GrxA1 from *C. pseudotuberculosis* is a Mrx-like protein.

The *Cp*-GrxA1 thiol-disulfide oxidoreductase activity on insulin showed strong effects, when the protein was reduced with DTT or ESH. The reduction of *Cp*-GrxA1 with ESH has not been reported previously and is characterized for the first time and, this result could expand the function of this LMW thiol as a back-up system for MSH in actinomycetes species.

We also describe, for the first time, the binding behaviors and inhibitory effects of suramin, heparin, hesperidin and hesperetin on *Cp*-GrxA1 using biochemical and biophysical methods. Our results can be used as basis for further experiments to identify lead compounds and design potential inhibitors for this protein family.

5. Author contributions

Raphael J. Eberle expressed and purified *Cp*-GrxA1. Liege A. Kawai expressed and purified *Cp*-TrxA1. Raphael J. Eberle performed the experimental procedures. Fabio R. de Moraes performed the NMR experiments and analyses. Ljubica Tasic purified and provided the hesperidin (Hst) and hesperetin (Hsp) flavonoids. Raghuvir K. Arni guided the research and the elaboration of the manuscript. Monika A. Coronado coordinated the research and advised the elaboration of the manuscript. All authors read and took part in revising the final manuscript version.

6. Conflict of interest

Authors declare that there exists no conflict of interest.

7. Acknowledgements

This research was supported by grants from CNPq [Grant numbers 435913/2016-6, 401270/2014-9, 307338/2014-2], FAPESP [Grant numbers 2015/13765-0, 2015/18868-2, 2016/08104-8; 2016/12904-0; 2009/53989-4], CAPES and PROPe UNESP.

8. References

- [1] F.A.P. Dorella, L.G. Carvalho, S.C. Oliveira, A. Miyoshi, V. Azevedo, *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence, *Vet. Res.* 37 (2006) 201-218.
- [2] M.W. Paton, I.R. Rose, R.A. Hart, S.S. Sutherland, A.R. Mercy, T.M. Ellis, J.A. Dhaliwal, New infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* reduces wool production, *Aust. Vet. J.* 71 (1994) 47-49.
- [3] J.L. Ayers, Caseous lymphadenitis in goats and sheep: a review of diagnosis, pathogenesis, and immunity *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 171 (1977) 1251-1254.
- [4] M.M. Peel, G.G. Palmer, A.M. Stacpoole, T.G. Kerr, Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review, *Clin. Infect. Dis.* 24 (1997) 185-191.
- [5] S. Mckean, J. Davies, R. Moore, Identification of macrophage induced genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by differential fluorescence induction, *Microbes and Infect.* 7 (2005) 1352-1363.
- [6] A. Gaballa, G.L. Newton, H. Antelmann, D. Parsonage, H. Upton, M. Rawat, A. Claiborne, R.C. Fahey, J.D. Helmann, Biosynthesis and functions of bacillithiol, a major low-molecular-weight thiol in Bacilli, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 107 (2010) 6482-6486.
- [8] G.L. Newton, K. Arnold, M.S. Price, C. Sherrill, S.B. Delcardayre, Y. Aharonowitz, G. Cohen, J. Davies, R.C. Fahey, C. Davis, Distribution of thiols in microorganisms: mycothiol is a major thiol in most actinomycetes, *J. Bacteriol.* 178 (1996) 1990-1995.
- [9] M. Rawat, Y. Av-Gay, Mycothiol-dependent proteins in actinomycetes, *FEMS Microbiol. Rev.* 31 (2007) 278-292.
- [10] M.E. Anderson, Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation, *Chem. Biol. Interact.* 111 (1998) 1-14.
- [11] N.S. Kosower, E.M. Kosower, The glutathione status of cells, *Int. Rev. Cytol.* 54 (1978) 109-160.

- [12] M. Si, L. Zhang, M.T. Chaudhry, W. Ding, Y. Xu, C. Chen, A. Akbar, X. Shen, S.J. Liu, *Corynebacterium glutamicum* methionine sulfoxide reductase A uses both mycoredoxin and thioredoxin for regeneration and oxidative stress resistance, *App. Environ. Microbiol.* 8 (2015) 2781-2796.
- [13] G.L. Newton, Y. Av-Gay, R.C. Fahey, A novel mycothiol-dependent detoxification pathway in mycobacteria involving mycothiol S-conjugate amidase, *Biochemistry* 39 (2000) 10739-10746.
- [14] M. Rawat, G.L. Newton, M. Ko, G.J. Martinez, R.C. Fahey, Y. Av-Gay, Mycothiol-deficient *Mycobacterium smegmatis* mutants are hypersensitive to alkylating agents, free radicals, and antibiotics, *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (2002) 3348-3355.
- [15] N. Buchmeier, R.C. Fahey, The mshA gene encoding the glycosyltransferase of mycothiol biosynthesis is essential in *Mycobacterium tuberculosis* Erdman, *FEMS Microbiol. Lett.* 264 (2006) 74-79.
- [16] K. Van Laer, L. Buts, N. Foloppe, D. Vertommen, K. Van Belle, K. Wahni, G. Roos, L. Nilsson, L.M. Mateos, M. Rawat, N.A.J. Van Nuland, J. Messens, Mycoredoxin-1 is one of the missing links in the oxidative stress defence mechanism of Mycobacteria, *Mol. Microbiol.* 86 (2012) 787-804.
- [17] D.S. Genghof, Biosynthesis of ergothioneine and hercynine by fungi and Actinomycetales, *J. Bacteriol.* 103 (1977) 475-478.
- [18] R.C. Fahey, Novel thiols of prokaryotes, *Annu. Rev. Microbiol.* 55 (2001) 333-356.
- [19] J.F. Collet, J. Messens, Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins, *Antioxid. Redox Signal.* 13 (2010) 1205-1216.
- [20] W.A. Prinz, F. Åslund, A. Holmgren, J. Beckwith, The Role of the Thioredoxin and Glutaredoxin Pathways in Reducing Protein Disulfide Bonds in the *Escherichia coli* Cytoplasm, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 15661-15667.
- [21] C.H. Lillig, C. Berndt, Glutaredoxins in thiol/disulfide exchange, *Antioxid. Redox Signal.* 18 (2013) 1654-1665.
- [22] J.L. Martin, Thioredoxin—a fold for all reasons, *Structure* 3 (1995) 245-250.
- [23] C.H. Lillig, C. Berndt, A. Holmgren, Glutaredoxin systems, *BBA-Gen. Subjects* 1780 (2008) 1304-1317.
- [24] C. Berndt, J.D. Schwenn, C.H. Lillig, The specificity of thioredoxins and glutaredoxins is determined by electrostatic and geometric complementarity, *Chem. Sci.* 6 (2015) 7049-7058.
- [25] R.C. Edgar, MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity, *BMC bioinformatics* 5 (2004) 113.

- [26] N. Eswar, M.A. Marti-Renom, B. Webb, M.S. Madhusudhan, D. Eramian, M. Shen, U. Pieper, A. Sali, Comparative Protein Structure Modeling With MODELLER, *Curr. Protoc. Bioinformatics* 15 (2007) 1-30.
- [27] G.R. Grimsley, C.N. Pace, Spectrophotometric determination of protein concentration, *Curr. Protoc. Protein Sci.* (2004) 3.1.1-3.1.9.
- [28] . Sreerama, R.W. Woody, Computation and analysis of protein circular dichroism spectra, *Methods Enzymol.* 383 (2004) 318-351.
- [29] M. Bieri, A.H. Kwan, M. Mobli, G.F. King, J.P. Mackay, P.R. Gooley, Macromolecular NMR spectroscopy for the non-spectroscopist: beyond macromolecular solution structure determination, *FEBS J.* 278 (2011) 704-715.
- [30] M. Mayer, B. Meyer, Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 6108-6117.
- [31] M. Mayer, B. Meyer, Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 38 (1999) 1784-1788.
- [32] J. Angulo, I. Díaz, J.J. Reina, G. Tabarani, F. Fieschi, J. Rojo, P.M. Nieto, Saturation Transfer Difference (STD) NMR Spectroscopy Characterization of Dual Binding Mode of a Mannose Disaccharide to DC-SIGN, *Chem Bio Chem* 9 (2008) 2225-2227.
- [33] S. Rahlfs, M. Fischer, K. Becker, *Plasmodium falciparum* possesses a classical glutaredoxin and a second, glutaredoxin-like protein with a PICOT homology domain, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 37133-37140.
- [34] H. Kurooka, K. Kato, S. Minoguchi, Y. Takahashi, J.E. Ikeda, S. Habu, N. Osawa, A.M. Buchberg, K. Moriwaki, H. Shisa, T. Honjo, Cloning and characterization of the nucleoredoxin gene that encodes a novel nuclear protein related to thioredoxin, *Genomics* 39 (1997) 331-339.
- [35] A. Jordan, F. Åslund, E. Pontis, P. Reichard, A. Holmgren, Characterization of *escherichia coli* Nrdh a glutaredoxin-like protein with a thioredoxin-like activity profile, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 18044-18050.
- [36] A. Holmgren, Glutathione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides. Characterization of the enzymatic mechanism of *Escherichia coli* glutaredoxin, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 3672-3678.
- [37] L. Tasic, B. Mandic, C.H.N. Barros, D.Z. Cypriano, D. Stanisic, L.G. Schultz, L. da Silva, M.A.M. Mariño, V.L. Queiroz, Exploring bioactivity of hesperidin, naturally occurring flavanone glycoside, isolated from oranges, (2016) In: *Citrus Fruits*, Ed. Simmons, D. Nova Science Publishers, Inc. ISBN: 978-1-63484-079-8.
- [38] W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman, Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.* 215 (1990) 403-410.

- [39] N.A. Buchmeier, G.L. Newton, R.C. Fahey, A mycothiol synthase mutant of *Mycobacterium tuberculosis* has an altered thiol-disulfide content and limited tolerance to stress, *J. Bacteriol.* 188 (2006) 6245-6252.
- [40] M.P. Patel, J.S. Blanchard, Expression, purification, and characterization of *Mycobacterium tuberculosis* mycothione reductase, *Biochemistry* 38 (1999) 11827-11833.
- [41] G.L. Newton, C.A. Bewley, T.J. Dwyer, R. Horn, Y. Aharonowitz, G. Cohen, J. Davies, D.J. Faulkner, R.C. Fahey, The structure of U17 isolated from *Streptomyces clavuligerus* and its properties as an antioxidant thiol, *Eur. J. Biochem.* 230 (1995) 821-825.
- [42] C. Nathaniel, L.A. Wallace, J. Burke, H.W. Dirr, The role of an evolutionarily conserved cis-proline in the thioredoxin-like domain of human class Alpha glutathione transferase A1-1, *Biochem. J.* 372 (2003) 241-246.
- [43] J.B. Charbonnier, P. Belin, M. Moutiez, E.A. Stura, E. Quemeneur, On the role of the cis-proline residue in the active site of DsbA, *Protein Sci.* 8 (1999) 96-105.
- [44] A. Holmgren, Thioredoxin, *Annu. Rev. Biochem.* 54 (1985) 237-271.
- [45] G. Krause, A. Holmgren, Substitution of the conserved tryptophan 31 in *Escherichia coli* thioredoxin by site-directed mutagenesis and structure-function Analysis, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 4056-4066.]
- [46] J.F. Collet, J. Messens, Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins, *Antioxid. Redox Signal.* 13 (2010) 1205-1216.
- [47] Comper, WD. Heparin and Related Polysaccharides, (eds Lane D A, Bjoerk I & Lindahl U) Vol. 7. Springer Science & Business Media; Berlin: 1981.
- [48] I. Capila, R.J. Linhardt, Heparin-protein interactions, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 41 (2002) 390-412.
- [49] T.A. Brown, T.M. Yang, T. Zaitsevskiaia, Y. Xia, C.A. Dunn, R.O. Sigle, B. Knudsen, W.G. Carter, Adhesion or plasmin regulates tyrosine phosphorylation of a novel membrane glycoprotein p80/gp140/CUB domain-containing protein 1 in epithelia, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 14772-14783.
- [50] F. Manetti, F. Corelli, M. Botta, Fibroblast growth factors and their inhibitors, *Curr. Pharm. Des.* 6 (2000) 1897-1924.
- [51] A. Garg, S. Garg, L.J.D. Zaneveld, A.K. Singla, Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin, *Phytother. Res.* 15 (2001) 655-669.
- [52] O. Benavente-Garcia, J. Castillo, Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 6185-6205.

- [53] J.A. Manthey, N. Guthrie, K. Grohmann, Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation, *Curr. Med. Chem.* 8 (2001) 135-153.
- [54] J. Yu, L. Wang, R.L. Walzem, E.G. Miller, L.M. Pike, B.S. Patil, BS (2005) Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 2009-2014.
- [55] S.L. Hwang, P.H. Shih, G.C. Yen, Neuroprotective effects of citrus flavonoids, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 877-885.
- [56] F. Ding, J.X. Diao, Y. Sun, Y. Sun, Bioevaluation of human serum albumin–hesperidin bioconjugate: insight into protein vector function and conformation, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 7218-7228.
- [57] A. Ratnaparkhi, S.A. Muthu, S.M. Shiriskar, R.R. Pissurlenkar, S. Choudhary, B. Ahmad, Effects of hesperidin, a flavanone glycoside interaction on the conformation, stability, and aggregation of lysozyme: multispectroscopic and molecular dynamic simulation studies, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 33 (2015) 1866-1879.

9. Supplementary Material

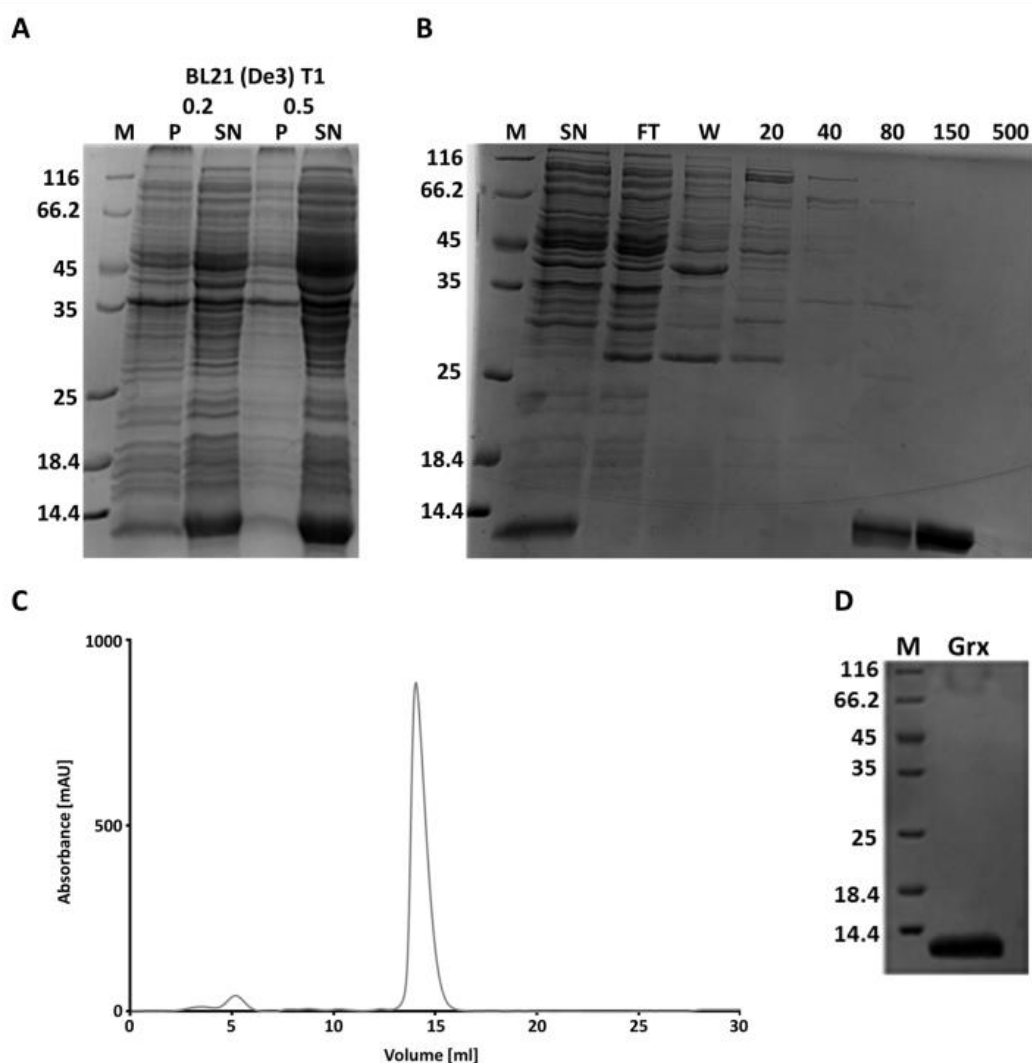


Figure S1. Purification of *Cp-GrxA1*. **A:** Expression profile of *Cp-GrxA1* in *E. coli* BL21 (De3) T1 cells. Expressed at 37 °C for 4h, induced with 0.2 and 0.5 mM IPTG respectively. P: cell pellet after cell disruption, SN: supernatant after cell disruption. **B:** SDS-PAGE analysis of *Cp-GrxA1* after Ni-NTA column. SN: supernatant after cell disruption, FT: flow through, W: washing step without imidazole, numbers indicate imidazole concentration in mM. **C:** Chromatogram of size exclusion chromatography. **D:** SDS-PAGE analysis of a concentrated *Cp-GrxA1* sample after size exclusion chromatography.

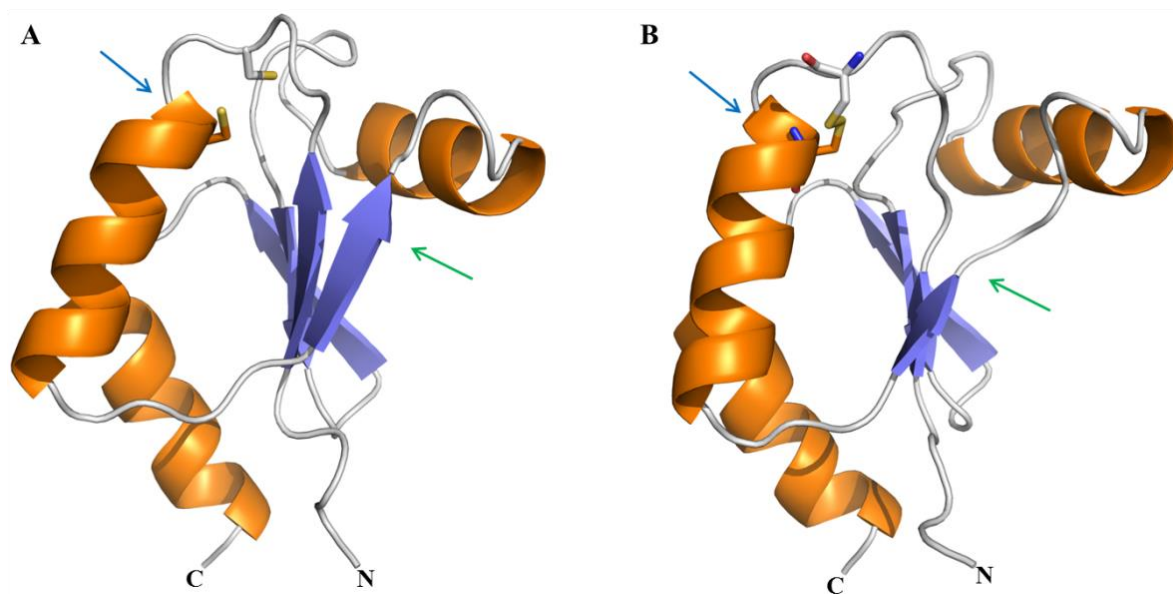


Figure S2. Structural comparison of reduced and oxidized *Cp-GrxA1* homology model. **A:** Homology model of reduced *Cp-GrxA1* based on the protein structure of reduced *M. tuberculosis* Mrx1 (PDB: 2LQO). **B:** Homology model of reduced *Cp-GrxA1* based on the protein structure of oxidized *M. tuberculosis* Mrx1 (PDB: 2LQQ). The arrows label the protein regions where changes in α -helix and β -sheet can be observed between the reduced and oxidized states.

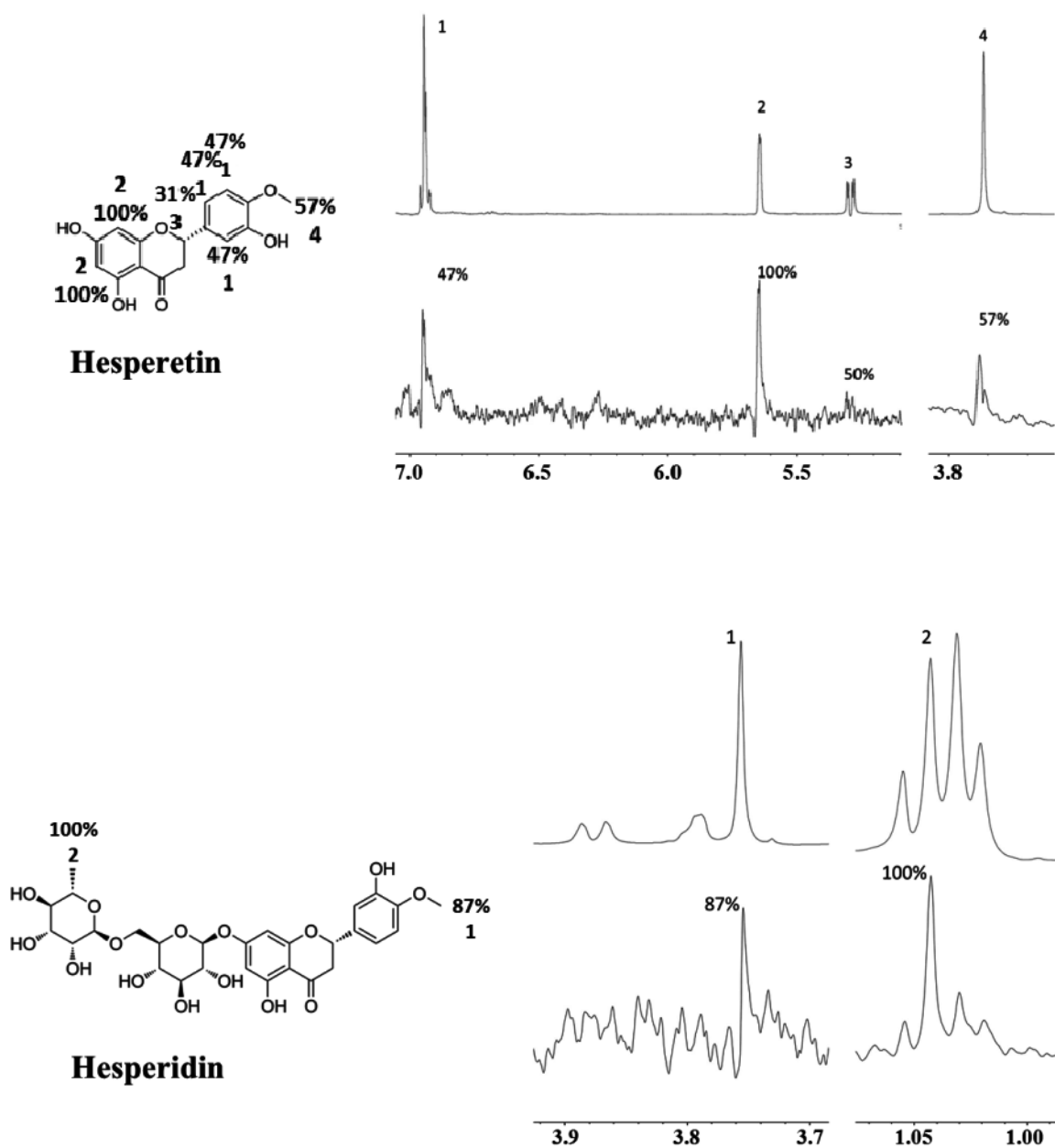


Figure S3. NMR results for Cp-GrxA1 with Hst and Hsp. NMR spectrum and mode of interaction are shown and the relative STD amplification factors.

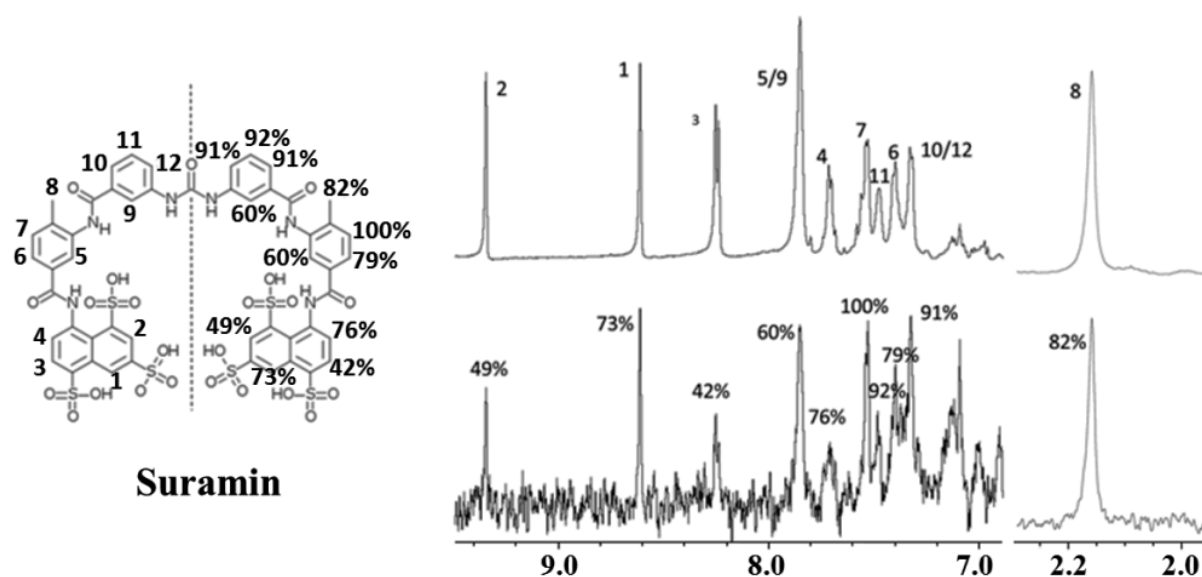


Figure. S4. NMR results for *Cp-GrxA1* with suramin. NMR spectrum and mode of interaction are shown and the relative STD amplification factors.

Table S1. Results of the insulin reductase assay of *Cp-GrxA1*, expressed as mean value and the corresponding standard deviation of the activity and inhibition experiments.

Protein	Redox agent	Activity mean [%]	Standard deviation
Grx	DTT	100	± 0.9
Grx	GSH	36	± 6.0
Grx	ESH	88	± 2.0
Grx	CoA	20	± 5.2
Grx	Diamide	4	± 0.5
Protein	Ligands	Inhibition mean [%]	Standard deviation
Grx	Suramin	87	± 3.7
Grx	Heparin	93	± 2.0
Grx	Hsp	86	± 1.9
Grx	Hst	72	± 5.4

Table S2. Convolution of the CD results of *Cp*-GrxA1.

	α -helix (%)	β -sheet (%)	turn (%)	coil (%)
<i>M. tuberculosis</i> Mrx1 (pdb: 2LQO)	34	17		
Grx (<i>C. pseudotuberculosis</i>)	37	15	19	29
Grx+DTT	37	15	18	30
Grx+GSH	37	15	18	30
Grx+ESH	32	20	20	28
Grx+CoA	37	15	18	30
Grx+diamide	40	14	18	28
Grx+suramin	33	15	22	30
Grx+heparin	33	13	22	32
Grx+Hst	30	10	20	40
Grx+Hsp	35	9	21	35
Grx pH 7.0	30	22	20	28
Grx pH 7.4	31	20	21	28
Grx pH 7.8	30	20	21	29
Grx pH 8.0	33	17	21	29
Grx pH 8.4	33	17	21	29
Grx pH 8.8	36	15	20	30
Grx pH 9.0	37	15	19	29

RESEARCH ARTICLE

Cold Shock Protein A from *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Role of Electrostatic Forces in the Stability of the Secondary Structure

Monika A. Coronado^{a,b}, Icaro P. Caruso^b, Vinícius M. de Oliveira^b, Vinícius G. Contessoto^b,
Vitor B.P. Leite^b, Liege A. Kawai^{a,b}, Raghuvir K. Arni^{a,b} and Raphael J. Eberle^{a,b,*}

^aMultiuser Center for Biomolecular Innovation, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São Jose do Rio Preto-SP, 15054-000, Brazil; ^bDepartment of Physics, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São Jose do Rio Preto-SP, 15054-000, Brazil

Abstract: The conformational stability of the Cold shock protein A (CspA) from *C. pseudotuberculosis* (Cp), a nucleic acid binding protein in function of pH and salt concentration was examined by using differential scanning calorimetry and CD spectroscopy in combination with computational analysis to identify the specific amino acids undergoing change. Our approach identified a sodium-binding site in CpCspA and at pH 8.0 a significant reduction in the β -sheet content was observed which resulted in a decrease of the protein thermal stability. The computational analyses identified His30 and His65 as the amino acids with the largest charge shifts at different pHs. His30/His65 are part of the extensive hydrogen bonding network and along with the ion-binding site are essential for the conformational stability of CspA.

ARTICLE HISTORY

Received: November 30, 2016

Revised: January 25, 2017

Accepted: January 25, 2017

DOI: 10.2174/0929866524666170207
153808

Keywords: Cold shock protein, *C. pseudotuberculosis*, ion binding, histidine, pH, secondary structure.

1. INTRODUCTION

Bacteria respond to changes in environmental parameters such as nutrient levels, oxygen availability, osmotic stress and temperature by triggering the activation of a specific set of genes that up-regulate the production of cold shock proteins (Csps) and consequently, by restricting the production of non-cold-shock proteins [1-3].

The initial phase of the cold shock response, the acclimation phase, is characterized by high levels of expression of Csp which stimulates the synthesis of other cold-stress related proteins [4, 5]. At the end of the acclimation phase the synthesis of the cold shock proteins is diminished and the levels of non-cold shock protein synthesis are reestablished [6]. The primary function of Csps involves the enhancement of DNA transcription to support the expression of other cold shock induced genes [5, 7, 8]. This is achieved by the high affinity and specificity of Csps in binding to short single-stranded DNAs [9-12]. The observed non-specific binding of Csps to ssRNA suggests that they could also function as

RNA chaperones [13] by preventing the formation of cold-induced mRNA secondary structures [14]. Both mechanisms help to preserve cell viability during the cold shock process and also in restoring normal cell functions.

Csps are encountered in a wide range of bacterial species, such as psychrophilics, mesophilics, thermophilics and hyperthermophilics and share highly conserved sequences and structural motifs. The three-dimensional structures of a number of Csps have been determined, including the *E. coli* CspA, *B. subtilis* CspB, and *B. caldolyticus* CspB, and they possess a typical β -barrel fold, consisting of a three stranded N-terminal sheet (β 1- β 2- β 3) and a two stranded C-terminal sheet (β 4- β 5). Csps contain two nucleic acid binding motifs (RNP1 and RNP2) consisting mainly of aromatic and basic amino acid residues that participate in the binding to single-stranded nucleic acids [15-18].

Despite the high degree of conservation of Csps sequences and principal structural motifs, the thermal stability of these proteins varies significantly; the *E. coli* CspA unfolds at 60 °C [16, 19], whereas the *B. subtilis* CspB unfolds at 52 °C [10]. The melting temperature (T_m) of the thermophilic *B. caldolyticus* Csp is 77 °C [17], twenty-five degrees higher than the T_m of *B. subtilis* CspB, and the reversible unfolding process is a monomolecular (N) $\leftrightarrow$ unfolded (U) two state reaction [20]. Theoretical and experimental investigations on the thermal stability of Csps have examined the role of point mutations [21], variations of salt concentration [17, 22] and pH [23, 24].

Mycobacterium, Nocardia, and Rhodococcus, a cluster of gram-positive bacteria species [25]. *C. pseudotuberculosis* is the causative agent of caseous lymphadenitis (CLA), a disease encountered in sheep, goats, and equids (ulcerative lymphangitis) and cattle (cutaneous excoriated granulomas) which results in drastically reduced yields of wool and milk,

*Address correspondence to this author at the Multiuser Center for Biomolecular Innovation, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rua Cristóvão Colombo 2265, São Jose do Rio Preto-SP, 15054-000, Brazil; Tel/Fax: +55-17-32212707, +55-17-32212247; E-mail: eberleraphael@gmail.com



weight loss and carcass condemnation thus resulting in considerable economic loss [26, 27]. Only isolated cases of human infection have been reported [28]. As a facultative intracellular parasite, this bacterium is capable of survival and growth in macrophages and is able to evade recognition by the host's immune system [29]. Although *C. pseudotuberculosis* is a mesophilic bacterium that grows optimally at 37

°C, its genome presents csp genes, coding for cold shock proteins (Csp) and we have previously reported the expression, purification and characterization of *C. pseudotuberculosis* CpCspA [30].

Circular dichroism spectroscopy (CD) and differential scanning calorimetry (DSC) combined with computational analysis have been utilized to analyze the secondary structural variations and thermal stability in response to changes in pH and salt concentrations.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. *In silico* Analysis

Sequence alignments of Csp proteins were performed using the ClustalW2 online tool [31]. The atomic coordinates of *E. coli* CspA (PDB: 2L15) were used as the template for the comparative modeling of CpCspA (Uniprot: D9QDZ8) and also to satisfy the spatial restraints implemented in the program Modeller 9v13 [32]. The sodium binding site was modeled based on the *B. caldolyticus* Csp structure (PDB: 1C9O) and the hydrogen bonds and salt bridges were predicted using the ESBRI web server [33] and PDBsum [34] respectively.

2.2. CpCspA by Recombinant Expression and Purification

CpCspA was cloned, expressed, and purified as reported earlier [30].

2.3. Circular Dichroism Spectroscopy (CD)

CD experiments were conducted using a Jasco J-701 spectropolarimeter (Jasco, USA). Far-UV spectra were measured in the 200 to 260 nm range, with a protein concentration of 20 µM and cells with 0.1 cm path lengths were used for the measurements. The baseline was determined using five scans and the average of a set of 15 repeat scans was used for the samples. To investigate the influence of pH, a protein sample was dialyzed against a 1:1000 higher volume of 50 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ in the 6.0 to 8.0 pH range.

Results are presented as molar ellipticity [θ] (mdeg cm dmol⁻¹) based on the equation:

$$[\theta]_{\lambda} = \theta / (c \cdot l \cdot n)$$

where θ represent the measured ellipticity at a given wavelength λ (in deg), c is the protein concentration (in mol/L), l the path length of the cell (in cm) and n the number of amino acids. Data were analyzed using the program CDpro [35].

2.4. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

The DSC experiments were performed using a N DSC III (TA Instruments, USA) differential scanning calorimeter in the 20 – 90

experiments, the protein concentration was 109.6 µM (1 mg/ml) in 50 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ buffer. Two experimental ranges were examined: 1) pH variation in the range from 6.0 – 8.0 in the absence of NaCl and 2) at pH 7.5 by varying the NaCl concentration from 0 – 2.0 M. Both calorimeter cells were loaded with the buffer solution, equilibrated at 20 °C for 10 min and scanned repeatedly as described earlier until the baseline was stable and reproducible. The sample cell was subsequently loaded with the protein solution and scanned using the same procedure. Baseline correction was conducted by subtracting the 'buffer vs. buffer' scan from corresponding 'protein vs. buffer' scan. The measurements were repeated twice.

For the estimation of the number of Na⁺ ions released upon protein unfolding, the following equation was used:

$$dT_m/d(\ln[a]) = -\Delta n(R \cdot T_m^2 / \Delta H(T_m))$$

where T_m is the melting temperature, [a] is the ionic activity of sodium chloride, Δn is the variation in the number of bound ions during the protein denaturation, R is the gas constant, and ΔH(T_m) is the transition enthalpy change at the transition temperature T_m [36, 37].

2.5. Computational Methods

A constant-pH molecular dynamic method [38] was utilized for the protein folding studies which combines a standard molecular dynamics simulation using a structure-based model [39, 40] coupled with the Metropolis Monte Carlo method to model the protein protonation states [41]. The simulation was conducted over a given number of molecular dynamics steps and the titratable residue was randomly chosen. The modification of its protonation state was selected based on the Metropolis criterion.

2.5.1. Ca - Structure-Based Model (Protein Folding Molecular Dynamics)

The Csp structure was modeled using a Ca - structure-based model (Ca-SBM) [39, 40]. Beads in the positions of the α-carbon atoms represent the amino acid residues. The Hamiltonian, which provides the protein energy interaction, is based on the geometry of the CpCspA homology model. In this first approach, the protein charge was not taken into consideration and the potential energy reached its minimum in the native state. The electrostatic interactions were introduced through the inclusion of charges at the centers of the beads and the interactions between any two charged groups is given by Debye-Huckel potential. The potential energy is calculated to conformation Γ relative to the native conformation Γ₀ by equation:

$$V(r, r_0) = \sum_{\text{bonds}} \epsilon_r (r - r_0)^2 + \sum_{\text{angles}} \epsilon_{\theta} (\theta - \theta_0)^2 \\ + \sum_{\text{dihedrals}} \epsilon_{\Phi} \{ [1 - \cos(\Phi - \Phi_0)] + \frac{1}{2} [1 - \cos(3(\Phi - \Phi_0))] \} \\ + \sum_{\text{contacts}} \epsilon_C [5(d_{ij}/r_{ij})^{12} - 6(d_{ij}/r_{ij})^{10}] \\ + \sum_{\text{non-contacts}} \epsilon_{NC} (\sigma_{NC}/r_{ij})^{12} \\ + \sum_{\text{electrostatics}} K_{\text{elec}} (q_i q_j \exp^{-K_r}) / r_{ij}$$

where r₀, θ₀, and Φ₀ are defined by the values of distance between two subsequent residues, angles formed by three subsequent residues and dihedral angles formed by four subsequent residues, all of them are obtained from the CpCspA

homology model. d_{ij} is the native distance between the pair contact i and j determined by CSU Software (Contact of Structural Units) [42]. The parameters are defined as $\epsilon_C=1.0$ kcal/mol, $\epsilon_r=100$ kcal/(mol Å²), $\epsilon_\theta=20$ cal/mol, $\epsilon_{NC}=1.0$ kcal/mol, $\sigma_{NC}=4.00$ Å [40, 43, 44] and $K_{\text{electrostatics}}=332$ kcal Å/(mol e²) [45]. q_i and q_j are the charges from residues i and j respectively, κ is the inverse of Debye length [46].

2.5.2. Monomer Titration (Metropolis Monte Carlo)

The Monte Carlo method was implemented to protonate or deprotonate a selected titratable residue [47]. The Metropolis criterion was adopted to determine the acceptance of the monomer's titration and the residue valences were modified (+1 0 for Arg/Lys/His and 0 -1 for Asp/Glu). The energy variation used in Metropolis criterion is given by the equation:

$$\Delta U = \Delta U_{\text{el}} + \xi k_B T \ln(10)(\text{pH} - \text{pK}_a)$$

where ΔU_{el} is the electrostatic energy variation between the charge configuration before and after the titration [46]. The constant ξ is 1 or -1 for acid and basic residues, respectively. The intrinsic pK_a values of the residues are: Asp (4.0), Glu (4.5), His (6.3), Lys (10.6) and Arg (12.0) [48] (Data A.1. shows details from this simulation and is presented in the supplementary material).

3. RESULTS AND DISCUSSIONS

3.1. Sequence analysis and molecular modeling of CpCspA

A Blast search of the CpCspA sequence performed against the atomic coordinates currently held in the Protein Data Bank (www.rcsb.org) indicated 67% identity with CspE from *S. typhimurium* (PDB: 3I2Z, Figure 1A). Csp sequence alignment through the bacterial genera highlights the conservation of the nucleotide-binding sites RNP1 and RNP2 [49] and the exposed aromatic residues that are crucial for the conformational stability of Csp [50].

The Csp structure is typically composed of five antiparallel β -strands that form a Greek-key β -barrel [15,16,18] as illustrated in Figure 1B. The numbers and lengths of β -strands in the Csp from different bacterial species as well as the number of hydrogen bonds and salt bridges varies, [18, 51-53] however, the structural core is highly conserved in the Csp protein family.

3.2. Identification of the Sodium-Binding site in CpCspA

The binding capacities of different monovalent ions such as NaCl, KCl or LiCl and their roles in the stability of Csp proteins from *B. caldolyticus* has been examined [17].

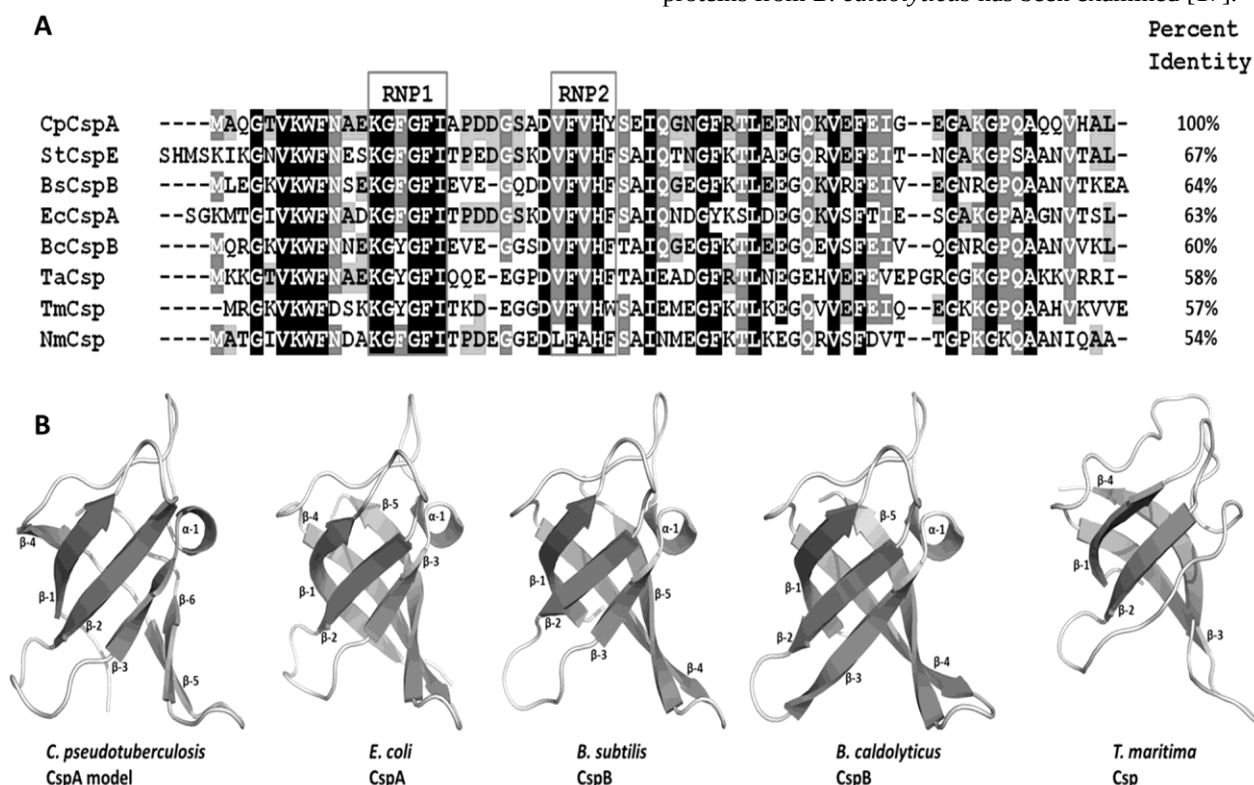


Figure 1. Sequence and structural comparison of different bacterial Csp.

(A) Sequence alignment of *C. pseudotuberculosis* CspA (GenBank: ADL09721.1), *S. typhimurium* CspE (GenBank: AE006468.1; PDB: 3I2Z), *B. subtilis* CspB (GenBank: CAA42235.1; PDB: 2I5M), *E. coli* CspA (GenBank: AAA23617.1; PDB: 2L15), *B. caldolyticus* CspB (GenBank: CAA51790.1; PDB: 1C9O), *T. aquaticus* Csp (GenBank: EED09135.1; PDB: 1MO0), *T. maritima* Csp (GenBank: AAD36750.1; PDB: 1G6P) and *N. meningitis* Csp (GenBank: AAF41249.1; PDB: 3CAM). (B) structural comparison of *C. pseudotuberculosis* CspA homology model, *E. coli* CspA and *B. subtilis* CspB (mesophilic), *B. caldolyticus* CspB (thermophilic) and *T. maritima* Csp (hyperthermophilic).

reactions since they modify the Hofmeister effects and influence water activity. These effects may alter the hydrophobic force by increasing the surface tension of the solvent and hence by stabilizing the protein conformation [22], or they may stabilize peptide dipoles through specific ionic interactions [54, 55]. Additionally, salts modify the ionic strength of the protein solution [54,56] and their stabilizing or destabilizing effects depend on the specific charge distribution within the protein [57].

To study the effect of NaCl on the thermal stability of concentrations of CspA differential scanning calorimetry (DSC) experiments were performed at several salt concentrations. To identify potential ion binding sites for CpCspA a blast search of the protein sequence against structural databases were performed. The sequences of the identified Csp hits, with ions, were compared with the CpCspA sequence.

DSC experiments indicated an increase in the T_m of CpCspA proportional to the NaCl concentration (Figure 2A). The melting points vary by 13°C NaCl between the examined concentrations.

The determination of the number of Na^+ ions released upon thermal unfolding of CspA, resulted in $\Delta n = -0.7$ which was rounded to 1 Na ion per Csp molecule (Figure 2B). Interestingly, at a concentration higher than 1.0 M NaCl, the

slope of the straight-line changes and each Csp molecule releases around 3 Na^+ ions. Proteins are stabilized by high concentrations of strongly hydrated anions [56], such as NaCl, that interact with water in the hydration shell [58] and may be released during the thermal denaturation process.

The CSP protein structure from *B. caldolyticus* (PDB: 1C9O), which possess a Na binding site in each monomer coordinated by Val20 and Gly23 [17], was encountered in the PDB database. Sequence and model comparisons between CpCspA and 1C9O showed that Val20 is replaced by Pro20 in CpCspA and that Gly23 is conserved (Figure 2C and 2D). Structural overlays of the two proteins revealed that the O1 atom of Val20, which is important for Na binding, exhibits similar bond distances as Pro20 in CpCspA Na (Figure 2D).

The interactions among Na^+ , Val20 and Gly23 observed in 1C9O may serve as a stabilizing anchor for the β -hairpin. The identification of a similar binding area in CpCspA coordinated by Gly23 and Val20 or Pro20 is negatively charged (Figure 2E), and forms the basis of interaction with the positively charged sodium ion.

3.3. Impact of pH on the Secondary Structure and Thermal Stability of CpCspA

Besides the salt concentration, the pH also plays a significant role in maintaining the ionic network and surface

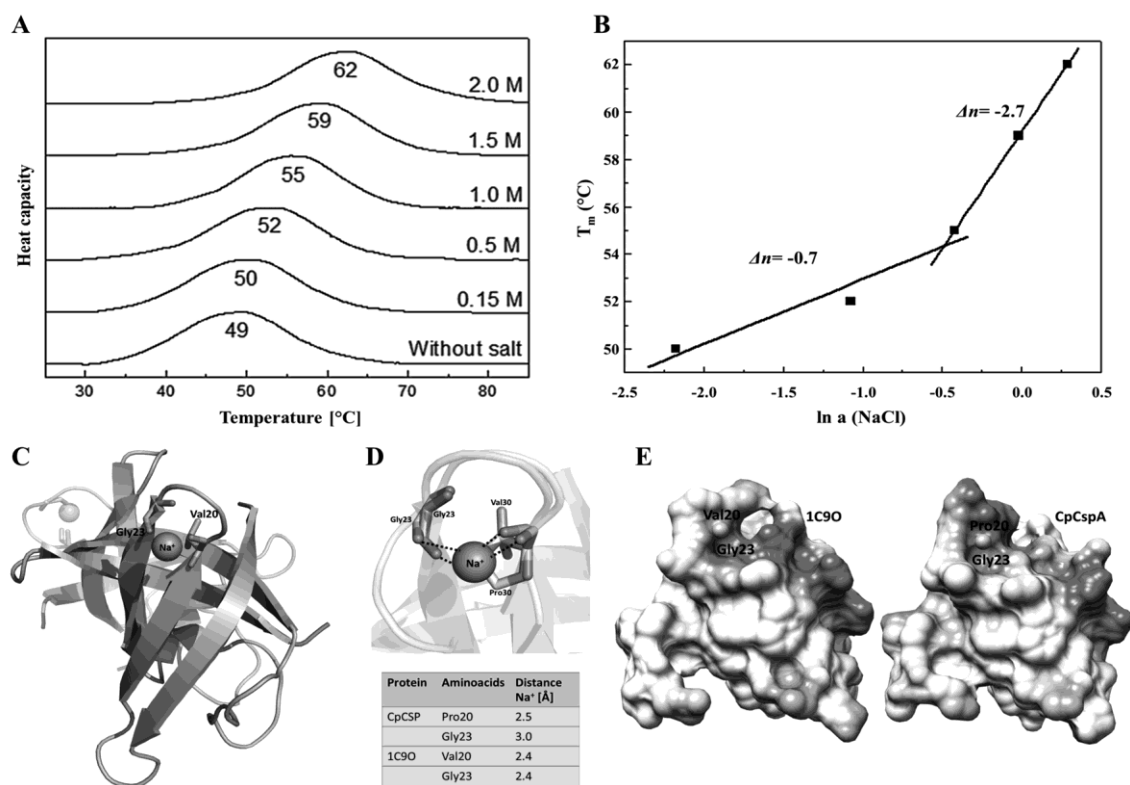


Figure 2. The influence of NaCl on the thermal stability of CpCspA and identification of a sodium-binding site in CpCspA. **(A)** Determination of T_m by increasing NaCl concentrations. **(B)** Estimation of the number of Na^+ ions released upon thermal unfolding of CspA. **(C)** *B. caldolyticus* protein structure (PDB: 1C9O), each monomer of the protein structure contains a Na^+ binding site, constructed by Val20 and Gly23. **(D)** Structural comparison of CpCspA homology model and 1C9O, zoom on the Na^+ binding area showing the ion coordination. **(E)** Coulombic surfaces of *B. caldolyticus* (1C9O) and the CpCspA homology model, Na^+ ion presented as a sphere. Negatively charged coulombic surfaces presented in dark grey, positively charged coulombic surfaces presented in grey and areas without charges are presented in light grey.

charges. Conformational changes of CpCspA by pH titrations were monitored using far-UV CD spectroscopy (260–200 nm). The CD spectrum exhibits the CpCspA typical maxima at 222 nm and the minima at 205 nm (Figure 3A) which are in agreement with the results obtained by Lindae *et al.* [30] and for CpCspA by Mueller *et al.* [17].

The results of the pH changes on the surface electrostatic interactions and their stabilizing effects using CD and DSC experiments are presented in Figure 3.

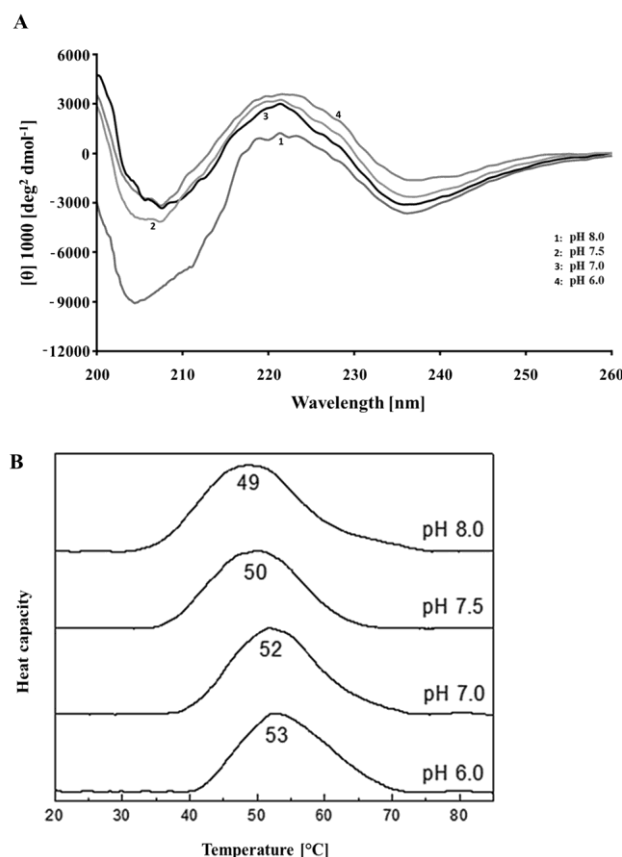


Figure 3. Biophysical investigation of CpCspA in different pHs. (A) far-UV CD spectrum of CspA from 200 to 260 nm wavelength; pH from 8.0 to 6.0 dialyzed for 24h. (B) DSC thermogram of CpCspA, indicating a reduction in T_m while increasing pH.

The results of the CD experiments indicate significant changes in the secondary structure of CpCspA at pH 8.0. Analysis of the CD results using the CDpro program [35] indicated a reduction of the β -strand content by about 30 % compared with the secondary structure composition of the protein at pH 6.0 (Figure 3A). CpCspA secondary structure contents for all tested pHs are summarized in Table A.1. in the supplementary material.

A pH shift affects the electrostatic interactions that stabilize the protein structure, especially the charges on ionizable groups and peptide dipoles [59]. Examples of these groups in proteins are α -carboxyl, aspartic acid, glutamic acid, histidine, α -amino, cysteine, tyrosine, lysine, and arginine residues [60]. The ionization states of these amino acids influence peripheral ion clusters, salt bridges, intramolecular ion pairing and the lengths of the β -strands.

To examine the influence of pH on CpCspA stability, thermal unfolding experiments and T_m determinations were performed at different pHs by DSC and indicated an increase of CpCspA T_m from 49 °C (pH 8.0) to 53 °C (pH 6.0) (Figure 3B), which is in agreement with the results obtained by CD experiments.

The decrease on β -strand contents at pH 8.0 results in reduced stability of CpCspA. Variations in β -sheet lengths may play a critical role in the thermal stability of CspA especially from thermophilic bacteria [61].

The pH influence on the CpCspA homology model was computationally simulated and several simulations were carried out at pH 8.0, 7.0, 6.0. Additionally, a control experiment with the protein model without any charges was performed. The thermal stability for all these systems was evaluated by comparing the heat capacity, C_v (Figure 4A) and indicated a significant change in the value of the C_v peak, corresponding to the folding transition temperature (TF). The CpCspA model without charges exhibited the lowest TF and, consequently, the lowest thermal stability. The presence of charged groups indicates enhanced stability of CpCspA, at the pHs tested. The charged model presented the lowest thermal stability at pH 8.0 and the highest thermal stability at pH 6.0. Quantitatively, the TF values in reduced units are 1.081, 1.078 and 1.073 for pH 6.0, 7.0, and 8.0, respectively. This represents a decrease of ~ 1 K for pH 7.0 and ~ 4 K for pH 8.0 when comparing both individually with pH 6.0. The theoretical model results regarding the thermal stability under the influence of different pHs are in good agreement with our results obtained from the DSC and CD experiments. The corresponding free energy changes $F(Q)$ as functions of the total native fraction contacts Q and energy barriers between the folded (N) and unfolded (U) state of the CpCspA model are presented in Figure 6B. Interestingly, the protein at pH 8.0 forms an intermediate state (I) which does not appear in pH 7.0, 6.0 or in the model without charges, but the shoulders in the curves are observed (Figure 4B) and can possibly correspond to very rapidly formed intermediate states.

As demonstrated by previous simulation experiments of *B. subtilis* CspB, the protein follows a rapid two-state folding mechanism after thermal or chemical unfolding with a highly unstable intermediate state [20,61]. Such intermediate state is observed in the computational analysis for CpCspA at pH 8.0 (Figure 4B and 5B). CpCspA at pH 8.0 possesses decreased thermal stability and structural compactness as shown before by CD and DSC experiments.

A comparison of the electrostatic energy distribution of CpCspA at different pHs indicates a more negative average value for pH 6.0 than for pHs 7.0 and 8.0 (Figure 5A). Thus, the charge-charge interaction contributes to the higher stability of the protein at pH 6.0. At pH 8.0 three peaks are present, whereas at pH 7.0 and 6.0 only two peaks are evident, and the comparison between the highest peaks for each pH (highlighted by dotted lines) indicated a change of $\sim 2\epsilon c$ in the electrostatic energy between pHs 6.0 and 7.0 and $\sim 3\epsilon c$ between pHs 6.0 and 8.0. The distribution of the electrostatic energy as a function of Q was plotted in a two dimensional map to evaluate the charge-charge interaction and their effects of each folding stage for pHs 8.0, 7.0 and 6.0 (Fig. 5B-D, respectively).

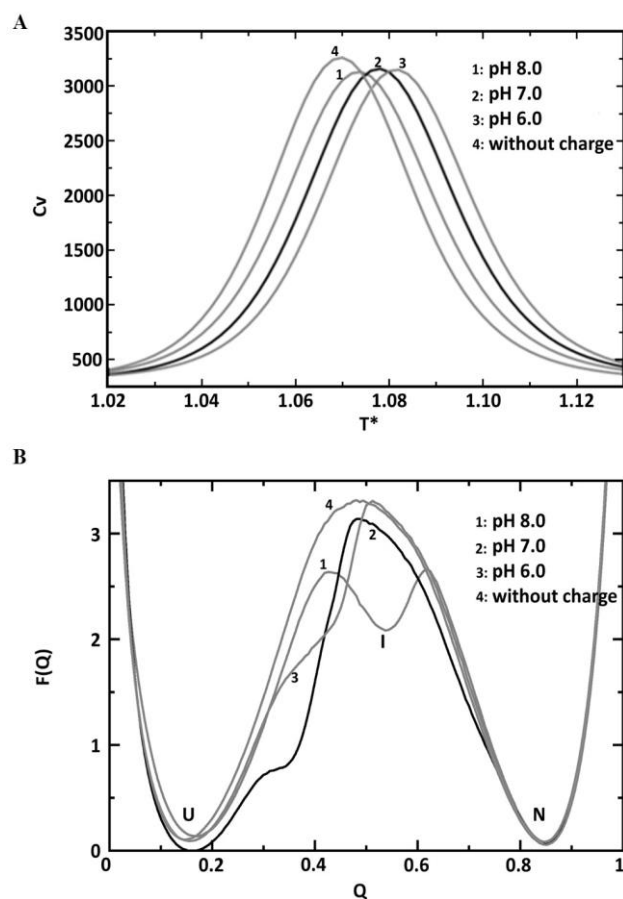


Figure 4. Thermodynamic properties of CpCspA at different pHs. (A) Heat capacity (C_v) at constant volume as function of temperature in reduced units (T^*) for three different pHs and a system without charges. (B) Free energy curves as function of the reaction coordinate Q (fraction

The I state of the protein at pH 8.0 was not observed either at pH 6.0 or at 7.0 (Figure 5A). At pH 7.0 and 8.0 the N state of the protein is present in two different regions of the 2D map.

These differences in the energetic group in the same Q are caused by the probability of higher ionization of specific residues at these pHs and depending on their protonation. Nevertheless, at all pHs examined, in the N state of the protein the electrostatic energy is more negative compared to the U states of these amino acids, resulting in a less stable N state of the protein, even showing lower electrostatic energy in the I state at pH 8.0. The highest energetic difference between the N state and the U state occurs at pH 6 (almost $\sim 2\epsilon_c$), mostly because the N state at this pH presents only one highly populated electrostatic energy level. These electrostatic features result in the highest CpCspA stability at pH 6.0, when compared to the pHs 7.0 and 8.0, also evaluated.

The results of the CD, DSC experiments and computational analysis indicate that the pH of the protein solution has a very strong influence on the CpCspA secondary structure and thermal stability.

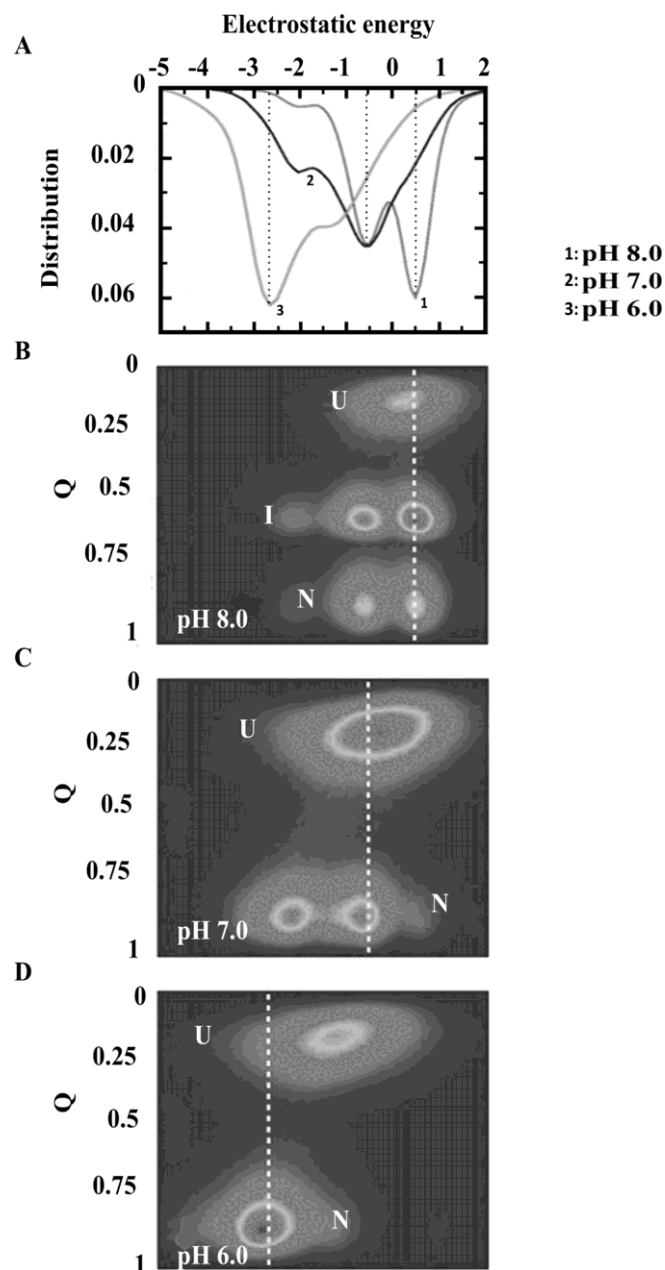


Figure 5. Electrostatic energy of CpCspA at different pHs. (A) Distribution of the electrostatic energy in the reduced unit ϵ_c for three different pHs. (B,C,D) Two-dimensional map of the electrostatic energy as functions of the reaction coordinate Q for pHs 8, 7 and 6, respectively. The map represents the distribution probability of the electrostatic energy and Q , normalized by its highest value. All the systems with $T \sim TF$.

3.4. His30 and His65 in CpCspA are pH-Sensitive and Advance the Structural Change?

pH variation in protein solutions affects the charges on ionizable groups of the proteins [60]. The observed destabilization at pH 8.0 and stabilization at pH 6.0 for CpCspA indicates the participation of an amino acid with a pK_a value in this pH range, with a stabilizing/destabilizing affect for the protein. The only amino acid with a pK_a value within this

pH range is histidine (~6.5) [60]. The importance of histidine residues in pH-induced conformational transitions of proteins was described in various examples [61–63].

The CpCspA sequence contains two histidines, His30 and His65. His30 is conserved and is a constituent of the RNP2 region and part of the β strand 3 in the protein homology model. In contrast to His65, which is present only in CpCspA; the only other Csp that contains a histidine in this region is *T. maritima* (His61).

The computational analysis indicated that three amino acid residues undergo significant changes in their charge in response to pH variations (Table A.1. in the supplementary material presents a list of all charges of the investigated amino acids). The C α of the N terminal Met, His30 and

His65 showed a charge change, in which the strongest influence was observed for His30 and His65 at pH 8.0; at this pH these amino acids are uncharged (Figure 6). Figure 6 shows that the conserved histidine residues in the Csp family undergo charge changes at different pHs. Especially at pH 8.0, the residue charges are near 0.0 and at pH 6.0 the largest charge modification was observed.

A hydrogen bond between His65 and Glu49 was detected in the CpCspA model using the PDBsum online database [34] as a tool, but during a pH change the His65-Glu49 bond is most likely to rupture. Additionally, computational analysis showed that His65 has the potential to participate in an electrostatic interaction, especially at pH 7.0, which appears to be the highest charge change. His30 is conserved in the Csp family and forms the C-terminal end of β -strand 3 (Figure 7A), and an online tool to predict salt bridges [33] indicated that His30 enables the formation of a salt bridge with Glu33 (Figure 7B).

The His30-Glu33 salt bridge is unique for CpCspA. The amino acid Glu33 is replaced to alanine residues in CSP structures (Figure 7D). As consequence of the pH change,

His30-Glu33 salt bridge is absent resulting in destabilization of CpCspA. Computational analysis showed that the His30 residue is involved in an electrostatic interaction, and most likely with Glu33, (Figure A.1. is deposited in supplementary material). His30 and His65 of CpCspA are pH sensitive and during a shift from pH 6.0 to pH 8.0, the charge of the amino acids changes. His65 is not conserved within the Csp family and is located in the C-terminal part of CpCspA (Figure 7A). However, in the sequence of *T. maritima* Csp (PDB: 1G6P), a histidine is present in the C-terminal region of the protein (His61), which is part of the long β -strand 4 (Figure 7A). In 1G6P, His61 forms a salt bridge with Glu49, being the distance between both residues lower than 3 Å (Figure 7C).

CONCLUSION

The amount of specific secondary structure elements, like beta strands, and ionic networks on the protein surface has a crucial importance for the thermal stability of Csp family proteins. However, little is known about changes in amino acid charges and their effect on the thermal stability from CpCspA.

We present the influence of pH and NaCl concentration on the secondary structure and thermal stability of CpCspA. Our approach predicted one sodium-binding site in CpCspA.

At pH 8.0 CD spectroscopy experiments indicated a loss in the β -strand content, therefore being described for the first time in this protein family. Additionally, thermal unfolding experiments and computational analysis showed that at pH 8.0 the protein remains in a low stability.

Significant charge-changes of His30 and His65 were identified by computational analysis and showed an enormous effect on the protein thermal stability in these experiments.

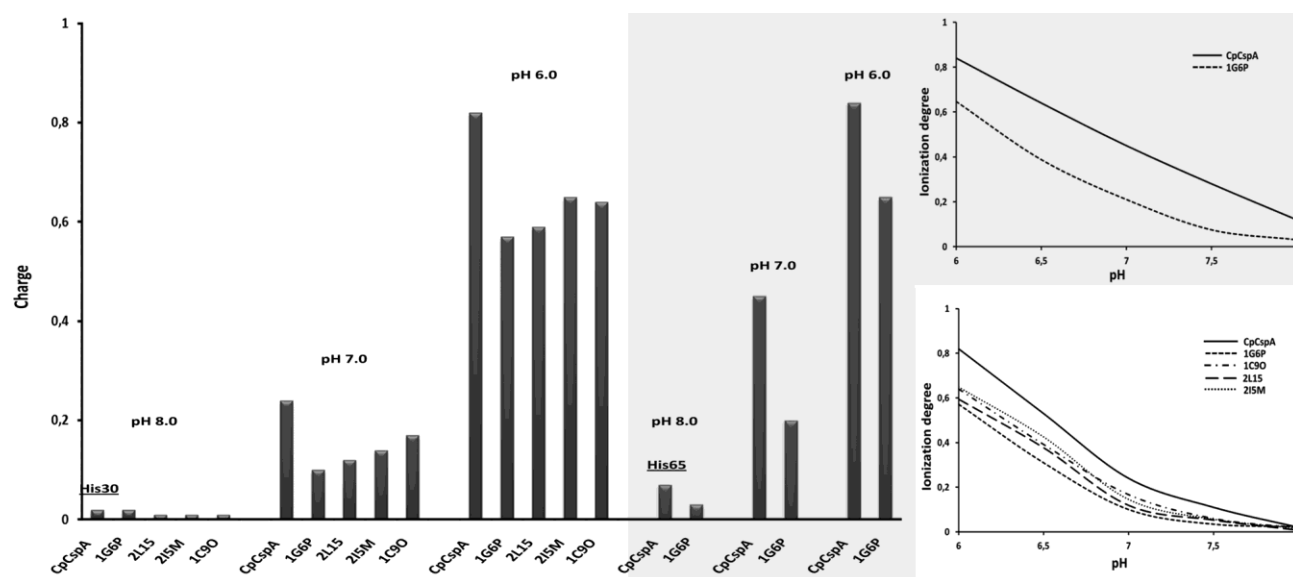


Figure 6. Charges of the histidine residues of Csp proteins from different species in different pHs. The changes in the charge of His30 and His65 of CpCspA, His28 and His61 of Csp from *T. maritima* (PDB: 1G6P), His33 of CspA from *E. coli* (PDB: 2L15), His29 of CspB from *B. subtilis* (PDB: 2I5M) and His29 of CspB from *B. caldolyticus* (PDB: 1C90) were observed. At pH 8 the charge of the histidine residues is near 0.0 and the maximum charge reached at pH 6.0.

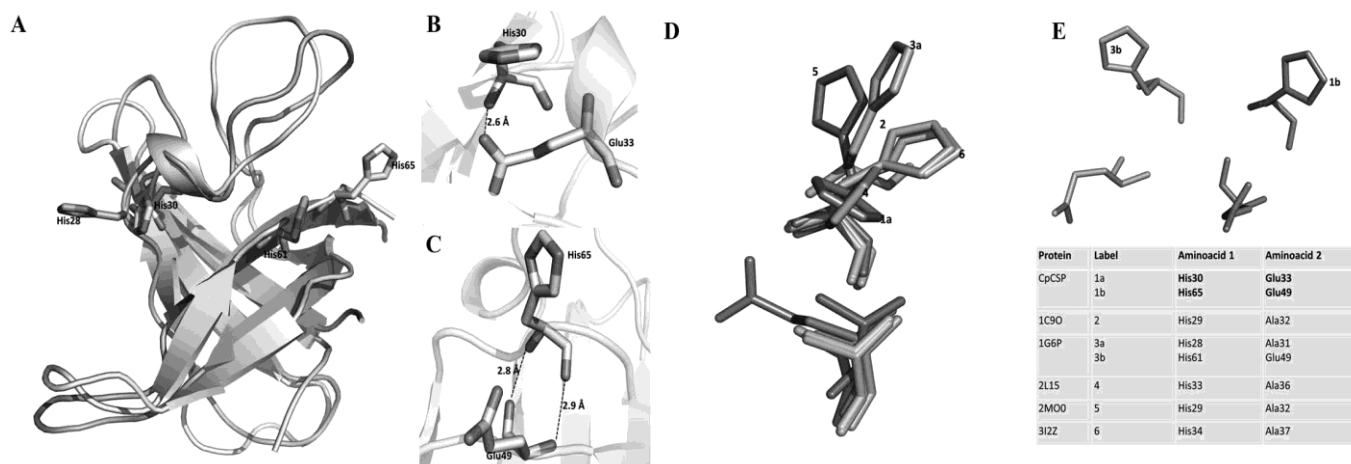


Figure 7. Position of the histidine residues in Csp family structures. **(A)** Structural comparison of the CpCspA homology model and the Csp of *T. maritima* (1G6P), the positions of the histidine residues highlighted as sticks. **(B)** Detail view of the predicted His30-Glu33 salt bridge. **(C)** Detail view of the predicted His65-Glu49 salt bridge. **(D)** Overlay of the conserved His30 of the Csp family and Glu33 of CpCspA and the alanine residues in homolog structures. **(E)** Overlay of the His61, Glu49 region from 1G6P (left) and the His65, Glu49 region from CpCspA (right).

LIST OF ABBREVIATIONS

CLA	=	Caseous lymphadenitis
CD	=	Circular dichroism spectroscopy
DSC	=	Differential scanning calorimetry
T _m	=	Melting temperature
C _v	=	Heat capacity
TF	=	Folding transition temperature,
N	=	Folded state
U	=	Unfolded state
I	=	Intermediate state

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by grants from the CNPq (Science without Frontiers), FAPESP and CAPES. The authors want to thanks the PROPe UNESP. The authors would like to thank Sidney Jurado de Carvalho and Leandro Cristante de Oliveira for the helpful discussions. RJE is funded by FAPESP (2016/08104-8), VBPL was funded by FAPESP (2014/06862-7) and CNPq (Grants 442352/2014-0, 2532/002/14-PROPe/CDC). We also thank the Center of Scientific Computing (NCC/GridUNESP) of São Paulo State University (UNESP) for computational resources.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is available on the publishers Web site along with the published article.

REFERENCES

- [1] Hébraud, M.; Potier, P. Cold shock response and low temperature adaptation in psychrotrophic bacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **1999**, *1*, 211-219.
- [2] Yamanaka, K. Cold shock response in *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **1999**, *1*, 193-202.
- [3] Cavicchioli, R.; Thomas, T.; Curmi, P.M. Cold stress response in Archaea. *Extremophiles*, **2000**, *4*, 321-331.
- [4] Jones, P.G.; van Bogelen, R.A.; Neidhardt, F.C. Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **1987**, *169*, 2092-2095.
- [5] Jones, P.G.; Krah, R.; Tafuri, S.R.; Wolffe, A.P. DNA gyrase, CS7.4, and the cold shock response in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **1992**, *174*, 5798-5802.
- [6] Horn, G.; Hofweber, R.; Kremer, W.; Kalbitzer, H.R. Structure and function of bacterial cold shock proteins. *Cell. Mol. Life. Sci.*, **2007**, *64*, 1457-1470.
- [7] La Teana, A.; Brandi, A.; Falconi, M.; Spurio, R.; Pon, C.L.; Gualerzi, C.O. Identification of a cold shock transcriptional enhancer of the *Escherichia coli* gene encoding nucleoid protein H-NS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1991**, *88*, 10907-10911.
- [8] Brandi, A.; Pon, C.L.; Gualerzi, C.O. Interaction of the main cold shock protein CS7.4 (cspa) of *Escherichia coli* with the promoter region of hns. *Biochimie*, **1994**, *76*, 1090-1098.
- [9] Lopez, M.M.; Yutani, K.; Makhatadze, G.I. Interactions of the major cold shock protein of *Bacillus subtilis* CspB with single-stranded dna templates of different base composition. *J. Biol. Chem.*, **1994**, *274*, 33601-33608.
- [10] Max, K.E.; Zeeb, M.; Bienert, R.; Balbach, J.; Heinemann, U. T-rich dna single strands bind to a preformed site on the bacterial cold shock protein Bs-CspB. *J. Mol. Biol.*, **2006**, *360*, 702-714.
- [11] Lopez, M.M.; Makhatadze, G.I. Major cold shock proteins, cspa from *Escherichia coli* and csb from *Bacillus subtilis*, interact differently with single-stranded dna templates. *BBA-Protein Struct. M.*, **2000**, *1479*, 196-202.
- [12] Morgan, H.P.; Estibeiro, P.; Wear, M.A.; Max, K.E.; Heinemann, U.; Cubeddu, L.; Gallagher, M.P.; Sadler, P.J.; Walkinshaw, M.D. Sequence specificity of single-stranded DNA-binding proteins: a novel DNA microarray approach. *Nucleic Acids Res.*, **2007**, *35*, e75.
- [13] Jiang, W.; Hou, Y.; Inouye, M. CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, 196-202.
- [14] Higgs, P.G. RNA secondary structure: physical and computational aspects. *Q. Rev. Biophys.*, **2000**, *33*, 199-253.

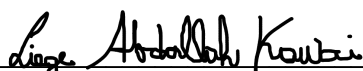
- [15] Schindelin, H.; Marahiel, M.A.; Heinemann, U. Universal nucleic acid-binding domain revealed by crystal structure of the *B. subtilis* major cold-shock protein. *Nature*, **1993**, *364*, 164-168.
- [16] Schindelin, H.; Jiang, W.; Inouye, M.; Heinemann, U. Crystal structure of CspA, the major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, *91*, 5119-5123.
- [17] Mueller, U.; Perl, D.; Schmid, F.X.; Heinemann, U. Thermal stability and atomic-resolution crystal structure of the *Bacillus caldolyticus* cold shock protein. *J. Mol. Biol.*, **2000**, *297*, 975-988.
- [18] Schnuchel, A.; Wiltschek, R.; Czisch, M.; Herrler, M.; Willmsky, G.; Graumann, P.; Marahiel, M.; Holak, T.A. Structure in solution of the major cold-shock protein from *Bacillus subtilis*. *Nature*, **1993**, *364*, 169-171.
- [19] Newkirk, K.; Feng, W.; Jiang, W.; Tejero, R.; Emerson, S.D.; Inouye, M.; Montelione, G.T. Solution NMR structure of the major cold shock protein (CspA) from *Escherichia coli*: identification of a binding epitope for DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, *91*, 5114-5118.
- [20] Perl, D.; Welker, C.; Schindler, T.; Schröder, K.; Marahiel, M.A.; Jaenicke, R.; Schmid, F.X. Conservation of rapid two-state folding in mesophilic, thermophilic and hyperthermophilic cold shock proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **1998**, *5*, 229-235.
- [21] Perl, D.; Mueller, U.; Heinemann, U.; Schmid, F.X. Two exposed amino acid residues confer thermostability on a cold shock protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2000**, *7*, 380-383.
- [22] Dominy, B.N.; Perl, D.; Schmid, F.X.; Brooks, C.L. The effects of ionic strength on protein stability: the cold shock protein family. *J. Mol. Biol.*, **2002**, *319*, 541-554.
- [23] Wassenberg, D.; Welker, C.; Jaenicke, R. Thermodynamics of the unfolding of the cold-shock protein from *Thermotoga maritima*. *J. Mol. Biol.*, **1999**, *289*, 187-193.
- [24] Makhatadze, G.I.; Marahiel, M.A. Effect of pH and phosphate ions on self-association properties of the major cold-shock protein from *Bacillus subtilis*. *Protein Sci.*, **1994**, *3*, 2144-2147.
- [25] Dorella, F.A.; Pacheco, L.G.C.; Oliveira, S.C.; Miyoshi, A.; Azevedo, V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet. Res.*, **2006**, *37*, 201-218.
- [27] Paton, M.W.; Rose, I.R.; Hart, R.A.; Sutherland, S.S.; Mercy, A.R.; Ellis, T.M.; Dhaliwal, J.A. New infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* reduces wool production. *Aust. Vet. J.*, **1994**, *71*, 47-49.
- [28] Ayers, J.L. Caseous lymphadenitis in goats and sheep: a review of diagnosis, pathogenesis, and immunity. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **1977**, *171*, 1251-1254.
- [29] Peel, M.M.; Palmer, G.G.; Stacpoole, A.M.; Kerr, T.G. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. *Clin. Infect. Dis.*, **1997**, *24*, 185-191.
- [30] McKean, S.; Davies, J.; Moore, R. Identification of macrophage induced genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by differential fluorescence induction. *Microbes Infect.*, **2005**, *7*, 1352-1363.
- [31] Lindae, A.; Eberle, R.J.; Caruso, I.P.; Coronado, M.A.; de Moraes, F.R.; Azevedo, V.; Arni, R.K. Expression, purification and characterization of cold shock protein A of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Protein Expres. Purif.*, **2015**, *112*, 15-20.
- [32] Larkin, M.A.; Blackshields, G.; Brown, N.P.; Chenna, R.; McGettigan, P.A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I.M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J.D. Gibson, T.J.; Higgins, D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **2007**, *23*, 2947-2948.
- [33] Eswar, N.; Marti-Renom, M.A.; Webb, B.; Madhusudhan, M.S.; Eramian, D.; Shen, M.Y.; Pieper, U.; Sali, A. Comparative Protein Structure Modeling With MODELLER. *Curr. Protoc. Bioinformatics*, **2006**, *15*, 1-30.
- [34] Costantini, S.; Colonna, G.; Facchiano, A.M. ESBRI: a web server for evaluating salt bridges in proteins. *Bioinformatics*, **2008**, *3*, 137-138.
- [35] Laskowski, R.A. Enhancing the functional annotation of PDB structures in PDBsum using key figures extracted from the literature. *Bioinformatics*, **2007**, *23*, 1824-1827.
- [36] Sreerama, N.; Woody, R.W. Computation and Analysis of protein circular dichroism spectra. *Methods Enzymol.*, **2004**, *383*, 318-351.
- [37] Sturtevant, J.M. Biochemical applications of differential scanning calorimetry. *Ann. Rev. Phys. Chem.*, **1987**, *38*, 463-488.
- [38] Sanchez-Ruiz, J.M. Ligand effects on protein thermodynamic stability. *Biophysical chemistry*, **2007**, *126*, 43-49.
- [39] Contessoto, V.G.; Oliveira, V.M.; Carvalho, S.J.; Oliveira, L.C.; Leite, V.B.P. NTL9 folding in constant pH: The importance of Electrostatic interaction and pH-dependence. *J. Chem. Theory Comput.*, **2016**, *12*, 3270-3277.
- [40] Contessoto, V.G.; Lima, D.T.; Oliveira, R.J.; Bruni, A.T.; Chahine, J.; Leite, V.B.P. Analyzing the effect of homogeneous frustration in protein folding. *Proteins*, **2013**, *81*, 1727-1737.
- [41] Clementi, C.; Nymeyer, H.; Onuchic, J.N. Topological and energetic factors: what determines the structural details of the transition state ensemble and "en-route" intermediates for protein folding? An investigation for small globular proteins. *J. Mol. Biol.*, **2000**, *298*, 937-953.
- [42] Mongan, J.; Case, D.A.; McCammon, J.A. Constant pH molecular dynamics in generalized Born implicit solvent. *J. Comput. Chem.*, **2004**, *25*, 2038-2048.
- [43] Sobolev, V.; Sorokine, A.; Prilusky, J.; Abola, E.E.; Edelman, M. Automated analysis of interatomic contacts in proteins. *Bioinformatics*, **1999**, *15*, 327-332.
- [44] De Mendonça, M.R.; Rizzi, L.G.; Contessoto, V.; Leite, V.P.B.; Alves, N.A. Inferring a weighted elastic network from partial unfolding with coarse-grained simulations. *Proteins*, **2014**, *82*, 119-129.
- [45] Koga, N.; Takada, S. Roles of native topology and chain-length scaling in protein folding: a simulation study with a Go-like model. *J. Mol. Biol.*, **2001**, *313*, 171-180.
- [46] Tzul, F.O.; Schweiker, K.L.; Makhatadze, G.I. Modulation of folding energy landscape by charge-charge interactions: Linking experiments with computational modeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2015**, *112*, e266.
- [47] Ullner, M.; Woodward, C.E.; Jönsson, B. A Debye-Hückel theory for electrostatic interactions in proteins. *J. Chem. Phys.*, **1996**, *105*, 2056-2065.
- [48] Baptista, A.M.; Teixeira, V.H.; Soares, C.M. Constant-pH molecular dynamics using stochastic titration. *J. Chem. Phys.*, **2002**, *117*, 4184-4200.
- [49] Fersht, A. Enzyme Structure and Mechanism, 2nd edn.; W.H. Freeman: New York, **1984**.
- [50] Schröder, K.; Graumann, P.; Schnuchel, A.; Holak, T.A.; Marahiel, M.A. Aromatic and basic residues in binding of single-stranded DNA containing the Y box motif. *Mol. Microbiol.*, **1995**, *16*, 699-708.
- [51] Schindler, T.; Perl, D.; Graumann, P.; Sieber, V.; Marahiel, M.A.; Schmid, F.X. Surface-exposed phenylalanines in the RNP1/RNP2 motif stabilize the cold-shock protein CspB from *Bacillus subtilis*. *Proteins*, **1998**, *30*, 401-406.
- [52] Jin, B.; Jeong, K.W.; Kim, Y. Structure and flexibility of the thermophilic cold-shock protein of *Thermus aquaticus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2014**, *451*, 402-407.
- [53] Kremer, W.; Schuler, B.; Harrieder, S.; Geyer, M.; Gronwald, W.; Welker, C.; Jaenicke, R.; Kalbitzer, H.R. Solution NMR structure of the cold shock protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Eur. J. Biochem.*, **2001**, *268*, 2527-2539.
- [54] Chatterjee, S.; Jiang, W.; Emerson, S.D.; Inouye, M. The backbone structure of the major cold-shock protein CS7.4 of *Escherichia coli* in solution includes extensive beta-sheet structure. *J. Biochem.*, **1993**, *114*, 663-669.
- [55] Record, Jr. M.T.; Zhang, W.; Anderson, C.F. Analysis of effects of salts and uncharged solutes on protein and nucleic acid equilibria and processes: a practical guide to recognizing and interpreting polyelectrolyte effects, Hofmeister effects, and osmotic effects of salts. *Adv. Protein Chem.*, **1998**, *51*, 281-353.
- [56] Baldwin, R.L. How Hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophys. J.*, **1996**, *71*, 2056-2063.
- [57] von Hippel, P.H.; Wong, K.Y. Neutral salts: the generality of their effects on the stability of macromolecular conformations. *Science*, **1964**, *145*, 577-580.
- [58] Kohn, W.D.; Kay, C.M.; Hodges, R.S. Salt effects on protein stability: two-stranded alpha-helical coiled-coils containing inter- or intrahelical ion pairs. *J. Mol. Biol.*, **1997**, *267*, 1039-1052.
- [59] Zhao, L.; Ma, K.; Yang, Z. Changes of water hydrogen bond network with different externalities. *Int. J. Mol. Sci.*, **2015**, *16*, 8454-8489.
- [60] Huang, L.; Shakhnovich, E.I. Is there an en route folding intermediate for cold shock proteins? *Protein Sci.*, **2012**, *21*, 677-68

- [61] D'Auria, G.; Esposito, C.; Falcigno, L.; Calvanese, L.; Iaccarino, E.; Ruggiero, A.; Pedone, C.; Pedone, E.; Berisio, R. Dynamical properties of cold shock protein A from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2010**, *402*, 693-698.
- [62] Karshikov, A.D.; Engh, R.; Bode, W.; Atanasov, B.P. Electrostatic interactions in proteins: Calculations of the electrostatic term of free energy and the electrostatic potential field. *Eur. Biophys. J.*, **1989**, *17*, 287-297.
- [63] Thurlkill, R.L.; Grimsley, G.R.; Scholtz, J.M.; Pace, C.N. pK values of the ionizable groups of proteins. *Protein Sci.*, **2006**, *15*, 1214-1218.
- [64] Armstrong, K.M.; Baldwin, R.L. Charged histidine affects alpha-helix stability at all positions in the helix by interacting with the backbone charges. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, *90*, 11337-11340.

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 13/12/2017.

A handwritten signature in black ink, reading "Diego Abdullah Koubi", is written over a horizontal line.

Assinatura do autor