



UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO



instituto de química

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza
Instituto de Química

Projeto Final de Curso
IQWX01

Caracterização estrutural do anti-ativador de *quorum sensing* QsrO de *Pseudomonas aeruginosa*

Luiza Carvalho Behnken

Rio de Janeiro
Junho/2019

Behnken, Luiza Carvalho.

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO ANTI-ATIVADOR DE
QUORUM SENSING QsrO DE *PSEUDOMONAS*
AERUGINOSA/Luiza Carvalho Behnken – Rio de Janeiro: UFRJ/IQ.

Dissertação (Projeto Final de Curso) – Universidade Federal do Rio
de Janeiro, Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza,
Instituto de Química / DBQ, 2019.

Orientador: Anderson de Sá Pinheiro

1. QsrO. 2. *Quorum sensing*. 3. *Pseudomonas*. 4. Estrutura. I.
Pinheiro, Anderson de Sá II. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
Instituto de Química.

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, Patrícia e Ricardo Behnken, meu irmão, Pedro Behnken, e outros familiares por estarem sempre por perto em todos os momentos. Minha mãe, que apesar de não entender absolutamente nada sobre o assunto, sempre tentava ajudar quando eu chegava em casa reclamando que “a HisTag não deu pico no FT” ou comemorando que tive TEV suficiente para clivar toda a amostra. Meu pai não fica para trás, podendo sempre contar com a sua carona nos dias (quase todos) nos quais eu saía tarde do laboratório.

Agradeço aos amigos que conquistei nos anos de UFRJ, por me aguentarem falando sem fim quando estava nervosa e por me fazerem uma pessoa mais aberta a possibilidades.

Agradeço aos meus colegas de bancada no laboratório, que sempre estiveram dispostos a ajudar e dar conselhos. Muitos tornaram-se meus amigos e foram essenciais para chegar onde hoje estou. Desde comer o resto do bolo de aniversário até emprestar um pouco de TEV, todos vocês foram (e são) importantes para mim e fizeram os dias de trabalho serem leves e prazerosos.

Como não poderia faltar, agradeço enormemente ao professor Anderson Pinheiro que, além de me apresentar à Bioquímica, foi meu orientador nesta saga que é o TCC. Com suas aulas de Bioquímica I conheci o fabuloso universo das proteínas e me encantei. Tive a sorte de fazer parte do seu laboratório e o encanto só aumentou. Obrigada por todas as conversas, conselhos, paciência, explicações e muitas risadas também. Sem você eu não saberia tudo o que sei e não teria absoluta certeza do rumo que quero seguir para o resto da vida.

Agradeço também as professoras Bianca Neves e Yraima Cordeiro, por aceitarem participar da minha banca examinadora, respondendo prontamente ao meu convite. Ainda, gostaria de agradecer em especial à professora Yraima e ao professor Luís Maurício Trambaioli, por colaborarem com o meu trabalho em vários experimentos.

RESUMO

PROJETO DE CURSO

TÍTULO: CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO ANTI-ATIVADOR DE *QUORUM SENSING* QsrO DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

ALUNO: Luiza Carvalho Behnken

ORIENTADOR: Anderson de Sá Pinheiro, DBQ – Instituto de Química – UFRJ

DATA DA DEFESA: 02/07/2019

PALAVRAS-CHAVE: QsrO; *Quorum sensing*; *Pseudomonas*; Estrutura.

QsrO (*Quorum Sensing Repressive ORF*) é um regulador capaz de bloquear a expressão de genes controlados por *quorum sensing* em *Pseudomonas aeruginosa*, levando a diminuição da virulência e patogenicidade desta bactéria. QsrO é uma proteína de 166 aminoácidos que não apresenta similaridade de sequência com nenhuma outra proteína conhecida até o momento. Apesar da função inibitória de QsrO ser bem estabelecida, os mecanismos moleculares através dos quais a proteína atua ainda são pouco entendidos. Neste trabalho, utilizamos uma série de técnicas bioquímicas e biofísicas para caracterizar o estado oligomérico e a conformação de QsrO. A construção His₆MBP-QsrO₁₋₁₆₆ foi expressa em *Escherichia coli* BL21(DE3) a temperatura de 18°C, durante 18 h, com a adição de isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo 1 mM. A proteína foi purificada por uma combinação de técnicas cromatográficas: afinidade à amilose, afinidade a níquel e exclusão molecular. A proteína purificada apresentou dois picos de eluição na cromatografia por exclusão molecular, sugerindo a existência de dois estados oligoméricos. Estes estados foram caracterizados como dímero e trímero através de *cross-linking* e SDS PAGE. As massas moleculares estimadas a partir da exclusão molecular foram maiores do que as esperadas para o dímero e trímero de QsrO, sugerindo que a proteína não adota uma estrutura globular. Ainda, a oligomerização de QsrO ocorre com afinidades subnanomolares. A topologia global de QsrO foi investigada por espalhamento de raios-X a baixo ângulo. A análise de Guinier mostrou um raio de giro (R_g) de 6,49 nm, a análise de Kratky indicou que a proteína não apresenta regiões desenoveladas e a análise da função de pares de distribuição sugeriu que QsrO apresenta um formato alongado. A estrutura secundária de QsrO foi investigada por dicroísmo circular (CD). O espectro de CD mostrou mínimos em 222 e 211 nm, além de um máximo em 195 nm, compatível com uma conformação majoritariamente α-helicoidal. A estabilidade de QsrO contra agentes desnaturantes foi investigada por espectroscopia de fluorescência. O espectro de fluorescência intrínseca de QsrO apresentou máximo de emissão em 347 nm, sugerindo que o único resíduo de triptofano presente na proteína encontra-se exposto ao solvente e, portanto, não participa da interface de oligomerização. A adição de concentrações crescentes de ureia promoveu um aumento da intensidade de fluorescência da sonda extrínseca 1,8-ANS, sugerindo a exposição de segmentos hidrofóbicos. Entretanto, mesmo frente a 8 M de ureia, a intensidade de fluorescência do 1,8-ANS permaneceu alta, indicando que a proteína é resistente a desnaturação. Em conjunto, nossos dados sugerem que o anti-ativador QsrO é constituído por um feixe de α-hélices alongado, altamente estável, capaz de formar dímeros e trímeros.

Autorizamos a divulgação no Repositório Institucional da UFRJ-Pantheon.

Aluno: _____

Orientador: _____

Assinatura

Assinatura

Sumário

Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Índice de Figuras	vii
Índice de Abreviaturas.....	viii
Índice de Tabelas	x
1. Introdução	1
1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
1.2 <i>Quorum Sensing</i>	2
1.3 <i>Quorum sensing</i> em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
1.4 Anti-ativadores de QS	7
1.5 QsrO	10
2. Objetivo.....	11
2.1 Objetivo Geral	11
2.2 Objetivos Específicos.....	11
3. Material e Métodos	12
3.1 Reagentes.....	12
3.2 Meios de cultura.....	12
3.3 Cepas bacterianas	13
3.4 Plasmídeos	13
3.5 Métodos	14
3.5.1 Predição de estrutura secundária	14
3.5.2 Transformação.....	15
3.5.3 Expressão de His ₆ MBP-QsrO ₁₋₁₆₆	15
3.5.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes ..	16
3.5.5 Purificação	18

3.5.5.1	Cromatografia de afinidade à amilose	18
3.5.5.2	Cromatografia de afinidade a níquel.....	18
3.5.5.3	Cromatografia por exclusão molecular	19
3.5.6	Dosagem de proteínas	19
3.5.7	<i>Cross-linking</i> seguido de SDS PAGE	19
3.5.8	Dicroísmo circular (CD)	20
3.5.9	Espectroscopia de fluorescência	20
3.5.9.1	Polarização de fluorescência.....	20
3.5.9.2	Ligação a 1,8-ANS	20
3.5.10	Espalhamento de raio-X a baixo ângulo (SAXS)	21
4.	Resultados e Discussão.....	23
4.1	Purificação de QsrO ₁₋₁₆₆	23
4.1.1	Cromatografia de afinidade à amilose	23
4.1.2	Cromatografia de afinidade a níquel.....	25
4.1.3	Cromatografia por exclusão molecular	26
4.2	QsrO ₁₋₁₆₆ adota dois estados oligoméricos: dímero e trímero.....	27
4.3	QsrO ₁₋₁₆₆ é uma proteína composta por α -hélices	31
4.4	A hélice α 3 pode estar envolvida na oligomerização de QsrO ₁₋₁₆₆	35
4.5	QsrO ₁₋₁₆₆ adota uma forma alongada não-globular.....	37
4.6	QsrO ₁₋₁₆₆ é uma proteína altamente estável	41
5.	Conclusão	45
6.	Referências Bibliográficas.....	47

Índice de Figuras

Figura 1: Sistema de QS em <i>Vibrio fischeri</i>	4
Figura 2: Circuitos de QS em <i>P. aeruginosa</i>	6
Figura 3: Estruturas tridimensionais de TraM, TraM2, TraR e seus complexos.....	8
Figura 4: Representação esquemática da construção His ₆ MBP-QsrO ₁₋₁₆₆	14
Figura 5: Purificação de His ₆ MBP-QsrO ₁₋₁₆₆ por cromatografia de afinidade à amilose.....	24
Figura 6: Clivagem de His ₆ MBP-QsrO ₁₋₁₆₆ com TEV.....	25
Figura 7: Purificação de QsrO ₁₋₁₆₆ por cromatografia de afinidade a níquel.....	26
Figura 8: Purificação de QsrO ₁₋₁₆₆ por cromatografia por exclusão molecular.....	27
Figura 9: Análise da distribuição oligomérica de QsrO ₁₋₁₆₆ por cromatografia por exclusão molecular.....	28
Figura 10: Análise da distribuição oligomérica de QsrO ₁₋₁₆₆ por <i>cross-linking</i> seguido de SDS PAGE.....	29
Figura 11: QsrO ₁₋₁₆₆ é uma proteína não-globular com alta afinidade de oligomerização.....	31
Figura 12: Predições de elementos de estrutura secundária e enovelamento por bioinformática.....	32
Figura 13: Análise de estrutura secundária e propensão a <i>coiled-coil</i> de QsrO ₁₋₁₆₆	33
Figura 14: Uma sequência de 25 aminoácidos em QsrO ₁₋₁₆₆ é homóloga a OmpR.....	36
Figura 15: Análise de parâmetros topológicos de QsrO ₁₋₁₆₆	39
Figura 16: Estabilidade de QsrO ₁₋₁₆₆ frente a agentes desnaturantes.....	42

Índice de Abreviaturas

1,8-ANS	1,8-anilinoftalenosulfonato
Acil-HSLs	Homoserinolactonas aciladas
BSA	Albumina bovina sérica
CD	Dicroísmo circular
C-terminal	Carboxi-terminal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
GDH	Glutaraldeído
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
IQS	2-(2-hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldeído
LB	Luria Bertani, meio rico para cultivo de micro-organismos
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
MBP	Proteína ligadora de maltose
Milli-Q	Água deionizada com valor de resistividade de 18,2 Ω .cm
N-terminal	Amino-terminal
ORF	<i>Open reading frame</i>
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PCA	Fenazina-1-ácido carboxílico
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoreto
PQS	2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona
PSA	Persulfato de amônio
QS	<i>Quorum sensing</i>
QscR	<i>Quorum-sensing control regulator</i>
QsIA	<i>Quorum sensing LasR anti-activator</i>
QsrO	<i>Quorum sensing repressive ORF</i>
QteE	<i>Quorum-threshold expression element</i>
Rg	Raio de giro
rpm	Rotações por minuto

SAM	S-adenosilmetionina
SAXS	<i>Small-angle X-ray scattering</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TEMED	N,N,N',N'- tetrametiletenodiamina
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
TFI	Transformada de Fourier indireta
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano

Índice de Tabelas

Tabela 1: Materiais utilizados na preparação dos géis de SDS PAGE com corrida em Tris-Glicina.....	17
Tabela 2: Materiais utilizados na preparação dos géis de SDS PAGE com corrida em Tris-Tricina.....	17

1. Introdução

1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas spp. são micro-organismos oportunistas Gram-negativos que naturalmente habitam o solo e áreas úmidas do meio ambiente. Dentre estes, *Pseudomonas aeruginosa* é um dos principais patógenos humanos, frequentemente encontrado no ambiente hospitalar, cuja taxa de mortalidade pode chegar a 60% dos pacientes (PRASAD *et al.*, 2009). As principais infecções causadas por esta bactéria incluem infecções do sistema respiratório (pneumonias), do trato urinário, de pele, oculares (conjuntivites, queratites e úlcera de córnea), gastrintestinais, infecções das articulações e ossos, otites e bacteremias, que acometem principalmente pacientes imunocomprometidos, particularmente aqueles com neutropenia, queimadura, câncer, doença crônica do pulmão (por exemplo, fibrose cística) e diabetes mellitus (ONO, 2002).

P. aeruginosa apresenta um vasto arsenal de virulência, que inclui: adesinas (flagelo e pili tipo 4, por exemplo), endotoxinas (lipopolissacarídeo), exotoxinas (exotoxina A), pigmentos (piocianina), sideróforos (pioverdina), surfactantes (ramnolipídeos) e uma coleção de enzimas hidrolíticas extracelulares (por exemplo, fosfolipases, esterases, lipases e proteases) (GELLATLY & HANCOCK, 2013; CROUSILLES *et al.*, 2015; DRISCOLL *et al.*, 2007). Coletivamente, todos estes atributos de virulência promovem o aumento do dano tecidual e/ou a proteção do patógeno contra o sistema imune do hospedeiro, contribuindo para o estabelecimento e manutenção do processo infeccioso (LEE & ZHANG, 2015)

P. aeruginosa possui um caráter multirresistente que se deve não somente ao perfil de resistência intrínseca da espécie, mas também a sua habilidade de adquirir outros mecanismos de resistência contra diferentes classes de agentes antimicrobianos. A exposição contínua aos antimicrobianos exerce uma pressão seletiva e favorece a seleção de cepas mais resistentes e com extrema plasticidade genética, garantindo a sobrevivência destas *in vitro* e *in vivo* (STRATEVA & YORDANOV, 2009). Não obstante, a capacidade de produção de biofilme é outro fator importante, consistindo na formação de comunidades de micro-organismos envolvidos por uma matriz extracelular composta, em sua maior parte, por

polissacarídeos. Estas sociedades microbianas possuem seus próprios sistemas de comunicação e defesa, pelos quais são capazes de resistir não só a ação do sistema imune do hospedeiro, mas também a ação dos antimicrobianos (HALL-STOODLEY & STOODLEY, 2009).

Em *P. aeruginosa*, tanto a formação de biofilme quanto a produção de fatores de virulência são processos regulados pelo mecanismo de sinalização celular denominado *quorum sensing*. Este sistema permite à bactéria coordenar a expressão de genes específicos através da produção de moléculas auto-indutoras (WINSTANLEY & FOTHERGILL, 2009). Assim, a infecciosidade de células de *P. aeruginosa* é fortemente dependente da regulação gênica via *quorum sensing* (BIELECKI *et al.*, 2008; CHANG *et al.*, 2014).

1.2 Quorum Sensing

Quorum sensing (QS) consiste em uma rede de sinalização celular complexa presente em diversas espécies de bactérias, desencadeada pelo aumento da concentração populacional local, sendo um processo vital tanto bioquímico quanto fisiológico e assim, requerido para a realização de diversas funções. Este mecanismo bacteriano de comunicação célula-a-célula permite a regulação da expressão gênica em resposta ao aumento da densidade populacional (KELLER *et al.*, 2006; MILLER *et al.*, 2001). QS se baseia na secreção e captação de sinais moleculares sintetizados pelas próprias células individuais como indicadores da densidade celular. Com o crescimento da população bacteriana, ocorre um aumento proporcional da concentração extracelular destas moléculas sinalizadoras, conhecidas como auto-indutores. Assim, ao atingir um valor crítico de concentração, a população bacteriana reconhece a presença deste auto-indutor por meio da sua complexação a um receptor celular e este complexo é capaz de ativar a expressão coordenada de genes específicos (NG & BASSLER, 2009; WILLIAMS & CAMARA, 2009).

De um modo geral, o mecanismo de QS controla atividades biológicas que são improdutivas quando exercidas por um único indivíduo, porém eficazes quando desempenhadas pela população bacteriana. Portanto, processos como esporulação, formação de biofilme, expressão de fatores de virulência, bioluminescência, produção de antibióticos, secreção de toxinas e captação de nutrientes são regulados por QS

(VENTURI, 2006). O sistema de QS e os auto-indutores envolvidos variam significativamente de uma espécie de bactéria para outra, de tal forma que bactérias Gram-positivas e Gram-negativas apresentam mecanismos de QS bastante diferentes. Bactérias Gram-positivas utilizam oligopeptídeos como auto-indutores e um sistema de dois componentes, composto por receptores histidina-quinases ligados à membrana e reguladores de resposta, que agem como fatores de transcrição quando fosforilados, promovendo modificações na expressão gênica (PAPENFORT & BASSLER, 2016). Enquanto isso, bactérias Gram-negativas utilizam pequenas moléculas orgânicas como auto-indutores, especificamente homoserinolactonas aciladas (acil-HSLs) (NOVICK & GEISINGER, 2008; NG & BASSLER, 2009; WILLIAMS & CAMARA, 2009) ou outras moléculas sintetizadas a partir de S-adenosilmetionina (SAM) (PAPENFORT & BASSLER, 2016). Devido a sua natureza anfipática, estas moléculas se difundem livremente através da membrana plasmática. Quando uma concentração crítica é alcançada, estes auto-indutores se ligam a receptores específicos citoplasmáticos que agem como fatores de transcrição, regulando a expressão de diversos genes responsivos a QS (PAPENFORT & BASSLER, 2016). Um aspecto interessante desse processo é que a ativação do mecanismo de QS leva ao aumento da síntese do próprio auto-indutor, estabelecendo uma alça de *feedback* positivo que supostamente sincroniza a expressão gênica na população bacteriana (PAPENFORT & BASSLER, 2016).

QS foi primeiramente descrito por Nealson e Hastings (1979) na bactéria marinha *Vibrio fischeri*, atuando no controle da expressão de genes responsáveis pelo fenômeno de bioluminescência (HASTINGS & GREENBERG, 1999). O sistema LuxI-LuxR constitui a via de QS mais comumente empregada por bactérias Gram-negativas (GALLOWAY *et al.*, 2011), estando ausente apenas em *Escherichia coli* e *Salmonella sp.* (MICHAEL *et al.*, 2001; ANTUNES *et al.*, 2010). Este sistema regulatório é baseado em um ativador (LuxR), um DNA alvo (operon *lux*) e um auto-indutor (N-(3-oxo-hexanoil)-homoserinolactona) (**Figura 1**). A proteína LuxR é composta por dois domínios funcionais, sendo o domínio N-terminal responsável pela interação com o ligante e o domínio C-terminal, pela ligação ao DNA (PAPENFORT & BASSLER, 2016). O auto-indutor, cuja síntese é catalisada pela enzima LuxI, se difunde livremente entre o meio intracelular e o meio externo. Ao atingir um limiar crítico de

concentração, o auto-indutor se liga ao receptor LuxR no citoplasma das células. A formação do complexo LuxR:auto-indutor promove a dimerização da proteína LuxR e o complexo então atua como um fator de transcrição, ligando-se a uma sequência de DNA específica no operon *lux* e ativando a transcrição do gene que codifica a enzima luciferase, resultando no fenômeno de bioluminescência (ENGBRECHT & SILVERMAN, 1984; PAPENFORT & BASSLER, 2016).

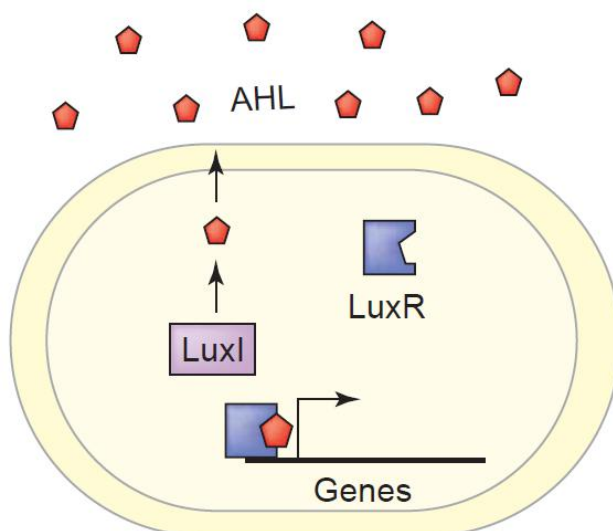


Figura 1: Sistema de QS em *Vibrio fischeri*. A enzima LuxI produz o auto-indutor, homoserinolactonas aciladas, que, devido a sua característica anfipática, se acumula no meio externo. Ao alcançar um limiar de concentração, devido ao aumento da densidade populacional, este auto-indutor se complexa com o receptor intracelular LuxR e este complexo ativa a transcrição de genes responsivos a QS (HENKE & BASSLER, 2004).

1.3 Quorum sensing em *Pseudomonas aeruginosa*

Mecanismos de QS semelhantes ao sistema LuxI-LuxR de *V. fischeri* foram identificados em mais de 100 espécies de bactérias Gram-negativas (CASE *et al.*, 2008). Em *P. aeruginosa*, ao menos quatro sistemas de QS distintos são conhecidos: dois sistemas homólogos ao LuxI-LuxR, denominados LasI-LasR e RhII-RhIR, o sistema PQS (*Pseudomonas quinolone signal*; 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona) e o sistema IQS (2-(2-hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldeído), que funciona em condições de restrição de fosfato (PAPENFORT & BASSLER, 2016). Os sistemas de QS estão organizados de maneira hierárquica, sendo que LasI-LasR está presente no topo da cascata de sinalização celular. A enzima LasI sintetiza o auto-indutor N-(3-oxo-dodecanoil)-homoserinolactona (3-oxo-C12-HSL) (PARSEK *et al.*, 1999), enquanto a

enzima RhII produz o auto-indutor N-(butiril)-homoserinolactona (C4-HSL) (PEARSON *et al.*, 1995). Quando em altas densidades populacionais, 3-oxo-C12-HSL se liga especificamente ao receptor LasR (SCHUSTER *et al.*, 2003) e o complexo LasR:3-oxo-C12-HSL (**Figura 2**) ativa a transcrição de uma gama de genes, incluindo aqueles que codificam determinados fatores de virulência, como *lasB* (elastase), *lasA* (protease), *toxA* (endotoxina A) e *aprA* (fosfatase alcalina) (GAMBELLO & IGLEWSKI, 1991; GAMBELLO *et al.*, 1993). O complexo LasR:3-oxo-C12-HSL também ativa a expressão do gene *lasI*, estabelecendo uma alça de *feedback* positivo no controle da produção do sinal molecular (SEED, 1995; GROSSO-BECERRA *et al.*, 2014) (**Figura 2**). Além disso, LasR:3-oxo-C12-HSL também regula a expressão dos genes *rhII* e *rhIR* (PESCI *et al.*, 1997) (**Figura 2**), que codificam o segundo sistema de QS em *P. aeruginosa*, além dos genes *pqsR* e *pqsABCDH*, que codificam o sistema PQS (DEZIEL *et al.*, 2004).

O sistema RhII-RhIR age de maneira análoga ao LasI-LasR, de tal forma que a ligação específica do auto-indutor C4-HSL ao receptor RhIR promove a ativação da expressão de uma segunda classe de genes alvo, que inclui: *rpoS* (fator sigma), *lecA* (lectina citotóxica) e o operon *rhIAB* (SCHUSTER *et al.*, 2003; SCHUSTER & GREENBERG, 2007). Este último codifica ramnosiltransferases, enzimas responsáveis pela síntese de ramnolipídeos, glicolipídeos anfipáticos com ação surfactante que contribuem de forma decisiva para a formação de biofilme por células de *P. aeruginosa* (DE KIEVIT, 2008). O complexo RhIR:C4-HSL também ativa a expressão da enzima *rhII*, estabelecendo uma segunda alça de *feedback* positivo (WINSON *et al.*, 1995; VENTRE *et al.*, 2003) (**Figura 2**). Além disso, o complexo PqsR:PQS ativa a expressão dos genes *rhIR* e *rhII*, conectando os três módulos de sinalização celular (McKNIGHT *et al.*, 2000). Em contrapartida, o complexo RhIR:C4-HSL inibe a expressão de *pqsR* e *pqsABCD* e esta alça de *feedback* negativo garante a existência da proporção correta entre 3-oxo-C12-HSL e C4-HSL que, por sua vez, é responsável pela ativação do sistema PQS (CAO *et al.*, 2001) (**Figura 2**). Esse alto grau de interconectividade destaca como vários sinais intracelulares e extracelulares são integrados a fim de modular a resposta do mecanismo de QS. Estas várias camadas de regulação permitem o ajuste fino da resposta via QS, possibilitando uma comunicação célula-a-célula robusta sob diversas condições.

Recentemente, foi descoberto um quarto sinal de comunicação intercelular, capaz de integrar sinais de estresse ambiental com a rede de QS (LEE *et al.*, 2013). Este sinal molecular, nomeado IQS, é sintetizado pelo cluster gênico *ambBCDE* que codifica sintetases peptídicas não-ribossômicas (**Figura 2**). A interrupção deste *cluster* gênico diminui a produção de PQS e de fatores de virulência, como pirocianina, ramnolipídeo e elastase, enquanto a adição exógena de IQS é suficiente para restaurar completamente o fenótipo (LEE *et al.*, 2013). Sob condições de depleção de fosfato, IQS substitui parcialmente as funções do sistema central LasI-LasR, fornecendo informações importantes sobre o motivo pelo qual isolados clínicos de *P. aeruginosa* frequentemente carregam mutações nos genes *lasI* e *lasR* (CIOFU *et al.*, 2010; D'ARGENIO *et al.*, 2007; HOFFMAN *et al.*, 2009; SMITH *et al.*, 2006). IQS leva a ativação da expressão dos genes *pqs* que, por sua vez, ativam a expressão de *rhII* e a produção de C4-HSL (LEE *et al.*, 2013) (**Figura 2**).

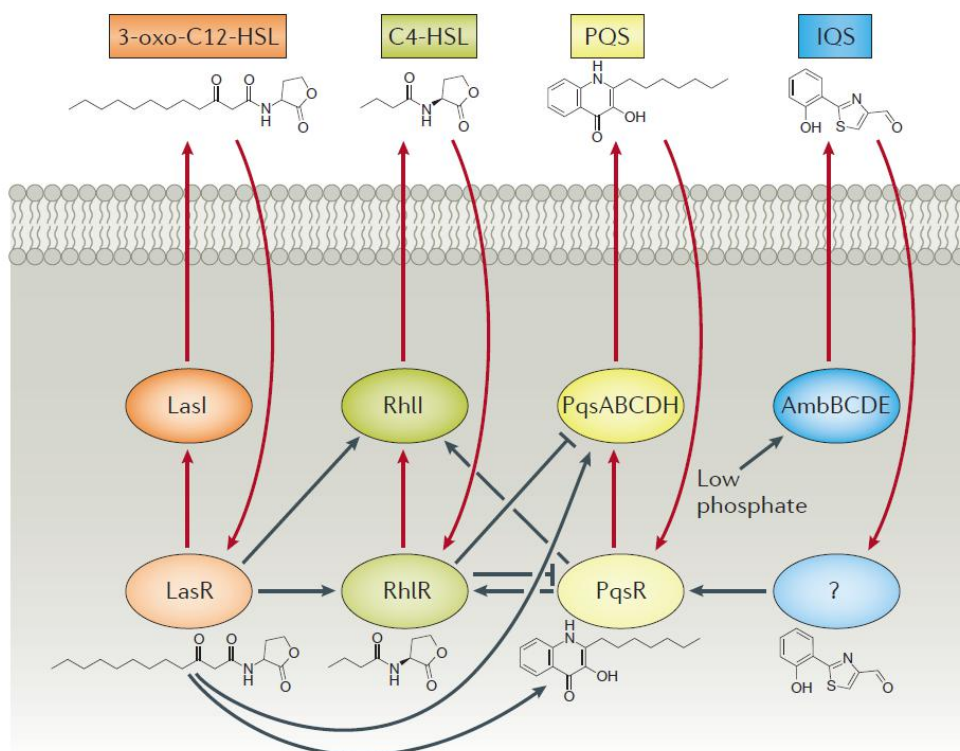


Figura 2: Circuitos de QS em *P. aeruginosa*. As quatro sintetases, LasI, RhII, PqsABCDH e AmbBCDE, produzem os auto-indutores N-(3-oxo-dodecanoil)-homoserinolactona (3-oxo-C12-HSL), N-(butiril)-homoserinolactona (C4-HSL), 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS) e 2-(2-hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldeído (IQS). 3-oxo-C12-HSL, C4-HSL e PQS são reconhecidos por fatores de transcrição citoplasmáticos. O receptor de IQS é atualmente desconhecido. Os circuitos individuais encontram-se altamente interconectados (PAPENFORT & BASSLER, 2016).

1.4 Anti-ativadores de QS

Diversos genes controlados por QS apresentam uma curva de expressão característica em formato sigmoide. Este padrão de expressão, conhecido como padrão dependente de quórum (PIPER & FARRAND, 2000), apresenta uma fase inicial de baixa densidade celular, chamada de pré-quorum, com taxa de expressão gênica desprezível. Ao atingir um valor crítico de concentração celular, ou seja, o quórum, ocorre uma rápida mudança no comportamento desta curva acompanhada do desencadeamento da expressão gênica.

Claramente, a concentração extracelular do auto-indutor desempenha um papel central no estabelecimento deste padrão de expressão dependente de quórum. Diversos fatores influenciam a acumulação do sinal de QS no meio extracelular, como densidade populacional, pH do meio, degradação enzimática e regulação da síntese do auto-indutor por *feedback* positivo (PEARSON, 2002). No entanto, apenas a concentração extracelular do auto-indutor não é suficiente para explicar o padrão de expressão observado para muitos genes regulados por QS. Whiteley *et al.* (1999) mostraram que a adição de concentrações saturantes de acil-HSLs exógenas a uma cultura de *P. aeruginosa* em baixa densidade populacional não foi capaz de aumentar os níveis de expressão de genes controlados por QS. Este resultado sugere a existência de mecanismos adicionais de controle da resposta via QS.

Sendo assim, fatores intrínsecos, como proteínas inibitórias, poderiam atuar de forma determinante para o padrão de expressão observado. Proteínas capazes de reprimir a expressão gênica durante a fase pré-quorum foram primeiramente descritas em *Agrobacterium tumefaciens*. Nesta bactéria, o receptor de QS TraR é inibido pelos reguladores TraM, TraM2 e TrIR, através de interações proteína-proteína (CHAI *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2006). O anti-ativador TraM é uma proteína de ~11,2 kDa, completamente helicoidal, que existe sob a forma de homodímeros em solução. Cada monômero é basicamente composto por duas α -hélices antiparalelas que se associam através de uma interface de dimerização majoritariamente hidrofóbica (VANNINI *et al.*, 2004; QIN *et al.*, 2004) (**Figura 3A**). TraM se liga ao receptor de QS TraR e inibe sua atividade de ligação ao DNA. TraM se liga tanto ao domínio C-terminal quanto a outras regiões de TraR, induzindo uma mudança conformacional no receptor que previne sua interação com promotores de DNA (CHEN *et al.*, 2007) (**Figura 3D**). O mecanismo de

anti-ativação envolve a dissociação do dímero de TraM e a interação de cada monômero com uma subunidade do dímero de TraR, formando um complexo TraM:TraR de estequiometria 2:2 (CHEN *et al.*, 2004; QIN *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2007) (**Figura 3D**). Costa *et al.* (2012) mostraram que o domínio C-terminal de ligação a DNA de TraR é altamente suscetível à degradação proteolítica, aumentando o *turnover* do receptor íntegro. A interação com TraM diminui o acúmulo de TraR em células de *P. aeruginosa*, sugerindo que TraM facilita a proteólise de TraR. Chen *et al.* (2006) identificaram um segundo anti-ativador de QS homólogo a TraM, denominado TraM2. Assim como TraM, TraM2 é composto por um feixe de hélices que se associam formando um dímero (**Figura 3B**). TraM2 também é capaz de formar um complexo estável com TraR, porém com menor afinidade (CHEN *et al.*, 2006).

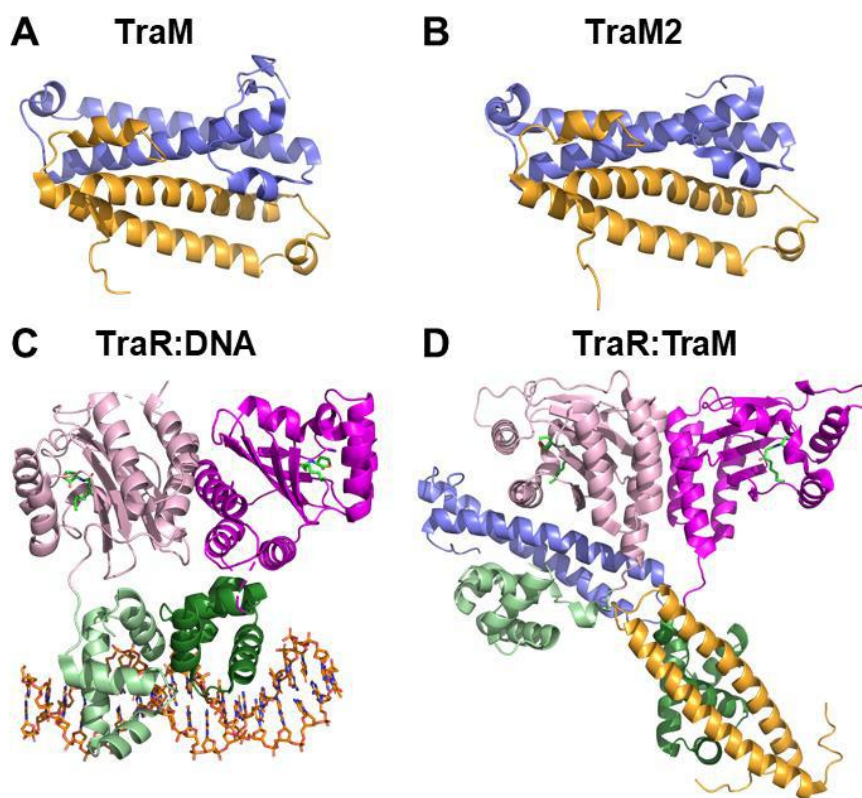


Figura 3: Estruturas tridimensionais de TraM, TraM2, TraR e seus complexos. (A) Estrutura cristalográfica de (A) TraM (1UPG) e (B) TraM2 (2HJD). Cada monômero está colorido em uma cor. (C) Estrutura cristalográfica do dímero de TraR ligado ao DNA. O domínio N-terminal, responsável pela ligação ao auto-indutor, está colorido em rosa, enquanto o domínio C-terminal, responsável pela ligação ao DNA, está colorido em verde. O auto-indutor está mostrado em verde. A sequência de DNA está representada em laranja. (D) Estrutura cristalográfica do complexo TraR:TraM (2Q0O) evidenciando a estequiometria proposta 2:2.

O receptor de QS TraR é do tipo LuxR e, portanto, apresenta em sua estrutura dois domínios funcionais, um domínio N-terminal de interação com o sinal molecular, responsável pela dimerização, e um domínio C-terminal de interação com o DNA. A ligação ao seu auto-indutor cognato N-(3-oxo-octanoil)-L-homoserinolactona (3-oxo-C8-HSL) promove a dimerização de TraR que, uma vez dimérico, interage com o DNA (FUQUA & GREENBERG, 2002; CHEN *et al.*, 2004) (**Figura 3C**). Um terceiro anti-ativador chamado TrIR apresenta alta similaridade de sequência com o domínio N-terminal de TraR, entretanto constitui uma forma truncada da proteína, pois não possui o domínio C-terminal. Portanto, TrIR não é funcional e não apresenta capacidade de ligação a DNA. Interessantemente, TrIR é capaz de formar heterodímeros com TraR que são inativos, pois não possuem capacidade de ligação a DNA. Desta forma, TrIR inibe a função de TraR (CHAI *et al.*, 2001).

Em *P. aeruginosa*, dois anti-ativadores de QS foram reportados recentemente. Por meio de experimentos de ativação gênica randômica, Siehnel *et al.* (2010) identificaram um regulador, chamado QteE (*quorum-threshold expression element*), capaz de bloquear a expressão de genes controlados por QS. QteE é uma proteína de 190 aminoácidos, cuja sequência não apresenta similaridade com a de nenhuma outra proteína até então conhecida. Em células de *P. aeruginosa*, a expressão de QteE resulta na diminuição da estabilidade do receptor LasR sem alterar os níveis de transcrição e tradução do gene *lasR*. Além disso, de forma paralela a LasR, este anti-ativador também é capaz de bloquear a sinalização via o sistema de QS RhII-RhIR. Por outro lado, a inativação deste anti-ativador provoca a perda do limiar crítico de concentração celular, importante para a construção do padrão de expressão dependente de quórum observado para muitos genes controlados por QS (SIEHNEL *et al.*, 2010). Apesar destas informações, o mecanismo pelo qual QteE inibe QS em *P. aeruginosa* ainda permanece desconhecido.

De forma semelhante, Seet *et al.* (2011) identificaram um segundo anti-ativador de QS em *P. aeruginosa*, denominado QslA (*quorum sensing lasR anti-activator*). A proteína QslA apresenta 104 resíduos de aminoácidos e, como QteE, não apresenta similaridade de sequência com outras proteínas descritas até hoje. A inativação desta proteína promove o aumento dos níveis de expressão de genes responsivos a QS, bem como o aumento da produção de fatores de virulência e da patogenicidade de

células de *P. aeruginosa*. Ao contrário de QteE, o mecanismo de ação de QslA é melhor compreendido. QslA bloqueia a expressão de genes controlados por QS por meio de interações proteína-proteína com o receptor LasR. Assim como os anti-ativadores de *A. tumefaciens*, QslA é uma proteína dimérica e altamente helicoidal (FAN *et al.*, 2013). O dímero de QslA interage com o monômero de LasR de tal forma a ocupar a sua interface de dimerização e, com isso, impedir a dimerização de LasR, prevenindo a ligação de LasR ao DNA e bloqueando o sistema QS (FAN *et al.*, 2013). Recentemente, foi mostrado que QslA interage diretamente com o domínio N-terminal do receptor QscR (*quorum sensing control regulator*) e assim, diminui a biossíntese de PCA (fenazina-1-ácido carboxílico) por células de *P. aeruginosa* (FANG *et al.*, 2018)

1.5 QsrO

Recentemente, um novo anti-ativador do mecanismo de QS foi descoberto em *P. aeruginosa*. Através de *screening* genético, foi possível encontrar um gene, denominado *qsrO* (*quorum sensing repressive ORF*), capaz de bloquear a expressão dos principais fatores de virulência (elastase, ramnolipídeos e piocianina) em *P. aeruginosa* (KÖHLER *et al.*, 2014). O gene *qsrO* está localizado num *operon* ao lado do gene *vqsM*, um regulador transcricional central em *P. aeruginosa*. A proteína QsrO apresenta 166 aminoácidos, ponto isoelétrico de 5,06 e não apresenta homologia com nenhuma outra sequência proteica conhecida até o momento. A expressão de QsrO reduz as taxas de expressão de genes responsivos a QS, bem como diminui a produção de fatores de virulência e a patogenicidade de células de *P. aeruginosa*, promovendo, assim, a perda do limiar crítico de concentração celular necessário para a produção do padrão de expressão dependente de quórum (KÖHLER *et al.*, 2014). Apesar disso, o mecanismo pelo qual QsrO inibe QS em *P. aeruginosa* é totalmente desconhecido, surgindo, assim, a necessidade da sua caracterização estrutural.

2. Objetivo

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo principal a caracterização oligomérica e conformacional do anti-ativador de *quorum sensing* QsrO de *Pseudomonas aeruginosa*.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Expressão do anti-ativador QsrO em sistema bacteriano;
- ✓ Purificação do anti-ativador QsrO recombinante;
- ✓ Análise do estado oligomérico do anti-ativador QsrO;
- ✓ Estudo de aspectos de estrutura secundária do anti-ativador QsrO;
- ✓ Análise da topologia tridimensional global do anti-ativador QsrO;
- ✓ Análise da estabilidade do anti-ativador QsrO frente a agentes desnaturantes.

3. Material e Métodos

3.1 Reagentes

Para o desenvolvimento do presente projeto foram utilizados diferentes reagentes certificadamente reconhecidos. Uma relação de tais reagentes e suas origens encontra-se descrita abaixo.

Reagente	Fabricante	Reagente	Fabricante
HEPES	Sigma-Aldrich	Persulfato de Amônio (PSA)	Sigma-Aldrich
Ditiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich	TEMED	Sigma-Aldrich
NaCl	Sigma-Aldrich	HCl	Sigma-Aldrich
Imidazol	Sigma-Aldrich	Dodecilsulfato de sódio (SDS)	Sigma-Aldrich
Maltose	Sigma-Aldrich	Comassie Blue R	Sigma-Aldrich
Acrilamida	Sigma-Aldrich	Padrão de peso molecular para SDS PAGE	Sigma-Aldrich
Canamicina	Sigma-Aldrich	NaOH	Sigma-Aldrich
Albumina Bovina Sérica (BSA)	Sigma-Aldrich	Tris	Sigma-Aldrich
β -mercaptoetanol	Sigma-Aldrich	Fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF)	Sigma-Aldrich
Bisacrilamida	Vetec	Bradford Protein Assay	Bio-Rad
Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG)	Thermo Cientific	Meio Luria-Bertani (LB)	Sigma-Aldrich
Triton X100	Sigma-Aldrich	Glicerol	Grupo Química

3.2 Meios de cultura

O cultivo das cepas bacterianas foi realizado em meio Luria-Bertani (LB) [triptona 10 g.L⁻¹, extrato de levedura 5 g.L⁻¹ e NaCl 5 g.L⁻¹]. O meio LB sólido foi composto pelo meio líquido acrescido de ágar 15 g.L⁻¹. Para o meio LB líquido, foi utilizada uma concentração final de 20 g.L⁻¹, enquanto que o meio sólido apresentou

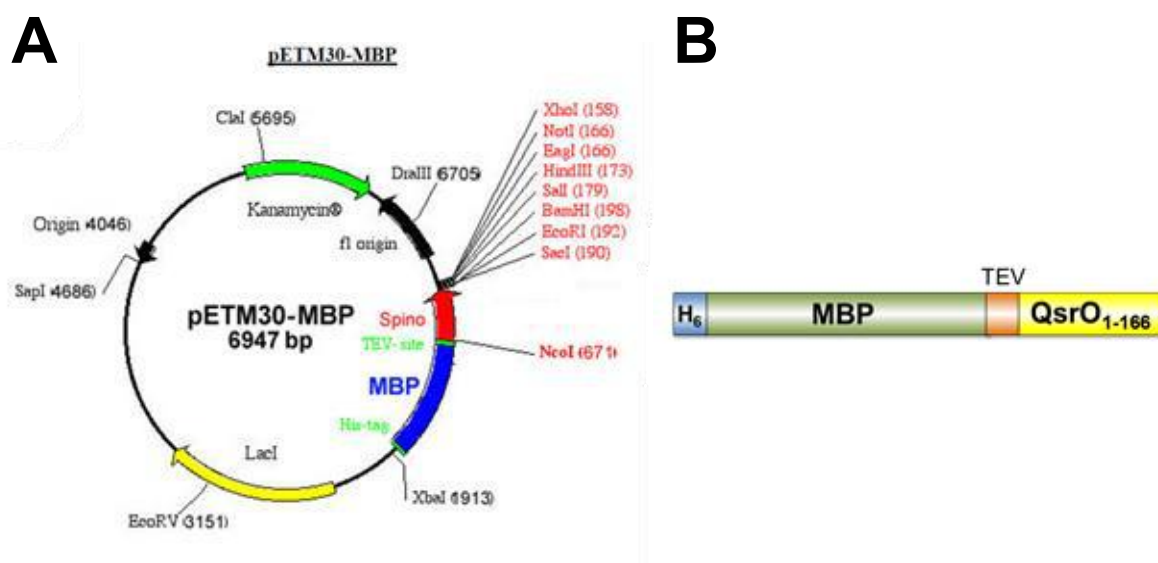
concentração final de 35 g.L⁻¹. Aos meios seletivos, foi adicionada canamicina em uma concentração final de 100 µg.mL⁻¹. O estoque de antibiótico foi preparado em uma concentração de 100 mg.mL⁻¹ com a utilização de água ultrapura (Milli-Q, fabricante Millipore) e esterilizado por filtração em membrana de poro 0,22 µm.

3.3 Cepas bacterianas

Ao todo, foram utilizadas duas cepas de *Escherichia coli*, sendo uma para armazenamento e propagação dos plasmídeos e outra para a expressão da proteína de interesse. Ambas as cepas foram gentilmente cedidas pela professora Bianca Cruz Neves do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro. A cepa *E. coli* DH5-α [genótipo: F- φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1] foi utilizada para estoque de plasmídeos, enquanto a cepa *E. coli* BL21(DE3) [genótipo: F- *ompT hsdSB*(rB-, mB-) *gal dcm* (DE3)] foi utilizada para a expressão das proteínas recombinantes.

3.4 Plasmídeos

Neste trabalho, foi utilizado o plasmídeo pETM30-MBP, que fusiona a proteína de interesse a uma cauda N-terminal de seis histidinas seguida da proteína ligadora de maltose (His₆MBP), além de um sítio de clivagem para a protease TEV. Este plasmídeo apresenta um promotor T7, origem de replicação *f1*, sendo resistente à canamicina (Kan^R) e originário do *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL), em Heidelberg, Alemanha. O mapa de restrição do plasmídeo está representado na **Figura 4**.



C

MKHHHHHPMKIEEGKLVIIWINGDKGYNGLAIEVGGKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGD
GPDI IWAHDRFGGYAQSGLLAEIT'PKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALS LIYNKDL
LPNPKTWEEI PALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGYDKIDVGVDNA
GAKAGLTFLVDLIKNKHMNADTDYSIAEAAFNKGETAMTINGPWAWSNIDTSKVNYGVTVLPTFK
GQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPLGAVALKS YEEELAKDPR
IAATMENAQKGEIMPNI PQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEALKDAQTNSSNNNNNNNNNNP
MSENLYFQGAMNFNRRNNQILSMAETQFDAYVLGYIAKARTISIAADSLRIEAEGSAMLAGLIS
DSCRKRRTQKNPFPYLLQLIAHEALDRIRLNLANIRNISSADALYKELLSQAAWDASVAMDNISE
FVEPDQGGVRVIERLVEFAHNSGIAEGQNLALALEAVLGLDVKSHF

Figura 4: Representação esquemática da construção His₆MBP-QsrO₁₋₁₆₆. (A) Mapa de restrição do plasmídeo pETM30-MBP. (B) Representação esquemática da proteína de fusão expressa em *E. coli*. A proteína foi fusionada a uma cauda N-terminal de seis histidinas, seguida da cauda de MBP e um sítio de clivagem para a protease TEV. (C) Sequência primária da proteína de fusão expressa em *E. coli* (~62 kDa). Em roxo, a cauda N-terminal de seis histidinas. Em azul, a proteína ligadora de maltose. Em vermelho, o sítio de clivagem para TEV. O único resíduo de triptofano da proteína está marcado em verde. Após a clivagem da cauda N-terminal, a construção QsrO₁₋₁₆₆ passou a apresentar uma massa molecular de ~18 kDa.

3.5 Métodos

3.5.1 Predição de estrutura secundária

Como a proteína QsrO₁₋₁₆₆ não apresenta similaridade de sequência com a de nenhuma proteína conhecida, foram feitas predições estruturais por meio de ferramentas de bioinformática a partir de sua sequência primária. Desta maneira, através da utilização dos softwares IUPred (iupred.enzim.hu), Psipred (bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred), PONDR (pondr.com), COILS (embnet.vital-it.ch/software/COILS_form) e BLASTp (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast), foi possível obter

informações preliminares acerca de possíveis regiões propícias a formação de *coiled-coils* e outros elementos estruturais, bem como a análise de prováveis sequências homólogas.

3.5.2 Transformação

Células de *E. coli* BL21(DE3) quimicamente competentes foram retiradas do congelador a -80°C em alíquotas de 200 μL e descongeladas em banho de gelo. Um volume de 2 μL de DNA plasmidial foi adicionado à alíquota de células competentes e a mistura foi incubada em banho de gelo por um período de 30 minutos. Em seguida, foi feito o choque térmico por 45 segundos a temperatura de 42°C , com subsequente banho de gelo por 2 minutos. Então, adicionou-se 800 μL de meio LB líquido e as amostras foram incubadas a 37°C por 1 hora sob agitação a 200 rpm. Passado este tempo, as células foram centrifugadas a 8000 X g ao longo de 30 minutos a 4°C . Foram retirados 930 μL do sobrenadante e o precipitado foi ressuspenso no volume de meio restante. Os 70 μL de suspensão bacteriana foram adicionados a uma placa de Petri previamente preparada com meio LB sólido seletivo acrescido do antibiótico canamicina na concentração prevista ($100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Com o auxílio de um rodo estéril, a suspensão bacteriana foi distribuída ao longo de toda a extensão da placa contendo ágar e a mesma foi incubada em estufa a 37°C *overnight* (~16h) para a formação de colônias macroscópicas.

3.5.3 Expressão de His₆MBP-QsrO₁₋₁₆₆

Células de *E. coli* BL21(DE3) foram previamente transformadas com o plasmídeo que codifica a construção His₆MBP-QsrO₁₋₁₆₆ e uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido seletivo acrescido de canamicina $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O cultivo foi deixado sob agitação constante a 200 rpm ao longo de 6 horas a temperatura de 37°C . Passado este período, 25 mL de meio LB líquido contendo canamicina $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ acrescidos de 250 μL deste cultivo foram incubados em constante agitação a 200 rpm na temperatura de 37°C , *overnight*, para o crescimento do pré-inóculo. Assim, o inóculo foi feito por meio da adição de 10 mL do pré-inóculo à 1 L de meio LB líquido previamente acrescido de canamicina $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e o mesmo foi incubado em agitação a 200 rpm e 37°C para acompanhamento da densidade

óptica a 600 nm até que o valor aproximado de 0,6 fosse atingido (D.O.₆₀₀). Neste momento, foi feita a indução da expressão da proteína de interesse com IPTG 1 mM permanecendo em agitação a 200 rpm e 18°C, *overnight*. Ao final da expressão, as células foram recolhidas por centrifugação a 8000 X g a 4°C durante 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet obtido foi ressuspenso em tampão de lise [HEPES 20 mM (pH 7,4), NaCl 200 mM, DTT 1 mM, PMSF 250 µM, Triton X100 0,1%]. Estas células foram, posteriormente, lisadas por sonicação em ciclos (20 segundos de sonicação em amplitude de 20% seguido de 59 segundos em banho de gelo) utilizando um sonicador modelo Sonica Vibracell. Em seguida, o *debris* celular foi removido por centrifugação a 8000 X g a 4°C durante 40 minutos.

3.5.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS PAGE)

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS PAGE) foi executada conforme descrito por LAEMMLI (1970) por meio da utilização do Mini-PROTEAN Tetra System (Bio-Rad). Os géis foram preparados a partir de uma mistura de bis-acrilamida 1% e acrilamida 29% (p/v). O gel fracionador 12% foi preparado por meio da adição de Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8) e SDS 10% (p/v) a esta mistura. O mesmo foi polimerizado através da adição de PSA 10% e TEMED. Já o gel concentrador (5%) foi preparado da mesma forma como no gel fracionador, diferindo-se apenas na utilização do tampão Tris-HCl 1,0 M (pH 6,8). Os volumes de cada componente utilizado para o preparo dos géis encontram-se descritos na **Tabela 1**. Todas as amostras proteicas analisadas por SDS PAGE foram acrescidas de tampão de amostra 1x [Tris-HCl 50 mM (pH 6,8), SDS 2% (p/v), DTT 100 mM, azul de bromofenol 0,1% (p/v) e glicerol 10% (v/v)] e incubadas em banho-Maria a 100°C ao longo de 5 minutos previamente a aplicação no gel. Os géis foram corridos a 30 mA ao longo de 1h e 30 minutos em tampão de corrida [Tris-HCl 25 mM (pH 8,3), Glicina 250 mM e SDS 0,1% (p/v)]. Após a separação eletroforética, as proteínas foram visualizadas por coloração com Comassie Blue R.

Tabela 1: Materiais utilizados na preparação dos géis de SDS PAGE com corrida em Tris-Glicina

Reagente	Gel Fracionador 12% Volume (mL)	Gel Concentrador 5% Volume (mL)
Água destilada	1,6	1,4
Mix de acrilamida 30%	2,0	0,33
Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8)	1,3	-
Tris-HCl 1,0 M (pH 6,8)	-	0,25
SDS 10%	0,05	0,02
PSA 10%	0,05	0,02
TEMED	0,005	0,002

Para a SDS PAGE em géis de Tris-Tricina, foram preparados dois géis, fracionador e concentrador, a partir de uma mistura de bis-acrilamida 1,5% e acrilamida 48% (p/v). O gel fracionador 18% foi preparado com a adição de Tris-HCl 3 M (pH 8,45) e SDS 0,3% (p/v) a esta mistura, além de glicerol 80%. O mesmo foi polimerizado através da adição de PSA 10% e TEMED. Já o gel concentrador foi preparado da mesma forma como o gel fracionador, diferindo-se apenas pela não utilização de glicerol. Os volumes utilizados de cada componente estão descritos na **Tabela 2**. Os géis foram corridos a 60 mA ao longo de 2h e 30 minutos e a cuba, imersa em banho de gelo, foi estruturada contendo diferentes tampões de corrida, dentro [Tris-HCl 0,5 M (pH 8,25), Tricina 0,5 M, SDS 1%] e fora [Tris-HCl 0,5 M (pH 8,9)] do suporte contendo as placas de gel. Após a separação eletroforética, as bandas foram visualizadas por coloração com Comassie Blue R.

Tabela 2: Materiais utilizados na preparação dos géis de SDS PAGE com corrida em Tris-Tricina

Reagente	Gel Fracionador 18% Volume (mL)	Gel Concentrador Volume (mL)
Água destilada	0,95	1,94
Mix de acrilamida 49,5%	1,8	0,375
Tris-HCl 3 M, SDS 0,3% (pH 8,45)	1,7	0,75
Glicerol 80%	0,55	-
PSA 10%	0,020	0,025
TEMED	0,004	0,005

3.5.5 Purificação

O processo de purificação de QsrO₁₋₁₆₆ foi realizado em três etapas, individualmente descritas nos itens 3.5.5.1, 3.5.5.2 e 3.5.5.3.

3.5.5.1 Cromatografia de afinidade à amilose

A primeira etapa consistiu em uma cromatografia de afinidade à amilose. Esta se deu pela utilização de uma coluna de MBPTrap (GE Healthcare) acoplada a um sistema de purificação FPLC Äkta Prime plus (GE Healthcare). Para tanto, executou-se a lise celular com a utilização de um sonicador modelo Sonica Vibracell e, após centrifugação a 8000 X g durante 40 minutos a 4°C, o sobrenadante contendo a proteína de interesse foi filtrado em membrana de poro 0,22 µm e injetado na coluna cromatográfica previamente equilibrada com tampão *Binding* [HEPES 20 mM (pH 7,4), NaCl 200 mM, DTT 1 mM]. A coluna foi então lavada com este mesmo tampão até o ponto em que o traçado de absorvância a 280 nm atingisse o valor da linha base. Em seguida, a eluição da proteína de interesse foi feita com tampão *Elution* [HEPES 20 mM (pH 7,4), NaCl 200 mM, DTT 1 mM, maltose 10 mM]. Ao longo de todo o processo, foram coletadas frações de cada etapa para posterior análise via SDS PAGE. As frações que continham a proteína de interesse foram incubadas com a protease His₆-TEV NIa (S219V) a razão molar de 1:5 (TEV:QsrO₁₋₁₆₆) por um período de 96 h a 4°C, com o intuito de separar a cauda ligadora de maltose. Passado este período, a amostra foi submetida a uma nova etapa de cromatografia.

3.5.5.2 Cromatografia de afinidade a níquel

A segunda etapa de purificação consistiu em uma cromatografia de afinidade a níquel (HisTag, GE Healthcare), acoplada a um sistema de purificação FPLC Äkta Prime plus (GE Healthcare). A coluna foi previamente equilibrada com tampão A [HEPES 50 mM (pH 8,0), NaCl 500 mM, imidazol 5 mM, β-mercaptoetanol 10 mM]. Após injeção da amostra, a coluna foi lavada com este mesmo tampão até o retorno da absorvância a 280 nm à linha base, momento no qual iniciou-se um gradiente contínuo de imidazol (5 a 500 mM) para a eluição da amostra. Este gradiente se deu a partir da mistura de tampão A e tampão B [HEPES 50 mM (pH 8,0), NaCl 500 mM, imidazol 500 mM, β-mercaptoetanol 10 mM]. As frações contendo a proteína de

interesse resultantes desta segunda etapa de purificação e identificadas por SDS PAGE foram concentradas por ultracentrifugação em sistema Centricon (Millipore) com uma membrana de porosidade de 3000 Da.

3.5.5.3 Cromatografia por exclusão molecular

Uma vez concentrada, a amostra foi submetida a última etapa de purificação, que consistiu em uma cromatografia por exclusão molecular por meio de uma coluna Superdex 75 PG HiLoad 16/600 (GE Healthcare) acoplada a um sistema de purificação FPLC Äkta Explorer (GE Healthcare). A coluna foi previamente equilibrada com tampão [HEPES 20 mM (pH 7,4), NaCl 100 mM, DTT 1 mM]. As frações de interesse foram identificadas por SDS PAGE, enquanto que a concentração final da amostra de proteína obtida foi determinada espectrofotometricamente utilizando-se o reagente Bradford 590 nm (Bio-Rad).

3.5.6 Dosagem de proteínas

Para a quantificação da amostra de proteína foi seguido um método colorimétrico que consistiu na utilização do reagente Bradford 590 nm. Em uma placa de 96 poços, foi feita a adição de 10 μ L de amostra e 200 μ L do reagente previamente diluído em água 4X. A reação foi incubada durante 5 minutos ao abrigo da luz para então ser feita a leitura do valor de absorbância da amostra a 590 nm utilizando-se um leitor de microplacas modelo Polaris (Celer). O valor de concentração da amostra foi determinado a partir de uma curva padrão feita com albumina bovina sérica (BSA) com intervalo de concentração de 0,025 a 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Todos os ensaios realizados foram conduzidos em triplicata.

3.5.7 Cross-linking seguido de SDS PAGE

Amostras de QsrO₁₋₁₆₆ a 50 μ M foram incubadas a temperatura ambiente ao longo de 10 minutos com o agente glutaraldeído (GDH), nas seguintes concentrações: 0 mM, 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM e 5 mM. Uma alíquota de 20 μ L foi retirada e a reação foi parada com a adição de Tris 1 M (pH 7,5). Paralelamente, o mesmo ensaio foi repetido utilizando uma concentração fixa de GDH em 5 mM e variando-se as

concentrações de QsrO₁₋₁₆₆, utilizando-se: 10 µM, 20 µM, 50 µM, 70 µM e 100 µM. Em seguida, as amostras foram analisadas via SDS PAGE.

3.5.8 Dicroísmo circular (CD)

Espectros de CD em UV distante (190-260 nm) foram coletados no espectropolarímetro Jasco-715 (Jasco Corporation). As amostras foram analisadas na concentração de 50 µM em tampão [fosfato de sódio 20 mM (pH 7,2), NaCl 100 mM, DTT 0,5 mM] com o auxílio de uma cubeta de quartzo de 1 mm de espessura. Seis espectros foram coletados com velocidade de 100 nm.min⁻¹, 0,1 s por ponto e 1 nm de largura de banda. Todos os espectros foram subtraídos do tampão correspondente.

3.5.9 Espectroscopia de fluorescência

3.5.9.1 Polarização de fluorescência

Para este ensaio, foi inicialmente realizada a marcação da amostra proteica com o fluoróforo fluorescamina. A 17 µM de QsrO₁₋₁₆₆, foi adicionada fluorescamina na proporção 1:3 (QsrO:fluorescamina) e a amostra foi mantida ao abrigo da luz ao longo de 5 minutos. Em uma placa de 96 poços preta, foi feita a adição de 150 µL de amostra em diferentes concentrações (17 µM, 13 µM, 7 µM, 4 µM, 1 µM, 0,5 µM, 0,1 µM, 0,05 µM, 0,01 µM, 0,006 µM, 0,003 µM e 0,001 µM), além de 5 µL de amostra previamente marcada. A placa foi então lida em um espectrofluorímetro SpectraMax M5 utilizando-se os comprimentos de onda de excitação e emissão em 390 nm e 475 nm, respectivamente. Para cada ponto, foram feitas 6 leituras, obtendo-se as médias posteriormente para análise.

3.5.9.2 Ligação a 1,8-ANS

Os experimentos de espectroscopia de fluorescência utilizando-se 1,8-anilinoftaleno-sulfonato (1,8-ANS) foram conduzidos no espectrofluorímetro modelo FP-8200 (Jasco). Para o preparo das amostras a serem analisadas, QsrO₁₋₁₆₆ a concentração de 5 µM em tampão [HEPES 20 mM (pH 7,4), NaCl 100 mM, DTT 1 mM] foi previamente incubada *overnight* com ureia em diferentes concentrações finais (0 M, 1 M, 2 M, 3 M, 4 M, 5 M, 6 M, 7 M e 8 M). Foi utilizada uma cubeta de quartzo

de 700 μL . À cada amostra foi adicionado 1,8-ANS a concentração final de 50 μM . Os espectros de emissão de fluorescência do 1,8-ANS foram coletados fixando-se o comprimento de onda de excitação em 360 nm e varrendo-se a emissão de 450 nm a 600 nm. A largura das fendas de excitação e emissão foi de 10 nm e foram coletados 3 espectros por concentração de ureia. Além disso, para a análise de fluorescência intrínseca, os espectros foram coletados com comprimento de onda de excitação em 280 nm e varredura de emissão de 315 nm a 400 nm, utilizando-se as mesmas larguras das fendas explicitadas acima. Posteriormente, o mesmo ensaio foi conduzido nas mesmas condições utilizando-se cloreto de guanidina como agente desnaturante em substituição a ureia, nas seguintes concentrações finais: 0 M, 1 M, 1,5 M, 2 M, 2,5 M, 3 M, 3,5 M, 4 M, 4,5 M, 5 M, 5,5 M e 6 M. Todos os espectros de fluorescência foram subtraídos da fluorescência do tampão utilizado.

3.5.10 Espalhamento de raio-X a baixo ângulo (SAXS)

O experimento de SAXS foi conduzido na linha de luz SAXS1 do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS, São Paulo, Brasil). As curvas de espalhamento foram coletadas utilizando um feixe de raios-X monocromático ($\lambda = 1,488 \text{ \AA}$), um detector bidimensional (Pilatus 300K) e um porta-amostra de aço contendo janelas de mica. A distância detector-amostra foi de 1 m, o que gerou um vetor de espalhamento na faixa de $0,01 < q < 0,45 \text{ \AA}^{-1}$, onde q é a magnitude do vetor de espalhamento definida como $q = 4\pi \sin \theta / \lambda$; (2θ é o ângulo de espalhamento). Os dados de espalhamento foram coletados utilizando 1 mg.mL^{-1} de QsrO₁₋₁₆₆ em tampão [HEPES 20 mM (pH 7,4), NaCl 100 mM, DTT 1 mM] a 25°C. Cada imagem foi coletada ao longo de 100 s, certificando-se previamente que a proteína não sofria radiólise, enquanto o espalhamento do tampão foi coletado durante 300 s. As curvas de espalhamento da amostra foram subtraídas do espalhamento do tampão. O raio de giro (R_g) de QsrO₁₋₁₆₆ foi obtido a partir da regressão linear de Guinier em valores de q apropriados ($q < 1.3/R_g$). A presença de regiões intrinsecamente desordenadas foi inferida pelo gráfico de Kratky ($q^2 \cdot I(q)$ vs. q) (DONIACH, 2001). A função de distribuição de pares de distâncias ($P(r)$) foi extraída da curva de espalhamento experimental utilizando-se a metodologia da transformada de Fourier indireta (TFI), que pode ser aplicada no caso de sistemas monodispersos (GLATTER & KRATKY,

1982; FEIGIN & SVERGUN, 1987; FOURNET & GUINIER, 1955). O programa GNOM (SVERGUN *et al.*, 1987; SVERGUN, 1992) foi utilizado para gerar os valores da função $P(r)$ a partir das curvas experimentais $I(q)$.

4. Resultados e Discussão

4.1 Purificação de QsrO₁₋₁₆₆

4.1.1 Cromatografia de afinidade à amilose

A proteína recombinante foi purificada por meio de uma combinação de técnicas cromatográficas. A primeira etapa consistiu em uma cromatografia de afinidade à amilose, uma vez que a construção His₆MBP-QsrO₁₋₁₆₆ apresenta uma cauda proteica ligadora de maltose (MBP). Assim, este processo de purificação baseia-se na interação entre a lectina contida na proteína de fusão e a resina cromatográfica. Desta maneira, é possível separar os contaminantes proteicos da construção de interesse, que fica especificamente aderida à resina cromatográfica. Posteriormente, por meio de lavagem com tampão contendo maltose ocorre a quebra da interação entre a MBP e a resina de amilose, possibilitando a eluição da amostra desejada. O perfil de eluição foi acompanhado por absorbância a 280 nm, como mostrado na **Figura 5A**, na qual é observado um único pico correspondente à eluição com maltose. A constituição proteica das amostras referentes ao pico de eluição foi avaliada por SDS PAGE. Como observado na **Figura 5B**, a eletroforese mostrou a presença de uma banda intensa correndo logo abaixo de 64 kDa, correspondente à proteína de fusão (His₆MBP-QsrO₁₋₁₆₆; ~62 kDa). A amostra proteica encontrava-se então separada de seus contaminantes majoritários.

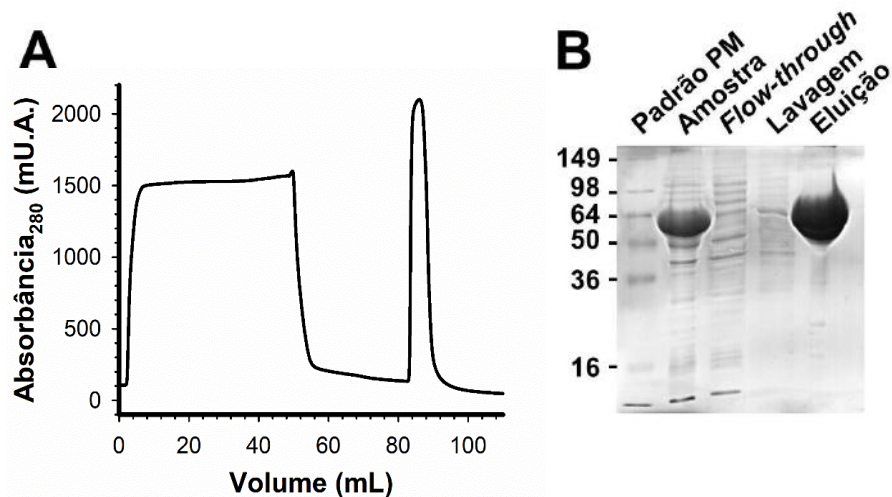


Figura 5: Purificação de His₆MBP-QsrO₁₋₁₆₆ por cromatografia de afinidade à amilose. (A) Cromatograma de eluição de His₆MBP-QsrO₁₋₁₆₆ da coluna de afinidade MBPTrap (GE Healthcare). (B) Análise via SDS PAGE das frações coletadas em A. Padrão PM: padrão de peso molecular; Amostra: fração anterior a cromatografia de afinidade à amilose; Lavagem: realizada com tampão *Binding* [HEPES 20 mM (pH 7,4), NaCl 200 mM, DTT 1 mM]; Eluição: realizada com tampão *Elution* [HEPES 20 mM (pH 7,4), NaCl 200 mM, DTT 1 mM, maltose 10 mM]. A proteína de fusão foi eluída na última etapa da cromatografia e corre no gel de SDS PAGE como uma banda pouco abaixo de 64 kDa.

O passo seguinte consistiu na clivagem da cauda N-terminal His₆MBP através da incubação da amostra com a protease His₆-TEV N1a (S219V). O processo de incubação se deu a 4°C por um período de 96 h em razão molar 1:5 (TEV:QsrO₁₋₁₆₆). A eficiência do processo de clivagem foi avaliada por SDS PAGE (**Figura 6**). Após 96 h de incubação, observa-se o aparecimento de 3 outras bandas eletroforéticas: (i) uma banda em ~50 kDa, referente à cauda His₆MBP; (ii) uma banda em ~28 kDa referente à protease His₆-TEV; (iii) uma banda em ~18 kDa (corre acima do padrão de 16 kDa) referente à QsrO₁₋₁₆₆. Mesmo após 96 h de incubação, ainda se observa a presença de uma banda em ~62 kDa, correspondente à proteína de fusão, indicando que a clivagem, nessas condições experimentais, não foi completa. Essa cinética de clivagem lenta é comumente observada para proteínas fusionadas à MBP, devido ao tamanho da cauda de expressão/solubilidade (BROWN *et al.*, 2008). Entretanto, a fração remanescente da construção His₆MBP-QsrO₁₋₁₆₆ não foi considerada significativa e não comprometeu o processo de purificação.

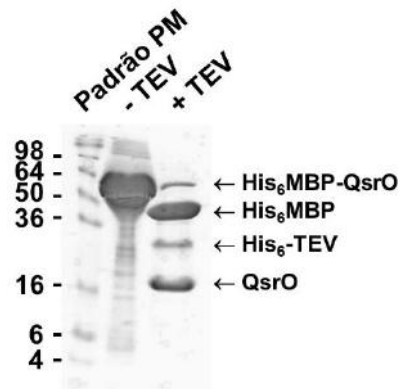


Figura 6: Clivagem de His₆MBP-QsrO₁₋₁₆₆ com TEV. Padrão PM: padrão de peso molecular; - TEV: His₆MBP-QsrO₁₋₁₆₆ purificada; + TEV: QsrO₁₋₁₆₆ após o período de incubação com TEV.

4.1.2 Cromatografia de afinidade a níquel

As amostras contendo QsrO₁₋₁₆₆ foram submetidas a segunda etapa do processo de purificação, que consistiu em uma cromatografia de afinidade a níquel, visando separar a proteína de interesse da cauda His₆MBP e da protease His₆-TEV. Como His₆MBP e His₆-TEV possuem uma cauda de polihistidinas (His₆), ocorre a interação destes resíduos com o níquel imobilizado na resina cromatográfica. Assim, enquanto a proteína de interesse é eluída diretamente no lavado, His₆MBP e His₆-TEV interagem com a resina, sendo eluídas por meio de um gradiente de imidazol, que atua como um competidor, sendo capaz de doar elétrons e formar ligações de coordenação com o metal de transição imobilizado. A **Figura 7A** mostra o cromatograma de eluição, através do qual se observa um único pico na concentração de ~140 mM de imidazol. A composição proteica das amostras coletadas ao longo desta etapa foi analisada por SDS PAGE (**Figura 7B**). O gel de eletroforese elucidou a presença de uma banda em ~18 kDa, correspondente à proteína de interesse (QsrO₁₋₁₆₆) nas etapas de lavagem, porém acrescida de uma banda em ~50 kDa relativa à His₆MBP, a ser eliminada até o fim do processo de purificação. Entretanto, grande parte de His₆MBP (~50 kDa), bem como a protease His₆-TEV (~28 kDa) e o remanescente da construção fusionada His₆MBP-QsrO₁₋₁₆₆ (~62 kDa) foram eliminadas nessa etapa de purificação intermediária (**Figura 7B**).

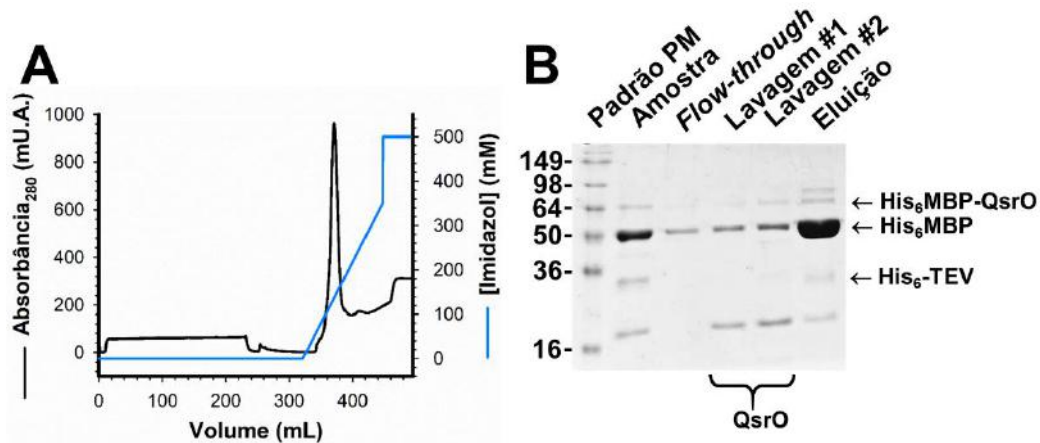


Figura 7: Purificação de QsrO₁₋₁₆₆ por cromatografia de afinidade a níquel. (A) Cromatograma de eluição de QsrO₁₋₁₆₆ da coluna de afinidade HisTrap (GE Healthcare). Em preto, a curva de absorbância a 280 nm. Em azul, o gradiente de imidazol. **(B)** Análise via SDS PAGE das frações coletadas em **A**. Padrão PM: padrão de peso molecular; Amostra: fração anterior a etapa de cromatografia de afinidade a níquel; Lavagem #1 e #2: realizada com tampão A [HEPES 50 mM (pH 8,0), NaCl 500 mM, Imidazol 50 mM, β-mercaptoetanol 10 mM]; Eluição: realizada com um gradiente de concentração produzido com tampão A e B [HEPES 50 mM (pH 8,0), NaCl 500 mM, Imidazol 500 mM, β-mercaptoetanol 10 mM]. A proteína de fusão foi eluída ao longo das lavagens #1 e #2, correndo como uma banda de ~18 kDa no gel de SDS PAGE.

4.1.3 Cromatografia por exclusão molecular

A última etapa de purificação consistiu na etapa de polimento, onde QsrO₁₋₁₆₆ foi separada de qualquer contaminante remanescente na amostra através de cromatografia por exclusão molecular. Como observado na **Figura 8A**, o cromatograma indica a presença de dois picos de eluição majoritários. Neste, o segundo pico, de maior intensidade, apresentou um volume de retenção de ~70 mL. A análise por SDS PAGE das frações coletadas ao longo do cromatograma revelou que o segundo pico se refere à cauda His₆MBP livre (**Figura 8B**). Além disso, o primeiro pico exibido no cromatograma, cuja intensidade é reduzida em relação ao segundo, apresentou um volume de retenção de 56 mL, sendo correspondente à proteína de interesse (**Figura 8**).

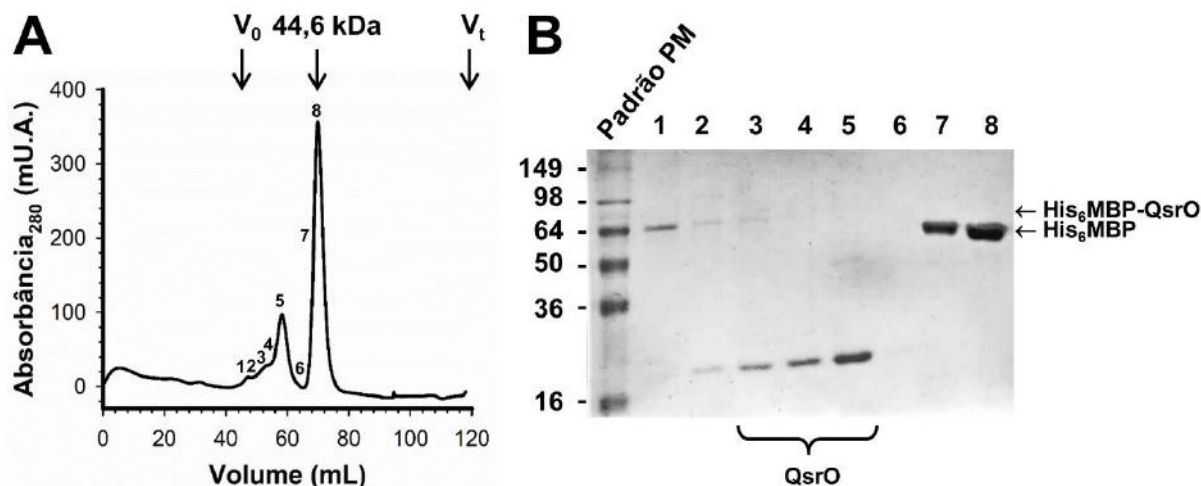


Figura 8: Purificação de QsrO₁₋₁₆₆ por cromatografia por exclusão molecular. (A) Cromatograma de eluição de QsrO₁₋₁₆₆ da coluna Superdex 75 PG HiLoad 16/600 (GE Healthcare) realizado em tampão HEPES 20 mM (pH 7,4), NaCl 100 mM, DTT 1 mM. **(B)** Análise por SDS PAGE das frações coletadas em **A**. Padrão PM: padrão de peso molecular; 1-7: constituição proteica das frações coletadas ao longo de **A** com correspondência numérica, ressaltando as bandas em ~18 kDa, correspondente à QsrO₁₋₁₆₆, assim como bandas em ~62 kDa e ~50 kDa, relativas à proteína de fusão e à cauda His₆MBP, respectivamente.

4.2 QsrO₁₋₁₆₆ adota dois estados oligoméricos: dímero e trímero

Visando caracterizar o estado oligomérico de QsrO₁₋₁₆₆, a amostra purificada na concentração de 1 mg.mL⁻¹ foi analisada por cromatografia por exclusão molecular (**Figura 9A**). O cromatograma mostrou a presença de dois picos, com volumes de retenção de, aproximadamente, 51 mL e 56 mL. A análise da constituição proteica das frações do cromatograma por SDS PAGE mostrou que os dois picos correspondiam à QsrO₁₋₁₆₆ e não a algum outro contaminante, sugerindo que QsrO₁₋₁₆₆ adota dois estados oligoméricos em solução (**Figura 9B**). Além disso, foi possível observar a presença de uma banda eletroforética em ~54 kDa (correndo ligeiramente abaixo do padrão de 55 kDa) para o primeiro pico, e uma segunda banda em ~36 kDa (correndo entre os padrões de 34 e 45 kDa) para o segundo pico de eluição, mesmo sob as condições desnaturantes da eletroforese, sugerindo que os dois picos se tratavam das formas dimérica e trimérica de QsrO₁₋₁₆₆ (**Figura 9B**). Vale ressaltar a presença de bandas abaixo da massa relativa ao monômero de QsrO₁₋₁₆₆ (na faixa de 10-5 kDa), referentes a eventuais peptídeos de degradação da amostra (**Figura 9B**).

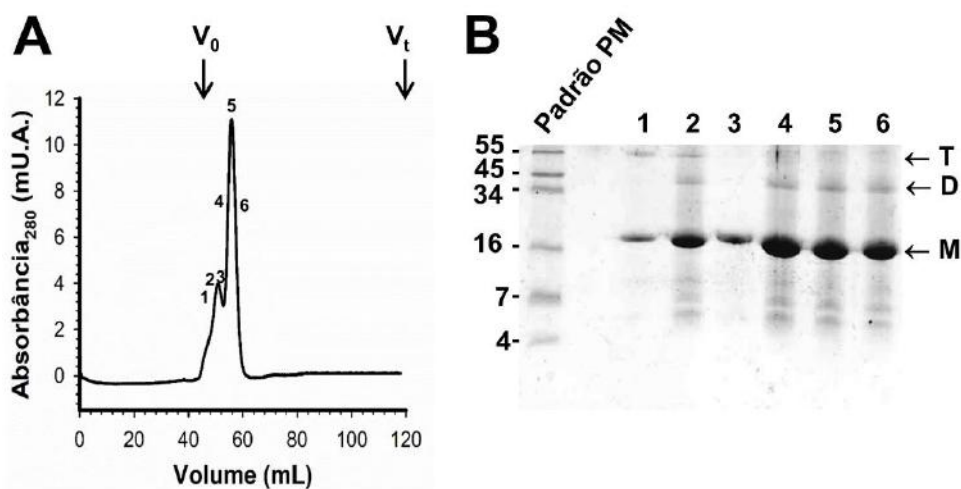


Figura 9: Análise da distribuição oligomérica de QsrO₁₋₁₆₆ por cromatografia por exclusão molecular. (A) Cromatograma de eluição de QsrO₁₋₁₆₆ (1 mg.mL⁻¹) da coluna Superdex 75 PG HiLoad 16/600 (GE Healthcare) realizado em tampão HEPES 20 mM (pH 7,4), NaCl 100 mM, DTT 1 mM. **(B)** Análise via SDS PAGE das frações coletadas em **A**, evidenciando-se as bandas relativas a monômeros (~18 kDa, 'M'), dímeros (~36 kDa, 'D') e trímeros (~54 kDa, 'T').

A fim de confirmar o resultado obtido com a SDS PAGE, foram conduzidos experimentos de *cross-linking*. De forma a promover a ligação covalente entre os monômeros de QsrO₁₋₁₆₆, lançou-se mão do agente glutaraldeído, que promove ligações cruzadas entre aminas primárias livres presentes na proteína, principalmente entre cadeias laterais de resíduos de lisina (COELHO-CERQUEIRA *et al.*, 2013). O aumento da concentração de glutaraldeído levou ao aparecimento de uma banda em ~36 kDa (correndo logo acima de padrão de 35 kDa), referente ao dímero de QsrO₁₋₁₆₆, além de uma segunda banda, de menor intensidade, que corre entre os padrões de 45 e 66 kDa, compatível com o trímero de QsrO₁₋₁₆₆ (54 kDa) (**Figura 10A**). É sabido que o glutaraldeído é um agente de *cross-linking* razoavelmente inespecífico (COELHO-CERQUEIRA *et al.*, 2013). Portanto, a fim de determinar se os resultados encontrados foram devido à difusão de moléculas de proteína em uma solução concentrada ou se, de fato, à interação física entre os monômeros de QsrO₁₋₁₆₆, não somente a concentração de glutaraldeído, mas também a concentração de proteína foi variada durante o experimento. Assim, caso o resultado do *cross-linking* fosse causado pela difusão de QsrO₁₋₁₆₆ em solução, seria esperado que a formação de oligômeros fosse dependente tanto da concentração de GDH quanto da concentração

de proteína. Portanto, nem o aumento da concentração de GDH nem o aumento da concentração de proteína promoveram o aparecimento de bandas de massa molecular mais elevada, compatíveis com oligômeros de maior ordem inespecíficos, sugerindo que os eventos de dimerização e trimerização observados para QsrO₁₋₁₆₆ são, de fato, específicos (**Figura 10B**).

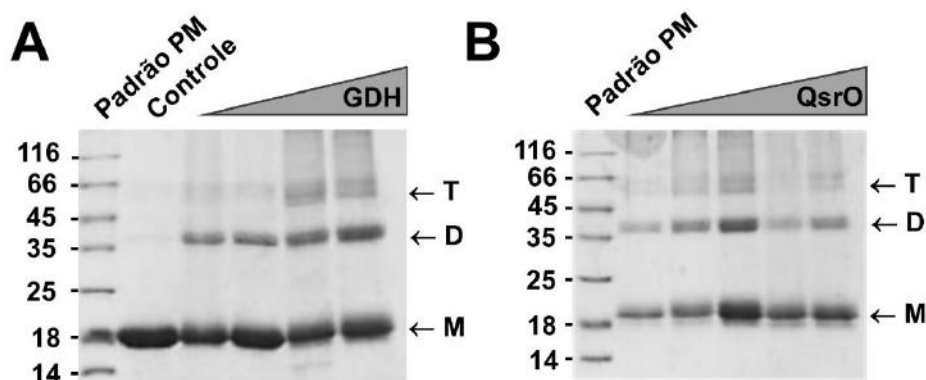


Figura 10: Análise da distribuição oligomérica de QsrO₁₋₁₆₆ por *cross-linking* seguido de SDS PAGE. (A) *Cross-linking* com [QsrO₁₋₁₆₆] fixa em 50 µM variando-se [GDH] seguido de SDS PAGE. Padrão PM: padrão de peso molecular, Controle: 0 mM GDH, GDH: [GDH] crescente: 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM e 5 mM. (B) *Cross-linking* com [GDH] fixa em 5 mM variando-se [QsrO₁₋₁₆₆] seguido de SDS PAGE. Padrão PM: padrão de peso molecular, QsrO: [QsrO] crescente: 10 µM, 20 µM, 50 µM, 70 µM e 100 µM.

Os volumes de retenção apresentados pela amostra proteica na cromatografia por exclusão molecular (**Figura 9A**) não são condizentes com a massa molecular de QsrO₁₋₁₆₆ em sua forma monomérica. No entanto, sabendo-se que, na realidade, se trata de duas outras formas oligoméricas, sendo estas dímero e trímero, ainda assim, os volumes de retenção se mostraram inferiores ao esperado para as massas referentes ao dímero e trímero de QsrO₁₋₁₆₆, caso se assuma que a proteína seja globular. A partir da curva de calibração da coluna de filtração em gel, utilizando como calibrantes as proteínas globulares aprotinina, ribonuclease A, anidrase carbônica, ovoalbumina, conalbumina e blue dextran (V_o), foi possível determinar o valor aproximado da massa molecular relativa a cada um dos volumes de retenção apresentados por QsrO₁₋₁₆₆ (**Figura 11A**). Com relação à forma dimérica, a massa molecular obtida através da curva de calibração foi de aproximadamente 50 kDa, em contraste com a massa real de 36 kDa. Da mesma forma, de acordo com a calibração, a espécie cujo volume de retenção foi 51 mL apresentaria 66,6 kDa, enquanto a forma trimérica, na realidade, possui 54 kDa (**Figura 11A**). Esse resultado sugere que QsrO₁₋

166 não é uma proteína globular e, portanto, elui da cromatografia de filtração em gel com um volume molecular maior do que o esperado, sugerindo que se trata de uma proteína com estrutura alongada.

Uma vez sabendo-se da existência de diferentes estados oligoméricos, o passo seguinte consistiu no estudo da afinidade de oligomerização. Para tal, foram conduzidos experimentos de polarização de fluorescência. Esta técnica permite reunir informações a respeito do tamanho da espécie fluorescente através da determinação do tempo de correlação rotacional. A polarização de fluorescência é definida pela diferença de intensidade entre a luz polarizada vertical e horizontalmente, sob condições de excitação da luz verticalmente polarizada, estando relacionada ao tempo de correlação rotacional do fluoróforo. A polarização depende do volume molecular que, por sua vez, é uma propriedade do tamanho e, portanto, a polarização é sensível a mudanças no tamanho da proteína que ocorrem mediante a formação de complexos (ROYER & SCARLATA, 2008). Neste experimento, a amostra foi marcada com a sonda fluorescente fluorescamina e a polarização de fluorescência foi medida em função da concentração de proteína. Era de se esperar que a polarização de fluorescência diminuísse conforme as espécies oligoméricas fossem dissociadas com a diluição da amostra de QsrO₁₋₁₆₆. No entanto, como pode ser visto na **Figura 11B**, este fato não ocorreu. Assim, os oligômeros de QsrO₁₋₁₆₆ não foram desfeitos mesmo a concentração de 1 nM, sugerindo que a constante de dissociação aparente (K_d) é abaixo de nanomolar, o que configura uma afinidade de oligomerização bastante elevada. A partir deste resultado, considera-se a possibilidade de a interface de oligomerização ser extensa e, portanto, muito afim.

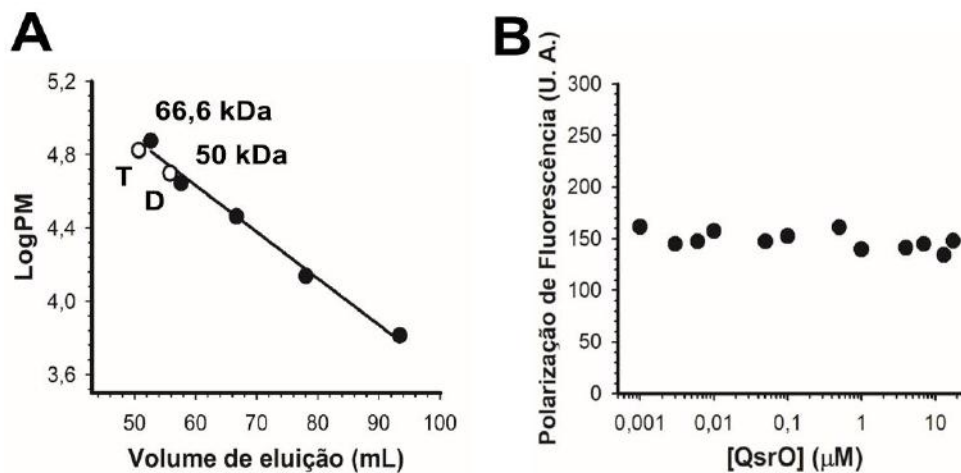


Figura 11: QsrO₁₋₁₆₆ é uma proteína não-globular com alta afinidade de oligomerização. (A) Curva de calibração da coluna Superdex 75 PG HiLoad 16/600 (GE Healthcare), ressaltando-se as massas moleculares encontradas para as formas dimérica e trimérica de QsrO₁₋₁₆₆. (B) Polarização de fluorescência para diferentes [QsrO₁₋₁₆₆], variando entre 0,001 μM e 10 μM em tampão HEPES 20 mM (pH 7,4), NaCl 100 mM, DTT 1 mM.

4.3 QsrO₁₋₁₆₆ é uma proteína composta por α-hélices

Para reunir mais informações acerca deste anti-ativador, predições estruturais foram feitas através do uso de ferramentas de bioinformática a partir da sequência primária de QsrO₁₋₁₆₆. Por meio destas predições, obtém-se dados preliminares acerca de possíveis regiões desenoveladas e de elementos de estrutura secundária. Os programas IUPred (iupred.enzim.hu) e PONDR (pondr.com) foram utilizados para a investigação do grau de desordem (**Figura 12A**). De acordo com o resultado apresentado pelo programa IUPred, a proteína de interesse seria completamente enovelada, não possuindo regiões intrinsecamente desordenadas. Já pela predição resultante do programa PONDR, estariam presentes duas regiões de maior grau de desordem, localizadas entre os resíduos 36-59 e 116-148, que poderiam representar regiões sem estrutura secundária organizada, como regiões de alças. No entanto, como a tendência geral de desordem foi pequena, pode-se considerar que QsrO₁₋₁₆₆ seja uma proteína majoritariamente estruturada. Além disso, a partir da análise de estrutura secundária fornecida pelo programa Psipred (bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred), este anti-ativador de QS seria composto quase exclusivamente por α-hélices, sendo seis ao todo, e uma única fita-β (**Figura 12B**). Contudo, esta fita-β seria composta apenas por três resíduos, não sendo suficiente para a estabilização desta estrutura.

Com isso, a partir da predição de estrutura secundária, QsrO₁₋₁₆₆ foi considerada como sendo composta exclusivamente por α -hélices.

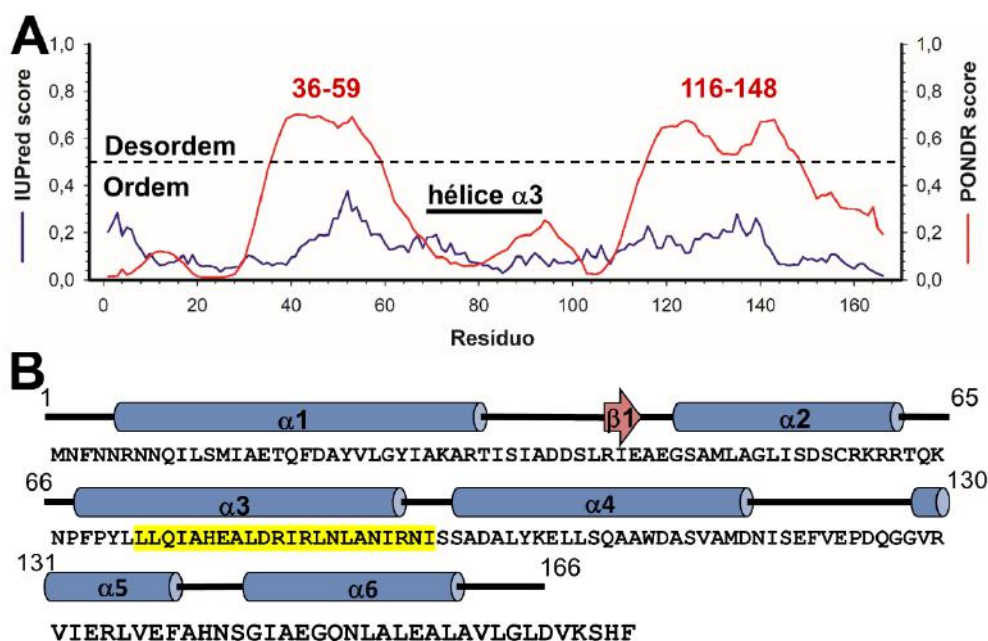


Figura 12: Predições de elementos de estrutura secundária e enovelamento por bioinformática. (A) Predição de regiões desenoveladas utilizando os programas IUPred (linha azul) e PONDR (linha vermelha). QsrO₁₋₁₆₆ é predita de ser parcialmente enovelada. (B) Predição de estrutura secundária utilizando o programa Psipred. As α -hélices estão representadas por cilindros azuis, as regiões de alça, por linhas pretas e a fita- β , por uma seta vermelha. Em amarelo está destacado o trecho de sequência primária predito de formar *coiled-coil*. QsrO₁₋₁₆₆ é predita de ser majoritariamente constituída por α -hélices.

De forma a analisar o conteúdo de estrutura secundária e validar as predições realizadas, a proteína foi submetida à análise por dicroísmo circular (CD). O espectro de CD revelou sinais característicos de estrutura α -helicoidal, apresentando mínimos em 211 e 222 nm, além de um máximo em 195 nm, característico de proteínas enoveladas (**Figura 13A**). Ainda, não foram observados sinais indicativos da presença de folha- β , confirmando a hipótese prévia de que se trata de uma proteína composta unicamente por um feixe de α -hélices.

Visto que QsrO₁₋₁₆₆ é uma proteína majoritariamente helicoidal e capaz de formar oligômeros (dímeros e trímeros), surgiu a hipótese de que a oligomerização seria mediada por estruturas em *coiled-coil*. Assim, o programa COILS (embnet.vital-it.ch/software/COILS_form) foi utilizado para avaliar a propensão da sequência primária de QsrO₁₋₁₆₆ de formar *coiled-coil*. Como observado na **Figura 13B**, foi

assinalada a probabilidade de haver formação de *coiled-coil* entre os resíduos 72 e 93. Porém, a predição não apresentou alto grau de probabilidade (**Figura 13B**). Ao relacionar a região predita de formar *coiled-coil* com a estrutura secundária sugerida pelo programa Pspred, nota-se que a hélice $\alpha 3$ ocupa parcialmente o sítio predito como *coiled-coil*, realçado em amarelo na **Figura 12B**.

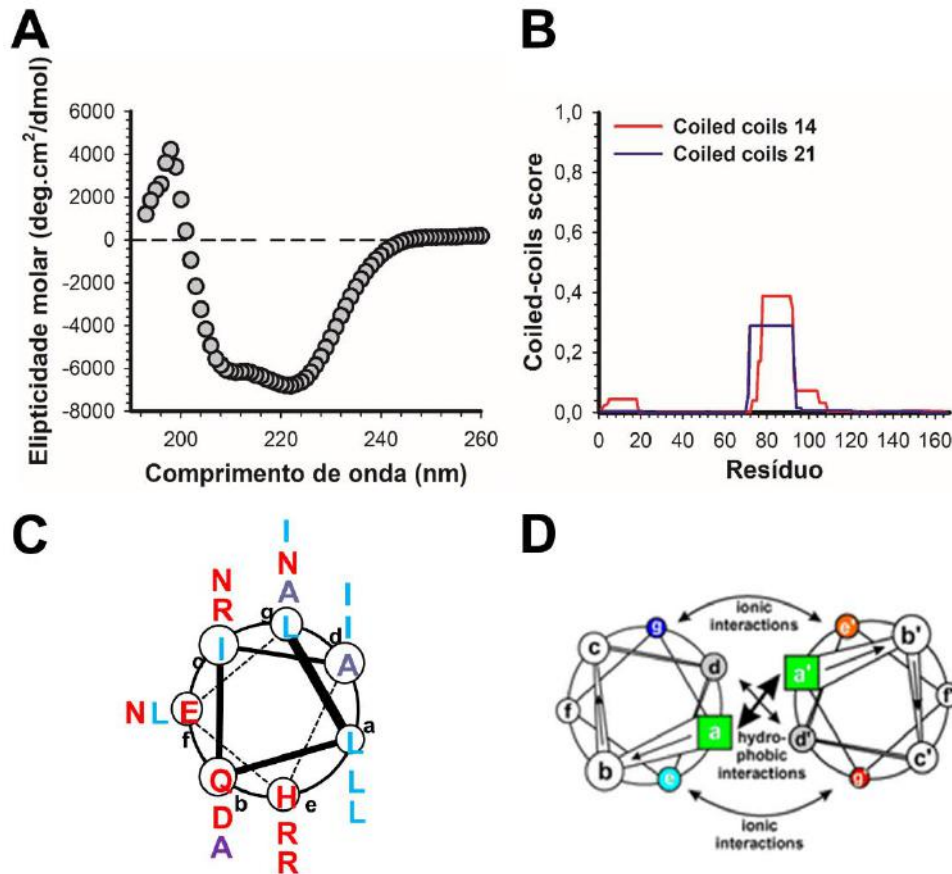


Figura 13: Análise de estrutura secundária e propensão a *coiled-coil* de QsrO₁₋₁₆₆. (A) Análise de estrutura secundária por dicroísmo circular. O experimento foi realizado em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7,2), NaCl 100 mM, DTT 0,5 mM. QsrO₁₋₁₆₆ apresenta um espectro de CD condizente com o esperado para proteínas α -helicoidais. (B) Predição de *coiled-coil* na estrutura de QsrO₁₋₁₆₆ obtida com a ferramenta COILS. A amostra apresenta propensão à formação de estrutura em *coiled-coil* entre os resíduos 72 a 93. (C) Posições características de um *coiled-coil* e resíduos da sequência de QsrO₁₋₁₆₆ que as ocupam. Em azul estão assinalados os resíduos hidrofóbicos, em vermelho estão os polares, carregados ou não, e em roxo estão os apolares. (D) Representação esquemática das interações usuais ocorridas entre posições características na estrutura de um *coiled-coil* dimérico (MASON & ARNDT, 2004).

Estruturas do tipo *coiled-coil* são estabilizadas por interações entre determinadas posições, que vão de 'a' a 'g', estando localizadas ao longo do eixo

longitudinal da α -hélice. De maneira geral, as posições 'a' e 'd' são ocupadas por resíduos hidrofóbicos encontrados na interface entre as duas hélices e assim, são capazes de estabilizar o *coiled-coil* por meio de interações hidrofóbicas e de Van der Waals (**Figura 13D**). Nesse sentido, Crick (1953) sugeriu que a natureza não polar dos resíduos que ocupam as posições 'a' e 'd' facilita a dimerização ao longo de uma face de cada hélice. Enquanto isso, as posições 'e' e 'g' são ocupadas por resíduos carregados/polares expostos ao solvente que conferem especificidade entre ambas as hélices por interações eletrostáticas (**Figura 13D**). Ainda, as posições remanescentes ('b', 'c' e 'f') devem ser hidrofílicas, formando superfícies helicoidais expostas ao solvente (MASON & ARNDT, 2004; O'SHEA *et al.*, 1993; GRADDIS *et al.*, 1993). Como mostrado na **Figura 13C**, as posições 'a' e 'd' de um suposto *coiled-coil* presente em QsrO₁₋₁₆₆ seriam sempre ocupadas por resíduos apolares/hidrofóbicos. A posição 'a' seria sempre ocupada por um resíduo de leucina, enquanto a posição 'd' seria ocupada, na primeira volta, por um resíduo de alanina e, nas demais voltas, por resíduos de isoleucina. Ainda, a posição 'e' do *coiled-coil* de QsrO₁₋₁₆₆ seria ocupada por resíduos básicos, como arginina e histidina. Já a posição 'g' seria ocupada, na maior parte, por resíduos de natureza hidrofóbica, como isoleucina e leucina, entretanto resíduos polares, como asparagina, também estariam presentes. Portanto, o suposto *coiled-coil* de QsrO₁₋₁₆₆ seria principalmente estabilizado por interações hidrofóbicas entre os resíduos que ocupam as posições 'a' e 'd' da hélice α 3 (**Figura 13C**).

Outros anti-ativadores de QS, como TraM e TraM2, são capazes de formar dímeros e, no caso de TraM, trímeros, ainda que a forma dimérica seja majoritária (QIN *et al.*, 2004; VANNINI *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2006). A estrutura de TraM revela que o monômero consiste em duas longas α -hélices interligadas, sendo que uma hélice de cada monômero também interage entre si, formando um *coiled-coil* com extensa interface de dimerização. Ainda, este evento é primordial para a manutenção da atividade inibitória de TraM (QIN *et al.*, 2004). De forma semelhante, TraM2 existe como um feixe de quatro hélices, sendo duas α -hélices longas e duas curtas. As hélices maiores dão origem a um *coiled-coil* antiparalelo que, juntamente com a interação entre as hélices α 2 e α 4 de cada monômero, resultam no homodímero de TraM2 (CHEN *et al.*, 2006). Por outro lado, GCN4, um ativador transcricional de

Saccharomyces cerevisiae, consiste em um *coiled-coil* com equilíbrio oligomérico crucial para a sua atividade de ligação a DNA. Dependendo da condição experimental, observa-se a interconversão entre as formas dimérica e trimérica de GCN4 (OSHABEN *et al.*, 2012). A longa superfície hidrofóbica existente em cada α -hélice e a complementariedade precisa entre os resíduos envolvidos são determinantes críticos para a formação do *coiled-coil*, o que, por sua vez, influencia diretamente no estado oligomérico adotado por GCN4. Ao relacionar tais características estruturais com as observadas para QsrO₁₋₁₆₆, estima-se que a presença de *coiled-coils*, predita por bioinformática e sugerida por CD, uma vez que se trata de uma proteína altamente helicoidal, fundamente a presença de estados oligoméricos de maior ordem e, como visto para outras proteínas de função semelhante à de QsrO₁₋₁₆₆, represente um fator importante para o seu papel anti-ativador.

4.4 A hélice α 3 pode estar envolvida na oligomerização de QsrO₁₋₁₆₆

Como dito anteriormente, QsrO₁₋₁₆₆ não apresenta homologia de sequência primária com nenhuma outra proteína conhecida até o presente momento. No entanto, ao realizar uma comparação contra sequências de organismos modelo através da ferramenta de bioinformática BLASTp (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast) foi detectada uma pequena sequência de 25 aminoácidos em QsrO₁₋₁₆₆ com grande similaridade a uma sequência presente na proteína bacteriana OmpR (**Figura 14A**).

Apesar de ser aqui apresentada a sequência primária da proteína de *Escherichia coli*, OmpR pode ser encontrada em diferentes bactérias, sendo considerada um regulador de resposta, em outras palavras, uma proteína envolvida na transdução de sinal intracelular. Bactérias não são capazes de fosforilar resíduos de serina ou tirosina, possuindo enzimas quinases específicas para histidinas (BARBIERI *et al.*, 2013). Assim, uma vez fosforilados por uma histidina quinase em seus domínios N-terminais, estes reguladores de resposta encontram-se ativos e aptos a ativar a transcrição gênica, ligando-se ao DNA através de seus domínios C-terminais (BARBIERI *et al.*, 2013; JEON *et al.*, 2001; TORO-ROMAN *et al.*, 2005; MACK, 2008). Ainda, proteínas pertencentes à família da OmpR são diméricas e a conformação e orientação entre os monômeros na estrutura do homodímero muda quando a proteína é fosforilada, de forma a viabilizar a interação do domínio C-terminal

com o DNA, atuando então como fatores de transcrição (BARBIERI *et al.*, 2013; HARLOCKER *et al.*, 1995).

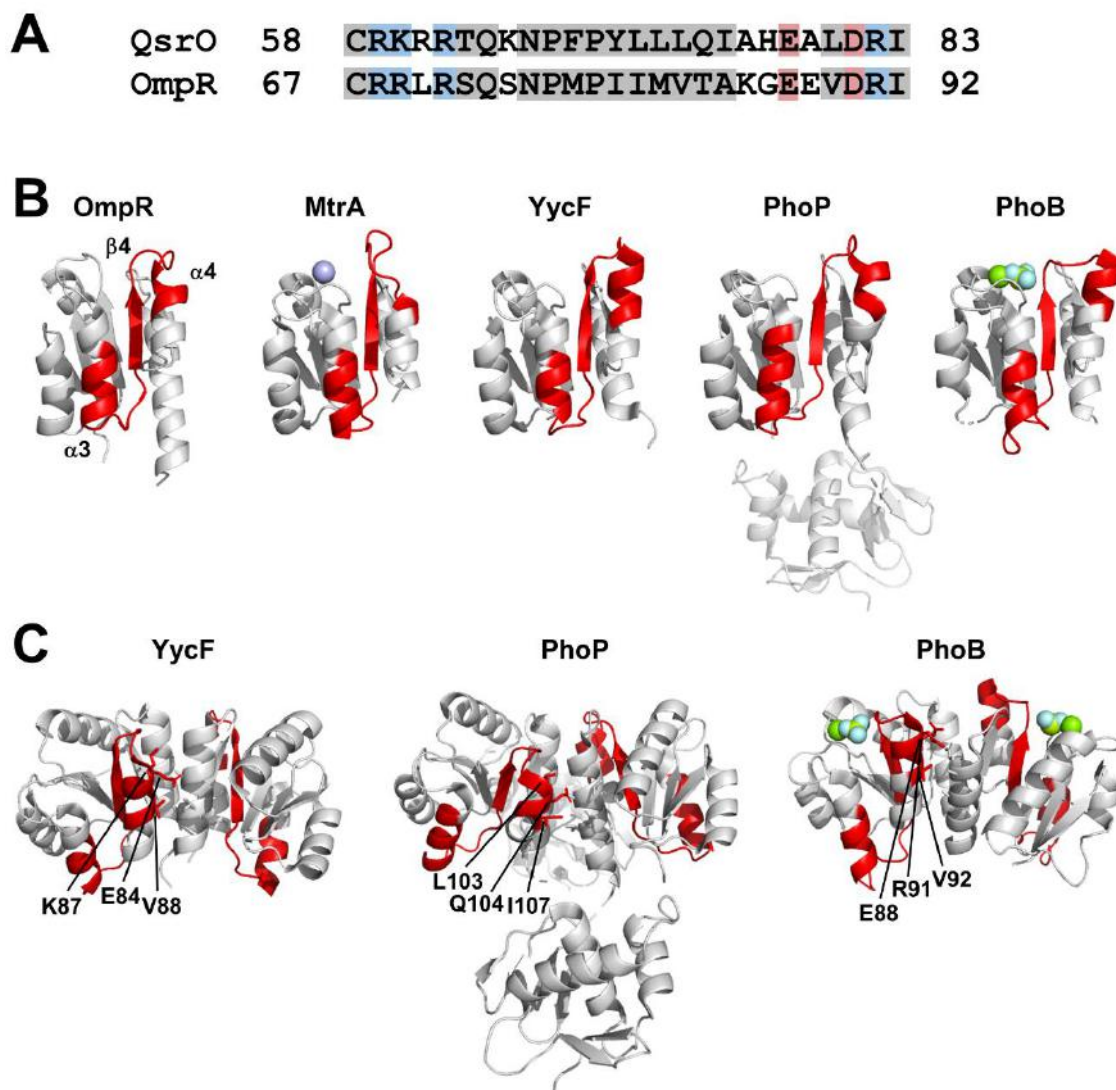


Figura 14: Uma sequência de 25 aminoácidos em QsrO₁₋₁₆₆ é homóloga a OmpR. (A) Homologia de sequência entre os resíduos 58 e 83 de QsrO₁₋₁₆₆ e os resíduos 67 e 92 de OmpR. Destacados em vermelho, estão os resíduos polares negativos, em cinza, estão os resíduos apolares, em azul, estão os polares positivos e os resíduos não destacados não apresentam similaridade entre os aminoácidos naquelas posições. **(B)** Modelo estrutural de OmpR e estruturas tridimensionais cristalográficas de seus homólogos no estado monomérico. PhoP é representada em conjunto com seu domínio C-terminal, uma vez que sua estrutura já foi integralmente elucidada. Em vermelho, está destacada a estrutura formada pela sequência de aminoácidos presente em OmpR assinalada em **A**. **(C)** Estrutura tridimensional cristalográfica dos dímeros formados por três dos homólogos de OmpR apresentados em **B**. Em vermelho, destaca-se a sequência de aminoácidos presente em OmpR marcada em **A**.

Com base neste resultado, investigamos o papel estrutural/funcional desta sequência em OmpR, com o intuito de extrapolar estas informações para a proteína em estudo, QsrO₁₋₁₆₆. Contudo, como OmpR não teve sua estrutura tridimensional determinada até o momento, foi analisado então o modelo tridimensional de OmpR, construído por homologia de sequência, bem como as estruturas experimentais de proteínas homólogas. A **Figura 14B** exibe o modelo conformacional de OmpR, seguido de estruturas cristalográficas dos homólogos de OmpR aqui avaliados em seus estados monoméricos. Como pode ser observado, a sequência homóloga a QsrO₁₋₁₆₆ (C67 a I92) forma, em OmpR, os seguintes elementos de estrutura secundária: região C-terminal da hélice α_3 , fita β_4 e região N-terminal da hélice α_4 . É interessante notar que esta mesma sequência nos homólogos de OmpR dá origem aos mesmos elementos de estrutura secundária. Dentre os homólogos estudados, as proteínas YycF, PhoP e PhoB estão também representadas em suas formas diméricas (**Figura 14C**). Ao avaliar a contribuição desta sequência para a manutenção da estrutura quaternária das proteínas em questão, observamos que a hélice α_4 está envolvida em suas interfaces de dimerização. Assim, seria possível que parte desta sequência, principalmente a região C-terminal, também participasse da interface de oligomerização de QsrO₁₋₁₆₆, sendo importante para o estabelecimento do alto grau de afinidade observado para as espécies oligoméricas de QsrO₁₋₁₆₆. Vale ressaltar que a região C-terminal desta sequência, o que seria equivalente à região N-terminal da hélice α_4 na estrutura dos reguladores de resposta, se sobrepõe à sequência predita para formar a hélice α_3 em QsrO₁₋₁₆₆ (**Figura 12B**), sugerindo mais uma vez que a hélice α_3 poderia estar envolvida na oligomerização de QsrO₁₋₁₆₆.

4.5 QsrO₁₋₁₆₆ adota uma forma alongada não-globular

Experimentos de espalhamento de raio-X a baixo ângulo (SAXS) são particularmente informativos acerca da topologia global de proteínas. Com isso, QsrO₁₋₁₆₆ foi submetida às medidas de SAXS. A **Figura 15A** mostra a curva de espalhamento, onde a intensidade da luz espalhada está mostrada em função da magnitude do vetor de espalhamento q .

A partir dos dados experimentais, foram feitas diversas análises a fim de avaliar tanto o tamanho quanto o formato global de QsrO₁₋₁₆₆. Em 1939, Guinier mostrou a

relação entre a intensidade de espalhamento em regiões de baixos valores de q ($q \rightarrow 0$) e o raio de giro (R_g) da partícula, mostrada na equação abaixo (GUINIER, 1939). Como a obtenção de menores valores de q está relacionada à distância entre a amostra e o detector, não é possível obter um valor de intensidade em $q = 0$, sendo obtido então pela extrapolação da curva.

$$I(q \rightarrow 0) = I(0) \cdot e^{-\frac{q^2 R_g^2}{3}}$$

Assim, analisando-se somente os pontos iniciais da curva de espalhamento, ao relacionar a intensidade em valores de q em escala logarítmica com q^2 , a curva é linearizada e obtém-se um valor numérico para o raio de giro através do coeficiente angular desta reta. Para QsrO₁₋₁₆₆, foi obtido um valor de raio de giro de 6,49 nm (**Figura 15B**). É possível relacionar este valor à massa molecular de proteínas globulares (SMILGIES & FOLTA-STOGNIEW, 2015), o que acusou uma proteína de massa molecular acima de 300 kDa. Sabe-se que tal massa está muito acima do valor esperado para QsrO₁₋₁₆₆ (dímero - 36 kDa; trímero - 54 kDa), o que sugere que QsrO₁₋₁₆₆ não adota uma estrutura globular em solução. Além disso, um valor de R_g na ordem de 6,49 nm é consideravelmente elevado, o que sugere que QsrO₁₋₁₆₆ seja muito anisotrópica, apresentando uma distribuição de massa não esférica ao redor do seu centro de massa.

Paralelamente, também se estudou a possível presença de regiões desenoveladas e/ou parcialmente enoveladas na proteína através da análise de Kratky (KRATKY & POROD, 1949; GLATTER & KRATKY, 1982). O gráfico de Kratky é sensível ao grau de compactação da proteína, sendo empregado no estudo do processo de desenovelamento proteico ou de proteínas intrinsecamente desordenadas. O gráfico de Kratky é obtido através da representação do dado experimental como $I(q) \cdot q^2$ versus q . Para proteínas enoveladas, a curva mostra um comportamento sinusóide. Além disso, ao interpretarmos o comportamento da curva em regiões de q elevado, proteínas enoveladas mostram uma curva descendente, enquanto proteínas desenoveladas mostram uma curva ascendente (DONIACH, 2001). Como exibido na **Figura 15C**, a curva para QsrO₁₋₁₆₆ apresenta um formato sinusóide com comportamento decrescente em altos valores de q , sugerindo ausência de regiões desenoveladas.

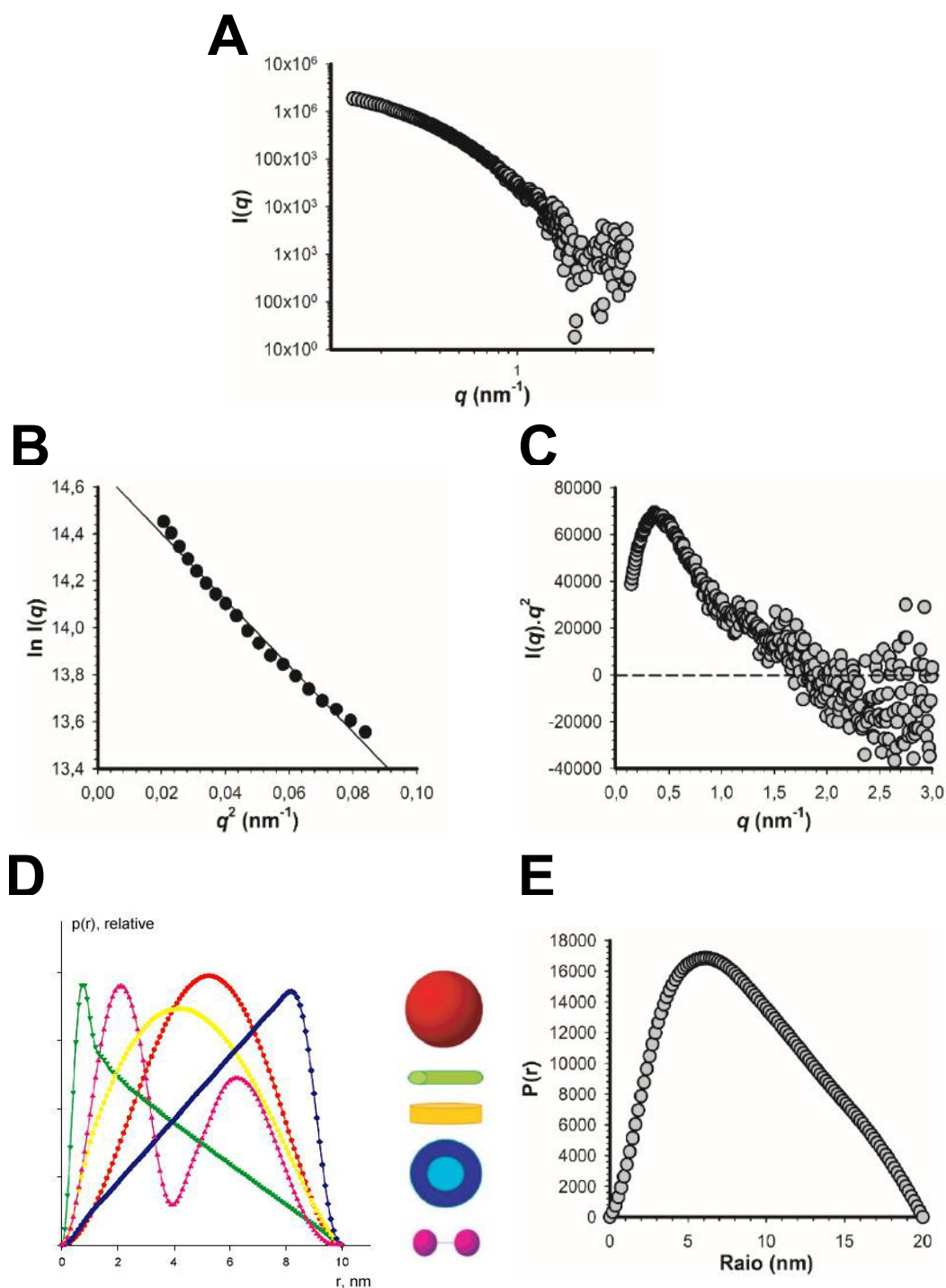


Figura 15: Análise de parâmetros topológicos de QsrO₁₋₁₆₆. (A) Curva de espalhamento de QsrO₁₋₁₆₆ a concentração de 1 mg.mL⁻¹ em tampão HEPES 20 mM (pH 7,4), NaCl 100 mM, DTT 1 mM. (B) Análise de Guinier, obtendo-se o valor do raio de giro (6,49 nm) a partir do coeficiente angular da curva linearizada. (C) Análise de Kratky. O formato sinusóide e decrescente em valores de q elevados sugere que QsrO₁₋₁₆₆ é uma proteína totalmente enovelada. (D) Comportamentos típicos de diferentes formas globais frente a análise de distribuição de pares de distância, $P(r)$ (SVERGUN & KOCH, 2003). (E) Função de distribuição de pares de distância, $P(r)$, para QsrO₁₋₁₆₆. Em comparação com D, QsrO₁₋₁₆₆ apresenta formato cilíndrico.

Outra análise que pode ser feita a partir dos resultados de SAXS é a distribuição de pares de distância, $P(r)$, que reporta acerca da topologia global da partícula. $P(r)$ é obtida a partir da transformada de Fourier indireta da curva de espalhamento e está relacionada à estrutura interna da partícula, fornecendo informações acerca do tamanho da proteína (dimensão máxima, D_{\max}) e formato global (GLATTER & KRATKY, 1982; FOURNET & GUINIER, 1955; SVERGUN *et al.*, 1987; FEIGIN & SVERGUN, 1987). Esta análise consiste no histograma de distribuição de diferentes distâncias entre dois pontos quaisquer presentes no interior da partícula. A **Figura 15E** mostra a curva de $P(r)$ calculada para QsrO₁₋₁₆₆, onde observa-se que a maioria das distâncias entre pares internos não se encontram distribuídas ao redor dos valores medianos de raio, mas sim em valores mais baixos. Isto sugere que: (i) a partícula não é esférica; (ii) a existência de muitos pares internos de curta distância em contraste a poucos pares internos de longa distância. Ainda, ao comparar a curva da $P(r)$ experimental com as curvas características de cada formato global (**Figura 15D**), o formato cilíndrico guarda grande semelhança com a distribuição apresentada por QsrO₁₋₁₆₆. Uma vez se tratando de uma proteína com formato alongado capaz de formar oligômeros em solução, é possível que a interface de oligomerização ocorra ao longo do eixo principal do cilindro de QsrO₁₋₁₆₆, o que explicaria o grande número de contatos físicos entre monômeros e a alta afinidade (abaixo de nM) inferida a partir dos resultados de polarização de fluorescência (**Figura 11B**).

Ainda, ao comparar as características estruturais de QsrO₁₋₁₆₆ com as de TraM e TraM2, nota-se que há certa semelhança no padrão de formato global alongado. Desta maneira, ainda que não haja similaridade de sequência entre QsrO₁₋₁₆₆ e os demais anti-ativadores de QS já caracterizados, tais proteínas guardam certas semelhanças estruturais, já que são completamente helicoidais e capazes de formar, na sua maioria, dímeros, além de adotarem uma conformação estendida. Assim, é possível enxergar a possibilidade de QsrO₁₋₁₆₆ apresentar um mecanismo de ação, ainda que não idêntico, similar ao adotado por estes anti-ativadores, sugerindo uma possível interação com receptores de QS em *P. aeruginosa*. Contudo, tal hipótese é calcada apenas em dados estruturais, sendo necessário a confirmação experimental.

4.6 QsrO₁₋₁₆₆ é uma proteína altamente estável

A fim de se estudar a estabilidade de QsrO₁₋₁₆₆ frente a agentes desnaturantes, foram conduzidos ensaios de espectroscopia de fluorescência. QsrO₁₋₁₆₆ apresenta um único resíduo de triptofano em sua sequência primária (**Figura 12B**). Os triptofanos são comumente utilizados como sondas intrínsecas para estudar o perfil de desenovelamento de proteínas, visto que a emissão de fluorescência do triptofano é sensível a polaridade do meio. Resíduos de triptofano internalizados no cerne hidrofóbico da proteína emitem fluorescência em comprimentos de onda menores, mais energéticos, enquanto resíduos de triptofano expostos ao meio aquoso, emitem fluorescência em comprimentos de onda maiores, portanto, menos energéticos (LAKOWICZ, 2006). A **Figura 16A** mostra o espectro de emissão de fluorescência intrínseca de QsrO₁₋₁₆₆. De acordo com o espectro, o máximo de emissão de fluorescência ocorreu em 347 nm, o que configura um resíduo de triptofano completamente exposto ao solvente. Isto sugere que o resíduo Trp109 não participa da interface de oligomerização de QsrO₁₋₁₆₆.

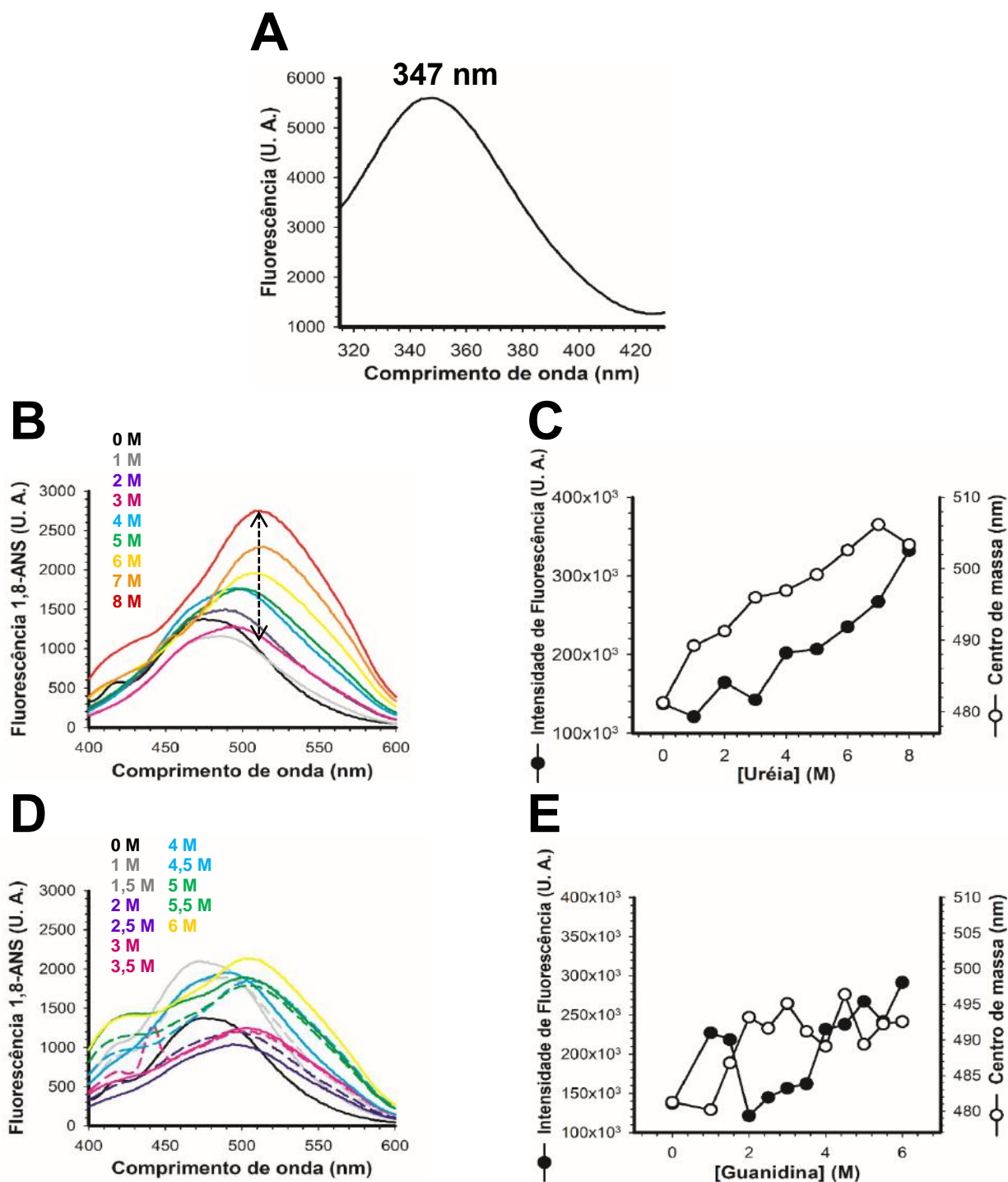


Figura 16: Estabilidade de QsrO₁₋₁₆₆ frente a agentes desnaturantes. (A) Fluorescência intrínseca de QsrO₁₋₁₆₆ (5 μM), na faixa de 315 a 450 nm de emissão, destacando-se o máximo de emissão do triptofano. **(B)** Espectros de fluorescência de 1,8-ANS na presença de QsrO₁₋₁₆₆ (5 μM) frente a concentrações crescentes de ureia entre 0 M e 8 M, destacando-se o aumento de intensidade em 510 nm. **(C)** Centro de massa espectral e intensidade total obtidos a partir de **B**. **(D)** Espectros de fluorescência de 1,8-ANS na presença de QsrO₁₋₁₆₆ (5 μM) frente a concentrações crescentes de cloreto de guanidina entre 0 M e 6 M. **(E)** Centro de massa espectral e intensidade total obtidos a partir de **D**.

Já que o único resíduo de triptofano presente na proteína se encontra exposto ao solvente, este não pôde ser utilizado como sonda intrínseca a fim de acompanhar o desenovelamento de QsrO₁₋₁₆₆. Assim, utilizou-se a sonda extrínseca 1,8-anilinoftalenosulfonato (1,8-ANS). Este composto apresenta baixos níveis de fluorescência quando em solução aquosa, porém, quando ligado a regiões hidrofóbicas de proteínas, a intensidade de fluorescência é significativamente aumentada (SLAVIK, 1982). Logo, conforme a proteína é desnaturada, resíduos hidrofóbicos são expostos e a ligação a 1,8-ANS aumenta, aumentando a sua intensidade de fluorescência. Entretanto, a interação de 1,8-ANS com a proteína não é dependente somente da exposição de resíduos hidrofóbicos, mas também do grau de estruturação do sítio de ligação. Dessa forma, a desnaturação completa da proteína promove desligamento da sonda 1,8-ANS e conseqüente redução na sua intensidade de fluorescência emitida (SLAVIK, 1982).

A **Figura 16B** mostra os espectros de emissão de fluorescência do 1,8-ANS na presença de QsrO₁₋₁₆₆ frente ao aumento da concentração de ureia (0 a 8 M), um conhecido agente desnaturante. O aumento da concentração de ureia promoveu um aumento significativo na intensidade de fluorescência do 1,8-ANS, sugerindo a exposição de resíduos hidrofóbicos. Este aumento está quantificado na **Figura 16C** que mostra a intensidade de fluorescência total, sendo esta a área sob cada espectro, em função da concentração de ureia. Ainda, observa-se uma mudança no comprimento de onda máximo de emissão do 1,8-ANS em função da concentração de ureia, de 475 para 510 nm. Esta mudança é refletida no aumento do centro de massa espectral que pode ser observado na **Figura 16C**. Este aumento da emissão de fluorescência em 510 nm, um comprimento de onda maior e, portanto, menos energético, sugere a exposição de sítios menos hidrofóbicos ao solvente. Ambos os resultados apresentados na **Figura 16C** sugerem um maior grau de desnaturação de QsrO₁₋₁₆₆ em proporção a maior concentração ureia. Contudo, não foi observado a formação de um platô em altas concentrações de ureia, tão pouco uma diminuição da fluorescência do 1,8-ANS, sugerindo que a desnaturação completa de QsrO₁₋₁₆₆ não ocorreu e que, portanto, QsrO₁₋₁₆₆ é uma proteína estável. Desse modo, um estado parcialmente desenovelado de QsrO₁₋₁₆₆ estaria presente em 8 M de ureia, o que levou à necessidade da utilização de outro agente desnaturante.

Assim, o experimento foi conduzido com cloreto de guanidina. A **Figura 16D** mostra os espectros de emissão de fluorescência do 1,8-ANS na presença de QsrO₁₋₁₆₆ obtidos em concentrações crescentes de cloreto de guanidina. Observa-se um aumento significativo da fluorescência do 1,8-ANS no comprimento de onda de 475 nm em baixas concentrações de guanidina (1,0-1,5 M). A sonda 1,8-ANS apresenta dois máximos de emissão de fluorescência, em 475 e 510 nm. A posição do máximo de fluorescência depende, em parte, da polaridade do sítio de ligação; portanto, um sítio mais apolar resulta em um máximo de emissão mais deslocado para o azul (ESPERANTE *et al.*, 2012). Assim, o aumento da intensidade de fluorescência em 475 nm sugere a exposição de segmentos mais hidrofóbicos de QsrO₁₋₁₆₆. Isto pode ser melhor observado na **Figura 16E** que reporta a intensidade total de fluorescência e o centro de massa espectral em função da concentração de agente desnaturante. Este aumento da intensidade de fluorescência em 475 nm em concentrações de guanidina entre 1-1,5 M poderia estar relacionado à dissociação dos oligômeros de QsrO₁₋₁₆₆ em espécies monoméricas, uma vez que a interface de oligomerização é predita de ser bastante hidrofóbica. Assim, QsrO₁₋₁₆₆ sofreria dissociação seguida de desnaturação dos monômeros, o que seria representado pelo aumento da intensidade de fluorescência do 1,8-ANS em 510 nm, observado nos espectros obtidos em concentrações mais elevadas de guanidina (4 a 6 M) (**Figura 16D**). Entretanto, a confirmação desta hipótese requer experimentos adicionais de dicroísmo circular, a fim de acompanhar a perda de estrutura secundária e de espalhamento de luz dinâmico, a fim de acompanhar a redução do tamanho da proteína em função do aumento da concentração do agente desnaturante. É interessante notar a presença de um platô na intensidade de fluorescência emitida pelo 1,8-ANS a partir de 4 M de guanidina, sugerindo que o aumento da concentração de guanidina não foi capaz de aumentar a ligação a 1,8-ANS (**Figura 16E**). Entretanto, vale ressaltar que a guanidina, assim como a ureia, não promoveu o desligamento do 1,8-ANS, sugerindo que, mesmo em 6 M de guanidina, ainda se tenha uma espécie parcialmente enovelada capaz de ligar a 1,8-ANS (**Figura 16E**) e que, portanto, QsrO₁₋₁₆₆ é, de fato, uma proteína que exhibe alta estabilidade.

5. Conclusão

- ✓ A cromatografia por exclusão molecular acusou a presença de dois estados oligoméricos, sendo estes confirmados pelos resultados de *cross-linking* e caracterizados como dímero e trímero.
- ✓ Tais formas oligoméricas eluíram em discordância com o volume esperado para proteínas globulares, sugerindo que QsrO₁₋₁₆₆ não é globular.
- ✓ Embora a afinidade de oligomerização não tenha sido obtida, os resultados de polarização de fluorescência sugerem uma afinidade da ordem de subnanomolar, propondo alta afinidade e uma grande interface de oligomerização.
- ✓ Predições por instrumentos de bioinformática sugeriram uma estrutura totalmente enovelada para QsrO₁₋₁₆₆, sendo composta por seis α -hélices, em concordância com a análise feita por dicroísmo circular, cujo espectro apresentou mínimos em 211 nm e 222 nm e máximo em 195 nm, característicos de estrutura em α -hélice.
- ✓ A predição de *coiled-coil* acusou uma probabilidade de apenas 0,4, sendo que a sequência predita para formar esta estrutura se sobrepõe em parte com a hélice α 3, sugerindo que esta hélice poderia estar envolvida na interface de oligomerização.
- ✓ Foi possível encontrar uma sequência de 25 aminoácidos altamente similar a uma sequência presente na proteína OmpR. Esta sequência é responsável pela formação de determinados elementos de estrutura secundária em OmpR e seus homólogos, de tal forma que o final dessa sequência, equivalente ao início da hélice α 4, está envolvido na dimerização destas proteínas. Interessantemente, essa sequência envolvida em dimerização está presente na hélice α 3 predita para QsrO₁₋₁₆₆, sugerindo novamente que este elemento de estrutura secundária esteja envolvido em oligomerização em QsrO₁₋₁₆₆.
- ✓ Os resultados de SAXS sugerem que QsrO₁₋₁₆₆ não é uma proteína globular e, sim, quase cilíndrica com um R_g de 6,49 nm e completamente estruturada.

- ✓ O único resíduo de triptofano presente em QsrO₁₋₁₆₆ encontra-se totalmente exposto ao solvente, sugerindo que este não participa da interface de oligomerização.
- ✓ A adição de ureia promoveu aumento da intensidade da sonda extrínseca 1,8-ANS no comprimento de onda de 510 nm de forma dose-dependente. Entretanto, não foi observado um platô ou diminuição da intensidade do 1,8-ANS em altas concentrações de ureia, sugerindo que este agente não foi capaz de desnaturar a proteína por completo.
- ✓ A adição de cloreto de guanidina nas concentrações de 1-1,5 M promoveu um aumento significativo da emissão de fluorescência do 1,8-ANS em 475 nm, um comprimento de onda que sugere a exposição de sítios mais hidrofóbicos. Este resultado sugere a identificação de um intermediário de enovelamento, que poderia ser a forma dissociada de QsrO₁₋₁₆₆, uma vez que a interface de oligomerização é predita de ser bastante hidrofóbica.
- ✓ O aumento da concentração de guanidina promoveu o aumento da intensidade de fluorescência do 1,8-ANS em 510 nm, o que poderia estar relacionado a desnaturação dos monômeros de QsrO₁₋₁₆₆. Entretanto, esta desnaturação parece não ser completa, uma vez que não ocorreu a diminuição de emissão de fluorescência do 1,8-ANS mesmo em concentrações altas de guanidina (6 M), sugerindo que QsrO₁₋₁₆₆ é uma proteína estável.

6. Referências Bibliográficas

ANTUNES, L. C. M.; FERREIRA, R. B. R.; BUCKNER, M. M. C.; FINLAY, B. B. **Quorum sensing in bacterial virulence**. *Microbiology*, v. 156, p. 2271–2282, 2010.

ARTIMO, P.; JONNALAGEDDA, M.; ARNOLD, K.; BARATIN, D.; CSARDI, D.; CASTRO, E.; DUVAUD, S.; FLEGEL, V.; FORTIER, A.; GASTEIGER, E. GROSIDIER, A.; HERNANDEZ, C.; IOANNIDIS, V.; KUZNETSOV, D.; LIECHTI, R.; MORETTI, S.; MOSTAGUIR, K.; REDASCHI, N.; ROSSIER, G.; XENARIOS, I.; STOCKINGER, H. **ExPASy: SIB bioinformatics resource portal**. *Nucleic Acids Res*, v. 40(W1), p. W597-W603, 2012.

BARBIERI, M. C.; WU, T.; STOCK, A. M. **Comprehensive Analysis of OmpR Phosphorylation, Dimerization and DNA Binding Supports a Canonical Model for Activation**. *J Mol Biol*, v. 425, n. 10, p. 1612–1626, 2013.

BIELECKI, P.; GLIK, J.; KAWECKI, M.; MARTINS, S. **Towards understanding Pseudomonas aeruginosa burn wound infections by profiling gene expression**. *Biotechnol Lett*, v. 30, p. 777–790, 2008.

BROWN, B. L.; HADLEY, M.; PAGE, R. **Heterologous high-level E. coli expression, purification and biophysical characterization of the spine-associated RapGAP (SPAR) PDZ domain**. *Protein Expr Purif*, v. 62, n. 1, p. 9–14, 2008.

CAO, H.; CAO, H.; KRISHNAN, G.; GOUMNEROV, B.; TSONGALIS, J.; TOMPKINS, R.; RAHME, L. G. **A quorum sensing-associated virulence gene of Pseudomonas aeruginosa encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism**. *Proc. Natl Acad. Sci*, v. 98, p. 14613–14618, 2001.

CASE, R. J.; LABBATE, M.; KJELLEBERG, S. **AHL-driven quorum-sensing circuits: their frequency and function among the Proteobacteria**. *Isme J*, v. 2, p. 345–349, 2008.

CHAI, Y.; ZHU, J.; WINANS, S. C. **TrIR, a defective TraR-like protein of Agrobacterium tumefaciens, blocks TraR function in vitro by forming inactive TrIR:TraR dimers**. *Mol. Microbiol*, v. 40, n. 2, p. 414–421, 2001.

CHANG, C. Y.; KRISHNAN, T.; WANG, H.; CHEN, Y.; YIN, W. F.; CHONG, Y. M.; TAN, L. Y.; CHONG, T. M.; CHAN, K. G. **Non-antibiotic quorum sensing inhibitors acting against N-acyl homoserine lactone synthase as druggable target**. *Sci Rep*, v. 4, p. 7245, 2014.

CHEN, G.; JEFFREY, P. D.; FUQUA, C.; SHI, Y.; CHEN, L. **Structural basis for antiactivation in bacterial quorum sensing**. *PNAS*, v. 42, p. 16474–16479, 2007.

CHEN, G.; MALENKOS, J. W.; CHA, M. R.; FUQUA, C.; CHEN, L. **Quorum-sensing antiactivator TraM forms a dimer that dissociates to inhibit TraR**. *Mol Microbiol*, v. 52, n. 6, p. 1641–51, 2004.

CHEN, G.; WANG, C.; FUQUA, C.; ZHANG, L.; CHEN, L. **Crystal Structure and Mechanism of TraM2, a Second Quorum-Sensing Antiactivator of *Agrobacterium tumefaciens* Strain A6**. J. Bacteriol, v. 188, p. 8244–8251, 2006.

CIOFU, O.; MANDSBERG, L. F.; BJARNSHOLT, T.; WASSERMANN, T.; HØIBY, N. **Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during chronic lung infection of patients with cystic fibrosis: strong and weak mutators with heterogeneous genetic backgrounds emerge in *mucA* and/or *lasR* mutants**. Microbiology, v. 156, p. 1108–1119, 2010.

COELHO-CERQUEIRA, E.; CARMO-GONÇALVES, P.; PINHEIRO, A. S.; CORTINES, J.; FOLLMER, C. **α -Synuclein as an intrinsically disordered monomer—fact or artefact?** FEBS J, v. 280, n. 19, p. 4915–27, 2013.

COSTA, E.; CHAI, Y.; WINANS, S. **The Quorum-sensing Protein TraR of *Agrobacterium tumefaciens* is Susceptible to Intrinsic and TraM-mediated Proteolytic Instability**. Mol. Microbiol, v. 84, n. 5, p. 807-815, 2012.

CRICK, F. H. S. **The packing of α -helices: simple Coiled Coils**. Acta Crystallogr, v. 6, p. 689–697, 1953.

CROUSILLES, A.; MAUNDERS, E.; BARTLETT, S.; FAN, C.; UKOR, E. F.; ABDELHAMID, Y.; BAKER, Y.; FLOTO, A.; SPRING, D. R.; WELCH, M. **Which microbial factors really are important in *Pseudomonas aeruginosa* infections?** Future Microbiol, v. 10, p. 1825–36, 2015.

D'ARGENIO, D. A.; WU, M.; HOFFMAN, L. R.; KULASEKARA, H. D.; DÉZIEL, E.; SMITH, E. E.; NGUYEN, H.; ERNST, R. K.; LARSON FREEMAN, T. J.; SPENCER, D. H.; BRITTNACHER, M.; HAYDEN, H. S.; SELGRADE, S.; KLAUSEN, M.; GOODLETT, D. R.; BURNS, J. L.; RAMSEY, B. W.; MILLER, S. I. **Growth phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa lasR* mutants adapted to the airways of cystic fibrosis patients**. Mol Microbiol, v. 64, p. 512–533, 2007.

De KIEVIT, T. R. **Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms**. Environ. Microbiol, v. 11, p. 279–288, 2008.

DEZIEL, E.; DÉZIEL, E.; LÉPINE, F.; MILOT, S.; HE, J.; MINDRINOS, M. N.; TOMPKINS, R. G.; RAHME, L. G. **Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication**. Proc. Natl Acad. Sci, v. 101, n. 5, p. 1339–1344, 2004.

DONIACH, S. **Changes in Biomolecular Conformation Seen by Small Angle X-ray Scattering**. Chem. Rev, v. 101, n. 6, p. 1763–1778, 2001.

DRISCOLL JAMES, A.; STEVEN, L.; BRODY, M. H. K. **The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections**. Drugs, v. 67, p. 351–68, 2007.

ENGBRECHT, J.; SILVERMAN, M. **Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence**. Proc. Natl. Acad. Sci, v. 81, n. 13, p. 4154–4158, 1984.

ESPERANTE, S. A.; PARIS, G.; DE PRAT-GAY, G. **Modular unfolding and dissociation of the human respiratory syncytial virus phosphoprotein p and its interaction with the m(2-1) antiterminator: a singular tetramer-tetramer interface arrangement**. Biochemistry, v. 51, n. 41, p. 8100-10, 2012.

FAN, H.; DONG, Y.; WU, D.; BOWLER, M.; ZHANG, L. **QsIA disrupts LasR dimerization in antiactivation of bacterial quorum sensing**. PNAS, v. 110, n. 51, p. 20765–20770, 2013.

FANG, Y. L.; CHEN, B.; ZHOU, L.; JIN, Z. J.; SUN, S.; HE, Y. W. **The Anti-activator QsIA Negatively Regulates Phenazine-1-Carboxylic Acid Biosynthesis by Interacting With the Quorum Sensing Regulator MvfR in the Rhizobacterium Pseudomonas aeruginosa Strain PA1201**. Front Microbiol, v. 25, n. 9, p. 1584, 2018.

FEIGIN, L. A.; SVERGUN, D. I. **Structure Analysis by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering**. Plenum Press, Springer, 1987.

FOURNET, G.; GUINIER, A. **Small Angle scattering of X-rays**. John Wiley & Sons, New York, 1955.

FUQUA, C.; GREENBERG, E. P. **Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling**. Nature Rev, v. 3, n. 9, p. 685–695, 2002.

GALLOWAY, W. R. J. D.; HODGKINSON, J. T.; BOWDEN, S. D.; WELCH, M.; SPRING, D. R. **Quorum sensing in Gram-negative bacteria: small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways**. Chem. Rev, v. 111, n. 1, p. 28–67, 2011.

GAMBELLO, M. J.; IGLEWSKI, B. H. **Cloning and characterization of the Pseudomonas aeruginosa lasR gene, a transcriptional activator of elastase expression**. J. Bacteriol, v. 173, n. 9, p. 3000–3009, 1991.

GAMBELLO, M. J.; KAYE, S.; IGLEWSKI, B. H. **LasR of Pseudomonas aeruginosa is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (apr) and an enhancer of exotoxin A expression**. Infect. Immun, v. 61, n. 4, p. 1180–1184, 1993.

GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R. E. **Pseudomonas aeruginosa: new insights into pathogenesis and host defenses**. Pathog Dis, v. 67, n. 3, p. 159–73, 2013.

GLATTER, O.; KRATKY, O. **Small Angle X-ray Scattering**. Academic Press, New York, 1982.

GRADDIS, T. J.; MYSZKA, D. G.; CHAIKEN, I. M. **Controlled formation of model homo- and heterodimer coiled coil polypeptides**. Biochemistry, v. 32, n. 47, p. 12664–12671, 1993.

GROSSO-BECERRA, M. V.; CRODA-GARCIA, G.; MERINO, E.; SERVIN-GONZALEZ, L.; MOJICA-ESPINOSA, R.; SOBERON-CHAVEZ, G. **Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors by two novel RNA thermometers.** Proc. Natl. Acad. Sci, v. 111, n. 43, p. 15562–15567, 2014.

GUINIER, A. **La Diffraction des Rayons X aux Très Faibles Angles: Applications à l'Etude des Phénomènes Ultra-microscopiques.** Ann. Phys, v. 11, n. 12, p. 161–236, 1939.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. **Evolving concepts in biofilm infections.** Cel. Microbiol, v. 11, n. 7, p. 1034–1043, 2009.

HARLOCKER, S. L.; BERGSTROM, L.; INOUE, M. **Tandem Binding of Six OmpR Proteins to the *ompF* Upstream Regulatory Sequence of *Escherichia coli*.** J Biol Chem, v. 270, p. 26849–26856, 1995.

HASTINGS, J. W.; GREENBERG, E. P. **Quorum Sensing: the Explanation of a Curious Phenomenon Reveals a Common Characteristic of Bacteria.** J. Bacteriol, v. 181, n. 9, p. 2667–2668, 1999.

HENKE, J. M.; BASSLER, B. L. **Bacterial social engagements.** Trends Cell Biol, v. 14, n. 11, p. 648-56, 2004.

HOFFMAN, L. R.; KULASEKARA, H. D.; EMERSON, J.; HOUSTON, L. S.; BURNS, J. L.; RAMSEY, B. W.; MILLER, S. I. ***Pseudomonas aeruginosa* lasR mutants are associated with cystic fibrosis lung disease progression.** J Cyst Fibros, v. 8, n. 1, p. 66–70, 2009.

JEON, Y.; LEE, Y. S.; HAN, J. S.; KIM, J. B.; HWANG, D. S. **Multimerization of Phosphorylated and Non-phosphorylated ArcA Is Necessary for the Response Regulator Function of the Arc Two-component Signal Transduction System.** J Biol Chem, v. 276, p. 40873–40879, 2001.

KELLER, L.; SURETTE, M. **Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective.** Nature Rev. in Microbiology, v. 4, n. 4, p. 248–258, 2006.

KÖHLER, T.; OUERTATANI-SAKOUHI, H.; COSSON, P.; van DELDEN, C. **QsrO a novel regulator of quorum-sensing and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*.** PLoS ONE, v. 9, n. 2, p. e87814, 2014.

KRATKY, O.; POROD, G. **X-ray investigation of dissolved chain molecules.** Rec Trav Chim Pays-Bas, v. 68, p. 1106–1122, 1949.

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

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy.** Springer, New York, 2006.

LEE, J.; WU, J.; DENG, Y.; WANG, J.; WANG, C.; WANG, J.; CHANG, C.; DONG, Y.; WILLIAMS, P.; ZHANG, L. H. **A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response**. *Nature Chem Biol*, v. 9, n. 5, p. 339–343.

LEE, J.; ZHANG, L. **The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa***. *Protein & Cell*, v. 6, n. 1, p. 26–41, 2015.

LUPAS, A., VAN DYKE, M., AND STOCK, J. **Predicting coiled coils from protein sequences**. *Science*, v. 252, n. 5009, p. 1162–1164, 1991.

MACK, T. R. **Characterization of the inter- and intramolecular interactions that mediate the phosphorylation-dependent activation of the response regulator PhoB**. Piscataway, v. PhD, p. 110.

MASON, J. M.; ARNDT, K. M. **Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications**. *ChemBioChem*, v. 5, n. 2, p. 170–176, 2004.

McKNIGHT, S. L., IGLEWSKI, B. H.; PESCI, E. C. **The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa***. *J. Bacteriol*, v. 182, n. 10, p. 2702–2708, 2000.

MICHAEL, B.; SMITH, J. N.; SWIFT, S.; HEFFRON, F.; AHMER, B. M. **SdiA of *Salmonella enterica* is a LuxR homolog that detects mixed microbial communities**. *J Bacteriol*, v. 183, n. 19, p. 5733–5742, 2001.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. **Quorum Sensing in Bacteria**. *Annu. Rev. of Microbiology*, v. 55, v. 1, p. 165–199, 2001.

NG, W. L.; BASSLER, B. L. **Bacterial quorum-sensing network architectures**. *Annu. Rev. Genet*, v. 43, p. 197–222, 2009.

NOVICK, R. P.; GEISINGER, E. **Quorum sensing in staphylococci**. *Annu. Rev. Genet*, v. 42, p. 541–564, 2008.

ONO, Y. [***Pseudomonas aeruginosa***]. *Nippon Rinsho*, v. 60, n. 11, p. 2150–2155, 2002.

OSHABEN, K. M.; SALARI, R.; McCASLIN, D. R.; CHONG, L. T.; HORNE, W. S. **The Native GCN4 Leucine-Zipper Domain Does Not Uniquely Specify a Dimeric Oligomerization State**. *Biochemistry*, v. 51, n. 47, p. 9581–9591, 2012.

O'SHEA, E. K.; LUMB, K. J.; KIM, P. S. **Peptide 'Velcro': design of a heterodimeric coiled coil**. *Curr. Biol*, v. 3, n. 10, p. 658–667, 1993.

PAPENFORT, K.; BASSLER, B. **Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria**. *Springer Nature*, v. 14, p. 576–588, 2016.

PARSEK, M. R.; VAL, D. L.; HANZELKA, B. L.; CRONAN, J. E. Jr.; GREENBERG, E. P. **Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation**. *Proc. Natl. Acad. Sci*, v. 96, n. 8, p. 4360–4365, 1999.

PEARSON, J. P. **Early Activation of Quorum Sensing.** J. Bacteriol, v. 184, n. 10, p. 2569–2571, 2002.

PEARSON, J. P.; PASSADOR, L.; IGLEWSKI, B. H.; GREENBERG, E. P. **A second N-acylhomoserine lactone signal produced by Pseudomonas aeruginosa.** Proc. Natl. Acad. Sci, v. 92, n. 5, p. 1490–1494, 1995.

PESCI, E.C.; PEARSON, J. P.; SEED, P. C.; IGLEWSKI, B. H. **Regulation of las and rhl quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa.** J. Bacteriol, v. 179, n. 10, p. 3127–3132, 1997.

PIPER, K. R.; FARRAND, S. K. **Quorum Sensing but Not Autoinduction of Ti Plasmid Conjugal Transfer Requires Control by the Opine Regulon and the Antiactivator TraM.** J. Bacteriol, v. 182, n. 4, p. 1080–1088, 2000.

PRASAD, S. V.; BALLAL, M.; SHIVANANDA, P. G. **Slime production a virulence marker in Pseudomonas aeruginosa strains isolated from clinical and environmental specimens: A comparative study of two methods.** Indian J. Pathol. Bacteriol, v. 52, n. 2, p. 191–193, 2009.

QIN, Y.; SMYTH, A. J.; SU, S.; FARRAND, S. K. **Dimerization properties of TraM, the antiactivator that modulates TraR-mediated quorum-dependent expression of the Ti plasmid tra genes.** Mol Microbiol, v. 53, n. 5, p. 1471–85, 2004.

QIN, Y.; SU, S.; FARRAND, S. K. **Molecular basis of transcriptional antiactivation. TraM disrupts the TraR-DNA complex through stepwise interactions.** J Biol Chem, v. 282, n. 27, p. 19979–91, 2007.

ROYER, C. A.; SCARLATA, S. F. **Fluorescence Approaches to Quantifying Biomolecular Interactions.** Met. In Enzymology, v. 450, p. 80–103, 2008.

SCHUSTER, M.; GREENBERG, E. P. **Early activation of quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa reveals the architecture of a complex regulon.** BMC Genomics, v. 8, p. 287, 2007.

SCHUSTER, M.; LOSTROH, C. P.; OGI, T.; GREENBERG, E. P. **Identification, timing, and signal specificity of Pseudomonas aeruginosa quorum-controlled genes: a transcriptome analysis.** J. Bacteriol, v. 185, n. 7, p. 2066–2079, 2003.

SEED, P. C.; PASSADOR, L.; IGLEWSKI, B. H. **Activation of the Pseudomonas aeruginosa lasI gene by LasR and the Pseudomonas autoinducer PAI: an autoinduction regulatory hierarchy.** J. Bacteriol, v. 177, n. 3, p. 654–659, 1995.

SEET, Q.; ZHANG, L. H. **Anti-activator QsIA defines the quorum sensing threshold and response in Pseudomonas aeruginosa.** Mol. Microbiol, v. 80, n. 4, p. 951–965, 2011.

SIEHNEL, R.; TRAXLER, B.; AN, D. D.; PARSEK, M. R.; SCHAEFER, A. L.; SINGH, P. K. **A unique regulator controls the activation threshold of quorum-regulated**

genes in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci, v. 107, n. 17, p. 7916–7921, 2010.

SLAVIK, J. **Anilino-naphthalene sulfonate as a probe of membrane composition and function**. Biophys. Acta, v. 694, n. 1, p. 1–25, 1982.

SMILGIES, D. M.; FOLTA-STOGNIEW, E. **Molecular weight-gyration radius relation of globular proteins: a comparison of light scattering, small-angle X-ray scattering and structure-based data**. J. Appl. Cryst, v. 48, n. 5, p. 1604–1606, 2015.

SMITH, E. E.; BUCKLEY, D. G.; WU, Z.; SAENPHIMMACHAK, C.; HOFFMAN, L. R.; D'ARGENIO, D. A.; MILLER, S. I.; RAMSEY, B. W.; SPEERT, D. P.; MOSKOWITZ, S. M.; BURNS, J. L.; KAUL, R.; OLSON, M. V. **Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients**. Proc Natl Acad Sci, v. 103, n. 22, p. 8487–8492, 2006.

SMITH, RS.; IGLEWSKI, BH. ***P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence**. Curr Opin Microbiol, v. 6, n. 1, p. 56–60, 2003.

STRATEVA, T.; YORDANOV, D. ***Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance**. J. Med. Microbiol, v. 58, n. 9, p. 1133–1148, 2009.

SVERGUN, D. I. **Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria**. J. Appl. Crystallogr, v. 25, p. 495–503, 1992.

SVERGUN, D. I.; FEĬGIN, L. A.; TAYLOR, G. W. **X-ray and neutron scattering**. Plenum, New York, 1987.

SVERGUN, D. I.; KOCH, S. **Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution**. Rep. Prog. Phys, v. 66, n. 10, p. 1735–1782, Fig. 5 (c), 2003.

SWIDERSKA, A.; BERNDTSON, A. K.; CHA, M. R.; LI, L.; BEAUDOIN, G. M.; ZHU, J.; FUQUA, C. **Inhibition of the *Agrobacterium tumefaciens* TraR quorum-sensing regulator. Interactions with the TraM anti-activator**. J. Biol. Chem, v. 276, n. 52, p. 49449–49458, 2001.

TORO-ROMAN, A.; MACK, T. R.; STOCK, A. M. **Structural analysis and solution studies of the activated regulatory domain of the response regulator ArcA: a symmetric dimer mediated by the alpha4-beta5-alpha5 face**. J Mol Biol, v. 349, n. 1, p. 11–26, 2005.

VANDEPUTTE, O. M.; KIENDREBEOGO, M.; RASAMIRAVAKA, T.; STÉVIGNY, C.; DUEZ, P.; RAJAONSON, S.; DIALLO, B.; MOL, A.; BAUCHER, M.; EI JAZIRI, M. **The flavanone naringenin reduces the production of quorum sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1**. Microbiology, v. 157, n. 7, p. 2120–2132, 2011.

VANNINI, A.; VOLPARI, C.; DI MARCO, S. **Crystal structure of the quorum-sensing protein TraM and its interaction with the transcriptional regulator TraR.** J Biol Chem, v. 279, n. 23, p. 24291–6, 2004.

VENTRE, I.; LEDGHAM, F.; PRIMA, V.; LAZDUNSKI, A.; FOGLINO, M.; STURGIS, J. N. **Dimerization of the quorum sensing regulator RhIR: development of a method using EGFP fluorescence anisotropy.** Mol. Microbiol, v. 48, n. 1, p. 187–198, 2003.

VENTURI, V. **Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*.** Microbiol Rev, v. 30, n. 2, p. 274–291, 2006.

WANG, C.; ZHANG, H. B.; CHEN, G.; CHEN, L.; ZHANG, L. H. **Dual Control of Quorum Sensing by Two TraM-Type Antiactivators in *Agrobacterium tumefaciens* Octopine Strain A6.** J. Bacteriol, v. 188, n. 7, p. 2435–2445, 2006.

WHITELEY, M.; LEE, K. M.; GREENBERG, E. P. **Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*.** Proc. Natl. Acad. Sci, v. 96, n. 24, p. 13904–13909, 1999.

WILLIAMS, P.; CAMARA, M. **Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules.** Curr. Opin. Microbiol, v. 12, n. 2, p. 182–191, 2009.

WINSON, M. K.; WINSON, M. K.; CAMARA, M.; LATIFI, A.; FOGLINO, M.; CHHABRA, S. R.; DAYKIN, M.; BALLY, M.; CHAPON, V.; SALMOND, G. P.; BYCROFT, W. B. **Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*.** Proc. Natl Acad. Sci, v. 92, n. 20, p. 9427–9431, 1995.

WINSTANLEY, C.; FOTHERGILL, J. L. **The role of quorum sensing in chronic cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* infections.** FEMS Microbiol. Lett, v. 290, n. 1, p. 1–9, 2009.