

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA ASSOCIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – DOUTORADO  
UEL/UEPG/UNICENTRO

RENATO FERRAS PENTEADO

ESTUDOS ESTRUTURAIS DAS PROTEÍNAS METIONIL-tRNA SINTETASE DE  
*Rickettsia typhi*, HISTIDIL-tRNA SINTETASE DE *Ehrlichia chaffeensis*, GLICERALDEÍ-  
DO-3-FOSFATO DESIDROGENASE DE *Acinetobacter baumannii* E RECOMBINASE A  
DE *Herbaspirillum seropedicae*

PONTA GROSSA

2023

RENATO FERRAS PENTEADO

ESTUDOS ESTRUTURAIS DAS PROTEÍNAS METIONIL-tRNA SINTETASE DE  
*Rickettsia typhi*, HISTIDIL-tRNA SINTETASE DE *Ehrlichia chaffeensis*, GLICERALDEÍ-  
DO-3-FOSFATO DESIDROGENASE DE *Acinetobacter baumannii* E RECOMBINASE A  
DE *Herbaspirillum seropedicae*

Tese apresentada à Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito do Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Doutorado em Química – Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Iulek

PONTA GROSSA

2023

P419 Pentead, Renato Ferras  
Estudos estruturais das proteínas Metionil-tRNA Sintetase de *Rickettsia typhi*, Histidil-tRNA Sintetase de *Ehrlichia chaffeensis*, Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase de *Acinetobacter baumannii* e Recombinase A de *Herbaspirillum seropedicae* / Renato Ferras Pentead. Ponta Grossa, 2023.  
130 f.

Tese (Doutorado em Química - Área de Concentração: Química),  
Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Iulek.

1. Metionil-tRNA sintetase de *Rickettsia typhi*. 2. Histidil-tRNA sintetase de *Ehrlichia chaffeensis*. 3. Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Acinetoba*. 4. Recombinase A de *Herbaspirillum seropedicae*. I. Iulek, Jorge. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Química. III.T.

CDD: 540



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 - Bairro Uvaranas - CEP 84030-900 - Ponta Grossa - PR - <https://uepg.br>

## TERMO

### TERMO DE APROVAÇÃO

#### RENATO FERRAS PENTEADO

**“ESTUDOS ESTRUTURAIS DAS PROTEÍNAS METIONIL-tRNA SINTETASE DE *Rickettsia typhi*,  
HISTIDIL-tRNA SINTETASE DE *Ehrlichia chaffeensis*, GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO  
DESIDROGENASE DE *Acinetobacter baumannii* E RECOMBINASE A DE *Herbaspirillum seropedicae*”**

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química (Associação UEL/UEPG/UNICENTRO) da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Jorge Iulek (Orientador)  
UEPG/PR

Prof. Dr. João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa  
UnB/DF

Profa. Dra. Nadia Krieger  
UFPR/PR

Prof. Dr. Luciano Huergo  
UFPR/PR

Prof. Dr. Rafael Mazer Etto  
UEPG/PR



**Ponta Grossa, 29 de março de 2023.**



Documento assinado eletronicamente por **Jorge Iulek, Professor(a)**, em 01/06/2023, às 14:13, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **NADIA KRIEGER, Usuário Externo**, em 01/06/2023, às 15:19, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa, Usuário Externo**, em 01/06/2023, às 20:03, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Luciano Fernandes Huergo, Usuário Externo**, em 02/06/2023, às 09:13, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Mazer Etto, Professor(a)**, em 02/06/2023, às 15:23, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.uepg.br/autenticidade> informando o código verificador **1476799** e o código CRC **C24FC07B**.

## AGRADECIMENTOS

Ao orientador Prof. Dr. Jorge Iulek por todos os ensinamentos cessão do *laptop* por vários anos e a ajuda com as diversas questões do Laboratório de Purificação de Proteínas, sobretudo nos últimos meses com os trabalhos nos dados de difração de raios X.

Aos demais membros (egressos e atuais) do laboratório pela ajuda com preparação coletiva de meios de cultura e soluções em geral, preenchimento de caixas de ponteiras, esterilização, transporte do *shaker*, centrifugações e empréstimo de tampões.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa e ao Programa Associado de Pós-Graduação em Química pela oportunidade de realização deste projeto.

Ao Complexo de Laboratórios Multiusuários (C-LABMU) pela infraestrutura e aos técnicos e coordenadores pelo atendimento às demandas de uso de equipamentos em horários extraordinários.

Ao Prof. Dr. Alexandre Camilo do Depto. de Física pela assistência quanto ao uso do supercomputador Beta da Universidade Estadual de Ponta Grossa para a realização da Dinâmica Molecular.

À Profa. Dra. Carolina W. Galvão pela oferta de uso da ultracentrífuga do LABMOM e pela oportunidade de participar do trabalho a respeito da Dinâmica Molecular da HsRecA.

À Dra. Beatriz Gomes Guimarães (Instituto Carlos Chagas – Fiocruz Paraná) por permitir utilizar o equipamento Prometheus Panta para aquisição dos dados de DLS e NanoDSF.

Ao *Seattle Structural Genomics Center for Infectious Disease (SSGCID)* por fornecer os vetores plasmidiais de expressão com os genes das proteínas Metionil-tRNA Sintetase de *Rickettsia typhi*, Histidil-tRNA Sintetase de *Ehrlichia chaffeensis*, Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase de *Acinetobacter baumannii*.

Aos órgãos financiadores do projeto, Fundação Araucária e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelas bolsas, e INBEQMeDI (Instituto Nacional de Biotecnologia Estrutural e Química Medicinal em Doenças Infecciosas) e CNPq pelos recursos para aquisição de equipamentos e reagentes, (573607/2008-7 e 08/57910-00).

## RESUMO

A determinação de estruturas tridimensionais de proteínas de organismos patogênicos pode auxiliar no entendimento do funcionamento detalhado destas macromoléculas e evidenciar características que as diferenciam das presentes em organismos hospedeiros. O conhecimento adquirido desta maneira também pode ser utilizado como ponto de partida para estudos computacionais com vistas a auxiliar a interpretação das informações estruturais já existentes. Neste contexto, o desenvolvimento deste trabalho teve como objetivos determinar a estrutura tridimensional por Cristalografia de Difração de Raios X de três enzimas pertencentes a organismos patogênicos: Metionil-tRNA Sintetase de *Rickettsia typhi* (RtMetRS), Histidil-tRNA Sintetase de *Ehrlichia chaffeensis* (EhHisRS) e Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de *Acinetobacter baumannii* (AbGAPDH), e simular o complexo da Recombinase A do organismo não patogênico *Herbaspirillum seropedicae* (HsRecA) com substratos dsDNA, ATP e íons  $Mg^{2+}$ , nas suas composições nativa e mutante (L53Q), com a finalidade de entender a razão da perda de atividade da proteína mutante. RtMetRS e EhHisRS participam da biossíntese de proteínas e suas funções são prover ao tRNA<sup>Met</sup> (de iniciação e alongação) e ao tRNA<sup>His</sup> os aminoácidos cognatos nos respectivos organismos. RtMetRS, membro da família MetRS1, teve sua estrutura resolvida complexada à L-metionina no grupo de espaço *P1* a uma resolução de 2,30 Å com oito monômeros na unidade assimétrica. Durante o processamento das imagens de difração e confirmação posterior com tentativas de refinamento, verificou-se que os dados indicavam geminação e demandaram a consideração das leis de geminação referentes a quatro domínios cristalinos geminados durante o refinamento estrutural no grupo de espaço de baixa simetria. Além disso, o uso de Simetria Não Cristalográfica (NCS) se mostrou importante pelo impacto positivo na qualidade dos índices de refinamento. A análise da estrutura mostrou que os monômeros apresentam razoável heterogeneidade conformacional entre eles. Observou-se que o domínio CP se encontra em uma conformação diferente daquela observada em complexo equivalente nas homólogas da família MetRS1. A caracterização de estabilidade térmica da RtMetRS nas formas apo e complexos com os substratos L-metionina ou ATP, através da técnica de nanofluorimetria diferencial de varredura (nanoDSF), mostrou que estes substratos não conferiram maior estabilidade significativa frente à desnaturação térmica em relação à forma apo. EhHisRS se mostrou razoavelmente insolúvel e não foi submetida a ensaios de cristalização. A avaliação da sua estabilidade térmica por nanoDSF nas formas apo e complexos com L-histidina ou ATP revelou um  $\Delta T_m \approx +11^\circ C$  para os complexos, portanto, mais estáveis do que os complexos homólogos comparados. Realizou-se a modelagem por homologia de sua estrutura para verificar a possível razão estrutural desta observação no caso do complexo com ATP. A análise da superfície de potencial eletrostático calculada sugere que vários resíduos de lisina e arginina contribuem para uma carga positiva mais elevada próxima ao sítio de ligação do ATP, o que poderia ser responsável por maior força de interação com o substrato e se refletir em maior estabilidade térmica. AbGAPDH foi purificada em quantidade suficiente para realizar apenas alguns ensaios de cristalização iniciais, entretanto, cristais da enzima não mostraram capacidade de difração quando submetidos aos raios X. A análise por nanoDSF realizada para a forma apo da enzima mostrou que o valor de  $T_m$  estimado é comparável àquele reportado para algumas homólogas. Assim, foi realizada a modelagem por homologia de sua estrutura tridimensional. A análise do modelo mostrou que a substituição dos resíduos V, I e L (altamente conservados nas homólogas) por K239 na AbGAPDH poderia dar lugar a interações polares com a porção adenina do cofator. A substituição da F conservada por W240 e a presença da Y136 poderiam propiciar uma interação de empilhamento  $\pi$ - $\pi$  com um ligante aromático intercalado entre as cadeias laterais destes resíduos. Por fim, o estudo por Dinâmica Molecular da Recombinase A, nativa e mutante L54Q, de *Herbaspirillum seropedicae* indicou que a perda de atividade da mutante pode estar relacionada à dispersão da capacidade de transdução de sinais intramolecularmente.

**Palavras-chave:** Metionil-tRNA Sintetase de *Rickettsia typhi*. Histidil-tRNA Sintetase de *Ehrlichia chaffeensis*. Gliceraldeido-3-Fosfato Desidrogenase de *Acinetobacter baumannii*. Recombinase A de *Herbaspirillum seropedicae*.

## ABSTRACT

The three dimensional structure determination of proteins from pathogenic organisms may contribute to understand the detailed functioning of these proteins and highlight features that make them different from host's counterparts. The knowledge acquired in this way may be used as a starting point for computational studies with the aim to assist the interpretation of existing structural information. In the context, this work was developed with the aim of solving the three dimensional structure by X-Ray Crystallography of three enzymes from pathogenic organisms: Methionyl-tRNA Synthetase from *Rickettsia typhi* (RtMetRS), Histidyl-tRNA Synthetase from *Ehrlichia chaffeensis* (EhHisRS) and Glycerinaldehyde-3-phosphate Dehydrogenase from *Acinetobacter baumannii* (AbGAPDH), and to simulate by molecular dynamics the complex of the Recombinase A from *Herbaspirillum seropedicae* (HsRecA) with its substrates dsDNA, ATP and Mg<sup>2+</sup> ions, in its native and mutant composition L53Q), to understand the loss of activity of the mutant enzyme. RtMetRS and EhHisRS participate on protein biosynthesis; their functions include to provide the cognate amino acid to tRNA<sup>Met</sup> (initiator and elongator) and to tRNA<sup>His</sup> in their respective organisms. RtMetRS, a member of MetRS1 family, had its 3D structure solved in complex with L-methionine in the space group *P1* at 2.30 Å resolution with eight monomers in the asymmetric unit. During the diffraction image processing and then later confirmation at refinement trials, it was observed that data indicated twinning and demanded to consider the twin laws for the four twin domains during the structural refinement in the lower symmetry space group. Further, the usage of noncrystallographic symmetry (NCS) was important to improve refinement indices. Structure analyzes showed that the eight monomers are fairly conformationally heterogeneous among them. The CP domain was found in a different conformation from that observed in equivalent homologous complexes of the MetRS1 family. The thermal stability of RtMetRS apo and complexed with either L-methionine or ATP forms, studied by nano Differential Scanning Fluorimetry (nanoDSF), showed that these substrates do not influence the thermal stability of this enzyme when compared to its apo form. EhHisRS proved to be mostly insoluble, so that crystallization assays were not performed. Its thermal stability was assessed by nanoDSF for the apo and complexed with either L-histidine or ATP forms and it showed a  $\Delta T_m \approx +11^\circ\text{C}$  for the complexes, therefore, they are more stable than the compared homologues. A homology modeling was performed to verify if there was a possible structural reason for the observation of thermal stability specially for the complex with ATP. The analysis of electrostatic potential surface calculated for the model suggests that several lysine and arginine residues may contribute to a highly positive charge near the ATP binding site, which could be responsible for a stronger interaction with ATP would be reflected as a higher thermal stability. AbGAPDH was purified to perform a few initial crystallization assays, however, crystals of this enzyme did not show any diffraction when submitted to X-rays. The nanoDSF analysis performed for the apo form of the enzyme showed that the estimated  $T_m$  value is comparable to that reported for some homologues. Thereby its 3D structure was modeled using homology modeling. The analysis of the model showed that the residues V, I and L, highly conserved, substituted for K239 could give rise to polar interaction with the adenine moiety of the cofactor. The substitution of F for W240 and the presence of Y136 could allow for  $\pi$ - $\pi$  stacking interactions with an aromatic ligand intercalated between the side chains of these residues. Eventually the Molecular Dynamic study of the Recombinase A, native and mutant L54Q, from *Herbaspirillum seropedicae* indicated that the loss of activity of the mutant may be related to a more dispersed modes of intramolecular signal transduction.

**Keywords:** Methionyl-tRNA Synthetase from *Rickettsia typhi*. Histidyl-tRNA Synthetase from *Ehrlichia chaffeensis*. Glycerinaldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from *Acinetobacter baumannii*. Recombinase A from *Herbaspirillum seropedicae*.

## LISTA DE FIGURAS

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Figura 1.  | Gel de eletroforese em poliacrilamida 10% do teste de confirmação de expressão da Metionil-tRNA sintetase de <i>Rickettsia typhi</i> . ....   | 33 |
| Figura 2.  | Purificação cromatográfica da Metionil-tRNA sintetase de <i>Rickettsia typhi</i> . ....   | 34 |
| Figura 3.  | Cristais inicialmente obtidos nos ensaios de cristalização com o complexo RtMetRS com metionina. ....   | 37 |
| Figura 4.  | Cristais obtidos nos ensaios de cristalização iniciais realizados para a RtMetRS na concentração de 7,0 mg mL <sup>-1</sup> . ....  | 38 |
| Figura 5.  | Cromatogramas das etapas de purificação e os respectivos géis SDS-PAGE da produção da RtMetRS destinada às análises de DLS e NanoDSF. ....  | 40 |
| Figura 6.  | Resultados de espalhamento dinâmico de luz (DLS) da fração da cromatografia de exclusão por tamanho eluída em 15 mL da RtMetRS nas formas apo e em complexo com ATP ou L-metionina. ....  | 42 |
| Figura 7.  | Resultados de nanofluorimetria diferencial de varredura (NanoDSF) da fração da cromatografia de exclusão por tamanho eluída em 15 mL da RtMetRS nas formas apo e em complexo com ATP ou L-metionina. ....   | 43 |
| Figura 8.  | Alinhamento sequencial entre as enzimas metionil-tRNA sintetases de <i>Brucella melitensis</i> (BmMetRS) e <i>Rickettsia typhi</i> (RtMetRS). ....  | 48 |
| Figura 9.  | Gráficos de Ramachandran para o modelo refinado final da Metionil-tRNA Sintetase de <i>Rickettsia typhi</i> . ....  | 51 |
| Figura 10. | Resíduos de glicina (G237) que se apresentaram fora de regiões permitidas do gráfico de Ramachandran. ....  | 52 |
| Figura 11. | Ambiente local dos resíduos de prolina 183, 239 e 250 que assumem conformação <i>cis</i> na estrutura da Metionil-tRNA sintetase de <i>R. typhi</i> . ....  | 53 |
| Figura 12. | Representação gráfica dos valores de RSCC e RSR calculados para o modelo refinado da RtMetRS por resíduo. ....  | 54 |
| Figura 13. | Estrutura global do monômero da metionil-tRNA sintetase de <i>Rickettsia typhi</i> com o substrato metionina complexado. ....   | 57 |
| Figura 14. | Estrutura tridimensional do <i>knuckle</i> de RtMetRS mostrando os resíduos de aminoácidos que compõem os motivos de ligação ao íon Zn <sup>2+</sup> em algumas estruturas de enzimas homólogas, e alinhamento de sequências entre RtMetRS e enzimas homólogas das famílias MetRS1 e MetRS2. .... | 59 |
| Figura 15. | Posicionamento relativo dos monômeros da metionil-tRNA sintetase de <i>Rickettsia typhi</i> em um dímero da unidade assimétrica. ....   | 61 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 16. Alinhamento de sequências da metionil-tRNA sintetase de <i>Rickettsia typhi</i> com enzimas MetRS homólogas com estrutura tridimensional resolvida. ....  | 63 |
| Figura 17. Mapeamento do grau de conservação sequencial da metionil-tRNA sintetase de <i>R. typhi</i> para a estrutura do monômero A realizado com o servidor Consurf.....   | 66 |
| Figura 18. Sítio de ligação do substrato metionina.....  | 67 |
| Figura 19. Sobreposição estrutural dos monômeros da metionil-tRNA sintetase de <i>Rickettsia typhi</i> .....   | 68 |
| Figura 20. Gel de eletroforese em condições desnaturantes do teste de expressão da Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de <i>Acinetobacter baumannii</i> .....   | 75 |
| Figura 21. Cromatogramas de afinidade e de exclusão por tamanho da Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de <i>Acinetobacter baumannii</i> . ....  | 76 |
| Figura 22. Imagens capturadas de gotas durante observações dos ensaios de cristalização da Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de <i>Acinetobacter baumannii</i> .....   | 77 |
| Figura 23. Curva de distribuição de intensidade obtidas por espalhamento dinâmico de luz (DLS) de uma amostra purificada da Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de <i>Acinetobacter baumannii</i> . ....             | 78 |
| Figura 24. Resultados gráficos do perfil de desnaturação térmica obtidos por nanofluorimetria diferencial de varredura (NanoDSF) para a Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de <i>Acinetobacter baumannii</i> . .... | 79 |
| Figura 25. Alinhamento de sequências de aminoácidos da Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de <i>Acinetobacter baumannii</i> e das enzimas homólogas selecionadas ...  | 81 |
| Figura 26. Gráfico de Ramachandran do modelo monomérico da Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de <i>Acinetobacter baumannii</i> . ....  | 84 |
| Figura 27. Modelo teórico do monômero e do tetrâmero da Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de <i>Acinetobacter baumannii</i> . ....   | 85 |
| Figura 28. Região do modelo de um monômero da Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de <i>Acinetobacter baumannii</i> com uma molécula de NAD <sup>+</sup> ligada. ....  | 86 |
| Figura 29. Resultado de eletroforese em gel de poliacrilamida realizado para o teste confirmação de expressão da Histidil-tRNA Sintetase de <i>Ehrlichia chaffeensis</i> .....   | 93 |
| Figura 30. Purificação da Histidil-tRNA Sintetase de <i>Ehrlichia chaffeensis</i> utilizada nos ensaios de DLS e nanoDSF.....  | 94 |
| Figura 31. Curvas de DLS medidas para amostras purificadas da Histidil-tRNA Sintetase de <i>Ehrlichia chaffeensis</i> . ....   | 95 |
| Figura 32. NanoDSF da Histidil-tRNA Sintetase de <i>Ehrlichia chaffeensis</i> . ....   | 97 |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 33. Alinhamento de sequências utilizado na modelagem por homologia da estrutura tridimensional da histidil-tRNA sintetase de <i>Ehrlichia chaffeensis</i> .....  | 98  |
| Figura 34. Gráfico de Ramachandran gerado pra o modelo do monômero da histidil-tRNA sintetase de <i>Ehrlichia chaffeensis</i> .....   | 99  |
| Figura 35. Modelos construídos do monômero e do dímero da histidil-tRNA sintetase de <i>Ehrlichia chaffeensis</i> . ....  | 101 |
| Figura 36. Superfície de potencial eletrostático da histidil-tRNA sintetase de <i>Ehrlichia chaffeensis</i> e suas homólogas. ....  | 102 |
| Figura 37. Modelo completo para o hexamero da Recombinase A de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> complexado com dsDNA, ATP e Mg <sup>2+</sup> utilizado na dinâmica molecular. ....   | 108 |
| Figura 38. Resultado do cálculo do desvio quadrático médio das coordenadas atômicas (RMSD) e de flutuações quadráticas médias (RMSF) para as trajetórias do complexo nucleoproteico HsRecA-DNA selvagem e mutante L53Q.....                     | 109 |
| Figura 39. Correlação de movimento atômico nas estruturas nativa e mutante da Recombinase A de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> . ....   | 111 |
| Figura 40. Ambiente local do resíduo 53 com destaque para as ligações de hidrogênio (pontilhados amarelos) formadas no motivo MAW após a mutação. ....  | 112 |
| Figura 41. Diferença média dos caminhos mais curtos de interação entre aminoácidos calculada como a média entre $\Delta L$ de cada replicata da trajetória para o complexo nucleoproteico HsRecA-DNA de composição selvagem e mutante L53Q..... | 114 |



## LISTA DE TABELAS

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Tabela 1.  | Composição de condições de cristalização nas quais se desenvolveram cristais no ensaios de cristalização com os kits Morpheus e Structure Screen I. ....  | 36 |
| Tabela 2.  | Índice de polidispersividade (PDI) e temperatura de desnaturação ( $T_m$ ) da RtMetRS na presença e ausência dos substratos ATP ou metionina.....   | 43 |
| Tabela 3.  | Resultados e estatísticas de processamento de imagens e refinamento estrutural para os conjuntos de imagens mtrs02-test02_0026 e Ren_StrucScr_B5_2a-Rt_col_0001 (continua).....                                       | 45 |
| Tabela 3.  | Resultados e estatísticas de processamento de imagens e refinamento estrutural para os conjuntos de imagens mtrs02-test02_0026 e Ren_StrucScr_B5_2a-Rt_col_0001 (conclusão) .....                                     | 46 |
| Tabela 4.  | Resultados da substituição molecular inicial no grupo de espaço $P2_12_12_1$ para o caso do conjunto de dados mtrs02-test02_0026.....   | 48 |
| Tabela 5.  | Dados do refinamento estrutural realizado para o processamento no grupo de espaço $P1$ no qual foram consideradas as operações de geminação. ....   | 49 |
| Tabela 6.  | Comparação dos valores de $R_{work}$ e $R_{free}$ entre as estruturas refinadas nos grupos de espaço $P2_12_12_1$ e $P1$ . ....   | 50 |
| Tabela 7.  | Validação dos ângulos diédricos de cadeia principal e lateral dos monômeros do modelo refinado da RtMetRS.....  | 51 |
| Tabela 8.  | Valores do coeficiente de correlação no espaço real (RSCC) e residual no espaço real (RSR) calculados para o modelo refinado final da RtMetRS ilustrando a qualidade do ajuste do modelo à densidade eletrônica. .... | 54 |
| Tabela 9.  | Resumo das interações proteína-proteína na RtMetRS. ....  | 61 |
| Tabela 10. | Padrões de conservação sequencial observados entre enzimas das famílias MetRS1 e MetRS2.....  | 65 |
| Tabela 11. | Relação das estruturas homólogas utilizadas na modelagem por homologia da Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de <i>Acinetobacter baumannii</i> .....   | 80 |
| Tabela 12. | Parâmetros hidrodinâmicos e temperatura de desnaturação térmica da histidil-tRNA sintetase de <i>Ehrlichia chaffeensis</i> .....  | 97 |

## LISTA DE SIGLAS

|                   |   |
|-------------------|---|
| AaRS              | Aminoacil-tRNA Sintetases   |
| AbGAPDH           | GAPDH de <i>Acinetobacter baumannii</i>   |
| ATP               | Adenosina Trifosfato  |
| DLS               | <i>Dynamic Light Scattering</i> (Espalhamento Dinâmico de Luz)  |
| EhHisRS           | Histidil-tRNA Sintetase de <i>Ehrlichia chaffeensis</i>   |
| GAPDH             | Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase   |
| IMAC              | <i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i> (Cromatografia de afinidade por metal imobilizado)                                 |
| LNLS              | Laboratório Nacional de Luz Síncrotron  |
| NAD <sup>+</sup>  | Nicotinamida adenina dinucleotídeo - forma oxidada  |
| NADP <sup>+</sup> | Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato - forma oxidada  |
| NanoDSF           | <i>Nano-format Differential Scanning Fluorimetry</i> (Nanofluorimetria Diferencial de Varredura)                                    |
| NCBI              | <i>National Center for Biotechnology Information</i>  |
| NCS               | Noncrystallographic symmetry (Simetria não cristalográfica)   |
| PDB               | <i>Protein Data Bank</i> (Banco de Dados de Proteínas)  |
| PDI               | <i>Polydispersity index</i> (Índice de polidispersividade)  |
| PEG               | <i>Polyethylene glycol</i> (Polietileno glicol)   |
| RecA              | Recombinase A   |
| RMSD              | <i>Root mean square deviation</i> (Desvio quadrático médio)   |
| RSCC              | <i>Real Space Correlation Coefficient</i> (Coeficiente de Correlação no Espaço Real)  |
| RSR               | <i>Real Space Residual</i> (Residual no Espaço Real)  |
| RtMetRS           | Metionil-tRNA Sintetase de <i>Rickettsia typhi</i>  |
| SDS-PAGE          | Eletroforese em gel de poliacrilamida   |
| SEC               | <i>Size Exclusion Chromatography</i> (Cromatografia de Exclusão por Tamanho)  |
| SSGCID            | <i>Seattle Structural Genomic Center for Infectious Disease</i> (Centro de Genômica Estrutural para Doenças Infecciosas de Seattle) |

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....  | 17 |
| <b>OBJETIVO GERAL</b> .....  | 19 |
| <b>CAPÍTULO 1 – METIONIL-tRNA SINTETASE DE <i>Rickettsia typhi</i></b> .....   | 20 |
| 1 <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 20 |
| 1.1    Enzimas Aminoacil-tRNA Sintetases .....   | 20 |
| 1.1.1  Enzima Metionil-tRNA Sintetase .....  | 21 |
| 1.2 <i>Rickettsia typhi</i> .....  | 22 |
| 1.3 <b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....   | 24 |
| 1.4 <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....   | 25 |
| 1.4.1  Escolha e Obtenção do Gene da Metionil-tRNA Sintetase de <i>Rickettsia typhi</i> .....  | 25 |
| 1.4.2  Métodos Gerais para Recuperação de Plasmídeos, Bactérias, Superexpressão, Purificação das Proteínas e Ensaio de Cristalização ..... | 25 |
| 1.4.2.1 Preparação de células quimiocompetentes .....  | 25 |
| 1.4.2.2 Recuperação dos plasmídeos .....   | 26 |
| 1.4.2.3 Transformação .....  | 26 |
| 1.4.2.4 Superexpressão e purificação .....   | 26 |
| 1.4.2.5 Ensaio de cristalização .....  | 27 |
| 1.4.3  Coleta de Dados de Difração de Raios X .....  | 28 |
| 1.4.4  Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Nanofluorimetria Diferencial de Varredura (NanoDSF) .....                                      | 29 |
| 1.4.5  Procedimentos Computacionais .....  | 30 |
| 1.4.5.1 Determinação de estrutura cristalográfica por difração de raios X .....  | 30 |
| 1.4.5.1.2 <i>Atribuição inicial de fases</i> .....   | 30 |
| 1.4.5.1.3 <i>Refinamento estrutural</i> .....  | 31 |
| 1.4.5.1.4 <i>Validação do modelo final</i> .....   | 31 |
| 1.4.5.2 Análises e comparações estruturais .....   | 32 |
| 1.4.5.2.1 <i>Topologia da estrutura da RtMetRS</i> .....   | 32 |
| 1.4.5.2.2 <i>Comparações estruturais com proteínas homólogas</i> .....   | 32 |
| 1.4.5.2.3 <i>Determinação dos contatos estabelecidos entre RtMetRS e a metionina</i> .....   | 32 |
| 1.5 <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | 32 |
| 1.5.1  Superexpressão e Purificação da Metionil-tRNA Sintetase de <i>Rickettsia typhi</i> (RtMetRS) .....                                  | 32 |
| 1.5.2  Cristalização da RtMetRS .....  | 35 |
| 1.5.3  Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Nanofluorimetria Diferencial de Varredura (NanoDSF) .....                                      | 39 |
| 1.5.4  Procedimentos Computacionais .....  | 44 |

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| 1.5.4.1   | Determinação da estrutura de RtMetRS por difração de raios X .....   | 44 |
| 1.5.4.1.1 | <i>Coleta de dados e processamento de imagens</i> .....  | 44 |
| 1.5.4.1.2 | <i>Atribuição de fases iniciais por substituição molecular</i> .....   | 47 |
| 1.5.4.1.3 | <i>Modelagem e refinamento</i> .....   | 49 |
| 1.5.4.1.4 | <i>Validações</i> .....  | 51 |
| 1.5.4.1.5 | <i>Descrição da estrutura da metionil-tRNA sintetase de Rickettsia typhi e comparações estruturais</i> ..... | 56 |
| 1.5.4.1.6 | <i>Alinhamento estrutural, análise de conservação e contatos com L-metionina</i> .....                       | 62 |
| 1.6       | CONCLUSÕES .....   | 68 |

## **CAPÍTULO 2 - GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE DE *Acinetobacter***

|         |  |    |
|---------|--|----|
|         | <b><i>baumannii</i></b> .....  | 70 |
| 2.1     | INTRODUÇÃO .....   | 70 |
| 2.1.1   | <i>Acinetobacter baumannii</i> .....   | 70 |
| 2.1.2   | Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase .....  | 71 |
| 2.2     | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 72 |
| 2.3     | MATERIAIS E MÉTODOS .....  | 73 |
| 2.3.1   | Escolha e Obtenção do Gene da Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de <i>Acinetobacter baumannii</i> (AbGAPDH) .....                    | 73 |
| 2.3.2   | Métodos Gerais para Recuperação de Plasmídeos, Bactérias, Superexpressão, Purificação das Proteínas e Ensaio de Cristalização .....      | 73 |
| 2.3.2.1 | Recuperação do plasmídeo .....   | 73 |
| 2.3.2.2 | Superexpressão e purificação .....   | 73 |
| 2.3.2.3 | Ensaio de cristalização .....  | 73 |
| 2.3.4   | Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Nanofluorimetria Diferencial de Varredura (NanoDSF) .....   | 74 |
| 2.3.5   | Procedimentos Computacionais .....   | 74 |
| 2.3.5.1 | Modelagem por homologia e análise da estrutura modelada da Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de <i>Acinetobacter baumannii</i> ..... | 74 |
| 2.4     | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 74 |
| 2.4.1   | Superexpressão e Purificação .....   | 74 |
| 2.4.2   | Ensaio de cristalização da Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de <i>Acinetobacter baumannii</i> .....                                 | 76 |
| 2.4.3   | Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Nanofluorimetria Diferencial de Varredura (NanoDSF) .....   | 77 |
| 2.4.4   | Modelagem por Homologia da estrutura da Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de <i>Acinetobacter baumannii</i> .....                    | 79 |
| 2.5     | CONCLUSÕES .....   | 87 |

|   |  |     |
|---|--|-----|
| <b>CAPÍTULO 3 – HISTIDIL-tRNA SINTETASE DE <i>Ehrlichia chaffeensis</i></b> ..... | 88   |     |
| 3.1   | INTRODUÇÃO.....  | 88  |
| 3.1.1   | <i>Ehrlichia chaffeensis</i> .....   | 88  |
| 3.1.2   | Histidil-tRNA Sintetase.....   | 89  |
| 3.2   | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 90  |
| 3.3   | MATERIAIS E MÉTODOS.....   | 91  |
| 3.3.1   | Escolha e obtenção do gene da Histidil-tRNA Sintetase de <i>Ehrlichia chaffeensis</i> .....                              | 91  |
| 3.3.2   | Métodos Gerais para Recuperação de Plasmídeos, Bactérias, Superexpressão, Purificação da Proteína .....                  | 91  |
| 3.3.2.1   | Recuperação do plasmídeo .....   | 91  |
| 3.3.2.2   | Superexpressão e purificação .....   | 91  |
| 3.3.3   | Espalhamento Dinâmico de Luz e Nanofluorimetria Diferencial de Varredura .....   | 91  |
| 3.3.4   | Procedimentos Computacionais.....  | 92  |
| 3.3.4.1   | Modelagem por homologia e análise da estrutura modelada da Histidil-tRNA Sintetase de <i>Ehrlichia chaffeensis</i> ..... | 92  |
| 3.4   | RESULTADOS E DISCUSSÃO.....  | 92  |
| 3.4.1   | Expressão e Purificação da Histidil-tRNA Sintetase de <i>Ehrlichia chaffeensis</i> .....                                 | 92  |
| 3.4.2   | Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Nanofluorimetria Diferencial de Varredura (NanoDSF).....                            | 93  |
| 3.4.3   | Modelagem por Homologia da Estrutura da Histidil-tRNA Sintetase de <i>Ehrlichia chaffeensis</i> .....                    | 98  |
| 3.5   | CONCLUSÕES .....   | 102 |

## **CAPÍTULO 4 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MUTAÇÃO L53Q NA RECOMBINASE**

### **A DE *Herbaspirillum seropedicae* POR DINÂMICA MOLECULAR** ....

|         |  |     |
|---------|--|-----|
| 4.1     | INTRODUÇÃO.....  | 104 |
| 4.1.1   | Recombinase A de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> (HsRecA).....                         | 104 |
| 4.2     | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 105 |
| 4.3     | MATERIAIS E MÉTODOS.....   | 106 |
| 4.3.1   | Dinâmica Molecular da Recombinase A de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> (HsRecA) .....  | 106 |
| 4.3.1.1 | Reconstrução dos <i>loops</i> não modelados na estrutura cristalográfica da HsRecA ..... | 106 |
| 4.3.1.2 | Dinâmica molecular.....  | 106 |
| 4.3.2   | Redes de Contatos Dinâmicos de Aminoácidos .....   | 107 |
| 4.4     | RESULTADOS E DISCUSSÃO.....  | 108 |
| 4.4.1   | Dinâmica Molecular da Recombinase A de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....           | 108 |
| 4.4.1.1 | Mutação L53Q .....   | 108 |
| 4.5     | CONCLUSÕES .....   | 114 |

|  |            |
|--|------------|
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>   | <b>115</b> |
| <b>APÊNDICE A – PRIMEIRA PÁGINA DO ARTIGO PUBLICADO COM OS<br/>RESULTADOS DA DINÂMICA MOLECULAR DA RECA DE<br/><i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....</b> | <b>129</b> |

## INTRODUÇÃO GERAL

As proteínas são um dos constituintes mais importantes de todas as formas de vida e perfazem uma proporção significativa da matéria contida em uma célula viva. Estas macromoléculas, polímeros de moléculas de aminoácidos cuja sequência provém da tradução de RNA mensageiro (mRNA – produto da transcrição da informação genética contida no DNA), são sintetizadas por componentes supramoleculares presentes nas células, os ribossomos, e na maior parte dos casos são o produto final do processo de expressão gênica. A tradução se refere à interpretação da informação contida no mRNA, nas suas triplas de nucleotídeos, que têm correspondência a um determinado aminoácido. Outras moléculas de RNA são essenciais na síntese de proteínas, como o RNA ribossomal (rRNA), que participa da catálise da formação de ligações peptídicas entre aminoácidos de uma nova cadeia polipeptídica, e o RNA transportador (tRNA), que medeia a tradução da informação genética para proteína.

Uma molécula de tRNA é composta de aproximadamente 80 nucleotídeos e, embora apresente diversidade composicional, tem um enovelamento comum que se assemelha à uma letra “L” tridimensionalmente. Basicamente, a função do tRNA é prover cada aminoácido necessário à cadeia polipeptídica nascente no ribossomo. Isto é possível porque uma molécula de tRNA é aminoacilada com o aminoácido cognato de forma que a interação do anticódon do aminoacil-tRNA com o códon do mRNA sendo lido no ribossomo seja proficiente.

O processo de aminoacilação é realizado por enzimas denominadas aminoacil-tRNA sintetases (aaRS). Existe uma aaRS para cada um dos vinte aminoácidos e sua função é desempenhada em duas etapas. A primeira é a de ativação do aminoácido através da reação com uma molécula de ATP para produzir um intermediário aminoacil adenilato. Na segunda etapa o aminoácido é transferido para a hidroxila 3' da adenosina na extremidade do braço acceptor do tRNA.

As diferentes proteínas assim sintetizadas vão desempenhar variadas funções em um organismo vivo, como catálise, transporte de moléculas pequenas e íons, regulação de diversos processos celulares, proteção, manutenção da estrutura física celular, transdução de sinais, etc. O entendimento da função de uma determinada proteína se relaciona com a sua constituição aminoacídica e como seus aminoácidos constituintes se organizam tridimensionalmente. O estudo de estrutura de proteínas é fundamentalmente importante não apenas para compreensão das suas funções durante a sua atuação normal, mas também em situações de desenvolvimento de patologias oriundas seja devido a defeitos em proteínas endógenas ou devido a proteínas

exógenas advindas de organismos externos, estas últimas atuando diretamente ou porque mantêm os organismos patogênicos funcionais.

Neste trabalho foram realizados estudos com vistas à determinação da estrutura tridimensional de três enzimas cujas estruturas tridimensionais ainda não são conhecidas experimentalmente: a metionil-tRNA sintetase de *R. typhi* (RtMetRS), a histidil-tRNA sintetase de *E. chaffeensis* (EhHisRS) e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Acinetobacter baumannii* (AbGAPDH). Também, realizou-se um estudo computacional por dinâmica molecular da enzima Recombinase A de *Herbaspirillum seropedicae* (HsRecA) com o intuito de se compreender a observação experimental da perda de atividade recombinatorial desta enzima pela mutação L53Q.

A tese foi dividida em capítulos de maneira que em cada um fosse tratada uma proteína. No primeiro, são descritos os procedimentos para determinação da estrutura tridimensional por difração de raios X da RtMetRS desde a expressão heteróloga, purificação e cristalização, análise da estrutura e caracterização da estabilidade térmica por Nanofluorimetria Diferencial de Varredura (NanoDSF) nas formas apo e de complexos com seus substratos. O segundo trata da expressão heteróloga, purificação, ensaios de cristalização, caracterização da estabilidade térmica e modelagem por homologia da AbGAPDH. No terceiro, são descritas a expressão heteróloga, purificação, caracterização da estabilidade térmica e modelagem por homologia da EhHisRS. Por fim, o quarto capítulo trata da simulação por Dinâmica Molecular da HsRecA com estrutura nativa e mutante L53Q, com a finalidade de se entender a perda de atividade da enzima mutante.



## OBJETIVO GERAL

Obter a estrutura tridimensional, por métodos experimentais das enzimas metionil-tRNA sintetase de *Rickettsia typhi*, histidil-tRNA sintetase de *Ehrlichia chaffeensis* e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Acinetobacter baumannii*, e por modelagem computacional, aliada a estudo por dinâmica molecular, do complexo Recombinase A e dsDNA de *Herbaspirillum seropedicae*, nativa e mutada, tal que se compreenda as razões que levam à perda de atividade quando é introduzida a mutação do aminoácido leucina 53 por glutamina.

## CAPÍTULO 1 – METIONIL-tRNA SINTETASE DE *Rickettsia typhi*

### 1 INTRODUÇÃO

#### 1.1 Enzimas Aminoacil-tRNA Sintetases

Aminoacil-tRNA sintetases (aaRS) compõem uma classe de enzimas de inigualável importância funcional uma vez que estão diretamente ligadas à síntese de proteínas. A função clássica destas enzimas é prover a uma molécula de RNA transportador (tRNA) o aminoácido cognato através da condensação destes substratos, embora outras funções importantes tenham sido atribuídas às aaRS. Elas são distribuídas em duas classes, classe I e classe II, cujo critério de classificação é a arquitetura do sítio ativo, cada qual com dez integrantes, que podem ser agrupados ainda em três subdivisões (RAJENDRAN et al., 2018).

A especificidade em relação ao aminoácido é estabelecida por meio da afinidade diferenciada entre os substratos cognatos e não cognatos. A seleção do aminoácido correto dentro do sítio ativo se dá pela exclusão estérica daqueles com tamanho superior ou pela minimização da afinidade de ligação de aminoácidos menores ou isostéricos utilizando interações eletrostáticas e hidrofóbicas (FERSHT et al., 1985; FERSHT, 1987). Nos casos em que a afinidade é semelhante, as aaRSs utilizam mecanismos de edição para realizar a ligação ao substrato correto (BEUNING; MUSIER-FORSYTH, 2000).

A maioria das aaRSs realiza diretamente a reação de aminoacilação do tRNA substrato por um mecanismo em duas etapas. Na primeira etapa, o aminoácido correspondente é ativado por ATP para formar o intermediário aminoaciladenilato, acompanhado da liberação de pirofosfato inorgânico. Após a ligação do tRNA, há a transferência do aminoácido e liberação do AMP (HO et al., 2018).

Devido à criticidade do papel biológico desempenhado pelas aminoacil-tRNA sintetases, elas são atrativas como alvos para desenvolvimento de substâncias anti-infectivas frente a muitos microrganismos patogênicos, não somente porque produzem as moléculas intermediárias, aminoacil-tRNAs, que possibilitam que os aminoácidos sejam incorporados à cadeia polipeptídica nascente, mas por assegurarem a fidelidade deste processo. Assim, a escolha das aaRSs como alvos de estudos estruturais pode ser de grande valia e auxiliar o desenvolvimento de novos compostos com propriedades farmacológicas que interfiram especificamente na atividade dessas enzimas. Algumas características que reforçam o interesse no estudo das aaRSs neste contexto podem ser mencionadas: (i) apresentam divergência evolutiva entre procariotos e eucariotos, que podem ser usadas para desenvolver substâncias que não atuem indesejavelmente

nas correspondentes humanas; (ii) são enzimas bastante conservadas entre patógenos bacterianos, o que pode ser explorado no sentido de produzir antibióticos de espectro amplo; (iii) representam vinte alvos independentes que estão presentes como um conjunto completo na maioria das bactérias patogênicas; (iv) podem ser produzidas heterologicamente em quantidades razoavelmente altas e de maneira estável, (v) muitas delas possuem estrutura tridimensional determinada por difração de raios X, que proveem uma abordagem estrutural para o desenvolvimento de quimioterápicos (HURDLE; O'NEILL; CHOPRA; 2005) e, geralmente, antibióticos que interferem na via de síntese de proteínas têm como alvo subunidades ribossomais ou RNA ribossomal (rRNA) (PHAM et al., 2014; MOEN et al., 2017; HO et al., 2018).

As pesquisas por inibidores específicos de aaRSs resultaram em vários compostos com bom potencial, alguns em testes clínicos (KIM et al., 2003). Como exemplo de caso bem sucedido de substância dedicada à inibição da atividade de aaRS, pode-se citar o uso da mupirocina, clinicamente utilizada como antibacteriano tópico em infecções cutâneas por *Staphylococcus aureus* (PHAM et al., 2014; NAKAMA; NUREKI; YOKOYAMA, 2001).

### 1.1.1 Enzima Metionil-tRNA Sintetase

Esta enzima pertence à classe I (subclasse Ia) das aminoacil-tRNA sintetases. A sua composição, em termos de domínios, pode ser exemplificada com a estrutura da metionil-tRNA sintetase de *Escherichia coli*, que pode ser dividida em quatro domínios: domínio com enovelamento Rossmann (resíduos 1-96 e 252-323), domínio CP (*conector peptide*) (97-251), domínio KMSKS (324-384 e 536-547) e domínio carboxi-terminal (385-535). Outra característica estrutural a se destacar é a existência de motivos chamados *knuckles* que podem apresentar íons  $Zn^{2+}$ . A ligação destes íons pode ter alguma importância na reação de ativação da metionina, bem como na transferência do aminoácido para o tRNA (MECHULAM et al., 1999).

Com base na estrutura cristalina da MetRS de *E. coli* complexada com L-metionina, identificou-se o sítio de ligação, que se mostrou uma cavidade hidrofóbica. Na enzima livre, uma cadeia lateral de Y260 e a cadeia principal de L13 mantêm ligada uma molécula de água, enquanto no complexo metionina:enzima a mesma posição é ocupada pelo enxofre delta do aminoácido. De forma geral, vários resíduos sofrem rearranjo no sítio ativo após a ligação da metionina. O resíduo H24 do motivo conservado HIGH, bem como a cadeia lateral de Y15, estão envolvidos na ligação do grupo carboxilato alfa do substrato através de uma molécula de água. O grupo amino alfa é mantido em posição pela cadeia lateral do D52 e o oxigênio carbonílico da L13.

Estudos em que foram realizadas mutações nos aminoácidos do motivo HIGH mostraram que o estado de transição é estabilizado pelas duas histidinas durante a formação do intermediário metioniladenilato (SCHMITT et al., 1995). A ligação da metionina desencadeia alterações estruturais em várias regiões, especialmente dos resíduos 118-235 que participam do domínio CP. O movimento deste domínio pode ter origem na interação de  $\pi$ -stacking entre W299 e F304 que ocorre em resposta à ligação da metionina. Além disso, a mobilidade do domínio CP poderia ainda influenciar resíduos próximos do *knuckle* de  $Zn^{2+}$  e duas glutaminas do próprio CP envolvidos na taxa de aminoacilação do tRNA (MEINNEL et al., 1991). A região carboxi-terminal apresenta certo grau de flexibilidade que, por sua vez, pode ser responsável pela comunicação com a região amino-terminal durante a reação de aminoacilação.

A metionina participa tanto da iniciação quanto da elongação durante a síntese de proteínas, o que implica na existência de um tRNA acceptor para cada função. Entretanto, a mesma metionil-tRNA sintetase deve reconhecer dois substratos distintos que possuem o mesmo anticódon CAU (onde as letras C, A e U representam os nucleotídeos citosina, adenina e uracila) e também ocorre no mesmo sítio na superfície da enzima. O anticódon  $C_{34}A_{35}U_{36}$  é de grande importância na formação do complexo MetRS-tRNA de forma proficiente, mesmo frente a tRNAs heterólogos (BLANQUET; PETRISSANT; WALLER, 1973). O nucleotídeo A73 também se apresenta como importante para a eficiente realização de metionilação (UEMURA et al., 1982), pois quando substituído por outros nucleotídeos, a eficiência da reação se reduz. Apesar da importância crucial do anticódon CAU, outras regiões do tRNA são importantes, como o tamanho do loop do anticódon (MEINNEL et al., 1992) e o braço acceptor (MEINNEL et al., 1993).

## 1.2 *Rickettsia typhi*

As espécies englobadas no gênero *Rickettsia* são  $\alpha$ -proteobactérias cocobacilares, gram-negativas, aeróbicas e de ciclo de vida estritamente intracelular que envolve hospedeiros vertebrados e invertebrados. Elas dependem de artrópodes hematófagos como vetores e reservatórios primários, apesar de que pequenos animais, como ratos e gambás, também podem ser usados para fins de replicação (McLEOD et al., 2004). *Rickettsias* são classificadas em quatro grupos de acordo com suas características biológicas, genéticas e antigênicas. Inicialmente, estes organismos eram classificados em apenas dois grupos: o da febre maculosa (*Spotted Fever Group* – SFG), que inclui *R. conorii*, *R. sibirica*, *R. rickettsii*, e o grupo tifo (*Thyphus Group* – TG), que inclui *R. prowazekii* e *R. typhi*. À medida que novas espécies foram sendo descobertas, mais dois outros grupos foram criados, o grupo transicional, que inclui as

espécies *R. akari*, *R. australis* e *R. felis*; e grupo ancestral, que inclui *R. bellii* e *R. canadensis* (MCLEOD et al., 2004; WALKER e ISMAIL, 2008, GILLESPIE et al., 2009). Devido à sua patogenicidade e à severidade das doenças causadas em seres humanos, algumas espécies do gênero *Rickettsia* estão inseridas nas categorias B (*R. rickettsii* e *R. prowazekii*) e C (*R. typhi*) na classificação de patógenos prioritários do *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID) e também constam como agentes selecionados (pelo potencial de servirem ao propósito de bioterrorismo - *R. rickettsii* e *R. prowazekii*) pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (CHAN et al., 2010).

Em consequência do estilo de vida obrigatoriamente intracelular, o processo evolutivo destas bactérias as tornou muito especializadas em invadir e parasitar seus hospedeiros de modo que uma característica notória desses organismos é a redução genômica. *Rickettsias* apresentam genomas que variam em tamanho de 1,1 a 2,3 Mpb, com 75,2-85,2% do material genético de fato codificante (DIOP; RAOULT; FOURNIER, 2018), além de que apresentam muitos pseudogenes e genes divididos (WALKER e YU, 2005). Esta redução genômica se dá como resultado da perda de genes considerados não essenciais e de alguns componentes de determinadas vias biossintéticas, portanto, essas bactérias necessitam obter metabólitos das células do hospedeiro, transportando-os para o interior de suas próprias células (EL KARKOURI et al., 2017). *Rickettsias* são capazes de sintetizar ATP, entretanto, utilizam ATP da célula hospedeira, por meio de translocase de ADP-ATP, até que a concentração deste metabólito seja reduzida, em cujo caso então passam a realizar sua síntese (SAHNI et al., 2019).

A degradação gênica é observada principalmente em genes codificantes de componentes do metabolismo de aminoácidos e de carboidratos, síntese de nucleotídeos, biossíntese de lipídeos (DIOP; RAOULT; FOURNIER, 2018; SAHNI et al., 2019).

A análise de genomas de um grande número de espécies de *Rickettsias* mostrou uma tendência de que espécies mais virulentas apresentam genomas menores do que espécies menos virulentas (EL KARKOURI et al., 2017). O genoma de *R. typhi* apresenta 42 genes de proteínas que possivelmente se constituem fatores de virulência. Alguns exemplos são hemolisinas, enzimas envolvidas na sobrevivência dentro do citoplasma; fosfolipases, relacionadas ao escape do fagolisossomo e da membrana citoplasmática da célula infectada; proteínas da biossíntese de lipopolissacarídeo; proteínas associadas ao sistema de secreção tipo IV e autotrasportadores (Sca1-4 e OmpB) (MCLEOD et al., 2004).

*R. typhi* é o agente causador do tifo murino (tifo endêmico) e apresenta uma grande semelhança genética com *R. prowazekii*, que é o organismo causador do tifo epidêmico. Apesar da semelhança entre estes organismos, *R. typhi* é um patógeno mais brando para seres humanos (GILLESPIE et al., 2009). A infecção por *R. typhi* se caracteriza por sintomas como febre,

cefaleia e mialgia; pode levar a doenças multissistêmicas e disseminadas como infecção no cérebro, pulmões, fígado, rins, endotélio cardíaco, vasculite linfocitolítica do sistema nervoso central, dano alveolar difuso e hemorragia, pneumonia intersticial, edema pulmonar, miocardite e nefrite intersticial, triadíte portal e hemorragia cutânea, mucosal e serosal (WALKER et al., 1989). Apesar de severidade demonstrada em muitos casos, em geral, o tifo murino apresenta taxa de mortalidade baixa, menor ou igual a 1% dos casos reportados (WALKER e ISMAIL, 2008), mesmo sem tratamento a infecção é autocontida dentro de um período de 7 a 14 dias (PARIS e DAY, 2014). O tratamento para o tifo murino é feito com antibióticos doxiciclina ou tetraciclina (alternativamente, indivíduos hipersensíveis, com disfunções hepáticas ou gestantes podem ser tratados com cloranfenicol ou ciprofloxacina) (KNOOP, 2014). A infecção por *R. typhi* afeta indivíduos mundialmente, entretanto, na literatura mais comumente são descritos casos em países das Américas (a maioria nos Estados Unidos, sobretudo nos estados do Texas e Califórnia), da África, Europa e do sudeste da Ásia (WALTER et al., 2012; BLANTON, 2019).

A inoculação do organismo hospedeiro mamífero pode ocorrer pela picada do vetor infectado (pulga de rato – principal vetor – *Xenopsylla cheopis*; pulga de gato, *Ctenocephalides felis* ou piolho de rato, *Polyplax spinulos*), bem como pelos seus excrementos, quando estes são levados às regiões irritadas ou danificadas da pele do hospedeiro (SAHNI et al., 2019). Outros mecanismos potenciais de contaminação são o contato na mucosa conjuntiva e por inalação de fezes secas contaminadas dos vetores (PARIS e DAY, 2014).

*R. typhi* infecta inicialmente macrófagos e/ou células dendríticas, em seguida essas bactérias são propagadas através do sistema linfático, até nodos linfáticos locais. Finalmente, se espalham hematologicamente e infectam células endoteliais do hospedeiro humano (SAHNI et al., 2019). A invasão celular ocorre através da adesão a receptores ainda não identificados destas células e indução de fagocitose, seguida de lise do fagossomo, em um processo assistido por fosfolipase D e hemolisina C, e as células rickettsiais passam ao citoplasma. Após a multiplicação e lise das células endoteliais infectadas, *R. typhi* é liberada para promover a infecção de outras células (WALKER e ISMAIL, 2008).

### 1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Superexpressar, purificar, cristalizar a enzima metionil-tRNA sintetase de *Rickettsia typhi* (RtMetRS);
- Determinar a temperatura de desnaturação térmica da RtMetRS;
- Realizar ensaios para medição da atividade enzimática de RtMetRS;

- Coletar dados de difração de Raios X dos cristais da RtMetRS;
- Refinar as estruturas obtidas a partir dos padrões de difração coletados.

## 1.4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 1.4.1 Escolha e Obtenção do Gene da Metionil-tRNA Sintetase de *Rickettsia typhi*

A definição da Metionil-tRNA Sintetase como gene de trabalho foi realizada com base em uma busca no portfólio de proteínas e genes do *Seattle Structural Center Genomics for Infectious Disease* (SSGCID) (MYLER et al., 2009). Para esta finalidade, foram desenvolvidos *scripts* destinados a auxiliar principalmente nas etapas de tomada de decisão, contemplando desde o gerenciamento do tráfego de dados de e para o SSGCID até a compilação dos dados para avaliação. As etapas iniciais compreenderam a coleta das sequências de aminoácidos e sua reformatação, para todas as proteínas. Intermediariamente, buscou-se definir proteínas cujos genes que codificassem proteínas completas pudessem ser fornecidos para pesquisa, mas que ainda não tivessem estrutura tridimensional resolvida e se ajustassem à infraestrutura do laboratório. Posteriormente, uma análise bioinformática de predição da propensão à cristalização de cada proteína com o servidor XtalPred (SLABINSKI et al., 2007) foi realizada automaticamente pelo script que, finalmente, compilou as informações de cristalizabilidade em uma tabela para avaliação final humana e, então, solicitação ao SSGCID.

### 1.4.2 Métodos Gerais para Recuperação de Plasmídeos, Bactérias, Superexpressão, Purificação das Proteínas e Ensaio de Cristalização

#### 1.4.2.1 Preparação de células quimiocompetentes

Os meios de cultura LB e LA foram preparados de acordo com Sambrook; Fritsch e Maniatis (1989). Bactérias *Escherichia coli* da cepa Rosetta BL21(DE3)pLysS foram inoculadas, a partir do estoque em glicerol, em 5 mL de meio LB suplementado com cloranfenicol  $34 \mu\text{g mL}^{-1}$ , e cultivadas por aproximadamente 16 h a  $37^\circ\text{C}$  e 150 rpm. Uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  desta pré-cultura foi tomada para inocular 25 mL de meio LB suplementado com cloranfenicol  $34 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Esta cultura foi mantida sob agitação a  $37^\circ\text{C}$  e 150 rpm até que sua densidade ótica a 600 nm atingisse valor 0,4; posteriormente, ela foi transferida para um tubo de 50 mL e resfriada em gelo. Realizou-se a centrifugação deste volume (a  $4^\circ\text{C}$ ) por 15 minutos a  $2500 \times g$ . Descartou-se o sobrenadante. O pellet de células foi cuidadosamente ressuspenso em 10 mL de solução  $200 \text{ mmol L}^{-1}$  de Tris-acetato pH = 8,  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$  ( $0 - 4^\circ\text{C}$ ), incubado em gelo por 1 hora

e novamente centrifugado a  $2500 \times g$  por 15 minutos. Descartou-se o sobrenadante. O pellet foi cuidadosamente ressuspenso em 0,5 mL da solução de  $\text{CaCl}_2$  ( $0 - 4^\circ\text{C}$ ) e incubado em gelo por 1 h. A suspensão resultante foi dividida em alíquotas de 100  $\mu\text{L}$ ; a cada uma, foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de solução de glicerol 50% para serem armazenadas a  $-86^\circ\text{C}$  até serem usadas. Todas as soluções usadas foram esterilizadas por filtração em membranas com porosidade 0,22  $\mu\text{m}$ .

#### 1.4.2.2 Recuperação dos plasmídeos

O vetor plasmidial de expressão da proteína (BG1861, com resistência à ampicilina) foi recebido do SSGCID impregnado em papel de filtro. O procedimento consistiu em excisar aproximadamente  $1\text{ cm}^2$  da porção central da região do papel em que o gene foi impregnado e inserir este fragmento em uma ponteira de 1 mL cortada, para que ela coubesse em um microtubo de 2 mL. Adicionaram-se 100  $\mu\text{L}$  de água ultrapura ao fragmento excisado. O sistema foi mantido à temperatura ambiente por 20 min para extração dos plasmídeos pela água. Por fim, realizou-se uma centrifugação a  $200 \times g$  por 45 s para separar o papel da solução do plasmídeo.

#### 1.4.2.3 Transformação

Utilizou-se uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  de células quimiocompetentes descongeladas de gelo e 5  $\mu\text{L}$  das soluções do plasmídeo. A mistura foi gentilmente homogeneizada e mantida em banho de gelo por 10 minutos. Subsequentemente, alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  e 40  $\mu\text{L}$  foram inoculadas em meio LA (complementado com cloranfenicol  $34\ \mu\text{g mL}^{-1}$  e ampicilina  $100\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ). As colônias desenvolvidas foram tomadas separadamente e inoculadas em meio LB, suplementado com os antibióticos necessários, e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  e 150 rpm até D.O.600 de 0,4 - 0,6. As células foram recuperadas por centrifugação a  $4000 \times g$ , ressuspenso em glicerol (concentração final de 20%) e armazenadas a  $-86^\circ\text{C}$ .

#### 1.4.2.4 Superexpressão e purificação

A superexpressão da RtMetRS foi realizada através do emprego de meios de cultura para autoindução, especificamente, ZYP-5052 (STUDIER, 2005). Para o propósito de testes, geralmente 5 ou 10 mL de meio foram inoculados diretamente com as células do estoque em glicerol a uma diluição de 1:1000 (V/V). Para produção destinada à purificação das proteínas, realizaram-se pré-inóculos em meio LB, dos quais alíquotas foram utilizadas para inocular o volume desejado de meio ZYP-5052. Em todos os casos, procedeu-se à complementação dos



meios de cultura com os antibióticos adequados, com as incubações realizadas a 170 rpm, 37 °C ou 20 °C por períodos de 18 – 20 horas em incubadora com agitação orbital, *shaker*.

Alternativamente, para expressão destinada à purificação, empregou-se um biorreator confeccionado no nosso laboratório que permite o desenvolvimento de culturas bacterianas por meio de insuflação de ar. Este dispositivo foi concebido tendo em vista o princípio de funcionamento do biorreator comercial LEX<sup>TM</sup> – “Large-scale EXpression” (Harbinger Biotech, Toronto, Canadá). Quando da utilização deste método, o meio ZYP-5052 foi complementado ainda com 0,02% (V/V) de antiespumante SE15 (Sigma), como sugerido nas instruções do fabricante, sem que outras condições fossem modificadas. Nos casos de expressão a 20 °C, após a inoculação do volume desejado de ZYP-5052, as culturas foram submetidas a um pré-crescimento por 4 h a 37 °C, em seguida, a temperatura foi reduzida para 20 °C e o cultivo continuado até se completarem 22 h.

Findo o tempo de expressão, os meios foram centrifugados e o pellet de células foi ressuspensão em tampão de lise (20 mmol L<sup>-1</sup> de HEPES-NaOH pH = 7,5, 500 mmol L<sup>-1</sup> de NaCl) e lisado por ultrassom durante 10 – 20 min, de acordo com o volume de células produzido. Para tanto, a suspensão de células foi submetida a uma sequência de pulsos ultrassônicos de 30 s, cada qual seguido de 30 s de repouso, até que o tempo total predeterminado fosse atingido. O lisado total foi centrifugado a 20000 × g durante 3 minutos (teste de expressão) ou 1 hora (para purificação) a 4 °C. As amostras da fração solúvel foram submetidas a procedimentos de purificação cromatográfica por afinidade a íons metálicos imobilizados (IMAC – *Immobilized Metal Affinity Chromatography*), com íons Cu<sup>2+</sup> ou Ni<sup>2+</sup> imobilizados em colunas HisTrap FF de 5mL, previamente equilibradas com tampão de lise. A eluição das proteínas sem afinidade pela fase estacionária foi realizada com o tampão de lise e a eluição das enzimas de interesse foi realizada pela aplicação de um gradiente com este mesmo tampão acrescido de 500 mmol L<sup>-1</sup> de imidazol. A verificação da ocorrência de expressão das enzimas, bem como o monitoramento das amostras eluídas nas cromatografias, foi realizada por eletroforese em géis de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE; LAEMMLI, 1970).

#### 1.4.2.5 Ensaio de cristalização

Os ensaios de cristalização foram conduzidos com soluções proteicas obtidas após reunião das frações eluídas na cromatografia de afinidade e, subsequentemente, concentradas por ultrafiltração em dispositivos concentradores Vivaspin 6 com membrana de corte de massa molecular de 30 kDa (GE Healthcare). As concentrações utilizadas sofreram variações a depender do lote de purificação, em geral, foram utilizadas amostras concentradas até 7,0, 8,76,

10, 15,8 mg mL<sup>-1</sup>, conforme dosagem realizada empregando-se o método descrito por Bradford (1976).

Os ensaios foram efetuados manualmente (na câmara de cristalização do Laboratório de Purificação de Proteínas da UEPG) em placas de cristalização com 24 poços, nas quais se utilizaram 250 uL de solução de cada condição de cristalização dos kits comerciais JCSG+, Morpheus, Structure Screen, Midas e PGA Screen (Molecular Dimensions). Empregou-se o método de difusão de vapor (MCPHERSON, 1999), majoritariamente na configuração do tipo gota suspensa e, em algumas tentativas de refinamento de eventuais *hits*, na configuração do tipo gota sentada. Em todos os casos a temperatura de incubação das placas foi 18 °C.

Foram preparadas gotas de 2 uL, obtidas pela adição de 1 uL de solução concentrada de proteína a 1 uL da solução do poço. Inicialmente, estes experimentos, no formato *screening*, foram realizados com a proteína na forma apo, de maneira que somente uma gota foi montada por condição testada. Posteriormente, decidiu-se utilizar quatro gotas para cada condição testada, mantidas as proporções volumétricas descritas anteriormente, a fim de se promover eventual cocristalização com os substratos ATP e L-metionina (daqui em diante, denominada apenas metionina). Neste caso, a composição qualitativa da solução proteica em cada gota foi a seguinte: (i) a proteína na forma apo, (ii) proteína em complexo com ATP 10 mmol L<sup>-1</sup>, (iii) proteína em complexo com metionina 10 mmol L<sup>-1</sup> e (iv) proteína em complexo com ATP e com metionina, 10 mmol L<sup>-1</sup> cada. Em todos os casos os substratos foram adicionados à solução de proteína concentrada a partir de uma solução estoque concentrada, de modo que a diluição ocorrida pudesse ser negligenciada.

#### 1.4.3 Coleta de Dados de Difração de Raios X

Cristais obtidos em ensaios iniciais de *screening* foram testados quanto à capacidade de difração em difratômetro para monocristais D8 Venture (Bruker) da UFPR. Os cristais foram coletados manualmente em *loops* e o sistema *loop*+cristal foi acondicionado rapidamente no interior de um capilar ao qual foram adicionados previamente 10 µL da solução de cristalização, necessária para evitar dano ao cristal por evaporação do solvente. Esta etapa preparatória e a aquisição das imagens de difração foram executadas à temperatura ambiente pela indisponibilidade momentânea de refrigeração.

As coletas de conjuntos de dados de difração foram realizadas na fonte de luz síncrotron Sirius, operada pelo Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS – (Campinas, SP, Brasil). Os cristais, submetidos à difração por raios X de comprimento de onda  $\lambda = 0,97718 \text{ \AA}$ , foram mantidos sob fluxo de nitrogênio em temperatura de 100 K e 3600 imagens (correspondentes à

uma rotação de 360 ° do cristal, portanto, 0,1 ° por imagem) foram registradas para cada região irradiada de cada cristal.

#### 1.4.4 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Nanofluorimetria Diferencial de Varredura (NanoDSF)

Amostras purificadas da proteína foram submetidas à análise de homogeneidade por meio do emprego da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e também foram caracterizadas quanto à estabilidade térmica por Nanofluorimetria Diferencial de Varredura (NanoDSF). Especificamente para estas técnicas, a proteína foi purificada em três etapas. A primeira consistiu em uma cromatografia de afinidade do tipo já descrita no item 1.4.2.4.

Em seguida, uma segunda etapa de purificação foi realizada, agora de troca aniônica, em coluna HiTrap Q HP de 1 mL previamente equilibrada em tampão 20 mmol L<sup>-1</sup> de trietanolamina-HCl, pH = 7,5, 5% (V/V) de glicerol (A1). As frações de interesse eluídas da IMAC foram reunidas e a fração combinada foi diluída para reduzir a concentração de NaCl em 20 mmol L<sup>-1</sup>. A eluição foi realizada com gradiente de concentração de NaCl obtido pela mistura do tampão A1 com tampão A1 acrescido de 500 mmol L<sup>-1</sup> de NaCl (tampão A2). Por fim, as frações de interesse desta segunda etapa foram reunidas, a fração combinada foi concentrada até o volume de 500 µL e usada em uma cromatografia de exclusão por tamanho (SEC – *Size Exclusion Chromatography*) em tampão 20 mmol L<sup>-1</sup> de HEPES-NaOH pH = 7,5, 500 mmol L<sup>-1</sup> de NaCl. A fração de interesse nesta etapa foi centrifugada a 20000 × g durante 10 min a 4 °C e uma alíquota foi retirada diretamente da porção mais superficial da solução com tubo capilar para os experimentos de DLS e NanoDSF em equipamento Prometheus Panta.

Os parâmetros para DLS foram ajustados para potência do laser de 100% e 10 aquisições/replicatas por capilar (modo ‘sensível’, de acordo com a terminologia empregada pelo fabricante do equipamento). Ao final, o mesmo capilar foi usado para NanoDSF, neste caso, utilizou-se uma taxa de aquecimento de 1,5 °C/min ao longo de um intervalo de temperatura de 20 a 80 °C e potência do laser de excitação de fluorescência de 38%. A intensidade de emissão fluorescente dos resíduos de aminoácido triptofano foi registrada nos comprimentos de onda 330 nm e 350 nm e a razão entre os valores de fluorescência nestes comprimentos de onda (350 nm/330 nm) foi computada automaticamente e posta em gráfico como uma função da temperatura. Os comprimentos de onda correspondentes a um máximo de intensidade de fluorescência do triptofano diferem de acordo com o ambiente químico em que este resíduo se encontra. Quando ele está em um ambiente hidrofílico (resíduo exposto ao solvente), o máximo de emissão ocorre em 350 nm, enquanto que em um ambiente hidrofóbico (resíduo internalizado

na estrutura de uma proteína, por exemplo), o máximo de emissão ocorre em 330 nm. Portanto, o monitoramento da razão 350 nm/330 nm como função da temperatura possibilita estimar o valor da temperatura de desnaturação na qual metade da população de proteína se encontra desnaturada ( $T_m$ ). Ao final desta etapa, de desnaturação térmica, foi realizado o resfriamento gradual da amostra ao longo do intervalo de temperatura de 80 a 20 °C, com uma taxa de resfriamento de 1,5 °C/min. DLS e NanoDSF foram realizados em triplicata para a proteína apo, em complexo com ATP e em complexo com metionina.

#### 1.4.5 Procedimentos Computacionais

##### 1.4.5.1 Determinação de estrutura cristalográfica por difração de raios X

###### 1.4.5.1.1 Processamento das imagens de difração

Os procedimentos de indexação, integração e escalonamento foram realizados com DIALS (WINTER et al., 2018).

###### 1.4.5.1.2 Atribuição inicial de fases

Um modelo de busca foi definido com auxílio da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST) (JOHNSON et al., 2008), disponível no site do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI), com os parâmetros de busca padrões e contra a base de dados de estruturas tridimensionais PDB. Os critérios de escolha do modelo de busca para a substituição molecular foram a porcentagem de identidade sequencial e maior grau de cobertura do modelo da estrutura homóloga. Em seguida, um alinhamento entre as sequências de aminoácidos da *RtMetRS* e da proteína homóloga selecionada foi produzido com o programa TCOFFEE (NOTREDAME; HIGGINS; HERINGA, 2000). Este alinhamento foi utilizado como dado de entrada para o programa CHAINSAW (STEIN, 2008) no modo “MAXI”. Com a informação do conteúdo de solvente do cristal, determinado com o programa MATTHEWS\_COEF (MATTHEWS, 1968), a estimativa inicial das fases foi realizada pelo método de substituição molecular pelo programa PHASER (MCCOY et al., 2007).

Posteriormente, ante a diminuição da simetria para  $P1$ , as moléculas então não mais simetricamente equivalentes foram geradas com o programa PDBSET (WINN et al., 2011).

#### 1.4.5.1.3 Refinamento estrutural

O modelo inicial da RtMetRS obtido por substituição molecular foi submetido a um processo de construção automática com o programa *phenix.autobuild* (LIEBSCHNER et al., 2019). Este modelo foi, então, utilizado para continuar, agora manualmente, a construção de regiões ainda não modeladas e posicionamento dos átomos na densidade eletrônica em um procedimento iterativo de ciclos de refinamento no espaço recíproco e no espaço real com os programas *phenix.refine* (LIEBSCHNER et al., 2019) e COOT (EMSLEY e COWTAN, 2004), respectivamente. Neste processo, utilizaram-se mapas de densidade eletrônica 2mFo-DFc com  $\sigma$  geralmente igual a 1 e mapas Fourier diferença mFo-DFc com  $\sigma$  geralmente igual a 3. Os mapas 2mFo-DFc foram produzidos pelo método *Feature Enhanced Map* (FEM) (AFONINE, et al., 2015).

Posteriormente, ante a necessidade de se refinar com vários domínios de *twinning*, utilizou-se o programa REFMAC5 (MURSHUDOV et al., 2011) no procedimento iterativo de refinamento, tal como o descrito no parágrafo anterior. Assim, para melhor comparação, adicionaram-se moléculas de água, inicialmente de forma automatizada se utilizando o programa Arp/wARP (COHEN et al., 2008) e, posteriormente, por adições manuais.

O servidor TLSMD (PAINTER e MERRITT, 2006) foi utilizado para determinar grupos de TLS (*Translation, Libration and Screw* – Translação, Libração e Parafuso), ou seja, que se comportam com deslocamentos harmônicos de corpo rígido.

#### 1.4.5.1.4 Validação do modelo final

O modelo final foi validado quanto à qualidade geral, principalmente geométrica, com os programas Procheck (LASKOWSKI, 1993) e Molprobit (CHEN et al., 2010). A avaliação da qualidade do ajuste do modelo na densidade eletrônica foi realizada através dos índices RSCC (*Real Space Correlation Coefficient* – Coeficiente de Correlação no Espaço Real) e RSR (*Real Space Residual* – Residual no Espaço Real) calculados com o programa Mapman (KLEYWEGT e JONES, 1996).

#### 1.4.5.2 Análises e comparações estruturais

##### 1.4.5.2.1 Topologia da estrutura da RtMetRS

A área de interação entre os monômeros, número e tipo de interações entre eles e o diagrama de topologia foram obtidos com o servidor PDBSum (LASKOWSKI et al., 2018). Também foi empregado o programa PISA (KRISINEL e HENRICK, 2007) para a estimativa da área superficial de cada monômero.

##### 1.4.5.2.2 Comparações estruturais com proteínas homólogas

Comparações estruturais foram realizadas através da sobreposição do modelo validado da RtMetRS com estruturas de proteínas homólogas. A definição das homólogas teve como base um alinhamento inicial produzido com a ferramenta BLAST, mantidos os seus parâmetros padrões de busca, exceto a base de dados, que foi alterada para PDB. A partir deste alinhamento foram excluídas estruturas de menor cobertura sequencial e redundantes, selecionadas aquelas apenas de metionil-tRNA sintetases e que tivessem maior valor de identidade sequencial. As sobreposições foram realizadas com o programa GESAMT (KRISINEL, 2012). Este mesmo conjunto de estruturas homólogas foi utilizado para produzir um alinhamento estrutural com o programa TCOFFEE.

##### 1.4.5.2.3 Determinação dos contatos estabelecidos entre RtMetRS e a metionina

O programa NCONT (WINN et al., 2011) foi usado para se determinar os contatos existentes entre o substrato metionina e a cadeia polipeptídica a uma distância máxima de 3,5 Å. Para a visualização dos resíduos interagentes, bem como dos demais modelos estruturais citados no texto, foi utilizado o programa PYMOL (DeLANO, 2002).

## 1.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

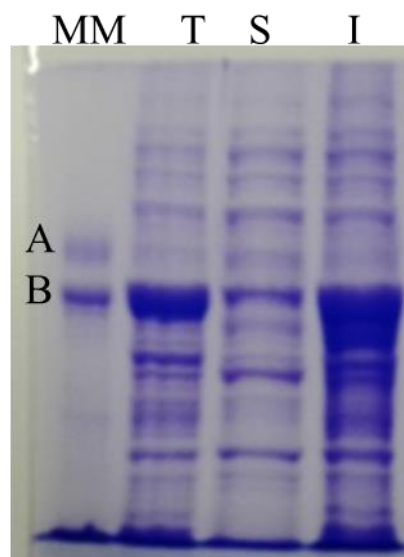
### 1.5.1 Superexpressão e Purificação da Metionil-tRNA Sintetase de *Rickettsia typhi* (RtMetRS)

A recuperação do plasmídeo foi efetuada como descrito no item 1.4.2.2 dada a dificuldade de separação da solução plasmidial do papel de filtro usado para sua impregnação devido ao fato de ele ser bastante espesso e absorvivo. Nestas condições, a quantidade de DNA extraída deve ser relativamente reduzida, entretanto, a transformação foi bem sucedida. A análise

do perfil de expressão proteico através de eletroforese em gel de poliacrilamida 10% na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE 10%) (Figura 1) evidenciou uma banda intensa na posição esperada para massa molecular de aproximadamente 59 kDa, portanto, compatível com o valor de 59,35 kDa calculado pelo servidor ProtParam (GASTEIGER et al., 2005) a partir da sequência de aminoácidos da metionil-tRNA sintetase de *R. typhi* (RtMetRS). Faz-se necessário ressaltar a importância desta informação uma vez que, segundo o relatório de validação sequencial enviado pelo SSGCID, havia a possibilidade de que esta enzima fosse produzida desprovida dos 35 primeiros resíduos de aminoácidos. Assim, esperar-se-ia uma banda no SDS-PAGE de aproximadamente 53,31 kDa. Comparativamente à estrutura da MetRS de *E. coli*, PDB 1QQT (MECHULAM et al., 1999), parte destes 35 resíduos faz interações com o substrato metionina, portanto, sua ausência poderia acarretar prejuízo à sua função.

A partir da Figura 1, pode ser observado que a maior parte da massa de RtMetRS expressa se encontra na raia correspondente à fração insolúvel (identificada com a letra I) do lisado bacteriano total. Contudo, a porção produzida solúvel (identificada com a letra S) da RtMetRS foi suficiente para que pudesse ser purificada posteriormente.

Figura 1. Gel de eletroforese em poliacrilamida 10% do teste de confirmação de expressão da Metionil-tRNA sintetase de *Rickettsia typhi*.



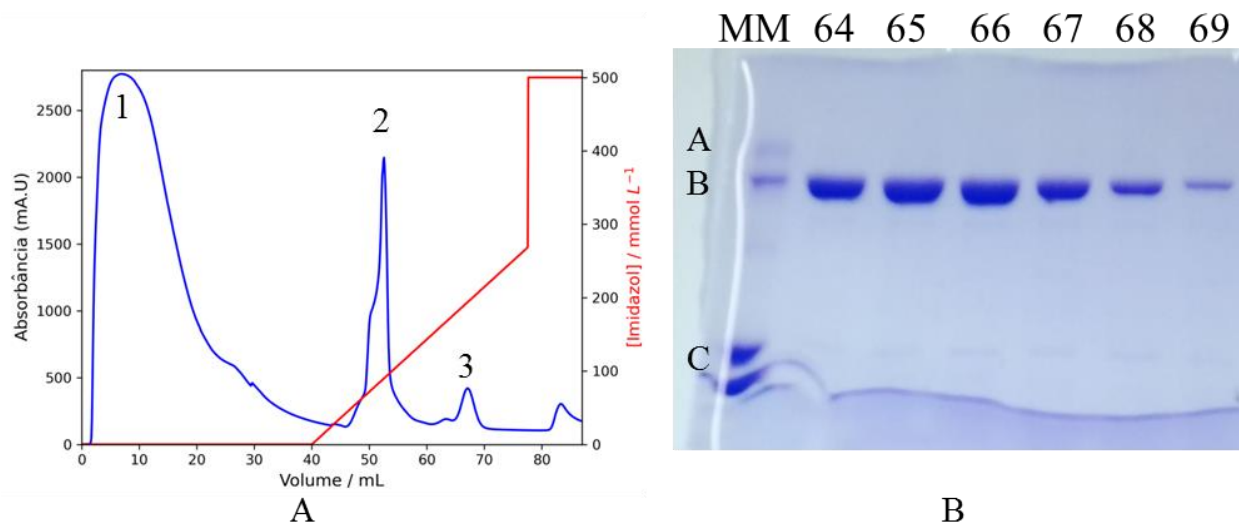
Legenda: Gel SDS-PAGE 10% do teste de expressão da RtMetRS. As raias se referem a: MM, marcador de massa molecular – kDa (A: 66,5; B: 55,8); demais, amostras T – lisado bacteriano total, S – fração solúvel do lisado bacteriano, I – fração insolúvel do lisado bacteriano.

Fonte: O autor.

Em um primeiro teste, realizou-se uma cromatografia de afinidade por metal imobilizado (IMAC), íons  $\text{Cu}^{2+}$  especificamente, sob a hipótese de que o rendimento seria maior (de acordo com o manual do fabricante da coluna). De fato, a RtMetRS foi eluída em um número menor de

frações, ou seja, mais concentrada, embora, com mais contaminações também. Diante disso, optou-se por utilizar íons  $\text{Ni}^{2+}$  imobilizados (cromatograma na Figura 2A) em testes de purificação subsequentes, nos quais a RtMetRS se distribuiu em um maior número de frações, porém, com pureza mais elevada (Figura 2B).

Figura 2. Purificação cromatográfica da Metionil-tRNA sintetase de *Rickettsia typhi*.



Legenda: (A) Perfil de eluição da RtMetRS na cromatografia de afinidade por metal imobilizado com íons  $\text{Ni}^{2+}$  imobilizados. A absorbância foi monitorada em 280 nm. (B) Gel de poliacrilamida 10% com dodecilsulfato de sódio do pico 3 da cromatografia mostrada em (A). As raias se referem a: MM, marcador de massa molecular – kDa (A: 66,5; B: 55,8; C: 29,0); demais, amostras 64 – 69 correspondentes às frações (1 mL) eluídas e que continham a RtMetRS.

A RtMetRS foi eluída no pico 3 no gradiente feito com o tampão de eluição no intervalo de concentração de imidazol de 175 a 208  $\text{mmol L}^{-1}$  (Figura 2A). Através da inspeção gel de eletroforese na Figura 2B, nota-se que algumas impurezas ainda persistem após a IMAC, sobretudo próximas a 29 kDa.

As frações de interesse foram reunidas e submetidas à diálise para remoção do imidazol e, paralelamente, uma alíquota de 1 mL foi tomada para teste de concentração por ultrafiltração em membranas de corte de massa molecular de 30 kDa. As impurezas acima referidas foram eliminadas após a tentativa de concentração da amostra não dialisada – a concentração atingida, de cerca de 0,85  $\text{mg mL}^{-1}$ , foi estimada espectrofotometricamente de acordo com Bradford (1976). A qualidade desta amostra foi monitorada por SDS-PAGE durante três semanas; neste período, não foi observado qualquer sinal de degradação da proteína. A amostra submetida à diálise, entretanto, mostrou-se instável e sofreu agregação logo nas primeiras 24 horas do procedimento com formação de precipitado. Em uma tentativa de reestabelecer a RtMetRS em solução, nova diálise foi realizadas contra um tampão com 500  $\text{mmol L}^{-1}$  de NaCl e 10% de glicerol; entretanto, nenhuma desagregação foi observada. Apesar disso, decidiu-se utilizar o



volume ainda límpido de ambos os casos em testes de concentração. Novamente, foi observada a formação de precipitados, embora a fração solúvel – cerca de  $0,7 \text{ mg mL}^{-1}$  – tenha se mantido sem degradação por cerca de três semanas. Diante destes insucessos, no que se refere à estabilização da RtMetRS em solução, decidiu-se eliminar a etapa de diálise em purificações subsequentes e utilizar diretamente as frações da IMAC para concentrar e seguir para os ensaios de cristalização. Em tentativa posterior de purificar e concentrar a RtMetRS, novamente ela se mostrou instável durante a etapa de concentração. Estas tentativas iniciais de purificação foram conduzidas em tampão Tris-HCl, entretanto, as purificações no SSGCID são realizadas em tampão HEPES (escolhido como padrão pelo consórcio). Sob a hipótese de que a utilização deste mesmo tampão poderia ser benéfica e estabilizar a RtMetRS, passou-se a utilizá-lo em procedimentos posteriores, nos quais se confirmou ser possível atingir concentrações altas da enzima de forma estável. Como mencionado anteriormente, a fração solúvel da RtMetRS é relativamente pequena, por isso, foi adotada a temperatura de  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  em todos os ensaios de expressão seguintes com o intuito de favorecer sua expressão solúvel.

Ainda no que diz respeito à expressão, notou-se que o rendimento da RtMetRS foi menor quando o método empregado para sua produção foi o de insuflação de ar, em comparação ao obtido com agitação orbital. Este fenômeno já havia sido descrito por Studier (2005) quando é empregado meio de autoindução em uma condição de grande oxigenação, principalmente em temperaturas mais baixas, como a usada aqui. Tal fato, entretanto, não se constituiu em empecilho para que o objetivo de cristalização fosse alcançado.

### 1.5.2 Cristalização da RtMetRS

Nos ensaios de cristalização iniciais realizados com os kits Morpheus e Structure Screen I, várias condições apresentaram cristais, mas a maioria, no entanto, verificou-se posteriormente por difratometria de raios X que se tratavam de cristais de substâncias de natureza não proteica ou cristais que não proviam padrões de difração. Estes experimentos de cristalização foram realizados com apenas a forma apo da RtMetRS a  $7,0 \text{ mg mL}^{-1}$ . A utilização dos aminoácidos cognatos foi uma decisão importante no contexto da bem sucedida cristalização de outras aminoacil-tRNA sintetases (MOEN et al., 2017). A adoção dessa estratégia poderia trazer benefícios para o caso da RtMetRS, isto é, sob a hipótese de que a presença do substrato a estabilizaria em solução na medida que a interação com a metionina poderia reduzir a flexibilidade da estrutura e, assim, levá-la a um estado de maior monodispersividade que poderia favorecer a cristalização. Portanto, em ensaios de cristalização subsequentes, os substratos foram sempre incorporados à solução de RtMetRS.

Em novos ensaios realizados com o complexo de RtMetRS (a  $7,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ) com metionina algumas condições dos *kits* Morpheus e Structure Screen I apresentaram cristais (Tabela). Na Figura 3 são mostrados alguns destes cristais que, entretanto, não produziram um padrão de difração, possivelmente devido à natureza não proteica (Figura 3A) ou por apresentarem capacidade de espalhamento de raios X muito reduzida dada a menor massa de proteína da região irradiada (Figura 3B e 3C).

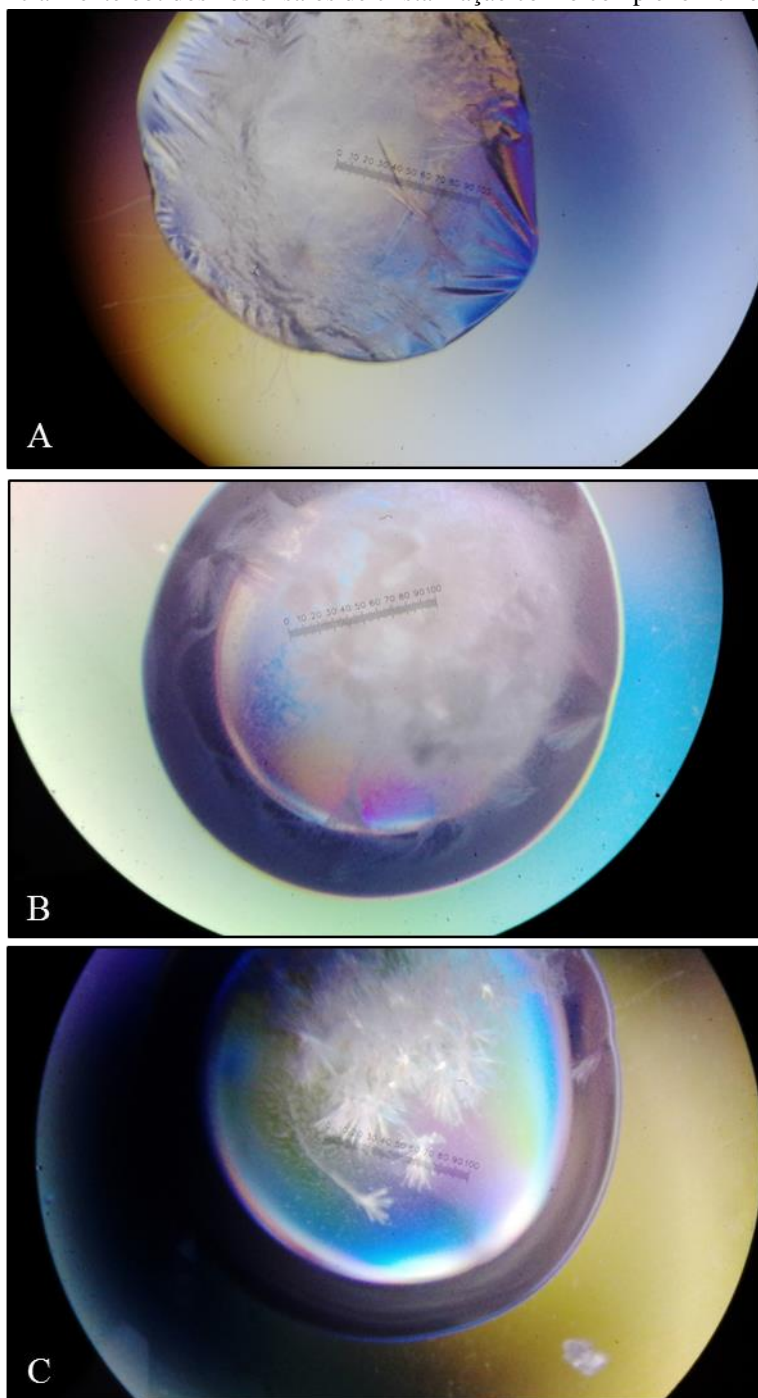
Tabela 1. Composição de condições de cristalização nas quais se desenvolveram cristais no ensaios de cristalização com os kits Morpheus e Structure Screen I.

| <b>Kit – Número da condição</b> | <b>Composição</b>   |
|---------------------------------|---|
| Morpheus – 9                    | $0,06 \text{ mol L}^{-1}$ de cátions divalentes; $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de mistura tamponante #3 pH 8,5; 40% (V/V) PEG500MME e 20% (m/V) PEG20000 |
| Structure Screen I – 29         | $1,4 \text{ mol L}^{-1}$ de Citrato de Sódio tribásico; $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de Hepes sódico pH 7,5;  |
| Structure Screen I – 33         | $0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de Tris pH 8,5 e 30% (m/V) PEG4000                     |
| Structure Screen I – 35         | $0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ Li}_2\text{SO}_4$ ; $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de Tris pH 8,5 e 30% (m/V) PEG4000                                      |

Legenda: Descrição da composição das soluções de cristalização de alguns *kits* nas quais foram obtidos cristais da RtMetRS.

Fonte: O autor.

Figura 3. Cristais inicialmente obtidos nos ensaios de cristalização com o complexo RtMetRS com metionina.



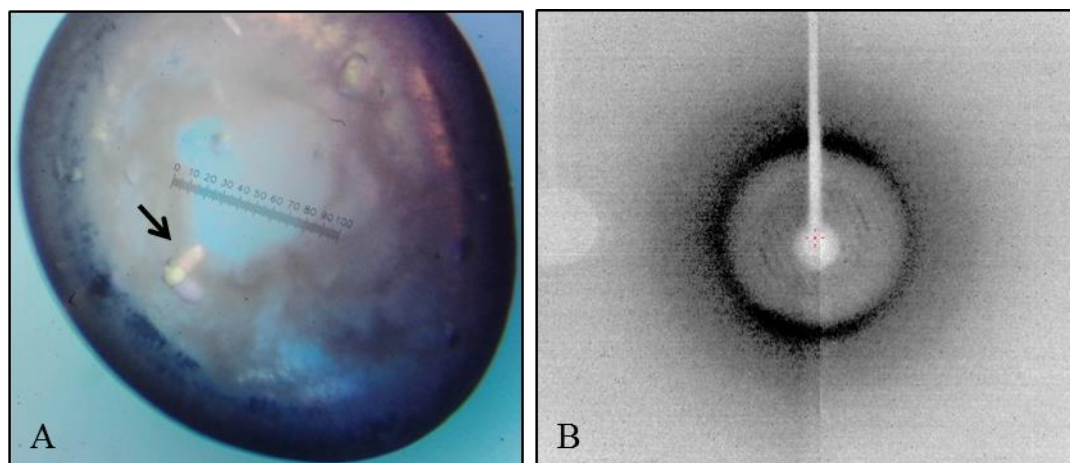
Legenda: (A) Cristais obtidos na condição 9 do *kit* Morpheus. (B) e (C) Cristais obtidos nas condições 33 e 35 do *kit* Structure Screen I, respectivamente.

Fonte: O autor.

Afortunadamente, a condição número 29 do *kit* Structure Screen I apresentou vários cristais de aspecto mostrado na Figura 4 e um deles foi capaz de gerar um padrão de difração com características típicas de cristal de proteína. Este experimento serviu apenas para o propósito de confirmar a natureza proteica do cristal obtido (e, por extensão, dos demais na mesma gota), uma vez que ele não apresentou qualidade suficiente para realizar uma coleta completa de dados. Além disso, há que se considerar que a aquisição deste padrão de difração foi

realizada no difratômetro de laboratório anteriormente citado, portanto, a intensidade reduzida do feixe de raios X nesta circunstância poderia ser insuficiente para permitir a aquisição de reflexões de maior resolução.

Figura 4. Cristais obtidos nos ensaios de cristalização iniciais realizados para a RtMetRS na concentração de 7,0 mg mL<sup>-1</sup>.



Legenda: (A) Cristais observados na condição 29 do *kit* Structure Screen I. O cristal maior destacado pela seta foi submetido à difração de raios X para confirmação da sua natureza proteica. (B) Padrão de difração coletado em  $\lambda = 1,542 \text{ \AA}$  do cristal indicado em A. O limite de maior resolução observado foi aproximadamente 5  $\text{\AA}$  (determinado por inspeção manual com o auxílio do programa ADXV).

A partir da composição desta condição, foram realizados novos ensaios de cristalização com o propósito de melhorar a qualidade dos cristais. Assim, variou-se a concentração do precipitante citrato de sódio tribásico (1,0; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5 e 1,6 mol L<sup>-1</sup>) e o pH (6,8; 7,0; 7,5 e 8,0) com volume do poço de 250  $\mu\text{L}$  e 500  $\mu\text{L}$ . Nestes ensaios, utilizando-se a técnica de gota suspensa, cristais se desenvolveram em praticamente todas as condições e tinham aspecto semelhante aos da condição original, agora com melhor definição dos domínios dos quais os cristais eram constituídos, que cresceram a partir da sua região central. Tendo em vista este resultado e que os cristais que pareciam ser mais ordenados se desenvolveram em concentrações de citrato de sódio tribásico entre 1,30 e 1,50 mol L<sup>-1</sup>, realizou-se mais uma tentativa de refinamento através da alteração da concentração de precipitante (1,30; 1,36; 1,38; 1,40; 1,42 e 1,46 mol L<sup>-1</sup> – pH e volume do poço mantidos sem alteração em relação ao primeiro refinamento) e de RtMetRS (15,8 e 22,6 mg mL<sup>-1</sup>). Desta vez, não se observou melhoramento no aspecto visual dos cristais.

Exatamente estas mesmas condições foram testadas com a técnica de gota sentada e volume do poço de 100  $\mu\text{L}$ . Eventualmente, em algumas condições foram observados cristais visualmente monocristalinos, alongados em uma direção que, entretanto, não renderam padrões de difração de boa qualidade, em geral, ou seja, difrataram a apenas muito baixa resolução.

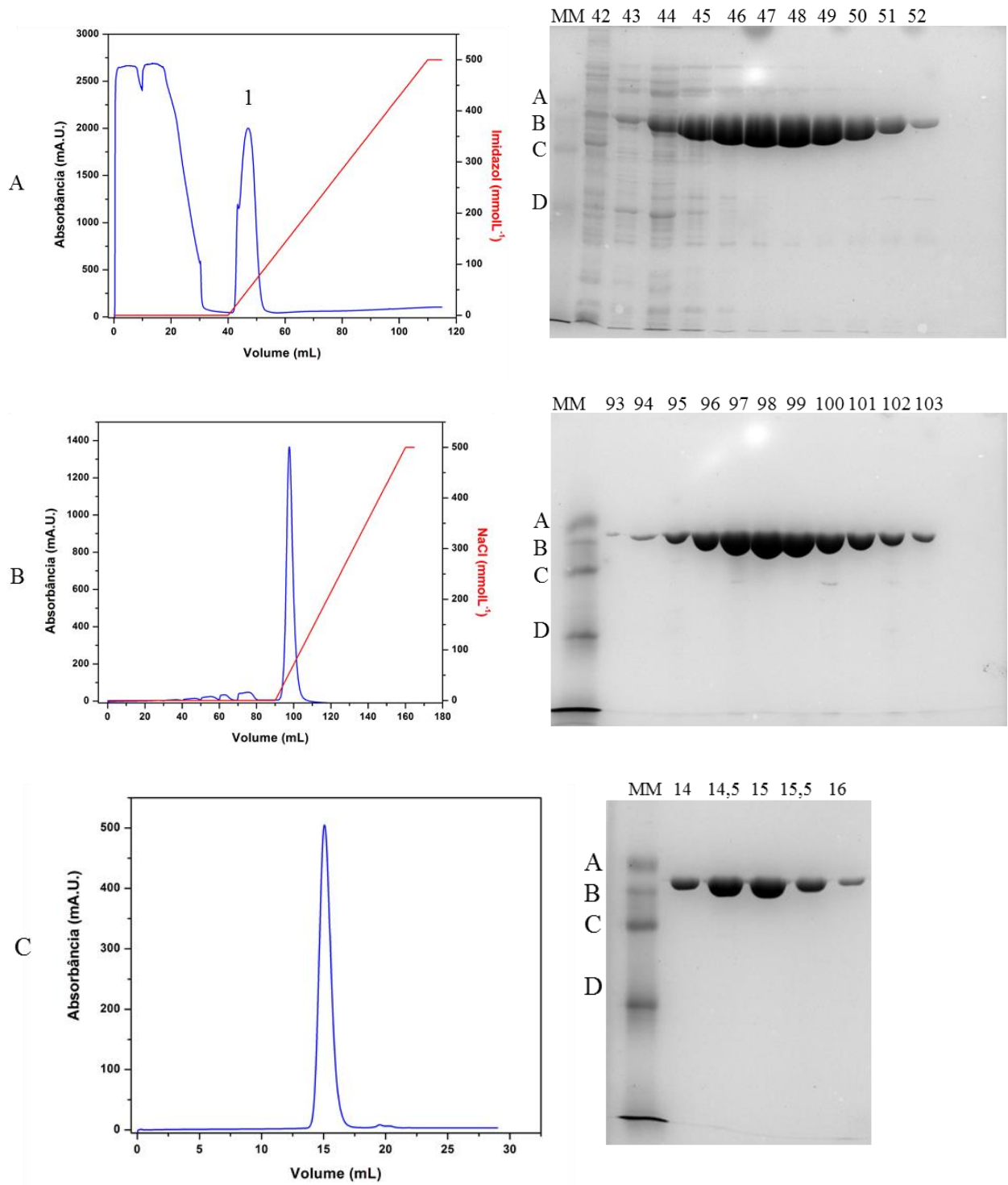
As gotas preparadas com RtMetRS apo, em complexo somente com ATP e em complexo com metionina e ATP, em todos os ensaios, não resultaram em qualquer tipo de cristalização. Nestes casos foram observados apenas precipitados amorfos.

Levando-se em consideração todos os ensaios de cristalização realizados com a finalidade de refinamento, foram produzidos centenas de cristais, mas a maioria não apresentou diferença visual de qualidade e morfologia. A maior parte dos cristais submetidos à difração proveram padrões com resolução muito baixa, geralmente de  $18 - 5 \text{ \AA}$ , e com reflexões severamente sobrepostas, mostrando-se como regiões praticamente contínuas de impressão dos *pixels* do detector. Não obstante, em cinco casos, foi possível coletar conjuntos completos de dados de difração. Entretanto, devido a dificuldades enfrentadas durante o processamento desses dados, mais cristais foram produzidos com o intuito de se obter dados melhores. Em um caso/cristal, foi possível coletar dados de melhor qualidade e prosseguir até a solução da estrutura da RtMetRS, especificamente na condição de otimização cuja composição é  $1,42 \text{ mol L}^{-1}$  de citrato de sódio tribásico e  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de HEPES sódico pH 7,0.

### 1.5.3 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Nanofluorimetria Diferencial de Varredura (NanoDSF)

Realizaram-se experimentos de DLS e NanoDSF para a avaliação do grau de homogeneidade (inferido a partir do índice de polidispersividade da amostra – PDI *Polydispersity index*) em solução e da estabilidade térmica da RtMetRS, respectivamente. As purificações efetuadas para este propósito transcorreram de maneira reprodutível no tocante ao perfil de eluição da IMAC em relação às purificações realizadas para cristalização. Desta vez, no entanto, as contaminações minoritárias que persistem após a IMAC precisaram ser eliminadas para que não interferissem nas medidas de espalhamento e fluorescência, para isso, frações selecionadas da IMAC foram submetidas duas novas etapas cromatográficas, descritas na seção Materiais e Métodos. A Figura 5 mostra os cromatogramas de cada etapa e os respectivos géis SDS-PAGE. A fração 15 da gel filtração foi usada para realização dos ensaios de DLS e NanoDSF, nas formas apo e em complexo com ATP ou L-metionina.

Figura 5. Cromatogramas das etapas de purificação e os respectivos géis SDS-PAGE da produção da RtMetRS destinada às análises de DLS e NanoDSF.

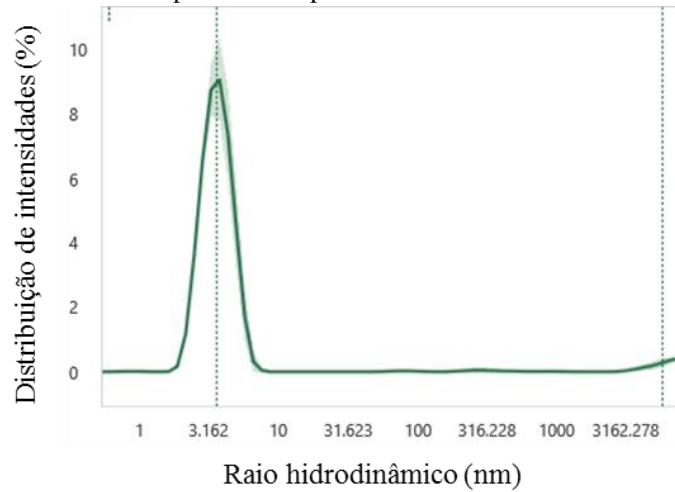


Legenda: Etapas de purificação cromatográfica da RtMetRS. (A) Cromatografia de afinidade (IMAC). As frações equivalentes aos volumes 48-51 mL (pico 1 da eluição) foram reunidas e diluídas para reduzir a concentração de NaCl para 20 mmol L<sup>-1</sup>. (B) Cromatografia de troca iônica utilizando as amostras diluídas da IMAC. As frações equivalentes aos volumes 98 e 99 mL foram reunidas e concentradas até 500  $\mu$ L para SEC. (C) Cromatografia SEC. A fração equivalente ao volume de 15 mL foi usada para DLS e NanoDSF. À direita de cada cromatograma é mostrado o respectivo gel SDS-PAGE das frações de interesse de 1 mL (exceto no caso da SEC, em que o volume por fração foi 0,5 mL).

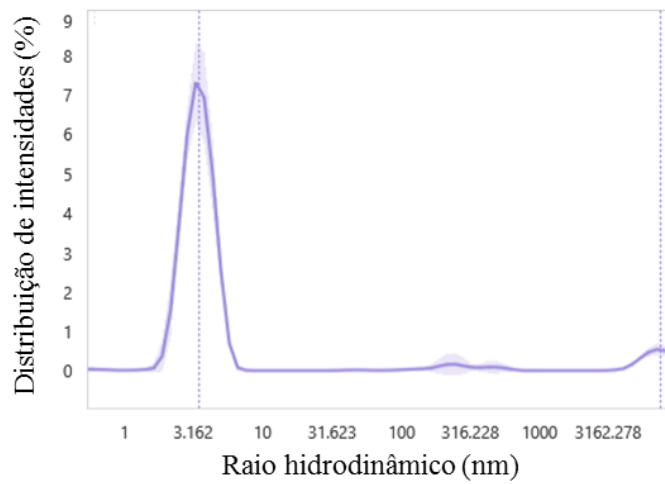
Fonte: O autor.

As curvas de DLS e NanoDSF da RtMetRS são reproduzidas na Figura 6 e na Figura 7, respectivamente. O perfil da curva de DLS apresenta somente um pico principal, indicativo de que a proteína em solução se mantém majoritariamente como uma população homogênea, ou seja, monodispersa, como indica também os valores de PDI de cada amostra analisada, reportados na Tabela 2.

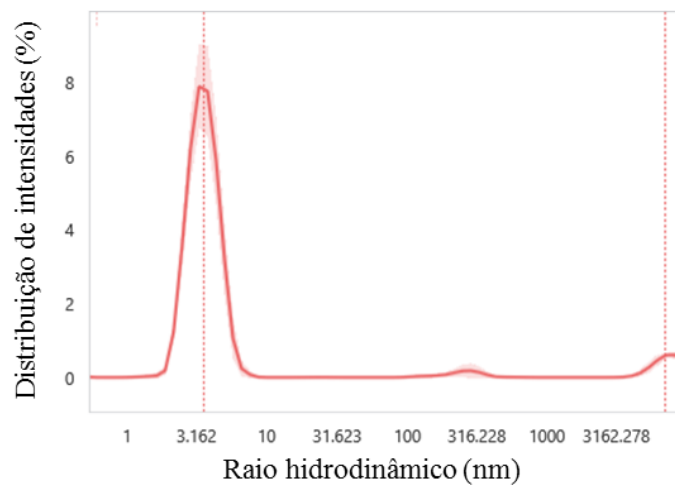
Figura 6. Resultados de espalhamento dinâmico de luz (DLS) da fração da cromatografia de exclusão por tamanho eluída em 15 mL da RtMetRS nas formas apo e em complexo com ATP ou L-metionina.



A



B



C

Legenda: Em (A), (B) e (C) são apresentadas as curvas de DLS para as amostras de RtMetRS na forma apo, em complexo com L-metionina e ATP, respectivamente. Em todos os casos a concentração da RtMetRS foi  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  ( $8,4 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e de cada substrato foi  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ . As linhas pontilhadas verticais indicam o valor do raio hidrodinâmico do pico em questão.

Fonte: O autor.



Os picos de menor intensidade observados nas curvas de DLS (Figura 6) poderiam ser oriundos de alguma impureza ainda persistente após etapas de purificação, mesmo não detectável visualmente nos géis SDS-PAGE. O raio hidrodinâmico,  $R_h$ , calculado para as três amostras indica que não houve variação apreciável do tamanho das partículas em solução entre a forma apo e os complexos com metionina ou ATP (Tabela 2).

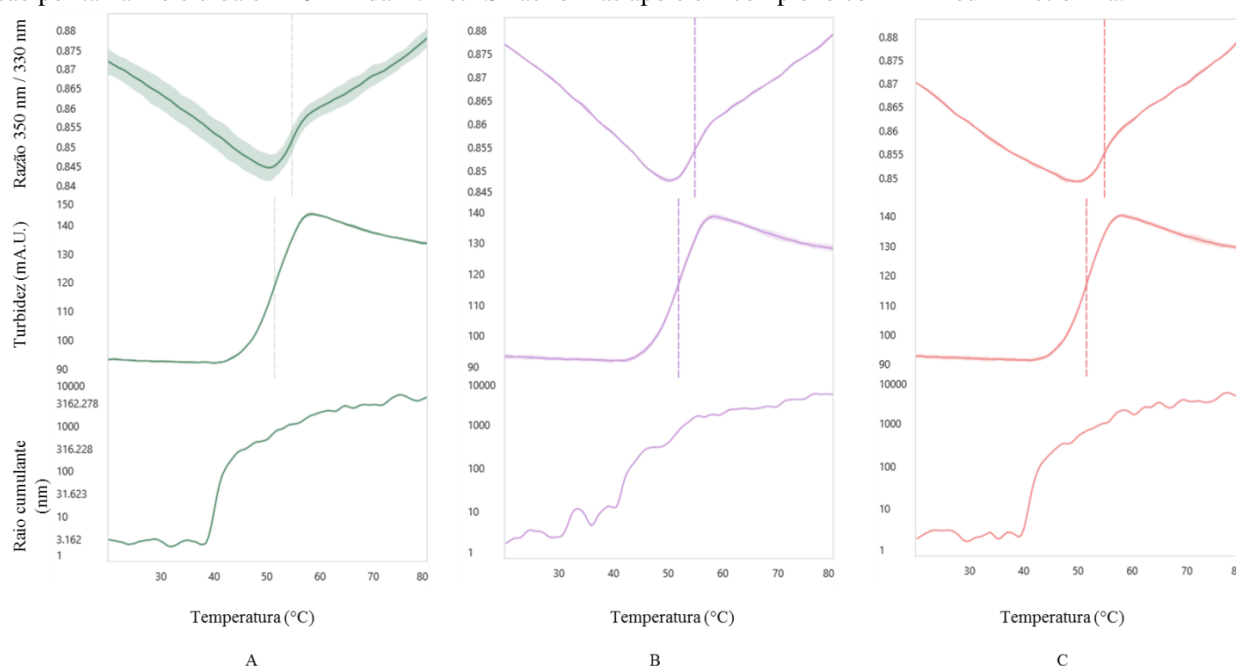
Tabela 2. Índice de polidispersividade (PDI) e temperatura de desnaturação ( $T_m$ ) da RtMetRS na presença e ausência dos substratos ATP ou metionina.

|             | $R_h$ (nm) | $\sigma$ | PDI  | $\sigma$ | $T_m$ (°C)   |           |
|-------------|------------|----------|------|----------|--------------|-----------|
|             |            |          |      |          | RFN/Turbidez | $\sigma$  |
| RtMetRS     | 3,68       | 0,12     | 0,12 | 0,01     | 54,74/51,45  | 0,10/0,15 |
| RtMetRS:Met | 3,47       | 0,08     | 0,13 | 0,02     | 54,85/51,84  | 0,12/0,03 |
| RtMetRS:ATP | 3,58       | 0,11     | 0,13 | 0,02     | 54,83/51,63  | 0,31/0,09 |

Legenda: Parâmetros hidrodinâmicos e temperatura de desnaturação determinados por DLS e nanoDSF para RtMetRS apo e dos complexos com metionina (RtMetRS:Met) ou ATP (RtMetRS:ATP). RFN: Razão de fluorescência em 350 nm e 330 nm normalizada, e  $\sigma$ : desvio padrão.

Fonte: O autor.

Figura 7. Resultados de nanofluorimetria diferencial de varredura (NanoDSF) da fração da cromatografia de exclusão por tamanho eluída em 15 mL da RtMetRS nas formas apo e em complexo com ATP ou L-metionina.



Legenda: Em (A), (B) e (C) são apresentadas as curvas de desnaturação térmica, obtidas por NanoDSF, das amostras de RtMetRS na forma apo, em complexo com L-metionina e com ATP, respectivamente. Para cada caso, duas curvas são mostradas, uma para cada tipo de propriedade monitorada; acima, razão das fluorescências registradas em 350 nm e 330 nm, no centro, turbidez, abaixo, raio cumulante. Em todos os casos a concentração da RtMetRS foi  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  ( $8,4 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e de cada substrato foi  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ . As linhas tracejadas verticais indicam o valor de temperatura no ponto de inflexão de cada curva.

Fonte: O autor.

A estabilidade térmica de uma proteína pode ser avaliada através da medida da temperatura de transição entre os estados enovelado e desenovelado (desnaturada),  $T_m$ , que é definida como a temperatura na qual a amostra analisada atingiu o estado cuja fração de moléculas desnaturadas é 0,5 (POLIZZI et al., 2007). Por se tratar de uma propriedade termodinâmica, a medida da  $T_m$  deveria ser realizada no estado de equilíbrio. A partir dos dados de NanoDSF é possível obter a  $T_m$ , entretanto, deve-se considerar que esta medida é uma aproximação, que será tanto mais fiel ao valor termodinâmico formal quanto mais lento for o progresso do experimento. Os valores de  $T_m$  determinadas para a RtMetRS estão mostradas na Tabela 2.

O cálculo da  $T_m$  foi realizado pela determinação do ponto de inflexão da curva da razão de intensidade de fluorescência nos comprimentos de onda 350 nm e 330 nm. Um cálculo semelhante também foi realizado para a curva de turbidez versus temperatura e os respectivos valores são mostrados na Tabela 2. A RtMetRS exibe  $T_m$  com boa concordância com as  $T_m$  descritas para MetRS de outros organismos, como *Xanthomonas citri* (formas apo, complexos com metionina e com ATP: 48,3 °C, 55,9 °C e 51,3 °C, respectivamente – MERCALDI et al., 2021); *Mycobacterium tuberculosis* (forma apo: 55 °C – WANG et al., 2018) e *Staphylococcus aureus* (formas apo e complexo com ATP: 52,6 °C e 56,9 °C, respectivamente – YI et al., 2022). Além disso, esses valores também são comparáveis com as  $T_m$  de aminoacil-tRNA sintetases Classe II, HisRS, AlaRS e ThrRS de *E. coli* (ABBOTT et al., 2017). Em todos estes casos, a técnica utilizada foi DSF, que requer a adição de um corante fluorescente às amostras, diferentemente de NanoDSF utilizado aqui, que é baseado no registro do sinal de fluorescência intrínseca de triptofano nos comprimentos de onda 330 nm e 350 nm.

Os valores de temperatura de transição nas curvas de turbidez, menores que os observados nas curvas da razão 350 nm/330 nm, poderiam indicar que a RtMetRS primeiramente formaria agregados antes de sofrer desnaturação, hipótese que é corroborada pela curva de monitoramento do espalhamento (curvas inferiores na Figura 7).

#### 1.5.4 Procedimentos Computacionais

##### 1.5.4.1 Determinação da estrutura de RtMetRS por difração de raios X

###### 1.5.4.1.1 Coleta de dados e processamento de imagens

Entre os cristais obtidos no primeiro lote produzido e que possibilitaram coleta completa de dados de difração, três não apresentaram estabilidade/convergência dos parâmetros de célula

durante o processamento, chamados mtrsgt02-rityagtP2, MetRS\_OptCit\_C3\_Mb-PL4 e mtrs01pH7-rityaOptCit13, devido à sobreposição de vários padrões de difração de monocristais com orientações diferentes.

Os outros dois conjuntos de dados, mtrs02-test02\_0023 e mtrs02-test02\_0026, tiveram suas tentativas iniciais de processamento que se mostraram instáveis devido à presença de múltiplas redes em um número considerável de imagens. Apesar disso, observou-se que ao se realizar a combinação/promediação das 3600 imagens, em grupos de 10, o processamento transcorreu de forma relativamente estável para mtrs02-test02\_0026, no grupo de espaço  $P2_12_12_1$  com parâmetros de rede  $a = 49,12 \text{ \AA}$ ,  $b = 144,24 \text{ \AA}$ ,  $c = 150,19 \text{ \AA}$ , no limite máximo de resolução de  $2,65 \text{ \AA}$  (Tabela 3). Como critérios de definição de limite de resolução foram utilizados os índices  $CC_{1/2}$  (EVANS e MURSHUDOV, 2013), com valor mínimo de 0,3, e razão sinal/ruído ( $\langle(I/\sigma(I))\rangle$ ), com valor mínimo 1,0 (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados e estatísticas de processamento de imagens e refinamento estrutural para os conjuntos de imagens mtrs02-test02\_0026 e Ren\_StrucScr\_B5\_2a-Rt\_col\_0001 (continua)

| <b>Dados de processamento</b>   |   |   |
|---|---|---|
| Conjunto de dados   | <b>mtrs02-test02_0026</b>                     | <b>Ren_StrucScr_B5_2a-Rt_col_0001</b>         |
| PDB   | -   | 8GIG  |
| Comprimento de onda (Å)   | 0,97718                                       | 0,97718                                       |
| Faixa de resolução (Å)  | 104,03 – 2,65 (2,70 – 2,65)                   | 151,42 (2,31 – 2,30)                          |
| Grupo de espaço   | $P2_12_12_1$                                  | $P1$  |
| Parâmetros da célula unitária<br>a, b, c (Å); $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (°) | 49,12, 144,24, 150,19; 90,00,<br>90,00, 90,00 | 47,33, 122,46, 151,42; 90,04,<br>89,86, 90,04 |
| Nº. total de reflexões  | 277805 (14689)                                | 516310 (25456)                                |
| Nº. de reflexões únicas   | 31834 (1711)                                  | 146976 (7295)                                 |
| Multiplicidade  | 8,73 (8,58)                                   | 3,51 (3,49)                                   |
| Completeza (%)  | 99,7 (99,5)                                   | 98,52 (96,98)                                 |
| $\langle(I/\sigma(I))\rangle$   | 7,19 (1,16)                                   | 10,8 (1,0)                                    |
| $R_{merge}$ (%)   | 42,9 (275,7)                                  | 12,2 (107,2)                                  |
| $R_{meas}$ (%)  | 45,6 (292,6)                                  | 0,145 (1,267)                                 |
| $CC_{1/2}$ (%)  | 98,7 (41,2)                                   | 99,3 (34,7)                                   |

Tabela 3. Resultados e estatísticas de processamento de imagens e refinamento estrutural para os conjuntos de imagens mtrs02-test02\_0026 e Ren\_StrucScr\_B5\_2a-Rt\_col\_0001 (conclusão)

| <b>Dados de refinamento</b>             |                           |                                       |
|---|---------------------------|---------------------------------------|
| Conjunto de dados                       | <b>mtrs02-test02_0026</b> | <b>Ren_StrucScr_B5_2a-Rt_col_0001</b> |
| $R_{work}$ (%)                          | 27,11                     | 22,60                                 |
| $R_{free}$ (%)                          | 32,59                     | 28,34                                 |
| Monômeros por unidade assimétrica       | 2                         | 8                                     |
| Nº. de aminoácidos                      | 1009                      | 3895                                  |
| <b>Desvio Quadrático Médio</b>          |                           |                                       |
| Comprimento de ligação (Å)              | 0,002                     | 0,006                                 |
| Ângulo de ligação (°)                   | 0,577                     | 0,901                                 |
| <b>Nº. átomos*</b>                      |                           |                                       |
| Total                                   | 7697                      | 30435                                 |
| Macromoléculas                          | 7653                      | 28744                                 |
| Solvente                                | 44                        | 1691                                  |
| <b>Fatores B médios (Å<sup>2</sup>)</b> |                           |                                       |
| Global                                  | 59,73                     | 32,69                                 |
| Macromoléculas                          | 59,79                     | 32,83                                 |
| Solvente                                | 49,99                     | 30,36                                 |
| RSCC global                             | 0,7928                    | 0,7857                                |
| RSR global                              | 0,2630                    | 0,2845                                |
| <b>Gráfico de Ramachandran (%)</b>      |                           |                                       |
| Favoráveis                              | 89,89                     | 93,60                                 |
| Permitidas                              | 8,31                      | 6,19                                  |
| Não permitidas                          | 1,80                      | 0,21                                  |

Legenda: Valores entre parênteses dizem respeito aos valores da faixa de maior resolução. \* Exceto átomos de hidrogênio.

Fonte: O autor.

O cristal do segundo lote possibilitou coletar quatro conjuntos de dados. Um em particular apresentou indícios de ser constituído de múltiplas redes e não se obteve êxito na continuidade do seu processamento. Os outros três conjuntos de dados puderam ser processados

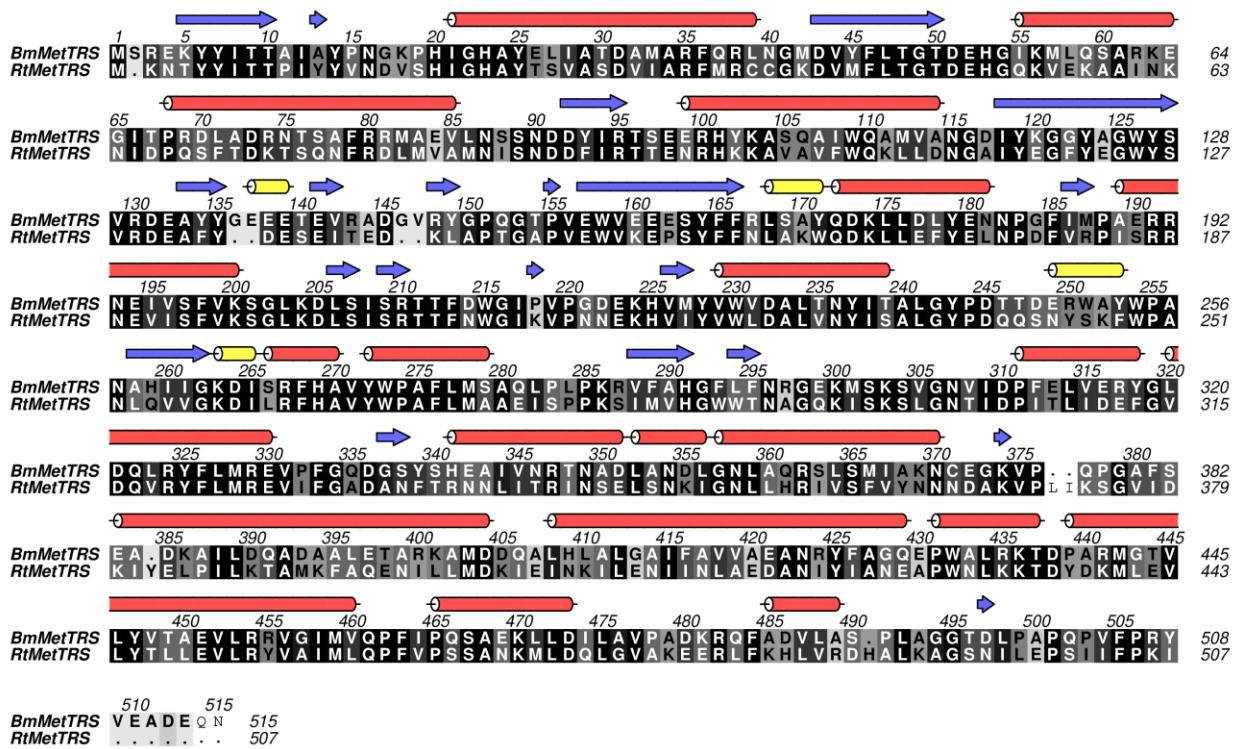
separadamente e, posteriormente, combinados para que se obtivesse um conjunto de reflexões de maior completeza e qualidade. A combinação destes dados foi realizada no grupo de espaço  $P2_12_12_1$ , com parâmetros de célula  $a = 47,23 \text{ \AA}$ ,  $b = 122,29 \text{ \AA}$ ,  $c = 151,16 \text{ \AA}$  e resolução máxima de  $1,97 \text{ \AA}$ . O limite de resolução foi definido mediante a observação dos índices mencionados no parágrafo anterior.

Após a execução de um determinado número de ciclos de refinamento, observou-se que os índices  $R_{work}$  e  $R_{free}$  não melhoravam, apresentaram valores mínimos de 24,49% e 29,46%, respectivamente, com RSCC 76,96% e RSR 34,39% (valores globais). A partir deste ponto, os ajustes na densidade eletrônica e novas modelagens resultaram em aumentos de  $R_{work}$  e  $R_{free}$ , acompanhados da divergência entre eles, e deterioração dos índices RSCC e RSR. Sob a hipótese de que isso seria decorrente de uma atribuição errada de grupo de espaço, novos processamentos foram realizados, nos quais foram testados vários parâmetros e diferentes possibilidades de indexação no grupo de espaço P21 ou então no grupo de espaço P1. Por fim, a partir da avaliação das tentativas de refinamento nos diferentes grupos de espaço, estabeleceu-se que o mais apropriado é P1, com parâmetros de célula  $a = 47,33 \text{ \AA}$ ,  $b = 122,46 \text{ \AA}$ ,  $c = 151,42 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = 90,04^\circ$ ,  $\beta = 89,86^\circ$ ,  $\gamma = 90,04^\circ$  e resolução máxima de  $2,30 \text{ \AA}$ , ou seja, a que proveu menores valores finais de  $R_{work}$  e  $R_{free}$  além dos residuais de densidade. Além disso, verificou-se durante os testes realizados a necessidade de o refinamento ser conduzido de maneira a contemplar geminação e simetria não cristalográfica (NCS).

#### 1.5.4.1.2 Atribuição de fases iniciais por substituição molecular

A estrutura homóloga escolhida para produzir o modelo para a substituição molecular foi a da metionil-tRNA sintetase de *Brucella melitensis* biovar *abortus* 2308 str. ATCC/CRP #DD-156, BmMetRS – PDB 4DLP (OJO et al., 2016), que apresenta 49,71% de identidade sequencial em relação à RtMetRS e grau de cobertura de 99%. O alinhamento das sequências de aminoácidos das duas proteínas é mostrado na Figura 8.

Figura 8. Alinhamento sequencial entre as enzimas metionil-tRNA sintetases de *Brucella melitensis* (BmMetRS) e *Rickettsia typhi* (RtMetRS).



Legenda: Alinhamento utilizado no procedimento de atribuição inicial de fases por substituição molecular. Os elementos de estrutura secundária foram calculados com o programa DSSP (KABSCH e SANDER, 1983) e são mostrados para BmMetRS (cilindros vermelhos e amarelos correspondem a hélices  $\alpha$  e  $3_{10}$ , respectivamente, e setas em azul correspondem a fitas  $\beta$ ). Figura gerada com o programa ALINE (BOND e SCHÜTTELKOPF, 2009). A coloração das seqüências de aminoácidos seguiu a convenção de Alscript Calcons (BARTON, 1993).

Fonte: O autor.

O programa Phaser apresentou a solução, inicialmente para  $P2_12_1$ , para duas moléculas na unidade assimétrica. Os resultados do procedimento de substituição molecular são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados da substituição molecular inicial no grupo de espaço  $P2_12_1$  para o caso do conjunto de dados mtrs02-test02\_0026.

| Ângulos de rotação<br>( $\alpha, \beta, \gamma$ ) <sup>o</sup> | Z Score | Translações<br>(x,y,z) | Z Score |
|--|---------|------------------------|---------|
| 40,44/122,59/331,17  | 4,8     | -0,987/-0,268/0,218    | 8,2     |
| 170,38/8,47/48,86  | 5,5     | -0,370/0,065/-0,230    | 25,7    |

Legenda:

Fonte: O autor.

### 1.5.4.1.3 Modelagem e refinamento

O refinamento realizado, referente ainda ao conjunto de dados mtrs02-test02\_0026, consistiu inicialmente em se utilizar o modelo proveniente da substituição molecular em um processo de construção automática com *phenix.autobuild* (LIEBSCHNER et al., 2019), refinamento de corpo rígido, seguido de um recozimento simulado, *simulated annealing* (SA). O modelo resultante necessitou de várias etapas de construção manual de regiões nas quais o procedimento automatizado não foi capaz de adicionar e posicionar corretamente os aminoácidos necessários. Seguiu-se com uma abordagem iterativa de refinamentos no espaço recíproco (com *phenix.refine*) e no espaço real (modelagens e ajustes manuais com o programa COOT). As dificuldades encontradas no decurso do refinamento, decorrentes da natureza problemática dos dados medidos, motivou a utilização de novo dados medidos em período posterior. Neste contexto, o modelo parcialmente refinado até então foi empregado em um novo procedimento de substituição molecular. Devido à completeza razoavelmente avançada do modelo nesta etapa, prosseguiu-se com um novo SA e refinamento iterativo manual com COOT e *phenix.refine* considerando-se ainda o grupo de espaço  $P2_12_12_1$ . Não obstante os progressos no ajuste do modelo na densidade eletrônica, não houve melhorias nos valores de  $R_{work}$  e  $R_{free}$ .

Diante disso, fez-se uma revisão bastante pormenorizada do processamento e refinamentos em  $P2_12_12_1$ , em três possibilidades de  $P2_1$  e em  $P1$ . Estes procedimentos indicaram a necessidade de mudança de grupo de espaço para  $P1$ , bem como de incluir operações de geminação durante o refinamento. Cuidado foi tomado para que o conjunto de reflexões usadas na validação cruzada não sofresse contaminação durante a perda de simetria (de  $P2_12_12_1$  para  $P1$ ). A consideração das leis de geminação demandou a adoção do programa REFMAC5 para a continuidade do refinamento, isso porque estão presentes quatro domínios geminados, cujos operadores e frações refinadas estão mostrados na Tabela 5.

Tabela 5. Dados do refinamento estrutural realizado para o processamento no grupo de espaço  $P1$  no qual foram consideradas as operações de geminação.

| Domínio | Operador | Fração ( $\alpha_L$ ) |
|---------|----------|-----------------------|
| 1       | h,k,l    | 0,304                 |
| 2       | -h,k,-l  | 0,265                 |
| 3       | -h,-k,l  | 0,213                 |
| 4       | h,-k,-l  | 0,218                 |

Legenda: Operadores de geminação considerados durante o refinamento estrutural para cada domínio do cristal e suas respectivas frações volumétricas.

Fonte: O autor.

O reprocessamento em *P1* e o refinamento considerando a geminação tiveram grande impacto nos valores de  $R_{work}$  e  $R_{free}$  (Tabela 5). Foram realizados testes de refinamento considerando TLS, aplicado em cada cadeia de acordo com a segmentação sugerida pela análise do servidor TLSMD (PAINTER e MERRITT, 2006), de 1 a 20 grupos de TLS. Entretanto, em todos os casos testados não se observou impacto positivo nos índices de refinamento que justificasse o emprego de mais de um grupo de TLS por cadeia. Posteriormente, mediante novos testes motivados pela avaliação dos índices do refinamento, que apresentaram novamente tendência a divergirem, verificou-se a necessidade de se considerar operações de simetria não cristalográfica (NCS) (Tabela 6).

Tabela 6. Comparação dos valores de  $R_{work}$  e  $R_{free}$  entre as estruturas refinadas nos grupos de espaço  $P2_12_12_1$  e *P1*.

| <b>Fator R</b> | <b><math>P2_12_12_1</math></b> | <b><i>P1</i> sem NCS</b> | <b><i>P1</i> com NCS</b> |
|----------------|--------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| $R_{work}$ (%) | 27,11                          | 14,15                    | 22,60                    |
| $R_{free}$ (%) | 32,59                          | 26,15                    | 28,34                    |

Legenda: Índices de refinamento comparados entre os grupos de espaço  $P2_12_12_1$  e *P1*. Também são mostrados os valores dos índices após a consideração de simetria não cristalográfica (NCS) no protocolo de refinamento.

Fonte: O autor.

O modelo refinado final da RtMetRS consiste em oito monômeros na unidade assimétrica, distribuídos em quatro dímeros. Em geral, cada monômero equivalente ao A em cada dímero tem melhor qualidade, com apenas algumas poucas exceções, cuja modelagem é mais fácil. Um total de 948 resíduos não tiveram suas cadeias laterais completamente modeladas devido à ausência de densidade eletrônica significativa. Por esta razão, alguns resíduos também não puderam ter os átomos da cadeia principal modelados, a saber: monômero A, 139, 298, 431-437; monômero B, 1-2, 372, 383-389, 402-403 e 423-442; monômero C, 1 e 167-168; monômero D, 1-2, 297-298, 369, 372-373, 381-382, 403 e 423-441; monômero E, 1-2, 138, 299 e 432-437; monômero F, 1, 296, 372-383, 388, 402-403 e 423-441; monômero G, 136-137, 298 e 438, e monômero H, 1-3, 209, 219-220, 237-244, 284-285, 292-294, 297, 384-385, 401-403 e 423-441.

O *loop* que porta os resíduos do motivo conservado KMSKS na maioria das estruturas de MetRS resolvidas na forma apo ou em complexos com apenas o substrato metionina apresenta-se desordenado e não pode ser modelado integralmente. Diferentemente destes casos, a região equivalente na RtMetRS pôde ser modelada em todos os monômeros, mesmo que parcialmente, no que diz respeito à completeza sequencial ou das cadeias laterais.



## 1.5.4.1.4 Validações

A qualidade de cada monômero no que diz respeito aos ângulos  $\psi$  e  $\phi$ , bem como dos ângulos diédricos de cadeia lateral (rotâmeros), foi avaliada com MOLPROBITY (CHEN, et al., 2010) e PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993). Na Tabela 7 estão mostrados os percentuais de resíduos por monômero nas diferentes regiões do gráfico de Ramachandran (Figura 9) e dos que apresentam desvios das conformações rotaméricas mais comuns (*outliers*), conforme a validação do MOLPROBITY.

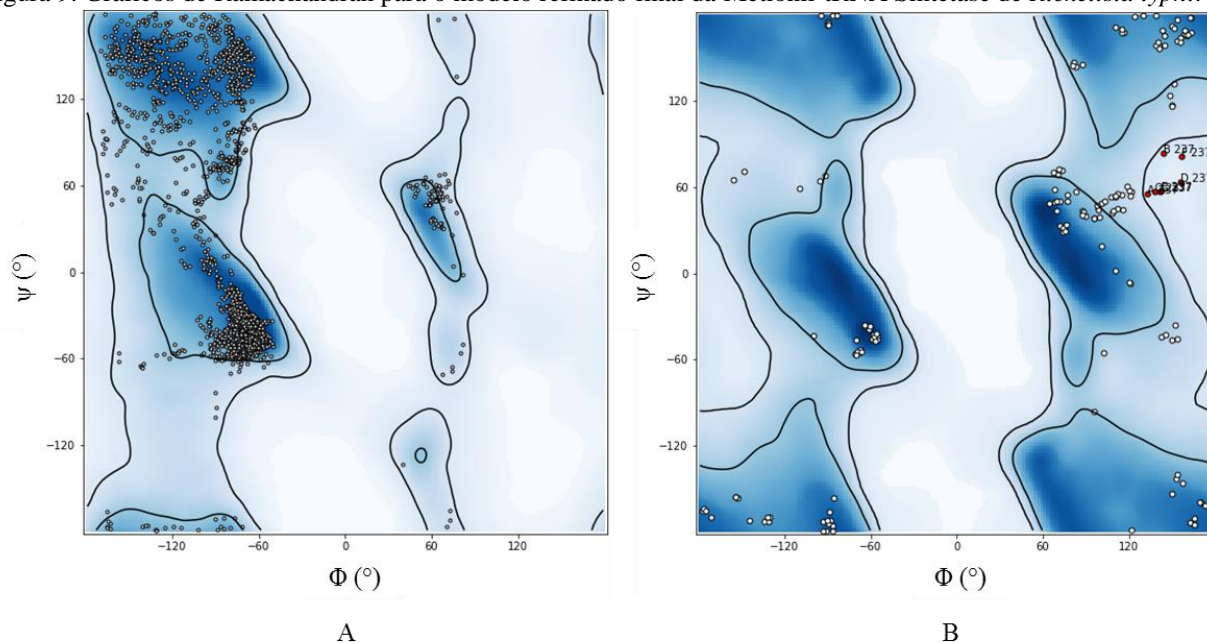
Tabela 7. Validação dos ângulos diédricos de cadeia principal e lateral dos monômeros do modelo refinado da RtMetRS.

| Região Ramachandran       | Monômero |       |       |       |       |       |       |       |
|---------------------------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                           | A        | B     | C     | D     | E     | F     | G     | H     |
| <b>Favorecidas</b>        | 93,60    | 93,07 | 94,00 | 93,32 | 94,27 | 93,64 | 94,14 | 92,06 |
| <b>Permitidas</b>         | 6,19     | 6,71  | 5,80  | 6,47  | 5,52  | 6,14  | 5,45  | 7,94  |
| <b>Outliers</b>           | 0,21     | 0,22  | 0,20  | 0,22  | 0,20  | 0,22  | 0,40  | 0,00  |
| <b>Rotâmeros outliers</b> | 1,38     | 0,72  | 1,71  | 0,66  | 2,02  | 1,40  | 1,13  | 2,21  |

Legenda: Resultados da validação para cada monômero do modelo refinado final da RtMetRS. Os valores mostrados se referem aos percentuais de resíduos em cada região do gráfico de Ramachandran, exceto prolinas e glicinas.

Fonte: O autor.

Figura 9. Gráficos de Ramachandran para o modelo refinado final da Metionil-tRNA Sintetase de *Rickettsia typhi*.

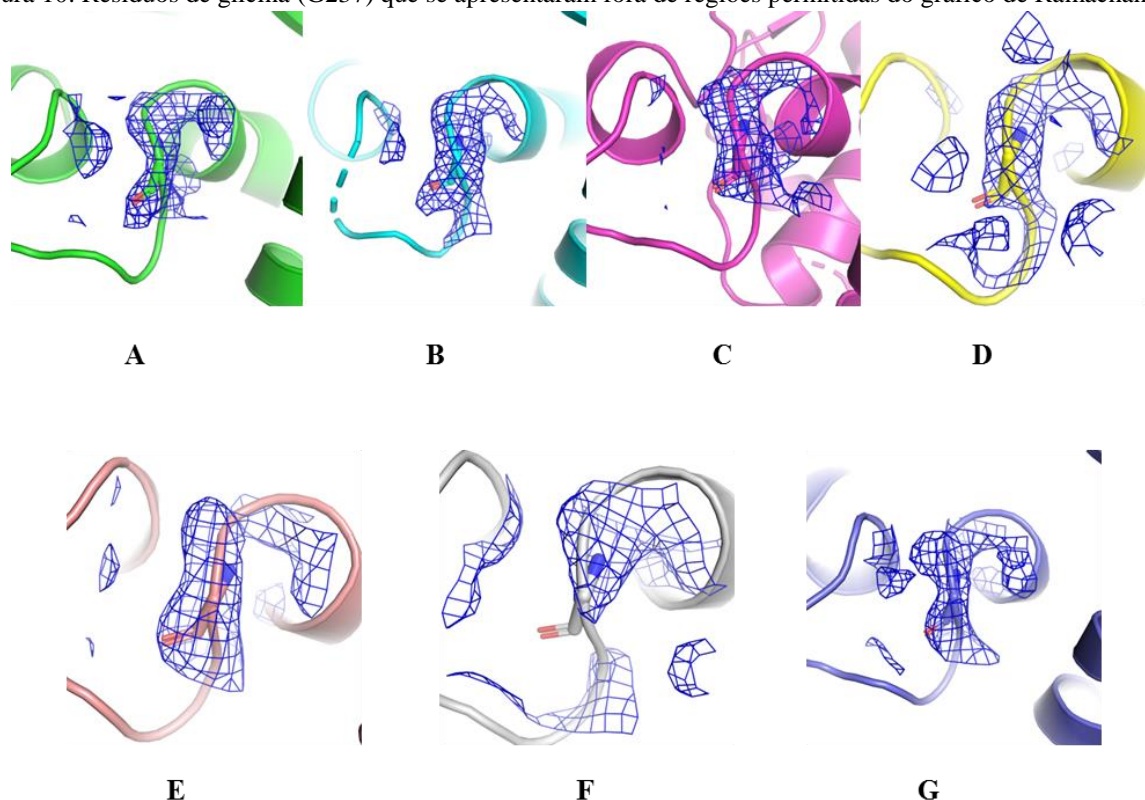


Legenda: Gráficos de Ramachandran do modelo global exceto prolinas e glicinas (A) e específico para glicinas (B). Verificou-se que os resíduos de glicina número 237 (destacados como pontos vermelhos na figura B) é um outlier autêntico tendo em vista que a densidade eletrônica corrobora a sua conformação (exceto no monômero H, onde este resíduo não foi modelado).

Fonte: O autor.

Os resíduos de G237 se mostraram autenticamente desviantes quanto aos valores dos ângulos diédricos da cadeia principal,  $\Phi$  e  $\psi$  (Figura 9). O ajuste do modelo destes resíduos na densidade eletrônica justifica o posicionamento fora de regiões permitidas no gráfico de Ramachandran e é mostrado na Figura 10 para cada monômero, exceto para o monômero H, no qual não foi observada densidade eletrônica para permitir a modelagem do referido resíduo.

Figura 10. Resíduos de glicina (G237) que se apresentaram fora de regiões permitidas do gráfico de Ramachandran.

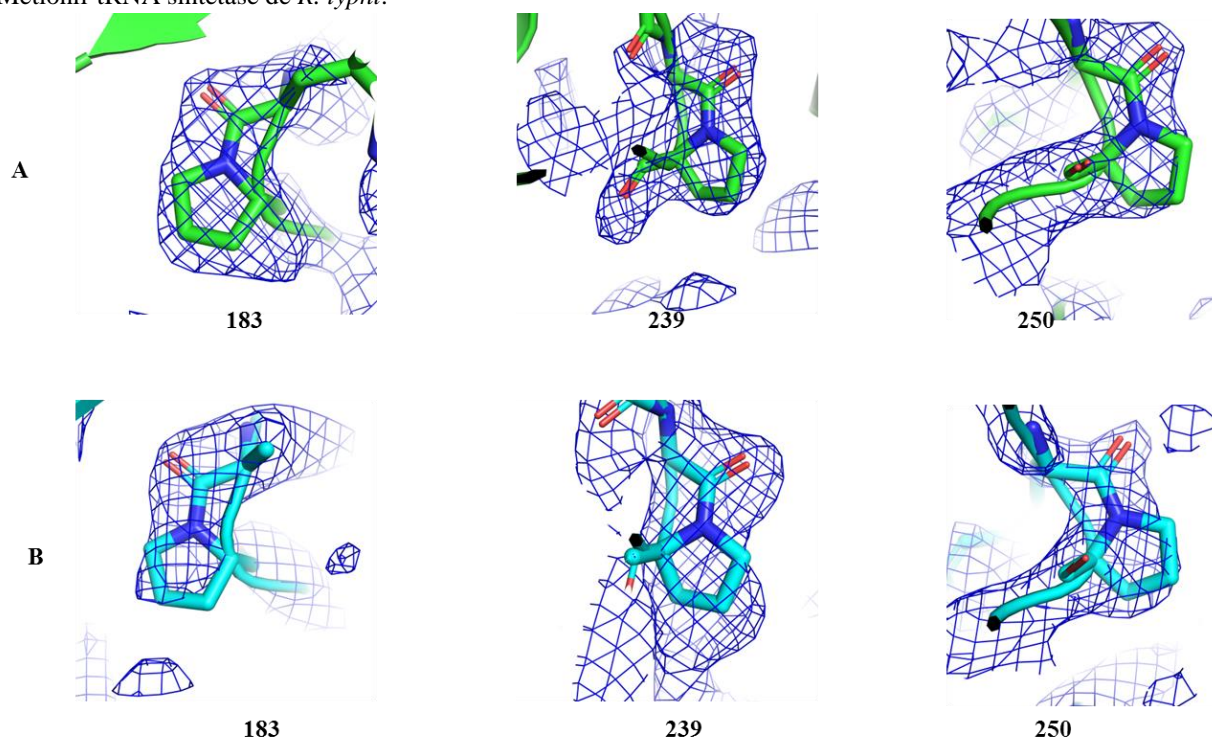


Legenda: A conformação assumida pelos resíduos de G237 é corroborada pela densidade eletrônica. Os resíduos são mostrados como modelos de bastões com carbonos coloridos diferentemente para cada monômero, oxigênios em vermelho e nitrogênios em azul. Os mapas de densidade eletrônica  $2mF_o-DF_c$  estão representados como modelo de arame e coloridos em azul e correspondem ao nível de  $1\sigma$ . No monômero H este resíduo não foi modelado devido à ausência de densidade eletrônica.

Fonte: O autor.

RtMetRS possui três prolínas (P183, P239 e P250) na conformação *cis*, que é respaldada pelas densidades eletrônicas, mesmo nos casos em que a densidade eletrônica não tem boa qualidade. O ajuste do modelo destas prolínas na densidade eletrônica é mostrado na Figura 11.

Figura 11. Ambiente local dos resíduos de prolina 183, 239 e 250 que assumem conformação *cis* na estrutura da Metionil-tRNA sintetase de *R. typhi*.



Legenda: Resíduos de prolina *cis* 183, 239 e 250 presentes na estrutura da RtMetRS mostrados juntamente com as respectivas densidades eletrônicas. Apenas os resíduos dos monômeros A (linha superior com modelo de bastões com carbonos coloridos em verde, oxigênios em vermelho e nitrogênios em azul) e B (linha inferior com modelo de bastões com carbonos coloridos em ciano) foram representados aqui devido à qualidade semelhante nos demais monômeros. Os mapas de densidade eletrônica 2mFo-DFc estão representados como modelo de arame e coloridos em azul e correspondem ao nível de  $1 \sigma$ .

Fonte: O autor.

A avaliação da qualidade do ajuste do modelo à densidade eletrônica foi realizada pelo cálculo dos índices RSCC e RSR. Os valores destes índices para cada monômero e para o modelo global são resumidos na Tabela 8. A Figura 12 traz a representação gráfica destes índices por resíduo em cada monômero.

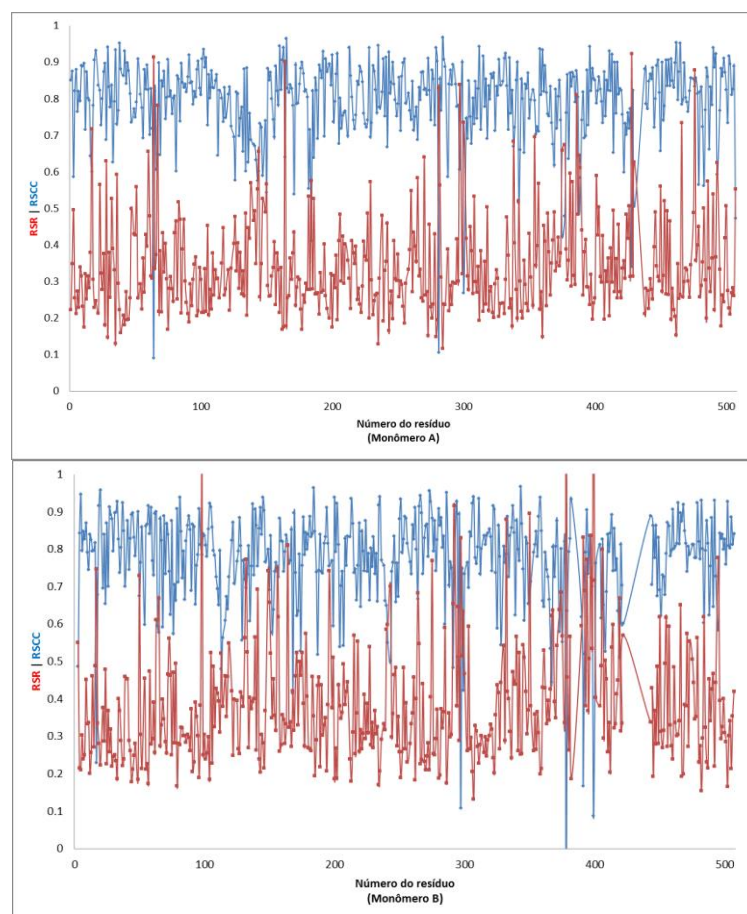
Tabela 8. Valores do coeficiente de correlação no espaço real (RSCC) e residual no espaço real (RSR) calculados para o modelo refinado final da RtMetRS ilustrando a qualidade do ajuste do modelo à densidade eletrônica.

| Monômero | RSCC   | RSR    |
|----------|--------|--------|
| A        | 0,8025 | 0,2741 |
| B        | 0,7786 | 0,2917 |
| C        | 0,7916 | 0,2971 |
| D        | 0,7871 | 0,2819 |
| E        | 0,7980 | 0,2764 |
| F        | 0,7760 | 0,2874 |
| G        | 0,7968 | 0,2725 |
| H        | 0,7516 | 0,3128 |
| Global   | 0,7857 | 0,2845 |

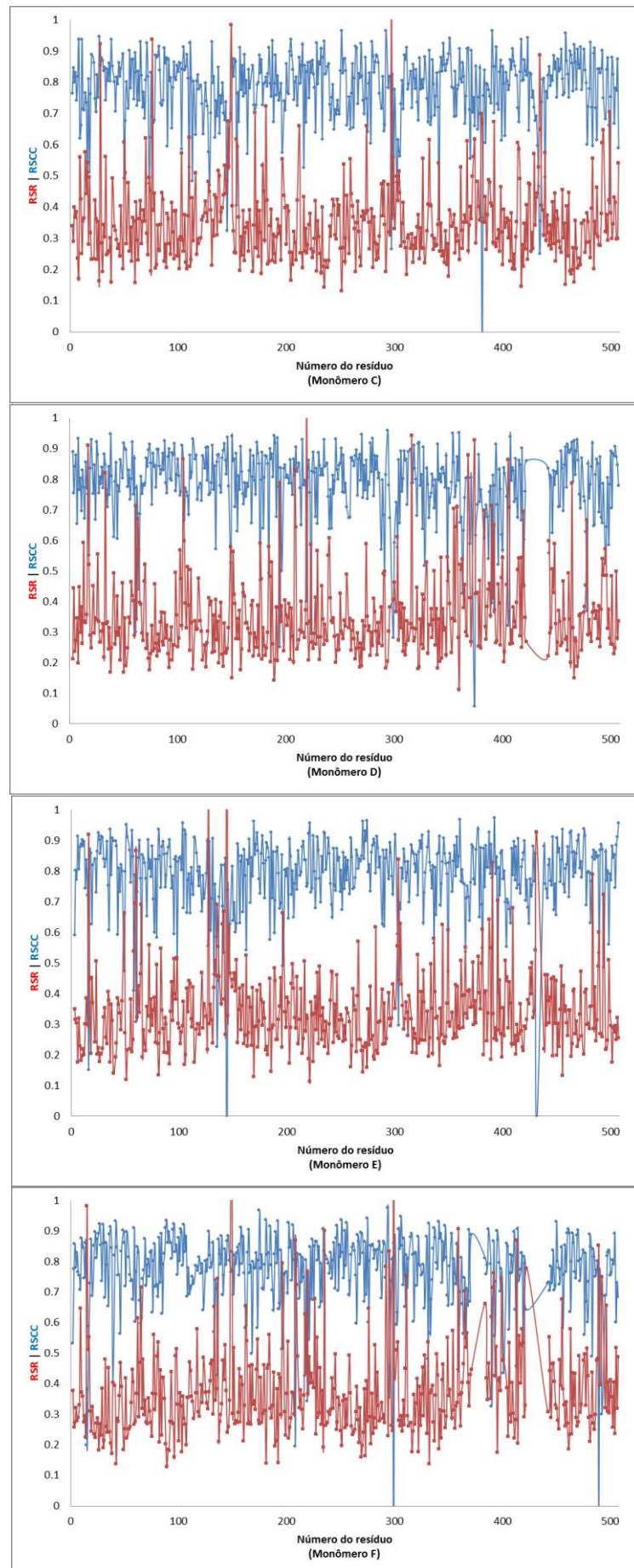
Legenda: Os valores mostrados foram calculados para cada um dos oito monômeros e também para a estrutura global.

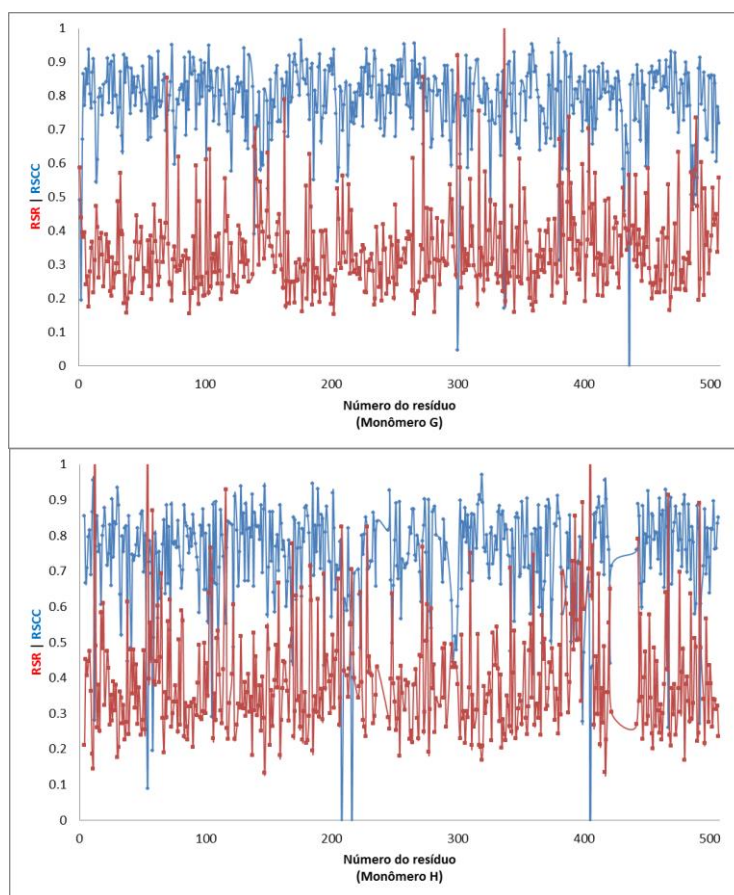
Fonte: O autor.

Figura 12. Representação gráfica dos valores de RSCC e RSR calculados para o modelo refinado da RtMetRS por resíduo.









Legenda: O valores do Coeficiente de correlação no Espaço Real (RSCC) e Residual no Espaço Real (RSR) postos em gráfico são mostrados nas curvas coloridas em azul e vermelho, respectivamente, para cada um dos monômeros do modelo refinado final da RtMetRS.

Fonte: O autor.

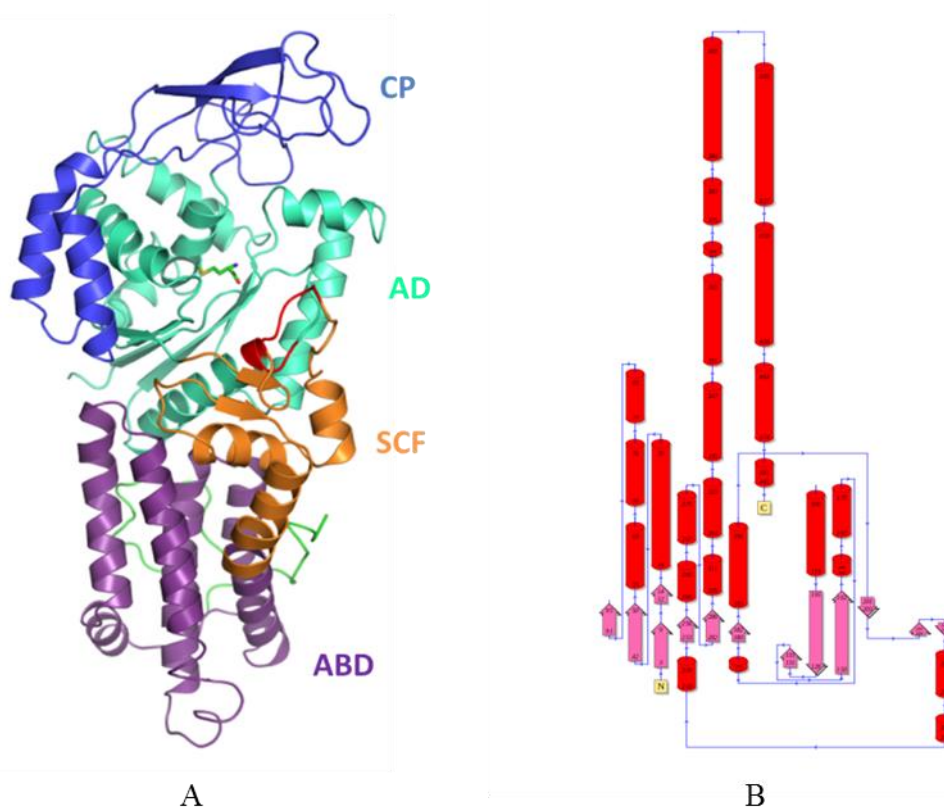
#### 1.5.4.1.5 Descrição da estrutura da metionil-tRNA sintetase de *Rickettsia typhi* e comparações estruturais

A sequência de aminoácidos da RtMetRS expressa contém um peptídeo com oito resíduos na região N-terminal incorporado para facilitar a purificação por IMAC, cuja sequência de aminoácidos é MAHHHHHH. Estes resíduos não foram observados na densidade eletrônica da estrutura refinada da RtMetRS. Não foi observada densidade eletrônica para componentes do tampão de purificação ou da própria condição de cristalização, portanto, nenhum ligante além da L-metionina foi modelado.

A estrutura cristalográfica global da RtMetRS, cristalizada com L-metionina complexada, apresenta as características observadas em metionil-tRNA sintetases de outros organismos e representa a composição de domínios mínima destas enzimas (DENIZIAK e BARCISZEWSKI, 2001), ou seja, não possui extensões *in cis* ou *in trans* que são encontradas em algumas espécies como *Caenorhabditis elegans* e *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente (HAVRYLENKO et al., 2010). RtMetRS é composta de um domínio catalítico, o domínio de aminoacilação (AD

(*aminoacylation domain*, que corresponde aos resíduos 1-115 e 223-286, com o enovelamento característico do tipo Rossmann), um peptídeo conector (domínio CP, *conector peptide*, resíduos 116-222, que divide o domínio Rossmann), um domínio SCF (*stem contact fold*, resíduos 287-350) e um domínio de ligação ao anticódon do tRNA, ABD (*anticodon-binding domain*, resíduos 351-473) (Figura 13). Os intervalos de resíduos aqui descritos foram atribuídos aos respectivos domínios da *R. typhi* por comparação com a estrutura da metionil-tRNA sintetase homóloga de *S. aureus*.

Figura 13. Estrutura global do monômero da metionil-tRNA sintetase de *Rickettsia typhi* com o substrato metionina complexado.



Legenda: Organização do monômero de RtMetRS em termos de seus domínios constituintes. (A) A metionina é mostrada como modelo em bastões no sítio catalítico (AD). Os domínios AD, CP, SCF e ABD, definidos no texto, e a porção C-terminal estão coloridos em verde ciano, azul, laranja, roxo e verde, respectivamente. Os motivos HIGH (AD) e KISKS (SCF) são destacados em vermelho. (B) Diagrama de topologia do monômero da RtMetRS gerado com o servidor PDBSum.

Fonte: O autor.

O diagrama de topologia mostrado na Figura 13 evidencia que RtMetRS apresenta a distribuição dos elementos de estrutura secundária típicos de estruturas da Classe  $\alpha/\beta$  e contém um subdomínio all-alpha na região C-terminal (SCOP). A subdivisão da RtMetRS segundo CATH é Classe  $\alpha/\beta$  com topologia Rossmann (AD e CP – 3.40.50.620), "mainly alpha" com topologia do domínio 1 de IleRS (ABD – 1.10.730.10).

O domínio Rossmann, que consiste de sete hélices  $\alpha$  ( $\alpha 1$ -  $\alpha 4$  e  $\alpha 8$ - $\alpha 10$ ) e cinco fitas  $\beta$  ( $\beta 1$ - $\beta 3$  e  $\beta 9$ - $\beta 10$ ), corresponde ao domínio catalítico tipicamente encontrado da Classe I de aminoacil-tRNA sintetases e contém o motivo altamente conservado denominado HIGH, no qual em algumas espécies a isoleucina na segunda posição é substituída por L, A, M ou V. Outro motivo característico da Classe I é encontrado no domínio SCF; trata-se da sequência KMSKS, que apresenta importância catalítica e estrutural por estar envolvida na ligação de ATP e mediar a comunicação entre os domínios ABD e AD. Especificamente em RtMetRS, este motivo tem a composição KISKKS, assim como encontrado em MetRS de outras espécies. Este segundo motivo também sofre alguma variação, assim como o HIGH, sendo observada a substituição com maior frequência da metionina na segunda posição por I, F, L ou E, seguida da primeira serina substituída por G ou A, e, menos frequentemente, da primeira lisina e segunda serina por R e T, respectivamente. O resíduo de lisina na quarta posição do motivo se apresenta invariante, como pode ser observado a partir de alinhamento de múltiplas sequências de MetRSs de 150 espécies produzido pelo servidor ConSurf (ASHKENAZY et al., 2016).

Considerando a classificação alternativa para metionil-tRNA sintestases, que diz respeito à presença e ocupação por íons zinco de regiões conhecidas como *knuckles*, RtMetRS pode ser classificada como MetRS do tipo 1 (MetRS1) por apresentar um *knuckle* (Figura 14A) no domínio CP (GENTRY et al., 2003; BROWN et al., 2003). Entretanto, prevê-se que este *knuckle* não seja capaz de ligar íons zinco, o que permite ainda subcategorizá-la como membro da família D de MetRSs na denominação empregada por Yi et al. (2022) com base na classificação proposta por Mechulam et al. (1999).

Um fragmento do alinhamento estrutural entre RtMetRS e suas homólogas no qual foi dada ênfase para a região dos *knuckles* é mostrado na Figura 14B. Os resíduos que constituem os motivos na região de um determinado *knuckle* envolvidos na ligação de íons zinco, ou que ocupam posições equivalentes, foram destacados no alinhamento. Alguns resíduos próximos destes motivos chamam a atenção por apresentarem grau de conservação diferenciado que pode correlacionado à família a que uma determinada MetRS pertence. De fato, o resíduo de glutamato número 131 em RtMetRS corrobora a observação de que esta posição é ocupada por glutamato em enzimas MetRS1 (MECHULAM et al., 1999). A presença de uma cadeia lateral negativamente carregada nesta posição da região do *knuckle* foi apontada como a razão de estruturas de MetRS1 serem resolvidas em uma conformação ‘fechada’ na presença de metionina (YI et al., 2022). Segundo os autores, o glutamato poderia participar de interações íon-dipolo com a hélice  $\alpha 2$  mantendo a estrutura mais fechada após o movimento do domínio CP induzido por alterações conformacionais de resíduos que fazem contato com a metionina no domínio AD (Figura 14C). Por outro lado, enzimas do tipo MetRS2 apresentam resíduos de Ala, Gly, Gln e



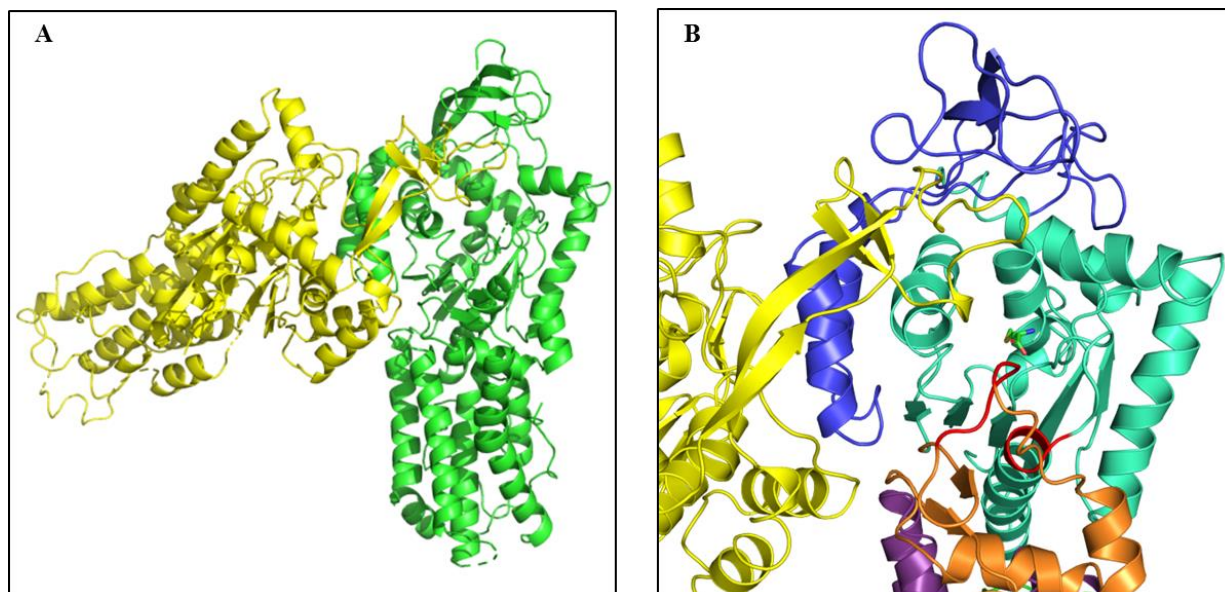


Alinhamento estrutural dos *knuckles* de RtMetRS e as homólogas. As seqüências foram agrupadas de maneira a reforçar a distinção entre MetRS1 e MetRS2 quanto ao número de motivos nos respectivos *knuckles*, com ou sem a capacidade de complexar íons zinco. Em amarelo e ciano foram destacados os resíduos que constituem *knuckles* sem capacidade de ligar  $Zn^{2+}$  e com capacidade de ligar  $Zn^{2+}$ , respectivamente. Em vermelho e azul são destacados *knuckles* que apresentam dois motivos de ligação de  $Zn^{2+}$ , mas que ligam um e dois íons, respectivamente. As seqüências mostradas são de metionil-tRNA sintetases de *R. typhi* (RtTRS), *B. melitensis* (BmTRS), *M. smegmatis* (MsTRS), *T. thermophilus* (TtTRS), *A. aeolicus* (AaTRS), *L. major* (LmTRS), *T. brucei* (TbTRS), *M. tuberculosis* (MtTRS), *S. aureus* (SaTRS), *E. coli* (EcTRS), *A. baumannii* (AbTRS), *X. citri* (XcTRS), *P. aeruginosa* (PsTRS), *P. abyssi* (PaTRS) e *H. sapiens* (HsTRS). (C) Sobreposição estrutural da RtMetRS (em verde) com a MetRS de *S. aureus* (em ciano) mostrando a interação íon-dipolo estabelecida pelo resíduo de glutamato apontada como a razão da conformação fechada observada em estruturas cristalinas de MetRS1. O resíduo equivalente em RtMetRS (E131 cuja cadeia lateral não foi modelada devido à falta de densidade eletrônica) se encontra distante da hélice comparativamente ao caso da SaMetRS, portanto, incapaz de realizar a interação íon-dipolo. Os resíduos de glutamato e o substrato metionina são representados por modelo de bastões.

Fonte: O autor.

Em RtMetRS, a conformação observada do domínio CP é comparável àquelas de estruturas de MetRS2, que assumem uma conformação mais aberta dada a impossibilidade de realizarem interação íon-dipolo. No entanto, isso pode ser apenas uma consequência do posicionamento relativo dos monômeros na unidade assimétrica. A segunda cadeia de cada dímero da RtMetRS tem parte do domínio CP, correspondente em grande medida ao *knuckle*, inserida na cavidade da primeira cadeia, que abrange áreas dos domínios CP, AD e SCF (Figura 15). Por outro lado, não se pode descartar a hipótese de que a disposição intermonomérica observada na unidade assimétrica seja a captura de uma conformação aberta assumida pela RtMetRS. No contexto do modelo de alterações conformacionais em proteínas em eventos de ligação de moléculas pequenas ou macromoléculas, chamado de seleção conformacional, o domínio CP poderia assumir diferentes populações conformacionais, abarcando os estados aberto e fechado, mesmo após a ligação da metionina. Admite-se que a ligação da metionina e os rearranjos em cadeias laterais de aminoácidos que formam seu sítio tornam possível o movimento de fechamento do domínio CP. Assim, seria esperado que este domínio na RtMetRS estivesse fechado. Eventualmente, um monômero de RtMetRS, atuando como ligante do complexo RtMetRS:Met, poderia se ligar ao outro quando o CP estivesse na conformação aberta. Faz-se necessário ressaltar que a disponibilidade de apenas um modelo representativo de apenas um estado limita a defesa desta hipótese. Entretanto, na literatura são encontrados exemplos de observações experimentais que são mais satisfatoriamente racionalizadas à luz do modelo de seleção conformacional em MetRS (KOH et al., 2012; YI et al., 2022).

Figura 15. Posicionamento relativo dos monômeros da metionil-tRNA sintetase de *Rickettsia typhi* em um dímero da unidade assimétrica.



Legenda: (A) Disposição relativa do monômero B, em amarelo, na cavidade do monômero A, em verde. (B) Ampliação da região de interação dos domínios CP de cada monômero. Nesta figura os domínios CP, AD e SCF foram coloridos da mesma maneira que na Figura 13. A metionina foi representada em modelo de bastões no centro do domínio AD e colorida de acordo com os tipos de átomos (carbonos em verde, oxigênios vermelhos, nitrogênio azul e enxofre amarelo).

Fonte: O autor.

Os resultados da análise de contato proteína-proteína realizada com PDBsum foram resumidos na Tabela 9. Utilizou-se também o programa PISA para o cálculo da área superficial total de cada monômero.

Tabela 9. Resumo das interação proteína-proteína na RtMetRS.

| Monômeros | Nº. resíduos da interface | Área interfacial (Å <sup>2</sup> ) | Área superficial total* (Å <sup>2</sup> ) | Interações iônicas | Ligações de hidrogênio | Contatos não ligados |
|-----------|---------------------------|------------------------------------|---|--------------------|------------------------|----------------------|
| A:B       | 29:21                     | 1317:1385                          | 21964,9:21589,8                           | 1                  | 4                      | 90                   |
| C:D       | 33:24                     | 1421:1524                          | 21910,4:21717,2                           | -                  | 6                      | 105                  |
| E:F       | 34:28                     | 1577:1674                          | 21924,3:21293,6                           | 3                  | 7                      | 127                  |
| G:H       | 31:22                     | 1427:1517                          | 22051,6:21865,7                           | 2                  | 4                      | 94                   |

Legenda: Resumo das interações intermoleculares e área de interação entre os monômeros. Os parâmetros tabelados foram obtidos com PDBsum, exceto os denotados com “\*”, que foram obtidos com PISA.

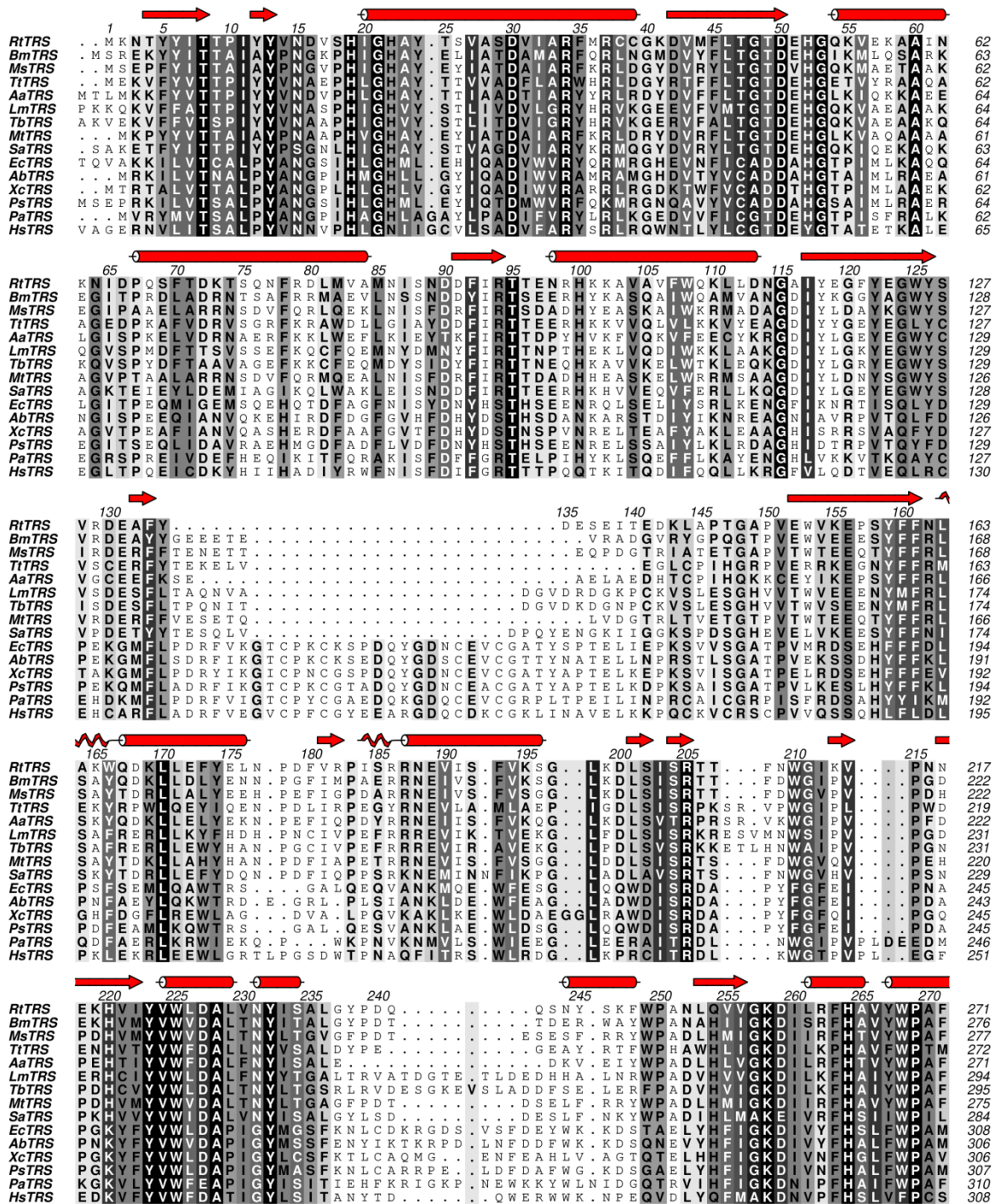
Fonte: O autor.

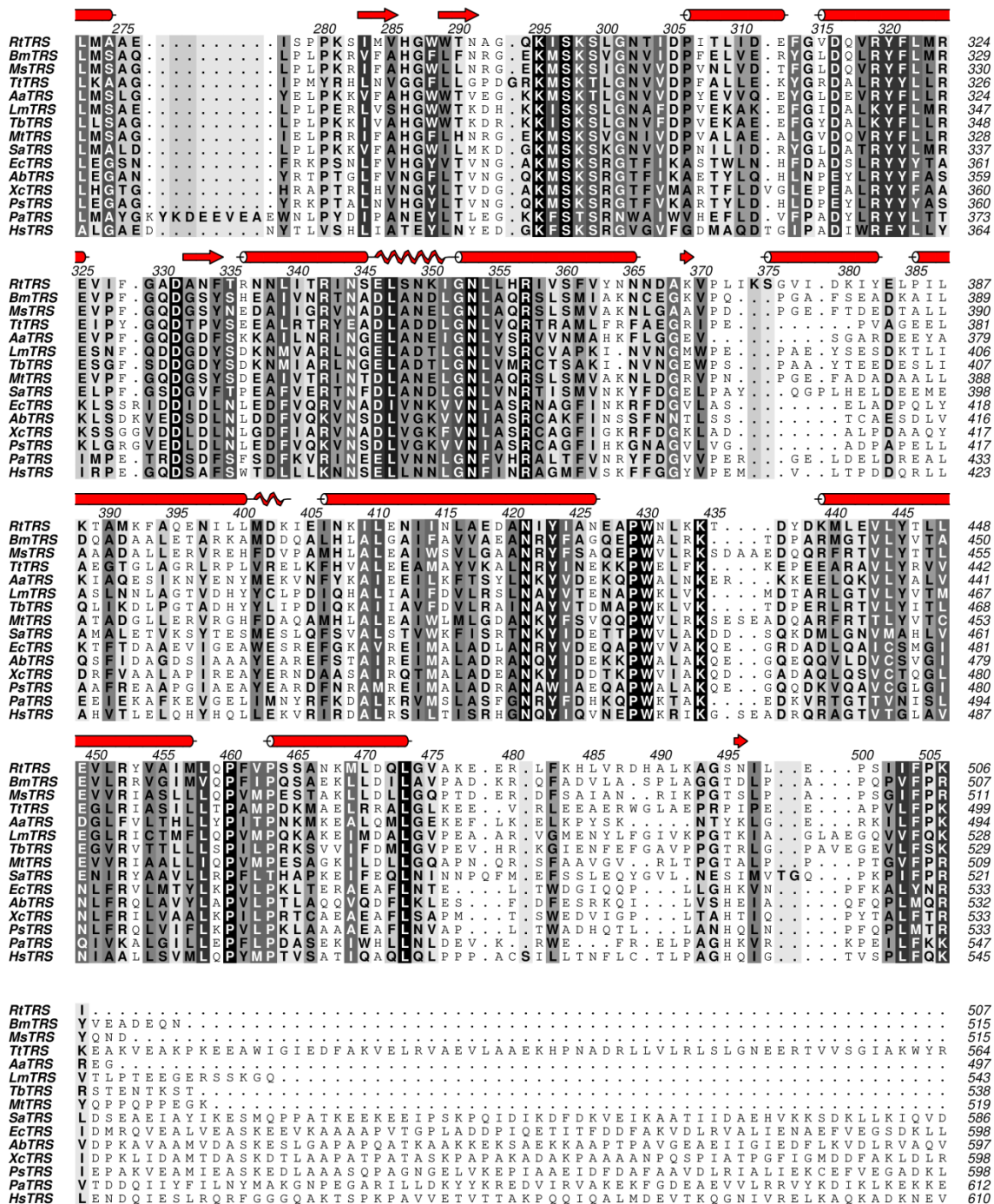
#### 1.5.4.1.6 Alinhamento estrutural, análise de conservação e contatos com L-metionina

O alinhamento estrutural (Figura 16) foi produzido utilizando-se as MetRSs homólogas dos organismos *Thermus thermophilus*, TtMetRS (PDB ID: 1A8H – SUGIURA et al., 2000); *Escherichia coli*, EcMetRs (PDB ID: 1QQT); *Pyrococcus abyssi*, PaMetRS (PDB ID: 1RQG – CREPIN et al., 2004); *Mycobacterium smegmatis*, MsMetRS (PDB ID: 2X1L – INGVARSSON e UNGE, 2010); *Leishmania major*, LmMetRS (PDB ID: 3KFL – LARSON et al., 2011); *Brucella melitensis* biovar *abortus* 2308 str. ATCC/CRP #DD-156, BmMetRS (PDB ID: 4DLP); *Trypanosoma brucei brucei*, TbMetRS (PDB ID: 4EG1 – KOH et al., 2012); *Homo sapiens*, HsMetRS citosólica (PDB ID: 5GL7); *Acinetobacter baumannii*, AbMetRS (PDB ID: 5URB); *Mycobacterium tuberculosis* H37RA, MtMetRS (PDB ID: 5XET – WANG et al., 2018); *Xanthomonas citri*, XcMetRS (PDB ID: 6WQS – MERCALDI et al., 2021); *Pseudomonas aeruginosa*, PsMetRS (PDB ID: 7ULZ); *Staphylococcus aureus*, SaMetRS (PDB ID: 7WPK – YI et al., 2022) e *Aquifex aeolicus*, AaMetRS (PDB ID: 2CSX – NAKANISHI et al., 2005).



Figura 16. Alinhamento de seqüências da metionil-tRNA sintetase de *Rickettsia typhi* com enzimas MetRS homólogas com estrutura tridimensional resolvida.





Legenda: Alinhamento de seqüências de aminoácidos da RtMetRS e MetRSs homólogas. As abreviações usadas dos nomes à esquerda de cada seqüência foi substituída aqui de MetRS para TRS e a correspondência com o organismo de origem foi mencionada no início da seção. Os elementos de estrutura secundária foram calculados com o programa DSSP e são mostrados para RtMetRS (cilindros e espirais em vermelho correspondem a hélices  $\alpha$  e  $\beta_{10}$ , respectivamente, e setas em vermelho correspondem a fitas  $\beta$ ). Figura gerada com o programa ALINE. A coloração das seqüências de aminoácidos seguiu a convenção de Alscript Calcons (BARTON, 1993). As seqüências mostradas são de metionil-tRNA sintetases de *R. typhi* (RtTRS), *B. melitensis* (BmTRS), *M. smegmatis* (MsTRS), *T. thermophilus* (TtTRS), *A. aeolicus* (AaTRS), *L. major* (LmTRS), *T. brucei* (TbTRS), *M. tuberculosis* (MtTRS), *S. aureus* (SaTRS), *E. coli* (EcTRS), *A. baumannii* (AbTRS), *X. citri* (XcTRS), *P. aeruginosa* (PsTRS), *P. abyssi* (PaTRS) e *H. sapiens* (HsTRS).

Fonte: O autor.

As seqüências de LmMetRS, TbMetRS e HsMetRS tiveram os intervalos resíduos N-terminais 1-204, 1-235 e 1-259, respectivamente, removidos para melhor apresentação do

alinhamento. Estas regiões correspondem a domínios extras que não apresentam equivalentes em RtMetRS. O alinhamento mostra que, entre as MetRSs com estrutura resolvida, os resíduos K374 e S375 de RtMetRS parecem ser únicos nesta posição e foram mapeados para a região N-terminal da hélice  $\alpha$  que faz parte do domínio ABD (Figura 17), mais especificamente, na superfície oposta à região envolvida na interação com o tRNA. A análise de conservação realizada com o servidor ConSurf mostrou que esta hélice  $\alpha$  pertence às regiões da RtMetRS com alta variabilidade.

A análise do alinhamento da Figura 16 evidencia alguns padrões de conservação nas sequências que poderiam ser associados a uma determinada família de MetRS. Em alguns casos, nota-se uma aparente invariabilidade dentro de uma família, por exemplo, o resíduo de glicina (G124 em RtMetRS) ocorre em todas as estruturas de MetRS1 alinhadas, enquanto que, em MetRS2, a glicina é substituída por uma glutamina. Já em outros casos observa-se alguma variabilidade (com substituições conservativas e não conservativas), por exemplo, na posição do resíduo Y134 da RtMetRS as demais MetRS1 apresentam F, K ou L, entretanto, enzimas MetRS2, apresentam apenas L. Os resíduos envolvidos nesses padrões e a sua associação com o tipo de MetRS em outras ocorrências no alinhamento foram compilados na Tabela 10 para os casos em que os resíduos são conservados dentro de uma família. Neste contexto ainda cabe destacar uma característica observada que diz respeito à presença de prolinas (mencionadas no item 2.4.1.3.1.4) em posições equivalente nas homólogas que pertencem à família MetRS1, exceto a posição 239. Entre as homólogas, apenas as de *T. thermophilus* e *A. aeolicus* não possuem as prolinas equivalentes a 183 e 250 na conformação *cis*. Embora não se possa inferir o papel que esses padrões composicionais podem desempenhar na estrutura de cada enzima, a compilação deles pode ser de algum valor quando da determinação das estruturas de novos membros.

Tabela 10. Padrões de conservação sequencial observados entre enzimas das famílias MetRS1 e MetRS2.

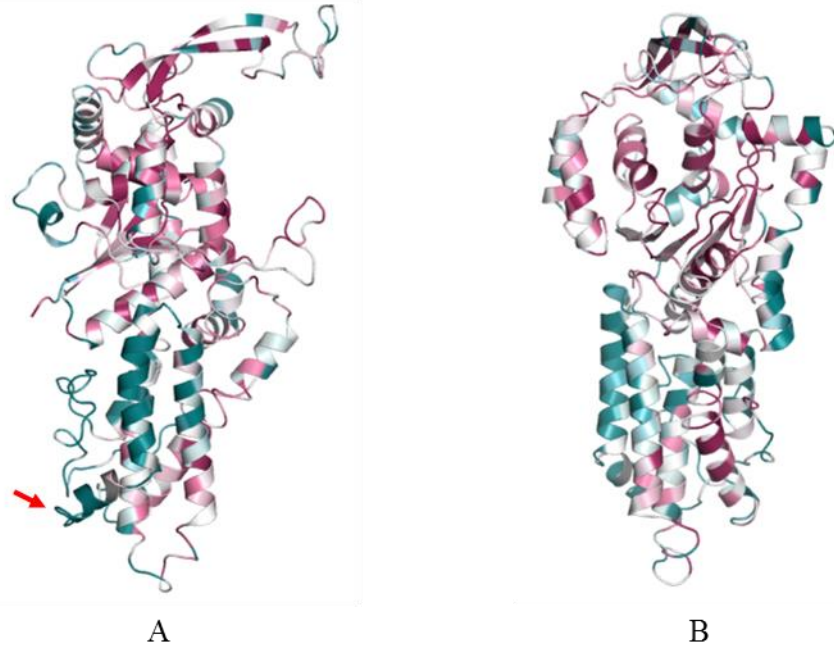
| Posição no alinhamento* | Família |        |
|-------------------------|---------|--------|
|                         | MetRS1  | MetRS2 |
| I11                     | I       | L      |
| T47                     | T       | C      |
| G124                    | G       | Q      |
| E156                    | E       | S      |
| H220                    | H       | K      |
| N231                    | N       | G      |



Legenda: Padrões de conservação de aminoácidos entre MetRS1 e MetRS2 observados no alinhamento da Figura 16. \*As posições do alinhamento são referentes à numeração da sequência da RtMetRS.

Fonte: O autor.

Figura 17. Mapeamento do grau de conservação sequencial da metionil-tRNA sintetase de *R. typhi* para a estrutura do monômero A realizado com o servidor Consurf.



Legenda: Análise de variabilidade da composição aminoacídica da RtMetRS. A hélice  $\alpha$ , que pertence ao conjunto de resíduos com maior variação e apresenta em sua porção N-terminal os resíduos K374 e S375, é destacada com uma seta vermelha. Resíduos coloridos em ciano representam posições de alta variabilidade, ou seja, menor grau de conservação, e em roxo, posições de menor variabilidade, portanto, mais conservados em estruturas de MetRS. O monômero foi rotacionado em torno de seu eixo vertical em  $\sim 90^\circ$  entre as imagens em A e B.

Fonte: O autor.

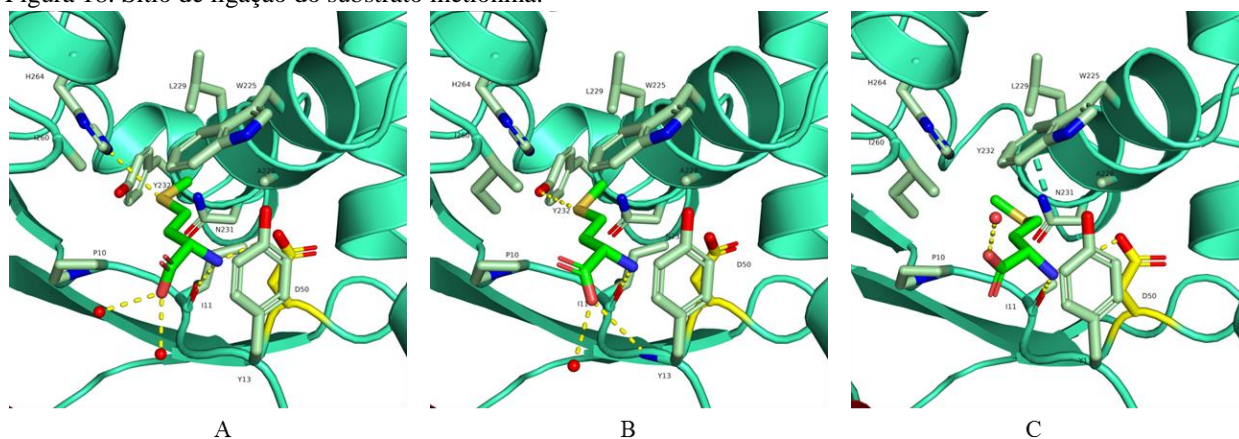
O substrato metionina é mantido no domínio AD em um sítio formado por cadeias laterais dos resíduos I11, Y13, D50, W225, A228, L229, N231, Y232, I260 e H264 (Figura 18). A metionina estabelece uma ligação de hidrogênio, através do grupo amino, com o oxigênio da cadeia principal da I11. Esta interação é conservada nas homólogas e em todos os monômeros da RtMetRS. Em estruturas homólogas há também uma interação entre a carboxila da cadeia lateral de um aspartato conservado e o grupo amino da L-metionina. Na estrutura da RtMetRS, este resíduo é o D50, que se encontra em uma conformação que deixa os átomos envolvidos nesta interação levemente mais distantes (3,07 Å no monômero A e 3,14 Å no monômero H) do que o observado na homóloga BmMetRS, entretanto, ainda dentro do valor de corte para uma interação iônica (ponte salina), 4,0 Å, de acordo com Barlow e Thornton (1983). Os resíduos Y13 e W225 exibem conformações equivalentes àquelas das homólogas que são atingidas após movimento das suas cadeias laterais em direção ao substrato, como se depreende da comparação com a forma apo quando disponível (uma exceção é da MetRS humana citosólica que apresenta a



referida tirosina em uma conformação aberta devido à interação com uma treonina de uma hélice  $\alpha$  próxima). Não se obteve sucesso na cristalização da RtMetRS na forma apo, entretanto, tem-se por hipótese que o estado ligado poderia ser alcançado através do mesmo evento de reposicionamento de cadeias laterais.

Os monômeros da RtMetRS apresentam heterogeneidade conformacional entre eles, da qual decorrem algumas interações polares com a metionina (através do SD e dos grupos carboxila e amino) que não têm equivalentes todos os monômeros devido a variações na conformação da carboxila e no SD do substrato. Algumas destas interações envolvem átomos das cadeias lateral e/ou principal dos resíduos I11 (“:” a seguir denota interação, à esquerda átomo do resíduo da cadeia e à direita átomo do substrato) (N:SD, presente nos monômeros B e H), Y13 (N:O, presente nos monômeros E, F e G), Y232 (OH:SD, presente apenas no monômero G) e H264 (NE2:SD, presente nos monômeros A, D, E e F). Outras interações dizem respeito às ligações de hidrogênio com moléculas de água, que se ligam apenas à metionina ou que medeiam ligações entre a metionina e outros resíduos (cadeia A [W1375:Y13:N, D16:OD2 e H22:NE2], C [W1573: H22:NE2, W350:D259:OD2] e G [W934: D16:OD2 e H22:NE2]). Em todos os casos, os átomos envolvidos estão separados por distâncias dentro do valor de corte de 3,5 Å.

Figura 18. Sítio de ligação do substrato metionina.



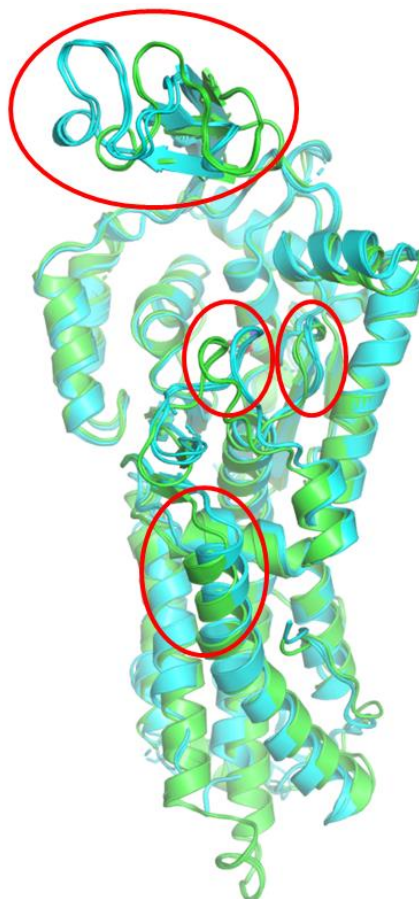
Legenda: Resíduos que formam a cavidade hidrofóbica de ligação da metionina. (A) Monômero A, (B) monômero G e (C) monômero H. Nesta figura foram mostrados apenas os monômeros com as maiores diferenças conformacionais e/ou de interações com a L-metionina após sobreposição estrutural. Em destaque com linha tracejada amarela a ligação de hidrogênio estabelecida entre metionina e ILE11 (monômeros A, G e H), D50 (monômeros A e H), Y232 (monômero G), H264 (monômero A) e moléculas de água (monômeros A, G e H). O resíduo D50 é mostrado em amarelo como modelo de bastões e foi incluído por ser um resíduo conservado que ajuda a manter a metionina no seu sítio.

Fonte: O autor.

Os desvios quadráticos médios, RMSDs, de  $C\alpha$  dos monômeros sobrepostos, utilizando-se o monômero A como referência, variam relativamente pouco e ficam entre 0,156-0,213 Å no

grupo de monômeros A, C, E e G. Já para o grupo B, D, F e H, os valores de RMSD ficam entre 1,083-1,191 Å, mesmo que a região mais variável (resíduos 124-153) seja omitida durante a sobreposição. Na Figura 19 é mostrada a sobreposição dos oito monômeros.

Figura 19. Sobreposição estrutural dos monômeros da metionil-tRNA sintetase de *Rickettsia typhi*.



Legenda: Sobreposição dos oito monômeros de RtMetRS. Em verde são mostrados os monômeros A, C, E e G, e em ciano são mostrados os monômeros B, D, F e H. Foram destacadas com elipses vermelhas as regiões de maior variação na conformação da cadeia principal (no topo, região dos *knuckles*; à esquerda, *loop* KISKS; à direita cadeia principal do D16, e abaixo, parte do domínio SCF).

Fonte: O autor.

## 1.6 CONCLUSÕES

A RtMetRS foi expressa em grande quantidade e, embora a fração insolúvel tenha sido dominante, o rendimento da enzima na fração solúvel foi satisfatório para que ensaios de cristalização fossem realizados (triagens iniciais e otimização). A análise por NanoDSF da RtMetRS apo e dos seus complexos com metionina ou ATP sugerem que estes substratos não impactam significativamente a estabilidade térmica da enzima.

Em relação aos ensaios de cristalização, uma condição testada produziu cristais proteicos. Devido à capacidade reduzida de difração destes cristais, ensaios de refinamento desta condição

foram realizados. Mesmo após um grande número de tentativas, em geral, os cristais não apresentavam melhoras de qualidade. Afortunadamente, alguns cristais propiciaram a coleta de conjuntos completos de dados de difração e um deles apresentou qualidade suficiente para a determinação da estrutura tridimensional da RtMetRS. No refinamento foram incluídas as leis de geminação referentes a quatro domínios cristalinos.

De forma geral, a organização de estrutura terciária da RtMetRS é bastante semelhante ao observado em enzimas homólogas e representa a estrutura mínima para uma MetRS. Entretanto, a estrutura refinada mostrou diferenças na conformação do domínio CP em relação ao que é geralmente encontrado em enzimas da família MetRS1, o que poderia indicar um comportamento distinto do complexo RtMetRS:Met em solução, assemelhando-se mais ao da família MetRS2. Em vários monômeros foi possível modelar, mesmo que parcialmente, trechos do *loop* que contém o motivo KISKKS, que geralmente se encontra desordenado em estruturas homólogas que também não possuem ATP ligado. Isso poderia ser uma consequência da proximidade intermonomérica em cada dímero na unidade assimétrica, que limita a movimentação da referida região. Além disso, este *loop* apresenta conformação distinta entre os monômeros.

A heterogeneidade conformacional ficou evidente também em outras regiões do modelo, como nos resíduos próximos ao motivo HIGH, onde a conformação da cadeia principal do ASP16 se encontra mais distante, voltada mais para o solvente para os monômeros A, C, E e G em relação ao observado para os monômeros B, D, F e H. Condição semelhante de variabilidade conformacional entre os dois grupos de monômeros também foi observada para a região que detém os *knuckles*.

## CAPÍTULO 2 - GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE DE *Acinetobacter baumannii*

### 2.1 INTRODUÇÃO

#### 2.1.1 *Acinetobacter baumannii*

*A. baumannii* é um bacilo Gram-negativo não fermentativo, aeróbico, pleomórfico e desprovido de aparato para mobilidade. Esta bactéria é um patógeno oportunista que infecta indivíduos imunologicamente debilitados, especialmente aqueles em períodos longos de internação hospitalar. *A. baumannii* tem desenvolvido resistência a múltiplos antibióticos de primeira linha, como carbapenens, polimixinas e tigeciclinas, o que representa um problema mais crítico ainda no contexto de infecções nosocomiais, ser membro de um grupo de microrganismos com panresistência a antibióticos denominado ESKAPE (um acrônimo para *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter* spp.) que consta como o patógeno de maior prioridade pela Organização Mundial da Saúde quanto à necessidade de desenvolvimento de novas medidas terapêuticas (MARAGAKIS e PERL, 2008; LI et al., 2006; PELEG et al., 2007; TILLERY et al., 2020). Este organismo apresenta mecanismos de resistência a agentes antimicrobianos intrínsecos e adquiridos. Os do primeiro tipo são provavelmente relacionados à capacidade de expressar diversas  $\beta$ -lactamases e cefalosporinases, ao número reduzido de porinas e à reduzida permeabilidade da membrana externa, além daqueles geralmente observados em outros membros do grupo ESKAPE. Já os do segundo tipo dizem respeito a características fenotípicas adquiridas através de elementos genéticos como plasmídeos transposons e integrons (MARAGAKIS e PERL, 2008). Além destas características, *A. baumannii* apresenta diversos fatores de virulência, como proteína de membrana externa A (OmpA), lipopolissacarídeos (LPS), lipooligossacarídeos (LOS), cápsula, fosfolipases C e D, sistemas de secreção do tipo I (T1SS), II (T2SS) e V (autotransportador, T5SS), e vesículas de membrana externa (OMV) (MORRIS et al., 2019).

As espécies do gênero podem ser encontradas em virtualmente qualquer tipo de solo e águas superficiais, o que leva a uma interpretação errônea de que as espécies deste gênero sejam ubíquas. Especificamente, *A. baumannii*, como patógeno, tem preferência por ambientes mucosos e pele com ferimentos e pode ser isolado de secreções do aparelho respiratório e orofaríngeas dos infectados. Entretanto, como é capaz de formar biofilmes, pode se desenvolver mesmo em superfícies abióticas, como utensílios hospitalares e dispositivos usados

em unidades de tratamento intensivo, onde causa infecções como pneumonia associada a ventiladores, infecções de pele e tecidos moles, em feridas, no trato urinário, na corrente sanguínea e meningites secundárias. Fora do ambiente hospitalar foram reportadas infecções em áreas da Ásia e Oceania afetadas por conflitos armados e desastres naturais, onde *A. baumannii* coloniza ferimentos e pode evoluir para fascite necrosante e morte. Casos de ocorrência de comunitária de pneumonia, encefalite e bacteremia primária geralmente são acompanhados de outras comorbidades como diabetes, doenças pulmonares e renais (HOWARD et al., 2012; DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007). A taxa de mortalidade por infecções nosocomiais causadas por *A. baumannii* pode ser tão alta quanto 44% das causas gerais de mortalidade e pode ser ainda maior se considerados outros fatores associados (ALRAHMANY et al., 2022).

A pele e tecidos moles infectados inicialmente apresentam aspecto similar à ‘pele’ de laranja, seguido por uma aparência de lixa que, finalmente, evolui para vesículas claras na pele. Em sequência, podem se desenvolver em áreas da pele bolhas hemorrágicas com processo necrótico visível, seguido de bacteremia. Se mantida sem tratamento, pode conduzir à septicemia e morte (SEBENY; RIDDLE; PETERSEN, 2008).

### 2.1.2 Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase

As enzimas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenases (GAPDH) são enzimas tetraméricas que catalisam a fosforilação oxidativa reversível do substrato D-gliceraldeído-3-fosfato (D-G3P) ao produto 1,3-bisfosfo-D-glicerato (1,3-bPG), o que implica o recebimento de elétrons pelo cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo ( $\text{NAD}^+$ ). O co-substrato, fosfato inorgânico, é incorporado ao produto final, assim, fazem-se necessários sítios para a ligação de ânions na cavidade catalítica da enzima. Em GAPDH, estes sítios são denominados “Ps” e “Pi” e correspondem aos locais de ligação do fosfato do substrato (embora também seja capaz de ligar fosfato inorgânico) e do fosfato inorgânico, respectivamente (MUKHERJEE et al., 2010). O sítio  $P_s$  é altamente conservado em eucariotos e procariotos, entretanto,  $P_i$  é variável. As estruturas de GAPDH possuem dois tipos de sítio  $P_i$ , um ‘clássico’, observado originalmente na GAPDH de *Bacillus stearothermophilus* (SKARZYŃSKI; MOODY; WONACOTT, 1987), e um denominado de ‘novo  $P_i$ ’, encontrado na GAPDH de *Thermotoga maritima* (KORNDÖRFER et al., 1995).

A atuação da GAPDH ocorre por um mecanismo em duas etapas. Na primeira, oxidativa, o grupo tiol da cadeia lateral da cisteína do sítio catalítico realiza um ataque nucleofílico ao carbono carbonílico do grupo aldeído do substrato D-G3P e, como resultado, obtém-se um hemitioacetal intermediário. Em seguida, um hidreto deste intermediário é transferido para o C4

de uma molécula de  $\text{NAD}^+$ , produzindo NADH e um intermediário tioacilado. A etapa de fosforilação ocorre pelo ataque nucleofílico da ligação tioéster do novo intermediário por um íon fosfato, gerando 1,3-bPG e a cisteína catalítica renovada (ZHANG et al., 2021). Além da cisteína nucleofílica, o mecanismo catalítico proposto considera a participação de um resíduo de histidina que reduz o  $\text{pK}_a$  aparente do próton da cisteína e aumenta sua nucleofilicidade ao torná-la um tiolato. A natureza básica da cadeia lateral da histidina também auxilia a transferência de hidreto do intermediário hemitioacetal (DIDIERJEAN et al., 2003).

A partir da análise da atividade de GAPDHs de *Bacillus subtilis* e da comparação de suas estruturas primárias com a de outras bactérias, identificou-se que até três tipos de GAPDH fosforilativas bacterianas podem ser expressas, dependendo da espécie. As diferenças encontradas neste estudo dizem respeito à especificidade por substrato e cofator que podem ser relacionadas à presença de sequências assinatura. Assim, GAPDH (GapA) e eritrose-4-fosfato desidrogenase (E4PDH) possuem trechos das suas sequências de aminoácidos que indicam especificidade por  $\text{NAD}^+$  como cofator, e G3P e eritrose-4-fosfato (E4P) como substratos, respectivamente. Já GapB, são enzimas que podem utilizar ambos os cofatores,  $\text{NAD}^+$  ou  $\text{NADP}^+$  com preferência por  $\text{NADP}^+$  (FILLINGER et al., 2000).

GAPDH não apresenta importância apenas como componente da via glicolítica, mas também para outras funções. Algumas destas se relacionam a áreas de importância médica/social, como contracepção, doenças neurodegenerativas e infecção por diversos patógenos (em agentes infecciosos como bactérias, GAPDH pode apresentar funções diversas - chamadas de *moonlighting* - que ampliam a virulência destes organismos e maximizam a capacidade de infectar hospedeiros, entre estas, adesão, invasão, evasão e aquisição de micronutrientes) (HENDERSON e MARTIN, 2011; NIMMA et al., 2023). Portanto, GAPDH poderia ser de interesse também na pesquisa para o desenvolvimento de fármacos, e de métodos de diagnóstico e prognóstico para o gerenciamento destas patologias (SEIDLER, 2013).

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Superexpressar, purificar, cristalizar a enzima Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de *Acinetobacter baumannii* (AbGAPDH);
- Realizar ensaios para medição da atividade enzimática de AbGAPDH;
- Determinar a temperatura de desnaturação da AbGAPDH por nanofluorimetria diferencial de varredura (nanoDSF);
- Coletar dados de difração de raios X dos cristais da referida enzima;

- Refinar as estruturas obtidas a partir dos padrões de difração coletados.

## 2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.3.1 Escolha e Obtenção do Gene da Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de *Acinetobacter baumannii* (AbGAPDH)

A escolha do gene da Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de *Acinetobacter baumannii* (AbGAPDH) foi realizada como descrito anteriormente no item 1.4.1. Este gene foi enviado subclonado no vetor de expressão BG1861, que tem resistência à ampicilina.

### 2.3.2 Métodos Gerais para Recuperação de Plasmídeos, Bactérias, Superexpressão, Purificação das Proteínas e Ensaio de Cristalização

#### 2.3.2.1 Recuperação do plasmídeo

Após o recebimento do vetor de expressão do *Seattle Structural Genomics for Infectious Disease* (SSGCID), ele foi recuperado aplicando-se o procedimento descrito no item 1.4.2.2 e utilizado para transformação de bactérias *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS quimiocompetentes conforme estabelecido no item 1.4.2.3.

#### 2.3.2.2 Superexpressão e purificação

A superexpressão e a purificação da AbGAPDH foram realizadas de acordo com o protocolo descrito no item 1.4.2.4, com a diferença de que não foi realizada a etapa de troca iônica.

#### 2.3.2.3 Ensaio de cristalização

Ensaio de cristalização do tipo *screening* foram executados de maneira semelhante aos descritos no item 1.4.2.5. Foram utilizadas amostras concentradas até 9 e 12 mg mL<sup>-1</sup>, conforme dosagem de concentração de proteínas realizada empregando-se o método descrito por Bradford (1976). Utilizaram-se os kits comerciais JCSG+, Morpheus e Structure Screen (Molecular Dimensions). As condições testadas apenas continham AbGAPDH e solução precipitante, isto é, não foram incorporados os substratos ou outros ligantes. Condições que eventualmente proveram cristais não foram submetidas a refinamento.

### 2.3.4 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Nanofluorimetria Diferencial de Varredura (NanoDSF)

Seguiram-se as etapas mencionada no item 1.4.4 para obtenção dos dados de DLS e NanoDSF, exceto que não foi incorporado qualquer ligante na solução de AbGAPDH analisada.

### 2.3.5 Procedimentos Computacionais

#### 2.3.5.1 Modelagem por homologia e análise da estrutura modelada da Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de *Acinetobacter baumannii*

A estrutura da AbGAPDH foi modelada teoricamente por modelagem por homologia. Inicialmente, a sequência de aminoácidos da AbGAPDH foi utilizada para definir as estruturas de GAPDHs homólogas depositadas no banco de dados PDB. Este procedimento foi realizado com a ferramenta BLAST. Os resultados foram avaliados e as homólogas de interesse foram selecionadas utilizando-se como critério de escolha a maior porcentagem de identidade e maior cobertura sequencial. Em seguida, o programa TCOFFEE foi utilizado para construir um alinhamento de sequências com base em estrutura das homólogas selecionadas. Este alinhamento, juntamente com a sequência da AbGAPDH, foi empregado para gerar 100 modelos com o programa MODELLER (ŠALI e BLUNDELL, 1993). O melhor modelo foi escolhido com base no critério de menor energia DOPE (SHEN e ŠALI, 2006) e validado com os programas PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993) e MOLPROBITY (CHEN et al., 2010). A inspeção e a produção de imagens do modelo foram realizadas com o programa PYMOL (DeLano, 2002). A análise do alinhamento e a sua edição para apresentação foram realizadas com o programa ALINE (BOND e SCHÜTTELKOPF, 2009).

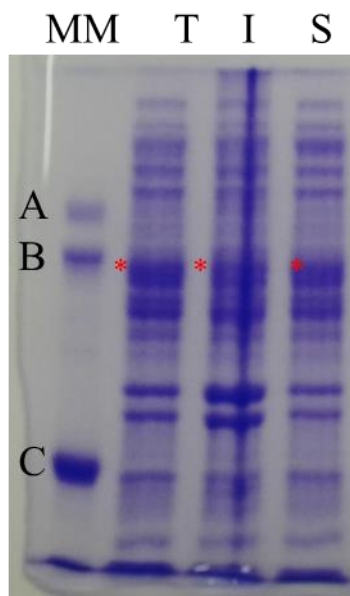
## 2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.4.1 Superexpressão e Purificação

Realizou-se um único teste para averiguação de expressão para uma colônia desenvolvida após transformação. A AbGAPDH foi expressa de forma solúvel como mostra a Figura 20 através do gel SDS-PAGE 12% do teste de expressão, mais especificamente pela banda destacada na raia denominada “S”.



Figura 20. Gel de eletroforese em condições desnaturantes do teste de expressão da Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de *Acinetobacter baumannii*.



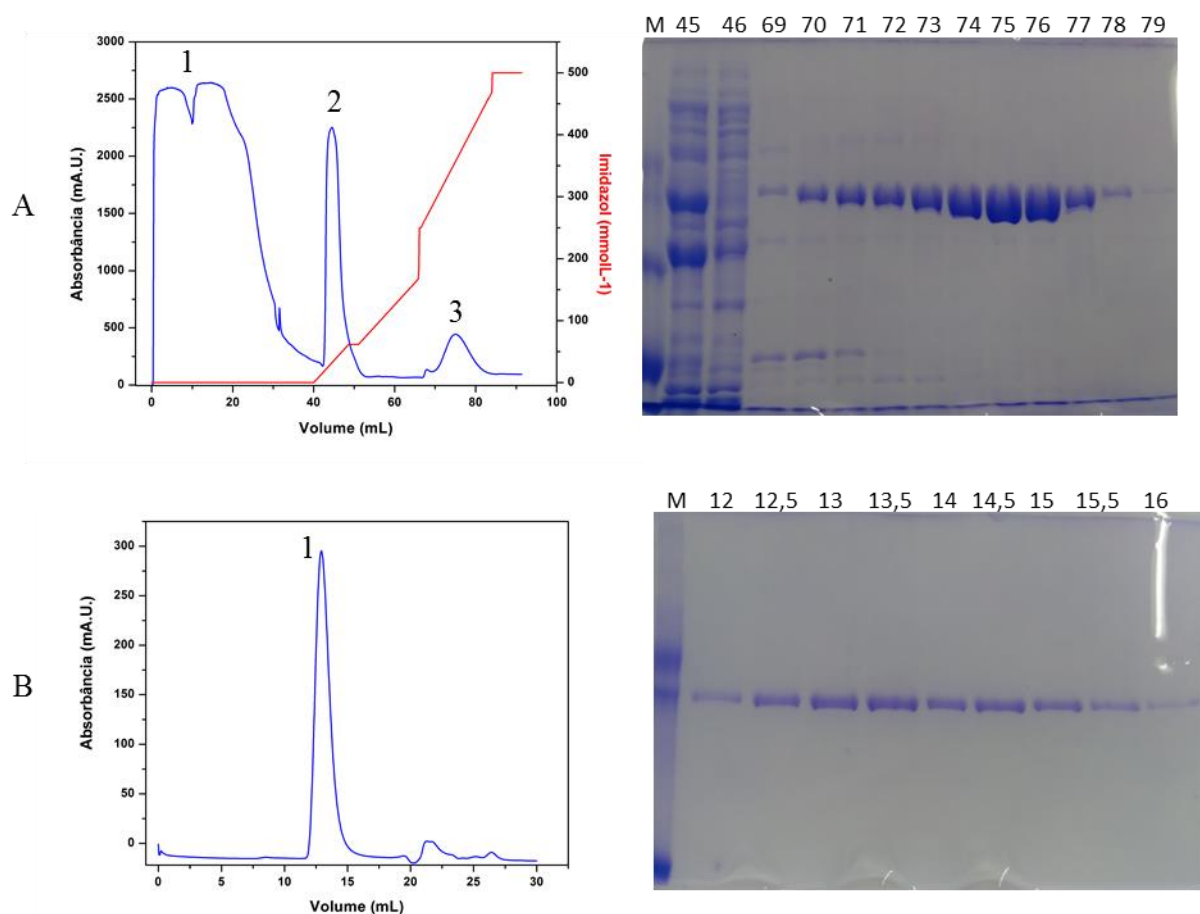
Legenda: Gel SDS-PAGE 12% utilizado para confirmar a expressão da AbGAPDH. MM: Marcador de massa molecular – kDa (A: 66,5; B: 55,8; C: 29,0), T: lisado total, I: fração insolúvel do lisado e S: fração solúvel do lisado. Os asteriscos vermelhos denotam as bandas às quais se atribuiu a expressão da AbGAPDH.

Fonte: O autor.

Diferentemente de outros casos (neste trabalho), a banda correspondente à expressão da AbGAPDH não apresentou grande destaque, entretanto, ela foi produzida em quantidade apreciável e de forma solúvel, como pode ser visto na raia S do gel da Figura 18. Essa diferença fez com que houvesse dúvida, inicialmente, quanto à AbGAPDH ter sido de fato expressa, entretanto, em produções destinadas à purificação, observou-se o mesmo aspecto no gel SDS-PAGE. A massa molecular teórica para AbGAPDH é de 53,90 kDa, portanto, está coerente com o observado no gel ao ocupar uma posição ligeiramente abaixo daquela ocupada pelo marcador de 55,8 kDa.

A purificação cromatográfica da AcGAPDH consistiu em duas etapas como mencionado na seção 2.3.2.2. Na Figura 21 são mostrados os cromatogramas da IMAC e SEC e os respectivos SDS-PAGE.

Figura 21. Cromatogramas de afinidade e de exclusão por tamanho da Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de *Acinetobacter baumannii*.



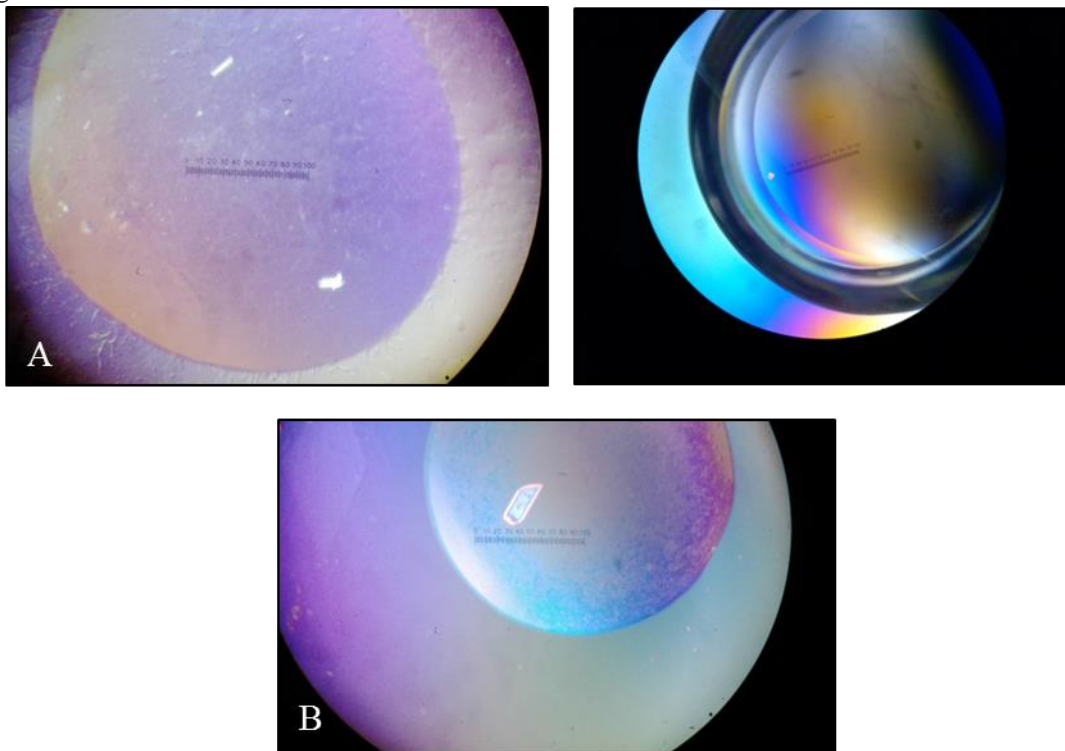
Legenda: (A) Primeira etapa de purificação, cromatografia de afinidade por íons de metal imobilizados (IMAC) da Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de *Acinetobacter baumannii*. A eluição da AbGAPDH ocorreu no pico 3 (B) Segunda etapa de purificação, cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) realizada com as frações 75 e 76 da etapa IMAC concentrada até volume de 500  $\mu$ L. A numeração de cada raia do gel se refere ao volume de eluição da enzima no pico majoritário (pico 1) do cromatograma de exclusão por tamanho. À direita de cada cromatograma é mostrado o respectivo gel SDS-PAGE a 15% (esta porcentagem de acrilamida foi usada devido à disponibilidade momentânea de um gel desta composição). A absorbância em todos os casos foi monitorada em 280 nm.

Fonte: O autor.

#### 2.4.2 Ensaios de cristalização da Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de *Acinetobacter baumannii*

Nos ensaios de cristalização foram observadas apenas duas condições nas quais cristais se desenvolveram e que foram preparadas com AbGAPDH a  $12 \text{ mg mL}^{-1}$ , uma do *kit* Structure Screen (condição de cristalização número 32) e outra do *kit* Morpheus (condição de cristalização 34) (Figura 22). Entretanto, a maioria das condições apresentou apenas precipitação amorfa. Estes cristais foram submetidos a difração de raios X, mas não proveram padrões de difração.

Figura 22. Imagens capturadas de gotas durante observações dos ensaios de cristalização da Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de *Acinetobacter baumannii*.



Legenda: Cristais observados nos ensaios de cristalização da Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de *Acinetobacter baumannii*. (A) Condição 32 do kit Structure Screen, cuja composição é: 2,0 mol L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio e 0,1 mol L<sup>-1</sup> de Tris, pH 8,5. As imagens à esquerda e à direita correspondem aos ensaios do tipo gota suspensa e gota sentada, respectivamente. (B) Condição 34 do kit Morpheus, cuja composição é: 0,1 mol L<sup>-1</sup> de ácidos carboxílicos (0,2 mol L<sup>-1</sup> de formato de sódio, 0,2 mol L<sup>-1</sup> de acetato de amônio, 0,2 mol L<sup>-1</sup> de citrato de sódio tribásico dihidratado, 0,2 mol L<sup>-1</sup> de tartarato de sódio e potássio tetrahidratado e 0,2 mol L<sup>-1</sup> de oxamato de sódio), 0,1 mol L<sup>-1</sup> do sistema tamponante 3 (1,0 mol L<sup>-1</sup> de Tris (base) e Bicina, pH 8,5), 30% (V/V) da mistura de precipitantes (40% (V/V) de etilenoglicol e 20% (m/V) de polietilenoglicol (PEG) 8000). A imagem corresponde à montagem do tipo gota suspensa. A escala presente em cada imagem é de 1 mm.

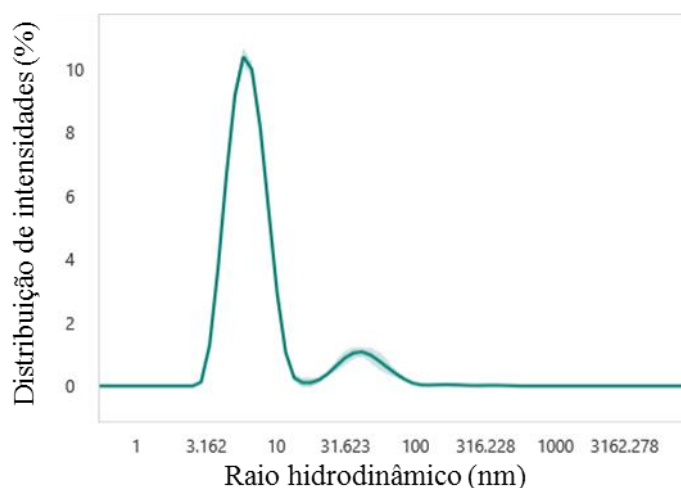
Fonte: O autor.

#### 2.4.3 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Nanofluorimetria Diferencial de Varredura (NanoDSF)

Avaliaram-se o grau de homogeneidade e a temperatura de desnaturação térmica da AbGAPDH por DLS e NanoDSF (Figura 23). A curva de DLS apresenta dois picos, o principal provavelmente corresponde à forma monodispersa da AbGAPDH e possui PDI de  $0,23 \pm 0,04$ . O segundo pico poderia corresponder a uma forma agregada da proteína ou a alguma impureza de mais elevada massa molecular. O raio hidrodinâmico associado ao pico principal calculado a partir dos dados de DLS coletados da AbGAPDH foi  $R_h = 6,33 \pm 0,18$  nm. Este valor é apreciavelmente maior do que o estimado para GAPDH extraída de músculo de coelho (*Oryctolagus cuniculus*),  $5,4 \pm 0,3$  nm (GOLUB et al., 2007). Geralmente, na literatura são realizados estudos de agregação de GAPDHs em diversas condições, contudo, o raio

hidrodinâmico é monitorado ao longo dos experimentos, sem que o valor desse parâmetro para uma condição “nativa” seja relatado. Em alguns casos, o  $R_h$  inicial é apresentado, mas em uma condição que é reconhecidamente desnaturante, portanto, não é possível realizar uma comparação nestas situações.

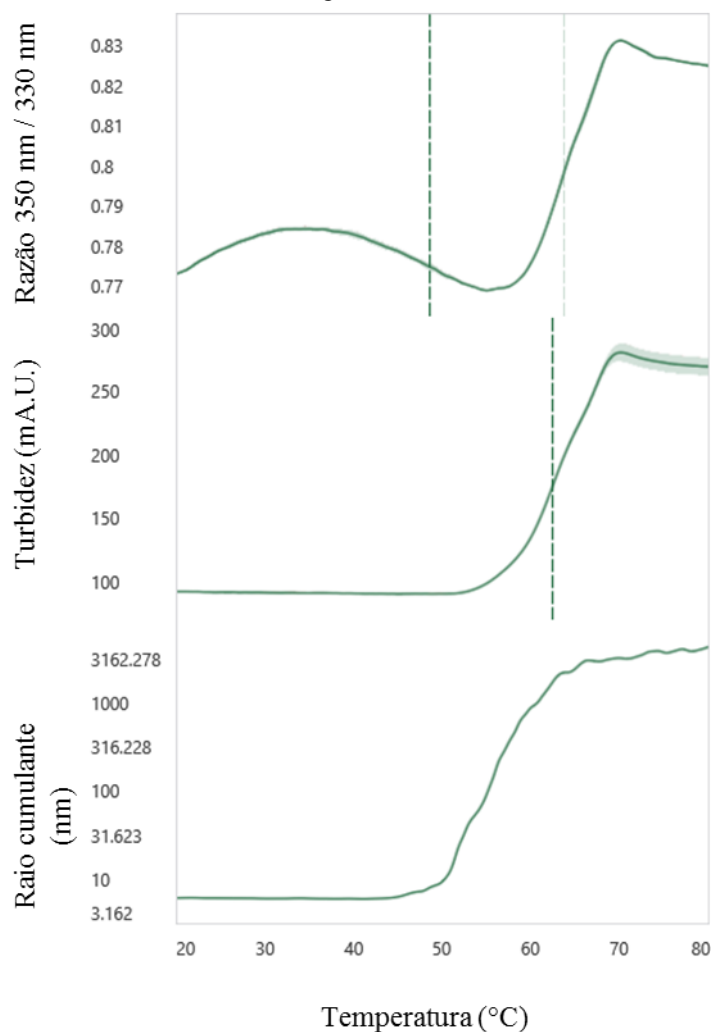
Figura 23. Curva de distribuição de intensidade obtidas por espalhamento dinâmico de luz (DLS) de uma amostra purificada da Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de *Acinetobacter baumannii*.



Legenda: Perfil de distribuição de intensidades obtido por DLS para a AbGAPDH. A curva representa a promediação da medição feita em triplicata. A concentração usada para a análise foi  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ .  
Fonte: O autor.

A enzima AbGAPDH também foi submetida à análise por NanoDSF para estimativa da temperatura de desnaturação (Figura 24). Observa-se que a curva da razão 350 nm/330 nm exibe duas transições, a primeira em  $48,07 \pm 1,04 \text{ }^\circ\text{C}$ , que marca o início da desnaturação, como pode ser visto na curva de turbidez vs. temperatura ao coincidir com o início do aumento da turbidez e também do aumento do raio cumulante (curvas central e inferior, respectivamente) das partículas em solução. A segunda transição, que foi tomada como a  $T_m$  da AbGAPDH, ocorre em  $63,67 \pm 0,10 \text{ }^\circ\text{C}$ . Esta  $T_m$  é maior do que as determinadas em outros casos como GAPDHs de *Plasmodium falciparum* ( $54,25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) (CROWTHER et al., 2010; SOOKAI, 2019), músculo de coelho (*O. cuniculus*) ( $60,7 \text{ }^\circ\text{C}$ , determinada por calorimetria diferencial de varredura) (MARKOSSIAN et al., 2006), *Arabidopsis thaliana* ( $54 \text{ }^\circ\text{C}$  para GAPC1 e GAPC2) e humana ( $60 \text{ }^\circ\text{C}$ , não especificada qual isoforma) (VEYEL et al., 2018).

Figura 24. Resultados gráficos do perfil de desnaturação térmica obtidos por nanofluorimetria diferencial de varredura (NanoDSF) para a Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de *Acinetobacter baumannii*.



Legenda: Perfil de desnaturação térmica da Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de *Acinetobacter baumannii* obtido por NanoDSF. Para cada caso, três curvas são mostradas, uma para cada tipo de propriedade monitorada, acima, razão das fluorescências registradas em 350 nm e 330 nm, no centro, turbidez, e abaixo, raio cumulante. As linhas tracejadas verticais indicam os valores de temperatura no ponto de inflexão na curva da respectiva propriedade mensurada. No caso da curva de razão de fluorescência, a segunda inflexão foi considerada para representar o valor da  $T_m$ .

Fonte: O autor.

#### 2.4.4 Modelagem por Homologia da estrutura da Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de *Acinetobacter baumannii*

Em razão do insucesso na cristalização da AbGAPDH e da decisão de priorizar o trabalho com a RtMetRS, devido à perspectiva positiva de cristalização e determinação de estrutura tridimensional desta última enzima, decidiu-se realizar apenas a modelagem por homologia da estrutura tridimensional da AbGAPDH.

A busca por homólogos com BLAST resultou em cem estruturas, das quais foram selecionadas dez de maneira que contemplassem organismos de diferentes reinos, não fossem

redundantes estruturalmente e não apresentassem mutações. As estruturas escolhidas estão listadas na Tabela 11.

Tabela 11. Relação das estruturas homólogas utilizadas na modelagem por homologia da Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de *Acinetobacter baumannii*.

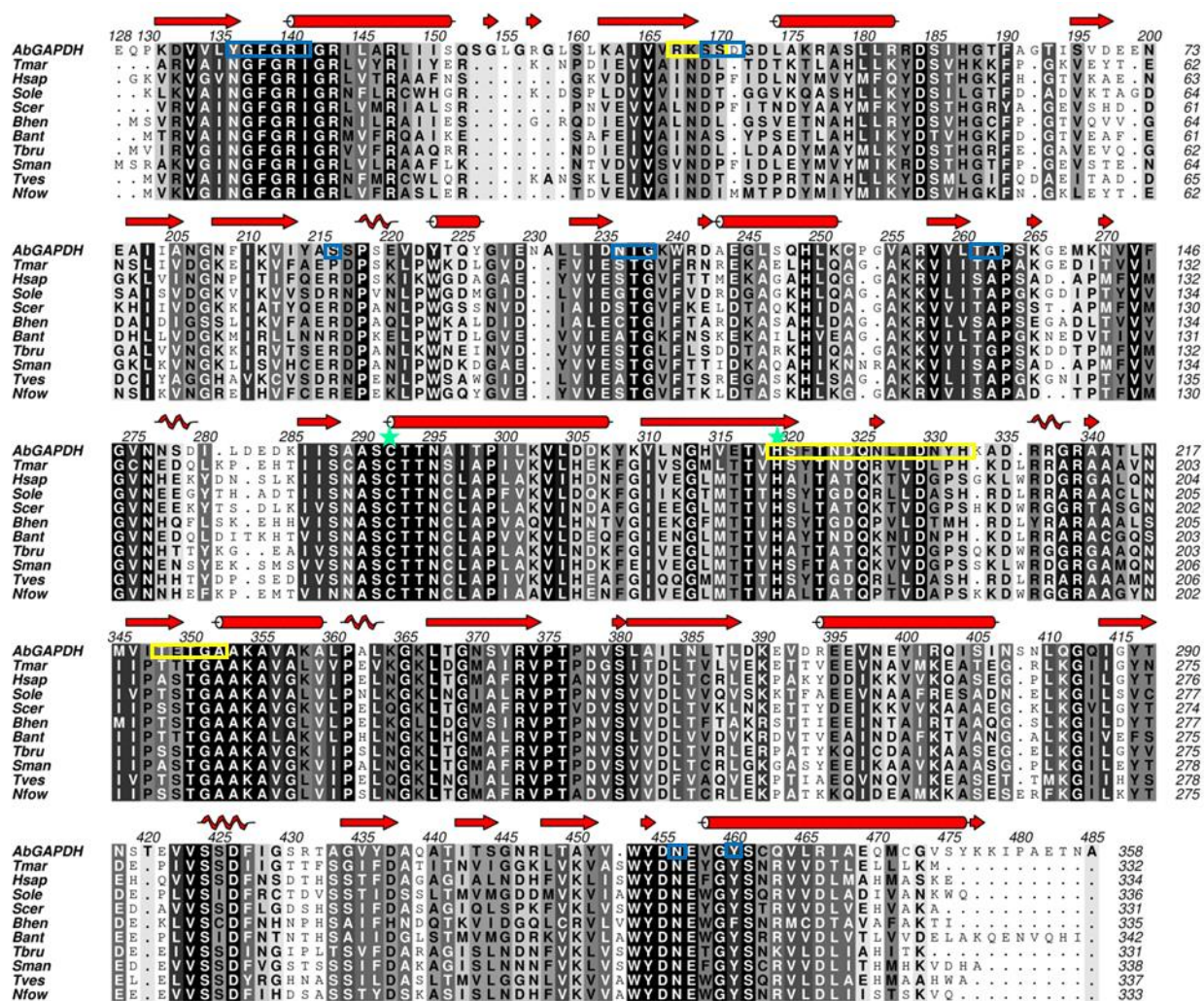
| <b>Código PDB</b> | <b>Organismo</b>                         | <b>Identidade (%)</b> |
|-------------------|--|-----------------------|
| 1HDG              | <i>Thermotoga maritima</i>               | 40,59                 |
| 1ZNQ              | <i>Homo sapiens</i>                      | 36,69                 |
| 3PYM              | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>          | 36,55                 |
| 6NLX              | <i>Naegleria fowleri</i>                 | 36,34                 |
| 3L0D              | <i>Bartonella henselae</i>               | 40,18                 |
| 6GFO              | <i>Thermosynechococcus vestitus</i> BP-1 | 39,41                 |
| 7JH0              | <i>Schistosoma mansoni</i>               | 36,84                 |
| 1RM4              | <i>Spinacia oleracea</i>                 | 41,30                 |
| 4P8R              | <i>Trypanosoma brucei</i>                | 36,34                 |
| 4DIB              | <i>Bacillus anthracis</i> str. Sterne    | 38,86                 |

Fonte: O autor.

O modelo final do monômero foi construído considerando-se o intervalo GLU128-LYS478 porque os demais resíduos das regiões N-terminal e C-terminal não se alinham com as sequências das homólogas (exceto no caso dos resíduos C-terminais de *B. anthracis*), por isso, a região N-terminal também foi omitida no alinhamento mostrado na Figura 25.



Figura 25. Alinhamento de seqüências de aminoácidos da Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de *Acinetobacter baumannii* e das enzimas homólogas selecionadas.



Legenda: Os elementos de estrutura secundária calculados pelo programa DSSP (KABSCH e SANDER, 1983) para o modelo da AbGAPDH se referem às fitas- $\beta$ , “pontes- $\beta$ ”, hélices- $\alpha$  e hélices  $3_{10}$ , e foram representadas como setas, ponta de seta, cilindros e espiral, respectivamente. A região N-terminal da AbGAPDH foi truncada para o propósito de apresentação do alinhamento. A coloração do fundo do alinhamento foi realizada de acordo com Alscript Calcons (BARTON, 1993). Os resíduos 478-485 foram mantidos no alinhamento, mas não foram usados na modelagem devido à falta de informação estrutural tridimensional das homólogas para este segmento. Retângulos amarelos indicam os resíduos que fazem parte das seqüências assinaturas relacionadas à preferência por um determinado cofator (NAD<sup>+</sup> ou NADP<sup>+</sup>), retângulos azuis denotam os resíduos que devem realizar interações com NAD<sup>+</sup> e estrelas verdes indicam os resíduos envolvidos na catálise. Os títulos das seqüências são referências aos organismos de origem das GAPDHs utilizadas para produzir o alinhamento : Tmar (*T. maritima*), Hsap (*H. sapiens*), Sole (*S. oleracea*), Scer (*S. cerevisiae*), Bhen (*B. henselae*), Bant (*B. anthracis*), Tbru (*T. brucei*), Sman (*S. mansoni*), Tves (*T. vestitus*) e Nfow (*N. fowleri*).

Fonte: O autor.

Durante processo de seleção das homólogas, verificou-se que os 127 resíduos iniciais não possuem equivalentes em GAPDHs de estrutura tridimensional determinada. Quando se buscou na base de seqüências de proteínas não redundantes, disponível no *site* do NCBI, majoritariamente seqüências de GAPDH de outras espécies do gênero *Acinetobacter* e de *A. baumannii* de diferentes linhagens foram encontradas, com a única exceção para *Staphylococcus*

*aureus*. Uma procura semelhante realizada na base de sequências *nr\_clustered* mostrou que a região N-terminal mais longa se alinha com GAPDHs de alguns outros organismos, embora nenhuma possua estrutura tridimensional resolvida. Posteriormente, fez-se uso do servidor SWISS-MODEL (WATERHOUSE et al., 2018) para determinar potenciais estruturas para serem usadas como molde para modelagem dessa porção N-terminal. Descobriu-se que apenas algumas poucas enzimas têm sequências que se alinham com a de AbGAPDH em alguns segmentos, entretanto, o grau de identidade muito baixo as tornam inadequadas para modelagem por homologia. Destaca-se que estas enzimas homólogas são proteínas tirosina fosfatases humana e polimerase de RNA independente de molde (com identidade de 25,93% e 20,93%, respectivamente).

Durante a revisão da literatura não foram encontradas informações a respeito da função da extensão N-terminal em qualquer destes organismos. Entretanto, no trabalho de Omumasaba et al., (2004), foi descrita a caracterização das GAPDHs de *Corynebacterium glutamicum*, GapA e GapB (esta apresenta 110 resíduos N-terminais de maneira semelhante à AbGAPDH). GapB foi capaz de exercer função glicolítica em concentrações altas de ATP, com  $\text{NAD}^+$  ou  $\text{NADP}^+$  como cofator. GapA, no entanto, apenas apresentou atividade glicolítica em baixas concentrações de ATP e de maneira especificamente dependente de  $\text{NAD}^+$ . A avaliação da atividade das duas enzimas utilizando  $\text{NADP}^+$  como cofator mostrou que ambas apresentam atividades comparáveis entre si em concentrações altas de ATP.

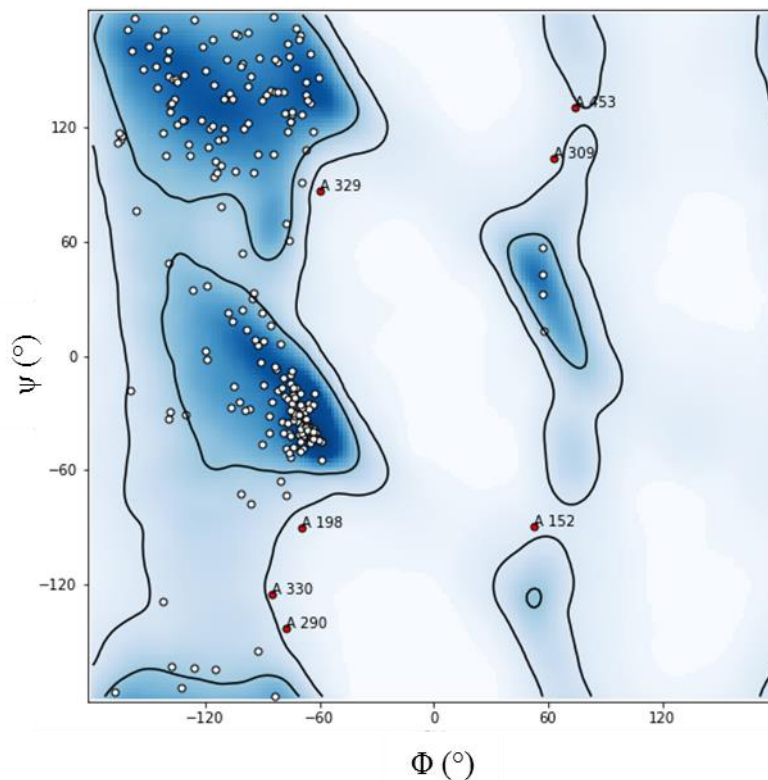
Lenvando-se em consideração as sequências assinatura propostas por Fillinger et al., (2000) e Omumasaba et al., (2004), pode-se lançar a hipótese de que AbGAPDH objeto deste trabalho seria do tipo GapB e talvez possa exibir o comportamento de dualidade de afinidade pelo cofator (ou seja, pode utilizar tanto  $\text{NAD}^+$  ou  $\text{NADP}^+$ ) a depender das condições de atuação, por exemplo, frente a algum metabólito como ATP. As sequências assinatura que suportam este argumento foram destacados no alinhamento da Figura 23. Particularmente, estes resíduos são:  $^{167}\text{RKSS}^{170}$ ,  $^{319}\text{HSFTNDQNLIDNYH}^{332}$  e  $^{348}\text{TETGA}^{352}$  na numeração da AbGAPDH. A presença de aspartato ou glutamato na posição 168, geralmente presente nas sequências de GapA, desfavorece a ligação ao  $\text{NADP}^+$ , bem como a substituição das serinas 169-170 por resíduos majoritariamente de natureza hidrofóbica. Serina/treonina nestas duas posições são tipicamente encontradas em GapB e foram relacionadas a um favorecimento da ligação ao  $\text{NADP}^+$ . No segundo segmento, a substituição de N330 por L, G, A e V, e Y331 por P desfavorecem analogamente a ligação ao  $\text{NADP}^+$ . A composição  $^{330}\text{NY}^{331}$  são alguns dos resíduos frequentemente encontrados em posições equivalentes em outros microorganismos e possibilitam interação com  $\text{NAD}^+$  ou  $\text{NADP}^+$ , com preferência para o último.



Soma-se a isso o fato de o genoma de *A. baumannii* de sequências não redundantes disponível apresentar três enzimas com função de GAPDH (e anotadas com tal). A primeira é a AbGAPDH discutida neste capítulo, a segunda é a GAPDH dependente de NADP<sup>+</sup> e a terceira tem função de E4PDH, de acordo com o estudo de Nimma et al., (2023). Estes autores consideram que AbGAPDH seria GapA e aquela dependente de NADP<sup>+</sup> seria GapB, entretanto, não discutem como chegaram a esta conclusão. Além disso, ao analisarem alinhamentos de sequências da E4PDH de *A. baumannii* e de outros organismos, admitem que E4PDH tem mais características composicionais observadas em GapA. Apesar do esforço em se tentar correlacionar características da estrutura primária a um determinado tipo de GAPDH, o real papel desempenhado por cada uma das três presentes em *A. baumannii* e sob quais condições demanda mais estudo experimentais, bioquímicos, bifofísicos e a solução da estrutura tridimensional delas.

O modelo do monômero foi submetido à validação com o programa MOLPROBITY que indicou desvios da idealidade significativos especialmente em ângulos de ligação e sobreposição de átomos (*clash*) de muitos resíduos, então, o programa *phenix.model\_idealization* foi empregado para reparar esses desvios. Após isso, uma nova avaliação com MOLPROBITY indicou melhora na qualidade do modelo e algumas alterações de ângulos diédricos  $\chi_2$  e  $\chi_3$  de resíduos de asparigina e glutamina, respectivamente. Especificamente para avaliação dos ângulos diédricos da cadeia principal também foi empregado o programa PROCHECK que mostrou que, conjuntamente, as regiões mais favorável e adicionalmente permitida do gráfico de Ramachandran (Figura 26) englobam 97,8% dos resíduos, enquanto as regiões generosamente perimitida e proibida correspondem aos 2,2% dos resíduos remanescentes, exceto prolinas e glicinas.

Figura 26. Gráfico de Ramachandran do modelo monomérico da Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de *Acinetobacter baumannii*.

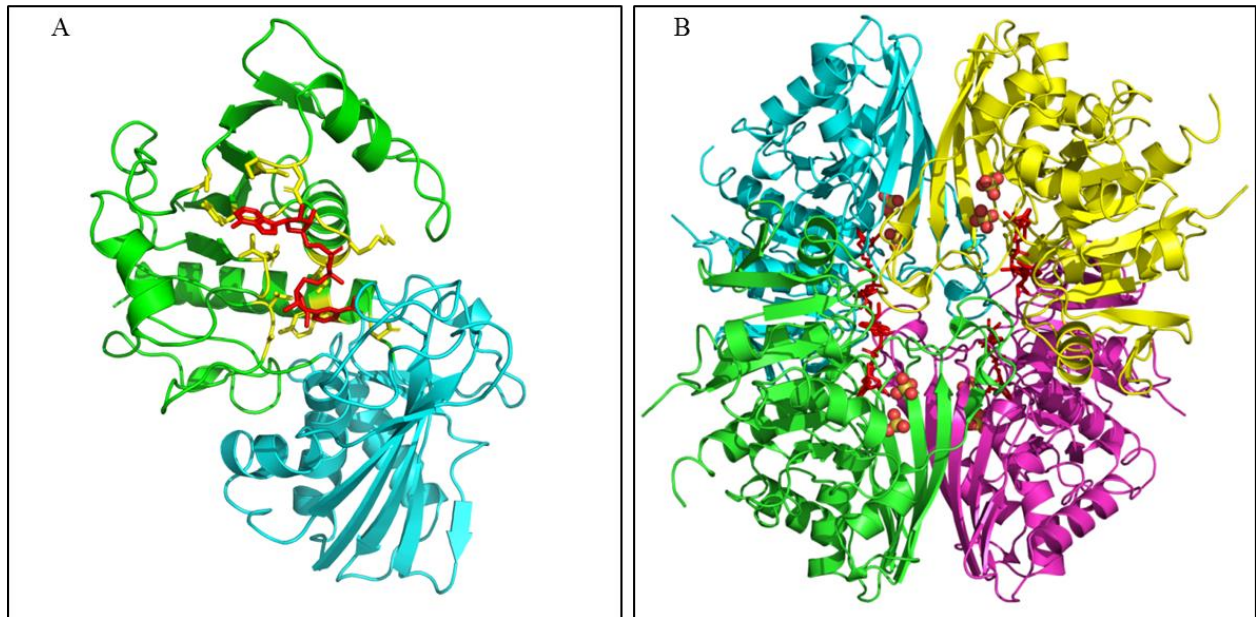


Legenda: Gráfico de Ramachandran gerado para o monômero 'idealizado' da Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de *Acinetobacter baumannii*. Os resíduos destacados em vermelho são: E198, Q152, A290, D329, N330, K309 e W453.

Fonte: O autor.

Através do alinhamento e das sobreposições estruturais, a estrutura da AbGAPDH foi dividida nos dois domínios característicos de GAPDHs (Figura 27A): o de ligação do  $\text{NAD}^+$ , que abarca os intervalos de resíduos E128-S291 e D455-K477, e o catalítico, que engloba o intervalo de resíduos C292-Y454, do qual C292 é o resíduo catalítico. Os resíduos que intergem com o  $\text{NAD}^+$ , presumidos a partir da comparação com a homóloga de *S. mansoni*, são destacados no alinhamento da Figura 25 e apresentam algumas variações em relação às homólogas como as substituições de resíduos bastante conservados N136Y, D169S (alanina em vez de aspartato em *B. anthracis*) e R216S (prolina em vez de arginina em *T. maritima*). O modelo do tetrâmero (Figura 27B) foi gerado a partir da sobreposição do modelo monomérico validado da AbGAPDH em cada monômero da homóloga de *S. oleracea*.

Figura 27. Modelo teórico do monômero e do tetrâmero da Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de *Acinetobacter baumannii*.

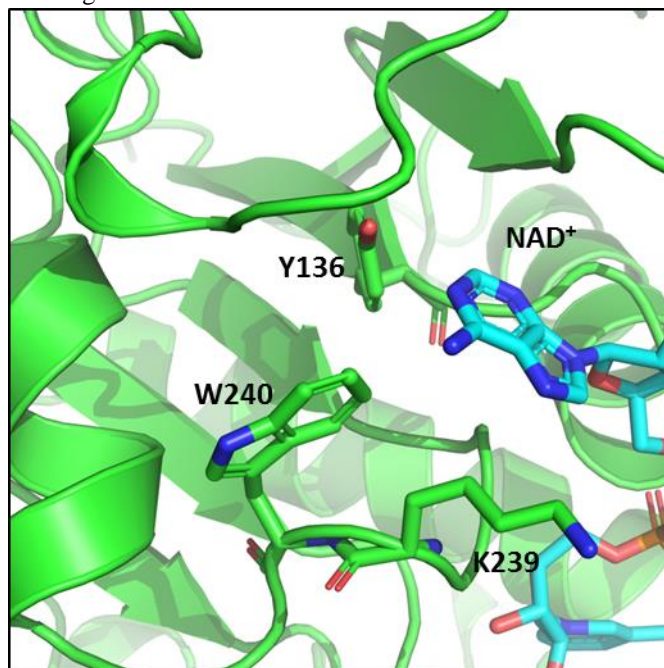


Legenda: Estruturas do monômero e tetrâmero da AbGAPDH. (A) Subdivisões do monômero nos domínios de ligação ao  $\text{NAD}^+$  (verde) e domínio catalítico (ciano). Os resíduos que possivelmente interagem com  $\text{NAD}^+$ , bem com ele próprio, estão destacados em modelo de bastões e coloridos em amarelo e vermelho, respectivamente. (B) As moléculas de  $\text{NAD}^+$  estão mostradas em modelo de bastões na cor vermelha e os íons sulfato estão representados em modelo de esferas.

Fonte: O autor.

A partir da inspeção do modelo, também se pode esperar que o resíduo K239 (presente também em *B. anthracis*), que substitui valina, isoleucina ou leucina nas homólogas, ao assumir conformação apropriada poderia participar de interações polares com a porção adenina do  $\text{NAD}^+$  (via N6A ou N7A). Ademais, o resíduo W240 adjacente substitui fenilalanina conservada nesta posição. A Figura 28 mostra a porção adenina da molécula de  $\text{NAD}^+$  e o posicionamento das cadeias laterais dos resíduos K239 e W240.

Figura 28. Região do modelo de um monômero da Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de *Acinetobacter baumannii* com uma molécula de NAD<sup>+</sup> ligada.



Legenda: Destaque da região do modelo da Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de *Acinetobacter baumannii* que interage com a porção adenina do cofator NAD<sup>+</sup>. As cadeias laterais dos resíduos Y136, K239 e W240 são mostradas com modelo de bastões coloridos em verde e o cofator NAD<sup>+</sup> é mostrado no mesmo tipo de representação e colorido em ciano. Os resíduos K239 e W240 substituem resíduos conservados em posições equivalentes nas GAPDHs homólogas. Mediante alteração conformacional apropriada, o resíduo K239 poderia estabelecer interações polares com o NAD<sup>+</sup> via N6A ou N7A. O resíduo Y136 e W240, após alterações conformacionais dos seus respectivos ângulos diédricos  $\chi_2$ , poderiam dar lugar a interações de empilhamento  $\pi$ - $\pi$  com um ligante aromático que seja capaz de se intercalar entre as suas cadeias laterais.

Fonte: O autor.

Resíduos na região de ligação da adenina/adenosina podem ser de interesse na exploração de moléculas inibidoras da ação de GAPDH, conforme descrito por Suresh et al. (2001) no contexto do da inibição desta enzima de *Leishmania mexicana* por compostos análogos à adenosina. Uma avaliação mais adequada do papel dos resíduos mencionados e suas vizinhanças demanda o conhecimento acerca da estrutura da AbGAPDH por métodos experimentais, por exemplo, para inferir a potencialidade de ancoragem de um ‘motivo’ aromático que poderia ser mantido por interação de empilhamento  $\pi$ - $\pi$  entre as cadeias laterais dos resíduos Y136 e W240 Figura 28. A conformação necessária para que isso ocorra poderia ser atingida após torções nos ângulos diédricos  $\chi_2$  de ambos os resíduos, que os deixaria aproximadamente paralelos e a uma distância de aproximadamente 6,4 Å.

## 2.5 CONCLUSÕES

A enzima Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de *Acinetobacter baumannii* (AbGAPDH) expressa e purificada foi suficiente para a realização de apenas ensaios iniciais de cristalização devido ao rendimento razoavelmente reduzido da proteína. Alguns cristais desenvolvidos não se mostraram difratadores.

Foram realizadas algumas caracterizações biofísicas por DLS e NanoDSF que mostraram que AbGAPDH se mantém monodispersa em solução, embora um pico, que pode ser atribuído a um agregado ou impureza de maior massa molecular, também tenha sido detectado na curva de espalhamento. O raio hidrodinâmico estimado é maior do que o reportado para outras GAPDHs, o que poderia ser decorrente do domínio N-terminal mais longo. A desnaturação térmica é irreversível, com  $T_m$  maior que as  $T_m$  de proteínas homólogas encontradas na literatura.

A estrutura tridimensional da AbGAPDH foi modelada por homologia, mesmo que não na totalidade de sua sequência devido à falta de molde adequado para os primeiros 127 resíduos N-terminais. A análise do alinhamento de sequências com proteínas homólogas possibilitou criar uma hipótese acerca da classificação da AbGAPDH (uma das três expressas em *A. baumannii*) quanto à utilização dos cofatores  $\text{NAD}^+$  e  $\text{NADP}^+$ . Enfatiza-se aqui a limitação desta hipótese visto que a heterogeneidade encontrada em enzimas GAPDH no tocante à classificação torna a análise teórica difícil e, obviamente, estudos experimentais bioquímicos e biofísicos são necessários.

## CAPÍTULO 3 – HISTIDIL-tRNA SINTETASE DE *Ehrlichia chaffeensis*

### 3.1 INTRODUÇÃO

#### 3.1.1 *Ehrlichia chaffeensis*

*Ehrlichia chaffeensis* é uma bactéria Gram-negativa de vida obrigatoriamente intracelular, pleomórfica, membro da subdivisão  $\alpha$ -proteobactéria (ordem Rickettsiales, família *Anaplasmataceae*), que infecta uma ampla variedade de animais. A descrição morfológica destas bactérias é originária de observações em leucócitos e tecidos humanos e em células de mamíferos de diversas linhagens. Dois tipos de células são identificados nestes ambientes, ambas não motoras; células reticuladas (cocoides e cocobacilares – com fibrilas de DNA do nucleóide e ribossomos uniformemente dispersos no citoplasma) e células de ‘núcleo denso’ (predominantemente cocoides – com o DNA do nucleóide e ribossomos mais densamente acomodados) (PADDOCK; CHILDS, 2003). Multiplicam-se por fissão binária em vacúolos no citoplasma de células do hospedeiro, formando agregados de densidade variável, denominados mórulas (RIKIHISA, 1991). As células alvejadas por este patógeno são monócitos e macrófagos, que são células imunológicas capazes de reconhecer os padrões moleculares patógeno-associados (PAMPs - *pathogen-associated molecular patterns*), tais como lipopolissacarídeos, peptídeoglicano, flagelo e pili comum, para desencadear uma resposta defensiva antimicrobiana. Entretanto, os genes envolvidos na biossíntese destes componentes celulares não estão presentes em *E. chaffeensis* (LIN e RIKIHISA, 2003). A entrada na célula hospedeira é mediada por uma invasina (proteína de superfície) que provoca a internalização do patógeno sem que o sistema de produção de espécies reativas de oxigênio seja ativado. As bactérias internalizadas se replicam no interior de compartimentos delimitados por membranas denominadas inclusões (RIKIHISA, 2022). Uma vez dentro destas inclusões, as células parasitárias empregam diversos mecanismos para obtenção de substâncias essenciais do hospedeiro. Ao fundir as inclusões com vesículas derivadas do hospedeiro, produzidas pela via de autofagossomos e endossomos regulada por RAB5, *E. chaffeensis* consegue obter aminoácidos, metabólitos intermediários, ferro, colesterol, glicerofosfolípidos, etc., componentes que não podem ser sintetizados devido à ausência de genes das vias correspondentes no seu genoma (LIN et al., 2020).

A forma principal de infecção ocorre pela picada de carrapatos infectados (por exemplo, *Amblyomma americanum*). O vetor *A. americanum* é infectado após se alimentar do sangue contaminado de um animal que serve como reservatório (*White-tailed deer*) de *E. chaffeensis*. Há relatos de casos em muitos países, distribuídos entre casos nos quais foi realizada a confirmação

de *E. chaffeensis* como o agente infeccioso por meio da caracterização molecular e casos com apenas evidência sorológica. Nestes últimos, não é possível dizer qual o agente causador devido à possibilidade de reatividade cruzada entre espécies relacionadas (YABSLEY, 2010).

As infecções por espécies do gênero *Ehrlichia* são denominadas erliquioses, particularmente, a erliquiose monocítica humana é causada por *Ehrlichia chaffeensis* (PADDOCK; CHILDS, 2003). Esta infecção é caracterizada por provocar sintomas como febre, dores de cabeça, mialgia, calafrios e, embora menos frequentemente, tosse, vômito, dores abdominais e vermelhidão da pele (geralmente em crianças). Os sintomas têm início após 1-2 semanas da exposição ao patógeno. Outras observações frequentes são anormalidades hematológicas (leucopenia e trombocitopenia) e hepáticas (aumento da quantidade de enzimas do fígado e proteína C reativa). A infecção pode ser fatal se não tratada, correspondendo a uma taxa de até 3%. O tratamento de primeira linha é realizado com o antibiótico doxiciclina. (MADISON-ANTENUCCI et al., 2020; THOMAS; DUMLER; CARLYON, 2009; RIKIHISA, 2022).

Os fatores determinantes da severidade da doença não são bem conhecidos. Acredita-se que a severidade possa estar relacionada à maneira complexa de interação entre os componentes da célula hospedeira, do patógeno e possivelmente de intervenções terapêuticas. Casos fatais foram descritos em indivíduos com debilidade imunológica causada por infecção por HIV, terapias com imunossupressores, gamopatia monoclonal, asplenia, talassemia beta e síndrome de Down (PADDOCK; CHILDS, 2003).

### 3.1.2 Histidil-tRNA Sintetase

Histidil-tRNA sintetases (HisRS) pertencem à classe II (subclasse IIa) das aaRS, a qual compreende enzimas que são formadas de três domínios conservados. O primeiro, que é comum à todas as enzimas da classe II, trata-se do domínio catalítico caracteristicamente formado por sete fitas-beta que compõem uma folha-beta central flanqueadas por sete hélices-alfa. O segundo é o domínio C-terminal, presente nas três integrantes da subclasse IIa, histidil- treonil-, prolil-, além da glicil-tRNA sintetase de organismos eucarióticos e arqueas (WOLF et al., 1999). Neste domínio fica o *loop* que realiza interação com o anticódon do tRNA, embora o anticódon não se constitua a razão primária para especificidade do tRNA<sup>His</sup>. O reconhecimento do tRNA cognato está muito provavelmente relacionado com interações com resíduos do motivo 2, situado no domínio catalítico (HAWKO e FRANCKLYN, 2001). O terceiro domínio, específico de HisRS, é uma inserção entre os motivos 2 e 3 do domínio catalítico, que assume a estrutura secundária de uma hélice-alfa. Esta hélice apresenta sequência de aminoácidos altamente conservada em

procariotos e realiza contatos com a cadeia principal do braço acceptor e está envolvida também na reação de ativação do substrato histidina (ABERG et al., 1997; GUTH et al., 2009). HisRS contém outros dois motivos, denominados HisA e HisB, destinados a facilitar a ligação de histidina.

A maior parte das enzimas da classe II é homodimérica, com exceções que são as fenilalanil- alanil- e glicil-tRS de eubactérias. O sítio ativo consiste de uma grande cavidade localizada em um dos lados da folha-beta. Existem três motivos conservados nas aaRSs da classe II. O motivo 1 encontra-se próximo da interface do dímero e auxilia no posicionamento dos motivos 2 e 3; estes dois, por sua vez, se localizam em *loops* próximos ao sítio ativo. O motivo 2 interage com ATP, o aminoácido e o “braço” acceptor, enquanto o motivo 3 interage com o ATP. As três subclasses (da classe II) se diferenciam quanto à sequência de aminoácidos e à estrutura quaternária; elas apresentam diferenças na topologia e na localização do domínio de ligação ao anticódon.

As informações estruturais, derivadas principalmente das estruturas das HisRS de *E. coli*, *T. thermophilus* e *S. aureus*, mostram que a ligação dos substratos ATP e histidina é acompanhada de ajustes induzidos específicos desta enzima e dos *loops* do motivo 2, que aumentam a especificidade pela histidina. O mecanismo de reação ocorre em duas etapas, assim como para outras aaRSs. Na primeira etapa ocorre a ativação do aminoácido, no caso histidina, pela reação com ATP e formação dos produtos histidil-adenilato e pirofosfato inorgânico. A etapa de adenilação envolve um deslocamento do tipo associativo, com a inversão estereoquímica do fosfato alfa, cujo estado de transição é estabilizado por uma arginina conservada da classe II e outra específica em HisRS. Na segunda etapa, a de aminoacilação, o histidil-adenilato sofre um ataque da hidroxila da extremidade 3' do tRNA (GUTH et al., 2009). As reações de cada etapa dependem da presença de íons  $Mg^{2+}$ , na razão 3:1  $Mg^{2+}$ :ATP, para a adenilação, e 2:1 na aminoacilação (HU et al., 2018; FRANCKLYN e ARNEZ, 2005).

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Superexpressar, purificar, cristalizar a enzima Histidil-tRNA Sintetase de *Ehrlichia chaffeensis* (EhHisRS);
- Realizar ensaios para medição da atividade enzimática de EhHisRS;
- Determinar a temperatura de desnaturação térmica da EhHisRS livre e em complexo com os substratos histidina ou ATP;
- Cristalizar a EhHisRS;



- Coletar dados de difração de Raios X dos cristais das referidas enzimas;
- Refinar a estrutura obtida a partir dos padrões de difração coletados.

### 3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.3.1 Escolha e obtenção do gene da Histidil-tRNA Sintetase de *Ehrlichia chaffeensis*

A escolha do gene da Histidil-tRNA Sintetase de *Ehrlichia chaffeensis* (EhHisRS) foi realizada como descrito no item 1.4.1. Este gene foi enviado subclonado no vetor de expressão AVA0421, que tem resistência à ampicilina.

#### 3.3.2 Métodos Gerais para Recuperação de Plasmídeos, Bactérias, Superexpressão, Purificação da Proteína

##### 3.3.2.1 Recuperação do plasmídeo

Após recebimento do vetor de expressão do *Seattle Structural Genomics Center for Infectious Disease* (SSGCID), ele foi recuperado, aplicando-se o procedimento descrito no item 1.4.2.2, e utilizando-se para transformação de bactérias *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS quimiocompetentes conforme descrito no item 1.4.2.3.

##### 3.3.2.2 Superexpressão e purificação

A superexpressão e as purificações da EhHisRS foram realizadas de acordo com o protocolo delineado no item 1.4.2.4.

#### 3.3.3 Espalhamento Dinâmico de Luz e Nanofluorimetria Diferencial de Varredura

Seguiram-se as etapas mencionadas no item 1.4.4 para obtenção dos dados de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Nanofluorimetria Diferencial de Varredura (NanoDSF). Especificamente para EhHisRS não foi realizada cromatografia de troca iônica como etapa intermediária de purificação.

### 3.3.4 Procedimentos Computacionais

#### 3.3.4.1 Modelagem por homologia e análise da estrutura modelada da Histidil-tRNA Sintetase de *Ehrlichia chaffeensis*

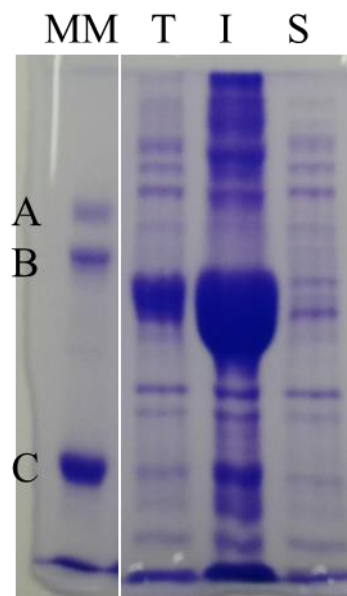
A estrutura da Histidil-tRNA Sintetase de *Ehrlichia chaffeensis* foi modelada teoricamente por modelagem por homologia conforme descrito anteriormente no item 2.3.5.1.

### 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.4.1 Expressão e Purificação da Histidil-tRNA Sintetase de *Ehrlichia chaffeensis*

Realizou-se um teste de expressão da enzima Histidil-tRNA Sintetase de *Ehrlichia chaffeensis* (EhHisRS) para uma colônia. A Figura 29 mostra o resultado da eletroforese (o gel SDS-PAGE) apenas para o teste realizado a 30 °C desta enzima, porque a 37 °C o perfil de expressão foi essencialmente o mesmo. EhHisRS apresenta uma massa teórica, de acordo com o servidor ProtParam, de 49,63 kDa, portanto, de acordo com a presença de uma banda intensa no gel em uma posição abaixo daquela do marcador de massa molecular de 55,8 kDa. No entanto, não houve expressão em grande quantidade na fração solúvel. O gene da EhHisRS foi inserido num plasmídeo AVA0421. Este vetor possibilita a obtenção da proteína de interesse fusionada à cauda de histidinas com um peptídeo intermediário de reconhecimento para a protease 3C de rinovírus humano (ALEXANDROV et al., 2004), portanto, pode-se realizar a clivagem/remoção enzimática da cauda no caso de que esta sequência N-terminal extra prejudique a solubilidade. Este procedimento não foi adotado, no entanto, devido à indisponibilidade da protease 3C a época em que a EhHisRS foi produzida.

Figura 29. Resultado de eletroforese em gel de poliacrilamida realizado para o teste confirmação de expressão da Histidil-tRNA Sintetase de *Ehrlichia chaffeensis*.



Legenda: Gel SDS-PAGE 12% dos testes de expressão a 30 °C para EhHisRS. As raia se referem a: MM, marcador de massa molecular – kDa (A: 66,5; B: 55,8; C: 29,0); demais amostras, T – lisado bacteriano total, S – fração solúvel, I – fração insolúvel.

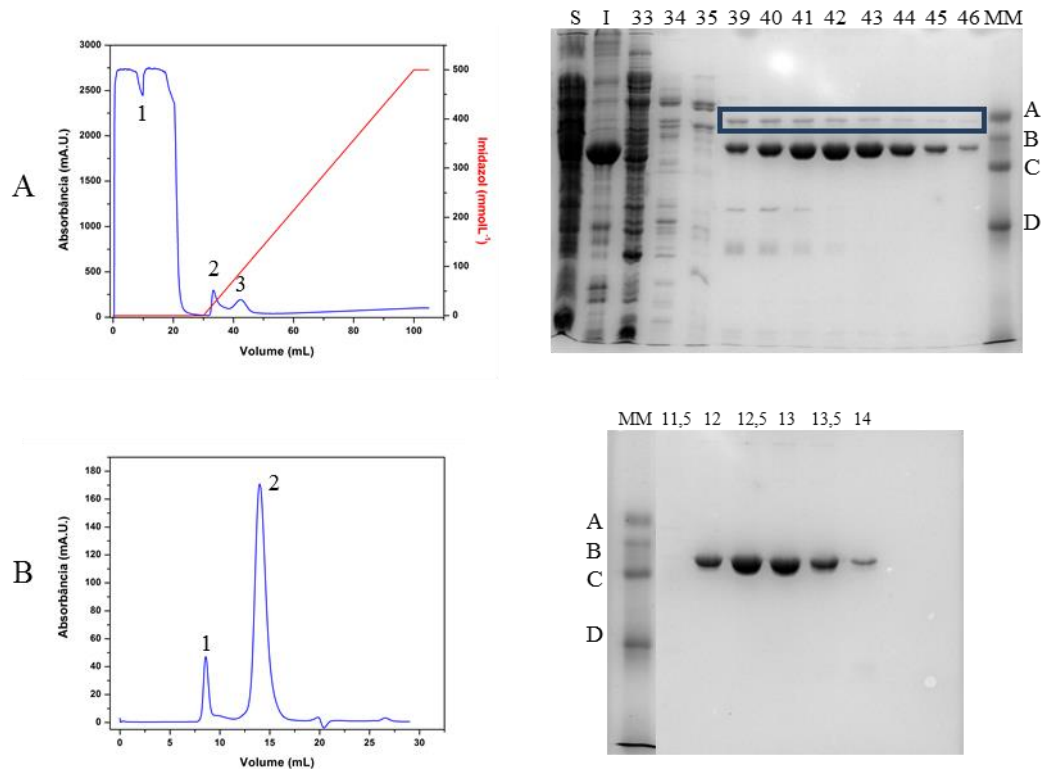
Fonte: O autor.

Devido ao baixo rendimento de produção de proteína solúvel, o que inviabilizava a execução de ensaios de cristalização, e ante a boa perspectiva de cristalização da RtMetRS, decidiu-se priorizar o trabalho com esta última e produzir EhHisRS apenas para DLS e nanoDSF. Neste caso, a produção foi realizada a temperatura de 20 °C, sob a hipótese de que isso melhoraria o rendimento da EhHisRS solúvel.

### 3.4.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Nanofluorimetria Diferencial de Varredura (NanoDSF)

O lote de EhHisRS destinado à caracterização por DLS e nanoDSF foi purificado por cromatografia de afinidade (IMAC) e exclusão por tamanho (SEC) sem que uma etapa intermediária de cromatografia de troca iônica fosse realizada, isso porque a necessidade de se reduzir a concentração de sal no tampão poderia provocar precipitação da EhHisRS. Os cromatogramas das duas etapas e os respectivos géis SDS-PAGE estão mostrados na Figura 30.

Figura 30. Purificação da Histidil-tRNA Sintetase de *Ehrlichia chaffeensis* utilizada nos ensaios de DLS e nanoDSF.

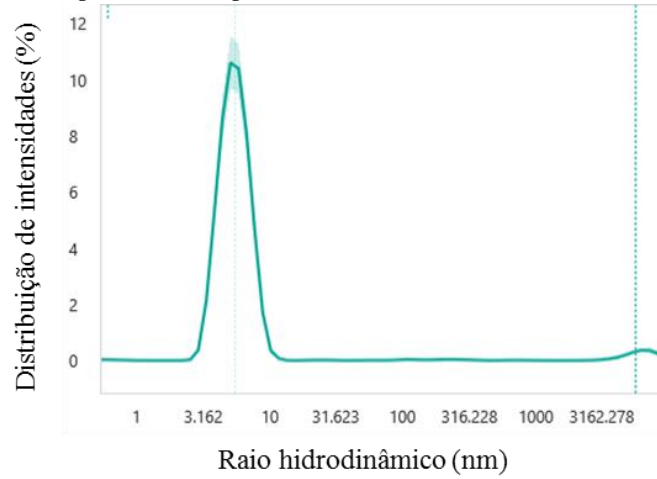


Legenda: (A) À esquerda, cromatograma de afinidade da purificação por IMAC, à direita, o gel SDS-PAGE 12% correspondente. A EhHisRS eluiu nas frações do pico 3. As impurezas destacadas com retângulo azul e aquelas abaixo das bandas da EhHisRS foram quase totalmente eliminadas possivelmente por retenção na membrana do concentrador como pode ser observado no gel em B. As raias correspondem a: S – fração solúvel total clarificada, I – fração insolúvel após clarificação, demais frações da eluição dos picos da IMAC. (B) À esquerda, cromatograma de exclusão por tamanho e, à direita, o respectivo gel SDS-PAGE 12%. A EhHisRS eluiu nas frações do pico 2. As raias correspondem às frações (0,5 mL) eluídas nos volumes de 12-14 mL. Em A e B, MM representa o marcador de massa molecular – kDa (A: 66,5; B: 55,8; C: 37,5 e D: 29,0). A absorbância em todos os casos foi monitorada em 280 nm.

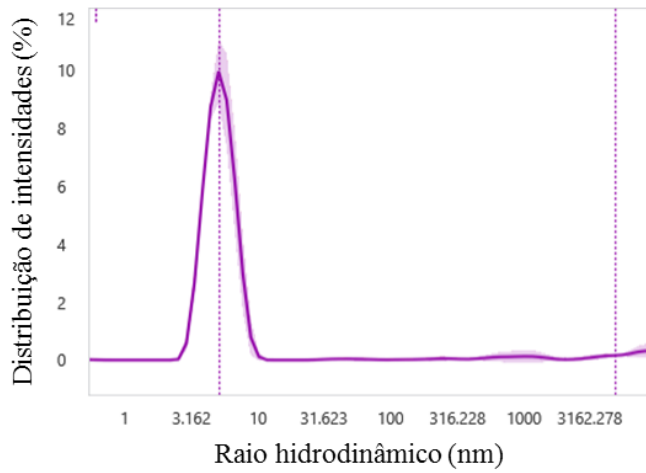
Fonte: O autor.

O grau de homogeneidade e temperatura de desnaturação térmica da EhHisRS foram avaliados por DLS e NanoDSF (Figura 31 e Figura 32, respectivamente) da fração eluída em 13 mL na SEC. A curva de distribuição de intensidades no DLS apresenta um pico principal nas três condições analisadas, além disso, os valores de PDI (Tabela 12) indicam que EhHisRS se manteve monodispersa em solução. O raio hidrodinâmico associado ao pico principal calculado a partir dos dados de DLS (Tabela 12) mostrou que houve redução do tamanho da EhHisRS complexada com os substratos em relação à forma apo, com o decréscimo mais pronunciado no caso do complexo com L-histidina.

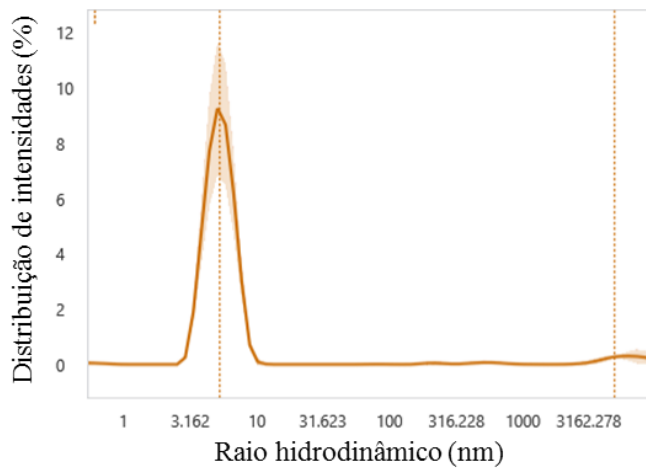
Figura 31. Curvas de DLS medidas para amostras purificadas da Histidil-tRNA Sintetase de *Ehrlichia chaffeensis*.



A



B

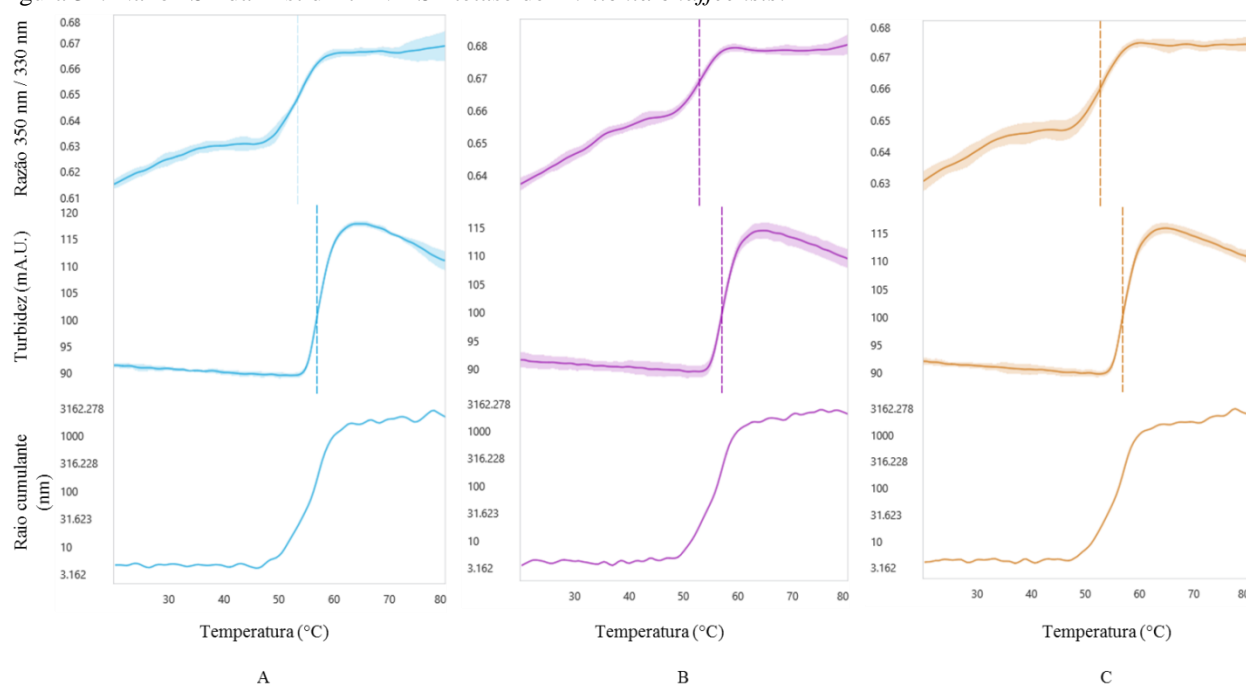


C

Legenda: Em (A), (B) e (C) são apresentadas as curvas de DLS para as amostras de EhHisRS na forma apo, em complexo com L-histidina ou ATP, respectivamente. Em todos os casos a concentração da EhHisRS foi  $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$  ( $8,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e de cada substrato foi  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ . As linhas verticais pontilhadas indicam o raio hidrodinâmico estimado pelo promograma de tratamento de dados para um determinado pico.

Fonte: O autor.

Assim como realizado para RtMetRS e AbGAPDH, amostras da EhHisRS foram analisadas por nanoDSF para caracterização da temperatura de desnaturação térmica (Figura 32). As  $T_m$  para as formas apo e em complexo com L-histidina ou ATP são resumidas na Tabela 12 e demonstram o efeito estabilizante que os substratos conferem à estrutura da EhHisRS, considerando-se o aumento de aproximadamente 11 °C da temperatura de desnaturação. Estas observações estão de acordo com a tendência encontrada em estudos de desnaturação térmica de HisRS de outros organismos, ou seja, também se observou estabilização estrutural na presença dos substratos. Para as HisRS humana e de *E. coli* as  $T_m$  das formas apo, HisRS:His e HisRS:ATP são  $51,7 \pm 0,4 / 53,4 \pm 1,1$ ,  $58,8 \pm 0,4 / 57,2 \pm 1,1$  e  $53,8 \pm 0,2 / 55,8 \pm 0,5$  °C (HsHisRS/EcHisRS), respectivamente (ABBOTT et al., 2017a; ABBOTT et al., 2017b), todas maiores que os valores correspondentes da EhHisRS. Para HisRS de *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. naiiffi*, os dados disponíveis dizem respeito às diferenças da  $T_m$  nos estados complexados e apo,  $\Delta T_m$  (para *T. brucei* é possível inferir a partir das curvas de fluorescência mostradas para as formas apo e TbHisRS:His que as  $T_m$  seriam ~47 e ~53 °C, respectivamente, TbHisRS:ATP praticamente não apresentou diferença em relação à forma apo) (MERRITT et al., 2010). A ligação da histidina nas HisRS desses tripanossomatídeos induz maior estabilidade, enquanto o ATP não o faz, exceto quando adicionado juntamente com histidina. A partir da comparação dos valores de  $\Delta T_m$ , pode-se dizer que a associação com os substratos parece ter um impacto mais significativo em EhHisRS ( $\Delta T_m$  maior) no aumento de estabilidade térmica do que o observado para as correspondentes humana e dos tripanossomatídeos. Além disso, no caso de EhHisRS, o ATP parece ter efeito estabilizante semelhante ao provocado pela histidina, situação diferente para as enzimas humana ( $\Delta T_m$  de 2 °C) e dos tripanossomatídeos ( $\Delta T_m \approx 0$ ). Esta observação poderia ter origem em alguma diferença na composição do sítio de ligação do ATP ou nas suas proximidades, como será discutido na próxima seção.

Figura 32. NanoDSF da Histidil-tRNA Sintetase de *Ehrlichia chaffeensis*.

Legenda: Em (A), (B) e (C) são apresentadas as curvas de desnaturação térmica, obtidas por NanoDSF, das amostras de EhHisRS na forma apo, em complexo com L-histidina e com ATP, respectivamente. Para cada caso, duas curvas são mostradas, uma para cada tipo de propriedade monitorada; acima, razão das fluorescências registradas em 350 nm e 330 nm, no centro, turbidez, abaixo, raio cumulante. Em todos os casos a concentração da EhHisRS foi  $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$  e de cada substrato foi  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ . As linhas pontilhadas verticais indicam o ponto de inflexão de uma determinada curva e corresponde ao valor de temperatura de desnaturação,  $T_m$ , estimado pelo programa de análise de dados para a propriedade em questão.

Fonte: O autor.

Tabela 12. Parâmetros hidrodinâmicos e temperatura de desnaturação térmica da histidil-tRNA sintetase de *Ehrlichia chaffeensis*.

|             | $R_h$ (nm) | $\sigma$ | PDI  | $\sigma$ | $T_m$ (°C)<br>RFN/Turbidez | $\sigma$  |
|-------------|------------|----------|------|----------|----------------------------|-----------|
| EhHisRS     | 5,44       | 0,03     | 0,14 | 0,01     | 41,74/56,99                | 0,32/0,02 |
| EhHisRS:His | 5,2        | 0,2      | 0,13 | 0,02     | 52,94/57,07                | 0,51/0,05 |
| EhHisRS:ATP | 5,28       | 0,05     | 0,12 | 0,01     | 52,84/56,97                | 0,35/0,04 |

Legenda: Parâmetros hidrodinâmicos e temperatura de desnaturação determinados por DLS e nanoDSF para EhHisRS apo e dos complexos com histidina ou ATP. RFN: Razão de fluorescência em 350 nm e 330 nm normalizada. O desvio padrão de cada uma das propriedades medidas é indicado pelo símbolo  $\sigma$ .

Fonte: O autor.

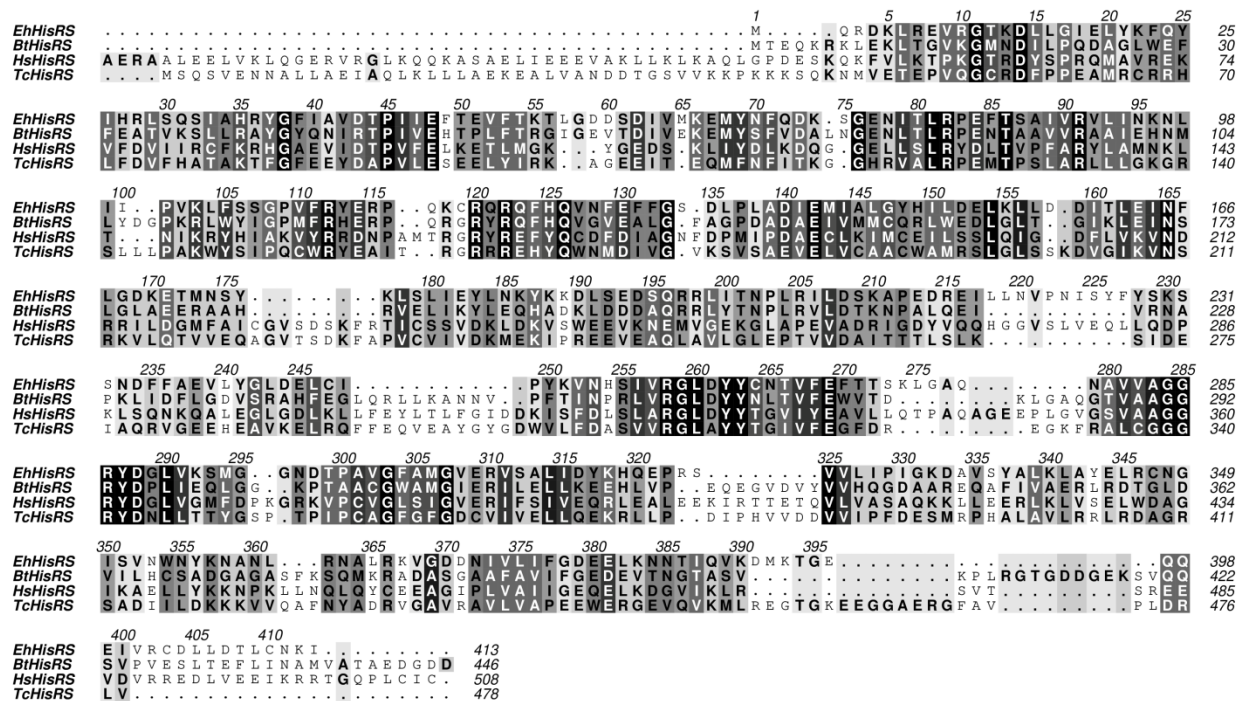
Nota-se também dos valores na tabela e das curvas da Figura 32 que a proteína sofre agregação em temperaturas ligeiramente maiores que as respectivas  $T_m$ , o que pode ser indicativo de que a desnaturação térmica seja o precursor da agregação, diferentemente do que ocorreu com RtMetRS e AbGAPDH.

### 3.4.3 Modelagem por Homologia da Estrutura da Histidil-tRNA Sintetase de *Ehrlichia chaffeensis*

Devido à solubilidade reduzida da EhHisRS não foram realizados ensaios de cristalização e ante o fato de que não se dispõe de modelo estrutural experimental dessa proteína (apenas o modelo teórico produzido por AlphaFold (JUMPER et al., 2021), acessível pelo *site* da base de dados Uniprot, sob o código de acesso Q2GHH1 - UNIPROT CONSORTIUM, 2023), decidiu-se realizar a modelagem comparativa de sua estrutura tridimensional.

O procedimento de modelagem foi executado tendo em vista a hipótese levantada na seção 3.4.2 a respeito de uma razão estrutural e/ou composicional relacionada ao sítio de ligação dos substratos que pudesse ser usada como racionalização para justificar qualitativamente os resultados de nanoDSF obtidos para EhHisRS. Assim, foram escolhidas as homólogas de *Trypanosoma cruzi* (PDBs 3HRK complexo TcHisRS:metioniladenilato), *Burkholderia thailandensis* (PDB 4E51, BtHisRS:His) e *Homo sapiens* (PDB 4PHC, HsHisRS:His) por representarem diferentes estados conformacionais de HisRS. O alinhamento de seqüências com base em estrutura tridimensional utilizado para modelagem é mostrado na Figura 33.

Figura 33. Alinhamento de seqüências utilizado na modelagem por homologia da estrutura tridimensional da histidil-tRNA sintetase de *Ehrlichia chaffeensis*.



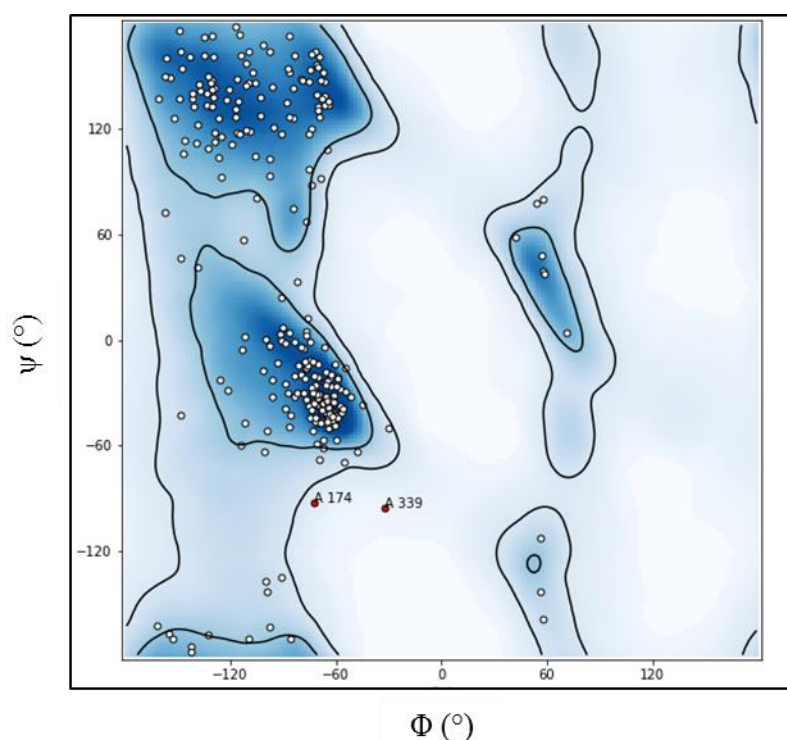
Legenda: Alinhamento produzido para a modelagem por homologia. Os códigos BtHisRS, HsHisRS e TcHisRS se referem às HisRS de *B. thailandensis*, *H. sapiens* e *T. cruzi*, respectivamente. A coloração do fundo do alinhamento foi realizada de acordo com Alscript Calcons (BARTON, 1993).

Fonte: O autor.



O modelo gerado foi validado com MOLPROBITY, que indicou desvios geométricos de alguns resíduos, então, utilizou-se o programa *phenix.model\_idealization* com o intuito de corrigir estes desvios tanto quanto possível. O modelo corrigido foi novamente avaliado com MOLPROBITY e PROCHECK. Tomando-se as regiões mais favorável e permitida do gráfico de Ramachandran (Figura 34) somadas, 99,02% dos resíduos que compõem o monômero da EhHisRS estão dentro da distribuição esperada de ângulos  $\phi$  e  $\psi$  e somente 0,98% são desviantes.

Figura 34. Gráfico de Ramachandran gerado pra o modelo do monômero da histidil-tRNA sintetase de *Ehrlichia chaffeensis*.



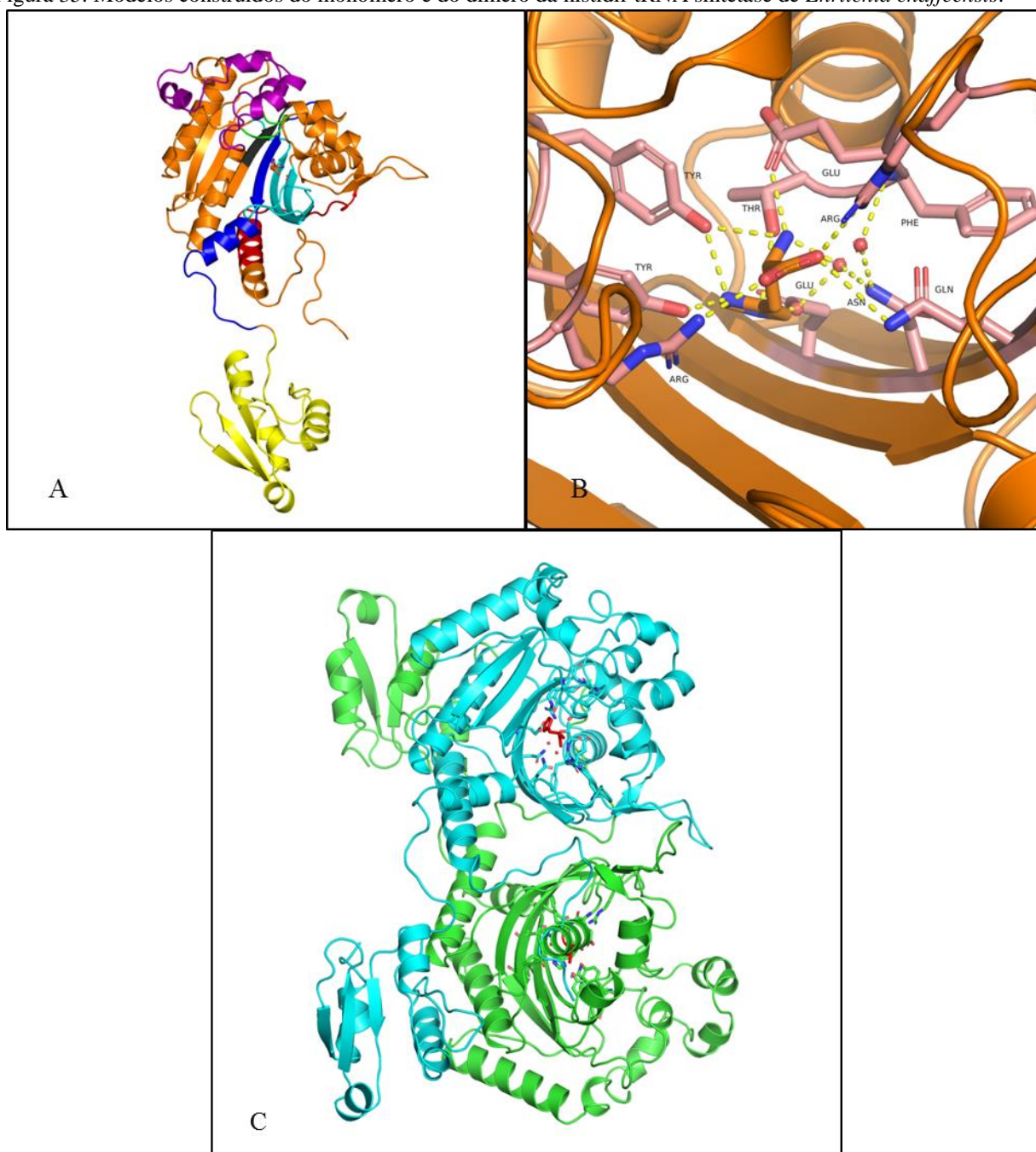
Legenda: Gráfico de Ramachandran da histidil-tRNA sintetase de *Ehrlichia chaffeensis*. A avaliação com MOLPROBITY indicou em 90,02% os resíduos que estão em regiões favoráveis, 9,00% em regiões permitidas e 0,98% em regiões proibidas.

Fonte: O autor.

Koh et al., (2014), ao analisarem a estrutura de HsHisRS, propõem que a maior estabilidade estrutural conferida pela ligação da L-histidina quando comparada à estabilidade da TcHisRS seja oriunda do maior número de ligações de hidrogênio entre a proteína e o substrato. O modelo de EhHisRS com L-histidina no sítio ativo mostra o mesmo padrão de ligações de hidrogênio da HsHisRS. Além do aminoácido, também foram modeladas duas moléculas de água próximas a ele, e uma delas possibilita uma melhor ancoragem desse substrato via ligações de hidrogênio envolvendo o grupo amino e os resíduos N128 (indiretamente via ND2 e uma molécula de água), E84, F85 (indiretamente via N e uma molécula de água), T86 e Y262. A

carboxila da histidina é mantida na sua posição por interações diretas com Q126, R112 e R258. Por fim, o resíduo Y263 e E130 fazem uma ligação de hidrogênio com o átomo ND1 e ND2 da histidina, respectivamente. Se esta rede de contatos observada no modelo de fato se estabelece em EhHisRS, ela poderia ser tomada como um fator de estabilização estrutural desta enzima e, mesmo que parcialmente, justificar o  $\Delta T_m$  obtido por nanoDSF. O monômero modelado por homologia da EhHisRS no qual são ilustradas as interações descritas acima é mostrado na Figura 35, juntamente com a rede de interações realizadas entre EhHisRS e a metionina, além do modelo do dímero obtido por sobreposição do modelo monomérico da EhHisRS aos monômeros de BtHisRS (PDB 4E51).

Figura 35. Modelos construídos do monômero e do dímero da histidil-tRNA sintetase de *Ehrlichia chaffeensis*.



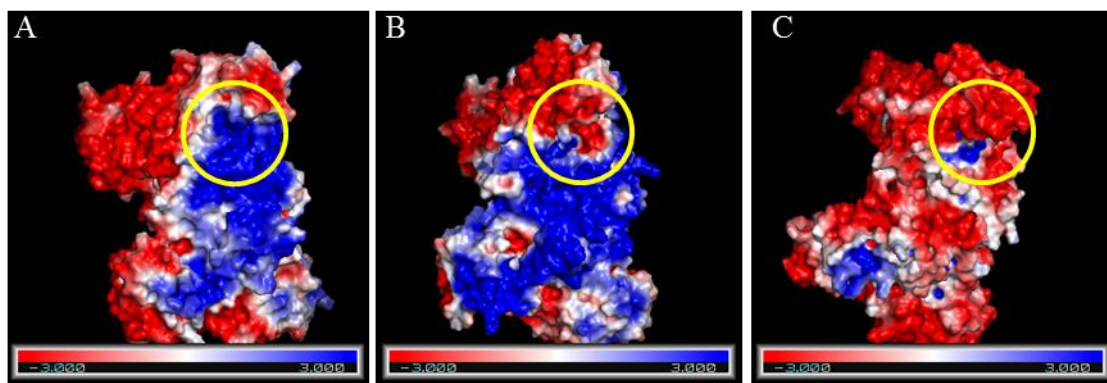
Legenda: Modelo por homologia da histidil-tRNA sintetase de *Ehrlichia chaffeensis*. (A) Monômero com a divisão em domínios da EhHisRS: em vermelho, motivo 1; em ciano, motivo 2; em verde, HisA; em cinza escuro, HisB; em roxo, inserção entre os motivos 2 e 3; em azul, motivo 3; em amarelo, domínio de ligação ao anticódon. (B) Interações da EhHisRS realizadas com o substrato histidina (modelo de bastões no centro do sítio e colorida em laranja) diretamente pelas cadeias laterais de aminoácidos ou indiretamente via moléculas de água (esferas vermelhas). (C) Modelo representativo do dímero da EhHisRS. Cada monômero apresenta o substrato histidina em modelo de bastões, bem como os resíduos interagentes como em A.

Fonte: O autor.

A partir das sobreposições e alinhamento, também pode-se esperar que o grande número de resíduos de arginina e lisina (principalmente K201, K202, R128, K18, R16, R210 K131 e R125) da EhHisRS contribuam para o potencial eletrostático positivo da região de entrada do sítio ativo e suas proximidades. De fato, o cálculo do mapa de potencial eletrostático para o

modelo gerado da EhHisRS, na conformação que seria correspondente ao complexo com L-histidina, e as homólogas citadas (Figura 36) mostrou que a superfície da referida região apresenta a seguinte ordem de potencial positivo: EhHisRS > HsHisRS > TcHisRS.

Figura 36. Superfície de potencial eletrostático da histidil-tRNA sintetase de *Ehrlichia chaffeensis* e suas homólogas.



Legenda: (A), (B) e (C) representam as superfícies de potencial eletrostático calculados com APBS (JURRUS et al., 2018) para as estruturas dos dímeros de EhHisRS, HsHisRS (PDB 4PHC) e TcHisRS (PDB 3HRK), respectivamente. Regiões demarcadas com os círculos amarelos correspondem à entrada do sítio catalítico. A cor azul denota potencial eletrostático positivo (máximo de +3 kT/e) e a cor vermelha, potencial negativo (mínimo de -3 kT/e).

Fonte: O autor.

Esta mesma relação das superfícies de potencial eletrostático também é verdadeira para o modelo gerado da conformação no estado apo. Esta ordem demonstra uma correlação positiva com a tendência observada na estabilidade térmica destas HisRSs causada pela ligação ao ATP. A hipótese que se formula aqui é a de que o maior potencial positivo do sítio ativo da EhHisRS propicie a ligação de uma molécula de ATP com maior força comparativamente às duas homólogas eucarióticas.

### 3.5 CONCLUSÕES

A expressão da enzima histidil-tRNA sintetase de *Ehrlichia chaffeensis* (EhHisRS) foi bem sucedida e com alto rendimento, entretanto, ela se concentra majoritariamente na fração insolúvel e a quantidade solúvel foi considerada insuficiente para a realização de ensaios de cristalização. Não obstante, a fração solúvel foi purificada cromatograficamente com alto grau de pureza.

EhHisRS foi analisada por DLS e NanoDSF nas suas formas apo e em complexo com os substrato histidina ou ATP. As curvas de DLS, bem com os valores de PDI das amostras obtidas nos três casos, mostraram que a enzima se mantém em solução de maneira monodispersa. Os

valores de  $T_m$  obtidos para cada estado são menores quando comparadas com algumas homólogas, no entanto, indicam que os complexos com histidina ou ATP estabilizam termicamente a EhHisRS na mesma intensidade, dado que a  $T_m$  deles é aproximadamente 11 °C maior que a da forma apo. Isto difere das homólogas (nas quais o ATP não tem um impacto tão grande no  $\Delta T_m$ ) e motivou a busca por explicação por meio de modelagem por homologia. A avaliação da superfície de potencial eletrostático do modelo indicou que o elevado potencial positivo conferido por alguns resíduos de arginina e lisina nas proximidades do sítio de ligação de ATP é maior em EhHisRS do que nas homólogas, assim, talvez contribua para maior afinidade a este substrato.

## CAPÍTULO 4 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MUTAÇÃO L53Q NA RECOMBINASE A DE *Herbaspirillum seropedicae* POR DINÂMICA MOLECULAR

### 4.1 INTRODUÇÃO

#### 4.1.1 Recombinase A de *Herbaspirillum seropedicae* (HsRecA)

A proteína RecA (Recombinase A) é integrante do sistema de reparo de DNA em muitos organismos. Ela é responsável por realizar a reação de troca entre moléculas de DNA de apenas uma fita e outra contendo fitas complementares, denominadas ssDNA e dsDNA, respectivamente. A recombinação gênica mediada pela RecA é de extrema importância em situações como o reparo recombinacional nos ramos de replicação. Quando estes ramos estagnam ou colapsam em uma região do DNA com dano ou mesmo quando o dano é sobrepujado, o processo recombinatório é requerido para que a replicação possa continuar. Além disso, a recombinação possui funções importantes que incluem a conjugação em bactérias e a recombinação meiótica em eucariotos (KOWALCZYKOWSKI et al., 1994; COX, 2007).

A estrutura tridimensional da recombinase A de vários organismos é conhecida a partir de estudos por cristalografia de difração de raios X, como *Escherichia coli* (código PDB: 2REC) (YU; EGELMAN, 1997), *Mycobacterium smegmatis* (código PDB: 1UBC) (DATTA et al., 2003), *Mycobacterium tuberculosis* (código PDB: 4OQF) (CHANDRAN et al., 2015), *Thermotoga maritima* (código PDB: 3HR8) (LEE et al., 2009), *Deinococcus radiodurans* (código PDB: 1XP8) (RAJAN; BELL, 2004), *Thermococcus kodakarensis* (código PDB: 2CVF), *Methanocaldococcus jannaschii* (código PDB: 4WIA) (MESHCHERYAKOV; WOLF, 2016), *Herbaspirillum seropedicae* (código PDB: 5JRJ) (LEITE et al., 2016), apenas para citar algumas. Entretanto, estas estruturas não apresentam moléculas de DNA, devido a dificuldades inerentes à cristalização do complexo, o que por sua vez leva a modelos nos quais importantes regiões do tipo *loop* não podem ser modeladas na densidade eletrônica devido à desordem.

A proteína RecA apresenta três domínios por monômero: um motivo N-terminal do tipo  $\alpha$ - $\beta$  (importante na formação do polímero), um domínio central do tipo  $\alpha/\beta$  ATPase, responsável pelos contatos com o substrato e onde está localizado o *loop* Walker-A (envolvido com a ligação de ATP – em *Escherichia coli*, corresponde aos resíduos 66-G/AxxxxGKT/S-73, onde x representa qualquer aminoácido), e um domínio C-terminal que pode estar envolvido em interações iniciais com dsDNA (STORY; WEBER; STEITZ, 1992; XING; BELL, 2004; SARASTE; SIBBALD; WITTINGHOFER, 1990). Convém destacar uma região importante para que a enzima RecA adote a conformação ativa, denominada MAW (*Makes ATP Work*), a qual

compreende os resíduos 42-TGSxxLDxALxxGGLxxGxIVEIY-65 em *E. coli* (CHEN; YANG; PAVLETICH, 2008).

Utilizando construções entre monômeros covalentemente ligados de RecA de *E. coli* (EcRecA – códigos PDB: 3CMU, 3CMT, 3CMV, 3CMW), Chen; Yang e Pavletich (2008) conseguiram cristalizar o complexo RecA-ssDNA/dsDNA. A partir deste estudo foi possível identificar a maneira como os nucleotídeos interagem com os *loops* (denominados L1 e L2) presentes no interior do filamento nucleoproteico. Além das interações diretas com o DNA, os autores confirmaram a presença de moléculas de ADP-AIF4 - análogo não hidrolisável do ATP capaz de induzir um estado de alta afinidade por DNA (KOWALCZYKOWSKI; KRUPP, 1995) - na interface inter monômeros e mostraram a importância dos aminoácidos envolvidos nas interações com este composto em cada monômero. A ligação de ssDNA e ATP à interface ocorre de forma cooperativa, razão pela qual o DNA é dependente da ligação de ATP.

Leite et al. (2016) descreveram a caracterização funcional e estrutural da RecA de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 (HsRecA) – uma bactéria endofítica capaz de realizar fixação de nitrogênio em condições limitantes de amônia e oxigênio. A enzima HsRecA foi cristalizada na ausência de DNA, que rendeu aos autores um modelo estrutural contendo ADP/ATP no sítio ativo, entretanto, sem prover condições para construir neste modelo as regiões dos resíduos 164-175 e 201-218, responsáveis pela interação com moléculas de DNA. A reconstrução do hexâmero por meio da aplicação das operações cristalográficas (referentes ao grupo de espaço  $P6_1$ ), correspondente a uma volta do filamento proteico ao redor de seu eixo, mostra que a HsRecA encontra-se em um estado considerado como inativo (LEITE et al., 2016). Dados até então não publicados concernentes à mutação no resíduo de leucina 53 por glutamina (L53Q) evidenciaram a completa perda de atividade hidrolítica de ATP. Além disso, sabe-se que a mutação G66A de EcRecA (G72 em HsRecA) pertencente ao loop altamente conservado, conhecido com Walker-A, também acarreta perda de atividade pela enzima (LOGAN; KNIGHT, 1993).

#### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Modelar o complexo hexamérico HsRecA-dsDNA-ATP-Mg<sup>2+</sup>;
- Simular os complexos com a proteína nativa e a mutante L53Q.

## 4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.3.1 Dinâmica Molecular da Recombinase A de *Herbaspirillum seropedicae* (HsRecA)

#### 4.3.1.1 Reconstrução dos *loops* não modelados na estrutura cristalográfica da HsRecA

Inicialmente, modelaram-se computacionalmente os *loops* que não modelados a partir do refinamento do modelo cristalográfico devido à falta de densidade eletrônica. Para isso, foi realizada modelagem por homologia utilizando-se o programa MODELLER (ŠALI; BLUNDELL, 1993) e, como moldes, as estruturas de EcRecA, cujos códigos de depósito no PDB são 3CMT e 3CMU (desta última, apenas um monômero dos 6 monômeros fusionados foi utilizado). Foram gerados 100 modelos e, dentre eles, aquele de menor energia foi escolhido com base no resultado da pontuação DOPE (*Discrete Optimized Protein Energy*) (SHEN e ŠALI, 2006).

Posteriormente, a estrutura experimental de HsRecA foi sobreposta ao modelo gerado na etapa anterior e as regiões com resíduos faltantes foram completadas manualmente, fazendo-se com que as posições atômicas das cadeias principal e lateral de cada aminoácido coincidisse com aquelas do modelo por homologia.

#### 4.3.1.2 Dinâmica molecular

Para a realização da simulação por Dinâmica Molecular, o modelo de um monômero da HsRecA gerado como descrito no item anterior foi utilizado para reconstruir um segmento do filamento proteico hexamérico, no qual cada cadeia polipeptídica interagia com uma molécula de ATP e um íon  $Mg^{2+}$  (cofator). Em seguida, uma molécula de ssDNA de composição d(T<sub>5</sub>C<sub>3</sub>AC<sub>2</sub>T<sub>4</sub>) foi adicionada ao segmento, a fim de reproduzir a conformação do estado ativo da HsRecA. Integrou-se a este complexo um modelo explícito de solvente - água, do tipo TIP3P (JORGENSEN et al., 1983) - de forma a manter uma distância mínima de 11 Å das bordas do volume do sistema. A adição destas moléculas de solvente e dos contra-íons ( $Na^+$ ) para neutralização foi realizada com o programa Leap (SCHAFMEISTER; ROSS; ROMANOVSKI, 1995), integrante do pacote computacional Amber/AmberTools (CASE et al., 2017), do qual todos os demais programas para realização e análise das dinâmicas fazem parte, somado ao programa externo MD-Task (BROWN et al., 2017).

A simulação foi conduzida utilizando-se o programa PMEMD e compreendeu as seguintes etapas: i) duas minimizações do modelo (uma com restrições posicionais fortes sobre



todos os átomos exceto aqueles do solvente e outra na qual todo o sistema foi minimizado); ii) aquecimento do sistema por 50 ps até a temperatura final de 300 K, utilizando restrições fracas; iii) uma dinâmica rápida por 50 ps; iv) uma dinâmica a pressão constante por 60 ps; e v) produção da simulação representativa a 300 K. Este procedimento foi empregado para a simulação da HsRecA selvagem e mutante L53Q. Em ambos os casos foram realizadas simulações em triplicata. Os parâmetros necessários foram obtidos dos campos de força ff14SB (MAIER et al., 2015) e OL15 (CHEATHAM; CASE, 2013) para proteína e DNA, respectivamente; de arquivos de modificação do próprio pacote Amber/AmberTools (LI; SONG; MERZ, 2015) para íons  $Mg^{2+}$  e da base de dados R.E.DD.B (DUPRADEAU et al., 2008) para o ATP.

#### 4.3.2 Redes de Contatos Dinâmicos de Aminoácidos

Com o objetivo de entender as possíveis diferenças na dinâmica da estrutura do complexo HsRecA nas trajetórias resultantes das simulações das formas nativa e mutante, foram analisadas redes de interações dinâmicas entre os aminoácidos. Para esta finalidade, utilizou-se o programa MD-TASK (BROWN et al., 2017). O procedimento consistiu em selecionar cada um dos seis monômeros do complexo em cada trajetória para os últimos 10 ns em cada caso. A decisão por não aplicar o procedimento à trajetória completa fundamenta-se no fato de que, neste caso, as variações conformacionais no início da simulação poderiam introduzir artefatos na interpretação, uma vez que ainda não há estabilidade conformacional suficiente. Foram usados os critérios padrões do programa para a construção da rede de contatos entre os aminoácidos, a saber: (i) considera-se apenas a trajetória reduzida, isto é, contendo apenas carbonos alpha e beta de cada resíduo e (ii) a distância de corte para se considerar uma interação entre dois resíduos de 7 Å. Especificamente, foi realizado o cálculo da diferença dos caminhos médios mais curtos, denominada  $\Delta L$ , para cada ponto da rede de aminoácidos que a estrutura tridimensional da modelo simulado representa. Os valores de  $\Delta L$  foram computados com o primeiro frame de cada trajetória estabelecido como o frame de referência. Em seguida, os valores de  $\Delta L$  foram tomados como a média entre os valores obtidos para cada replicata. O caminho mais curto médio para um dado resíduo é determinado através do cálculo de todos os caminhos mais curtos até o referido resíduo e dividindo-se o valor pelo número de caminhos (BROWN et al., 2017).

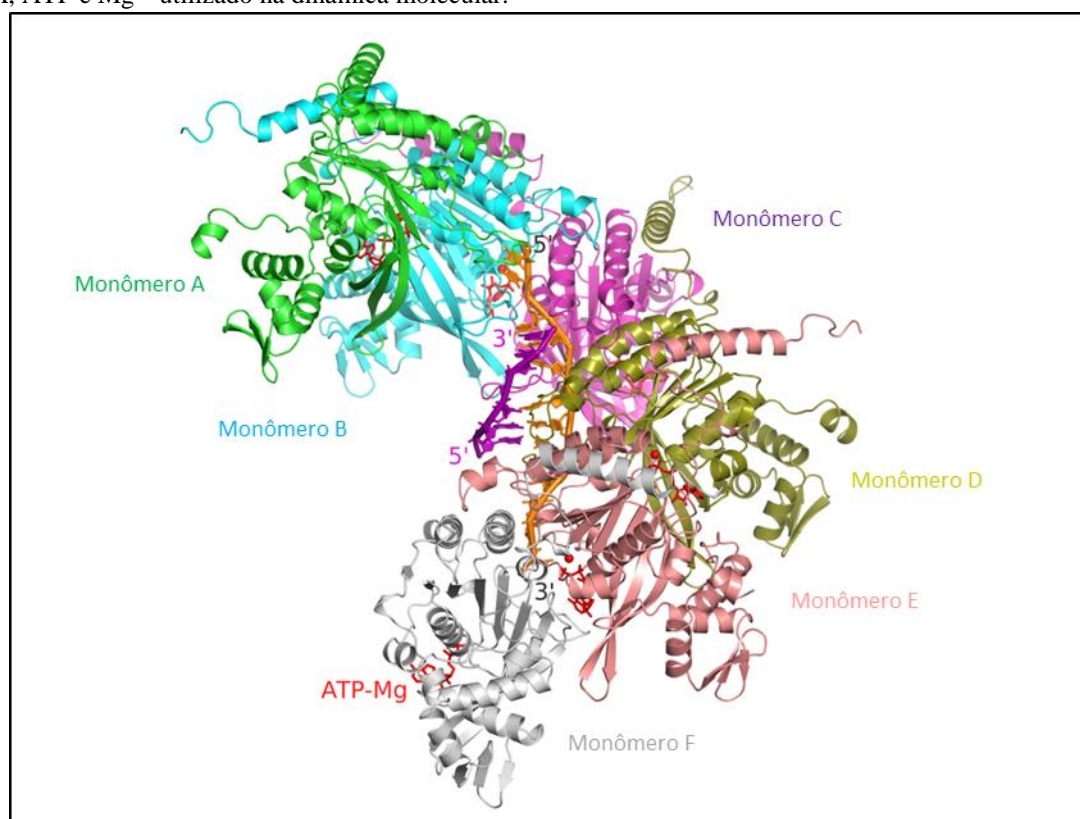
## 4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.4.1 Dinâmica Molecular da Recombinase A de *Herbaspirillum seropedicae*

#### 4.4.1.1 Mutação L53Q

O modelo do complexo HsRecA-ATP-dsDNA construído para realizar a simulação é mostrado na Figura 37. Neste caso específico, a composição corresponde à proteína tipo selvagem e o posicionamento relativo de cada monômero no hexâmero é aquele tipicamente observado para o estado estendido (ativo) do filamento nucleoprotéico.

Figura 37. Modelo completo para o hexamero da Recombinase A de *Herbaspirillum seropedicae* complexado com dsDNA, ATP e  $Mg^{2+}$  utilizado na dinâmica molecular.



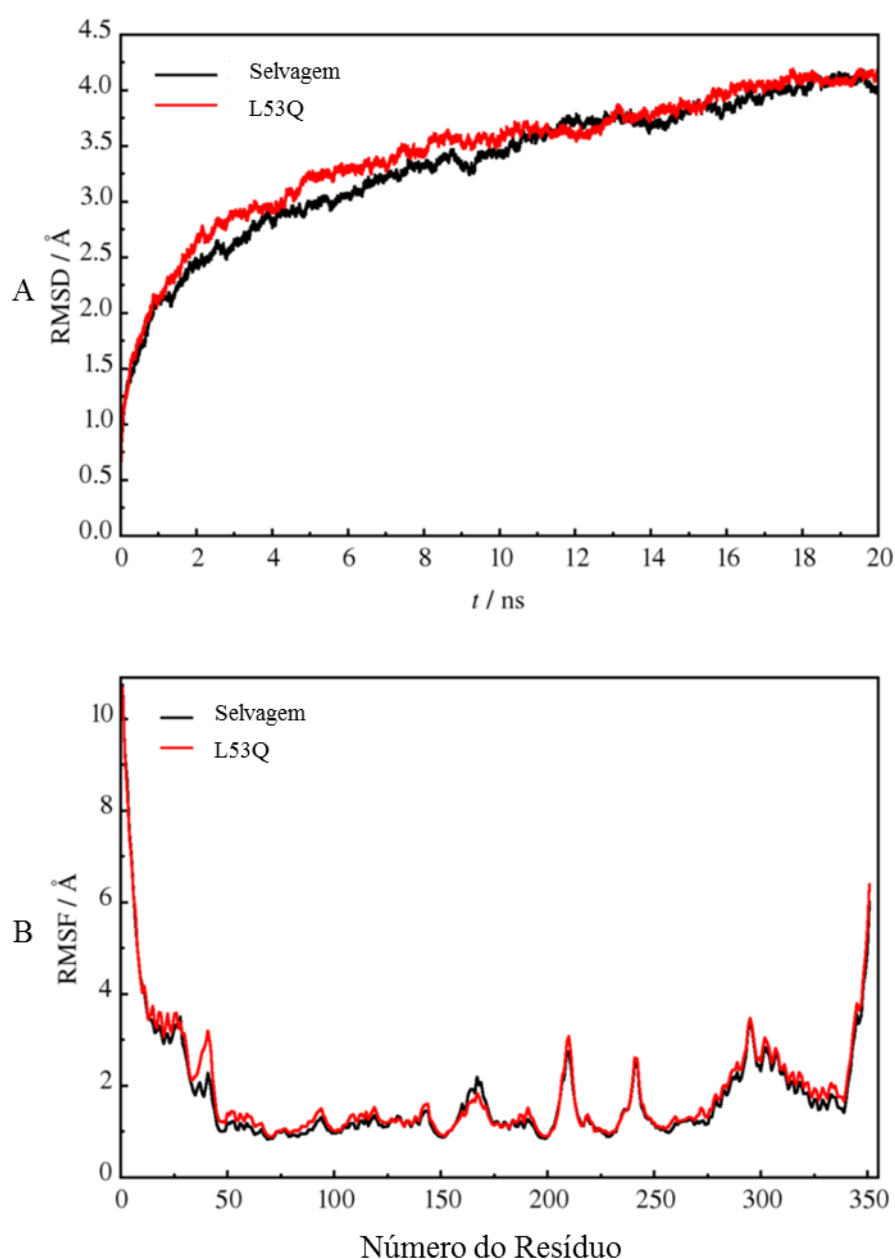
Legenda: Hexamero modelado de Recombinase A de *Herbaspirillum seropedicae* (mostrado em fita, uma cor diferente para cada monômero) contendo dsDNA (mostrado como bastões em laranja e roxo), ATP (bastões em vermelho) e íons magnésio (esferas vermelhas). Especificamente para esta figura, o modelo de composição nativa da HsRecA foi utilizado.

Fonte: O autor.

Com a finalidade de verificar se a simulação atingiu estabilidade no decorrer da trajetória, foram calculados os desvios quadráticos médios (RMSD) das coordenadas cartesianas dos  $C\alpha$ s, tomando-se como referência a estrutura inicial em cada caso. A Figura 38A traz o gráfico da comparação de RMSD entre HsRecA selvagem e L53Q (cada uma das curvas representa uma

promediação dos valores de RMSD para cada monômero e para todas as replicatas). Como se pode observar, a simulação parece atingir estabilidade a partir de 18 ns e a proximidade dos valores de RMSD indica que ambas HsRecA mutante e selvagem têm um comportamento global semelhante. A computação das flutuações dos desvios quadráticos médios (RMSF), Figura 35B, seguindo critérios de promediação semelhantes aos usados para RMSD, corroboram a concepção/hipótese de que a mutação L53Q na região MAW não implica em grandes alterações conformacionais que pudessem, por exemplo, comprometer a organização de estruturas secundária e terciária.

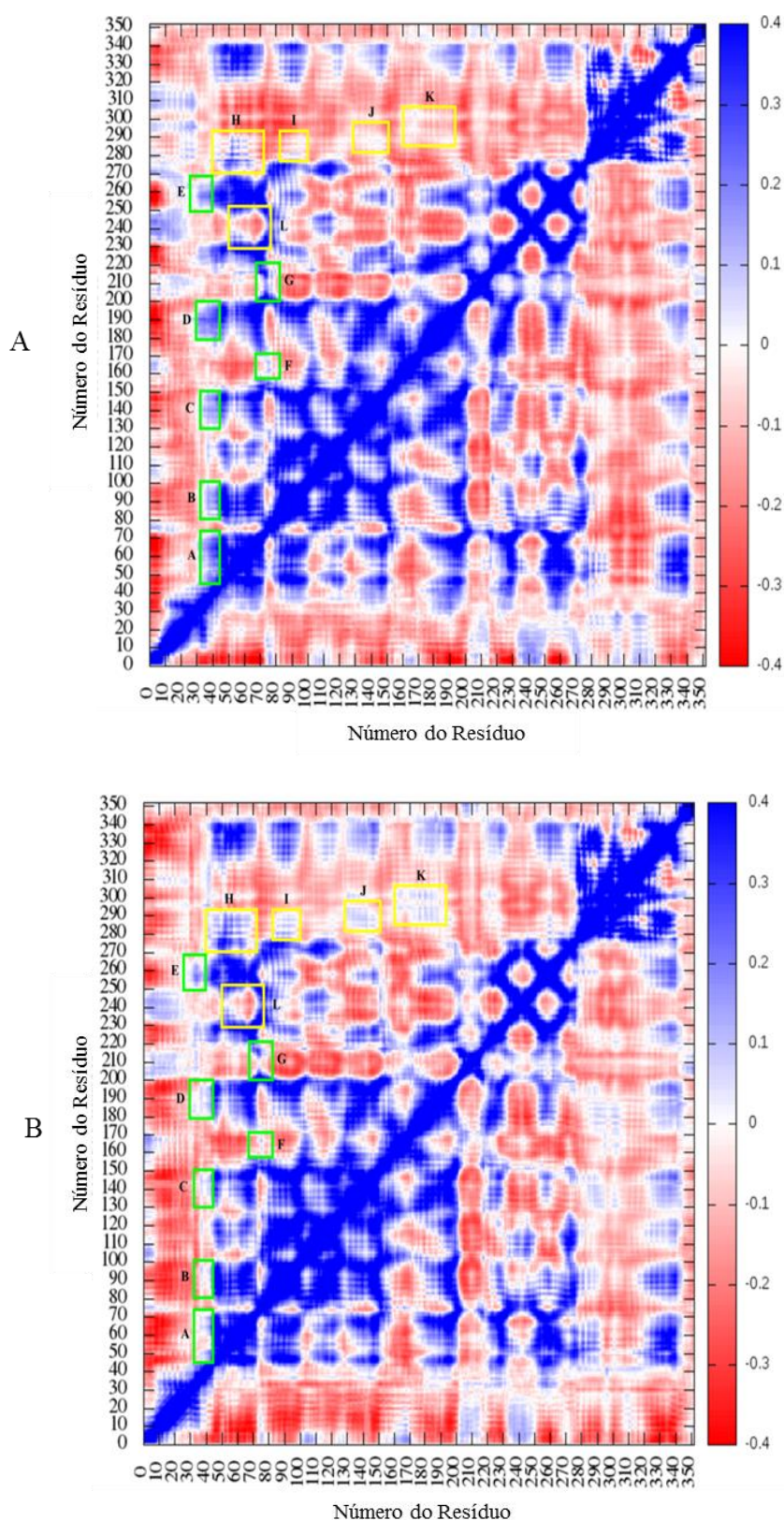
Figura 38. Resultado do cálculo do desvio quadrático médio das coordenadas atômicas (RMSD) e de flutuações quadráticas médias (RMSF) para as trajetórias do complexo nucleoproteico HsRecA-DNA selvagem e mutante L53Q.



Legenda: (A) Desvios quadráticos médios (RMSD). (B) Flutuações de desvios quadráticos médios (RMSF). As curvas em vermelho e preto são correspondentes aos dados das estruturas mutante e selvagem, respectivamente.  
Fonte: O autor.

Outro indício de que a mutação não afeta drasticamente a conformação global assumida pela proteína vem do cálculo do mapa de correlação dos resíduos intracadeia (promediados por monômero e por replicata) para ambas as estruturas selvagem e mutante (Figura 39A e Figura 39B, respectivamente). Observam-se apenas variações pequenas nas intensidades dos valores de correlação ao se comparar os mapas das duas estruturas. Ao se considerar uma situação na qual a mutação causaria grandes impactos estruturais, esperar-se-iam diferenças marcantes nos valores de correlação.

Figura 39. Correlação de movimento atômico nas estruturas nativa e mutante da Recombinase A de *Herbaspirillum seropedicae*.



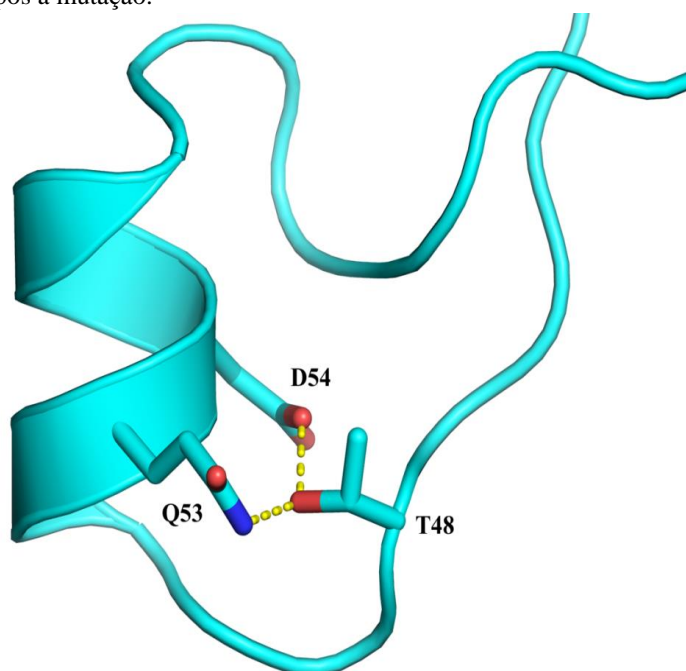
Legenda: Mapas de coeficientes de correlação para a Recombinase A de *Herbaspirillum seropedicae* selvagem e (B) mutante. As áreas destacadas com retângulos amarelos e verdes correspondem a aumentos e reduções nos valores de correlação, respectivamente, do movimento atômico. As áreas em azul denotam correlação positiva, enquanto as regiões em vermelho denotam anticorrelação de movimento atômico.

Fonte: O autor.

Algumas diferenças na correlação dos movimentos de resíduos 30-40 (envolvendo o motivo MAW) foram detectadas e destacadas com retângulos verdes, nomeados de A a E. Além disso, os resíduos E73-T78, envolvidos em contatos com ATP, os resíduos que fazem parte do sítio de ligação ao DNA, os resíduos F209 e G166 que participam do loop L2 (retângulo F) e loop L1 (retângulo G) também foram destacados. Há ainda outra característica digna de nota: o aparente início de diferenciação nos valores de correlação dinâmica na região que abarca resíduos dos intervalos 40-70 e 230-250 (retângulos amarelos, nomeados com L), os quais decrescem e mesmo se invertem (passam a apresentar anticorrelação). Por outro lado, resíduos dos domínios central (ATPase) e C-terminal (também destacados em retângulos amarelos nominados H, I, J e K) apresentaram variações positivas nos valores de correlação dinâmica.

Observou-se na maior parte do tempo da simulação (em média 86,12%) que o átomo NE (nitrogênio épsilon) do resíduo Q53 está envolvido na formação de uma ligação de hidrogênio com o resíduo T48 (via OG – oxigênio gama). Esta interação (naturalmente inexistente na proteína nativa) poderia ser responsável, ao menos parcialmente, por reduzir a intensidade de interação hidrofóbica do motivo MAW com o domínio central (*Core*). O ambiente local do resíduo Q53 é mostrado na Figura 40, na qual também procurou-se destacar a ligação de hidrogênio (esta, presente também na estrutura selvagem) formada entre os resíduos D54 e T48.

Figura 40. Ambiente local do resíduo 53 com destaque para as ligações de hidrogênio (pontilhados amarelos) formadas no motivo MAW após a mutação.



Legenda: Ambiente local do resíduo Q53 no motivo MAW com destaque para as interações através de ligações de hidrogênio realizadas diretamente com o resíduo T48 (inexistente na estrutura selvagem) e, indiretamente, com o resíduo D54 na estrutura da RecA mutante.

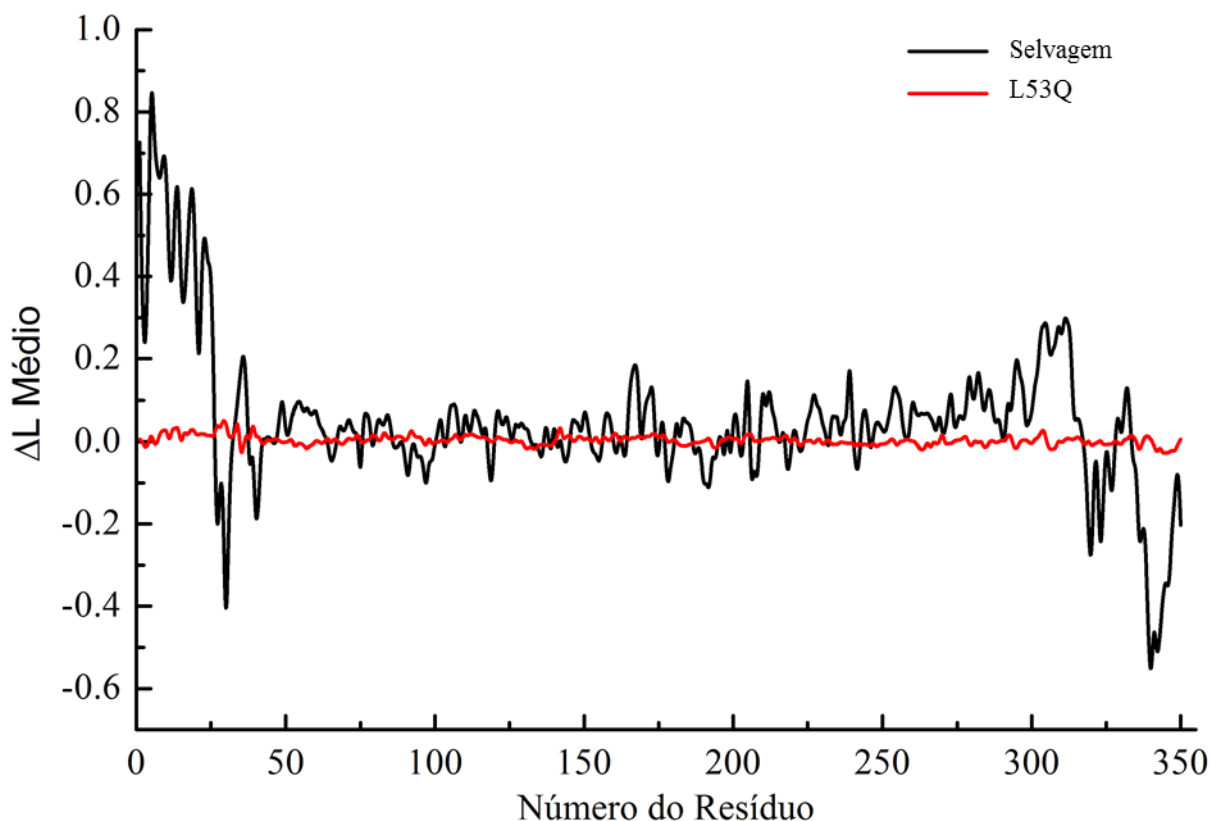
Fonte: O autor.



A importância de regiões hidrofóbicas para a estabilidade de proteínas, seja após enovelamento ou ainda no processo de consolidação de suas superestruturas, é bastante discutida na literatura. Observa-se que mutações em domínios hidrofóbicos, as quais envolvem substituições por resíduos polares, afetam a competência catalítica plena de enzimas (LIM et al., 1992; HARIRINA et al., 2008). Em outros casos, nos quais não há envolvimento de núcleos hidrofóbicos, mesmo mutações conservativas podem alterar a dinâmica de uma reação catalisada por enzima ao introduzirem perturbações na comunicação alostérica em sua estrutura (DOSHI et al., 2016). Especificamente em relação à RecA de *E. coli*, há relatos de que algumas mutações podem afetar sua atividade de forma parcial sem que ocorram alterações conformacionais dramáticas. Neste caso, a mutação G160N não compromete a capacidade de hidrolisar ATP e de se ligar ao substrato DNA, entretanto, incapacita a reação de troca de fitas. Embora não exista informação acerca do real papel do resíduo L53 em HsRecA (e nem dos equivalentes em RecA de outros organismos), a sua substituição por um resíduo polar como glutamina, na medida que supostamente enfraquece a interação hidrofóbica com o domínio ATPase central, poderia ser responsável pela alteração na maneira pela qual a sinalização alostérica se estabelece. Esta hipótese é concordante com a observação feita por Doshi et al., 2016, de que a comunicação a longo alcance dentro de um monômero ocorre principalmente por mediação de resíduos hidrofóbicos.

A fim de detectar alterações nos caminhos de comunicação dentro dos monômeros selvagem e mutante da HsRecA, foram calculados os caminhos mais curtos de interação em redes de contatos de aminoácidos em cada estrutura. Os resultados dos caminhos mais curtos médios por resíduo para todas as replicatas são mostrados na Figura 41. Novamente, pode-se perceber que não há grandes alterações na forma como os resíduos transmitem informações uns aos outros, tendo em vista a semelhança entre as curvas. Para realçar a diferença existente, foram postas em gráfico as diferenças médias nos caminhos mais curtos usando como referência o *frame* inicial de cada porção da trajetória analisada para HsRecA selvagem e mutante. Estas observações talvez possam ser tomadas como a razão pela qual as flutuações de RMS (Figura 38) ocorrem, isto é, a estrutura portadora da mutação apresenta um ligeiro aumento na flexibilidade global (maior RMSF médio) devido à maior dispersão dos contatos entre aminoácidos.

Figura 41. Diferença média dos caminhos mais curtos de interação entre aminoácidos calculada como a média entre  $\Delta L$  de cada replicata da trajetória para o complexo nucleoproteico HsRecA-DNA de composição selvagem e mutante L53Q.



Legenda: Diferença média dos caminhos mais curtos de interação entre aminoácidos. –  $\Delta L$  – para a HsRecA selvagem (linha em preto) e L53Q (linha em vermelho).

Fonte: O autor.

Os resultados aqui reportados foram publicados (LEITE et al., 2019) e a primeira página desta publicação foi reproduzida no Apêndice A.

#### 4.5 CONCLUSÕES

Os resultados do estudo computacional por dinâmica molecular do complexo da Recombinase A de *Herbaspirillum seropedicae* com dsDNA (HsRecA-DNA) indicam, qualitativamente, que a mutação L53Q não afeta a região Walker A e, conseqüentemente, sua capacidade de se ligar ao ATP. A ligação de hidrogênio extra no motivo MAW poderia interferir na capacidade de realizar a reação de troca de fitas (que é dependente de hidrólise de ATP) ao modificar a maneira pela qual a informação da presença do DNA no seu sítio de ligação é repassada a outras regiões de um monômero (e provavelmente com reflexos na comunicação intermonomérica). Convém destacar que estes resultados foram acrescentados aos resultados experimentais de colaboradores e já se encontram publicados (LEITE et al., 2019).



## REFERÊNCIAS

- ABBOTT, J. A.; GUTH, E.; KIM, C.; REGAN, C.; SIU, V. M.; RUPAR, C. A.; DEMELER, B.; FRANCKLYN, C. S.; ROBEY-BOND, S. M. The Usher Syndrome Type IIIB Histidyl-tRNA Synthetase Mutation Confers Temperature Sensitivity. **Biochemistry**, v. 56, n. 28, p. 3619-3631, 2017b.
- ABBOTT, J. A.; LIVINGSTON, N. M.; EGRI, S. B.; GUTH, E.; FRANCKLYN, C. S. Characterization of aminoacyl-tRNA synthetase stability and substrate interaction by differential scanning fluorimetry. **Methods**, v. 113, p. 64-71, 2017.
- ABERG, A.; YAREMCHUK, A.; TUKALO, M.; RASMUSSEN, B.; CUSACK, S. Crystal structure analysis of the activation of histidine by *Thermus thermophilus* histidyl-tRNA synthetase. **Biochemistry**, v. 36, n.11, p. 3084-3094, 1997.
- AFONINE, P. V.; MORIARTY, N. W.; MUSTYAKIMOV, M.; SOBOLEV, O. V.; TERWILLIGER, T. C.; TURK, D.; URZHUMTSEV, A.; ADAMS, P. D. FEM: feature-enhanced map. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 71, n. Pt 3, p. 646-666, 2015.
- ALEXANDROV, A.; VIGNALI, M.; LACOUNT, D. J.; QUARTLEY, E.; DE VRIES, C.; DE ROSA, D.; BABULSKI, J.; MITCHELL, S. F.; SCHOENFELD, L. W.; FIELDS, S.; HOL, W. G.; DUMONT, M. E.; PHIZICKY, E. M.; GRAYHACK, E. **J. Mol. Cell. Proteomics**, v. 3, p. 934-938, 2004.
- ALRAHMANY, D.; OMAR, A. F.; ALREESI, A.; HARB, G.; GHAZI, I. M. *Acinetobacter baumannii* Infection-Related Mortality in Hospitalized Patients: Risk Factors and Potential Targets for Clinical and Antimicrobial Stewardship Interventions. **Antibiotics (Basel)**, v. 11, n. 8, p. 1-10, 2022.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ASHKENAZY, H.; ABADI, S.; MARTZ, E.; CHAY, O.; MAYROSE, I.; PUPKO, T.; BENTAL, N. ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W344-W350, 2016.
- BARLOW, D. J.; THORNTON, J. M. Ion-pairs in proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 168, n. 4, p. 867-885, 1983.
- BARTON, G. J. Alscript: A tool to format multiple sequence alignments. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 6, n. 1, p. 37-40, 1993.
- BEUNING, P. J.; MUSIER-FORSYTH, K. Hydrolytic editing by a class II aminoacyl-tRNA synthetase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 97, p.8916-8920, 2000.
- BELL, C. E. Structure and mechanism of *Escherichia coli* RecA ATPase. **Molecular Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 358-366, 2005.

BLANTON, L. S. The Rickettsioses: A Practical Update. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n.1, p.213-229, 2019.

BOND, C. S.; SCHÜTTELKOPF, A. W. ALINE: A WYSIWYG protein-sequence alignment editor for publication-quality alignments. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 65, n. 5, p. 510–512, 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BROWN, D.; PENKLER, D. L.; AMAMUDDY, O. S.; ROSS, C.; ATILGAN, A. R.; ATILGAN, C.; BISHOP, O. T. MD-TASK: a software suite for analyzing molecular dynamics trajectories. **Bioinformatics**, v.33, n. 17, p. 2768–2771, 2017.

BROWN, J. R.; GENTRY, D.; BECKER, J. A.; INGRAHAM, K.; HOLMES, D. J.; STANHOPE, M. J. Horizontal transfer of drug-resistant aminoacyl-transfer-RNA synthetases of anthrax and Gram-positive pathogens. **Embo Reports**, v. 4, n. 7, p. 692-698, 2003.

CASE, D.A.; BERRYMAN, J.T.; BETZ, R.M.; CERUTTI, D.S.; CHEATHAM, T.E.; III, DARDEN, T.A.; DUKE, R.E.; GIESE, T.J.; GOHLKE, H.; GOETZ, A.W.; HOMEYER, N.; IZADI, S.; JANOWSKI, P.; KAUS, J.; KOVALENKO, A.; LEE, T.S.; LEGRAND, S.; LI, P.; LUCHKO, T.; LUO, R.; MADEJ, B.; MERZ, K.M.; MONARD, G.; NEEDHAM, P.; NGUYEN, H.; NGUYEN, H.T.; OMELIAN, I.; ONUFRIEV, A.; ROE, D.R.; ROITBERG, A.; SALOMON-FERRER, R.; SIMMERLING, C.L.; SMITH, W.; SWAILS, J.; WALKER, R.C.; WANG, J.; WOLF, R.M.; WU, X.; YORK, D.M.; KOLLMAN, P.A. Amber 2017, University of California, San Francisco, 2017.

CHAN, Y. G.; RILEY, S. P.; MARTINEZ, J. J. Adherence to and invasion of host cells by spotted fever group Rickettsia species. **Frontiers in Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2010.

CHANDRAN, A.V.; PRABU, J.R.; NAUTIYAL, A.; PATIL, K.N.; MUNIYAPPA, K.; VIJAYAN, M. Structural studies on *Mycobacterium tuberculosis* RecA: molecular plasticity and interspecies variability. **J. Biosci.**, v. 40, p. 13, 2015.

CHEATHAM, T. E. III; CASE, D. A. Twenty-five years of nucleic acid simulations. **Biopolymers**, v. 99, p. 969-977, 2013.

CHEN, V. B.; BRYAN, W. A.; HEADD, D. A.; KEEDY, M. A.; IMMORMINO, M, R.; KAPRAL, G. J.; MURRAY, J. S.; RICHARDSON, D. C. MolProbity: all atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 66, n. Pt1, p. 12-21, 2010.

CHEN, Z.; YANG, H.; PAVLETICH, N. P. Mechanism of homologous recombination from the RecA–ssDNA/dsDNA structures. **Nature**, v. 453, p. 489-494, 2008.

COHEN, S. X.; BEN, JELLOUL, M.; LONG, F.; VAGIN, A.; KNIPSCHIEER, P.; LEBBINK, J.; SIXMA, T. K.; LAMZIN, V. S.; MURSHUDOV, G. N.; PERRAKIS, A. ARP/wARP and

molecular replacement: the next generation. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**. v. 64, n. Pt 1, p. 49-60, 2008.

COX, M. M. Motoring along with the bacterial RecA protein. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v. 8, n. 2, p. 127-138, 2007.

CREPIN, T.; SCHMITT, E.; BLANQUET, S.; MECHULAM, Y. Three-dimensional structure of methionyl-tRNA synthetase from *Pyrococcus abyssi*. **Biochemistry**. v. 43, n. 9, p. 2635-2644, 2004.

CROWTHER, G. J.; HE, P.; RODENBOUGH, P. P.; THOMAS, A. P.; KOVZUN, K. V.; LEIBLY, D. J.; BHANDARI, J.; CASTANEDA, L. J.; HOL, W. G. J.; GELB, M. H.; NAPULI, A. J.; VAN VOORHIS, W. C. Use of thermal melt curves to assess the quality of enzyme preparations. **Analytical Biochemistry**, v. 399, p. 268-275, 2010.

DATTA, S.; KRISHNA, R.; GANESH, N.; CHANDRA, N. R.; MUNIYAPPA, K.; VIJAYAN, M. Crystal structures of *Mycobacterium smegmatis* RecA and its nucleotide complexes. **J. Bacteriol.**, v. 185, p. 4280, 2003.

DeLANO, W. L. PyMOL: An open-source molecular graphics tool. **CCP4 Newsletter on Protein Crystallography**, v. 40, p. 82-92, 2002.

DELARUE, M.; MORAS, D. The aminoacyl-tRNA synthetase family: Modules at work. **Bioessays**, v. 15, p. 675-687, 1993.

DENIZIAK, M. A.; BARCISZEWSKI, J. Methionyl-tRNA synthetase. **Acta Biochimica Polonica**, v. 48, n. 2, p. 337-350, 2001.

DIDIERJEAN, C.; CORBIER, C.; FATIH, M.; FAVIER, F.; BOSCHI-MULLER, S.; BRANLANT, G.; AUBRY, A. Crystal structure of two ternary complexes of phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* with NAD and D-glyceraldehyde 3-phosphate. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 15, p. 12968-12976, 2003.

DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A.; SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals: Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nature Reviews Microbiology**. v. 5, p. 939-951, 2007.

DIOP, A.; RAOULT, D.; FOURNIER, P. Rickettsial genomics and the paradigm of genome reduction associated with increased virulence. **Microbes and Infection**, v. 20, n.7-8, p. 401-409, 2018.

DOSHI, U.; HOLLIDAY, M.J.; EISENMESSER, E.Z.; HAMELBERG, D. Dynamical network of residue-residue contacts reveals coupled allosteric effects in recognition, catalysis, and mutation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 113, 4735-4740, 2016.

DUPRADEAU, F.-Y.; CEZARD, C.; LELONG, R.; STANISLAWIAK, E.; PECHER, J.; DELEPINE, J. C.; CIEPLAK, P. R.E.DD.B.: a database for RESP and ESP charge values and force field libraries, **Nucl. Acids Res.** v.36, p. D360-D367, 2008.

EL KARKOURI, K.; KOWALCZEWSKA, M.; ARMSTRONG, N.; AZZA, S.; FOURNIER, P.; RAOULT, D. Multi-omics Analysis Sheds Light on the Evolution and the Intracellular Lifestyle Strategies of Spotted Fever Group Rickettsia spp. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 1363, p. 1-16, 2017.

EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: Model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. D60, n. Pt 12, p. 2126–2132, 2004.

EVANS, P. R.; MURSHUDOV, G. N. How good are my data and what is the resolution? **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. D69, n. 7, p. 1204–1214, 2013.

FERSHT, A. R. Dissection of the structure and activity of the tyrosyl-tRNA synthetase by site-directed mutagenesis. **Biochemistry**, v.26, p. 8031-8037, 1987.

FERSHT, A. R.; SHI, J.; KNILL-JONES, J.; LOWE, D. M.; WILKINSON, A. J.; BLOW, D. M.; BRICK, P.; CARTER, P.; WAYE, M. M. Y.; WINTER, W. Hydrogen bonding and biological specificity analysed by protein engineering. **Nature**, v. 314, p. 235-238, 1985.

GASTEIGER E., HOOGLAND C., GATTIKER A., DUVAUD S., WILKINS M.R., APPEL R.D., BAIROCH A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press, p. 571-607, 2005.

FILLINGER, S.; BOSCHI-MULLER, S.; AZZA, S.; DERVYN, E.; BRANLANT, G.; AYMERICH, S. Two glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases with opposite physiological roles in a nonphotosynthetic bacterium. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 19, p. 14031-14037, 2000.

FRANCKLYN, C.; ARNEZ, J. Histidyl-tRNA Synthetases. In: IBBA, M.; FRANCKLYN, C.; CUSACK, S. The aminoacyl-tRNA synthetase. Georgetown, Landes Bioscience/Eureka.com, 2005, p. 135-148.

GENTRY, D. R.; INGRAHAM, K. A.; STANHOPE, M. J.; RITTENHOUSE, S.; JARVEST, R. L.; O'HANLON, P. J.; BROWN, J. R.; HOLMES, D. J. Variable sensitivity to bacterial methionyl-tRNA synthetase inhibitors reveals subpopulations of *Streptococcus pneumoniae* with two distinct methionyl-tRNA synthetase genes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, n. 6, p. 1784-1789, 2003.

GERRATANA, B; FREY, P. A.; CLELAND, W. W. Characterization of the transition-state structure of the reaction of kanamycin nucleotidyltransferase by heavy-atom kinetic isotope effects. **Biochemistry**, v. 40, p. 2972-2977, 2001.

GILLESPIE, J. J.; AMMERMAN, N. C.; BEIER-SEXTON, M.; SOBRAL, B. S.; AZAD, A. F. Louse- and flea-borne rickettsioses: biological and genomic analyses, **Veterinary Research**, v. 40, n. 2, p.1-13, 2009.

GOLUB, N.; MEREMYANIN, A.; MARKOSSIAN, K.; ERONINA, T.; CHEBOTAREVA, N.; ASRYANTS, R.; MURONETS, V.; KURGANOV, B. Evidence for the formation of start aggregates as an initial stage of protein aggregation. **FEBS Letters**, v. 581, n. 22, p. 4223-4227, 2007.

GUTH, E.; FARRIS, M.; BOVEE, M.; FRANCKLYN, C. S. Asymmetric amino acid activation by class II histidyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 3, p. 20753-20762, 2009.

HARIRINIA, A.; VERMA, R.; PUROHIT, N.; TWAROG, M.Z.; DESHAIES, R.J.; BOLON, D.; FUSHMAN, D. Mutations in the Hydrophobic Core of Ubiquitin Differentially Affect Its Recognition by Receptor Proteins. **Journal of Molecular Biology**, 375, 979–996, 2008.

HAVRYLENKO, S.; LEGOUIS, R.; NEGRUTSKII, B.; MIRANDE, M. Methionyl-tRNA synthetase from *Caenorhabditis elegans*: a specific multidomain organization for convergent functional evolution. **Protein Science**, v. 19, n. 12, p. 2475-2484, 2010.

HAWKO, S. A.; FRANCKLYN, C. S. Covariation of a specificity-determining structural motif in an aminoacyl-tRNA synthetase and a tRNA identity element. **Biochemistry**, v. 40, n. 7, p. 1930-1936, 2001.

HENDERSON, B.; MARTIN, A. Bacterial virulence in the moonlight: multitasking bacterial moonlighting proteins are virulence determinants in infectious disease. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 9, p. 3476-3491, 2011.

HO, J. M.; BAKKALBASI, E.; SÖLL, D.; MILLER, C. A. Drugging tRNA aminoacylation. **RNA Biology**, v. 15, p. 667-677, 2018.

HOWARD, A.; O'DONOGHUE, M.; FEENEY, A.; SLEATOR, R. D. *Acinetobacter baumannii* an emerging opportunistic pathogen. **Virulence**, v. 3, p. 243-250, 2012.

HU, Y.; PALMER, S. O.; ROBLES, S. T.; RESTO, T.; DEAN, F. D.; BULLARD, J. M. Identification of Chemical Compounds That Inhibit the Function of Histidyl-tRNA Synthetase from *Pseudomonas aeruginosa*. **SLAS Discovery**, v. 23, p. 65-75, 2018

HURDLE, J. G.; O'NEILL, A. J.; CHOPRA, I. Prospects for Aminoacyl-tRNA Synthetase Inhibitors as New Antimicrobial Agents. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 49, p. 4821-4833, 2005.

INGVARSSON, H.; UNGE, T. Flexibility and communication within the structure of the *Mycobacterium smegmatis* methionyl-tRNA synthetase. **The FEBS Journal**, v. 277, n. 19, p. 3947-3962, 2010.

JOHNSON, M.; ZARETSKAYA, I.; RAYTSELIS, Y.; MEREZHUK, Y.; MCGINNIS, S.; MADDEN, T. L. NCBI BLAST: a better web interface. **Nucleic Acids Research**. v. 36 (Web Server issue), p. W5-W9, 2008.

JORGENSEN, W. L.; CHANDRASEKHAR, J.; MADURA, J.; IMPEY, R. W.; KLEIN, M. L. Comparison of simple potential function for simulating liquid water. **Journal of Chemical Physics**, v. 79, p. 926-935, 1983.

JUMPER, J.; EVANS, R.; PRITZEL, A.; GREEN, T.; FIGURNOV, M.; RONNEBERGER, O.; TUNYASUVUNAKOOL, K.; BATES, R.; ŽÍDEK, A.; POTAPENKO, A.; BRIDGLAND, A.; MEYER, C.; KOHL, SAA.; BALLARD, AJ.; COWIE, A.; ROMERA-PAREDES, B.;

NIKOLOV, S.; JAIN, R.; ADLER, J.; BACK, T.; PETERSEN, S.; REIMAN, D.; CLANCY, E.; ZIELINSKI, M.; STEINEGGER, M.; PACHOLSKA, M.; BERGHAMMER, T.; BODENSTEIN, S.; SILVER, D.; VINYALS, O.; SENIOR, AW.; KAVUKCUOGLU, K.; KOHLI, P.; HASSABIS, D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, v. 596, n. 7873, p. 583-589, 2021.

JURRUS, E.; ENGEL, D.; STAR, K.; MONSON, K.; BRANDI, J.; FELBERG, L. E.; BROOKES, D. H.; WILSON, L.; CHEN, J.; LILES, K.; CHUN, M.; LI, P.; GOHARA, D. W.; DOLINSKY, T.; KONECNY, R.; KOES, D. R.; NIELSEN, J. E.; HEAD-GORDON, T.; GENG, W.; KRASNY, R.; WEI, G. W.; HOLST, M. J.; MCCAMMON, J. A.; BAKER, N. A. Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. **Protein Science**, v. 27, n. 1, p. 112-128, 2018.

KABSCH, W.; SANDER, C. Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. **Biopolymers**, v. 22, n. 12, p. 2577-2637, 1983.

KIM, S.; LEE, S. W.; CHOI, E. C.; CHOI, S. Y. Aminoacyl-tRNA synthetases and their inhibitors as a novel family of antibiotics. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 61, p. 278-288, 2003.

KLEYWEGT, G. J.; JONES, T. A. xdIMAPMAN and xdIDATAMAN - programs for reformatting, analysis and manipulation of biomacromolecular electron-density maps and reflection data sets. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 52, n. Pt4, p. 826-828, 1996.

KNOOP, F. C. Murine (Endemic) Typhus. In: **Reference Module in Biomedical Sciences**. Elsevier; 2014. p. 1-3.

KOH, C.Y.; KIM, J. E.; SHIBATA, S.; RANADE, R. M.; YU, M.; LIU, J.; GILLESPIE, J. R.; BUCKNER, F. S.; VERLINDE, C. L.; FAN, E.; HOL, W. G. Distinct states of methionyl-tRNA synthetase indicate inhibitor binding by conformational selection. **Structure**, v. 20, n.10, p. 1681-1691, 2012.

KOH, C. Y.; WETZEL, A. B.; DE VAN DER SCHUEREN, W. J.; HOL, W. G. Comparison of histidine recognition in human and trypanosomatid histidyl-tRNA synthetases. **Biochimie**, v. 106p. 111-120, 2014.

KORNDÖRFER, I.; STEIPE, B.; HUBER, R.; TOMSCHY, A.; JAENICKE, R. The crystal structure of holo-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* at 2.5 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 246, n.4, p. 511-521, 1995.

KOWALCZYKOWSKI, S. C.; DIXON, D. A.; EGGLESTON, A. K.; LAUDER, S. D.; REHRAUER, W.M. Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. **Microbiol. Rev.**, v. 58, p. 401-465, 1994.

KOWALCZYKOWSKI, S. C.; KRUPP, R. A. DNA-strand exchange promoted by RecA protein in the absence of ATP: Implications for the mechanism of energy transduction in protein-promoted nucleic acid transactions. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 92, n. 8, p. 3478-3482, 1995.

KRISSINEL, E. Enhanced fold recognition using efficient short fragment clustering. **Journal of Molecular Biochemistry**, v. 1, n. 2, p. 76-85, 2012.

KRISSINEL, E.; HENRICK, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. **Journal of Molecular Biology**, v. 372, n. 3, p. 774-797, 2007.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680 – 685, 1970.

LARSON, E. T.; KIM, J. E.; ZUCKER, F. H.; KELLEY, A.; MUELLER, N.; NAPULI, A. J.; VERLINDE, C. L.; FAN, E.; BUCKNER, F. S.; VAN VOORHIS, W. C, MERRITT, E. A, HOL, W. G. Structure of *Leishmania major* methionyl-tRNA synthetase in complex with intermediate products methionyladenylate and pyrophosphate. **Biochimie**, v. 93, n. 3, p. 570-582, 2011.

LASKOWSKI, R. A.; JABŁOŃSKA, J.; PRAVDA, L.; VAŘEKOVÁ, R. S.; THORNTON, J.M. PDBsum: structural summaries of PDB entries. **Protein Science**, v. 27, n. 1, p. 129-134, 2018.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283-291, 1993.

LEE, S.; KIM, T. G.; KU, J. K.; BAN, C. Crystal structure of ReA protein from *Thermotoga maritima* MSB8.

LEITE, W. C.; GALVÃO, C. W.; SAAB, S. C.; IULEK, J; ETTO, R. M.; STEFFENS, M. B. R.; CHITTENI-PATTU, S.; STANAGE, T.; KECK, J. L.; COX, M. M. Structural and Functional Studies of *H. seropedicae* RecA Protein – Insights into the Polymerization of RecA Protein as Nucleoprotein Filament. **PloS ONE**, v. 11, n. 7, p. 1-25, 2016.

LEITE, W. C.; PENTEADO, R. F.; GOMES, F.; IULEK, J.; ETTO, R. M.; SAAB, S. C.; STEFFENS, M. B. R.; GALVÃO, C. W. MAW point mutation impairs *H. seropedicae* RecA ATP hydrolysis and DNA repair without inducing large conformational changes in its structure. **PLoS ONE**, v. 14, p. 1-19, 2019.

LIEBSCHNER, D.; AFONINE, P. V.; BAKER, M. L.; BUNKÓCZI, G.; CHEN, V. B.; CROLL, T. I.; HINTZE, B.; HUNG, L. W.; JAIN, S.; MCCOY, A. J.; MORIARTY, N. W.; OEFFNER, R. D.; POON, B. K.; PRISANT, M. G.; READ, R. J.; RICHARDSON, J. S.; RICHARDSON, D. C.; SAMMITO, M. D.; SOBOLEV, O. V.; STOCKWELL, D. H.; TERWILLIGER, T. C.; URZHUMTSEV, A. G.; VIDEAU, L. L.; WILLIAMS, C. J.; ADAMS, P. D. Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: Recent developments in Phenix. **Acta Crystallographica Section D: Structural Biology**, v. D75, n. Pt 10, p. 861–877, 2019.

LIN, M.; GRANDINETTI, G.; HARTNELL, L. M.; BLISS, D.; SUBRAMANIAM, S.; RIKIHISA, Y. Host membrane lipids are trafficked to membranes of intravacuolar bacterium *Ehrlichia chaffeensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 117, n. 14, p. 8032-8043, 2020.

LIN, M.; RIKIHISA, Y. *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* Lack Genes for Lipid A Biosynthesis and Incorporate Cholesterol for Their Survival. **Infection And Immunity**, v. 71, n. 9, p. 5324–5331, 2003.

LIM, W. A.; FARRUGGIO, D. C.; SAUER, R. T. Structural and energetic consequences of disruptive mutations in a protein core. **Biochemistry**, 31, 4324–4333, 1992.

LOGAN, K. M.; KNIGHT, K. L. Mutagenesis of the P-loop motif in the ATP binding site of the RecA protein from *Escherichia coli*. **J. Mol. Biol.**, v. 232, n. 4, p. 1048-1059, 1993.

MATTHEWS, B. W. Solvent Content of Protein Crystal. **Journal of Molecular Biology**, v. 33, p. 491–497, 1968.

MADISON-ANTENUCCI, S.; KRAMER, L. D.; GEBHARDT, L. L.; KAUFFMAN, E. Emerging Tick-Borne Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 2, p. 1-34, 2020.

MAIER, J. A.; MARTINEZ, C.; KASAVAJHALA, K.; WICKSTROM, L.; HAUSER, K. E.; SIMMERLING, C. ff14SB: Improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 11, p. 3696-3713, 2015.

MARAGAKIS, L. L.; PERL, T. M. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. **Clinical Infectious Diseases**. v. 46, n. 8, p. 1254-1263, 2008.

MARKOSSIAN, K. A.; KHANOVA, H. A.; KLEIMENOV, S. Y.; LEVITSKY, D. I.; CHEBOTAREVA, N. A.; ASRYANTS, R. A.; MURONETZ, V. I.; SASO, L.; YUDIN, I. K.; KURGANOV, B. I. Mechanism of thermal aggregation of rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Biochemistry**. v. 45, n. 44, p. 13375-13384, 2006.

MCLEOD, M. P.; QIN, X.; KARPATHY, S. E.; GIOIA, J.; HIGHLANDER, S. K.; FOX, G. E.; MCNEILL, T. Z.; JIANG, H.; MUZNY, D.; JACOB, L. S.; HAWES, A. C.; SODERGREN, E.; GILL, R.; HUME, J.; MORGAN, M.; FAN, G.; AMIN, A. G.; GIBBS, R. A.; HONG, C.; YU, X.; WALKER, D. H.; WEINSTOCK, G. M. Complete Genome Sequence of *Rickettsia typhi* and Comparison with Sequences of Other Rickettsiae. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 5842-5855, 2004.

MCCOY, A. J.; GROSSE-KUNSTLEVE, R. W.; ADAMS, P. D.; WINN, M. D.; STORONI, L. C.; READ, R. J. Phaser crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, n. Pt 4, p. 658-674, 2007.

MCPHERSON, A. **Crystallization of biological macromolecules**. First Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.

MECHULAM, Y.; SCHMITT, E.; MAVEYRAUD, L.; ZELWER, C.; NUREKI, O.; YOKOYAMA, S.; KONNO, M.; BLANQUET, S. Crystal structure of *Escherichia coli* methionyl-tRNA synthetase highlights species-specific features. **Journal of Molecular Biology**, v. 294, p. 1287-1297, 1999.

MEINNEL, T.; MECHULAM, Y.; FAYAT G.; BLANQUET, S. Involvement of the size and sequence of the anticodon loop in tRNA recognition by mammalian and *E. coli* methionyl-tRNA synthetases. **Nucleic Acids Res.** V. 20, p. 4741-4746, 1992.



MEINNEL, T.; MECHULAM, Y.; LAZENNEC, C.; BLANQUET, S.; FAYAT, G. Critical role of the acceptor stem of tRNAs(Met) in their aminoacylation by *Escherichia coli* methionyl-tRNA synthetase. **J. Mol. Biol.**, v. 229, p. 26-36, 1993.

MEINNEL, T.; MECHULAM, Y.; LE CORRE D.; PANVERT, M.; BLANQUET, S.; FAYAT, G. Selection of suppressor methionyl-tRNA synthetases: mapping the tRNA anticodon binding site. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 291-295, 1991.

MERCALDI, G. F.; ANDRADE, M. O.; ZANELLA, J. L.; CORDEIRO, A. T.; BENEDETTI, C. E. Molecular basis for diaryldiamine selectivity and competition with tRNA in a type 2 methionyl-tRNA synthetase from a Gram-negative bacterium. **Journal of Biological Chemistry**, v. 296, n.100658, p. 1-18, 2021.

MERRITT, E. A.; ARAKAKI, T. L.; GILLESPIE, J. R.; LARSON, E. T.; KELLEY, A.; MUELLER, N.; NAPULI, A. J.; KIM, J.; ZHANG, L.; VERLINDE, C. L.; FAN, E.; ZUCKER, F.; BUCKNER, F. S.; VAN VOORHIS, W. C.; HOL, W. G. Crystal structures of trypanosomal histidyl-tRNA synthetase illuminate differences between eukaryotic and prokaryotic homologs. **Journal of Molecular Biology**, v. 397, n. 2, p. 481-94, 2010.

MOEN, S. O.; EDWARDS, T. E.; DRANOW, D. M.; CLIFTON, M. C.; SANKARAN, B.; VAN VOORHIS, W. C.; SHARMA, A.; MANOIL, C.; STAKER, B. L.; MYLER, P. J.; LORIMER, D. D. Ligand co-crystallization of aminoacyl-tRNA synthetases from infectious disease organisms. **Scientific Reports**. v. 7, p. 1-10, 2017.

MESHCHERYAKOV, V. A.; WOLF, M. Crystal structure of the flagellar accessory protein Flah of *Methanocaldococcus jannaschii* suggests a regulatory role in archaeal flagellum assembly. **Protein Sci.**, v. 25, p. 1147, 2016.

MORRIS, F. C.; DEXTER, C.; KOSTOULIAS, X.; UDDIN, M. I.; PELEG, A. Y. The Mechanisms of Disease Caused by *Acinetobacter baumannii*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 1601, p. 1-20, 2019.

MUKHERJEE, S.; DUTTA, D.; SAHA, B.; DAS, A. K. Crystal structure of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1 from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* MRSA252 provides novel insights into substrate binding and catalytic mechanism. **Journal of Molecular Biology**, v. 401, n. 5, p. 949-68, 2010.

MURSHUDOV, G. N.; SKUBÁK, P.; LEBEDEV, A. A.; PANNU, N. S.; STEINER, R. A.; NICHOLLS, R. A.; WINN, M. D.; LONG, F.; VAGIN, A. A. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. D67, n.4, p. 355-367, 2011.

MYLER, P. J.; STACY, R.; STEWART, L.; STAKER, B. L.; VAN VOORHIS, W. C.; VARANI, G.; BUCHKO, G. W. The Seattle Structural Genomics Center for Infectious Disease (SSGCID). **Infect. Disord. Drug Targets**, v. 9, p. 493-506, 2009.

NAKAMA, T.; NUREKI, O.; YOKOYAMA, S. Structural Basis for the Recognition of Isoleucyl-Adenylate and na Antibiotic, Mupirocin, by Isoleucyl-tRNA Synthetase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 47387-47393, 2001.

NAKANISHI, K.; OGISO, Y.; NAKAMA, T.; FUKAI, S.; NUREKI, O. Structural basis for anticodon recognition by methionyl-tRNA synthetase. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 12, n. 10, p. 931-932, 2005.

NIMMA, R.; KUMAR, A.; GANI, Z.; GAHLAWAT, A.; DILAWARI, R.; ROHILLA, R. K.; KUMBHAR, H.; GARG, P.; CHOPRA, S.; RAJE, M.; RAJE, C. I. Characterization of the enzymatic and multifunctional properties of *Acinetobacter baumannii* erythrose-4-phosphate dehydrogenase (E4PDH). **Microbial Pathogenesis**, v. 175, n. 105992, p. 1-17, 2023.

NOTREDAME, C.; HIGGINS, D. G.; HERINGA, J. T-coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. **Journal of Molecular Biology**, v. 302, n.1, p. 205–217, 2000.

OJO, K. K.; RANADE, R. M.; ZHANG, Z.; DRANOW, D. M.; MYERS, J. B.; CHOI, R.; HEWITT, S. N.; EDWARDS, T. E.; DAVIES, D. R.; LORIMER, D.; BOYLE, S. M.; BARRETT, L. K.; BUCKNER, F. S.; FAN, E.; VAN VOORHIS, W. C. *Brucella melitensis* Methionyl-tRNA-Synthetase (MetRS), a Potential Drug Target for Brucellosis. **PLoS One**, v. 11, n. 8, p. 1-19, 2016.

OMUMASABA, C. A.; OKAI, N.; INUI, M.; YUKAWA, H. *Corynebacterium glutamicum* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoforms with opposite, ATP-dependent regulation. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 91-103, 2004.

PADDOCK, C. D.; CHILDS, J. E. *Ehrlichia chaffeensis*: a Prototypical Emerging Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, p. 37-64, 2003.

PAINTER, J.; MERRITT, E. A. Optimal description of a protein structure in terms of multiple groups undergoing TLSmotion. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. D62, n. Pt4, p. 439-450, 2006.

PARIS, D. H.; DAY, N. P. J. Tropical rickettsial infections. In: **Manson's Tropical Diseases**. Elsevier Saunders; Edinburgh, UK: 2014. p. 273–291.e5.

PELEG, A. Y.; POTOSKI, B. A.; REA, R.; ADAMS, J.; SETHI, J.; CAPITANO, B.; HUSAIN, S.; KWAK, E. J.; BHAT, S. V.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection while receiving tigecycline: a cautionary report. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 1, p. 128-131, 2007.

PHAM, J. S.; DAWSON, K. L.; JACKSON, K. E.; LIM, E. E.; PASAJE, C. F. A.; TURNER, K. E. C.; RALPH, S. A. Aminoacyl-tRNA synthetases as drug targets in eukaryotic parasites. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 4, p. 1-13, 2014.

POLIZZI, K. M.; BOMMARIUS, A. S.; BROERING, J. M.; CHAPARRO-RIGGERS, J. F. Stability of biocatalysts. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, n. 2, p. 220-225, 2007.

RAJAN, R.; BELL, C.E. Crystal structure of RecA from *Deinococcus radiodurans*: insights into the structural basis of extreme radioresistance. **J.Mol.Biol.**, v. 344, p. 951, 2004.

RAJENDRAN, V.; KALITA, P.; SHUKLA, H.; KUMAR, A. TRIPATHI, T. Aminoacyl-tRNA synthetases: Structure, function, and drug discovery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, p. 400–414, 2018.

RIKIHISA, Y. The Tribe Ehrlichieae and Ehrlichial Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v.4, n.3, p. 286-308, 1991.

RIKIHISA, Y. The “Biological Weapons” of *Ehrlichia chaffeensis*: Novel Molecules and Mechanisms to Subjugate Host Cells. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, n. 830180, p. 1-11, 2022.

SAHNI, A.; FANG, R.; SAHNI, S. K.; WALKER, D. H. Pathogenesis of Rickettsial Diseases: Pathogenic and Immune Mechanisms of an Endotheliotropic Infection. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 14, p. 127-152, 2019.

ŠALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **J. Mol. Biol.** v. 234, p. 779-815, 1993.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SARASTE, M.; SIBBALD, P. R.; WITTINGHOFER, A. The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. **Trends Biochem. Sci.** v. 15, p.430-434, 1990.

SCHAFMEISTER, C. E. A. F.; ROSS, W. S.; ROMANOVSKI, V. Leap. University of California, San Francisco, 1995.

SEIDLER, N. W. GAPDH: Biological Properties and Diversity. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 985, p. 295, 2013.

SEBENY, P. J.; RIDDLE, M. S.; PETERSEN, K. *Acinetobacter baumannii* skin and soft-tissue infection associated with war trauma. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, n. 4, p. 444-449, 2008.

SHEN, M.; ŠALI, A. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. **Protein Sci.**, v. 15, n. 11, p. 2507–2524, 2006.

SCHMITT, E.; PANVERT, M.; BLANQUET, S.; MECHULAM, Y. Transition state stabilization by the ‘high’ motif of class I aminoacyl- tRNA synthetases: the case of *Escherichia coli* methionyl-tRNA synthetase. **Nucleic Acids Res.** v. 23, p. 4793-4798,1995.

SKARZYŃSKI, T.; MOODY, P.C.; WONACOTT, A.J. Structure of holo-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* at 1.8 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 193, n. 1, p. 171–187, 1987.

SLABINSKI, L.; JAROSZEWSKI, L.; RYCHLEWSKI, L.; WILSON, I. A.; LESLEY, S. A.; GODZIK, A. XtalPred: a web server for prediction of protein crystallizability. **Bioinformatics**, v. 23, p. 3403-3405, 2007

SOOKAI, S. Differential scanning fluorometry analysis of antibodies, *P. falciparum* proteins and assessing two copper-based assays to detect *P. falciparum* Histidine Rich Protein-2. University of KwaZulu-Natal, Pietermaritzburg, p. 354, 2019.

STEIN, N. CHAINSAW: a program for mutating pdb files used as templates in molecular replacement. **Journal of Applied Crystallography**, v. 41, n. 3, p. 641–643, 2008.

STORY, R. M.; WEBER, I. T.; STEITZ, T. A. The structure of the *E. coli* RecA protein monomer and polymer. **Nature**, v. 355, p. 318–325, 1992.

STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. **Protein Purification and Expression**, v. 41, p. 207-234, 2005.

SUGIURA, I.; NUREKI, O.; UGAJI-YOSHIKAWA, Y.; KUWABARA, S.; SHIMADA, A.; TATENO, M.; LORBER, B.; GIEGÉ, R.; MORAS, D.; YOKOYAMA, S.; KONNO, M. The 2.0 Å crystal structure of *Thermus thermophilus* methionyl-tRNA synthetase reveals two RNA-binding modules. **Structure**, v. 8, n. 2, p. 197-208, 2000.

SURESH, S.; BRESSI, J. C.; KENNEDY, K. J.; VERLINDE, C. L.; GELB, M. H.; HOL, W. G. Conformational changes in *Leishmania mexicana* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by designed inhibitors. **Journal of Molecular Biology**, v. 309, n. 2, p. 423-435, 2001.

THOMAS, R. J.; DUMLER, J. S.; CARLYON, J. A. Current management of human granulocytic anaplasmosis, human monocytic ehrlichiosis and *Ehrlichia ewingii* ehrlichiosis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 7, n. 6, p. 709-722, 2009.

TILLERY, L. M.; BARRETT, K. F.; DRANOW, D. M.; CRAIG, J.; SHEK, R.; CHUN, I.; BARRETT, L. K.; PHAN, I. Q.; SUBRAMANIAN, S.; ABENDROTH, J.; LORIMER, D. D.; EDWARDS, T. E.; VAN VOORHIS, W. C. Toward a structure of *Acinetobacter baumannii* drug targets. **Protein Science**, v. 29, n. 3, p. 789-802, 2020.

UEMURA, H.; IMAI, M.; OHTSUKA, E.; IKEHARA, M.; SÖLL, D. *E. coli* initiator tRNA analogs with different nucleotides in the discriminator base position. **Nucleic Acids Res.**, v. 10, p. 6531-6539, 1982.

UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. D1, p. D523-D531, 2023.

VANLOOCK, M.S., YU, X., YANG, S., LAI, A.L., LOW, C., CAMPBELL, M.J., AND EGELMAN, E.H. ATP-mediated conformational changes in the RecA filament. **Structure**, v. 11, p. 187–196, 2003.

VEYEL, D.; SOKOLOWSKA, E. M.; MORENO, J. C.; KIERSZNIOWSKA, S.; CICHON, J.; WOJCIECHOWSKA, I.; LUZAROWSKI, M.; KOSMACZ, M.; SZLACHETKO, J.; GORKA, M.; MÉRET, M.; GRAF, A.; MEYER, E. H.; WILLMITZER, L.; SKIRYCZ, A. PROMIS, global analysis of PROtein-metabolite interactions using size separation in *Arabidopsis thaliana*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 32, p.12440-12453, 2018.

XING, X.; BELL, C. E. Crystal Structures of *Escherichia coli* RecA in a Compressed Helical Filament. **J. Mol. Biol.**, v. 342, p. 1471–1485, 2004.

YABSLEY, M. J. Natural History of *Ehrlichia chaffeensis*: Vertebrate hosts and tick vectors from the United States and evidence for endemic transmission in other countries. **Veterinary Parasitology**, v. 167, n. 2-4, p. 136–148, 2010.

YI, J.; CAI, Z.; QIU, H.; LU, F.; LUO, Z.; CHEN, B.; GU, Q.; XU, J.; ZHOU, H. Fragment screening and structural analyses highlight the ATP-assisted ligand binding for inhibitor discovery against type 1 methionyl-tRNA synthetase. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. 8, p. 4755-4768, 2022.

YU, X.; EGELMAN, E. H. The RecA hexamer is a structural homologue of ring helicases. **Nat. Struct. Biol.**, v. 4, p. 101, 1997.

YU, X.; JACOBS, S. A.; WEST, S. C.; OGAWA, T.; EGELMAN, E. H. Domain structure and dynamics in the helical filaments formed by RecA and Rad51 on DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 98, n. 15, p. 8419–8424, 2001.

WALKER, D. H.; ISMAIL, N. Emerging and re-emerging rickettsioses: endothelial cell infection and early disease events. **Nature Reviews Microbiology**, v.6, p. 375-386, 2008.

WALKER, D. H.; PARKS, F. M.; BETZ, T. G.; TAYLOR, J. P.; MUEHLBERGER, J. W. Histopathology and Immunohistologic Demonstration of the Distribution of Rickettsia typhi in Fatal Murine Typhus. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 91, n. 6, p. 720–724, 1989.

WALKER, D. H.; YU, X. Progress in Rickettsial Genome Analysis from Pioneering of Rickettsia prowazekii to the Recent Rickettsia typhi. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1063, n. 1, p.13-25, 2005.

WALTER, G.; BOTELHO-NEVERS, E.; SOCOLOVSCHI, C.; RAOULT, D.; PAROLA, P. Murine Typhus in Returned Travelers: A Report of Thirty-Two Cases. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.86, n. 6, p.1049-1053, 2012.

WANG, W.; QIN, B.; WOJDYLA, J. A.; WANG, M.; GAO, X.; CUI, S. Structural characterization of free-state and product-state Mycobacterium tuberculosis methionyl-tRNA synthetase reveals an induced-fit ligand-recognition mechanism. **IUCrJ**. v. 5, n. Pt 4, p. 478-490, 2018.

WATERHOUSE, A.; BERTONI, M.; BIENERT, S.; STUDER, G.; TAURIELLO, G.; GUMIENNY, R.; HEER, F. T.; DE BEER, T. A. P.; REMPFER, C.; BORDOLI, L.; LEPORE, R.; SCHWEDE, T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W296-W303, 2018.

WINN, M. D.; BALLARD, C. C.; COWTAN, K. D.; DODSON, E. J.; EMSLEY, P.; EVANS, P. R.; KEEGAN, R. M.; KRISINEL, E. B.; LESLIE, A. G.; MCCOY, A.; MCNICHOLAS, S. J.; MURSHUDOV, G. N.; PANNU, N. S.; POTTERTON, E. A.; POWELL, H. R.; READ, R. J.; VAGIN, A.; WILSON, K. S. Overview of the CCP4 suite and current developments. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**. v. 67, n. Pt 4, p. 235-242, 2011.

WINTER, G.; WATERMAN, D. G.; PARKHURST, J. M.; BREWSTER, A. S.; GILDEA, R. J.; GERSTEL, M.; FUENTES-MONTERO, L.; VOLLMAR, M.; MICHELS-CLARK, T.; YOUNG, I. D.; SAUTER, N. K.; EVANS, G. DIALS: implementation and evaluation of a new

integration package. **Acta Crystallographica Section D: Structural Biology**, v. 74, n. Pt 2, p. 85-97, 2018.

WOLF, Y. I.; ARAVIND, L.; GRISHIN, N. V.; KOONIN, E. V. Evolution of aminoacyl-tRNA synthetases--analysis of unique domain architectures and phylogenetic trees reveals a complex history of horizontal gene transfer events. **Genome Research**, v. 9, n. 8, p. 689-710, 1999.

ZHANG, L.; LIU, M.; BAO, L.; BOSTRÖM, K. I.; YAO, Y.; LI, J.; GU, S.; JI, C. Novel Structures of Type 1 Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase from *Escherichia coli* Provide New Insights into the Mechanism of Generation of 1,3-Bisphosphoglyceric Acid. **Biomolecules**, v. 11, n. 11, p.1-19, 2021.

**APÊNDICE A – PRIMEIRA PÁGINA DO ARTIGO PUBLICADO COM OS  
RESULTADOS DA DINÂMICA MOLECULAR DA RECA DE *Herbaspirillum*  
*seropedicae***

## APÊNDICE A



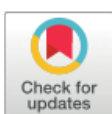
## RESEARCH ARTICLE

# MAW point mutation impairs *H. Seropedicae* RecA ATP hydrolysis and DNA repair without inducing large conformational changes in its structure

Wellington C. Leite<sup>1\*</sup>, Renato F. Penteado<sup>2</sup>, Fernando Gomes<sup>3</sup>, Jorge Iulek<sup>2</sup>, Rafael M. Etto<sup>2</sup>, Sérgio C. Saab<sup>1</sup>, Maria B. R. Steffens<sup>4</sup>, Carolina W. Galvão<sup>5\*</sup>

**1** Department of Physics, State University of Ponta Grossa (UEPG), Ponta Grossa, Paraná, Brazil, **2** Department of Chemistry, State University of Ponta Grossa (UEPG), Ponta Grossa, Paraná, Brazil, **3** Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil, **4** Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil, **5** Department of Structural and Molecular Biology and Genetics, State University of Ponta Grossa (UEPG), Ponta Grossa, Paraná, Brazil

\* wellingtonclaiton@gmail.com (WCL); carolwgalvao@yahoo.com.br.(CWG)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Leite WC, Penteado RF, Gomes F, Iulek J, Etto RM, Saab SC, et al. (2019) MAW point mutation impairs *H. Seropedicae* RecA ATP hydrolysis and DNA repair without inducing large conformational changes in its structure. PLOS ONE 14(4): e0214601. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214601>

**Editor:** Giovanni Maga, Istituto di Genetica Molecolare, ITALY

**Received:** November 28, 2018

**Accepted:** March 17, 2019

**Published:** April 18, 2019

**Copyright:** © 2019 Leite et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All PDB files are available from the <https://www.modelarchive.org> database. Model of wild-type HsRecA and L53Q were deposited at <https://www.modelarchive.org/doi/10.5452/ma-q6982> and <https://www.modelarchive.org/doi/10.5452/ma-8bnxv>, respectively.

**Funding:** The work was supported by Capes (Science without Borders program), INCT-FBN, Fundação Araucária. The funders had no role in

## Abstract

RecA is a multifunctional protein that plays a central role in DNA repair in bacteria. The structural Make ATP Work motif (MAW) is proposed to control the ATPase activity of RecA. In the present work, we report the biochemical activity and structural effects of the L53Q mutation at the MAW motif of the RecA protein from *H. seropedicae* (HsRecA L53Q). *In vitro* studies showed that HsRecA L53Q can bind ADP, ATP, and ssDNA, as does wild-type RecA. However, the ATPase and DNA-strand exchange activities were completely lost. *In vivo* studies showed that the expression of HsRecA L53Q in *E. coli recA1* does not change its phenotype when cells were challenged with MMS and UV. Molecular dynamics simulations showed the L53Q point mutation did not cause large conformational changes in the HsRecA structure. However, there is a difference on dynamical cross-correlation movements of the residues involved in contacts within the ATP binding site and regions that hold the DNA binding sites. Additionally, a new hydrogen bond, formed between Q53 and T49, was hypothesized to allow an independent motion of the MAW motif from the hydrophobic core, what could explain the observed loss of activity of HsRecA L53Q.

## 1. Introduction

The bacterial RecA protein plays a central role in (1) the repair of stalled replication forks and double-strand break, (2) general recombination, (3) induction of the SOS response, and (4) translesion DNA synthesis [1,2]. Its functions *in vivo* depend upon several key activities identified *in vitro*, including the binding of DNA molecules and the hydrolysis of ATP. RecA L1 and L2 motifs form the DNA binding sites and RecA Walker A and B motifs, the ATP (or other NTPs) binding and hydrolysis site [3,4]. The residues of the Walker A Motif (or P-loop) in the