

Giovanna Tavares Jeronymo

**Estudo da interação da Proteína Repressora de Arginina (ArgR) de
Clostridium botulinum, *Porphyromonas gingivalis*, *Nocardia farcinica* e
Corynebacterium pseudotuberculosis com possíveis ligantes**



Giovanna Tavares Jeronymo

Estudo da interação da Proteína Repressora de Arginina (ArgR) de *Clostridium botulinum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Nocardia farcinica* e *Corynebacterium pseudotuberculosis* com possíveis ligantes

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre 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”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Barros Mariutti

São José do Rio Preto
2021

J56e

Jeronymo, Giovanna Tavares

Estudo da interação da proteína repressora de arginina (ArgR) de *Clostridium botulinum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Nocardia farcinica* e *Corynebacterium pseudotuberculosis* com possíveis ligantes / Giovanna Tavares Jeronymo. -- São José do Rio Preto, 2021

95 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Ricardo Barros Mariutti

1. Arginina. 2. Aminoácidos. 3. Ligantes. I. Título.

Giovanna Tavares Jeronymo

Estudo da interação da Proteína Repressora de Arginina (ArgR) de *Clostridium botulinum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Nocardia farcinica* e *Corynebacterium pseudotuberculosis* com possíveis ligantes

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre 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”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Ricardo Barros Mariutti
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Edson Crusca Junior
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Jorge Enrique Hernández González
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

São José do Rio Preto
8 de Julho de 2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, Roberto e Sueli, que me deram a oportunidade de ingressar em uma faculdade, me incentivaram e me apoiaram todos esses anos.

Agradeço às minhas irmãs, Roberta e Josiane, por me darem todo o apoio possível.

Agradeço ao meu namorado, Heitor, por sempre acreditar no meu potencial e me encorajar.

A todos da equipe de pesquisa e do laboratório, em especial Carol, Ângela e Fernanda, que sempre me auxiliaram e também fizeram parte desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Raghuvir Arni, pela oportunidade e confiança.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Mariutti, pela paciência, apoio, consideração e por todos os ensinamentos. Agradeço por dedicar boa parte do seu tempo para minha formação e por acreditar no meu potencial.

Ao Prof. Dr. Jorge Enrique Hernández, pelo auxílio com as simulações de dinâmica molecular.

Aos meus professores pelo aprendizado e por proporcionarem uma ótima formação.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem contribuir com o presente trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram e compartilharam essa conquista.

RESUMO

Clostridium botulinum é o agente etiológico do botulismo, que ocorre principalmente após o consumo de alimentos contaminados com a toxina botulínica. Essa toxina impede a contração muscular e provoca paralisia, podendo afetar os nervos autônomos. Já a bactéria *Porphyromonas gingivalis* está envolvida na patogênese da periodontite, sendo considerada também um fator de risco para outras complicações. A espécie *Nocardia farcinica* é um actinomiceto responsável por infecções pulmonares, abscessos subcutâneos e cerebrais e bacteremia. A bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* é o agente etiológico da linfadenite caseosa (LC), doença infectocontagiosa crônica e de relevância econômica, que causa perdas econômicas significativas na produção de ovinos e caprinos. Todas essas espécies codificam a proteína repressora de arginina (ArgR), de forma que após atingir uma determinada concentração de arginina no citoplasma, esse ligante interage com a ArgR e o complexo formado (ArgR/Arg) se acopla ao promotor do DNA interrompendo a síntese. A sequência de aminoácidos da ArgR dos patógenos citados apresenta particularidades em relação ao sítio de ligação da arginina de forma que a ArgR de *C. botulinum* e *C. pseudotuberculosis* apresenta um resíduo de prolina na posição 115 (Pro115), enquanto *P. gingivalis* apresenta alanina (Ala115) e *N. farcinica* glicina (Gly115), diferentemente da maioria das ArgRs, as quais possuem aminoácidos Gln ou His na posição 115. O conhecimento dessas particularidades pode ser utilizado para o desenvolvimento de ligantes que possam inibir a via de síntese da arginina desses patógenos. Levando isso em conta, o objetivo do presente trabalho foi expressar a proteína ArgR de *C. botulinum*, *P. gingivalis*, *N. farcinica* e ArgR mutante P115H de *C. pseudotuberculosis* em *Escherichia coli*, purificá-las em condições nativas e desnaturantes e realizar ensaios de cristalização para a obtenção das estruturas tridimensionais cristalográficas dessas proteínas. Além disso, também foram realizados Ensaios de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), Dicroísmo Circular (CD), modelagem por homologia e simulações de Dinâmica Molecular. Ensaios de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) sugerem que o ligante Tirosina pode induzir a hexamerização das ArgRs de *P. gingivalis* e *N. farcinica*. Já resultados obtidos por meio de modelagem e dinâmica molecular indicam que outros fatores além do volume do *pocket* das ArgRs podem influenciar na especificidade pelo ligante. Essas constatações podem ser usadas para o desenvolvimento de ligantes que possam ocupar o sítio de ligação da arginina da ArgR dos patógenos citados, de forma que sua via de síntese seja interrompida e resulte na inibição da proliferação desse patógenos.

Palavras-Chave: Proteína Repressora de Arginina. Tirosina. Ligantes. Modelagem.

ABSTRACT

Clostridium botulinum is the etiological agent of botulism, which occurs mainly after consumption of foods contaminated with botulinum toxin. This toxin prevents muscle contraction and causes paralysis, which can affect the autonomic nerves. The bacterium *Porphyromonas gingivalis* is involved in the pathogenesis of periodontitis, and is also considered a risk factor for other complications. The species *Nocardia farcinica* is an actinomycete responsible for lung infections, subcutaneous and cerebral abscesses and bacteremia. The bacterium *Corynebacterium pseudotuberculosis* is the etiological agent of caseous lymphadenitis (CL), a chronic infectious disease of economic relevance, which causes significant economic losses in the production of sheep and goats. All these species encode the arginine repressor protein (ArgR), so that after reaching a certain concentration of arginine in the cytoplasm, this ligand interacts with the ArgR and the complex formed (ArgR/Arg) couples to the DNA promoter, interrupting the synthesis. The amino acid sequence of the ArgR of the aforementioned pathogens has particularities in relation to the arginine binding site, such that the ArgR of *C. botulinum* and *C. pseudotuberculosis* has a proline residue at position 115 (Pro115), while *P. gingivalis* has alanine (Ala115) and *N. farcinica* glycine (Gly115), unlike most ArgRs, which have amino acids Gln or His at position 115. The knowledge of these particularities can be used for the development of ligands that can inhibit the arginine synthesis pathway of these pathogens. Taking this into account, the aim of the present work was to express the ArgR protein from *C. botulinum*, *P. gingivalis*, *N. farcinica* and P115H mutant ArgR from *C. pseudotuberculosis* in *Escherichia coli*, purify them under native and denaturing conditions and carry out assays of crystallization to obtain the three-dimensional crystallographic structures of these proteins. In addition, Dynamic Light Scattering (DLS), Circular Dichroism (CD), homology modeling and Molecular Dynamics simulations were also performed. Dynamic Light Scattering Assays (DLS) suggest that the Tyrosine ligand can induce the hexamerization of *P. gingivalis* and *N. farcinica* ArgRs. On the other hand, results obtained through modeling and molecular dynamics indicate that factors other than the *pocket* volume of ArgRs can influence the specificity for the ligand. These findings can be used for the development of ligands that can occupy the arginine binding site of the ArgR of the aforementioned pathogens, so that its synthesis pathway is interrupted and results in the inhibition of the proliferation of these pathogens.

Keywords: Arginine repressor protein. Tyrosine. Ligands. Modeling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Há um grande número de etapas na ação da toxina botulínica, a maioria das quais ocorre em dois locais. As células epiteliais, como as do sistema gastrointestinal, podem ser vistas como células de transporte. Eles se ligam à toxina e a carregam do lúmen do intestino para o fluido intersticial e, por fim, para a circulação geral. As terminações nervosas colinérgicas periféricas, como aquelas na junção neuromuscular, são células-alvo para a ação da toxina. A toxina botulínica se liga a essas células e é internalizada para atingir o citosol. A cadeia leve da toxina é uma endoprotease que ataca vários polipeptídeos essenciais para a liberação do transmissor.23

Figura 2. (A) Diagrama esquemático em corte transversal de um dente humano. (B) Uma visão ampliada da bolsa periodontal. O biofilme (amarelo) é composto por muitas espécies de bactérias, das quais *Porphyromonas gingivalis* é uma pequena porção. A secreção de fibroblastos gengivais auxilia na destruição dos anticorpos do hospedeiro e do complemento, e contribui para a destruição localizada do tecido. (C) Várias células de *P. gingivalis* podem deixar a comunidade do biofilme e invadir células hospedeiras. As bactérias internalizadas se movem de célula em célula para as camadas mais profundas do tecido conjuntivo. (D) As fímbrias na superfície da célula bacteriana atuam como adesinas para os receptores de integrina do hospedeiro e medeiam a internalização da bactéria no citoplasma da célula hospedeira. A expressão gênica da célula hospedeira é significativamente modificada; por exemplo, as reduções na produção de citocinas interferem no recrutamento de neutrófilos para a bolsa periodontal. A capacidade de *P. gingivalis* de modificar as respostas locais do hospedeiro conduz a progressão da periodontite. 26

Figura 3. (A) Ilustração dos bacilos filamentosos de *N. farcinica* corados com ácido periódico-Schiff positiva (seta). (B) Imagem de ressonância magnética do cérebro de uma pessoa com abscesso cerebral causado por *N. farcinica*. Imagem sagital ponderada em T1 revelando múltiplas lesões (abscessos cerebrais).27

Figura 4. Abscessos hepáticos e renais em ovinos causados pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*.....28

Figura 5. Via da biossíntese da arginina. À esquerda, representação esquemática das etapas da via da biossíntese da arginina. À direita, cluster gênico da biossíntese da arginina. Neste modelo a ArgR (Vermelho) complexada à arginina (Verde) se liga ao operador. As setas amarelas representam os genes envolvidos na síntese da arginina e a seta vermelha representa o gene ArgR.....30

Figura 6. Efeito da substituição de aminoácidos no *pocket* de ligação Arg/Tyr da ArgR de *C. pseudotuberculosis*. Superposição estrutural de Pro115 nativa (azul) em mutante Gln115 (verde); o esqueleto proteico é mostrado em azul e moléculas de água em vermelho. Os oxigênios da cadeia lateral de Asp136 (amarelo) da molécula vizinha são necessários para a hexamerização e formam ligações de hidrogênio com os nitrogênios N1 e N2 do ligante Arg (linha tracejada preta) ou com o oxigênio do ligante Tyr (linha tracejada vermelha) via um íon de sódio (esfera roxa).....31

Figura 7. Modelo da estrutura tridimensional em *cartoon* das proteínas ArgRs gerado pelo SWISS-MODEL. (A) ArgR C-terminal de *P. gingivalis*. (B) ArgR *Full Length* de *N. farcinica*. (C) ArgR C-terminal de *C. botulinum*.....32

Figura 8. Sequência de aminoácidos das proteínas recombinantes ArgR *Full Length* de *N. farcinica* (I), ArgR C-terminal de *N. farcinica* (II), ArgR C-terminal de *C. botulinum* (III) e ArgR C-terminal de *P. gingivalis* (IV). Em destaque, a cauda de histidina (azul-claro) e o sítio de clivagem para a TEV-protease (roxo)36

Figura 9. Resultado do *Western blot* para detecção da proteína ArgR *Full Length* de *N. farcinica* durante etapa de expressão em pequena escala (testes iniciais de expressão) para determinar a linhagem celular ideal de *E. coli*. (M) Marcador molecular (*Amersham ECL Rainbow Marker – GE Healthcare*) em kDa. (1) Fração solúvel da ArgR *Full Length* linhagem BL21(DE3)-T1. (2) Fração solúvel da ArgR *Full Length* linhagem BL21(DE3)-RIL. (3) Fração solúvel da ArgR *Full Length* linhagem C41(DE3). (4) Fração solúvel da ArgR *Full Length* linhagem BL21 STAR-(DE3). (5) Fração insolúvel da ArgR *Full Length* linhagem BL21 STAR-(DE3). (6) Fração insolúvel da ArgR *Full Length* linhagem BL21(DE3)-RIL. (7) Fração insolúvel da ArgR *Full Length* linhagem BL21(DE3)-T1. (8) Fração insolúvel da ArgR *Full Length* linhagem C41(DE3).....50

Figura 10. Resultado do *Western blot* para detecção das proteínas ArgR *Full Length* e C-terminal de *N. farcinica* durante etapa de expressão em pequena escala (testes iniciais de expressão) para determinar a linhagem celular ideal de *E. coli*. (M) marcador molecular (*Amersham ECL Rainbow Marker – GE Healthcare*) em kDa; (1) Fração solúvel da ArgR *Full Length* linhagem BL21(DE3)-T1. (2) Fração solúvel da ArgR *Full Length* linhagem C43(DE3). (3) Fração solúvel da ArgR *Full Length* linhagem C41(DE3). (4) Fração solúvel da ArgR C-terminal linhagem BL21(DE3)-RIL. (5) Fração solúvel da ArgR C-terminal

linhagem C43(DE3). (6) Fração solúvel da ArgR C-terminal linhagem C41(DE3). (7) Fração insolúvel da ArgR *Full Length* linhagem BL21(DE3)-T1. (8) Fração insolúvel da ArgR *Full Length* linhagem C43(DE3). (9) Fração insolúvel da ArgR *Full Length* linhagem C41(DE3). (10) Fração insolúvel da ArgR C-terminal linhagem C43(DE3). (11) Fração insolúvel da ArgR C-terminal linhagem BL21(DE3)-RIL. (12) Fração insolúvel da ArgR C-terminal linhagem C41(DE3).....50

Figura 11. Resultado do *Western blot* para detecção da proteína ArgR C-terminal de *C. botulinum* durante etapa de expressão em pequena escala (testes iniciais de expressão) visando aumentar a solubilidade da proteína. (M) marcador molecular (*Amersham ECL Rainbow Marker – GE Healthcare*) em kDa. (1) Fração insolúvel da ArgR linhagem BL21 STAR-(DE3) com tampão de lise com 1% de Tween. (2) Fração insolúvel da ArgR linhagem BL21(DE3)-T1 com 1% de Tween. (3) Fração insolúvel da ArgR linhagem C41(DE3) com 1% de Tween. (4) Fração insolúvel da ArgR linhagem BL21(DE3)-RIL com 1% de Tween. (5) Fração insolúvel da ArgR linhagem BL21 STAR-(DE3) com 2% de Triton. (6) Fração insolúvel da ArgR linhagem BL21(DE3)-T1 com 2% de Triton. (7) Fração insolúvel da ArgR linhagem C41(DE3) com 2% de Triton. (8) Fração insolúvel da ArgR linhagem BL21(DE3)- RIL com 2% de Triton.....51

Figura 12. Resultado do *Western blot* para detecção da proteína ArgR C-terminal de *P. gingivalis* durante etapa de expressão em pequena escala (testes iniciais de expressão) visando aumentar a solubilidade da proteína. (M) marcador molecular (*Amersham ECL Rainbow Marker – GE Healthcare*) em kDa. (1) Fração solúvel da ArgR C-terminal de *P. gingivalis* linhagem BL21(DE3)-T1 51

Figura 13. Resultado do *Western blot* para detecção da proteína ArgR mutante P115H de *C. pseudotuberculosis* durante etapa de expressão em pequena escala (testes iniciais de expressão) visando aumentar a solubilidade da proteína. (M) marcador molecular (*Amersham ECL Rainbow Marker – GE Healthcare*) em kDa. (1) Fração solúvel da ArgR mutante P115H de *C. pseudotuberculosis* linhagem BL21(DE3)-T1.....52

Figura 14. SDS-PAGE 15% evidenciando as lavagens com diferentes concentrações de Imidazol realizadas durante a purificação por cromatografia de afinidade da proteína ArgR *Full Length* de *N. farcinica*. (M) Marcador molecular (*LMW-SDS Marker KIT – GE Healthcare*) em kDa. (1) ArgR *Full Length* linhagem BL21(DE3)-T1 durante lavagem com 400 mM de Imidazol (eluição). (2) 80 mM de Imidazol. (3) 60 mM de Imidazol. (4) 40 mM de Imidazol. (5) ArgR *Full Length* linhagem BL21(DE3)-RIL durante lavagem com 40 mM de Imidazol. (6) 60 mM de Imidazol. (7) 80 mM de Imidazol e (8) eluição com 400 mM de Imidazol.....53

Figura 15. SDS-PAGE 15% evidenciando as lavagens com diferentes concentrações de Imidazol realizadas durante a purificação por cromatografia de afinidade da proteína ArgR C-terminal de *N. farcinica* linhagem BL21(DE3)-RIL. (M) Marcador molecular (*LMW-SDS Marker KIT – GE Healthcare*) em kDa. (1) lavagem com 40 mM de Imidazol. (2) 60 mM de Imidazol. (3) 80 mM de Imidazol. (4) 400 mM de Imidazol (eluição).53

Figura 16. SDS-PAGE 15% evidenciando as lavagens com diferentes concentrações de Imidazol realizadas durante a purificação por cromatografia de afinidade da proteína ArgR C-terminal de *P. gingivalis* linhagem BL21(DE3)-T1.(M) Marcador molecular (*LMW-SDS Marker KIT – GE Healthcare*) em kDa. (1, 2 e 3) Lavagem com 60 mM de Imidazol. (4,5 e 6) 80 mM de Imidazol e (7,8 e 9) 400 mM de Imidazol (eluição)54

Figura 17. SDS-PAGE 15% evidenciando a eficiência da purificação por cromatografia de afinidade da ArgR mutante de *C. pseudotuberculosis*. (M) Marcador molecular (*LMW-SDS Marker KIT – GE Healthcare*) em kDa. (1) Lavagem da ArgR P115H com tampão 40 mM de imidazol. (2) 60 mM Imizadol. (3) 80 mM Imizadol. (4) 400 mM Imizadol.....54

Figura 18. SDS-PAGE 15% evidenciando a purificação por cromatografia de afinidade da proteína ArgR C-terminal de *P. gingivalis* em tampão desnaturante (8 M de ureia, 10 mM Tris HCl, 100 mM NaH₂PO₄). (M) Marcador molecular (*LMW-SDS Marker KIT – GE Healthcare*) em kDa. (1 e 2) Lavagem com tampão ureia pH 6,6. (3 e 4) Lavagem com tampão ureia pH 5,9. (5 e 6) Lavagem com tampão ureia pH 4,4 (eluição).....55

Figura 19. SDS-PAGE 15% evidenciando a purificação por cromatografia de afinidade da proteína ArgR C-terminal de *C. botulinum* linhagem BL21(DE3)-RIL em tampão desnaturante (8 M de ureia, 10 mM Tris HCl, 10 mM NaH₂PO₄). (M) Marcador molecular (*LMW-SDS Marker KIT – GE Healthcare*) em kDa. (1) Lavagem com tampão ureia pH 4,4 (eluição). (2) lavagem com tampão ureia pH 5,9. (3) lavagem com tampão ureia pH 6,6. (4) lavagem com tampão ureia pH 8,2.55

Figura 20. SDS-PAGE 15% evidenciando a purificação por cromatografia de afinidade das proteínas ArgR C-terminal de *C. botulinum* e *P. gingivalis* e ArgR *Full Length* de *N. farcinica* em tampão desnaturante (8 M de ureia, 10 mM Tris HCl, 10 mM NaH₂PO₄). (M) Marcador molecular (*LMW-SDS Marker KIT – GE Healthcare*) em kDa. (1) ArgR de *C. botulinum* em tampão ureia pH 6,6. (2) tampão ureia pH 5,9. (3) tampão ureia pH 4,4. (4) ArgR de *P. gingivalis* em tampão ureia pH 6,6. (5) tampão ureia pH 5,9. (6) tampão ureia pH 4,4. (7) ArgR *Full Length* de *N. farcinica* em tampão ureia pH 6,6. (8) tampão ureia pH 5,9. (9) tampão ureia pH 4,4.56

Figura 21. SDS-PAGE 15% evidenciando a purificação por cromatografia de afinidade da proteína ArgR mutante P115H de *C. pseudotuberculosis* em tampão desnaturante (8 M de ureia, 10 mM Tris HCl, 100 mM NaH₂PO₄). (M) Marcador molecular (*LMW-SDS Marker KIT – GE Healthcare*) em kDa. (1) ArgR Pro115His linhagem BL21(DE3)-T1 durante lavagem com tampão ureia pH 4,4.....56

Figura 22. Segunda etapa de purificação da proteína ArgR *Full Length* de *N. farcinica* utilizando tampão 20 mM Tris HCl 100 mM NaCl (pH 7,5). Perfil de cromatografia de exclusão molecular da proteína em Superdex G75 10/300 (GE) após etapa de purificação a partir de Ni-Sepharose. O eixo Y do gráfico corresponde a absorção em mili unidades de absorbância e o eixo X ao volume em mililitros. A linha azul indica a absorbância em 230 nm e a linha rosa absorbância em 280 nm57

Figura 23. Segunda etapa de purificação da proteína ArgR C-terminal de *N. farcinica* utilizando tampão 20 mM Tris HCl 100 mM NaCl (pH 7,5). Perfil de cromatografia de exclusão molecular da proteína em Superdex G75 10/300 (GE) após etapa de purificação a partir de Ni-Sepharose. O eixo Y do gráfico corresponde a absorção em mili unidades de absorbância e o eixo X ao volume em mililitros. A linha azul indica a absorbância em 230 nm e a linha rosa absorbância em 280 nm 58

Figura 24. Segunda etapa de purificação da proteína ArgR C-terminal de *P. gingivalis* utilizando tampão 20 mM Tris HCl 100 mM NaCl (pH 7,5). Perfil de cromatografia de exclusão molecular da proteína em Superdex G75 10/300 (GE) após etapa de purificação a partir de Ni-Sepharose. O eixo Y do gráfico corresponde a absorção em mili unidades de absorbância e o eixo X ao volume em mililitros. A linha azul indica a absorbância em 230 nm e a linha rosa indica absorbância em 280 nm58

Figura 25. Perfil de cromatografia de exclusão molecular da proteína ArgR P115H de *C. pseudotuberculosis* utilizando tampão 20 mM Tris HCl 100 mM NaCl (pH 7,5) em Superdex G75 10/300 (GE). O eixo Y do gráfico corresponde a absorção em mili unidades de absorbância e o eixo X ao volume em mililitros. A linha azul indica a absorbância em 230 nm e a linha rosa absorbância em 280 nm.....59

Figura 26. SDS-PAGE 15% correspondente à etapa de purificação por exclusão molecular da proteína ArgR *Full Length* de *N. farcinica* linhagem BL21(DE3)-RIL. Os números 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 (A) e 1,2,3,4,5 e 6 (B) dos géis SDS-PAGE 15% indicam as amostras coletadas a partir dos perfis cromatográficos da proteína ArgR *Full Length* de *N. farcinica* projetados pelo sistema AKTA-pure e a letra “M” corresponde ao marcador molecular (*LMW-SDS Marker KIT – GE Healthcare*) em kDa59

Figura 27. SDS-PAGE 15% correspondente à etapa de purificação por exclusão molecular da proteína ArgR C-terminal de *P. gingivalis* linhagem BL21(DE3)-T1. Os números 1, 2, 3, 4, 5 e 6 indicam as amostras coletadas a partir dos perfis cromatográficos da proteína ArgR C-terminal de *P. gingivalis* projetados pelo sistema AKTA-pure e a letra “M” corresponde ao marcador molecular (*LMW-SDS Marker KIT – GE Healthcare*) em kDa.....60

Figura 28. SDS-PAGE 15% correspondente à etapa de purificação por exclusão molecular da proteína ArgR mutante P115H de *C. pseudotuberculosis*. Os números 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 indicam as amostras coletadas a partir do perfil cromatográfico da proteína ArgR P115H projetado pelo sistema AKTA-pure e a letra “M” corresponde ao marcador molecular (*LMW-SDS Marker KIT – GE Healthcare*) em kDa.....60

Figura 29. SDS-PAGE 15% após etapa de *refolding* das proteínas ArgR C-terminal de *C. botulinum* e *P. gingivalis* e ArgR *Full Length* de *N. farcinica* utilizando tampão de renovelamento R3 (50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 1 mM DTT e 1 M NDSB). (M) Marcador molecular (*LMW-SDS Marker KIT – GE Healthcare*) em kDa. (1) ArgR C-terminal de *P. gingivalis*. (2) ArgR C-terminal de *C. botulinum*. (3) ArgR *Full Length* de *N. farcinica* após etapa de renovelamento.....61

Figura 30. Espectros de CD-UV característicos da proteína ArgR C-terminal de *P. gingivalis* a 25°C em solução tampão 5 mM NaH₂PO₄ e 50 mM NaF (pH 7,4). O eixo Y do gráfico corresponde a elipticidade molar em deg.cm².dmol⁻¹ e o eixo X ao comprimento de onda em nanômetros..... 62

Figura 31. Espectros de CD-UV característicos da proteína ArgR *Full Length* de *N. farcinica* a 25°C em solução tampão 5 mM NaH₂PO₄ e 50 mM NaF (pH 7,4). O eixo Y do gráfico corresponde a elipticidade molar em deg.cm².dmol⁻¹ e o eixo X ao comprimento de onda em nanômetros..... 63

Figura 32. Coeficiente de correlação em função do tempo (μs) da proteína ArgR de *P. gingivalis* (A) e *N. farcinica* (B) (linha vermelha). As amostras foram obtidas após desnaturação e renovelamento, seguido de diálise utilizando a membrana de diálise *Ficherbrand* (MWCO 6.000-8.000) em tampão 20 mM Tris HCl 100 mM NaCl (pH 7,5)....64

Figura 33. Distribuição relativa em função do diâmetro hidrodinâmico das medidas de DLS da ArgR de *P. gingivalis* (A) e *N. farcinica* (B). A linha vermelha representa o diâmetro hidrodinâmico (Dh) das proteínas em tampão 20 mM Tris HCl 100 mM NaCl (pH 7,5). As amostras foram obtidas após desnaturação e renovelamento, seguido de diálise utilizando a membrana de diálise *Ficherbrand* (MWCO 6.000-8.000) em tampão Tris HCl..... 65

Figura 34. Coeficiente de correlação em função do tempo (μs) da proteína ArgR de *P. gingivalis* em tampão 20 mM TRIS 100 mM NaCl (pH 7,5) com adição de 4 mM de L-Arginina (A) e com 4 mM de D-Tirosina (B). As amostras foram obtidas após desnaturação e renovelamento, seguido de diálise utilizando a membrana de diálise *Ficherbrand* (MWCO 6.000-8.000) em tampão Tris HCl. 66

Figura 35. Distribuição relativa em função do diâmetro hidrodinâmico das medidas de DLS da proteína ArgR de *P. gingivalis*. A linha vermelha representa o diâmetro hidrodinâmico (Dh) da proteína em tampão 20 mM Tris HCl 100 mM NaCl (pH 7,5) e a linha verde representa a proteína em mesmo tampão com adição de 4 mM de L-Arginina (A) e com 4 mM de D-Tirosina (B). As amostras foram obtidas após desnaturação e renovamento, seguido de diálise utilizando a membrana de diálise *Ficherbrand* (MWCO 6.000-8.000) em tampão Tris HCl.....66

Figura 36. Coeficiente de correlação em função do tempo (μ s) da proteína ArgR de *N. farcinica* em tampão 20 mM Tris HCl 100 mM NaCl (pH 7,5) com adição de 4 mM de L-Arginina (A) e em tampão PBS 1x com 4 mM de D-Tirosina (B). As amostras foram obtidas após desnaturação e renovamento, seguido de diálise utilizando a membrana de diálise *Ficherbrand* (MWCO 6.000-8.000) em tampão Tris HCl e PBS 1x.....67

Figura 37. Distribuição relativa em função do diâmetro hidrodinâmico das medidas de DLS da ArgR de *N. farcinica*. A linha vermelha representa o diâmetro hidrodinâmico (Dh) da proteína em tampão 20 mM Tris HCl 100 mM NaCl (pH 7,5) (A) e em tampão PBS 1x (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ e 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,5) (B) e a linha verde representa a proteína em tampão Tris HCl com adição de 4 mM de L-Arginina (A) e com 4 mM de D-Tirosina (B). As amostras foram obtidas após desnaturação e renovamento, seguido de diálise utilizando a membrana de diálise *Ficherbrand* (MWCO 6.000-8.000) em tampão Tris HCl (A) e PBS 1x (B).....67

Figura 38. Cristais (~100 μ m) da proteína ArgR *Full Length* de *N. farcinica* utilizando a proporção 2:1 de proteína: precipitante + *Additive screen* (2 M amonium sulfato; 5% 2-propanol + 0,1 M *Calcium Chloride*) obtidos por difusão de vapor em *hanging drop*.....68

Figura 39. Cristais (~100 μ m) da proteína ArgR C-terminal de *P. gingivalis* utilizando a proporção 2:1 de proteína: precipitante (0,5 M *Sodium Fluoride*) obtidos por difusão de vapor em *hanging drop*.....69

Figura 40. Cristais (~100 μ m) da proteína ArgR C-terminal P115H de *C. pseudotuberculosis* utilizando a proporção 2:1 de proteína: precipitante (2 M *Sodium Formate*) obtidos por difusão de vapor em *hanging drop*.....69

Figura 41. Padrão de difração de Raio-X da proteína ArgR mutante Pro115His de *C. pseudotuberculosis* coletado a partir do congelamento do cristal em um fluxo de nitrogênio gasoso de 100 K.....70

Figura 42. Alinhamento múltiplo de sequências das proteínas ArgRs pertencentes a diversas famílias. As sequências primárias da ArgR de *N. farcinica* (ArgR_Nf), *C. Botulinum* (ArgR_Cb) e *P. gingivalis* (ArgR_Pg) foram utilizadas para realizar uma busca de proteínas homólogas com estruturas cristalográficas disponíveis no PDB (Protein Data Bank). As proteínas identificadas, cujos códigos PDB aparecem à esquerda, e as três proteínas de interesse foram alinhadas usando o programa MUSCLE no site <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>. As barras indicam a conservação em cada posição do alinhamento. Os resíduos foram coloridos de acordo as suas propriedades químicas.....72

Figura 43. Gráficos correspondentes aos valores do *Z-score* de proteínas com estruturas resolvidas e dos modelos (estrelas vermelhas) e dos diedros Φ e Ψ são mostrados para cada estrutura 3D gerada (A) ArgR de *N. farcinica* (B) *C. botulinum* e (C) ArgR mutante P115H de *C. pseudotuberculosis*.....75

Figura 44. Representação estrutural dos sítios de ligação no estado trimérico das ArgRs de (A) *C. pseudotuberculosis* (PDB: 6WJO), (B) *N. farcinica* (modelo), (C) *C. botulinum* (modelo) e (D) ArgR P115H de *C. pseudotuberculosis* (modelo). Os resíduos destacados em negrito não são conservados.....76

Figura 45. Perfis de RMSD correspondetes aos átomos pesados dos ligantes durante as trajetórias de dinâmica molecular geradas para cada trímico. (A) ArgR de *N. farcinica* com 3 ligantes Tirosina; (B) ArgR de *N. farcinica* com 3 ligantes Arginina; (C) ArgR de *C. botulinum* com 3 ligantes Tirosina; (D) ArgR de *C. botulinum* com 3 ligantes Arginina; (E) ArgR P115H de *C. pseudotuberculosis* com 3 ligantes Tirosina e (F) ArgR P115H de *C. pseudotuberculosis* com 3 ligantes Arginina. As diferentes cores representam cada uma das três cópias do ligante em cada trímico. As trajetórias foram fitadas com respeito aos átomos do *backbone* da proteína nas respectivas estruturas iniciais empregadas nas dinâmicas e os movimentos dos ligantes foram acompanhados por meio dos RMSDs. Valores elevados indicam divergência do ligante relativa à posição inicial.....78

Figura 46. Representação estrutural dos complexos triméricos. (A) ArgR *N. farcinica*:3Arg, (B) ArgR *C. botulinum*:3Arg e (C) ArgR P115H de *C. pseudotuberculosis*:3Arg. As linhas tracejadas representam ligações de hidrogênio. As estruturas representadas correspondem às estruturas médias calculadas a partir de três trajetórias independentes de 50 ns de cada sistema.....80

Figura 47. Representação estrutural dos complexos triméricos. (A) ArgR de *N. farcinica*:3Tyr, (B) ArgR de *C. botulinum*:3Tyr e (C) ArgR P115H de *C. pseudotuberculosis*:3Tyr. As linhas tracejadas representam ligações de hidrogênio. As estruturas representadas correspondem às estruturas médias calculadas a partir de três trajetórias independentes de 50 ns de cada sistema.....81

Figura 48. Sequência de aminoácidos da proteína recombinante ArgR C-terminal mutante Pro115Ser de *C. pseudotuberculosis*. Em destaque, a cauda de histidina (amarelo), o sítio de clivagem para a TEV-protease (azul- claro) e o resíduo de aminoácido que diferencia a ArgR selvagem de *C. pseudotuberculosis* da ArgR com mutação pontual (rosa).....83

Figura 49. Gel de agarose 1% (TAE 1X) das amostras de DNA plasmidial pET-28a(+) com inserto da sequência nucleotídica codificadora da ArgR C-terminal de *C. pseudotuberculosis* que supostamente continha a mutação sítio-dirigida Pro115Ser (A) indicada pela seta preta à direita do marcador molecular (Sinapse Inc) em kb. Os experimentos de mutagênese sítio-dirigida foram realizados utilizando o kit de mutagênese *QuikChange II Site- Directed Mutagenesis* (Agilent Technologies) e a extração e purificação do DNA plasmidial foi feita por meio do kit *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Fisher Scientific).....84

Figura 50. SDS-PAGE 15% evidenciando as lavagens com diferentes concentrações de Imidazol realizadas durante a purificação por cromatografia de afinidade da proteína AhrC linhagem BL21 (DE3)-T1. (M) Marcador molecular (*LMW-SDS Marker KIT – GE Healthcare*) em kDa. (1, 2, 3 e 16) Lavagem com 40 mM de Imidazol. (4, 5, 6 e 15) 60 mM de Imidazol. (7, 8, 9 e 14) 80 mM de Imidazol. (10, 11, 12 e 13) 400 mM de Imidazol (eluição).....85

Figura 51. Segunda etapa de purificação da proteína AhrC linhagem BL21 (DE3)-T1 utilizando tampão 20 mM Tris HCl 100 mM NaCl (pH 7,5). Perfil de cromatografia de exclusão molecular da proteína em Superdex G75 10/300 (GE) após etapa de purificação a partir de Ni-Sepharose. O eixo Y do gráfico corresponde a absorção em mili unidades de absorbância e o eixo X ao volume em mililitros. A linha azul indica a absorbância em 230 nm e a linha rosa absorbância em 280 nm.....86

Figura 52. SDS-PAGE 15% correspondente à etapa de purificação por exclusão molecular da proteína AhrC linhagem BL21 (DE3)-T1. Os números 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 indicam as amostras coletadas a partir do perfil cromatográfico da proteína AhrC projetado pelo sistema AKTA-pure e a letra “M” corresponde ao marcador molecular (*LMW-SDS Marker KIT – GE Healthcare*) em kDa.....86

Figura 53. (A) SDS-PAGE 15% evidenciando a eficiência dos métodos de purificação por cromatografia de afinidade (GSH-Sepharose) e cromatografia de exclusão molecular (AKTA-pure) da proteína *Main protease* de SARS-CoV-2. A seta preta indica a presença da proteína recombinante e a letra “M” corresponde ao marcador molecular (*LMW-SDS Marker KIT – GE Healthcare*) em kDa. (B e C) Cristal (~50 μ m) de *Main protease* obtido pelo método de difusão de vapor em *hanging drop* utilizando a proporção 1:2 proteína: precipitante (0,1 M BIS- TRIS pH 9, 10% w/v *Polyethylene glycol* 200, 18% w/v *Polyethylene glycol* 8000).....87

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Sequência no sítio de ligação da arginina de ArgRs de diferentes organismos. Destaque em Vermelho: resíduos da posição 115, que é Gln ou His na maioria das estruturas Arg-ArgR determinadas e os resíduos Pro, Ala e Gly específicos das ArgRs dos microrganismos *C. botulinum*, *P. gingivalis* e *N. farcinica*..... 33
- Tabela 2.** Tampões com diferentes concentrações de imidazol utilizados durante a etapa de purificação por cromatografia de afinidade..... 40
- Tabela 3.** Tampões de renovelamento testados durante etapa de *refolding* das proteínas em estudo..... 41
- Tabela 4.** Dados das sequências primárias das proteínas ArgRs *Full Length* de *N. farcinica* e C-terminal de *N. farcinica*, *C. botulinum* e *P. gingivalis*, obtidos pelo programa ProtParam (ExpPASy)..... 47
- Tabela 5.** Linhagens de *E.coli* competentes utilizadas na otimização da expressão das proteínas ArgRs recombinantes e suas vantagens. 49
- Tabela 6.** Resultados em porcentagem das frações de estrutura secundária das proteínas ArgRs de *N. farcinica* e *P. gingivalis* obtidas por meio do experimento de UV-CD. A deconvolução e o cálculo das porcentagens de estrutura secundária foram realizados pelo software CONTINLL do pacote de programas CDPPro utilizando o conjunto de referências de proteínas SP29..... 63
- Tabela 7.** Dados sobre os moldes e a qualidade dos modelos gerados por homologia das proteínas ArgRs de *N. farcinica*, *C. botulinum* e ArgR mutante P115H de *C. pseudotuberculosis*, respectivamente.....74
- Tabela 8.** Valores de energia livre efetiva calculadas para cada cópia do ligante complexada com os trímeros das proteínas ArgRs de *N. farcinica*, *C. botulinum* e *C. pseudotuberculosis*. Valores entre parêntese indicam o desvio médio. O ligante com maior afinidade encontra-se sublinhado.....79
- Tabela 9.** Lista de primers dessalinizados sintetizados pela empresa Exxtend e utilizados na técnica de PCR convencional para construção de um novo vetor de expressão da proteína ArgR mutante P115S de *C. pseudotuberculosis* com mutações sítio-dirigidas.....83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å	Angstrom
Ala	Alanina
Arg	Arginina
ArgR	Proteína Repressora de Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido Aspártico
BCIP/NBT	<i>5-bromo-4chloro-3-indolylphosphate/nitro-bluetetrazolium</i>
CD	Dicroísmo Circular
Da	Dalton
Dh	Diâmetro Hidrodinâmico
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
GMQE	<i>Global Model Quality Estimation</i>
GST-tag	Glutathione S-transferase
SARS-CoV-2	Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2
His	Histidina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IFN-γ	Interferon- γ
Il-12	Interleucina-12
IPTG	Isopropil- β -d-tiogalactosídeo
K	Kelvin
Kb	Quilobase
Kcal	Quilocalorias
kDa	Quilodalton
LB	Meio Luria-Bertani
LC	Linfadenite Caseosa
LPS	Lipopolissacarídeo da Membrana Externa
Lys	Lisina

M	Molar
ml	Mililitro
Mm	Milimolar
MM	Massa Molecular
MWCO	<i>Molecular Weight cut-off</i>
µg	Microgramas
3D	Tridimensional
NDSB	3-(1-piridino)-1-propano sulfonato
Nm	Nanômetro
Ns	Nanosegundos
OD	Densidade Ótica
PBS	Solução Salina Tamponada
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PI	Ponto Isoelétrico
Pro	Prolina
QMEAN	<i>Qualitative Model Energy Analysis</i>
Rh	Raio hidrodinâmico
RMSD	Desvio quadrático médio da raiz
RPM	Rotações por Minuto
S	Segundos
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de Poliacrilamida com Dodecil-Sulfato de Sódio
µL	Microlitros
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
Thr	Treonina
Tyr	Tirosina
ΔG_{eff}	Energia Livre Efetiva

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1 <i>Clostridium botulinum</i>	22
1.2 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	24
1.3 <i>Nocardia farcinica</i>	26
1.4 <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	28
1.5 Proteína ArgR e seu papel na regulação gênica	29
1.5.1 Estudo da ArgR de <i>C. botulinum</i> , <i>P. gingivalis</i> e <i>N. farcinica</i> e <i>C. pseudotuberculosis</i>	31
2. OBJETIVOS	34
3. JUSTIFICATIVA	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 Vetor de expressão em <i>Escherichia coli</i>	36
4.2 Análise da sequência primária das proteínas de estudo	37
4.3 Transformação bacteriana para expressão proteica	37
4.4 Testes iniciais de expressão em <i>E. coli</i>	37
4.5 <i>Western blot</i>	38
4.6 Expressão das proteínas alvo	38
4.7 Purificação das proteínas alvo	39
4.7.1 Cromatografia de afinidade (Ni-Sepharose).....	39
4.7.2 Purificação sob condições desnaturantes	40
4.7.3 Cromatografia de exclusão molecular (AKTA-pure).....	40
4.8 <i>Refolding</i>	41
4.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15%	42
4.10 Dicroísmo circular (CD)	42
4.11 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)	43
4.12 Ensaio de cristalização	43
4.13 Construção de modelos tridimensionais por modelagem comparativa	44
4.14 Simulações de dinâmica molecular	44
4.15 Cálculos de energia livre MM-GBSA	45
4.16 Análise de trajetória	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 Análise da sequência primária das proteínas alvo	47
5.2 Expressão das proteínas alvo	48

5.3 Western blot.....	49
5.4 Purificação das proteínas recombinantes	52
5.4.1 Purificação por cromatografia de afinidade (Ni–Sepharose) em condição nativa ...	52
5.4.2 Purificação por cromatografia de afinidade (Ni–Sepharose) em condição desnaturante.....	54
5.4.3 Purificação por cromatografia de exclusão molecular	56
5.5 Refolding	61
5.6 Caracterização da estrutura secundária por dicroísmo circular (CD).....	62
5.7 Análise por espalhamento dinâmico de luz (DLS)	64
5.8 Ensaio de cristalização	68
5.9 Alinhamento múltiplo das sequências.....	71
5.10 Modelagem por homologia.....	73
5.11 Simulações de dinâmica molecular.....	77
6. EXPERIMENTOS PARALELOS.....	83
6.1 Experimentos de mutagênese para obtenção da ArgR mutante P115S de <i>C.</i> <i>pseudotuberculosis</i>.....	83
6.2 Estudo da proteína AhrC de <i>Streptococcus gordonii</i>.....	85
6.3 Main protease do vírus SARS-CoV-2	86
7. CONCLUSÃO	88
REFERÊNCIAS	90

1. INTRODUÇÃO

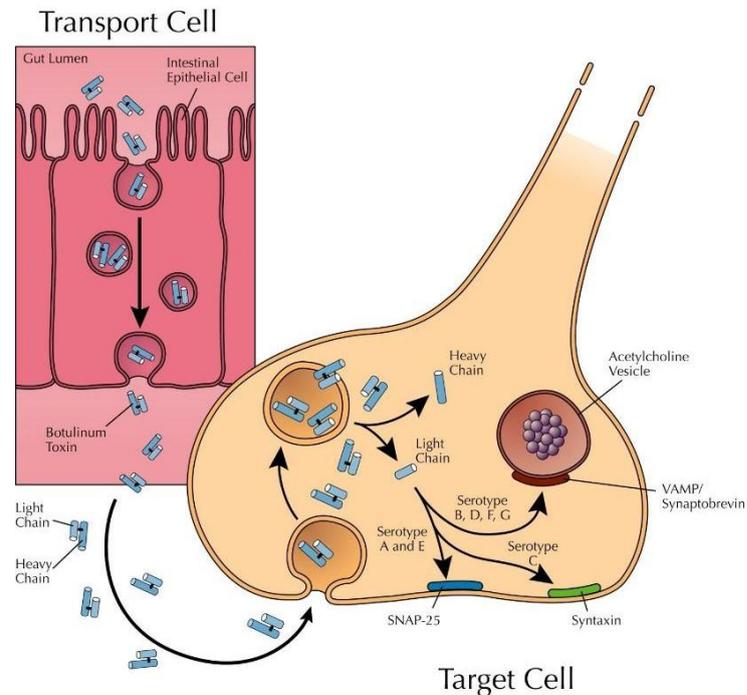
1.1 *Clostridium botulinum*

Clostridium botulinum é uma bactéria anaeróbia formadora de endósporos que causa uma grave intoxicação alimentar conhecida como botulismo, a qual é potencialmente fatal e ocorre após o consumo de alimentos contendo a exotoxina produzida por esse microrganismo. *C. botulinum* é uma bactéria habitante normal do solo ou da água, porém seus endósporos podem contaminar alimentos crus e processados. Se endósporos viáveis permanecerem no alimento eles podem germinar e produzir a toxina botulínica (MADIGAN et al., 2016).

Foram identificadas pelo menos sete toxinas botulínicas imunologicamente distintas, que são designadas pelas letras A–G, sendo conhecidas como as toxinas biológicas mais potentes. Todas as toxinas são polipeptídeos grandes (~150 kDa) de estrutura semelhante que exercem sua ação sobre o sistema colinérgico no terminal pré-sináptico do neurônio motor por meio do bloqueio da transmissão da acetilcolina na junção neuromuscular (HATHEWAY; HAUSCHILD; DODDS, 1992). Quando a toxina atinge as terminações nervosas colinérgicas periféricas, há uma sequência de eventos de penetração na membrana. Inicialmente, a toxina se liga a superfície das membranas plasmáticas, seguido de endocitose mediada por receptor e translocação através da membrana endossômica. Quando a toxina atinge o citosol, ela atua como uma endoprotease na clivagem de polipeptídeos essenciais para a exocitose. O bloqueio da liberação do transmissor é responsável pela paralisia flácida e disfunção autonômica que são características da doença (SIMPSON, 2003) (Figura 1).

Existem várias formas de infecção, como no botulismo alimentar, o qual é causado pelo consumo de alimentos contaminados com a toxina botulínica. A bactéria cresce e produz toxina somente quando o alimento apresenta condições que incluem um meio anaeróbico, pH < 4,5, baixo teor de sal e açúcar e uma temperatura de 4° C a 121° C (SHAPIRO; HATHEWAY; SWERDLOW, 1998) sendo os alimentos enlatados uma importante fonte de intoxicação. Em outros casos também pode ocorrer infecção, como no botulismo de ferimento, causado pela contaminação de uma ferida com esporos de *C. botulinum* do ambiente, subsequente germinação e produção da toxina no meio anaeróbico de um abscesso (SOBEL, 2005). Outro exemplo de infecção é o botulismo infantil, resultado da absorção da toxina produzida *in situ* pelo crescimento de *C. botulinum* no intestino de recém-nascidos. Acredita-se que a colonização ocorra porque a microbiota intestinal normal, que pode competir com *C. botulinum*, não foi totalmente estabelecida (ARNON; FEIGEN; CEREJA, 1998).

Figura 1. Há um grande número de etapas na ação da toxina botulínica, a maioria das quais ocorre em dois locais. As células epiteliais, como as do sistema gastrointestinal, podem ser vistas como células de transporte. Elas se ligam à toxina e a carregam do lúmen do intestino para o fluido intersticial e, por fim, para a circulação geral. As terminações nervosas colinérgicas periféricas, como aquelas na junção neuromuscular, são células-alvo para a ação da toxina. A toxina botulínica se liga a essas células e é internalizada para atingir o citosol. A cadeia leve da toxina é uma endoprotease que ataca vários polipeptídeos essenciais para a liberação do transmissor.



Fonte: SIMPSON, 2003.

Todas as formas de botulismo se manifestam essencialmente pela mesma síndrome clínica de paralisia simétrica dos nervos cranianos que pode ser seguida por paralisia flácida descendente e simétrica dos músculos voluntários, podendo evoluir para comprometimento respiratório e morte (SOBEL, 2005). Visão turva, disfagia e disartria são queixas iniciais comuns. O diagnóstico de botulismo é baseado em achados clínicos compatíveis; história de exposição a alimentos suspeitos; e testes auxiliares de suporte para descartar outras causas de disfunção neurológica que simulam o botulismo, como acidente vascular cerebral e síndrome de *Guillain-Barré* (SHAPIRO; HATHEWAY; SWERDLOW, 1998). A confirmação do botulismo depende da demonstração da toxina em amostras de soro do paciente, secreções gástricas, fezes ou em uma amostra de alimento. O único tratamento específico para o botulismo é a administração da antitoxina botulínica, que pode interromper a progressão da paralisia, diminuir sua duração e a dependência de ventilação mecânica (SOBEL, 2005).

Nos Estados Unidos, são observados anualmente cerca de 150 casos de botulismo, sendo 70% dos casos de botulismo infantil, 15% de ferimentos e 15% de origem alimentar.

Apesar de raro, o botulismo é muito grave em razão da elevada taxa de mortalidade associada à doença não tratada (MADIGAN et al., 2016), entre 30 e 65%.

1.2 *Porphyromonas gingivalis*

Porphyromonas gingivalis é uma bactéria cocobacilar Gram-negativa, anaeróbia estrita, não móvel, com cápsula, assacarolítica que adquire uma coloração preta/escura característica em placas de sangue devido à agregação do grupo heme na sua superfície celular (HOW et al., 2016). Essa bactéria está envolvida na patogênese da periodontite, uma doença inflamatória que destrói os tecidos que sustentam o dente, levando à sua perda (BOSTANCI; BELIBASAKIS, 2016). As doenças periodontais incluem uma ampla gama de respostas inflamatórias e destrutivas a bactérias componentes do biofilme dental, sendo importante salientar que a doença periodontal e a cárie dentária são as doenças da cavidade oral com maiores índices de prevalência nas populações mundiais (LEMOS, 2016).

Esse patógeno pode invadir ativamente as células epiteliais da gengiva, onde pode manter sua viabilidade e se replicar (TRIBBLE et al., 2006). Essa propriedade invasiva é dependente de suas fímbrias, que se ligam a receptores na superfície das células do hospedeiro, permitindo sua internalização (YILMAZ et al., 2003) (Figura 2). Esta é potencialmente uma estratégia para exposição limitada ao ambiente extracelular e evasão da vigilância imunológica. Posteriormente, o patógeno pode se disseminar de uma célula para outra por meio de pontes de citoesqueleto de actina, sem causar morte celular, e se espalhar, evitando o sistema imunológico (YILMAZ et al., 2006).

Ao invadir localmente os tecidos periodontais é capaz de subverter os mecanismos de defesa do hospedeiro e utilizando essa estratégia o patógeno desregula a imunidade inata, o que pode, por sua vez, incapacitar a imunidade adaptativa (PATHIRANA; O'BRIEN-SIMPSON; REYNOLDS, 2010). Alguns exemplos importantes dessas habilidades são: capacidade de degradar as defensas humanas (CARLISLE; SRIKANTHA; BROGDEN, 2009), resistência à oxidação por neutrófilos polimorfonucleares (MYDEL et al., 2006) e sua capacidade de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias cruciais (BOSTANCI et al., 2007a) (Figura 2). Portanto, essa bactéria pode incapacitar a primeira linha de defesa nos tecidos periodontais.

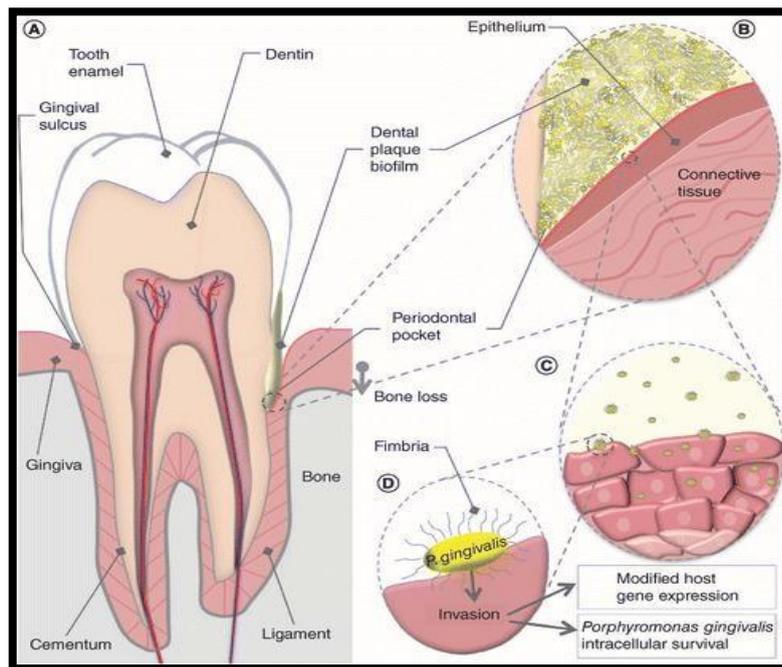
Além disso, ao inibir a produção de interleucina-12 (IL-12) por macrófagos, previne a ativação de células T citotóxicas e, portanto, a depuração bacteriana. Por conseguinte, ao inibir a produção de interferon- γ (IFN- γ) pelas células T, inibe a atividade bactericida dos macrófagos (HAJISHENGALLIS et al., 2007). Uma relação especial também

é revelada entre *P. gingivalis* e o sistema complemento, uma vez que o patógeno pode suprimir sua ativação.

Além disso, esse microrganismo utiliza inúmeros fatores de virulência que causam a desregulação das respostas imunes inatas. Os principais fatores de virulência presentes em *P. gingivalis* são as fímbrias, proteases, LPS (lipopolissacarídeo da membrana externa) e a própria cápsula que envolve a bactéria. As proteases são mediadoras de adesão a células epiteliais e aos fibroblastos gengivais, além disso, têm funções importantes na destruição de proteínas da matriz extracelular, na proteólise de citocinas, imunoglobulinas, fatores do sistema complemento e na clivagem de receptores de linfócitos T (CD2; CD4; CD8), dificultando, assim, a resposta imunológica e favorecendo a proliferação de *P. gingivalis* (TIKOO et al., 2015).

A presença de *P. gingivalis* juntamente com outros fatores de risco pode levar à criação de processos inflamatórios locais nos vasos sanguíneos onde existe uma invasão de células endoteliais, células musculares lisas e acúmulo da bactéria nesses locais, resultando numa calcificação vascular. Essa bactéria também é considerada um fator de risco na iniciação e manutenção da resposta inflamatória autoimune conhecida como artrite reumatoide, por meio da destruição de ossos e cartilagens nas articulações e aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (SERPA et al., 2020), além de já ter sido identificada em casos de cânceres orodigestivos (LEMOS, 2016). Por fim, a infecção por *P. gingivalis* foi identificada como fator de risco significativo para o desenvolvimento de demência e doença de Alzheimer (DOMINY et al., 2019), desempenhando papel na formação da lesão característica da doença e subsequente déficit cognitivo, por meio dos efeitos das citocinas sistêmicas e/ou moléculas da parede celular microbiana (SINGHRAO; OLSEN, 2019).

Figura 2. (A) Diagrama esquemático em corte transversal de um dente humano. (B) Uma visão ampliada da bolsa periodontal. O biofilme (amarelo) é composto por muitas espécies de bactérias, das quais *Porphyromonas gingivalis* é uma pequena porção. A secreção de fibroblastos gengivais auxilia na destruição dos anticorpos do hospedeiro e do complemento, e contribui para a destruição localizada do tecido. (C) Várias células de *P. gingivalis* podem deixar a comunidade do biofilme e invadir células hospedeiras. As bactérias internalizadas se movem de célula em célula para as camadas mais profundas do tecido conjuntivo. (D) As fímbrias na superfície da célula bacteriana atuam como adesinas para os receptores de integrina do hospedeiro e medeiam a internalização da bactéria no citoplasma da célula hospedeira. A expressão gênica da célula hospedeira é significativamente modificada; por exemplo, as reduções na produção de citocinas interferem no recrutamento de neutrófilos para a bolsa periodontal. A capacidade de *P. gingivalis* de modificar as respostas locais do hospedeiro conduz a progressão da periodontite.



Fonte: TRIBBLE; KERR; WANG, 2013.

1.3 *Nocardia farcinica*

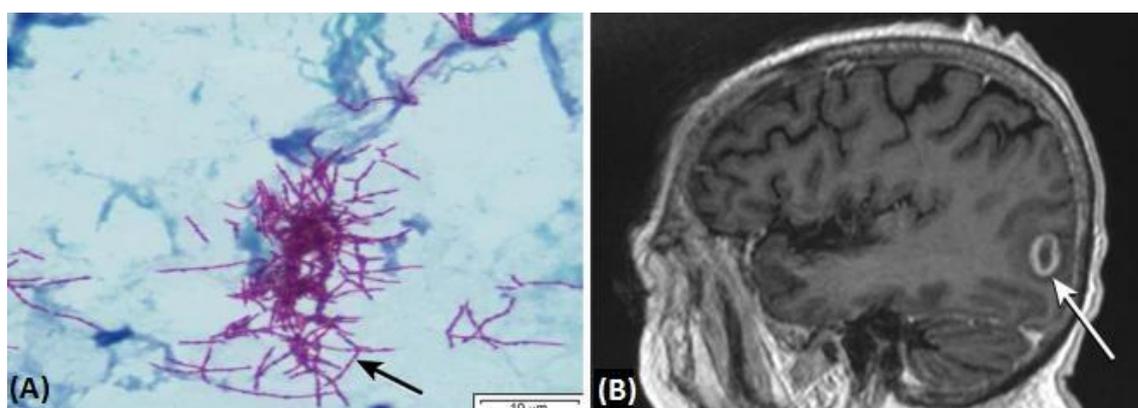
As espécies do gênero *Nocardia* são saprófitas generalizadas, caracterizadas como bacilos Gram-positivos e filamentosos (Figura 3A). Espécies desse gênero são responsáveis por causar a nocardiose, uma infecção preferencialmente oportunista. As portas de entrada para esses microrganismos são o trato respiratório, cirurgia ou lesões cutâneas traumáticas. Na maioria dos casos, a nocardiose é adquirida por inalação, sendo o pulmão o órgão mais comumente envolvido (KUMAR et al., 2014). Apresenta-se predominantemente como uma doença pulmonar aguda, subaguda ou crônica em hospedeiros imunocomprometidos que pode se disseminar para qualquer órgão, como cérebro, pele, ossos, rins e testículos, formando abscessos (BUDZIK et al., 2012).

A espécie *Nocardia farcinica* é um actinomiceto aeróbico Gram-positivo,

parcialmente ácido resistente e que causa infecções localizadas e disseminadas em humanos, incluindo infecções pulmonares (BRUNO et al., 2011), abscessos subcutâneos (YOKOTA et al., 2010) e cerebrais (IANNOTTI et al., 2009) além de bacteremia (AL-TAWFIQ; AL-KHATTI, 2010), especialmente em pacientes imunocomprometidos. Esse microrganismo raramente está associado à nocardiose, no entanto, pode causar infecções disseminadas clinicamente agressivas e potencialmente letais. Sabe-se também que é resistente a múltiplos agentes antimicrobianos, como a maioria dos antibióticos beta-lactâmicos (BROWN-ELLIOTT et al., 2006). As infecções causadas por esse agente patogênico são potencialmente letais devido à tendência do organismo em se disseminar e resistir aos antibióticos.

A maioria dos pacientes com infecção por *N. farcinica* apresenta fatores predisponentes como malignidades hematológicas, tratamento com corticosteróides, tumores, transplante de medula óssea ou de órgãos, infecção por HIV, doenças crônicas pulmonares e renais (TORRES et al., 2000). A apresentação clínica mais comum é uma pneumonia subaguda com nódulos, necrose ou abscessos pulmonares. A disseminação hematogênica para o sistema nervoso central na forma de abscessos cerebrais ou para outros locais também pode ocorrer (IANNOTTI et al., 2009) (Figura 3B).

Figura 3. (A) Ilustração dos bacilos filamentosos de *N. farcinica* corados com ácido periódico-Schiff positiva (seta). (B) Imagem de ressonância magnética do cérebro de uma pessoa com abscesso cerebral causado por *N. farcinica*. Imagem sagital ponderada em T1 revelando múltiplas lesões (abscessos cerebrais).



Fonte: MALEK, et al., 2020.

Mesmo sendo raro, existem casos de *N. farcinica* proveniente dos pulmões que acaba se disseminando e causando abscessos cerebrais, tanto em pacientes imunocomprometidos como imunocompetentes (representa 1-2% de todos os abscessos cerebrais). No entanto, esses casos têm uma alta taxa de mortalidade, chegando a 20% em pacientes imunocompetentes e a 55% em pacientes imunocomprometidos (ZINTGRAFF et al., 2018). Essas altas taxas são atribuídas à gravidade da doença subjacente às dificuldades em identificar o patógeno e à sua

resistência inerente aos antibióticos, levando ao início inadequado ou tardio da terapia (KUMAR et al., 2014).

1.4 *Corynebacterium pseudotuberculosis*

O gênero *Corynebacterium* pertence ao grupo supragenérico dos Actinomycetes (Actinobacteria) e apresenta considerável importância biológica, médica e veterinária. *Corynebacterium pseudotuberculosis* é o agente etiológico da linfadenite caseosa (LC), doença infectocontagiosa crônica e de relevância econômica, que acomete diferentes grupos de animais no mundo inteiro, principalmente nas áreas de produção de ovinos e caprinos, causando perdas econômicas significantes. A infecção está associada à redução da produção de lã, carne e leite, menor eficiência reprodutiva dos animais, condenação de carcaças e couros em abatedouros (PEEL et al., 1997), gastos com tratamento e honorários veterinários. A doença se manifesta pela presença de necrose nas glândulas linfáticas, apresentando-se em duas formas: a LC externa ou superficial e a LC interna ou visceral (Figura 4).

Figura 4. Abscessos hepáticos e renais em ovinos causados pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*.



Fonte: CORREA, W. M., 1992.

A LC é prevalente em vários países (DORELLA et al., 2009) e a introdução de animais enfermos nos rebanhos leva à rápida disseminação da doença nos plantéis (CETINKAYA et al., 2002). As infecções também podem ser assintomáticas, o que dificulta as análises epidemiológicas sobre a prevalência da doença. Além de ovinos, bovinos, equinos e caprinos, *C. pseudotuberculosis* é um patógeno que também pode infectar diferentes espécies, como camelos, lhamas e búfalos (PEEL et al., 1997). A infecção humana causada por *C. pseudotuberculosis* é um evento raro, mas demonstra o potencial zoonótico dessa bactéria.

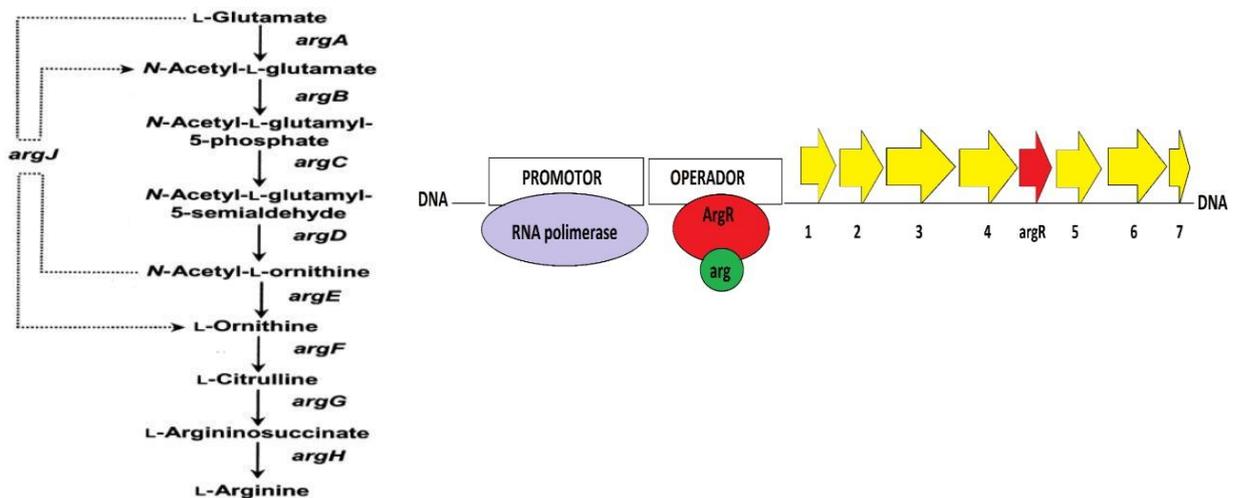
Na prática, o diagnóstico definitivo é firmado pelo cultivo do microrganismo a partir do conteúdo dos abscessos obtidos por punção aspirativa ou extirpação cirúrgica (PATON et al., 2003). A técnica de PCR é sensível e específica no diagnóstico, porém, tem como limitação o custo de implantação inicial e eventuais reações cruzadas entre espécies geneticamente relacionadas como *C. ulcerans* (COSTA, 2002). O tratamento dos animais apenas com antibióticos sistêmicos é ineficaz, de modo que a maioria dos casos também requer a excisão cirúrgica do linfonodo afetado (BAIRD; FONTAINE, 2007), procedimento comercialmente inviável.

A bactéria é sensível a vários tipos de antibióticos *in vitro*, no entanto ainda não foram encontradas moléculas eficientes para tratamento *in vivo*, o que torna a terapia ineficiente (OLSON et al., 2002). A drenagem e a extirpação dos linfonodos superficiais acometidos, além de não eliminarem 100% das bactérias, podem acarretar a contaminação do ambiente com o patógeno, sendo que a quantidade de bactérias liberada por um único abscesso é capaz de contaminar todo o rebanho. Portanto, a melhor estratégia para combater a doença é a profilaxia (PIONTKOWSKI; SHIVVERS, 1998) e o método de controle mais eficiente da LC é a identificação dos animais infectados e sua remoção do rebanho (NOZAKI et al., 2000). A vacinação é considerada, também, como ação de profilaxia e reduz a ocorrência de abscessos no rebanho em até 70%, porém, isoladamente, não erradica a doença em áreas endêmicas. Como ainda não existe um tratamento eficaz para combater essa doença, estudos envolvendo proteínas desse agente etiológico são de extrema importância para encontrar moléculas capazes de alterar vias metabólicas desse patógeno e conseqüentemente inibir sua proliferação.

1.5 Proteína ArgR e seu papel na regulação gênica

Em procariotos, a arginina é sintetizada a partir de glutamato, em oito passos enzimáticos (CUNIN et al., 1986) e a transcrição de genes envolvidos nessa via é regulada negativamente pela proteína repressora de arginina (ArgR) (Figura 5). Na presença de determinadas concentrações de arginina, a ArgR se oligomeriza e, por meio de um mecanismo alostérico, se liga ao operador do DNA envolvido na via metabólica da arginina. O complexo ArgR-operador impede estericamente a atividade da RNA polimerase, interrompendo a síntese de novas moléculas de arginina em nível transcricional.

Figura 5. Via da biossíntese da arginina. À esquerda, representação esquemática das etapas da via da biossíntese da arginina. À direita, cluster gênico da biossíntese da arginina. Neste modelo a ArgR (Vermelho) complexada à arginina (Verde) se liga ao operador. As setas amarelas representam os genes envolvidos na síntese da arginina e a seta vermelha representa o gene ArgR.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O mecanismo de regulação da biossíntese de arginina, a sequência de aminoácidos da ArgR e a sequência de nucleotídeos do operador alvo têm um elevado grau de conservação mesmo em bactérias evolutivamente distantes (TIAN et al., 1994). Cada subunidade da ArgR consiste de dois domínios interligados por um linker peptídico curto e flexível: o domínio N-terminal, que é envolvido na ligação ao DNA e o domínio C-terminal, que é responsável pela ligação à arginina e oligomerização. Existem 6 L-argininas localizadas na interface trímero-trímero do hexâmero da ArgR de forma que os dois trímeros se dimerizam, com os ligantes atuando como colas moleculares (DUYNE et al., 1996), e ao mesmo tempo induzem o aumento da afinidade de ligação do complexo ao operador do DNA (KOK; KUIPERS, 2005).

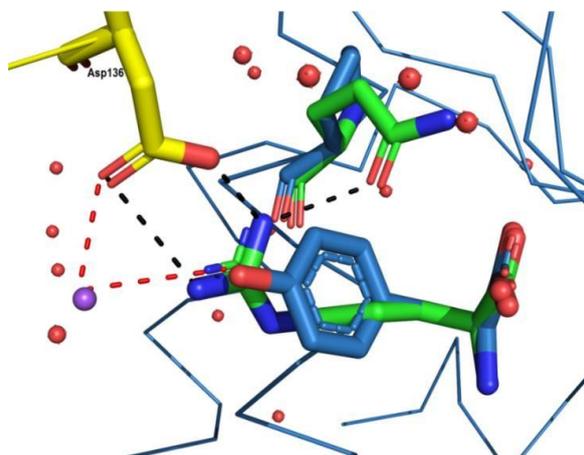
Embora o mecanismo de regulação da arginina compartilhe várias características em organismos divergentes, algumas características incomuns foram relatadas, como por exemplo a ArgR das bactérias hipertermófilas *Thermotoga neapolitana* e *T. maritima* ligam ao DNA de forma independente de arginina e apresentam baixa especificidade de ligação ArgR-DNA (MORIN et al., 2002). Essa interação independente de arginina está relacionada, pelo menos em parte, com a presença de um resíduo de serina na posição 115 dos repressores de *T. neapolitana* e *T. maritima*, em vez do resíduo de glutamina altamente conservado entre as ArgRs conhecidas.

1.5.1 Estudo da ArgR de *C. botulinum*, *P. gingivalis*, *N. farcinica* e *C. pseudotuberculosis*

O PDB disponibiliza estruturas de ArgRs de apenas sete diferentes microrganismos, sendo que os aminoácidos presentes no sítio de interação da arginina são altamente conservados, os quais possuem His ou Gln na posição 115, além de apresentarem a sequência de aminoácidos DDT (Asp-Asp-Thr) na posição 136, 137 e 138. Esses aminoácidos também estão conservados entre a grande maioria das 564 ArgRs que estão depositadas no UniProt. Nessas sequências de ArgRs, em espécies de bactérias pertencentes a oito filos, Gln e His são prevalentes na posição 115. No entanto, Pro, Ala, Ser, Asn, Asp, Gly ou Glu também são encontrados, indicando variações nos *pockets* de ligação entre as diferentes espécies. Das 564 ArgRs analisadas, apenas sete contêm Pro na posição 115, que pertencem a seis espécies do gênero *Corynebacterium*, e apenas uma pertencente a outro filo, *Lactococcus plantarum* (Firmicutes), que interessante, codifica duas ArgRs diferentes (ArgR1 com Pro115 e ArgR2 com Asn115).

Essa característica, que além de tornar o *pocket* da ArgR de *C. pseudotuberculosis* mais volumoso (MARIUTTI et al., 2016) altera bioquimicamente esse nanoambiente, permitindo a interação com Tyr e, possivelmente, de seus análogos, uma condição que não ocorreria com a maioria dos microrganismos, os quais possuem um *pocket* menos volumoso. O resíduo 115 da ArgR de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, que foi demonstrado experimentalmente estar relacionado à especificidade da enzima pelo ligante (Figura 6) (MARIUTTI et al., 2016) é utilizado como modelo para a elaboração dos experimentos deste trabalho.

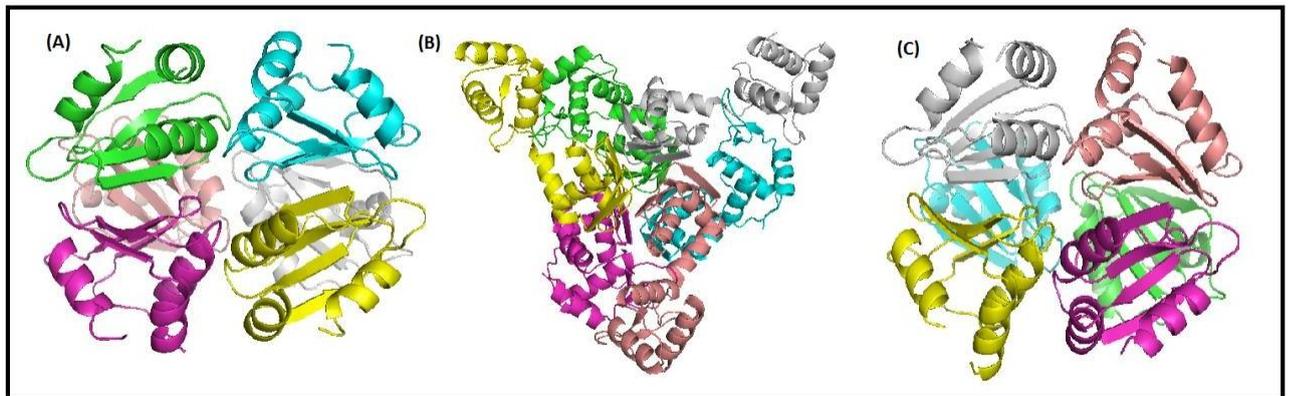
Figura 6. Efeito da substituição de aminoácidos no *pocket* de ligação Arg/Tyr da ArgR de *C. pseudotuberculosis*. Superposição estrutural de Pro115 nativa (azul) em mutante Gln115 (verde); o esqueleto proteico é mostrado em azul e moléculas de água em vermelho. Os oxigênios da cadeia lateral de Asp136 (amarelo) da molécula vizinha são necessários para a hexamerização e formam ligações de hidrogênio com os nitrogênios N1 e N2 do ligante Arg (linha tracejada preta) ou com o oxigênio do ligante Tyr (linha tracejada vermelha) via um íon de sódio (esfera roxa).



Fonte: Elaborado pelo Autor.

A ArgR de outros microrganismos como *C. botulinum*, *P. gingivalis* e *N. farcinica* (Figura 7) apresentam resíduos de cadeia lateral curta na posição 115, possuindo *pockets* mais volumosos que a maioria das ArgRs. A ArgR de *C. botulinum* apresenta um resíduo de prolina na posição 115 (Pro115), enquanto *P. gingivalis* apresenta alanina (Ala115) e *N. farcinica* glicina (Gly115) (Tabela 1). Além disso, outra característica peculiar das ArgRs de *C. botulinum* e *P. gingivalis* é a ausência da sequência de aminoácidos DDT, altamente conservada entre as ArgRs, na posição 136, 137 e 138, sendo que a primeira apresenta DNT (Asp-Asn-Thr) e a segunda PTH (Pro-Thr-His) como sequências alternativas (Tabela 1). Essas particularidades encontradas na sequência de aminoácidos do sítio de ligação da arginina dessas proteínas, além de trazerem informações sobre o processo de oligomerização, podem ser utilizadas para o desenvolvimento de ligantes que possam inibir a via de síntese da arginina desses patógenos sem interagir com o *pocket* da ArgR de microrganismos da microbiota normal dos hospedeiros, como, por exemplo a ArgR de *E. coli*, que não apresenta as particularidades citadas acima.

Figura 7. Modelo da estrutura tridimensional em *cartoon* das proteínas ArgRs hexamerizadas gerado pelo SWISS-MODEL. (A) ArgR C-terminal de *P. gingivalis*. (B) ArgR *Full Length* de *N. farcinica*. (C) ArgR C-terminal de *C. botulinum*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 1. Sequência no sítio de ligação da arginina de ArgRs de diferentes organismos. Destaque em Vermelho: resíduos da posição 115, que é Gln ou His na maioria das estruturas Arg-ArgR determinadas e os resíduos Pro, Ala e Gly específicos das ArgRs dos microrganismos *C. botulinum*, *P. gingivalis* e *N. farcinica*.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80
<i>Nfarcinica</i>	GGTDRLSKLL	GDLLVST	DASGNIAVLR	TTPPGA	GLASALDRAALPY	-VVGTIAGDDT	IAYIAREPL	TGAELAAKIEEL	-----
<i>Cpseudotuberculosis</i>	GTREKLRKMLD	LLYSVDHSGNIAVLR	TTPPGA	HLASFI	DRYGME	-VVGTIAGDDT	VFLARDPMT	GQELGEFLSQRRSG	--I
<i>Htuberculosis</i>	VSGGDRMARLL	GELLVST	DASGNIAVLR	TTPPGA	HLASAI	DRAALPQ	-VVGTIAGDDT	ILVYAREPTT	GAQLAGMFENLR
<i>Cbotulinum</i>	YMSDKLINIFA	QTVINVENIDKLI	IKAISGS	PARAEAI	OTLGF	DG-VAGTIAGDNT	IFVMAR	TNEKAQEITM	LKKIITA--
<i>Pgingivalis</i>	RPPSSRGELR	IGRTEGF	IGPYDTGEM	LLLN	TAEGH	AR	RIASEIEEL	SAPE-VADY	VFGPTHIVVIGQKGTTRQALLCAIAPAIPEVLI
<i>Bstearothernophilus</i>	FNPLQKLKRAL	VDVFIKLD	GTGNLLVLR	TLPGN	AR	IGVLLDNL	DWDE-IVGTIC	GDDTCLICR	TPKDAKKVSNQLLSHL
<i>Bsubtilis</i>	FNPLSKLRAL	DAFVKID	SASHIVLK	TMPGN	AR	IGALDNL	DWDE-MMGTIC	GDDTILICR	TPEDTEGVKMRLELL
<i>Bhalodurans</i>	FNPLQKLKRL	VSFYSI	ORTDNLIV	MKTL	PGN	AR	IGALDNL	DWTE-IMG	TICGDDTILICR
<i>Vvulnificus</i>	LGVPTVSSSL	RELVLVD	HNQALVVI	HTGPA	Q	IARML	DSL	GKSEGITL	GVVAGDDTIFITPTLTITTEQLF
<i>Ecoli</i>	LGVPTTSSPL	KMLVLDI	YNDAVVVI	HTSPGA	Q	IARML	DSL	GKSEGITL	GVVAGDDTIFITPTPANGFTVKDL
Consensusl...	l.#.....d.....	l.vl.t.pG.Aia..i#.l...e.!	gtia6ddt!	v..r...t...l			

Fonte: Elaborado pelo Autor.

2. OBJETIVOS

1. O objetivo geral deste trabalho foi expressar a proteína ArgR selvagem de *C. botulinum*, *P. gingivalis*, *N. farcinica* e ArgR mutante Pro115His de *C. pseudotuberculosis* em *E. coli* e posteriormente purificá-las em condição nativa e desnaturante, para garantir a obtenção dessas enzimas purificadas e em tampões específicos.
2. Como objetivo específico desta pesquisa, destaca-se: obtenção das proteínas em sua forma apo por meio da realização do renovelamento dos alvos purificados sob condições desnaturantes, ensaios de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e cristalização dessas proteínas visando a resolução das suas estruturas tridimensionais.
3. Além disso, também objetivou-se, por meio de métodos computacionais, a realização de modelagem por homologia e ensaios de dinâmica molecular, a fim de gerar modelos tridimensionais das proteínas citadas e avaliar ligantes que teriam uma maior afinidade pelo *pocket* das ArgRs desses microrganismos. Compreender os mecanismos envolvidos na interação da proteína ArgR com seus possíveis ligantes e o mecanismo de hexamerização dessas enzimas, é imprescindível para o desenvolvimentos de moléculas que não sejam antibióticos e que tenham a capacidade de bloquear a via de síntese dos patógenos sem prejudicar a microbiota normal do hospedeiro.

3. JUSTIFICATIVA

A proteína repressora de arginina (ArgR), que regula a expressão de vários genes envolvidos na biossíntese de arginina, é um potencial alvo para “*drug design*”, uma vez que a arginina é essencial para o crescimento dos microrganismos citados e essa via está presente nos patógenos e ausente no hospedeiro. As proteínas ArgRs de *C. botulinum*, *P. gingivalis*, *N. farcinica* e *C. pseudotuberculosis* fazem parte de uma minoria dos representantes dessas enzimas, pois apresentam o resíduo 115 com cadeia lateral curta, diferentemente da grande maioria que apresenta His ou Gln. Devido à dificuldade de purificação de proteínas bacterianas diretamente a partir de culturas de *C. botulinum*, *P. gingivalis*, *N. farcinica* e *C. pseudotuberculosis*, a expressão das proteínas ArgRs em *E. coli* viabiliza a produção em larga escala desses alvos para os estudos de interação e estruturais. Além disso, sabendo-se que a proteína purificada a partir de sistemas procarióticos pode ser encontrada ligada ao cofator, e que essa interação ocorre no citoplasma de *E. coli* e/ou durante a etapa de lise celular, a única forma de garantir a obtenção da proteína em sua forma apo é por meio de purificação em condições desnaturantes para que depois seja realizado o renovelamento. Ademais, o conhecimento dos mecanismos envolvidos na interação da ArgR dos patógenos com seus possíveis ligantes podem permitir, no futuro, encontrar moléculas que possam ocupar o sítio de ligação da arginina, induzir sua hexamerização via mecanismo alostérico e, conseqüentemente, aumentar sua afinidade pelo DNA, de forma que sua via de síntese seja interrompida e resulte na inibição da proliferação dos patógenos sem afetar a microbiota normal do hospedeiro, uma vez os microrganismos presentes no hospedeiro apresentam ArgR contendo His ou Gln na posição 115. O entendimento desses mecanismos poderá minimizar a incidência de patologias como botulismo, periodontite, nocardiose e linfadenite caseosa.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Vetor de expressão em *Escherichia coli*

Os vetores de expressão contendo as sequências nucleotídicas codificadoras das proteínas ArgR C-terminal de *N. farcinica*, *C. botulinum* e *P. Gingivalis*, mutante Pro115His de *C. pseudotuberculosis* e ArgR Full length de *N. farcinica*, fusionadas a uma cauda de histidina (His-tag) e apresentando sítio de clivagem para TEV-protease, foram sintetizados pela FastBio. O vetor utilizado foi o pET-28a(+) recombinante, o qual possui uma sequência codificadora de uma cauda de seis resíduos de histidina, fusionada à proteína expressa. Na Figura 8 estão representadas as sequências de aminoácidos que codificam as proteínas alvo.

Figura 8. Sequência de aminoácidos das proteínas recombinantes ArgR Full Length de *N. farcinica* (I), ArgR C-terminal de *N. farcinica* (II), ArgR C-terminal de *C. botulinum* (III), ArgR C-terminal de *P. gingivalis* (IV) e ArgR C-terminal mutante P115H de *C. pseudotuberculosis* (V). Em destaque, a cauda de histidina (roxo), o sítio de clivagem para a TEV-protease (azul-claro) e o resíduo de aminoácido Histidina 115 da ArgR mutante P115H de *C. pseudotuberculosis* em amarelo.

(I)	MSVSTPERGGAEQKGPAIARTRAGRQSRIVELLSAHA VRSQSELAALLAEGI ETTQATLSRDLDELGAVKLRAADGGAGVYVVPEDGSPVRGVTGGTDRLSKLL GDLLVSTDASGNIAVLRTPPGAAGYLASALDRAALPYVVGTIAGDDTIAVIARE PLTGAELA AKIEELA ENLYFQGGHHHHHH
(II)	GGTDRLSKLLGDLLVSTDASGNIAVLRTPPGAAGYLASALDRAALPYVVG GDDTIAVIAREPLTGAELA AKIEELA ENLYFQGGHHHHHH
(III)	YMSDKLINIFAQTVINVENIDKLIHKAIKSGSAPAAAEIDTLGFDGVAGTIAGDN TIFVMARTNEKAQEITMKLKKIITAGG ENLYFQSHHHHHH
(IV)	RPPSSRGELRIGRTEGFIGPVDTGEMLLLNTAEGHAARIASEIEELSAPEVADVFF GPTHIVVIGQKGTTRQALLCAIAPAPEVLRGG ENLYFQSHHHHHH
(V)	GTREKLRKMLDDLVSVDHSGNIAVLRTPPGA H FLASFIDRVGMEEVVG TIAGDD TVFVLARDPMTGQELGEFLSQRSGNGG ENLYFQGGHHHHHH

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Análise da sequência primária das proteínas de estudo

A análise da sequência primária das proteínas de estudo – ArgR C-terminal de *N. farcinica*, *C. botulinum*, *P. gingivalis*, mutante P115H de *C. pseudotuberculosis* e ArgR *Full Length* de *N. farcinica* – foi feita utilizando o programa ProtParam (web.expasy.org/protparam/), localizado a partir do servidor ExPASy (ca.expasy.org/). O programa ProtParam é uma ferramenta que permite a análise computacional de vários parâmetros físicos e químicos da proteína de estudo a partir da sequência de resíduos de aminoácidos. Esses parâmetros são importantes para avaliar quais métodos experimentais serão utilizados para a expressão e purificação proteica.

4.3 Transformação bacteriana para expressão proteica

Linhagens celulares competentes de *E. coli* C43(DE3), C41(DE3), BL21(DE3), BL21 STAR-(DE3), BL21(DE3)-RIL, BL21(DE3)-T1, Origami e Rosetta foram utilizadas em experimentos de transformação celular para encontrar o melhor rendimento da produção em larga escala das proteínas ArgR C-terminal de *N. farcinica*, *C. botulinum*, *P. gingivalis*, P115H de *C. pseudotuberculosis* e ArgR *Full Length* de *N. farcinica*. Inicialmente 80 ng de plasmídeos recombinantes foram adicionados a 50 μ L de solução contendo células competentes de *E. coli*. Essa mistura permaneceu no gelo durante 30 minutos, e então, foi submetida ao choque de temperatura a 42° C por 1 minuto seguida de 2 minutos no gelo. Após esse procedimento, as bactérias foram submetidas a agitação de 250 rpm por 1 hora a 37° C em meio líquido SOC. Em seguida, as bactérias foram selecionadas após cultivo em meio sólido seletivo LB contendo canamicina (30 μ g/ml). As colônias obtidas foram inoculadas em tubos individuais contendo 10 ml de meio líquido LB seletivo sob agitação e aeração constantes e utilizadas para expressão em pequena escala.

4.4 Testes iniciais de Expressão em *E. coli*

Inicialmente 5 ml do pré-inóculo foram transferidos para um novo tubo contendo 100 mL de meio líquido seletivo (LB + canamicina 30 μ g/mL). A amostra foi mantida sob agitação e aeração até atingir a densidade óptica (OD 550 nm) entre 0,4 e 0,6 para indução da expressão com IPTG. A leitura da amostra foi feita no espectrofotômetro *Spectronic Genesys 2*. Visando encontrar o maior rendimento de proteína solúvel pura/Litro de cultura, uma primeira análise da expressão de proteínas solúveis envolveu variações na densidade óptica antes da indução, temperatura de indução, concentração de indutor e tempo de expressão.

A indução da expressão foi feita sob diferentes temperaturas (17 à 37° C) variando o tempo de expressão a fim de obter proteínas na fração solúvel após a sonicação. A concentração ideal do indutor IPTG (0,1 mM a 0,5 mM) foi avaliada. A cultura foi centrifugada a 5000 x g, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em tampão de lise (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 500 mM, Glicerol 10%, 10 mM de Imidazol, pH 7.8). Após sonicação seguida de centrifugação a 17000 x g por 30 min, 15 uL da fração solúvel e insolúvel foi aplicado diretamente em SDS-PAGE para verificação da presença da proteína por *Western blot*.

4.5 Western blot

Para o procedimento, amostras das frações solúveis e insolúveis da expressão em pequena escala foram misturadas com tampão de amostra (1:1) e aplicadas em gel SDS-PAGE 15%. As proteínas, contidas no gel, foram transferidas para a membrana de nitrocelulose utilizando um eletrotransferidor (*Mini TransBlot Electrophoretic Transfer Cell Bio-Rad*) operando sob voltagem constante (100 V) por 1 hora. O tampão de transferência utilizado foi o Tris-Glicina (0,025 M Tris e 0,192 M Glicina) contendo metanol 20%. A membrana foi incubada com antissoro monoclonal Antipoli-histidina diluído 1:10.000 (produzido em camundongo; Sigma) e posteriormente com antissoro secundário Anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Sigma) diluído 1:30.000. A detecção da reação antígeno/anticorpo foi feita com a mistura de BCIP/NBT (*5-bromo-4chloro-3-indolyolphosphate/nitro-bluetetrazolium*) até o aparecimento do resultado da reação (coloração azul púrpura).

4.6 Expressão das proteínas alvo

As colônias isoladas de *E. coli* transformadas com vetores contendo os genes codificadores da ArgR C-terminal de *N. farcinica*, *C. botulinum*, *P. gingivalis*, mutante de *C. pseudotuberculosis* e ArgR *Full Length* de *N. farcinica* foram inoculadas em meio LB contendo canamicina (30 µg/ml) e o antibiótico de resistência de cada linhagem celular e mantidas sob agitação de 120 rpm por 16 horas a 37° C. Posteriormente, essas culturas foram diluídas 100 vezes em meio LB fresco contendo os antibióticos e incubadas a 37° C a 120 rpm até a densidade óptica (OD 550 nm) atingir 0,5, calculada em espectrofotômetro Biomate 3S (*Thermo Fisher Scientific*). Após atingir essa densidade, as culturas foram induzidas com 0,3

mM de IPTG e mantidas a 30° C sob agitação constante durante 5 horas. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas a 5000 x g durante 10 minutos a 4° C, os sobrenadantes foram descartados e as células precipitadas foram suspensas em tampão de lise 50 mM Fostato de Sódio, 500 mM NaCl, 10% de glicerol e 10 mM de Imidazol (pH 7,5). Após a adição do tampão, as células foram submetidas ao processo de lise celular por sonicação (4 pulsos de 40 segundos) em sonicador (Marconi - MA 103), e centrifugadas a 15.000 x g por 40 minutos a 4° C. O sobrenadante foi coletado para a realização das etapas de purificação.

4.7 Purificação das proteínas alvo

A primeira etapa de purificação das proteínas recombinantes foi por cromatografia de afinidade em Ni-Sepharose (*GE healthcare*) e posteriormente, em uma segunda etapa, os contaminantes das amostras contendo as proteínas foram removidos por meio de cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex G75 10/300 (GE) utilizando o sistema AKTA-pure. Além disso, também foi realizada a purificação por cromatografia de afinidade em condições desnaturantes.

4.7.1 Cromatografia de afinidade (Ni-Sepharose)

A purificação em coluna de afinidade utilizando resina Ni-Sepharose (*GE healthcare*) foi realizada conforme instruções do fabricante. Primeiramente, um volume de 2 ml de resina (Ni-Sepharose – *GE healthcare*) presentes em cada coluna de cromatografia de afinidade foi equilibrada com o mesmo tampão utilizado no processo de lise celular. Em seguida, cada coluna de purificação foi carregada com o sobrenadante do lisado celular obtido após centrifugação, para que as proteínas recombinantes fossem adsorvidas. Após a adsorção, a resina foi lavada utilizando tampão de lavagem (50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl e 10% glicerol, pH 7.7) com quantidades crescentes de imidazol para remover proteínas contaminantes adsorvidas inespecificamente na resina de níquel. Por fim, a proteína de interesse contendo a His-tag foi eluída utilizando tampão de eluição. As concentrações e volumes dos tampões utilizados são mostrados na tabela 2. Todas as amostras obtidas por meio das lavagens com variações crescentes na concentração de imidazol foram coletadas e analisadas em gel SDS-PAGE 15%, para verificar em qual delas as proteínas alvo foram eluídas.

Tabela 2. Tampões com diferentes concentrações de imidazol utilizados durante a etapa de purificação por cromatografia de afinidade.

Tampão	Concentração	Volume
Lise	50 mM NaH ₂ PO ₄ + 500 mM NaCl + 10% glicerol + 10 mM Imidazol	10 mL
Lavagem 1	50 mM NaH ₂ PO ₄ + 500 mM NaCl + 10% glicerol + 40 mM Imidazol	10 mL
Lavagem 2	50 mM NaH ₂ PO ₄ + 500 mM NaCl + 10% glicerol + 60 mM Imidazol	10 mL
Lavagem 3	50 mM NaH ₂ PO ₄ + 500 mM NaCl + 10% glicerol + 80 mM Imidazol	5 mL
Eluição	50 mM NaH ₂ PO ₄ + 500 mM NaCl + 10% glicerol + 400 mM imidazol	10 mL

Fonte: Elaborada pelo autor

4.7.2 Purificação sob condições desnaturantes

A purificação das proteínas sob condições desnaturantes, que garante os alvos livres de possíveis ligantes, foi realizada em coluna de afinidade utilizando resina de matriz de níquel conforme instruções do fabricante (GE Healthcare). O precipitado celular obtido após sonicação e centrifugação da cultura foi ressuspensionado em tampão desnaturante (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris HCl e 8 M ureia, pH 8,0). A suspensão foi novamente sonicada e centrifugada a 10.000 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi posteriormente aplicado em coluna de afinidade NI-NTA previamente equilibrada com o mesmo tampão desnaturante. Após a ligação, a matriz foi lavada com tampão 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris HCl, 8 M ureia e pH, respectivamente, 6,3 e 5,9. A eluição da proteína foi feita com mesmo tampão em pH 4,5. Após a purificação, as proteínas foram concentradas por centrifugação utilizando dispositivos *Amicon Ultra Centrifugal Filters* (3 kDa) e utilizadas para testes de *refolding*.

4.7.3 Cromatografia de exclusão molecular (AKTA-pure)

As amostras contendo as proteínas obtidas a partir da purificação por cromatografia de afinidade foram concentradas em dispositivos para concentração (*Amicon Ultra Centrifugal Filters* - 3 kDa) e submetidas à segunda etapa de purificação por gel filtração em coluna Superdex G75 10/300 (GE) equilibrada com tampão 20 mM Tris HCl e 100 mM NaCl em pH 7,5, utilizando o sistema AKTA-pure (*GE-Healthcare Life Sciences*). As amostras referentes aos picos do cromatograma foram coletadas e analisadas por meio de gel de poliácridamida (SDS-PAGE 15%) e *Western blot*.

4.8 Renovelamento

Para o renovelamento das proteínas desnaturadas utilizaram-se protocolos de diluição rápida em tampão de renovelamento, no qual a solução desnaturante contendo 8 M de ureia é diluída até a concentração final de 0,05 mM, enquanto a proteína de interesse é diluída até a concentração 10-100 µg/ml. As proteínas de interesse foram diluídas em tampão de renovelamento mantido à 5° C e sob agitação constante durante cinco minutos. Baseando-se no ponto isoelétrico das proteínas, foram formulados diferentes tampões de renovelamento (Tabela 3). Após o renovelamento as proteínas foram dialisadas contra tampão 20 mM Tris HCl e 100 mM NaCl (pH 7,5) e tampão PBS 1x (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ e 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,5), concentradas por centrifugação utilizando dispositivos *Amicon Ultra Centrifugal Filters* (3 kDa) e utilizadas para os ensaios de Dicroísmo Circular (CD) e Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).

Tabela 3. Tampões de renovelamento testados durante etapa de *refolding* das proteínas em estudo.

Tampões de Renovelamento	
1	50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 1 mM DTT e 500 mM L-arginina, pH 7,5
2	50 mM Tris HCl, 100 mM NaCl, 1 mM Glutathiona Reduzida, 1 mM EDTA, 500 mM L-arginina, 20 % glicerol, pH 7,5
3	50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 0,5 mM DTT e 1 M NDSB 201 [3-(1-piridino)-1-propano sulfonato)], pH 7,5
4	30 mM NaH ₂ PO ₄ , 200 mM NaCl e 20% glicerol, pH 7,5
5	30 mM Citrato de Sódio, 200 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 6,2
6	30 mM Citrato de Sódio, 200 mM NaCl, 500 mM L-arginina, pH 6.2
7	30 mM Citrato de Sódio, 200 mM NaCl, 1 M NDSB 201[3-(1-piridino)-1-propano sulfonato)], pH 6.2
8	30 mM Acetato de sódio, 30 mM NaCl e 1% glicerol, pH 5.5

Fonte: Elaborada pelo autor

4.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15%

Para a verificação das etapas de purificação foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE 15%), possibilitando a separação das proteínas de acordo com a massa molecular. Primeiramente, a proteína purificada foi transferida para microtubos, desnaturada em tampão de amostra 3x (Tris HCl 0,5 M pH 6,8; SDS 10%; β -mercaptoetanol; glicerol; azul de bromofenol; água q.s.p.), posteriormente fervida por 3 minutos e 10 μ L do sobrenadante foram aplicados em gel de poliacrilamida 15%, assim como o marcador molecular. O gel de poliacrilamida foi previamente preparado e incubado juntamente com o tampão de corrida (25 mM Trisma Base, 250 mM Glicina, SDS 10% e água q.s.p.), que permite que o pH permaneça neutro. A eletroforese foi conduzida por aproximadamente 90 minutos à 100 V no aparelho Protean II, à uma corrente elétrica de 130 mA e 50 Watts. Após esse procedimento, o gel foi fixado e corado em mistura contendo metanol, água, ácido acético (50:50:10) e *Comassie Blue* 0,25% por 10 horas e descorado com metanol e água (1:1), permitindo a visualização do resultado.

4.10 Dicroísmo circular (CD)

Para a determinação dos componentes da estrutura secundária e confirmação do enovelamento proteico, foram realizados experimentos de dicroísmo circular (CD). Primeiramente as proteínas foram dialisadas em tampão 5 mM NaH_2PO_4 e 50 mM NaF (pH 7,4), utilizando a membrana de diálise Fischerbrand (MWCO 6.000-8.000) e a concentração proteica das amostras foi calculada por meio de espectrofotômetro Biomate 3S (*Thermo Fisher Scientific*).

Os espectros UV-CD foram coletados no espectropolarímetro Jasco J-710 (Jasco, Brasil) em temperatura constante de 25° C e utilizando uma cubeta de quartzo de 0,5 mm. Para a coleta, adotou-se o intervalo de 200-260 nm, com varredura de 50 nm/min, tempo de resposta de 1 segundo, largura de banda espectral de 1 nm, resolução espectral de 0,2 nm e número de acumulações igual a 10. Após a obtenção dos dados, todos os espectros de CD registrados em miligraus foram corrigidos, subtraindo o espectro da solução tampão (5 mM NaH_2PO_4 e 50 mM NaF, pH 7,4) obtido em condições idênticas, e convertidos em elipticidade molar em unidades de $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ pelo software *OriginLab 7*. As porcentagens das estruturas secundárias foram estimadas pelo software CONTINLL do pacote de programas de deconvolução espectral CDPro, utilizando o conjunto de referências de proteínas SP29. Os valores de RMSD (Desvio Quadrático Médio da Raiz) foram determinados e avaliados.

4.11 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Após confirmação do renovelamento, as amostras de proteínas foram submetidas a ensaios de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) em aparelho Zetasizer Nano series S90 (*Malvern Instruments*) para análise do estado oligomérico das proteínas com e sem adição de possíveis ligantes. Para realização dos experimentos, as amostras em tampão 20 mM Tris HCl e 100 mM NaCl (pH 7,5) e em PBS 1x, foram previamente centrifugadas durante 40 minutos a 14.000 x g em temperatura de 10° C. As medidas de DLS foram realizadas utilizando o software Zetasizer e em todas as análises foram realizadas 10 varreduras de 30 segundos em temperatura constante de 25° C.

4.12 Ensaios de cristalização

Os *screenings* iniciais das condições de cristalização das proteínas foram realizados pelo método de difusão de vapor em *sitting drop* utilizando o robô *Janus Automated Workstation* (PerkinElmer). As temperaturas de incubação testadas foram de 4° C e 20° C. Os kits comerciais da *Hampton Research* (*Crystal Screen 1 e 2*, *SaltRx HT*, *PEG/Ion 1 e 2*) e *Qiagen* (*PACT Suite*, *JCSG*, *AmSO4 Suite* e *NexTal*) foram utilizados, e para cada uma das condições de cada um dos kits foram aplicadas na gota a solução de proteína concentrada e solução de precipitante nas proporções 1:1, 1:2 e 2:1. Devido à obtenção de cristais iniciais, iniciou-se a fase de refinamento pela técnica de difusão de vapor em *hanging drop*, envolvendo alterações no pH das soluções, concentração do precipitante, concentração da proteína, temperatura de armazenamento das placas e adição dos reagentes do *Additive Screen-Hampton*, e dos kits *Detergent screen 1, 2 e 3*. Os cristais de tamanhos considerados adequados foram utilizados pelo nosso grupo de pesquisa para experimentos de difração de raios-X visando resolver as estruturas tridimensionais das proteínas. Os dados de difração foram coletados de um único cristal congelado em uma corrente de nitrogênio gasoso de 100 K na linha de luz W01B-MX2 no Laboratório Brasileiro de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil).

4.13 Construção de Modelos Tridimensionais por modelagem comparativa

Primeiramente, as sequências das ArgRs C-terminal de *N. farcinica*, *C. botulinum* e *P. gingivalis* foram alinhadas com todas as proteínas homólogas que possuíam estruturas cristalográficas no bando de dados Protein Data Bank (PDB - <https://www.rcsb.org/>) usando o programa MUSCLE no site <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>. O alinhamento múltiplo de sequências de aminoácidos das proteínas em estudo permite comparar suas sequências com as sequências de proteínas de outros organismos para identificar aminoácidos conservados e não conservados.

O servidor *Web Swissmodel* (<https://swissmodel.expasy.org/>) foi empregado para escolher o melhor molde para a construção dos modelos tridimensionais e para a avaliação da qualidade dos modelos gerados. Esta ferramenta busca por sequências depositadas no PDB, que apresentam estrutura cristalográfica definida, e permite encontrar modelos segundo as recomendações encontradas na literatura (VERLI, 2014). Para avaliar a qualidade da estrutura gerada, foi analisado o gráfico de Ramachandran (RAMACHANDRAN; SASISEKHARAN, 1968) e os valores de *QMEAN* (*Qualitative Model Energy ANalysis*) e *GMQE* (*Global Model Quality Estimation*) gerados pelo SWISS MODEL. Os modelos tridimensionais foram gerados utilizando o programa *Pymol v. 2.3.0* com o plugin *Mutagenesis*, que permite realizar mutações pontuais.

4.14 Simulações de dinâmica molecular

O primeiro passo na configuração da simulação de dinâmica molecular foi a parametrização das moléculas estudadas. As cargas parciais para os aminoácidos Tyr e Arg, para os quais não há parâmetros disponíveis nos campos de força *Amber*, foram retiradas da literatura (WANG et al., 2004). As proteínas foram totalmente parametrizadas com campo de força *Amber14SB* após a protonação em pH = 7,0 usando o servidor da web PDB2PQR (CASE et al., 2016). Cada complexo foi incorporado em uma caixa octaédrica, tendo uma distância mínima de soluto-parede de 10,1 Å e preenchido com moléculas de água TIP3P e uma quantidade neutralizante de contra-íons (Na⁺). As etapas anteriores foram realizadas com o programa *leap* do *Amber16 suite*. Moléculas de água cristalográficas e íons foram incluídos nas simulações de dinâmica molecular, a menos que indicado de outra forma. As coordenadas iniciais dos complexos foram retiradas das estruturas cristalinas ou geradas por sobreposição estrutural usando *Pymol v. 2.3.0* (DELANO, 2002).

Os sistemas solvatados foram simulados em $T = 298$ K por até 50 ns no conjunto NVT para avaliar suas estabilidades de tempo. Antes das rodadas de produção, as etapas apropriadas de minimização e equilíbrio foram realizadas com pmemd do Amber16, seguindo um protocolo estabelecido (HERNANDEZ GONZALEZ et al., 2017). Além disso, após a última etapa de equilíbrio do NPT, as restrições de átomos pesados foram gradualmente reduzidas de 10 para 0 kcal . \AA^{-2} . mol⁻¹ durante 2 ns no conjunto NPT usando pmemd.cuda. Durante as execuções de produção, os quadros foram coletados a cada 10 ps.

Além disso, múltiplas simulações independentes de 5 ns de cada complexo estudado foram realizadas a fim de calcular as energias livres efetivas (ΔG_{eff}). As 20 réplicas de cada complexo diferiram em suas respectivas velocidades iniciais, que foram sorteadas aleatoriamente a partir de uma distribuição de Maxwell-Boltzmann em $T = 10$ K durante a etapa de aquecimento. A estrutura inicial de cada complexo submetido a múltiplas simulações curtas de dinâmica molecular foi calculada por meio de análise de agrupamento da respectiva simulação de 50 ns, conforme explicado a seguir. Todas as simulações produtivas de 5 ns foram precedidas pelo mesmo protocolo de equilíbrio mencionado anteriormente.

4.15 Cálculos de energia livre MM-GBSA

A abordagem MM-GBSA foi empregada para calcular as energias livres de ligação efetiva (ΔG_{eff}) para os sistemas analisados usando o programa MMPBSA.py do Amber16. A ΔG_{eff} corresponde à contribuição entálpica para a energia livre de ligação, que inclui *Van der Waals*, termos de solvatação eletrostática, polar e apolar, e despreza a entropia configuracional. Apesar dessa aproximação, ΔG_{eff} geralmente é suficiente para classificar os sistemas semelhantes, por exemplo, ligantes direcionados à mesma proteína, em termos de afinidade, porque a contribuição da entropia tende a ser aproximadamente constante (MILLER et al., 2012). Em todos os casos, avaliamos os valores de ΔG_{eff} para a interação de um único aminoácido (Tyr ou Arg) com a proteína (várias formas multiméricas de ArgR), sendo os locais de ligação restantes ocupados pelo aminoácido. As energias livres médias foram calculadas a partir dos resultados obtidos nas 20 simulações independentes de 5 ns de cada complexo.

4.16 Análise de trajetória

Estabilidades de tempo durante as simulações de dinâmica molecular foram avaliadas calculando os valores RMSD instantâneos para os átomos pesados dos ligantes (Tyr e Arg), ajustando todas as trajetórias e considerando os átomos do *backbone* do receptor de suas respectivas estruturas iniciais como referência. Estruturas representativas foram calculadas usando o algoritmo de ligação média e considerando os valores de RMSD em relação aos ligantes e resíduos da interface, ou seja, aqueles em contato com os ligantes a uma distância ≤ 4 Å (SHAO et al., 2007). As ligações de hidrogênio nas interfaces complexas foram avaliadas durante as simulações de dinâmica molecular com os critérios geométricos padrão. As distâncias entre pares de átomos também foram calculadas com o comando de distância.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise da sequência primária das proteínas alvo

Informações relevantes, como massa molecular das proteínas, ponto isoelétrico teórico (pI) e número de resíduos de aminoácidos foram obtidas usando a ferramenta ProtParam (ExpASy), permitindo um estudo mais detalhado das proteínas alvo e análise dos resultados obtidos durante os experimentos (Tabela 4).

O número de aminoácidos e a massa molecular auxiliam a identificação das proteínas alvo durante experimentos pelo seu tamanho em kDa. Além disso, o ponto isoelétrico teórico das proteínas também é um parâmetro importante a ser analisado para determinar o pH do tampão adequado. O ponto isoelétrico de uma proteína corresponde ao valor de pH em que a molécula se encontra eletricamente neutra, ou seja, quando o número de cargas positivas for igual ao número de cargas negativas. O pI das proteínas é determinado experimentalmente, sendo considerado o pH no qual a molécula não migra quando submetida a um campo elétrico (eletroforese), no entanto é possível fazer uma avaliação aproximada por meio de preditores. Cada proteína possui um pI característico, que reflete a proporção entre aminoácidos ácidos e básicos. Desta forma, foram escolhidos tampões baseados em informações do pI de forma que as proteínas apresentaram carga líquida positiva em pH menor que o pI e carga líquida negativa em pH maior que o pI.

Tabela 4. Dados das sequências primárias das proteínas ArgRs *Full Length* de *N. farcinica* e C-terminal de *N. farcinica*, *C. botulinum*, *P. gingivalis* e *C. pseudotuberculosis*, obtidos pelo programa ProtParam (ExpASy).

Proteínas	Aminoácidos	Massa Molecular (Da)	pI Teórico
<i>ArgR Full Length de N. farcinica</i>	189	19412.79	5.61
<i>ArgR C-terminal de N. farcinica</i>	93	9620.81	5.53
<i>ArgR C-terminal de C. botulinum</i>	96	10444.97	6.29
<i>ArgR C-terminal de P. gingivalis</i>	102	11035.48	6.03
<i>ArgR C-terminal mutante de C. pseudotuberculosis</i>	97	10657.93	6.02

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Expressão das proteínas alvo

Os protocolos para a expressão das proteínas ArgRs de *N. farcinica*, *C. botulinum*, *P. gingivalis* e *C. pseudotuberculosis* foram estabelecidos. Das diferentes linhagens de *E. coli* testadas, as que proporcionaram um melhor desempenho na expressão das proteínas alvo foram as linhagens BL21(DE3)-T1 para a ArgR de *P. gingivalis* e *C. pseudotuberculosis* e BL21(DE3)-RIL para as ArgRs de *N. farcinica* e *C. botulinum* (Tabela 5) em 1 L de meio LB na presença do indutor IPTG a 0,3 mM em temperatura de 30° C por 5 horas. Outras variações desses parâmetros foram testadas, mas os resultados foram similares ou mostraram-se menos eficientes. Ainda, após a expressão bacteriana, definiu-se a solução tampão mais eficiente para o processo de lise celular, sendo essa composta por 50 mM Fosfato de Sódio, 500 mM NaCl, 10% glicerol e 10 mM Imidazol (pH 7,5).

A proteína ArgR de *C. botulinum* apresentou uma baixa solubilidade e por conta disso, visando aumentar a solubilidade proteica, foram utilizados vários métodos descritos na literatura. Dentre eles foram testados a diminuição da temperatura de indução, variação na concentração do indutor IPTG, adição de 0,5 M de Sorbitol e 1 mM de Betaína na cultura celular e aditivos como Glicerol 20%, N-Sarkosyl 0,05%, aminoácidos como L-Arginina 50 mM e detergentes como Triton X-100 2% e Tween-20 1% no tampão de lise. Aditivos (co-solventes) específicos podem facilitar a dobragem proteica, desestabilizar a formação de agregados e melhorar a estabilidade, aumentando, desse modo, a solubilidade. Entretanto, nenhum desses métodos gerou um resultado significativo na solubilidade proteica, desse modo, essa proteína foi purificada em condições desnaturantes, já que agentes desnaturantes como a ureia são usados para diminuir a interação covalente entre as moléculas da proteína, melhorando dessa forma o rendimento do material solúvel.

Tabela 5. Linhagens de *E. coli* competentes utilizadas na otimização da expressão das proteínas ArgRs recombinantes e suas vantagens.

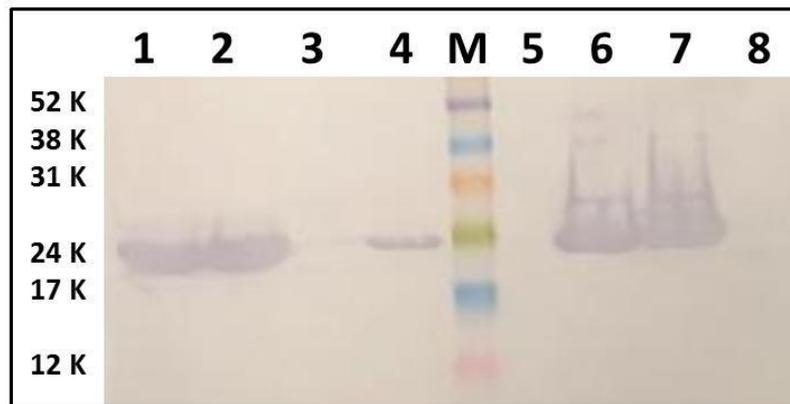
Linhagem de <i>E. coli</i>	Indução	Vantagens
BL21 (DE3)-T1	Indução por IPTG da RNA polimerase T7, que está sob controle do promotor lacUV5.	Possui ausência de atividade proteolítica, que pode reduzir a degradação de algumas proteínas heterólogas expressas na linhagem. Adequada para indução de alto nível.
BL21 (DE3)-Ril	Indução por IPTG da RNA polimerase T7, que está sob controle do promotor lacUV5.	Linhagem adequada para indução de alto nível.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Western blot

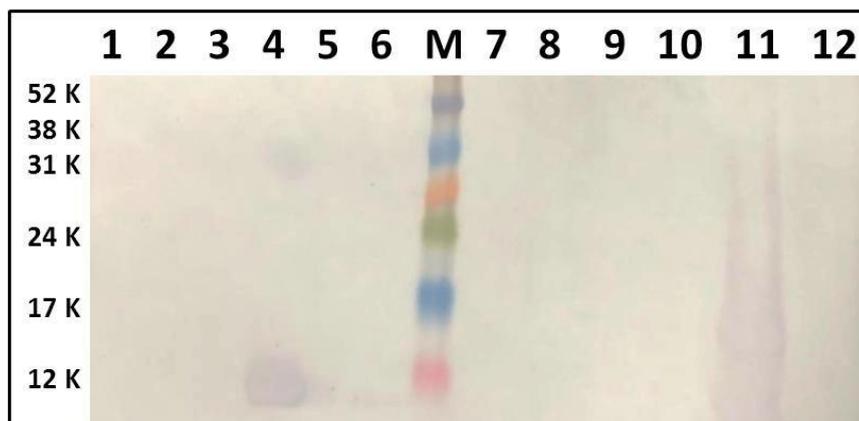
A confirmação da expressão das proteínas ArgRs de *N. farcinica*, *C. botulinum*, *P. gingivalis* e *C. pseudotuberculosis* foi realizada por meio de *Western blot*, utilizando anticorpo primário Anti-poli-histidina, que reconhece a cauda de histidina presente na proteína alvo, e Anti-IgG que reconhece o anticorpo primário. Este último é conjugado com uma enzima, a fosfatase alcalina. Após a aplicação da mistura BCIP/NBT é possível observar a coloração azul-púrpura apenas quando ocorre a reação antígeno/anticorpo, ou seja, na presença da proteína. Dessa forma, constatou-se que os métodos utilizados para a transformação e expressão das proteínas alvo foram satisfatórios, como demonstrado na Figura 9, 10, 11, 12 e 13.

Figura 9. Resultado do *Western blot* para detecção da proteína ArgR *Full Length* de *N. farcinica* durante etapa de expressão em pequena escala (testes iniciais de expressão) para determinar a linhagem celular ideal de *E. coli*. (M) Marcador molecular (*Amersham ECL Rainbow Marker – GE Healthcare*) em kDa. (1) Fração solúvel da ArgR *Full Length* linhagem BL21(DE3)-T1. (2) Fração solúvel da ArgR *Full Length* linhagem BL21(DE3)-RIL. (3) Fração solúvel da ArgR *Full Length* linhagem C41(DE3). (4) Fração solúvel da ArgR *Full Length* linhagem BL21 STAR-(DE3). (5) Fração insolúvel da ArgR *Full Length* linhagem BL21 STAR-(DE3). (6) Fração insolúvel da ArgR *Full Length* linhagem BL21(DE3)-RIL. (7) Fração insolúvel da ArgR *Full Length* linhagem BL21(DE3)-T1. (8) Fração insolúvel da ArgR *Full Length* linhagem C41(DE3).



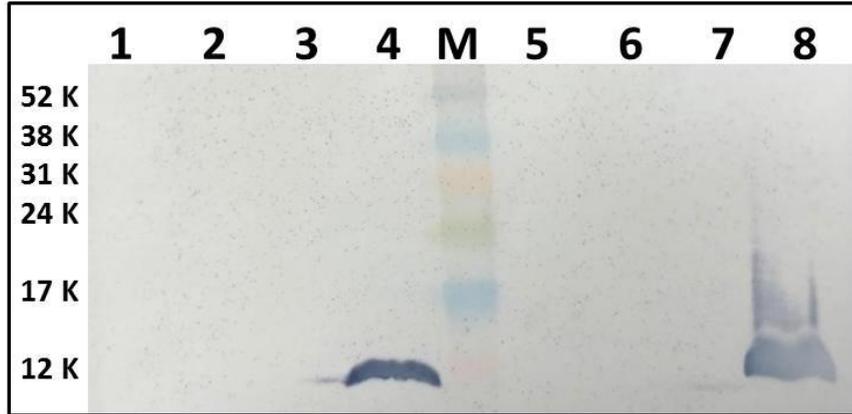
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 10. Resultado do *Western blot* para detecção das proteínas ArgR *Full Length* e C-terminal de *N. farcinica* durante etapa de expressão em pequena escala (testes iniciais de expressão) para determinar a linhagem celular ideal de *E. coli*. (M) marcador molecular (*Amersham ECL Rainbow Marker – GE Healthcare*) em kDa; (1) Fração solúvel da ArgR *Full Length* linhagem BL21(DE3)-T1. (2) Fração solúvel da ArgR *Full Length* linhagem C43(DE3). (3) Fração solúvel da ArgR *Full Length* linhagem C41(DE3). (4) Fração solúvel da ArgR C-terminal linhagem BL21(DE3)-RIL. (5) Fração solúvel da ArgR C-terminal linhagem C43(DE3). (6) Fração solúvel da ArgR C-terminal linhagem C41(DE3). (7) Fração insolúvel da ArgR *Full Length* linhagem BL21(DE3)-T1. (8) Fração insolúvel da ArgR *Full Length* linhagem C43(DE3). (9) Fração insolúvel da ArgR *Full Length* linhagem C41(DE3). (10) Fração insolúvel da ArgR C-terminal linhagem C43(DE3). (11) Fração insolúvel da ArgR C-terminal linhagem BL21(DE3)-RIL. (12) Fração insolúvel da ArgR C-terminal linhagem C41(DE3).



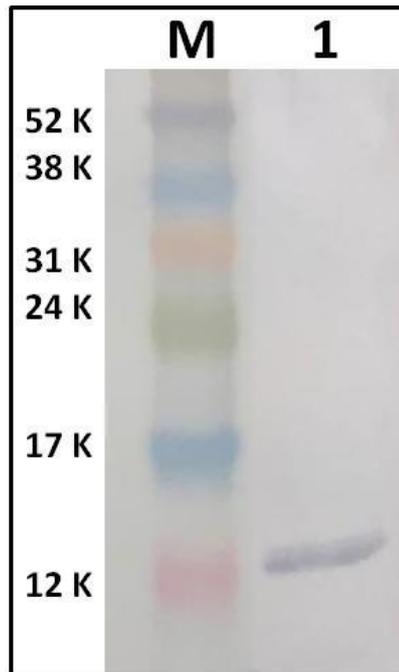
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 11. Resultado do *Western blot* para detecção da proteína ArgR C-terminal de *C. botulinum* durante etapa de expressão em pequena escala (testes iniciais de expressão) visando aumentar a solubilidade da proteína. (M) marcador molecular (*Amersham ECL Rainbow Marker – GE Healthcare*) em kDa. (1) Fração insolúvel da ArgR linhagem BL21 STAR-(DE3) com tampão de lise com 1% de Tween. (2) Fração insolúvel da ArgR linhagem BL21(DE3)-T1 com 1% de Tween. (3) Fração insolúvel da ArgR linhagem C41(DE3) com 1% de Tween. (4) Fração insolúvel da ArgR linhagem BL21(DE3)-RIL com 1% de Tween. (5) Fração insolúvel da ArgR linhagem BL21 STAR-(DE3) com 2% de Triton. (6) Fração insolúvel da ArgR linhagem BL21(DE3)-T1 com 2% de Triton. (7) Fração insolúvel da ArgR linhagem C41(DE3) com 2% de Triton. (8) Fração insolúvel da ArgR linhagem BL21(DE3)-RIL com 2% de Triton.



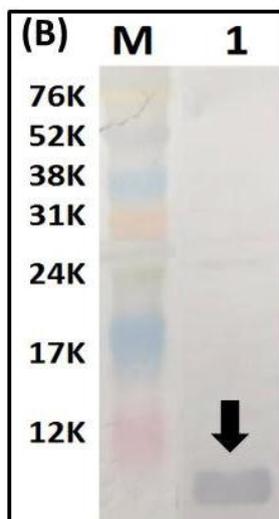
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 12. Resultado do *Western blot* para detecção da proteína ArgR C-terminal de *P. gingivalis* durante etapa de expressão em pequena escala (testes iniciais de expressão) visando aumentar a solubilidade da proteína. (M) marcador molecular (*Amersham ECL Rainbow Marker – GE Healthcare*) em kDa. (1) Fração solúvel da ArgR C-terminal de *P. gingivalis* linhagem BL21(DE3)-T1.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 13. Resultado do *Western blot* para detecção da proteína ArgR mutante P115H de *C. pseudotuberculosis* durante etapa de expressão em pequena escala (testes iniciais de expressão) visando aumentar a solubilidade da proteína. (M) Marcador molecular (*Amersham ECL Rainbow Marker – GE Healthcare*) em kDa. (1) Fração solúvel da ArgR mutante P115H de *C. pseudotuberculosis* linhagem BL21(DE3)-T1.



Fonte: Elaborado pelo autor.

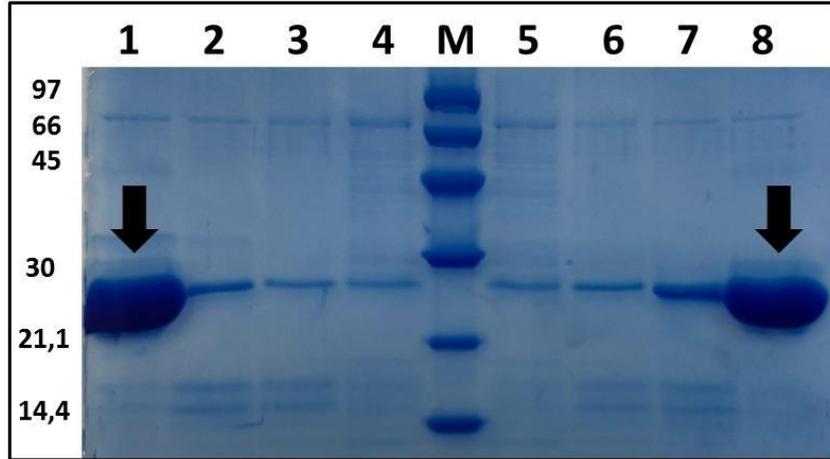
5.4 Purificação das proteínas recombinantes

5.4.1 Purificação por cromatografia de afinidade (Ni–Sepharose) em condição nativa

A metodologia utilizada na primeira etapa de purificação das proteínas ArgRs de *N. farcinica*, *P. gingivalis* e *C. pseudotuberculosis* foi a cromatografia de afinidade, na qual foram testados tampões de lavagem com concentrações crescentes de imidazol para a eliminação de proteínas contaminantes que se encontravam adsorvidas à resina (Ni-NTA) juntamente com a proteína alvo. O protocolo proposto anteriormente foi seguido: 10mL de tampão de lise (50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 10% glicerol) contendo 10 mM de imidazol, 10 mL de tampão de lavagem contendo 40 mM de imidazol, 10 mL de tampão de lavagem contendo 60 mM de imidazol, 5mL de tampão contendo 80 mM de imidazol e 10 mL de tampão de eluição contendo 400 mM de imidazol sendo que inicialmente todas as lavagens foram coletadas para determinar em qual concentração de imidazol as proteínas alvo estavam sendo liberadas.

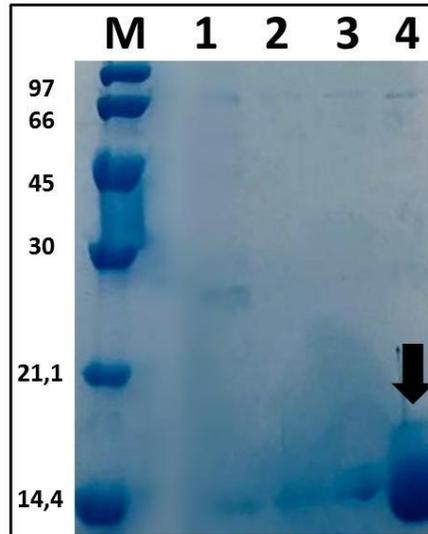
Após a conclusão da primeira etapa de purificação as amostras obtidas por meio das diferentes lavagens foram aplicadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%) e submetidas à eletroforese para verificar o sucesso da purificação por cromatografia de afinidade (Ni-Sepharose) de acordo com a Figura 14, 15, 16 e 17.

Figura 14. SDS-PAGE 15% evidenciando as lavagens com diferentes concentrações de Imidazol realizadas durante a purificação por cromatografia de afinidade da proteína ArgR *Full Length* de *N. farcinica*. (M) Marcador molecular (*LMW-SDS Marker KIT – GE Healthcare*) em kDa. (1) ArgR *Full Length* linhagem BL21(DE3)-T1 durante lavagem com 400 mM de Imidazol (eluição). (2) 80 mM de Imidazol. (3) 60 mM de Imidazol. (4) 40 mM de Imidazol. (5) ArgR *Full Length* linhagem BL21(DE3)-RIL durante lavagem com 40 mM de Imidazol. (6) 60 mM de Imidazol. (7) 80 mM de Imidazol e (8) eluição com 400 mM de Imidazol.



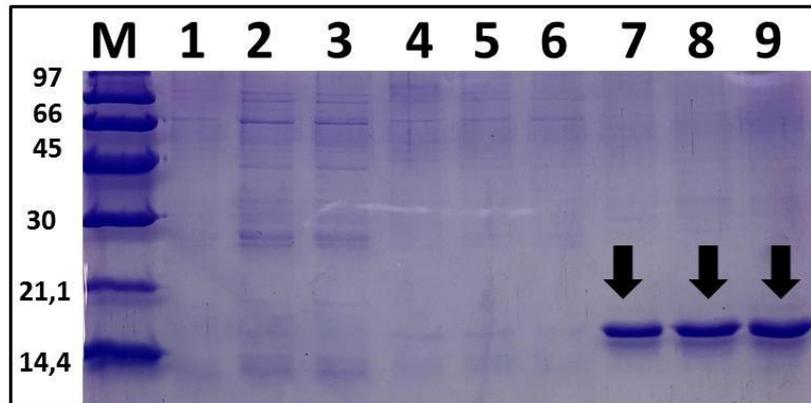
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15. SDS-PAGE 15% evidenciando as lavagens com diferentes concentrações de Imidazol realizadas durante a purificação por cromatografia de afinidade da proteína ArgR C-terminal de *N. farcinica* linhagem BL21(DE3)-RIL. (M) Marcador molecular (*LMW-SDS Marker KIT – GE Healthcare*) em kDa. (1) Lavagem com 40 mM de Imidazol. (2) 60 mM de Imidazol. (3) 80 mM de Imidazol. (4) 400 mM de Imidazol (eluição).



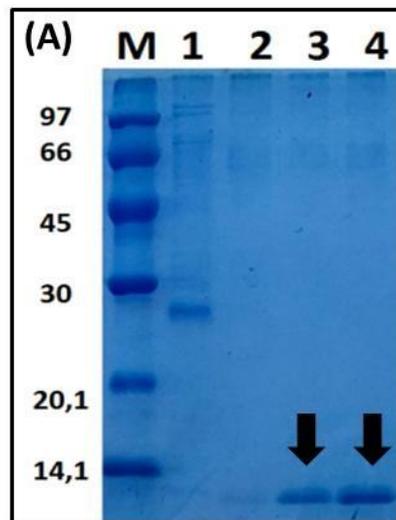
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 16. SDS-PAGE 15% evidenciando as lavagens com diferentes concentrações de Imidazol realizadas durante a purificação por cromatografia de afinidade da proteína ArgR C-terminal de *P. gingivalis* linhagem BL21(DE3)-T1. (M) Marcador molecular (*LMW-SDS Marker KIT – GE Healthcare*) em kDa. (1, 2 e 3) Lavagem com 60 mM de Imidazol. (4,5 e 6) 80 mM de Imidazol e (7,8 e 9) 400 mM de Imidazol (eluição).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 17. SDS-PAGE 15% evidenciando a eficiência da purificação por cromatografia de afinidade da ArgR mutante de *C. pseudotuberculosis*. (M) Marcador molecular (*LMW-SDS Marker KIT – GE Healthcare*) em kDa. (1) Lavagem da ArgR P115H com tampão 40 mM de imidazol. (2) 60 mM Imizadol. (3) 80 mM Imizadol. (4) 400 mM Imizadol.



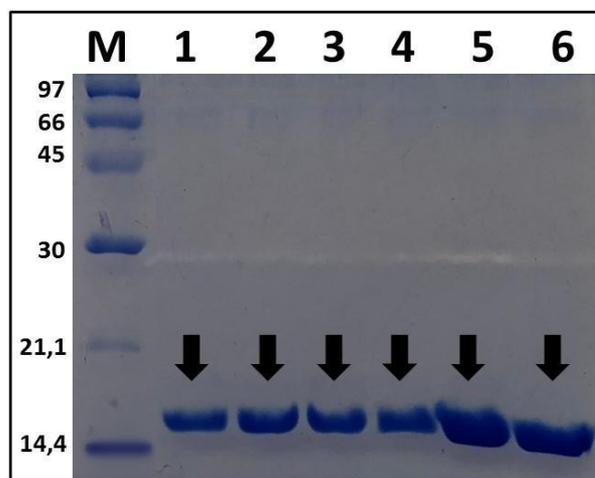
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4.2 Purificação por cromatografia de afinidade (Ni–Sephrose) em condição desnaturante

O protocolo que garantiu maior sucesso no processo de purificação desnaturante foi a realização de uma primeira lavagem com 10 mL de tampão desnaturante (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris HCl e 8 M ureia pH 8,0) seguida de lavagens com mesmo tampão em pH 6,3, pH 5,9 e finalizando com 10 ml do tampão em pH 4,5. O pH decrescente de cada solução atua

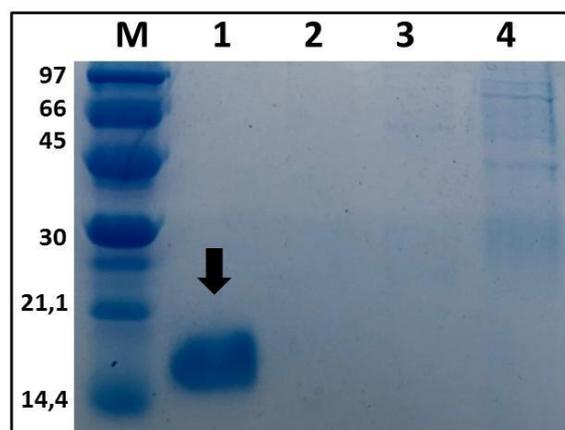
protonando o aminoácido histidina e com essa mudança de carga a interação com níquel se perde. Quando a solução utilizada é demasiadamente ácida (pH 4,5), todas as histidinas param de interagir com a matriz de níquel, permitindo a liberação da proteína alvo. A confirmação da purificação desnaturante das proteínas ArgRs de *N. farcinica*, *C. botulinum*, *P. gingivalis* e *C. pseudotuberculosis* foi realizada por meio de SDS-PAGE 15% (Figura 18, 19, 20 e 21), o qual indicou as amostras com um alto grau de pureza e elevada concentração.

Figura 18. SDS-PAGE 15% evidenciando a purificação por cromatografia de afinidade da proteína ArgR C-terminal de *P. gingivalis* em tampão desnaturante (8 M de ureia, 10 mM Tris HCl, 100 mM NaH₂PO₄). (M) Marcador molecular (*LMW-SDS Marker KIT – GE Healthcare*) em kDa. (1 e 2) Lavagem com tampão ureia pH 6,6. (3 e 4) Lavagem com tampão ureia pH 5,9. (5 e 6) Lavagem com tampão ureia pH 4,4 (eluição).



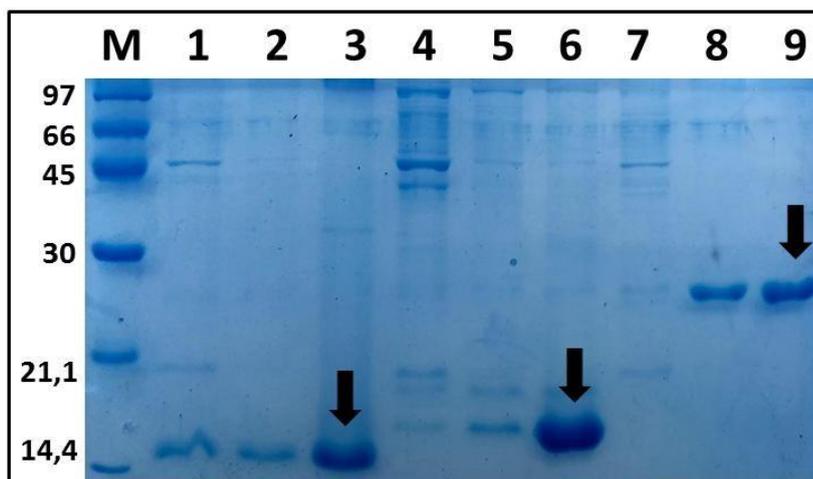
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 19. SDS-PAGE 15% evidenciando a purificação por cromatografia de afinidade da proteína ArgR C-terminal de *C. botulinum* linhagem BL21(DE3)-RIL em tampão desnaturante (8 M de ureia, 10 mM Tris HCl, 100 mM NaH₂PO₄). (M) Marcador molecular (*LMW-SDS Marker KIT – GE Healthcare*) em kDa. (1) Lavagem com tampão ureia pH 4,4 (eluição). (2) Lavagem com tampão ureia pH 5,9. (3) Lavagem com tampão ureia pH 6,6. (4) Lavagem com tampão ureia pH 8,2.



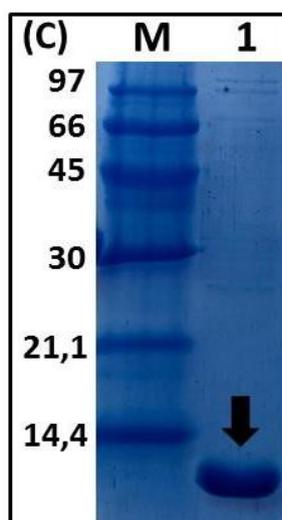
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 20. SDS-PAGE 15% evidenciando a purificação por cromatografia de afinidade das proteínas ArgR C-terminal de *C. botulinum* e *P. gingivalis* e ArgR Full Length de *N. farcinica* em tampão desnaturante (8 M de ureia, 10 mM Tris HCl, 100 mM NaH₂PO₄). (M) Marcador molecular (LMW-SDS Marker KIT – GE Healthcare) em kDa. (1) ArgR de *C. botulinum* em tampão ureia pH 6,6. (2) Tampão ureia pH 5,9. (3) Tampão ureia pH 4,4. (4) ArgR de *P. gingivalis* em tampão ureia pH 6,6. (5) Tampão ureia pH 5,9. (6) Tampão ureia pH 4,4. (7) ArgR Full Length de *N. farcinica* em tampão ureia pH 6,6. (8) Tampão ureia pH 5,9. (9) Tampão ureia pH 4,4.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 21. SDS-PAGE 15% evidenciando a purificação por cromatografia de afinidade da proteína ArgR mutante P115H de *C. pseudotuberculosis* em tampão desnaturante (8 M de ureia, 10 mM Tris HCl, 100 mM NaH₂PO₄). (M) Marcador molecular (LMW-SDS Marker KIT – GE Healthcare) em kDa. (1) ArgR Pro115His linhagem BL21(DE3)-T1 durante lavagem com tampão ureia pH 4,4.



Fonte: Elaborado pelo autor.

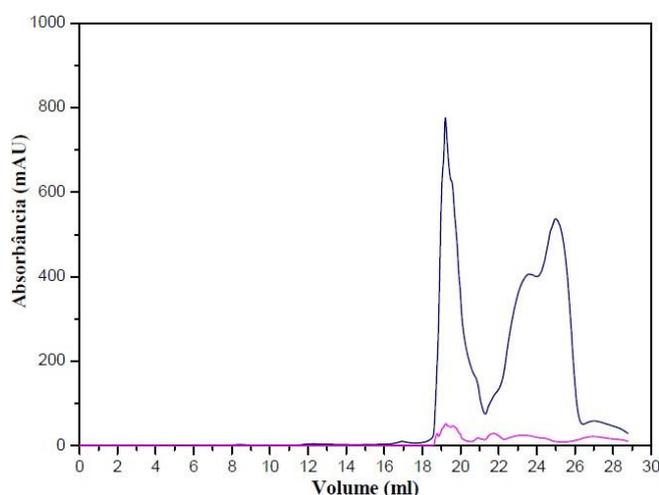
5.4.3 Purificação por cromatografia de exclusão molecular

A segunda etapa de purificação das ArgRs de *N. farcinica* e *P. gingivalis* nativas foi feita por cromatografia de exclusão molecular monitorada em AKTA-purifier para garantir um maior grau de pureza das amostras visando separar as proteínas alvo das contaminantes

pelo seu tamanho. Essa técnica de separação utiliza colunas empacotadas com polímeros contendo esferas de tamanho específico, que formam uma rede tridimensional de poros, proporcionando assim, a separação das moléculas em solução de acordo com seu tamanho (MM). As matrizes destas colunas permitem que as proteínas que apresentam maior MM migrem mais rapidamente do que proteínas com menor MM. Isso ocorre devido a não interação delas com os poros, enquanto as proteínas de MM menor permeiam por entre os poros da matriz e são eluídas mais lentamente. Para a proteína ArgR de *C. botulinum* não foi necessário a realização dessa segunda etapa de purificação, devido ao alto grau de pureza observado na amostra em tampão desnaturante pH 4,4 (Figura 19).

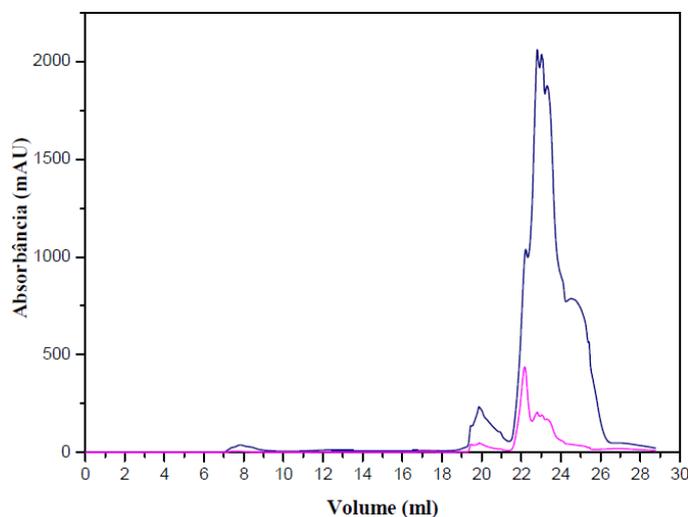
Os perfis de cromatografia de gel filtração foram obtidos adotando a absorbância de 230 e 280 nm, específica para identificação de ligações peptídicas e resíduos de aminoácidos aromáticos (triptofano e tirosina), respectivamente. O perfil de cromatografia da ArgR *Full Length* de *N. farcinica* (Figura 22), ArgR C-terminal de *N. farcinica* (Figura 23), C-terminal de *P. gingivalis* (Figura 24) e C-terminal de *C. pseudotuberculosis* (Figura 25) evidenciou picos acentuados entre os volumes 18-26 mL, 22-26 mL, 24-28 mL, 8-14 mL respectivamente, com absorbância em 230 nm, correspondente as ligações peptídicas. A absorção em 280 nm não foi tão evidente, já que as proteínas não apresentam nenhum resíduo de aminoácido Triptofano, e apresentam uma porcentagem muito baixa de resíduos de aminoácido Tirosina (3,1%, 2,1% e 1% na ArgR C-terminal de *N. farcinica*, *Full Length* de *N. farcinica*, C-terminal de *P. gingivalis* e C-terminal de *C. pseudotuberculosis*, respectivamente).

Figura 22. Segunda etapa de purificação da proteína ArgR *Full Length* de *N. farcinica* utilizando tampão 20 mM Tris HCl 100 mM NaCl (pH 7,5). Perfil de cromatografia de exclusão molecular da proteína em Superdex G75 10/300 (GE) após etapa de purificação a partir de Ni-Sepharose. O eixo Y do gráfico corresponde a absorção em mili unidades de absorbância e o eixo X ao volume em mililitros. A linha azul indica a absorbância em 230 nm e a linha rosa absorbância em 280 nm.



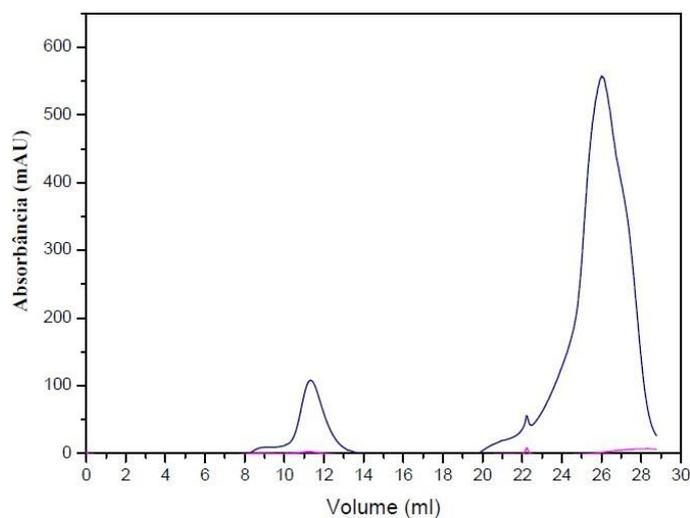
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 23. Segunda etapa de purificação da proteína ArgR C-terminal de *N. farcinica* utilizando tampão 20 mM Tris HCl 100 mM NaCl (pH 7,5). Perfil de cromatografia de exclusão molecular da proteína em Superdex G75 10/300 (GE) após etapa de purificação a partir de Ni-Sepharose. O eixo Y do gráfico corresponde a absorção em mili unidades de absorbância e o eixo X ao volume em mililitros. A linha azul indica a absorbância em 230 nm e a linha rosa absorbância em 280 nm.



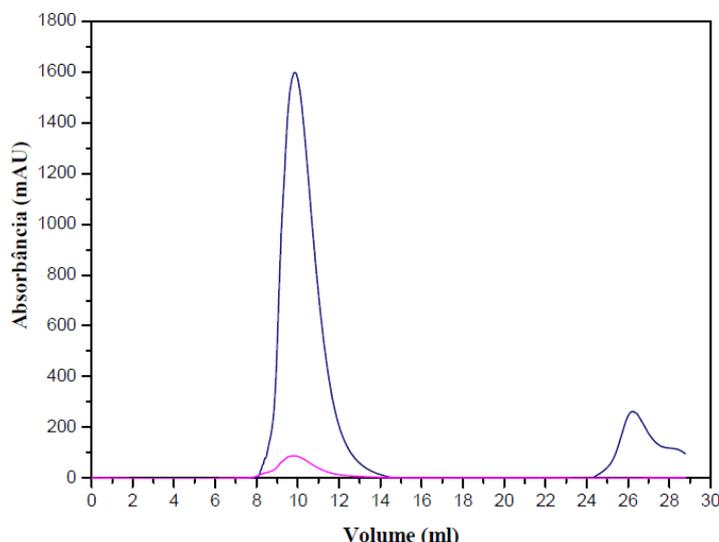
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 24. Segunda etapa de purificação da proteína ArgR C-terminal de *P. gingivalis* utilizando tampão 20 mM Tris HCl 100 mM NaCl (pH 7,5). Perfil de cromatografia de exclusão molecular da proteína em Superdex G75 10/300 (GE) após etapa de purificação a partir de Ni-Sepharose. O eixo Y do gráfico corresponde a absorção em mili unidades de absorbância e o eixo X ao volume em mililitros. A linha azul indica a absorbância em 230 nm e a linha rosa indica absorbância em 280 nm.



Fonte: Elaborado pelo autor.

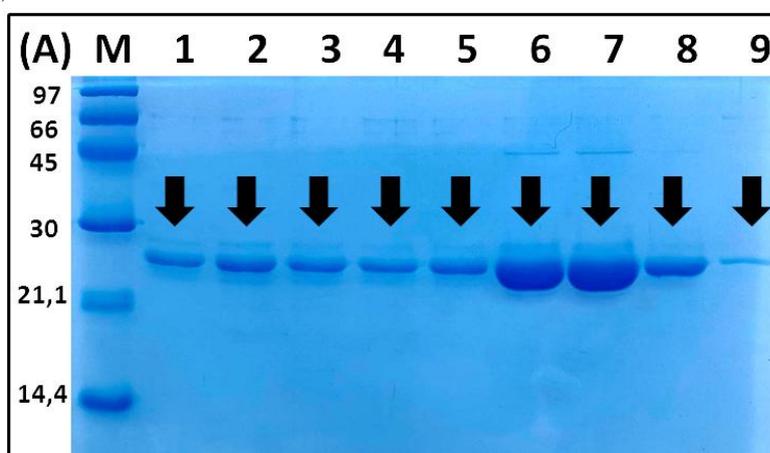
Figura 25. Perfil de cromatografia de exclusão molecular da proteína ArgR P115H de *C. pseudotuberculosis* utilizando tampão 20 mM Tris HCl 100 mM NaCl (pH 7,5) em Superdex G75 10/300 (GE). O eixo Y do gráfico corresponde a absorção em mili unidades de absorbância e o eixo X ao volume em mililitros. A linha azul indica a absorbância em 230 nm e a linha rosa absorbância em 280 nm.



Fonte: Elaborado pelo autor.

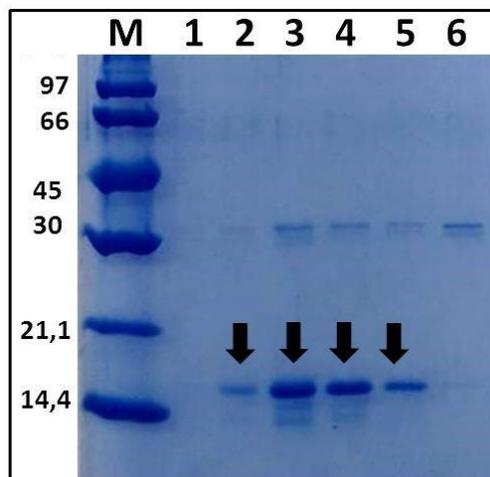
As frações de pico referentes às proteínas ArgRs de *N. Farcinica*, *P. gingivalis* e *C. pseudotuberculosis* de cada perfil cromatográfico foram coletadas e aplicadas em géis de poliácridamida (SDS-PAGE 15%), sendo submetidas à eletroforese para verificar o sucesso da purificação por gel filtração (AKTA-pure). Os resultados podem ser observados na Figura 26, 27 e 28.

Figura 26. SDS-PAGE 15% correspondente à etapa de purificação por exclusão molecular da proteína ArgR *Full Length* de *N. farcinica* linhagem BL21(DE3)-RIL. Os números 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 do gel SDS-PAGE 15% indicam as amostras coletadas a partir dos perfis cromatográficos da proteína ArgR *Full Length* de *N. farcinica* projetados pelo sistema AKTA-pure e a letra “M” corresponde ao marcador molecular (*LMW-SDS Marker KIT – GE Healthcare*) em kDa.



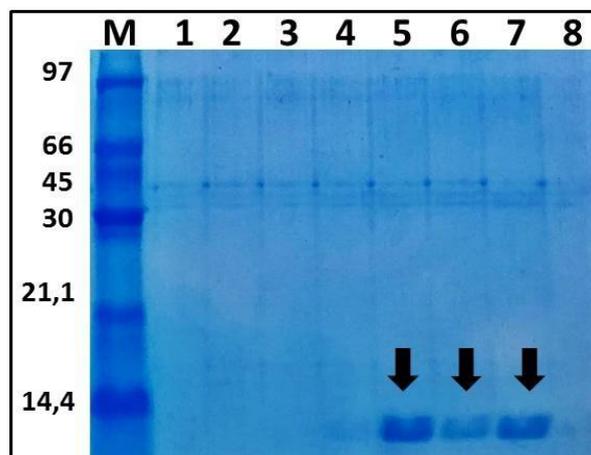
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 27. SDS-PAGE 15% correspondente à etapa de purificação por exclusão molecular da proteína ArgR C-terminal de *P. gingivalis* linhagem BL21(DE3)-T1. Os números 1, 2, 3, 4, 5 e 6 indicam as amostras coletadas a partir dos perfis cromatográficos da proteína ArgR C-terminal de *P. gingivalis* projetados pelo sistema AKTA-pure e a letra “M” corresponde ao marcador molecular (*LMW-SDS Marker KIT – GE Healthcare*) em kDa.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 28. SDS-PAGE 15% correspondente à etapa de purificação por exclusão molecular da proteína ArgR mutante P115H de *C. pseudotuberculosis*. Os números 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 indicam as amostras coletadas a partir do perfil cromatográfico da proteína ArgR P115H projetado pelo sistema AKTA-pure e a letra “M” corresponde ao marcador molecular (*LMW-SDS Marker KIT – GE Healthcare*) em kDa.



Fonte: Elaborado pelo autor.

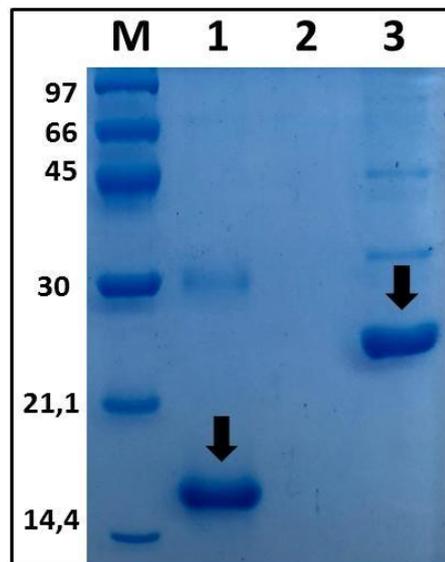
Com os resultados dos géis SDS-PAGE 15%, foi possível observar que as amostras das ArgRs de *N. farcinica*, *P. gingivalis* e mutante P115H de *C. pseudotuberculosis* obtiveram um grau de pureza satisfatório. As amostras foram concentradas separadamente por centrifugação em dispositivos *Amicon Ultra Centrifugal Filters* (3 kDa). Posteriormente, a concentração molar das proteínas foi medida utilizando espectrofotômetro *Biomate 3S* (*Thermo Fisher Scientific*) para a realização dos ensaios de cristalização.

5.5 Refolding

Foi estabelecido um protocolo de renovelamento para as proteínas ArgRs de *N. farcinica*, *C. botulinum* e *P. gingivalis* utilizando o método de diluição rápida e o tampão que se mostrou mais adequado para o renovelamento das proteínas foi o R3, composto por 50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 1 mM DTT e 1 M NDSB 201 [3-(1-piridino)-1-propano sulfonato)], pH 7,5. Durante esse método, a solução desnaturante que contém 8 M de ureia é diluída até uma concentração final de 0,05 M de ureia, enquanto a proteína de interesse é diluída até a concentração de 10-100 µg/ml. O processo de *refolding* se inicia com a diminuição da concentração do agente desnaturante (ureia) e visa diminuir e desacelerar o processo de agregação proteica utilizando baixas concentrações de proteína.

Com os resultados dos géis SDS-PAGE 15% foi possível observar que o protocolo de *refolding* foi eficiente para a ArgR de *N. farcinica* e *P. gingivalis*, enquanto para a ArgR de *C. botulinum* (Figura 29) e *C. pseudotuberculosis* os resultados não foram satisfatórios.

Figura 29. SDS-PAGE 15% após etapa de *refolding* das proteínas ArgR C-terminal de *C. botulinum* e *P. gingivalis* e ArgR *Full Length* de *N. farcinica* utilizando tampão de renovelamento R3 (50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 1 mM DTT e 1 M NDSB). (M) Marcador molecular (*LMW-SDS Marker KIT – GE Healthcare*) em kDa. (1) ArgR C-terminal de *P. gingivalis*. (2) ArgR C-terminal de *C. botulinum*. (3) ArgR *Full Length* de *N. farcinica* após etapa de renovelamento.



Fonte: Elaborado pelo autor.

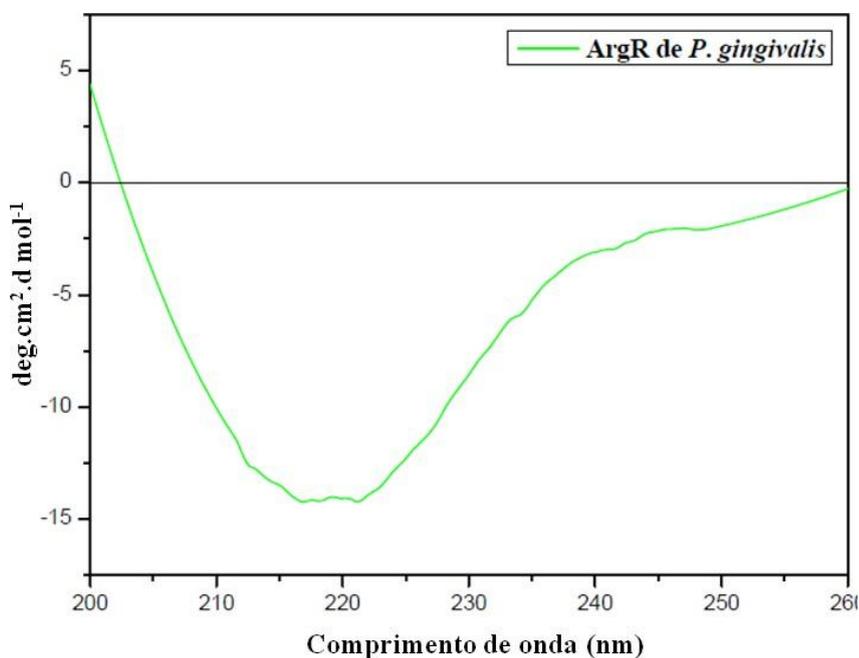
Após o renovelamento as proteínas foram dialisadas contra tampão 20 mM TRIS HCl 100 mM NaCl (pH 7,5) e tampão PBS 1x (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,5), concentradas por centrifugação utilizando dispositivos *Amicon Ultra Centrifugal Filters* (3 kDa) e utilizadas para os ensaios de Dicroísmo Circular e Espalhamento Dinâmico de Luz.

5.6 Caracterização da estrutura secundária por dicroísmo circular (CD)

Os espectros em elipticidade molar obtidos a partir dos experimentos de UV-CD realizados com as amostras das ArgRs de *N. farcinica* e *P. gingivalis* em tampão 5 mM NaH_2PO_4 e 50 mM NaF (pH 7,4), foram plotados em gráficos a partir do software *OriginLab* 7. Esses gráficos (Figura 30 e 31) indicaram que as duas proteínas estão estruturalmente enoveladas, ou seja, o renovelamento proteico foi bem-sucedido e essas proteínas estão em seu estado funcional (conformação nativa).

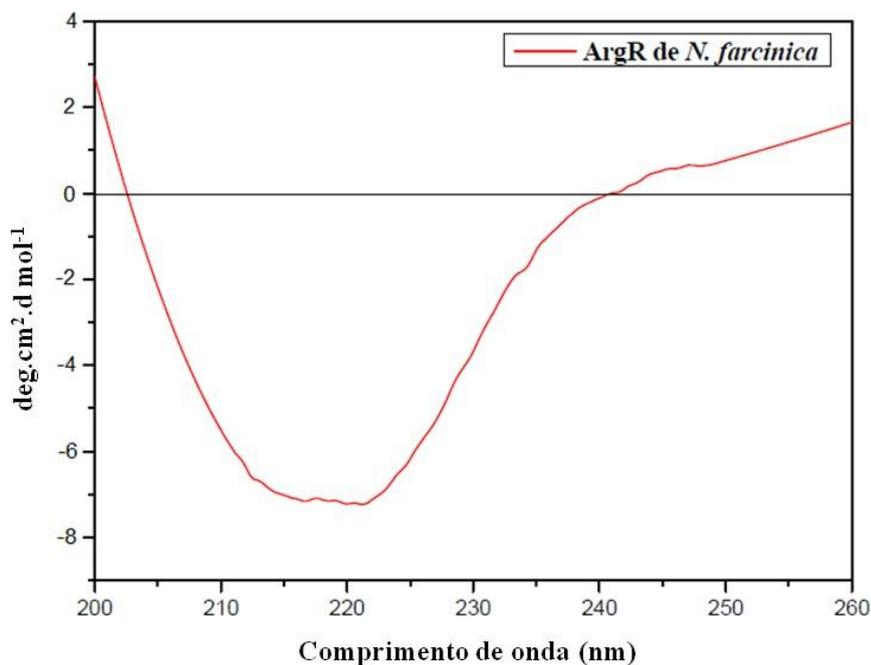
Além disso, a estimativa da estrutura secundária das proteínas renoveladas ArgRs de *N. farcinica* e *P. gingivalis*, obtidas por meio da deconvolução espectral pelo software CONTINLL do pacote de programas CDPPro (Tabela 6) se assemelha a de proteínas em sua conformação nativa (GREENFIELD, 2006), enfatizando que o renovelamento ocorreu de maneira correta.

Figura 30. Espectros de CD-UV característicos da proteína ArgR C-terminal de *P. gingivalis* a 25° C em solução tampão 5 mM NaH_2PO_4 e 50 mM NaF (pH 7,4). O eixo Y do gráfico corresponde a elipticidade molar em $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ e o eixo X ao comprimento de onda em nanômetros.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 31. Espectros de CD-UV característicos da proteína ArgR *Full Length* de *N. farcinica* a 25° C em solução tampão 5 mM NaH₂PO₄ e 50 mM NaF (pH 7,4). O eixo Y do gráfico corresponde a elipticidade molar em deg.cm².dmol⁻¹ e o eixo X ao comprimento de onda em nanômetros.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 6. Resultados em porcentagem das frações de estrutura secundária das proteínas ArgRs de *N. farcinica* e *P. gingivalis* obtidas por meio do experimento de UV-CD. A deconvolução e o cálculo das porcentagens de estrutura secundária foram realizados pelo software CONTINLL do pacote de programas CDPPro utilizando o conjunto de referências de proteínas SP29.

Proteínas	α -hélice	Folha- β	Volts	Desordenado	RMSD
ArgR C-terminal de <i>P. gingivalis</i>	30,1%	45,8%	20,9%	3,1%	0,031
ArgR Full de <i>N. farcinica</i>	27,9%	50,7%	19,2%	2,3%	0,035

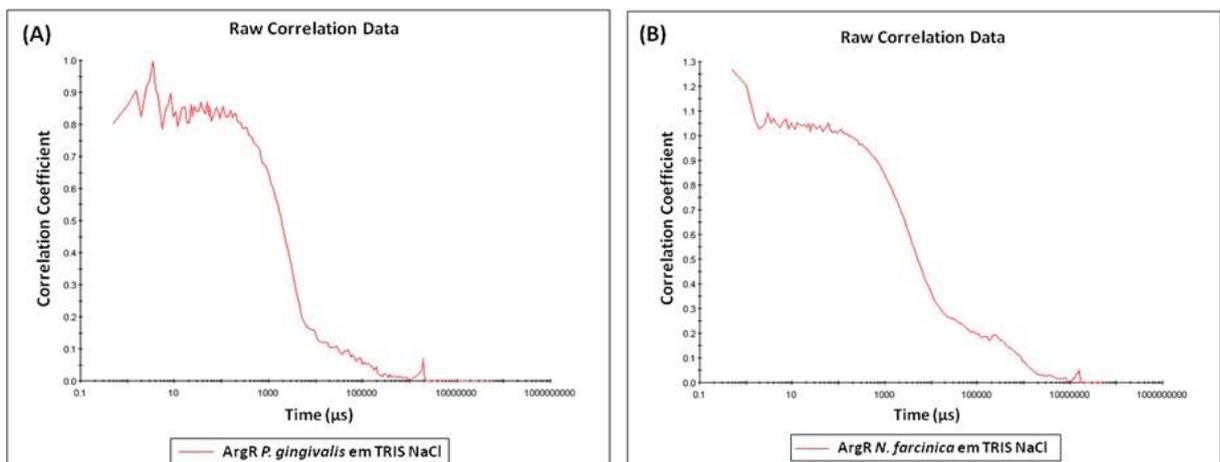
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.7 Análise por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Os experimentos de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) são capazes de mostrar a pureza oligomérica da proteína e seu Rh, estimando sua massa molecular (BERNE; PECORA, 1979) e ainda, diferenciar populações da mesma proteína que pode se oligomerizar sob diferentes formas. Essa técnica também permite analisar a dispersividade das amostras proteicas, diferenciando nanopartículas polidispersas, as quais apresentam distribuição de diferentes tamanhos/formas, de partículas monodispersas, que apresentam um único tamanho e forma (PECORA, 2000).

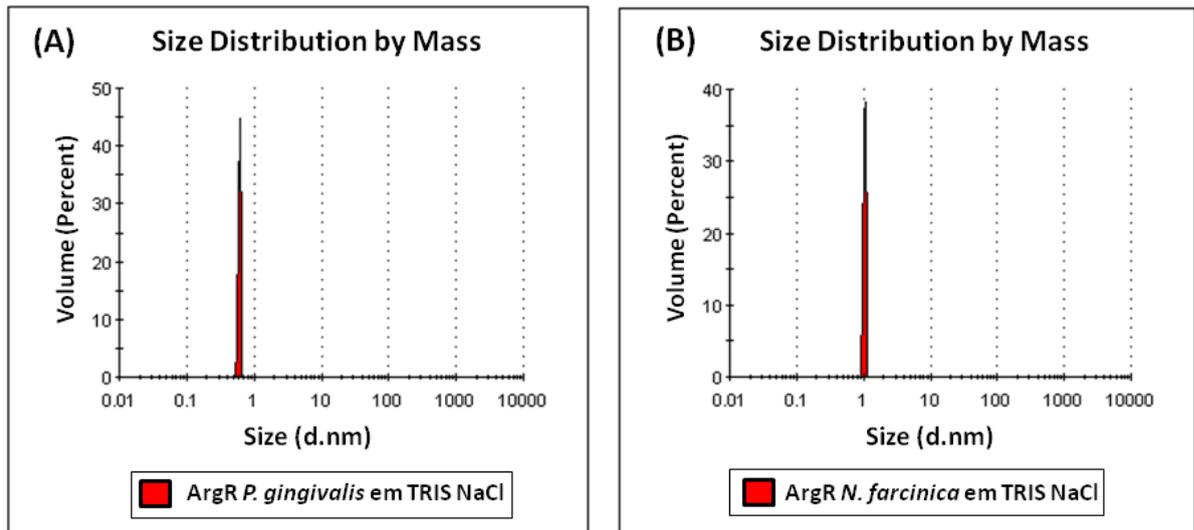
Posteriormente aos ensaios de difração circular, as proteínas ArgRs de *N. farcinica* e *P. gingivalis* renoveladas e dialisadas foram submetidas a ensaios de DLS, as ArgRs de *C. botulinum* e *C. pseudotuberculosis* não foram analisadas pois o renovelamento não ocorreu de forma correta. A partir dos resultados foi possível estimar o diâmetro hidrodinâmico das proteínas contidas em cada amostra. De acordo com o cálculo realizado pelo software Zetasizer, a ArgR de *P. gingivalis* apresenta diâmetro hidrodinâmico de aproximadamente 0,6 nm (Figura 32A e 33A), enquanto a ArgR de *N. farcinica* apresenta um diâmetro hidrodinâmico de aproximadamente 1 nm (Figura 32B e 33B). Esses resultados combinados com os experimentos de cromatografia de exclusão molecular sugerem que as proteínas ArgRs se encontram em seu estado monomérico em tampão 20 mM Tris HCl e 100 mM NaCl pH 7,5. Além disso, também é possível observar que as amostras se encontravam monodispersas, ou seja, com uma única população de mesmo tamanho e forma. A qualidade dos resultados foi considerada satisfatória e significativa pelo software.

Figura 32. Coeficiente de correlação em função do tempo (μs) da proteína ArgR de *P. gingivalis* (A) e *N. farcinica* (B) (linha vermelha). As amostras foram obtidas após desnaturação e renovelamento, seguido de diálise utilizando a membrana de diálise *Ficherbrand* (MWCO 6.000-8.000) em tampão 20 mM Tris HCl 100 mM NaCl (pH 7,5).



Fonte: Elaborado pelo autor.

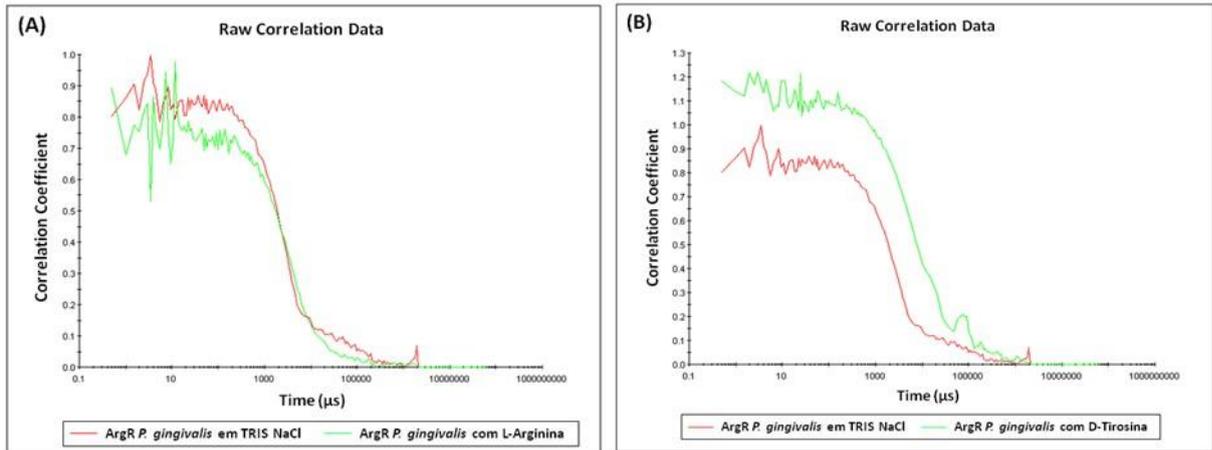
Figura 33. Distribuição relativa em função do diâmetro hidrodinâmico das medidas de DLS da ArgR de *P. gingivalis* (A) e *N. farcinica* (B). A linha vermelha representa o diâmetro hidrodinâmico (Dh) das proteínas em tampão 20 mM Tris HCl 100 mM NaCl (pH 7,5). As amostras foram obtidas após desnaturação e renovelamento, seguido de diálise utilizando a membrana de diálise *Ficherbrand* (MWCO 6.000-8.000) em tampão Tris HCl.



Fonte: Elaborado pelo autor.

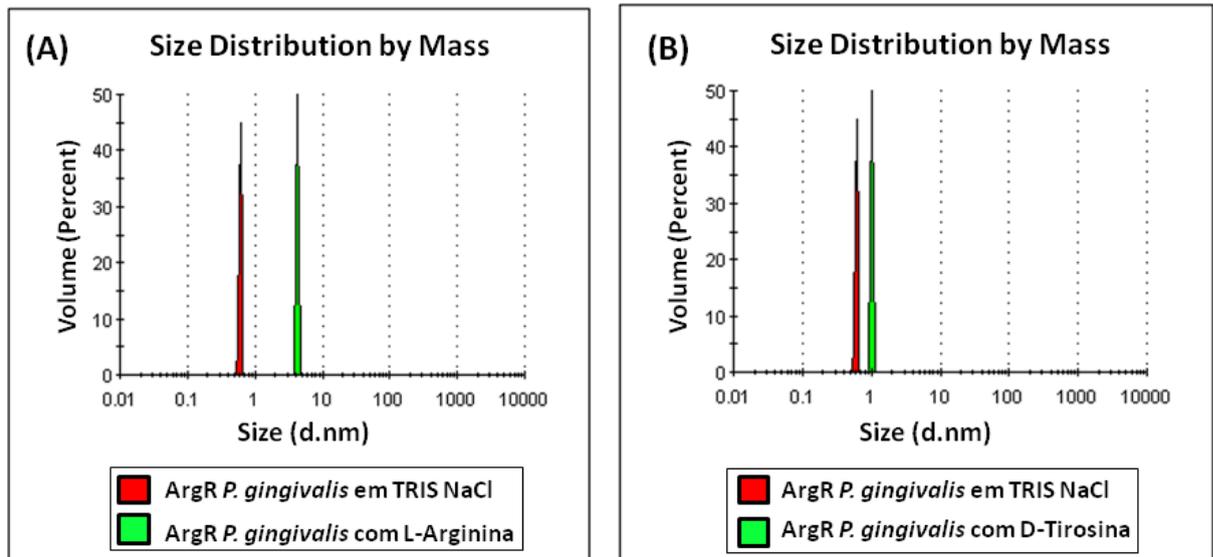
Após os ensaios de DLS com as proteínas ArgRs de *N. farcinica* e *P. gingivalis* renoveladas, foram realizados ensaios com a adição de possíveis ligantes ao tampão, dentre eles os aminoácidos D-Tirosina (4 mM) e L-Arginina (4 mM), sendo que novamente o estado oligomérico das amostras supracitadas foram avaliados por DLS. Como observado na Figura 35 e 37 e calculado pelo software Zetasizer, após a adição dos aminoácidos, as amostras proteicas tanto de *N. farcinica* como de *P. gingivalis* apresentaram um aumento do diâmetro hidrodinâmico. Em relação à proteína ArgR de *P. gingivalis*, antes da adição do ligante o seu Dh era de aproximadamente 0,6 nm, sendo que depois da adição de L-Arginina e D-Tirosina o diâmetro aumentou para 3 nm e 1 nm, respectivamente (Figura 34 e 35). Já em relação à ArgR de *N. farcinica*, o seu diâmetro era de aproximadamente 1 nm e aumentou para 10 nm e 3 nm depois da adição de L-Arginina e D-Tirosina, respectivamente (Figura 36 e 37).

Figura 34. Coeficiente de correlação em função do tempo (μs) da proteína ArgR de *P. gingivalis* em tampão 20 mM TRIS 100 mM NaCl (pH 7,5) com adição de 4 mM de L-Arginina (A) e com 4 mM de D-Tirosina (B). As amostras foram obtidas após desnaturação e renovelamento, seguido de diálise utilizando a membrana de diálise *Ficherbrand* (MWCO 6.000-8.000) em tampão Tris HCl.



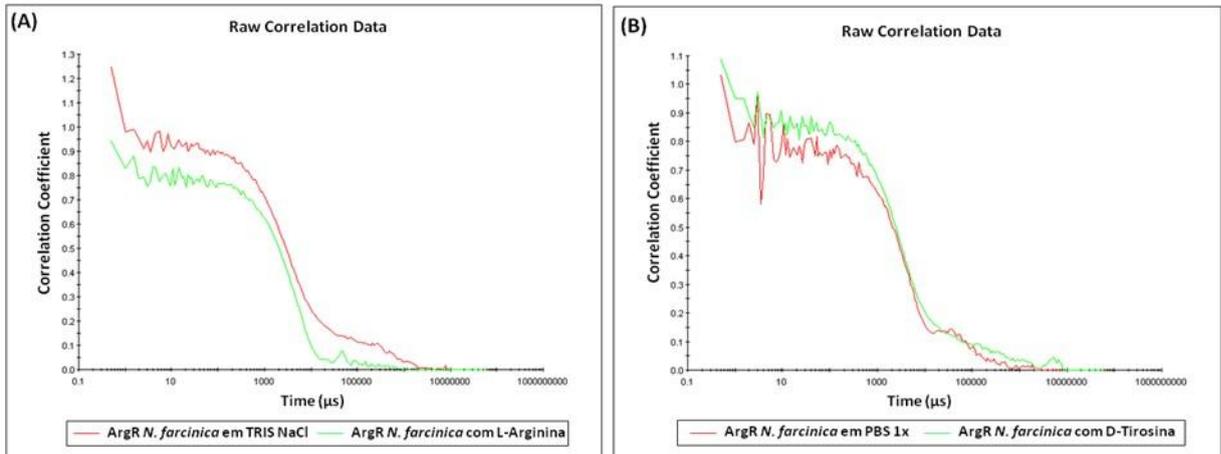
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 35. Distribuição relativa em função do diâmetro hidrodinâmico das medidas de DLS da proteína ArgR de *P. gingivalis*. A linha vermelha representa o diâmetro hidrodinâmico (Dh) da proteína em tampão 20 mM Tris HCl 100 mM NaCl (pH 7,5) e a linha verde representa a proteína em mesmo tampão com adição de 4 mM de L-Arginina (A) e com 4 mM de D-Tirosina (B). As amostras foram obtidas após desnaturação e renovelamento, seguido de diálise utilizando a membrana de diálise *Ficherbrand* (MWCO 6.000-8.000) em tampão Tris HCl.



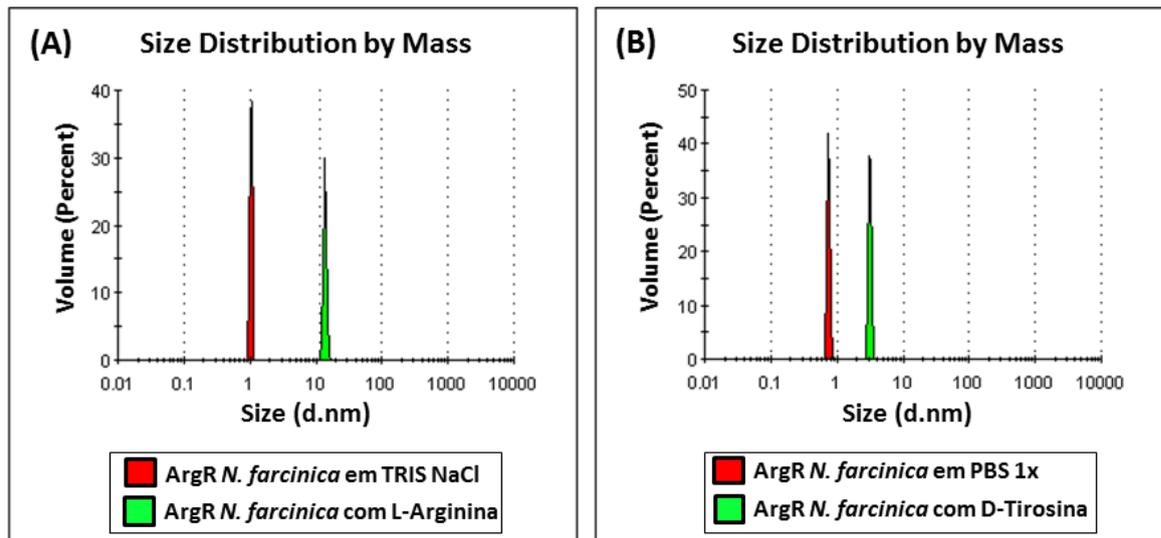
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 36. Coeficiente de correlação em função do tempo (μs) da proteína ArgR de *N. farcinica* em tampão 20 mM Tris HCl 100 mM NaCl (pH 7,5) com adição de 4 mM de L-Arginina (A) e em tampão PBS 1x com 4 mM de D-Tirosina (B). As amostras foram obtidas após desnaturação e renovelamento, seguido de diálise utilizando a membrana de diálise *Ficherbrand* (MWCO 6.000-8.000) em tampão Tris HCl e PBS 1x.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 37. Distribuição relativa em função do diâmetro hidrodinâmico das medidas de DLS da ArgR de *N. farcinica*. A linha vermelha representa o diâmetro hidrodinâmico (Dh) da proteína em tampão 20 mM Tris HCl 100 mM NaCl (pH 7,5) (A) e em tampão PBS 1x (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 e 1,8 mM KH_2PO_4 , pH 7,5) (B) e a linha verde representa a proteína em tampão Tris HCl com adição de 4 mM de L-Arginina (A) e com 4 mM de D-Tirosina (B). As amostras foram obtidas após desnaturação e renovelamento, seguido de diálise utilizando a membrana de diálise *Ficherbrand* (MWCO 6.000-8.000) em tampão Tris HCl (A) e PBS 1x (B).



Fonte: Elaborado pelo autor.

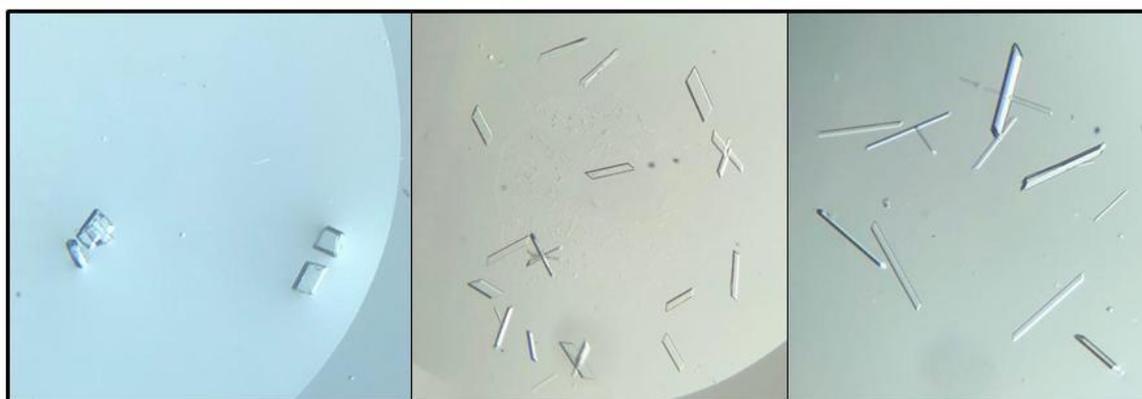
As proteínas ArgRs de *N. farcinica* e *P. gingivalis* se encontravam em seu estado monomérico antes da adição dos ligantes D-Tirosina e L-Arginina. Após a adição desses aminoácidos, o diâmetro hidrodinâmico aumentou e o estado oligomérico dessas proteínas foi alterado. Isso pode ser explicado pela forma como essas proteínas atuam na regulação gênica sendo ativas em sua forma hexamerizada, que é composta por dímero de trímeros, contendo

seis moléculas de arginina enterradas nas interfaces das subunidades (SAKANYAN et al., 1999; DENNIS et al., 2002; VAN DUYNÉ et al., 1996; CHERNEY et al., 2008; MARIUTTI et al., 2020). Além disso, provavelmente também ocorreu hexamerização induzida pela adição de D-Tirosina, já que também houve aumento no diâmetro das proteínas e alteração do seu estado oligomérico nesse caso. No entanto, este tipo de experimento não permite concluir que o ligante D-Tirosina ocupa o sítio de ligação da arginina e induz sua hexamerização via mecanismo alostérico. O ideal seria a obtenção da estrutura cristalográfica detalhando o complexo ou ensaios microbiológicos para avaliar se essas moléculas interferem na proliferação dos patógenos *P. gingivalis* e *N. farcinica*.

5.8 Ensaios de cristalização

A condição 5 do *Crystal Screen 2* (2 M Amonium sulfate; 5% 2-propanol) possibilitou a formação de pequenos cristais da proteína ArgR *Full Length* de *N. farcinica* pelo método de difusão de vapor em *sitting drop* e após fase de refinamento por *hanging drop*, alterando alguns parâmetros como pH das soluções, concentração do precipitante e da proteína, temperatura de armazenamento das placas e adição dos reagentes do *Additive Screen-Hampton*, obteve-se cristais de tamanhos satisfatórios (Figura 38). Esses cristais foram obtidos com uma concentração da proteína de 11 mg/mL utilizando a proporção 2:1 de proteína: precipitante *Crystal Screen 2* condição N° 5 + Condição 3 do *Additive Screen - Hampton* (0,1 M *Calcium Chloride*).

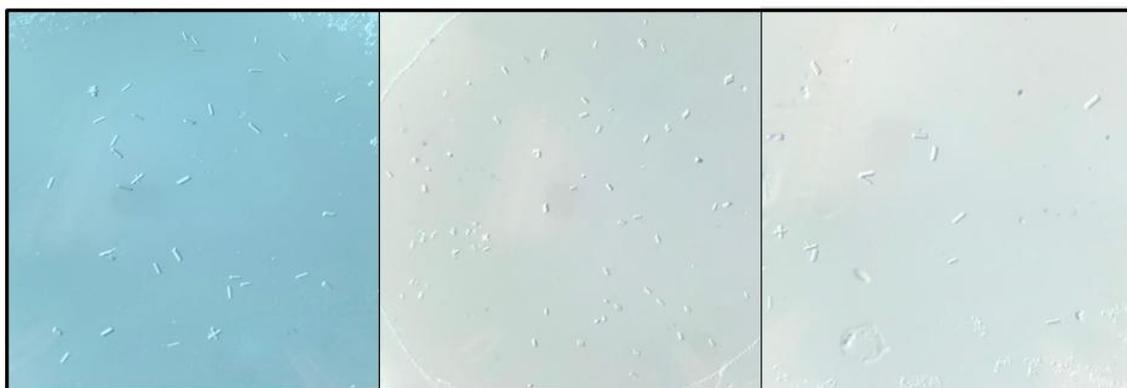
Figura 38. Cristais (~100 µm) da proteína ArgR *Full Length* de *N. farcinica* utilizando a proporção 2:1 de proteína: precipitante + *Additive screen* (2 M amonium sulfate; 5% 2-propanol + 0,1 M *Calcium Chloride*) obtidos por difusão de vapor em *hanging drop*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

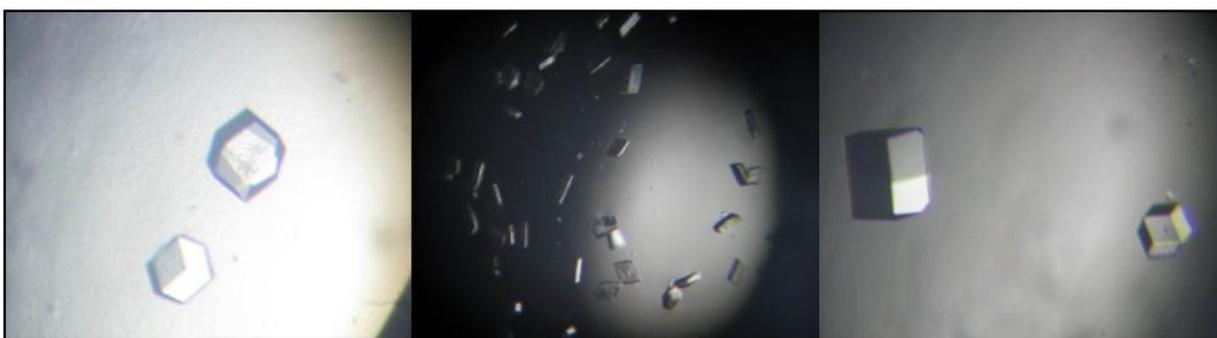
Além disso, também obteve-se a formação de pequenos cristais da proteína ArgR C-terminal de *P. gingivalis* (Figura 39) e ArgR C-terminal mutante P115H de *C. pseudotuberculosis* (Figura 40) utilizando-se o método de *hanging drop* com a condição número 5 do *Crystal Screen 2* (0,5 M Sodium Fluoride) e Tampão Tris HCl 10 mM NaCl 100 mM, pH 7,0 com volume igual da solução do reservatório (2,0 M *Sodium Formate*, pH 7,5), respectivamente. Em relação a proteína ArgR de *C. botulinum*, os ensaios de cristalização não obtiveram resultados satisfatórios.

Figura 39. Cristais (~100 μm) da proteína ArgR C-terminal de *P. gingivalis* utilizando a proporção 2:1 de proteína: precipitante (0,5 M *Sodium Fluoride*) obtidos por difusão de vapor em *hanging drop*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 40. Cristais (~100 μm) da proteína ArgR C-terminal P115H de *C. pseudotuberculosis* utilizando a proporção 2:1 de proteína: precipitante (2 M *Sodium Formate*) obtidos por difusão de vapor em *hanging drop*.

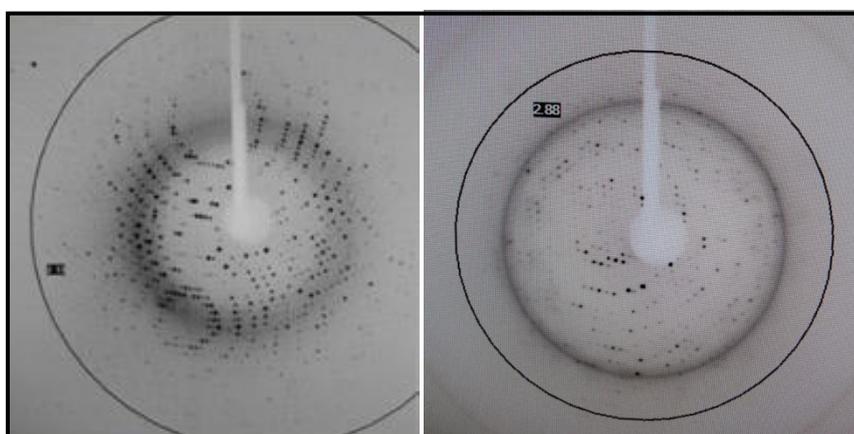


Fonte: Elaborado pelo autor.

Os cristais de tamanho satisfatórios foram levados até o feixe de raios-X do Sirius-LNLS (Campinas – SP) para coletar os dados de difração e determinar as estruturas tridimensionais dessas proteínas. Apenas foi possível coletar dados de difração de raios X da ArgR C-terminal P115H de *C. pseudotuberculosis* que difratou até 2 Angstrom e nosso grupo de pesquisa está trabalhando para conseguir a solução da estrutura.

Em relação aos cristais da proteína ArgR mutante P115H de *C. pseudotuberculosis*, os dados de difração foram coletados também na linha de luz do Venture D8 Bruker (Figura 41). Os dados de difração de raios-X foram utilizados pelo nosso grupo de pesquisa para resolver a estrutura cristalográfica da ArgR mutante Pro115His com intuito de analisar as interações do seu *pocket*, no entanto as primeiras tentativas de substituição molecular não permitiram a solução e estamos aguardando resultados de *softwares* mais avançados do *Sirius* para auxiliar.

Figura 41. Padrão de difração de Raio-X da proteína ArgR mutante Pro115His de *C. pseudotuberculosis* coletado a partir do congelamento do cristal em um fluxo de nitrogênio gasoso de 100 K.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Resultados positivos na difração por raios-X e determinação das estruturas tridimensionais cristalográficas das proteínas ArgRs de *N. farcinica*, *C. botulinum*, *P. gingivalis* e mutante P115H de *C. pseudotuberculosis* poderiam trazer informações sobre os mecanismos envolvidos na interação das ArgRs dos patógenos com seus possíveis ligantes. A ArgR desses microrganismos apresenta particularidades em relação a sua sequência de aminoácidos do sítio de ligação da arginina, apresentando uma glicina (Gly) - *N. farcinica*, prolina (Pro) - *C. botulinum* e alanina (Ala) - *P. gingivalis*, na posição 115, diferentemente da grande maioria dos demais microrganismos, nos quais os aminoácidos presentes no sítio de interação da arginina são altamente conservados, possuindo His ou Gln na posição 115. Essas particularidades podem ser utilizadas para o desenvolvimento de ligantes, como a Tirosina, que se liguem especificamente no *pocket* da ArgR de *N. farcinica*, *C. botulinum* e *P. gingivalis*, induza a sua hexamerização e regule o efeito alostérico dessa enzima, inibindo a

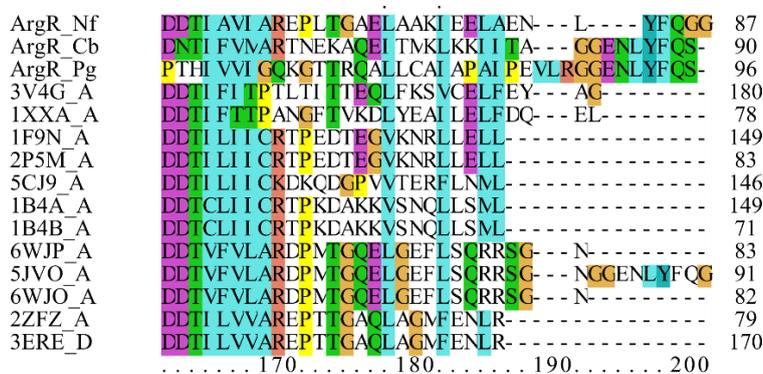
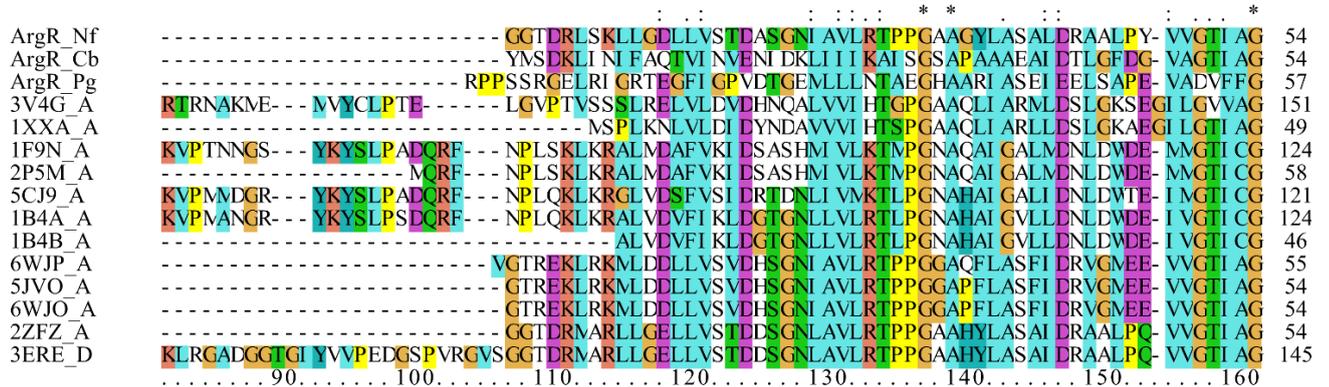
via de síntese da arginina desses patógenos sem interagir com o *pocket* da ArgR de microrganismos da microbiota normal dos hospedeiros, que não apresentam as particularidades supracitadas. Como as chances de cristalização são muito baixas, o presente trabalho também buscou conhecimento adicional dessas proteínas por meio de análises computacionais.

5.9 Alinhamento Múltiplo das Sequências

Primeiramente, as sequências das ArgRs de *C. botulinum*, *P. gingivalis* e *N. farcinica* foram alinhadas com todas as proteínas homólogas que possuem estruturas cristalográficas depositadas no bando de dados *Protein Data Bank* (PDB - <https://www.rcsb.org/>) (Figura 42). O alinhamento de sequências de proteínas foi feito com o intuito de conhecer as similaridades e diferenças entre as sequências e a posição dos resíduos de aminoácidos. Ao se alinhar sequências, os resíduos de aminoácidos que compõem as proteínas estarão alinhados de acordo com os resíduos conservados e não conservados, ou seja, os que sofreram ou não modificações com base em um ancestral comum.

Pela Figura 42 é possível observar que exceto pelos resíduos dos extremos N-terminal e C-terminal das proteínas estudadas, as regiões das sequências correspondentes aos *pockets* que acomodam o ligante e as envolvidas na formação das interfaces de oligomerização estão completamente alinhadas com as das proteínas do *Protein Data Bank* incluídas no alinhamento múltiplo. Portanto, foi constatado que é possível gerar modelos estruturais para estudar a interação das proteínas ArgRs mencionadas com os aminoácidos Tyr (Tirosina) e Arg (Arginina).

Figura 42. Alinhamento múltiplo de seqüências das proteínas ArgRs pertencentes a diversas famílias. As seqüências primárias da ArgR de *N. farcinica* (ArgR_Nf), *C. botulinum* (ArgR_Cb) e *P. gingivalis* (ArgR_Pg) foram utilizadas para realizar uma busca de proteínas homólogas com estruturas cristalográficas disponíveis no PDB (Protein Data Bank). As proteínas identificadas por meio de *PSI-BLAST*, cujos códigos PDB aparecem à esquerda, e as três proteínas de interesse foram alinhadas usando o programa MUSCLE no site <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>. As barras indicam a conservação em cada posição no alinhamento. Os resíduos foram coloridos de acordo as suas propriedades químicas.



Fonte: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>.

5.10 Modelagem por Homologia

A modelagem por homologia é uma ferramenta capaz de fazer previsões das estruturas tridimensionais das proteínas. Baseando-se em proteínas homólogas é possível a aquisição de coordenadas tridimensionais (3D) que serão fundamentais para a obtenção de um modelo 3D teórico. Existem alguns passos para que esse processo ocorra, dentre eles estão: identificação de modelo 3D padrão, alinhamento das sequências de proteínas, construção de um modelo para a proteína alvo baseada no modelo padrão; refinamento dos modelos, análise dos alinhamentos e validação do modelo (VYAS et al., 2002). O SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) é uma ferramenta utilizada para esse tipo de metodologia. Nesse programa, a sequência proteica de interesse é adicionada, uma varredura nos bancos de dados é feita até se encontrar pelo menos uma proteína de estrutura 3D conhecida que servirá de molde para a proteína alvo. Para o molde ser confiável é desejável que ele apresente uma identidade maior que 30% (GOLIATT, 2010).

Outros parâmetros importantes para verificar a confiabilidade do molde gerado são o GMQE (Estimativa Global da Qualidade do Modelo), QMEAN (Modelo Qualitativo de Análise Energética), gráfico de cobertura, qualidade local e comparação. Analisando esses parâmetros gerados pelo algoritmo é possível a construção de um modelo teórico 3D para a proteína alvo que posteriormente é exportado para o *software PyMol* (PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0, LLC) para visualização da estrutura, sequência de resíduos de aminoácidos, posição dos resíduos de aminoácidos e das ligações químicas, bem como o alinhamento estrutural com outras proteínas.

O servidor web Swissmodel (<https://swissmodel.expasy.org/>) foi empregado para escolher o melhor molde para a construção dos modelos tridimensionais e para a avaliação da qualidade dos modelos gerados. A tabela 7 mostra os resultados que permitem a avaliação da qualidade dos modelos gerados pelo servidor. O modelo da ArgR de *P. gingivalis* não foi incluído na tabela, já que o servidor indicou baixa identidade de sequência (<25%) com os moldes disponíveis.

Tabela 7. Dados sobre os moldes e a qualidade dos modelos gerados por homologia das proteínas ArgR de *N. farcinica*, *C. botulinum* e ArgR mutante P115H de *C. pseudotuberculosis*, respectivamente.

Proteína	PDB Molde	Identidade	Resolução (Å)	GMQE	QMEAN
ArgR <i>N. farcinica</i>	6WJP	56.79	1.7	0.70	0.16
ArgR <i>C. botulinum</i>	6WJO	31.65	1.6	0.57	-0.87
ArgR Mut <i>C. pseudotuberculosis</i>	6WJO	98.21	1.7	0.86	2.33

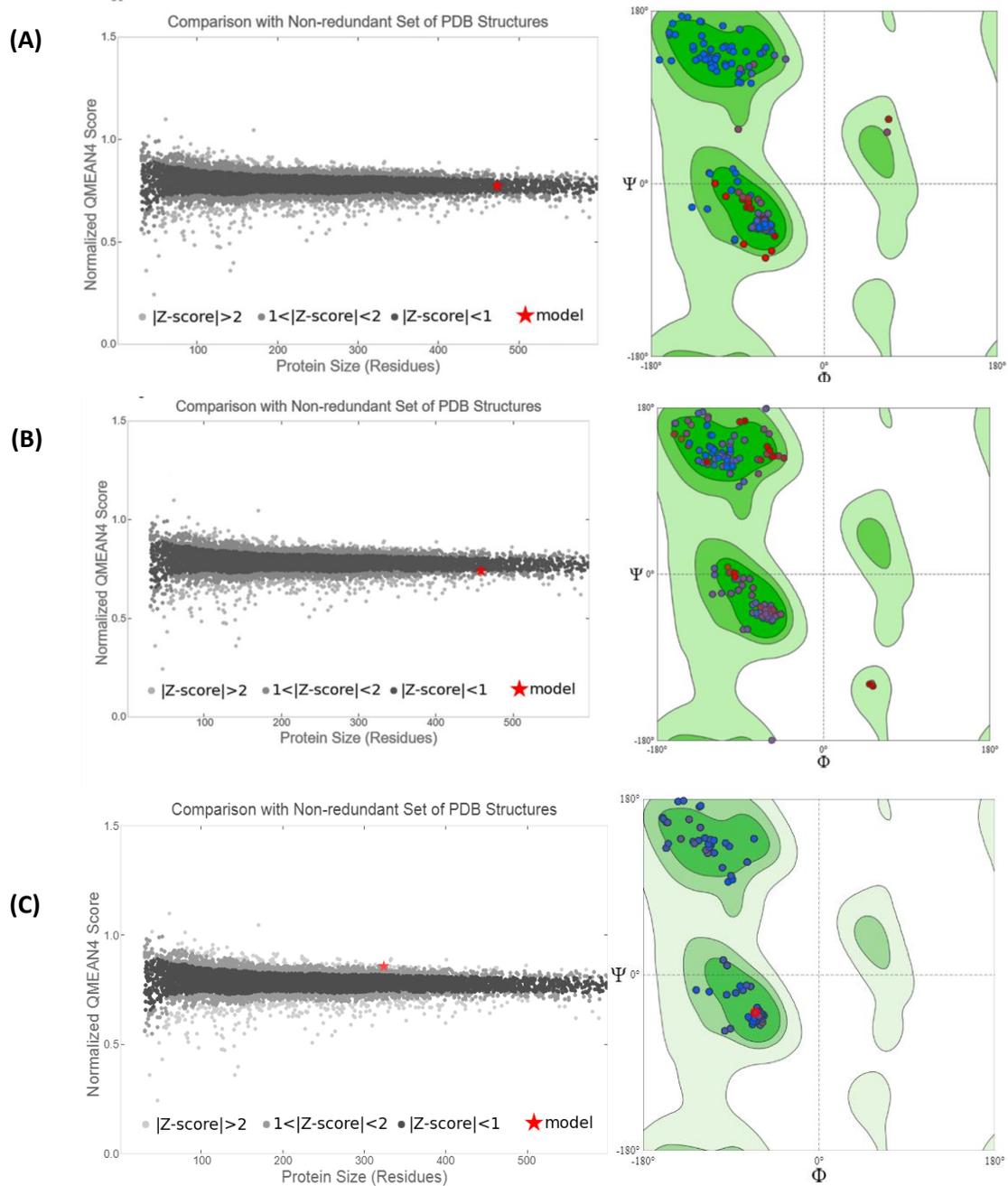
Fonte: Elaborado pelo Autor.

Para avaliar o modelo deve-se atentar para os valores de QMEAN (*Qualitative Model Energy ANalysis*) e GMQE (*Global Model Quality Estimation*). O QMEAN é um estimador conhecido como *z-score*, parâmetro que prevê a qualidade absoluta dos resíduos e da estrutura como um todo que foi gerado com base no modelo utilizado. Quando o valor *z* está próximo de 0 significa que o modelo é considerado confiável e, portanto, existe uma boa concordância entre o modelo e estruturas experimentais de tamanho semelhantes. Valores de QMEAN de -4 ou abaixo indicam um modelo de baixa qualidade. Já o GMQE, com valores entre 0 a 1, é a estimativa global do modelo que determina a exatidão e a qualidade da estrutura terciária do modelo gerado. Quanto mais alto mais preciso é o modelo em relação ao alinhamento alvo-modelo e a cobertura do alvo. Levando em conta esses parâmetros, é possível concluir que os moldes das proteínas ArgRs de *N. farcinica*, *C. botulinum* e ArgR mutante P115H de *C. pseudotuberculosis* gerados por homologia apresentaram uma boa qualidade e são confiáveis. Todos apresentaram uma identidade maior do que 30%, valores de GMQE próximo a 1 e valores de QMEAN próximos a 0.

Além disso, o SWISS-MODEL também fornece um gráfico de Ramachandran interativo, o qual é um método simples de validação que julga a qualidade da estrutura da proteína, baseada na distribuição dos ângulos diedros da cadeia principal. Os três ângulos torsionais da cadeia principal: ϕ (phi), ψ (psi) e Ω (ômega) são os principais determinantes do dobramento da proteína (HOOFT; SANDER; VRIEND, 1997). Entretanto, a extensão permitida de ângulos Ω é bem restrita e variações neste ângulo de torção não resultam em muita variedade conformacional (RAMACHANDRAN; RAMAKRISHNAN; SASISEKHARAN, 1963). Desta forma, o Gráfico de Ramachandran define os valores permitidos dos ângulos torsionais ϕ e ψ em estruturas tridimensionais, indicando os resíduos de aminoácidos que se encontram nas regiões energeticamente mais favoráveis e

desfavoráveis, prevendo conflitos estéricos e orientando na avaliação da qualidade dos modelos teóricos ou experimentais de proteínas (KLEYWEGT; JONES, 1996). Na figura 43 podemos visualizar o Gráfico de *Ramachandran* e os valores de *Z-score* para cada modelo gerado.

Figura 43. Gráficos correspondentes aos valores do *Z-score* de proteínas com estruturas resolvidas e dos modelos (estrelas vermelhas) e dos diedros Φ e Ψ são mostrados para cada estrutura 3D gerada (A) ArgR de *N. farcinica* (B) *C. botulinum* e (C) ArgR mutante P115H de *C. pseudotuberculosis*. As regiões em verde são as energeticamente favoráveis.

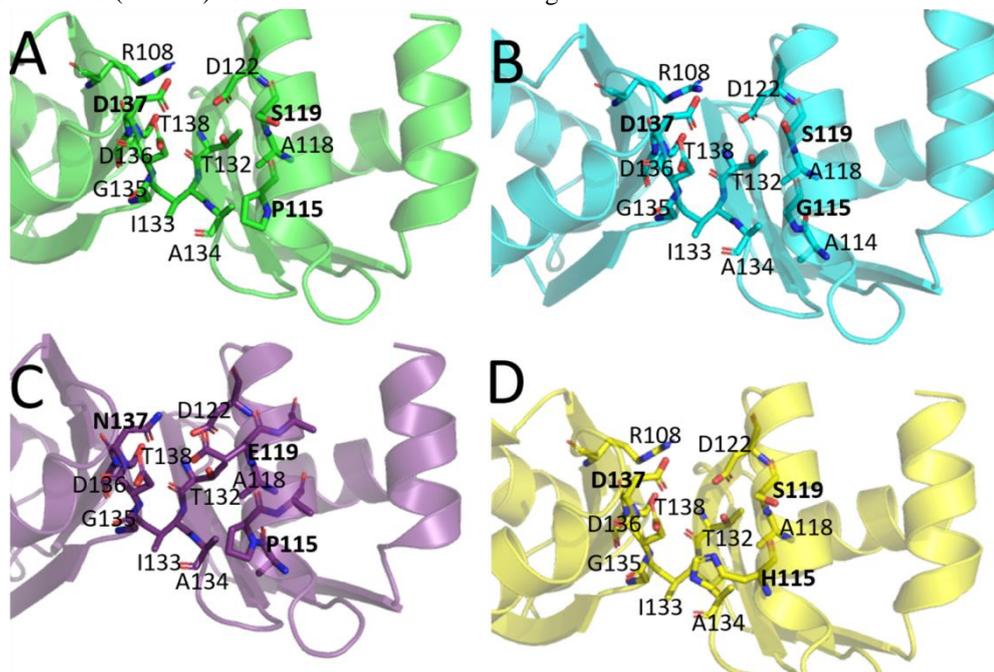


Fonte: Elaborado pelo Autor.

De acordo com a Figura 43, pode-se perceber que os modelos gerados apresentam um valor de *Z-score* dentro do permitido de acordo com a comparação com estruturas já resolvidas depositadas no PDB. Além disso, pelo gráfico de Ramachandran pode-se constatar que os resíduos de aminoácidos dos modelos gerados encontram-se em regiões energeticamente favoráveis. O Gráfico de Ramachandran (RAMACHANDRAN; SASISEKHARAN, 1968) considera satisfatório um modelo que possui pelo menos 90% dos resíduos dentro das regiões energeticamente favoráveis (LASKOWSKI et al., 1993; VERLI, 2014). Dessa forma, quando comparados pelo gráfico de Ramachandran e valores de QMEAN, os modelos construídos para as proteínas ArgRs de *N. farcinica*, *C. botulinum* e ArgR mutante P115H de *C. pseudotuberculosis* foram considerados satisfatórios para a predição e análise da estrutura 3D.

Após análise da qualidade dos modelos gerados, foi realizado o download dos modelos, e pode ser feita uma comparação visual entre as estruturas molde por meio de alinhamento estrutural utilizando a ferramenta PyMOL. Modelos dos trímeros foram gerados e os resíduos que compõem os sítios de ligação dos aminoácidos são mostrados na Figura 44. A escolha pelo estado trimérico para fazer as análises estruturais e energéticas deve-se ao fato de que são eles os responsáveis pela preferência por determinados aminoácidos, sendo que simulações de dinâmica molecular indicam que a escolha do ligante pela proteína ArgR ocorre em seu estado trimérico (MARIUTTI et al., 2020).

Figura 44. Representação estrutural dos sítios de ligação no estado trimérico das ArgRs de (A) *C. pseudotuberculosis* (PDB: 6WJO), (B) *N. farcinica* (modelo), (C) *C. botulinum* (modelo) e (D) ArgR P115H de *C. pseudotuberculosis* (modelo). Os resíduos destacados em negrito não são conservados.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

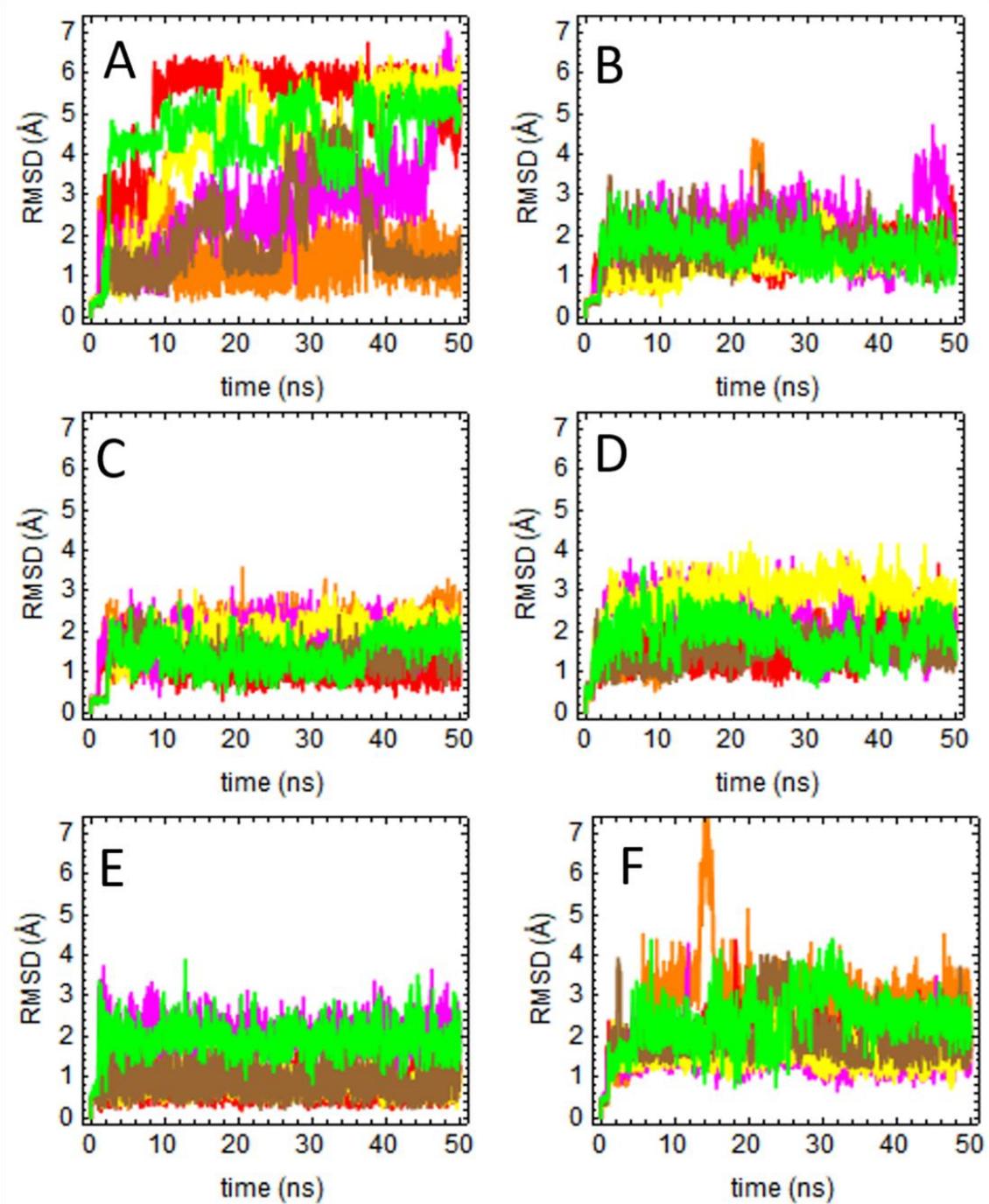
5.11 Simulações de dinâmica molecular

A compreensão do movimento dos átomos de uma proteína ao longo do tempo é fundamental para entender sua função. Diante disso, a Dinâmica Molecular é uma técnica computacional robusta usada para o cálculo e previsão do comportamento temporal de moléculas em um meio. Métodos de *docking* molecular têm como principal objetivo prever o modo de ligação e a afinidade de pequenas moléculas dentro do sítio ativo de proteínas de interesse. Esse processo visa posicionar o ligante em diferentes orientações no sítio ativo do receptor e, usualmente, em diferentes conformações, com o intuito de se obter a melhor interação. Este procedimento permite o estabelecimento de uma classificação entre os compostos de maior e de menor afinidade a um determinado receptor (DE ALENCAR, 2010).

A partir da ancoragem molecular, são obtidas diferentes conformações espaciais do ligante, possibilitando identificar qual dentre elas é a mais provável na interação ligante-alvo. A partir de cada conformação espacial, são obtidas energias livres de ligação (entre ligante e alvo), onde a menor energia é considerada a mais provável para justificar a interação (KITCHEN, 2004). Um bom parâmetro para medir a qualidade da estrutura encontrada pelo *software* é o RMSD (Desvio quadrático médio da raiz), em que um valor de RMSD menor que 2 Å indica que o modo de ligação do complexo proteína-ligante foi previsto corretamente, sendo que valores de RMSD menor que 2.5 Å também são considerados bons resultados (PHILOT, 2010). Entretanto, valores elevados de RMSD indicam divergência do ligante em relação à posição inicial.

A Figura 45 mostra os perfis de RMSD correspondentes aos átomos pesados dos ligantes durante as trajetórias de dinâmica molecular gerados para os trimêros de cada uma das proteínas. A Tabela 8 mostra os valores de energia livre efetiva calculados para os ligantes complexados com o os trimeros. Os valores de energia livre foram calculados para três trajetórias de 50 ns de cada sistema.

Figura 45. Perfis de RMSD correspondentes aos átomos pesados dos ligantes durante as trajetórias de dinâmica molecular geradas para cada trîmero. (A) ArgR de *N. farcinica* com 3 ligantes Tirosina; (B) ArgR de *N. farcinica* com 3 ligantes Arginina; (C) ArgR de *C. botulinum* com 3 ligantes Tirosina; (D) ArgR de *C. botulinum* com 3 ligantes Arginina; (E) ArgR P115H de *C. pseudotuberculosis* com 3 ligantes Tirosina e (F) ArgR P115H de *C. pseudotuberculosis* com 3 ligantes Arginina. As diferentes cores representam cada uma das três cópias do ligante em cada trîmero. As trajetórias foram fitadas com respeito aos átomos do *backbone* da proteína nas respectivas estruturas iniciais empregadas nas dinâmicas e os movimentos dos ligantes foram acompanhados por meio dos RMSDs. Valores elevados indicam divergência do ligante relativa à posição inicial.



Fonte: Elaborada pelo Autor

Tabela 8. Valores de energia livre efetiva calculados para cada cópia do ligante complexada com os trímeros das proteínas ArgRs de *N. farcinica*, *C. botulinum* e *C. pseudotuberculosis*. Valores entre parêntese indicam o desvio médio. O ligante com maior afinidade encontra-se sublinhado.

Complexo	ΔG_{eff} (kcal/mol)
ArgR <i>N. farcinica</i> : 3Y	-26(1)
<u>ArgR <i>N. farcinica</i>: 3R</u>	<u>-31.3(0.5)</u>
<u>ArgR <i>C. botulinum</i>: 3Y</u>	<u>-27.9(0.3)</u>
ArgR <i>C. botulinum</i> : 3R	-24.5(0.1)
<u>ArgR <i>C. pseudotuberculosis</i> P115H: 3Y</u>	<u>-29(2)</u>
ArgR <i>C. pseudotuberculosis</i> P115H: 3R	-26(3)

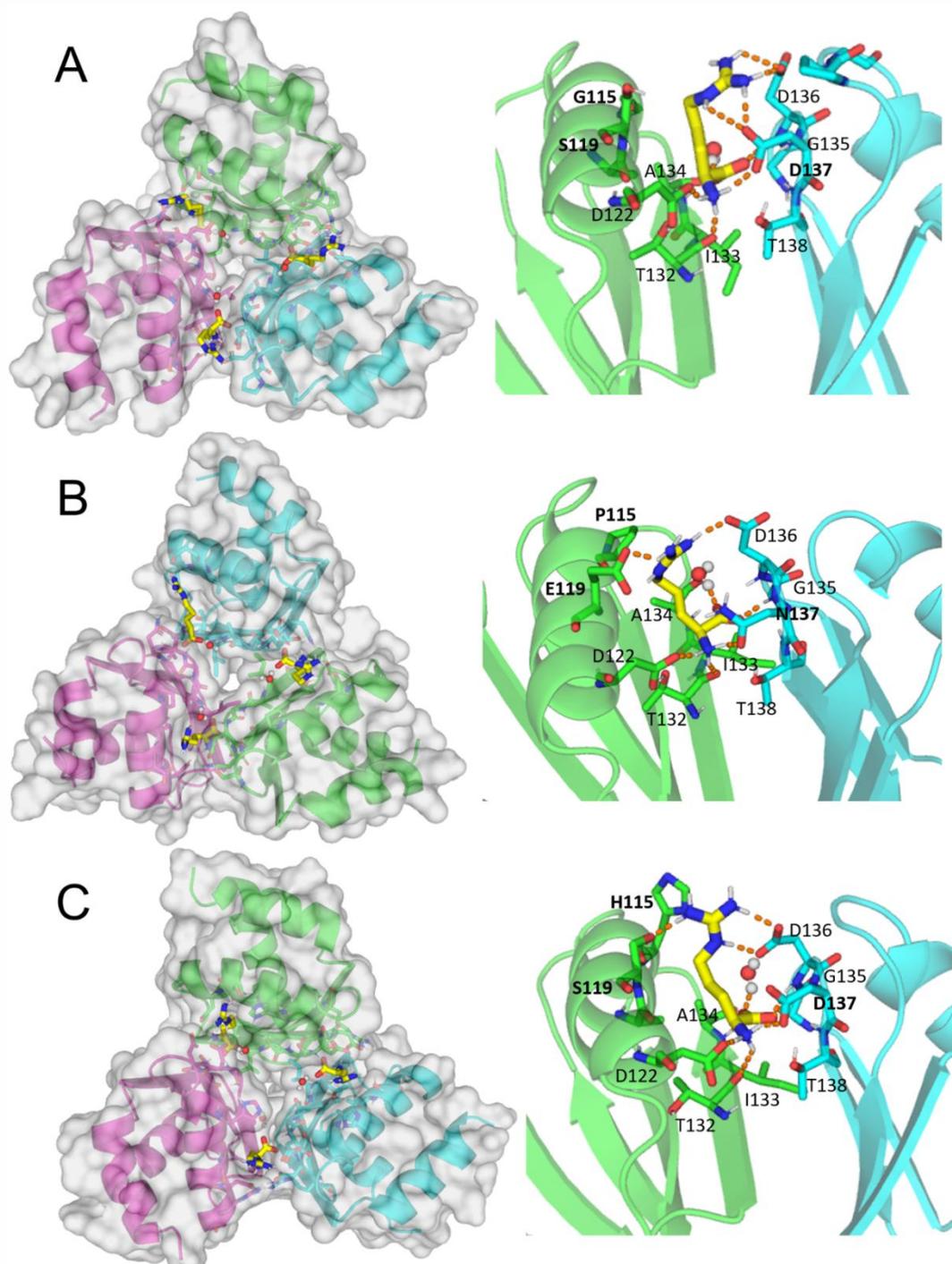
Fonte: Elaborado pelo Autor

Observando os perfis de RMSD e as energias livres efetivas do complexo trímero-ligante pode-se concluir que a proteína ArgR de *N. farcinica* tem preferência pelo ligante Arginina, já que esse complexo apresentou menores valores de RMSD e valores de energia livre mais negativos (-31.3). Já a proteína ArgR de *C. botulinum* exibe uma preferência maior pelo ligante tirosina, já que o complexo Trímero-Tirosina apresentou valores de RMSD menores e valores mais negativos de energia livre (-27.9). Assim, esse complexo é o mais provável de ser formado, pois quanto menor a energia livre de ligação mais favorecida é a interação. Entretanto, no caso da ArgR mutante P115H de *C. pseudotuberculosis*, parece haver uma leve preferência por Tyr mas os dados estão dispersos e não pode-se concluir totalmente que a tirosina tenha uma maior estabilidade no complexo do que a arginina.

Ao comparar a composição aminoacídica dos sítios de ligação dos trímeros (Fig 44), pode-se concluir que a presença de Prolina 115 na ArgR de *C. botulinum* e Glicina 115 na ArgR de *N. farcinica*, pode ter contribuído para a preferência por cada ligante, como mostrado para a ArgR de *C. pseudotuberculosis* (MARIUTTI, et al., 2020). A ArgR de *N. farcinica* e ArgR de *C. botulinum* só apresentam diferenças na região do sítio de ligação na posição 115, portanto, isto reforça que Gly nessa posição não é favorável para o acomodamento de Tyr, enquanto a Pro nessa posição favorece a ligação de Tyr. Por outro lado, a presença do resíduo neutro N137 na ArgR de *C. botulinum* pode prejudicar o acomodamento do ligante Arg, mas é preciso levar em consideração que E119 pode ter um papel compensatório nesse sentido (Figura 46).

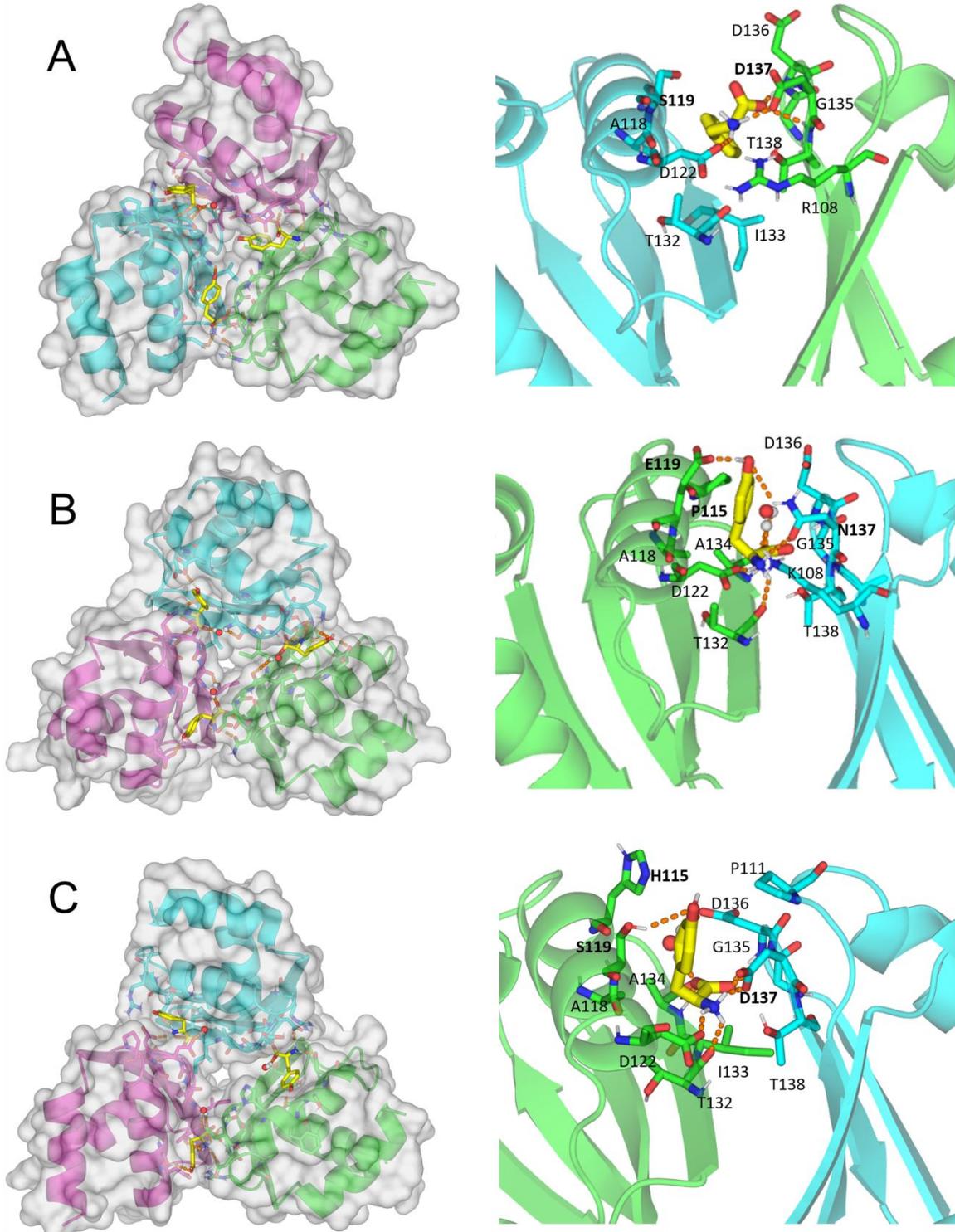
No caso da ArgR mutante P115H, como mencionado anteriormente, não é possível concluir qual a preferência. Pode-se constatar na interface do complexo que H115 adota uma posição que não afeta o acomodamento da Tyr (figura 47), a princípio mais volumosa que Arg.

Figura 46. Representação estrutural dos complexos triméricos. (A) ArgR *N. farcinica*:3Arg, (B) ArgR *C. botulinum*:3Arg e (C) ArgR P115H de *C. pseudotuberculosis*:3Arg. As linhas tracejadas representam ligações de hidrogênio. As estruturas representadas correspondem às estruturas médias calculadas a partir de três trajetórias independentes de 50 ns de cada sistema.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Figura 47. Representação estrutural dos complexos triméricos. (A) ArgR de *N. farcinica*:3Tyr, (B) ArgR de *C. botulinum*:3Tyr e (C) ArgR P115H de *C. pseudotuberculosis*:3Tyr. As linhas tracejadas representam ligações de hidrogênio. As estruturas representadas correspondem às estruturas médias calculadas a partir de três trajetórias independentes de 50 ns de cada sistema.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Sabe-se que os resíduos de aminoácidos Glicina, Prolina e Alanina presentes na posição 115 da ArgR dos organismos *N. farcinica*, *C. botulinum* e *P. gingivalis*, são aminoácidos apolares e possuem cadeias laterais curtas quando comparados com His115 ou Gln115, que são altamente conservados em organismos de outros filos. A hipótese inicial do presente trabalho era que os resíduos Pro, Ala e Gly em vez de Gln115 ou His115 altamente conservados, resultaria na formação de um *pocket* mais profundo e volumoso com mudanças significativas nas características do nanoambiente e portanto, acomodaria melhor o ligante Tirosina, um resíduo polar e de cadeia lateral longa, uma condição que não ocorreria com a maioria dos microrganismos, os quais possuem um *pocket* menos volumoso.

Entretanto, de acordo com os dados obtidos por meio da dinâmica molecular, foi visto que não apenas o volume do *pocket* pode influenciar a interação com o ligante, mas também outros fatores como carga e polaridade dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio de ligação das ArgRs. A ArgR de *N. farcinica* apresenta Gly115, Ser119 e D137 e de acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que o fator mais preponderante para a afinidade pelo ligante não foi a presença de um resíduo de cadeia lateral curta na posição 115 (Glicina). Nesse caso, a característica mais importante foi a presença de um resíduo com carga negativa na posição 137 (ácido aspártico), que interage fortemente com o resíduo de aminoácido Arginina, classificado como básico. Além disso, a presença de Serina na posição 119 também pode estar relacionada à menor afinidade por Tyr, já que os dois são resíduos considerados polares.

Já em relação à ArgR de *C. botulinum*, o fator considerado mais preponderante foi a presença da Prolina na posição 115, que é um resíduo de aminoácido apolar e de cadeia lateral curta, de forma que torna esse nanoambiente propício para a interação com a Tirosina, um resíduo mais volumoso, com cadeia lateral mais longa e polar. Além disso, a interação por cargas também pode estar envolvida na maior afinidade por Tirosina do que Arginina, já que a ArgR de *C. botulinum* apresenta um resíduo neutro na posição 137 (asparagina), em vez de um resíduo com carga negativa (D137) que está presente na ArgR de *N. farcinica*. Por conta disso, não ocorre a interação por cargas com o ligante Arginina que estava presente na ArgR de *N. farcinica*.

Por fim, no caso da ArgR mutante P115H de *C. pseudotuberculosis*, como mencionado anteriormente, não é possível concluir qual ligante tem maior afinidade, já que os valores de RMSD e de energia livre efetiva estão bem próximos para os dois ligantes. Entretanto, pode-se ver na interface do complexo que H115 adota uma posição que não afeta o acomodamento da Tyr (Figura 47), a princípio mais volumosa que Arg.

6. EXPERIMENTOS PARALELOS

6.1 Experimentos de mutagênese para obtenção da ArgR mutante P115S de *C. pseudotuberculosis*

Experimentos de mutagênese sítio-dirigida com o vetor de expressão pET-28a(+) que codifica a ArgR C-terminal selvagem de *C. pseudotuberculosis* (sintetizado pela FastBio), foram realizados para a obtenção de um novo vetor de expressão que codifica a ArgR de *C. pseudotuberculosis* com mutação pontual Pro115Ser, utilizando o kit de mutagênese *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies)* e os primers descritos na Tabela 9, por meio da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). Na Figura 48 está representada a sequência de aminoácidos que codifica a nova proteína alvo. Posteriormente ao PCR, o novo plasmídeo foi submetido à transformação bacteriana em linhagem celular DH5- α para possibilitar a produção em larga escala do DNA plasmidial, o qual foi extraído e purificado utilizando o *GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific)*. A positividade para a replicação dos plasmídeos nas células DH5- α foi verificada a partir da análise por eletroforese em gel de agarose 1% (TAE 1X) corado com brometo de etídeo (Figura 49).

Tabela 9. Lista de primers dessalinizados sintetizados pela empresa Exxtend e utilizados na técnica de PCR convencional para construção de um novo vetor de expressão da proteína ArgR mutante P115S de *C. pseudotuberculosis* com mutações sítio-dirigidas.

GENE	SEQUÊNCIA DO PRIMER
ArgR mutante Pro115Ser	5' – CGC CAG GAA CGA CGC GCC ACC CG – 3'
de <i>C. pseudotuberculosis</i>	5' – CG GGT GGC GCG TCG TTC CTG GCG – 3'

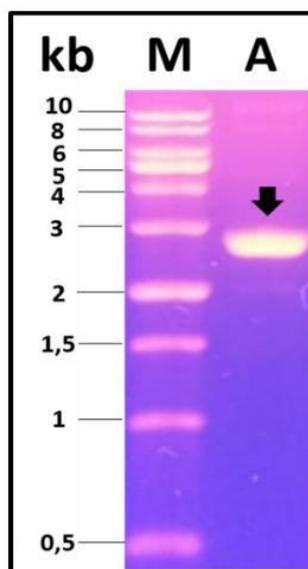
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 48. Sequência de aminoácidos da proteína recombinante ArgR C-terminal mutante Pro115Ser de *C. pseudotuberculosis*. Em destaque, a cauda de histidina (amarelo), o sítio de clivagem para a TEV-protease (azul-claro) e o resíduo de aminoácido que diferencia a ArgR selvagem de *C. pseudotuberculosis* da ArgR com mutação pontual (rosa).

GTREKLRKMLDDLLVSVDHSGNIAVLRTPPGGASFLASFIDRVGMEEVVGTIAGD
DTVFVLARDPMTGQELGEFLSQRRSGNGGENLYFQGHHHHHH

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 49. Gel de agarose 1% (TAE 1X) das amostras de DNA plasmidial pET-28a(+) com inserto da sequência nucleotídica codificadora da ArgR C-terminal de *C. pseudotuberculosis* que supostamente continha a mutação sítio-dirigida Pro115Ser (A) indicada pela seta preta à direita do marcador molecular (Sinapse Inc) em kb. Os experimentos de mutagênese sítio-dirigida foram realizados utilizando o kit de mutagênese *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis* (Agilent Technologies) e a extração e purificação do DNA plasmidial foi feita por meio do kit *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Fisher Scientific).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para confirmação da mutação na sequência nucleotídica, foi realizado o sequenciamento do plasmídeo mutado pelo Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (UNESP – Campus de Jaboticabal), utilizando os primers *forward* (ATGGATGAAGAAAGCGATCTG) e *reverse* (ATGGTGATGATGATGATGACTCTG) sintetizados pela Exxtend, que se anelam aos genes codificadores da nova proteína alvo. As análises das sequências obtidas foram realizadas utilizando o software BioEdit 7.1.11, entretanto os resultados obtidos não foram conclusivos. Devido aos obstáculos encontrados para obtenção de sequenciamentos adequados, novos experimentos utilizando a técnica de PCR deverão ser realizados.

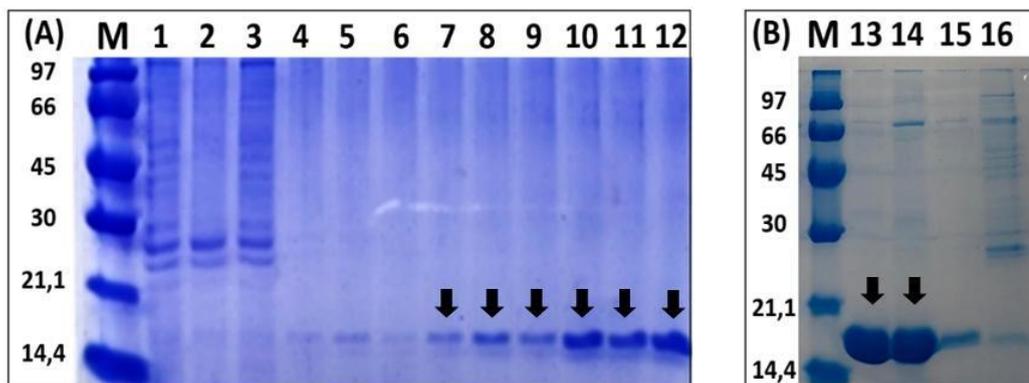
Resultados positivos da mutagênese para obtenção da ArgR mutante Pro115Ser podem proporcionar informações sobre a ligação da proteína ArgR ao DNA praticamente independente de arginina que foi observado em *Thermotoga neapolitana* e *T. maritima*. De acordo com MORIN et al. (2020) a ligação independente de arginina está relacionada com a presença de um resíduo de serina na posição 115 das ArgRs de *T. neapolitana* e *T. maritima*, em vez do resíduo de glutamina altamente conservado, conhecido por estar envolvido na ligação da arginina nos repressores de *E. coli*.

6.2 Estudo da proteína AhrC de *Streptococcus gordonii*

A proteína AhrC é considerada um regulador transcricional homólogo a proteína repressora de arginina (ArgR), as quais controlam a expressão do metabolismo do aminoácido arginina. Análises de sequências genômicas mostraram que a ocorrência de múltiplos homólogos da família de reguladores transcricionais, como a ArgR e AhrC é uma característica comum de muitas bactérias (KOK; KUIPERS, 2005). As proteínas AhrC e ArgR exibem multiplicidade funcional: na presença de arginina, a AhrC reprime os genes da biossíntese de arginina e ativa os genes de catabolismo de arginina (MOUNTAIN; BAUMBERG, 1980). Embora as proteínas AhrC e ArgR compartilhem apenas 27% de identidade de aminoácidos (NORTH, 1989), a AhrC pode complementar funcionalmente a repressão da transcrição exercida pela ArgR presumivelmente por ligação a sequências regulatórias semelhantes.

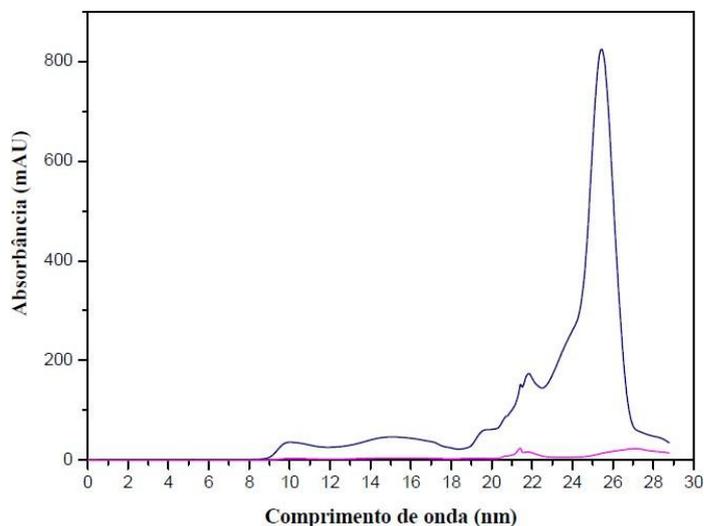
Em experimentos paralelos também foram realizados estudos com a proteína AhrC de *Streptococcus gordonii*, visando resolver sua estrutura cristalográfica para um entendimento mais detalhado do seu papel na regulação gênica e no metabolismo da arginina. Para isso foi realizada a expressão dessa proteína em linhagem de *E.coli* BL21 (DE3)-T1 de acordo com a metodologia do item 4.6 e posteriormente foi realizada a purificação por cromatografia de afinidade (Figura 50) e por exclusão molecular (Figura 51 e 52) de acordo com o item 4.7.1 e 4.7.3. Com os resultados dos géis SDS-PAGE 15% foi possível observar que a amostra proteica obteve um alto grau de pureza, sendo que os experimentos de ensaios de cristalização da proteína AhrC estão em andamento.

Figura 50. SDS-PAGE 15% evidenciando as lavagens com diferentes concentrações de Imidazol realizadas durante a purificação por cromatografia de afinidade da proteína AhrC linhagem BL21 (DE3)-T1. (M) Marcador molecular (*LMW-SDS Marker KIT – GE Healthcare*) em kDa. (1, 2, 3 e 16) Lavagem com 40 mM de Imidazol. (4, 5, 6 e 15) 60 mM de Imidazol. (7, 8, 9 e 14) 80 mM de Imidazol. (10, 11, 12 e 13) 400 mM de Imidazol (eluição).



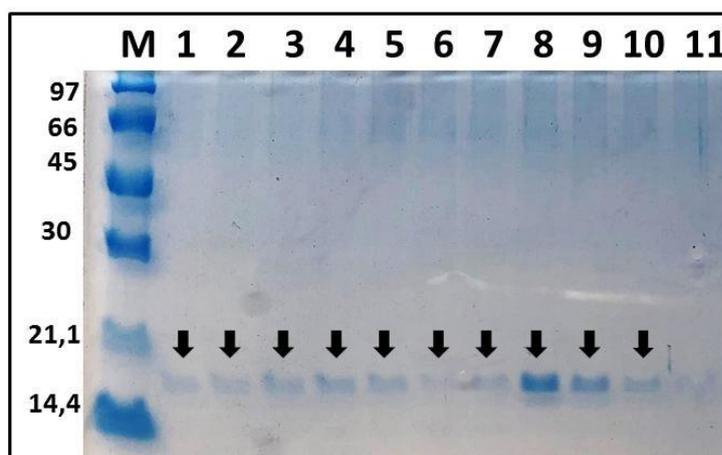
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 51. Segunda etapa de purificação da proteína AhrC linhagem BL21 (DE3)-T1 utilizando tampão 20 mM Tris HCl 100 mM NaCl (pH 7,5). Perfil de cromatografia de exclusão molecular da proteína em Superdex G75 10/300 (GE) após etapa de purificação a partir de Ni-Sepharose. O eixo Y do gráfico corresponde a absorção em mili unidades de absorbância e o eixo X ao volume em mililitros. A linha azul indica a absorbância em 230 nm e a linha rosa absorbância em 280 nm.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 52. SDS-PAGE 15% correspondente à etapa de purificação por exclusão molecular da proteína AhrC linhagem BL21 (DE3)-T1. Os números 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 indicam as amostras coletadas a partir do perfil cromatográfico da proteína AhrC projetado pelo sistema AKTA-pure e a letra “M” corresponde ao marcador molecular (*LMW-SDS Marker KIT – GE Healthcare*) em kDa.



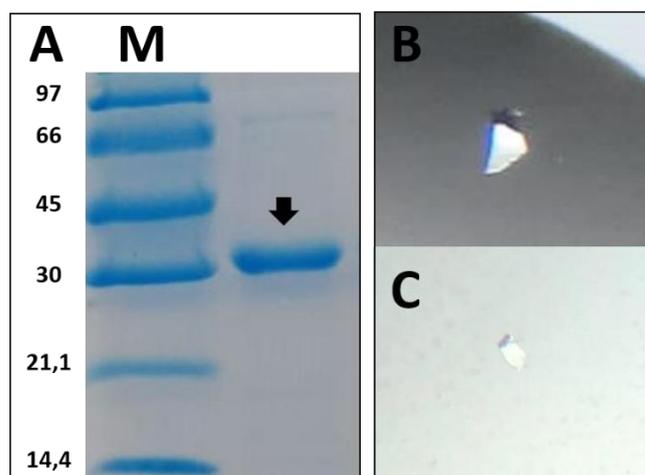
Fonte: Elaborado pelo autor

6.3 Main protease do vírus SARS-CoV-2

Outro projeto paralelo também está sendo executado em parceria com o grupo de pesquisa da *International Helmholtz Research School of Biophysics and Soft Matter, Jülich Research Center – Alemanha*. O objetivo é cocristalizar a proteína *Main protease* (3CLpro) do vírus SARS-CoV-2 com ligantes selecionados que estão sendo pesquisados em nosso

projeto conjunto para entender vias de inibição e proliferação do SARS-CoV-2 usando drogas já aprovadas para o tratamento de outras doenças e infecções (*repurposing approved drugs*). Para isso, o plasmídeo contendo a sequência nucleotídica codificadora da proteína 3CLpro do vírus SARS-CoV-2 acoplada à Glutathione S-transferase (GST-tag) foi utilizado em experimentos de transformação bacteriana em linhagem BL21(DE3)-T1 e expressão proteica. Posteriormente, a proteína de estudo foi utilizada em experimentos de clivagem com a PreScission Protease para a remoção da GST-tag, purificação por cromatografia de afinidade e cromatografia de exclusão molecular (Figura 53A) e cristalização. Cristais iniciais dessa proteína foram obtidos (Figura 53B e Figura 53C) e experimentos de cocristalização da 3CLpro com os possíveis ligantes suramina e quinacrina foram iniciados e estão em fase de refinamento.

Figura 53. (A) SDS-PAGE 15% evidenciando a eficiência dos métodos de purificação por cromatografia de afinidade (GSH-Sepharose) e cromatografia de exclusão molecular (AKTA-pure) da proteína *Main protease* de SARS-CoV-2. A seta preta indica a presença da proteína recombinante e a letra “M” corresponde ao marcador molecular (*LMW-SDS Marker KIT – GE Healthcare*) em kDa. (B e C) Cristal (~50 μm) de *Main protease* obtido pelo método de difusão de vapor em *hanging drop* utilizando a proporção 1:2 proteína: precipitante (0,1 M BIS-TRIS pH 9, 10% w/v *Polyethylene glycol* 200, 18% w/v *Polyethylene glycol* 8000).



Fonte: Elaborado pelo autor.

7. CONCLUSÃO

Os protocolos testados permitiram expressar e purificar as proteínas ArgRs C-terminal de *C. botulinum*, *P. gingivalis* e *N. farcinica*, ArgR *Full Length* de *N. farcinica*, ArgR mutante Pro115His de *C. pseudotuberculosis*, AhrC de *Streptococcus gordonii* e por fim a *Main protease* do vírus SARS-CoV-2.

Também foi possível estabelecer um protocolo de *refolding* para as proteínas ArgRs de *P. gingivalis* e *N. farcinica*, confirmando o sucesso do renovelamento proteico por meio da técnica de Dicroísmo Circular (CD) e garantindo, desse modo, que os alvos estão livres de ligantes. Por meio de ensaios de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) foi possível verificar o aumento no diâmetro hidrodinâmico das proteínas ArgRs de *P. gingivalis* e *N. farcinica* na presença de ligantes como a D-Tirosina e L-Arginina. Essas informações, combinadas com dados de biologia estrutural, podem permitir no futuro encontrar moléculas, que não sejam antibióticos e que possam se ligar especificamente no *pocket* da ArgR desses patógenos, sem afetar microrganismos da microbiota normal do hospedeiro.

Os protocolos testados não permitiram realizar a cristalização das proteínas ArgRs de *N. farcinica*, *P. gingivalis* e *C. botulinum*. Em relação a ArgR mutante P115H de *C. pseudotuberculosis*, os ensaios de cristalização foram bem sucedidos, porém até o momento não foi possível realizar a substituição molecular para obter a solução da estrutura tridimensional. Por conta disso, novos protocolos de cristalização devem ser realizados para encontrar a condição ideal de cristalização dessas proteínas. Resultados positivos na determinação de sua estrutura cristalográfica podem proporcionar informações sobre os mecanismos envolvidos na interação da ArgR desses patógenos com seus possíveis ligantes, que podem atuar inibindo a via de síntese de arginina.

Por meio de métodos computacionais, foi realizada a modelagem por homologia e simulações de dinâmica molecular das proteínas ArgR de *N. farcinica*, *C. botulinum* e *C. pseudotuberculosis* visando compreender melhor a interação das proteínas ArgRs com seus possíveis ligantes. Por meio desse procedimento foi possível concluir que o volume do *pocket* das proteínas ArgRs não é o único fator que influencia na preferência pelos ligantes, sendo que outros fatores como polaridade e interação por cargas também devem ser levados em conta. Por meio desse procedimento foi possível constatar que a ArgR de *N. farcinica* tem preferência pelo ligante Arginina, enquanto a ArgR de *C. botulinum* tem uma maior afinidade pelo ligante tirosina. Além disso, também foi deduzido que na ArgR mutante P115H de *C. pseudotuberculosis* a presença da histidina na posição 115 não impede estericamente a interação com tirosina, sendo que outros fatores podem estar envolvidos na interação.

Desse modo, a hipótese inicial de que os resíduos de aminoácidos Ala115, Pro115 e Gly115, resíduos de cadeia lateral curta, tornam os *pockets* das ArgRs de *P. gingivalis*, *C. botulinum* e *N. farcinica* mais volumosos, permitindo a interação do ligante tirosina no sítio ativo pode ser comprovada parcialmente, já que pode ser visto que o volume do *pocket* não é a única influência sobre a especificidade pelo ligante. Outros fatores estão envolvidos na interação com o ligante nas ArgRs de *P. gingivalis*, *C. botulinum* e *N. farcinica* e *C. pseudotuberculosis*, como por exemplo a interação com outros resíduos de aminoácidos do sítio de ligação. As informações obtidas nesse trabalho podem ser usadas para o desenvolvimento de ligantes que possam ocupar o sítio de ligação da arginina, induzir sua hexamerização via mecanismo alostérico e, conseqüentemente, aumentar sua afinidade pelo DNA, de forma que sua via de síntese seja interrompida e resulte na inibição da proliferação desse patógenos.

Também foram realizados experimentos de mutagênese para obtenção da ArgR mutante Pro115Ser de *C. pseudotuberculosis*. Resultados positivos da mutagênese podem proporcionar informações sobre a ligação da proteína ArgR ao DNA praticamente independente de arginina que foi observado em *Thermotoga neapolitana* e *T. marítima*, podendo confirmar se o resíduo de serina está realmente relacionado a ligação independente de arginina e obter mais informações sobre como ocorre a regulação do metabolismo de arginina nesse caso.

REFERÊNCIAS

- AL-TAWFIQ, J. A.; AL-KHATTI, A. A. Disseminated systemic *Nocardia farcinica* infection complicating alefacept and infliximab therapy in a patient with severe psoriasis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. 153–157, 2010.
- ARNON, S; FEIGEN, R.D.; CEREJA, J.D. Botulismo infantil, livro de texto de doenças infecciosas pediátricas. **Filadélfia WB Saunders**, p. 1570-7, 1998.
- BAIRD, G.J.; FONTAINE, M.C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **J Comp Pathol.**, v. 137, p. 179-210, 2007.
- BERNE, B.J.; PECORA, R. Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics. **J. Chem. Educ**, 1979.
- BOSTANCI, N.; ALLAKER, R.P.; BELIBASAKIS, G.N.; RANGARAJAN, M.; CURTIS, M.A.; HUGHES, F.J.; MCKAY, I.J. *Porphyromonas gingivalis* antagonises *Campylobacter rectus* induced cytokine production by human monocytes. **Cytokine**, v. 39, p. 147–156, 2007a.
- BOSTANCI, N.; BELIBASAKIS, G. N. *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. **FEMS Microbiology Letters**, v. 333, n. 1, p. 1–9, 2012.
- BROWN-ELLIOTT, B.A.; BROWN, J.M.; CONVILLE, P.S.; WALLACE, R.J. JR. Clinical and laboratory features of the *Nocardia spp.* based on current molecular taxonomy. **Clin Microbiol Rev**, v. 19, p. 259-82, 2006.
- BRUNO, P.; RICCI, A. PEZZUTO, A.; MARTONE, L.; GENCARELLI, G.; MARIOTTA, S. SEVERE. Pneumonia caused by *Nocardia farcinica* and complicated by *Staphylococcus haemolyticus* superinfection. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 15, n. 4, p. 401–405, 2011.
- BUDZIK, J.M.; HOSSEINI, M.; MACKINNON, A.C. JR.; TAXY, J.B. Disseminated *Nocardia farcinica*: literature review and fatal outcome in an immunocompetent patient. **Surg Infect (Larchmt)**, v. 1, n. 3, p.163–170, 2012.
- CARLISLE, M.D.; SRIKANTHA, R.N.; BROGDEN K.A. Degradation of human alpha- and beta-defensins by culture supernatants of *Porphyromonas gingivalis* strain 381. **J Innate Immun**, v. 1, p. 118–122, 2009.
- CASE, D.A.; BETZ, R. M.; CERUTTI, D. S.; CHEATHAM, T. E.; DARDEN, T. A.; DUKE, R. E. **AMBER 2016**: University of California, San Francisco, 2016.
- CETINKAYA, B. et al. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. **Vet Microbiol.**, v. 88, p. 75-83, 2002.
- CHERNEY, L. T.; CHERNEY, M. M.; GAREN, C. R.; LU G. J.; JAMES, M. N. Structure of the C-terminal domain of the arginine repressor protein from *Mycobacterium tuberculosis*. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 64, p. 950-956, 2008.

- CORREA, W.M. *Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos*. **Botucatu: UNESP**, 1992.
- COSTA, L.F.M. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente etiológico da linfadenite caseosa em caprinos. **Ver Cienc Med Biol**, v. 1, p. 105-15, 2002.
- CUNIN, R.; GLANSDORFF, N.; PIÉRARD, A.; STALON, V. Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 50, p. 314-352, 1986.
- DE ALENCAR, S.A. Utilização de ferramentas computacionais para o estudo do impacto funcional e estrutural de nsSNPs em genes codificadores de proteínas. Doctoral dissertation, **Universidade Federal de Minas Gerais**, 2010.
- DELANO, W. L. The PyMOL molecular graphics system. **Http://Pymol. Org**, 2002.
- DENNIS, C. C. A.; GLYKOS, N. M.; PARSONS, M. R.; PHILLIPS, S.E. The structure of AhrC, the arginine repressor/activator protein from *Bacillus subtilis*. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 58, p. 421-430, 2002.
- DOMINY, S. S. et al. *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. **Science Advances**, v. 5, n. 1, 2019.
- DORELLA, F.A. et al. Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. **Expert Rev.**, v. 8, p. 205-213, 2009.
- DUYNE, G.D. V.; GHOSH, G.; MAAS, W.K.; SIGLER, P.B. Structure of the oligomerization and L-arginine binding domain of the arginine repressor of *Escherichia coli*. **J Mol Biol**, v. 23, p. 377-91, 1996.
- GREENFIELD, Norma J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature protocols**, v. 1, n. 6, p. 2876, 2006.
- GOLIATT, C.Z.V. Predição de Estrutura 3D de Proteínas por Técnicas de Modelagem Comparativa. **V Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos LNCC – Petrópolis**, 2010.
- HAJISHENGALLIS, G. SHAKHATREH, M.A.; WANG, M.; LIANG, S. Complement receptor 3 blockade promotes IL-12-mediated clearance of *Porphyromonas gingivalis* and negates its virulence in vivo. **J Immunol**, v. 179, p. 2359-2367, 2007.
- HATHEWAY, C.L.; HAUSCHILD, A.H.S.; DODDS, K.L. *Clostridium botulinum* and other clostridia that produce botulinum neurotoxin, *Clostridium botulinum*: ecology and control in foods. **Marcel Dekker**, p. 3-20, 1992.
- HERNANDES GONZALES, J. E.; HERNANDEZ ALVAREZ, P. G.; PASCUTTI, P. G.; VALIENTE, P.A. Predicting binding modes of reversible peptide-based inhibitors of falcipain-2 consistent with structure-activity relationships. **Proteins**, v. 85, p. 1666-1683, 2017.
- HOOFT, R.W.; SANDER, C.; VRIEND, G. Objectively judging the quality of a protein structure from a Ramachandran plot. **Comput Appl Biosci**, v. 13, p. 425-430, 1997.

HOW, K. Y.; SONG K. P.; CHAN, K. G. *Porphyromonas gingivalis*: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 53. 2016.

IANNOTTI, C. A.; HALL, G. S.; PROCOP, G. W.; TUOHY, M. J.; STAUGAITIS, S. M.; WEIL, R. J. Solitary *Nocardia farcinica* brain abscess in an immunocompetent adult mimicking metastatic brain tumor: rapid diagnosis by pyrosequencing and successful treatment. **Surgical Neurology**, v. 72, n. 1, p. 74–79, 2009.

KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J., Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews**, v. 3, p. 935-949, 2004.

KLEYWEGT, G.J.; JONES, T.A. Phi/Psi-chology: Ramachandran revisited. **Ways & Means**, v. 4, n. 12, p. 1395-1400, 1996.

KOK, J.; KUIPERS, O. Interaction between ArgR and AhrC Controls Regulation of Arginine Metabolism in *Lactococcus lactis*. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, p. 19319-30, 2005.

KUMAR, V. A.; AUGUSTINE, D; PANIKAR, D.; NANDAKUMAR, A.; DINESH, K. R.; KARIM, S.; PHILIP, R. *Nocardia farcinica* Brain Abscess: Epidemiology, Pathophysiology, and Literature Review. **Surgical Infections**, v. 15, n. 5, p. 640-646, 2014.

LASKOWSKI, R. A. E. A. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1993.

LELI, C. et al. Fatal *Nocardia farcinica* Bacteremia Diagnosed by Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time of Flight Mass Spectrometry in a Patient with Myelodysplastic Syndrome Treated with Corticosteroids. **Case Rep Med**, 2013.

LEMOS, A. F. P. O papel da *Porphyromonas gingivalis* nas doenças da cavidade oral e sua relação com doenças sistêmicas. 2016. 74 f. Dissertação de Mestrado - Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, 2016.

MADIGAN, M. T. et al. Microbiologia de Brock. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MALEK, A.E.; VIOLA, G.M.; SEILER, G.T. et al. Disseminated *Nocardia farcinica* infection in immunocompromised patient. **Infection**, v. 48, p. 487–488, 2020.

MARIUTTI, R.B. et al. Tyrosine binding and promiscuity in the arginine repressor from the pathogenic bacterium *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 475, p. 350-5, 2016.

MARIUTTI R. B.; HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, J. E.; NASCIMENTO, A. F. Z, et al. A single P115Q mutation modulates specificity in the *Corynebacterium pseudotuberculosis* arginine repressor. **Biochimica et Biophysica acta**, v. 1864, n. 7, 2020.

MILLER, B. R.; MCGEE JR., T. D.; SWAILS, J. M.; HOMEYER, H.; GOHLKE, A. E.; OITBERG, R. MMPBSA.py: an efficient program for end-state free energy calculations. **J. Chem. Theory Comput.**, v. 8, p. 3314-3321, 2012.

MOUNTAIN, A.; BAUMBERG, S. Map locations of some mutations conferring resistance to arginine hydroxamate in *Bacillus subtilis*. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 178, p. 691-701, 1980.

MORIN, A. et al. *Hyperthermophilic Thermotoga* arginine repressor binding to full-length cognate and heterologous arginine operators and to half-site targets. **J Mol Biol.**, v. 332, p.537-553, 2002.

MURSHUDOV, G. N.; VAGIN, A. A.; DODSON, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 53, n. 3, p. 240-255, 1997.

MYDEL, P. et al. Roles of the host oxidative immune response and bacterial antioxidant rubrerythrin during *Porphyromonas gingivalis* infection. **PLoS Pathog**, v. 2, n.76, 2006.

NORTH, A.K. Analysis of a putative cloned arg repressor gene from *Bacillus subtilis*. Ph.D. Thesis. Leeds University, UK, 1989.

NOZAKI, C.N. et al. Extirpação cirúrgica dos abscessos da linfadenite caseosa em caprinos. **Arq Inst Biol.**, v. 67, p. 187-9, 2000.

OLSON, M.E. et al. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. **Can. J. Vet. Res.**, v. 66, p. 86-92, 2002.

PATHIRANA, R.D.; O'BRIEN-SIMPSON, N.M.; REYNOLDS, E.C. Host immune responses to *Porphyromonas gingivalis* antigens. **Periodontology**, v. 52, p. 218–237, 2010.

PATON, M.W. et al. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. **Aust. Vet. J.**, v. 81, p. 91-95, 2003.

PECORA, R. Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 2, p. 123–131, 2000.

PEEL, M.M. et al. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. **Clin Infect Dis.**, v. 24, p. 185-191, 1997.

PHILOT, E.A. Desenvolvimento de um método/software (PL-DOCK) para o Docking Proteína-Ligante usando Algoritmos Genéticos e Biblioteca de Rotâmeros. Sistemas Alvos: protease do HIV-1 e Diidrofolato Redutase. **Universidade Federal do ABC**; Santo André – SP, 2010.

PIONTKOWSKI, M.D.; SHIVVERS, D.W. Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 212, p. 1765–1768, 1998.

RAMACHANDRAN, G.; SASISEKHARAN, V. Conformation of Polypeptides and Proteins. **Advances in Protein Chemistry**, v. 23, p. 283-437, 1968.

RAMACHANDRAN, G.N.; RAMAKRISHNAN, C.; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. **J Mol Biol**, v. 7, p. 95–99, 1963.

SAKANYAN, N. J.; CHARLIER, V.; GLANSDORFF, D.; VANDUYNE, G.D. Structure of the arginine repressor from *Bacillus stearothermophilus*. **Nat Struct Biol**, v. 6, p. 427-432, 1999.

SERPA, O. V. V.; GUTIÉRREZ, A. C.; OTERO, D. A. S.; SALAZAR, J. F. Z.; JARABA, C. A. R. *Porphyromonas gingivalis* ligada a enfermedad periodontal y su relación con la artritis reumatoide: identificación de nuevos mecanismos biomoleculares. **Acta Odontol. Colomb.**, v. 10, n.2, p. 13-38, 2020.

SHAO, J.; TANNER, S. W.; THOMPSON, N.; CHEATHAM, T. E. Clustering molecular dynamics trajectories: 1. characterizing the performance of different clustering algorithms. **J. Chem. Theory Comput.**, v. 3, p. 2312-2334, 2007.

SHAPIRO, R. L.; HATHEWAY, C.; SWERDLOW, D. Botulism in the United States: A Clinical and Epidemiologic Review. **Annals of Internal medicine**, v.129, n. 3, p 221-228, 1998.

SIMPSON, L. L. Identification of the Major Steps in Botulinum Toxin Action. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 44, p. 167-193, 2003.

SINGHRAO, S. K.; OLSEN, I. Assessing the role of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis to determine a causative relationship with Alzheimer's disease. **J Oral Microbiol**, v. 11, n. 1, 2019.

SOBEL, J. Botulism. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 8, p. 1167–1173, 2005.

TIAN, G. et al. Explanation for different types of regulation of arginine biosynthesis in *Escherichia coli* B and *Escherichia coli* K-12 caused by a difference between their arginine repressors. **J. Mol. Biol.**, v. 235, p. 221–230, 1994.

TIKOO, P. et al. *Porphyromonas gingivalis*: Its virulence and vaccine. **Journal of the International Clinical Dental Research Organization**, v. 7, p. 51, 2015.

TORRES, O. H.; DOMINGO, P.; PERICAS, R.; BOIRON, P.; MONTIEL, J. A.; VÁZQUEZ, G. Infection caused by *Nocardia farcinica*: case report and review. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 19, n. 3, p. 205–212, 2000.

TRIBBLE, G. D.; KERR, J. E. WANG, B. Genetic diversity in the oral pathogen *Porphyromonas gingivalis*: molecular mechanisms and biological consequences. **Future Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 607-20, 2013.

TRIBBLE, G.D.; MAO, S.; JAMES, C.E.; LAMONT, R.J. A *Porphyromonas gingivalis* haloacid dehalogenase family phosphatase interacts with human phosphoproteins and is important for invasion. **P Natl Acad Sci**, v. 103, p. 11027-11032, 2006.

VAN DUYNE, G. D.; GHOSH, G.; MAAS, W. K.; SIGLER, P. B. Structure of the oligomerization and L-arginine binding domain of the arginine repressor of *Escherichia coli*. **J Mol Biol**, v. 256, p. 377-391, 1996.

VERLI, H. (Ed.). Bioinformática: da Biologia à flexibilidade molecular/ organizado por Hugo Verli. 1. ed. **São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq**, 2014. 282 p.

VYAS, V. K., et al. Homology Modeling a Fast Tool for Drug Discovery: Current Perspectives. **Indian J Pharm Sci**, v. 74, n. 1, p. 1–17, 2012.

YILMAZ, O.; VERBEKE, P.; LAMONT, R.J.; OJCIUS, D.M. Intercellular spreading of *Porphyromonas gingivalis* infection in primary gingival epithelial cells. **Infect Immun**, v. 74, p. 703–710, 2006.

YILMAZ, O.; YOUNG, P.A.; LAMONT, R.J.; KENNY, G.E. Gingival epithelial cell signalling and cytoskeletal responses to *Porphyromonas gingivalis* invasion. **Microbiology**, v. 149, p. 2417–2426, 2003.

YOKOTA, S.; KAWABE, K.; YAMADA, H.; NUNOMURA, M. A. Case of subcutaneous abscess caused by *Nocardia farcinica* in an aplastic anemia patient. **Nihon ishinkin gakkai zasshi**, v. 51, n. 2, p. 93–97, 2010.

WANG, R. M.; WOLF, J. W.; CALDWELL, P. A.; KOLLMAN, D. A. Case Development and testing of a general amber force field. **J Comput. Chem.**, v 25, n. 9, p. 1157-1174, 2004.

ZINTGRAFF, J. et al. Brain Abscess caused by *Nocardia farcinica*. **International Journal of infectious diseases**, v. 73, p. 158, 2018.