



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Instituto de Ciências biológicas
Departamento de biologia celular
Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular

**CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DE PROTEÍNAS VAP DO SISTEMA
TOXINA-ANTITOXINA DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

PAULO JARDIM

BRASÍLIA, DF
Fevereiro de 2019

PAULO JARDIM

**CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DE PROTEÍNAS VAP DO SISTEMA
TOXINA-ANTITOXINA DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa

Co-orientador: Prof. Dr. Napoleão Fonseca Valadares

BRASÍLIA, DF

Fevereiro de 2019

Dissertação de Mestrado apresentada por Paulo Jardim, documento final requerido para obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular. Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biofísica Molecular, sendo intitulado por “Caracterização biofísica de proteínas Vap do sistema toxina-antitoxina de *Mycobacterium tuberculosis*”, sob orientação do Professor Dr. João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa, co-orientado por Napoleão Fonseca Valadares e com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa

Universidade de Brasília

Presidente da Banca e Orientador

Prof. Dr. Vicente de Paulo Martins

Universidade de Brasília

Membro Interno

Prof^a. Dr^a. Talita Souza Carmo

Universidade de Brasília

Membro Externo

Prof. Dr. Aisel Valle Garay

Universidade de Brasília

Membro Suplente

BRASÍLIA, 2019

À minha mãe, por sempre ter me apoiado na carreira acadêmica

AGRADECIMENTOS

Encontrarão ao longo desse documento apenas uma pequena porção do todo que aprendi. Isso se faz verdade quando penso no número de pessoas que conheci, cada uma delas deu parte de si para que ao fim eu construísse um pouco mais de mim. De tanto escutar que a “ciência não se faz sozinha”, aprendi que viver também é uma grande colaboração, e que eu, por sorte da vida e do acaso, encontrei pessoas incríveis que me ajudaram gentilmente a ser um bom pesquisador e uma pessoa melhor. A todas estas pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta, escrevo-lhes meus sinceros agradecimentos:

Ao professor Dr. Napoleão Valadares. Se pudesse dizer algo, diria que a sua orientação foi excelente. Sempre esteve presente e disponível para qualquer necessidade. Obrigado pela compreensão; por me cobrar e chamar minha atenção quando necessário; por trabalhar ao meu lado na bancada e me ensinar tudo que esteve ao seu alcance.

Ao professor Dr. João Alexandre R. G. Barbosa e professora Dr^a. Sonia de Freitas. Obrigado por estarem sempre disponíveis a me ajudar e transmitir tanto conhecimento. São uma referência para mim de profissionalismo.

Ao Gustavo Trajano. Você foi uma das melhores surpresas do mestrado. Sem dúvida você é a pessoa mais inteligente que já conheci, e além de educado, prestativo, você é um grande amigo. Obrigado por estar sempre disposto a me ajudar e por ser sempre uma excelente companhia.

Em especial a Dr^a. Azadeh Mehdad, é incontável o número de coisas que aprendi com você. Sua personalidade única e paixão pela arte fez a total diferença nesses anos de laboratório;

À Dr^a. Amanda Souza e Dr. Aisel Garay. A ajuda de vocês foi fundamental. Obrigado por tudo que me ensinaram, sou extremamente grato pela colaboração.

Aos meus amigos e colegas de laboratório de biofísica molecular: Cláudia Bravo, Marysol Morais, Diego Honda, Diogo de Sá, Gideane Mendes, João Paulo Fernandes, Jônatas Lima, Julia Freitas, Liem Canet, Luisa Meneghetti, Muhammad Faheem, Patrícia Alves e Wallace Vasconcelos. Obrigado pela ótima convivência, ensinamentos, cafés e debates. Vocês transformaram o laboratório, que normalmente é a segunda casa da pós-graduação, em um ambiente muito agradável.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa sem a qual não seria possível realizar esse trabalho.

À minha mãe que foi a pessoa mais importante da minha vida. Não existem agradecimentos a altura dos sacrifícios diários que a senhora fez por mim para que eu chegasse até aqui. É com enorme alegria que digo que essa conquista foi graças a senhora e que sem dúvidas a senhora foi e é a minha maior inspiração.

Ao meu Pai por me ensinar que o esforço sempre é recompensado.

À minha família, não só pelo apoio, mas pela companhia, amor e carinho durante toda a caminhada. É confortante saber que sempre posso contar com vocês. Sei que não escolhemos a família, mas eu definitivamente escolhi amá-los. Em especial ao Pedro, Hannah, Lilian, Mitsuo e Yurie.

Ao meu melhor amigo, Igor -e família-, obrigado por tantas risadas. Até nos dias mais cinzas você me trouxe cor e conforto. Você foi mais que importante, foi essencial. Obrigado por me entender, amigo, você é insubstituível!

À Liga, que mais que um grupo de amigos, considero como um lar. Enche-me os olhos em poder dizer que tenho amigos de verdade como vocês. Camyla, Dante, Paula, Pereira, Nara, Gabriel, André e Patrick.

À Luanna e Ana, quem diria que em quatro anos de graduação eu encontraria uma amizade tão valiosa. Vocês são preciosidades únicas e especiais. Que permaneçamos juntos e que apoiemos uns aos outros. Amar vocês foi um processo rápido e natural. Obrigado por tudo, meus amores.

Ao Arthur Nunes Kishi -e família-. Obrigado por toda hospitalidade, gentileza e atenção. Me senti amado e querido, parte da família. Obrigado por todo cuidado e carinho que têm por mim. Arthur, obrigado por aceitar essa minha vida corrida de bailarino e pesquisador. Você é a minha sorte. Eu sou mais feliz por tê-lo ao meu lado.

A Deus e à Nossa Senhora.

Agradeço a todas as pessoas que colaboraram neste trabalho! Tudo isso não ocorreria sem a contribuição de cada um de vocês. A todos meus mais sinceros agradecimentos.

RESUMO

Estima-se cerca de 1,4 milhão de casos de óbito por tuberculose em 2015. Seu agente etiológico, *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), apresenta diversos mecanismos que propiciam a ocorrência de infecções recorrentes, dentre os quais destaca-se a persistência, que permite que algumas células apresentem um estado caracterizado por uma taxa metabólica muito baixa e tolerância a múltiplos antibióticos. A família de proteínas VapBC faz parte dos sistemas toxina-antitoxina e estão diretamente relacionadas a persistência. Quando em associação, a antitoxina (VapB) neutraliza a toxina (VapC). Fatores ambientais como stress celular podem levar a proteólise da antitoxina, o complexo (VapBC) é então desfeito possibilitando que a VapC exerça sua atividade tóxica de RNase.

Para o trabalho foram selecionadas algumas proteínas da família VapBC: VapB11, VapB17, VapB21, VapB38, VapC19 e VapC20. Os ensaios de expressão foram realizados em meio autoindutor ZYM-5052 utilizando células *E. coli* LEMO21, a 37 °C e variando o tempo de expressão entre 12 a 15 horas para as VapB, e a 20 °C por 7 horas de expressão para a VapC20. As proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (Ni^{2+}), seguido por cromatografia de exclusão molecular. Ensaios de cristalização automatizados, utilizando as proteínas puras e kits de cristalização comercialmente disponíveis permitiu a observação de micro cristais para as proteínas VapB17, VapB38, VapC19 e VapC20, que seguiram para etapa de refinamento manual. Outros experimentos como ultracentrifugação analítica SDS-PAGE, PAGE-nativo e dicroísmo circular (DC) foram realizados para estas proteínas, a fim de elucidar características estruturais. A VapC19 apresentou um perfil oligomérico de dímero. Todas as VapB apresentaram duas populações oligoméricas: VapB38 (dímeros e tetrâmeros), VapB21 (dímeros e hexâmeros) e VapB11 (monômeros e dímeros). Análises de DC proveram T_m de 75 °C para a VapB38 e 70 °C para a VapB17, além de informações estruturais sobre as antitoxinas.

Palavras-chave: Tuberculose, persistência, toxina-antitoxina, ultracentrifugação analítica, dicroísmo circular, estabilidade de proteínas.

ABSTRACT

Tuberculosis is one of the world's deadliest diseases according to the World Health Organization and being among the top 10 causes of death worldwide. It was estimated that around one-third of the world's population is infected with the pathogen *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), but the majority present the latent form of the disease. Persistent cells are genetically identical to non-persistent cells, but exhibit a phenotype characterized by slow growth, low metabolic rate and multidrug tolerance. VapBC, virulence-associated proteins, code for 47 pairs of toxin-antitoxin systems in Mtb H37Rv strain and are directly associated to persistence. The toxins (VapC) present RNase activities that reduce the Mtb metabolism, while the antitoxins (VapB) bind to and inhibit the cytotoxic effects of their cognate toxins. Under stress conditions, the antitoxin molecules are degraded by proteases and the toxin is released to exert activity. In this study, we analyze the proteins associated with the phenomenon of persistence due to its direct relationship with mechanisms related to recurrent infections and drug resistance. Fine-tuned expression assays and multiple purification steps were performed in order to obtain high purity soluble VapC toxins and VapB antitoxins in reasonable quantities for biophysical and biochemical assays. Circular dichroism, sedimentation velocity analytical ultracentrifugation, SDS-PAGE, native-PAGE and protein crystallization assays are among the techniques employed. Our main goal is to characterize the VapBC systems structurally and relate it to the persistence of Mtb, associating structure to function. VapB11, VapB17, VapB21, VapB38, VapC19 and VapC20 proteins were expressed and purified in appropriate purity and quantity to allow their biophysical characterization and the development of crystallization assays. We determined some crystallization conditions for the toxins, as well as thermal stabilities and oligomerization states for antitoxins. This work could contribute to a better understanding of Mtb persistence, providing new information to targets candidates for treatment. AUC data show that all four VapB present two different oligomeric populations: VapB38 (dimers and tetramers), VapB21 (dimers and hexamers) and VapB11 (monomers and dimers). For VapC19 samples, we observed a dimer profile. Circular dichroism analysis led to a T_m of 75 ° C for VapB38 and 70 ° C for VapB17. In addition, we show structural information for the antitoxins.

Key words: Tuberculosis, persistence, toxin-antitoxin, analytical ultracentrifugation, circular dichroism, protein stability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidência estimada de MRtb / RR-TB em 2017.	18
Figura 2. Ilustração esquemática dos sistemas TA do tipo I, II e III.	22
Figura 3. Imagem estéreo do dímero de VapC21 colorida de acordo com o potencial eletrostático	24
Figura 4. Complexo de VapBC3.....	25
Figura 5. Alinhamento de algumas VapB.....	26
Figura 6. Eletroforese em SDS-PAGE (15 %) das proteínas VapC	41
Figura 7. Perfil eletroforético em SDS-PAGE (15 %) da VapC20 e VapC19	41
Figura 8. Eletroforese em SDS-PAGE (15 %) das proteínas VapC20 (14,7 kDa) e VapC19 (13,7 kDa)	42
Figura 9. Eletroforese em SDS-PAGE (15 %) das amostras de VapB.....	43
Figura 10. Cromatograma de purificação por afinidade a níquel da proteína VapC20	45
Figura 11. Cromatograma de exclusão molecular da proteína VapC20	46
Figura 12. Eletroforese em SDS-PAGE (15 %), perfil de purificação da VapC20.....	46
Figura 13. Cromatograma de purificação por afinidade a níquel da proteína VapC19.....	47
Figura 14. Cromatograma de exclusão molecular da proteína VapC19.	48
Figura 15. Cromatograma de afinidade por níquel, purificação da VapB11	49
Figura 16. Cromatograma de exclusão molecular da amostra de VapB11.....	49
Figura 17. Cromatograma de afinidade por níquel, purificação da VapB21	50
Figura 18. Cromatograma de exclusão molecular da amostra de VapB21.....	51
Figura 19. Cromatograma de afinidade por níquel, purificação da VapB17.....	52
Figura 20. Sobreposição de dois cromatogramas de exclusão molecular da amostra de VapB17.	52
Figura 21. Cromatograma de afinidade por níquel ilustrando a purificação da VapB38	53
Figura 22. Cromatograma de exclusão molecular da amostra de VapB38.....	54
Figura 23. Eletroforese em SDS-PAGE (15 %) das amostras de cromatografia de afinidade da VapB38	54
Figura 24. Eletroforese em SDS-PAGE (15 %) das amostras de três cromatografias de exclusão molecular da VapB38.	55
Figura 25. Cromatograma de afinidade por níquel, purificação da VapB11+GST.....	56
Figura 26. Cromatograma de exclusão molecular da amostra de VapB11+GST.....	56

Figura 27. Cromatograma de exclusão molecular da amostra de VapB21+GST	57
Figura 28. <i>Western Blot</i> da VapB11 e VapB21 Membrana de nitrocelulose	58
Figura 29. Cristais de VapC20 em uma gota de 200 nL obtidos a partir do ensaio com kit ..	60
Figura 30. Microcristais de VapC20.....	61
Figura 31. Microcristais de VapC20 em uma gota de 2 μ L.....	61
Figura 32. Cristais de VapC20.....	62
Figura 33. Cristais de VapC20 em uma gota de 200 nL.....	62
Figura 34. Cristais de VapC19 em uma gota com volume de 200 nL.....	64
Figura 35. Perfil de sedimentação da proteína VapC19.	66
Figura 36. Distribuição contínua do coeficiente de sedimentação da proteína VapC19.	67
Figura 37. Perfil de sedimentação da proteína VapB11.	68
Figura 38. Distribuição contínua do coeficiente de sedimentação continuada proteína VapB11.	69
Figura 39. Perfil de sedimentação da proteína VapB21.	70
Figura 40. Distribuição contínua do coeficiente de sedimentação da proteína VapB21..	71
Figura 41. Perfil de sedimentação da proteína VapB38..	73
Figura 42. Distribuição contínua do coeficiente de sedimentação da proteína VapB38.	74
Figura 43. Curvas de termoestabilidade da proteína VapB17 nos pHs 4,0, 7,0 e 9,5.	77
Figura 44. Espectros dicróicos da proteína VapB17 na região distante da luz UV em pH 4,0 (A), pH 7,0 (B) e pH 9,5 (C) em diferentes temperaturas.	78
Figura 45. Curvas de termoestabilidade da proteína VapB21 nos pHs 4,0, 7,0 e 9,5 °C.	80
Figura 46. Espectros de dicroísmo circular da proteína VapB21 em pH 4,0, pH 7,0 e pH 9,5 em diferentes temperaturas..	81
Figura 47. Curvas de termoestabilidade da proteína VapB38 nos pHs 4,0, 7,0 e 9,5..	83
Figura 48. Espectros de dicroísmo circular da proteína VapB38 em pH 4,0, pH 7,0 e pH 9,5 em diferentes temperaturas..	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplo da variação das condições experimentais em ensaios de expressão heteróloga visando a obtenção das proteínas em sua forma solúvel.	43
Tabela 2. Parâmetros de UCA-VS obtidos a partir do ajuste dos dados de sedimentação para amostras da proteína VapC19.	65
Tabela 3. Parâmetros de UCA-VS obtidos a partir do ajuste dos dados de sedimentação para amostras de VapB11.	68
Tabela 4. Parâmetros de UCA-VS obtidos a partir do ajuste dos dados de sedimentação para amostras da proteína VapB11.	70
Tabela 5. Parâmetros de UCA-VS obtidos a partir do ajuste dos dados de sedimentação para amostras da proteína VapB38.	72
Tabela 6. Resumo dos parâmetros de UCA-VS obtidos a partir do ajuste dos dados de sedimentação para amostras das proteínas VapB e VapC testadas	75

LISTA DE ABREVIATURAS

CaCl ₂	Cloreto de cálcio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade ótica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ExRtb	cepas de tuberculose Extensivamente Resistentes
g	Grama
h	Hora (s)
HCl	Ácido clorídrico
IPTG	Isopropil-3-D-tiogalactopiranosídeo
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Quilodalton
L	Litro
LB	Luria-Bertani
M	Molar
m/v	Massa por volume
mA	Miliampere
mg	Miligrama
mg/ mL	Miligrama por mililitro
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
Min	Minutos
mL	Mililitro
mL/min	Mililitro por minuto
mM	Milimolar
MRtb	Cepas de Tuberculose Multirresistentes
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato monossódico
NaOH	Hidróxido de sódio

ng/ mL	Nanograma por mililitro
nm	Nanômetro
OMS	Organização mundial da saúde
ORF	<i>Open read frame</i>
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PDB	<i>Protein Data Bank</i> (https://www.rcsb.org/pdb)
RPM	Rotação por minuto
Ra	Variante avirulenta
RMN	Ressonância magnética nuclear
Rmsd	<i>Root Mean Square Deviation</i>
RRtb	cepas resistentes a rifampicina
Rv	Variante virulenta
s	Segundos
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i> (cromatografia de exclusão molecular)
TA	Toxina-antitoxina
Tb	Tuberculose
T_m	Temperatura de <i>melting</i>
U/ μ L	Unidade por microlitro
UV	Ultravioleta
V	Volts
v/v	Volume por volume V
μ g	Micrograma
μ g/ mL	Micrograma por mililitro
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Estatísticas globais	18
1.2. Grupo de risco.....	19
1.3. Mecanismos de infecção e sobrevivência	20
1.4. Mecanismos moleculares: Sistemas toxina-antitoxina	21
1.5. Família VapBC	23
OBJETIVO.....	28
Objetivo geral:.....	28
Objetivos específicos	28
2. MATERIAIS E MÉTODOS	29
2.1. Vetores de expressão.....	29
2.2. Escolha da linhagem de <i>Escherichia coli</i> para produção da proteína heteróloga.....	29
2.3. Transformação pela metodologia de choque térmico	30
2.4. Expressão	30
2.4.1. Pré-inóculo	30
2.4.2. Testes de solubilidade	30
2.4.3. Seleção de clones	31
2.4.4. Expressão dos genes que codificam as proteínas Vap	32
2.5. Purificação	32
2.5.1. Lise.....	32
2.5.2. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC)	33
2.6.3. Cromatografia de exclusão molecular (SEC)	33
2.6. Quantificação	33

2.7. Cristalização.....	34
2.7.1. Triagem de condições	34
2.7.2. Ensaio manuais de cristalização	35
2.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida	35
2.8.1. SDS-PAGE	35
2.9. Diálise	36
2.10. <i>Western blot</i>	36
2.11. Análise de estrutura secundária e estabilidade estrutural por dicroísmo circular	37
2.12. Ultracentrifugação analítica (UCA)	38
2.13. Testes físico-químicos	39
3. RESULTADOS	39
3.1. Expressão	39
3.2. Purificação	43
3.2.1. VapC20	44
3.2.2. VapC19	47
3.2.3. VapB11	48
3.2.4. VapB21	50
3.2.5. VapB17	51
3.2.6. VapB38	53
3.2.7. VapB11 e VapB21 fusionadas à GST.....	55
3.3. Western Blot	57
3.4. Cristalização.....	58
3.4.1. VapB	58
3.4.2. VapC20	58
3.4.3 VapC19	63
3.5. Análise do perfil de oligômeros por UCA	64
3.5.1. VapC19	64

3.5.2. VapB11	67
3.5.3. VapB21	69
3.5.4. VapB38	71
3.5.5 Análise geral dos resultados obtidos para AUC	74
3.6. Perfil de estrutura secundária e termoestabilidade das antitoxinas VapB por DC	75
3.6.1. VapB17	75
3.6.2. VapB21	79
3.6.3. VapB38	82
3.7. Análises físico-químicas	85
4. DISCUSSÃO.....	85
4.1. Expressão	85
4.2. Cristalização.....	87
4.3. Dicroísmo circular	88
4.4. Ultracentrifugação analítica	91
5. CONCLUSÃO	94
6. REFERÊNCIAS.....	95

1. INTRODUÇÃO

A doença tuberculose (TB) é causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) e acomete majoritariamente a região dos pulmões. A transmissão ocorre através da inalação direta de aerossóis de pessoas contaminadas, como por exemplo, tosse, espirro ou vapor ao falar (Ministério da saúde, 2018). Tratamentos eficientes para TB foram desenvolvidos nos anos 40, e o medicamento de referência para o tratamento, rifampicina, se tornou disponível nos anos 60. Atualmente os tratamentos disponíveis para novos casos de TB e para casos de infecção recorrente têm alcançado taxa de sucesso de até 85 %, e são realizados com o uso antibióticos de primeira linha de tratamento como rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol (*Global tuberculosis report, 2018*).

A resistência medicamentosa é considerada um problema de saúde pública, aumentando consideravelmente o custo e a duração do tratamento (*Global tuberculosis report, 2018*), e é comumente dividida em três grandes grupos: infecção por cepas resistentes a rifampicina (RRtb); cepas multirresistentes (MRtb), que são resistentes a rifampicina e isoniazida; e extensamente resistentes (ExRtb), quando apresentam resistência a pelo menos três dos antibióticos de primeira linha. Todo esse quadro representa cerca de 22 % do geral dos indivíduos com tuberculose, que necessitam de tratamento diferenciados com antibióticos de segunda linha. A seleção de coquetéis de medicações eficientes é árdua, exige altos custos e a taxa de sucesso dos tratamentos varia entre 30 % a 54 % (*Global tuberculosis report, 2018*). A **Figura 1**, adaptada do *Global Tuberculist Report (2018)*, ilustra um perfil mundial de incidência de MRtb e RRtb.



Figura 1. Incidência estimada de MRtb / RR-TB em 2017, para países com pelo menos 1000 casos incidentes. **Fonte:** *Global tuberculosis report 2018*.

Algumas evidências sugerem que doença coexistiu com a humanidade desde a antiguidade (With et al., 2008). Uma das linhagens de Mtb mais antigas foi encontrada em ossos humanos datados do período Neolítico pré-cerâmico 6200–5500 a.C (Hershkovitz et al., 2015). Contudo, foi apenas em 1882 que o Dr. Robert Koch publicou pela primeira vez sobre o *bacillus* Mtb iniciando formalmente os estudos sobre a doença (Konch, 1932). Em 1908 foi isolada uma cepa de Mtb e iniciou-se estudos visando a obtenção de culturas atenuadas que pudessem ser utilizadas como possível vacina. Alguns anos depois, em 1921, a vacina BCG foi aplicada pela primeira vez em crianças e seu nome originou-se da cepa Mtb atenuada nomeada de Bacilo Calmette-Guérin (Ministério da saúde, 2018). Com o aumento dos fatores de risco como tabagismo, alcoolismo, diabetes e doenças que levam a baixa do sistema imune, no ano de 1990, a epidemia da tuberculose reemergiu pelo mundo ocasionando a morte de 1,8 milhões de pessoas (*Global Burden of Disease*, 2016). Quatro anos depois, em 1994, A Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou estado de emergência de saúde pública global (*World health organization*, 1994) e desde então vem promovendo a criação de programas para controle e erradicação da doença como *Stop TB Strategy* (2006), *End TB strategy* (2015) e *End TB* (2018) (*World health organization*, 2018). Em 2016, a doença foi considerada como a maior causa de morte por um único agente patogênico, a maior causa de morte relacionada à resistência de antimicrobianos e a maior

causa de morte de pessoas portadoras do vírus HIV (vírus da imunodeficiência humana) (*World health organization, 2016; Global Tuberculosis Report, 2018*). No momento ocupa o ranking global *The Top 10 Causes of Death* (*World health organization, 2016; Global tuberculosis report, 2018*).

1.1. Estatísticas globais

A OMS estima que cerca de um terço da população mundial esteja infectada com o patógeno Mtb, no entanto a maioria das pessoas apresenta apenas a forma latente da doença, desenvolvendo sintomas subclínicos ou até mesmo inexistentes. Somente de 5 a 15 % das 1,7 bilhões de pessoas infectadas chegam a desenvolver a doença, com taxa de mortalidade de 16 % (*World health organization, 2018; Global Tuberculosis Report 2017*). Em 2017, aproximadamente 10 milhões de pessoas desenvolveram TB, com 0,5 milhões de óbitos confirmados, no qual os adultos (com idade superior a 15 anos) e indivíduos HIV positivos tiveram maior representatividade dos casos. Os maiores números de casos catalogados ocorreram nas regiões do Sudeste da Ásia, África, Mediterrâneo Oriental e Pacífico ocidental. Destacam-se ainda China, Índia e Indonésia por apresentarem um foco de incidência muito elevado, totalizando juntos cerca de 45 % dos casos mundiais (*Global tuberculosis report, 2018*).

1.2. Grupo de risco

A incidência da TB para o grupo de portadores de HIV alcança cerca de 10 % dos casos de incidência global (2016). Devido ao seu imunocomprometimento, um paciente HIV positivo é suscetível a um risco 21 vezes maior de desenvolver a doença quando comparado a uma pessoa HIV negativa (*World health organization, 2018; Global Tuberculosis Report, 2018*). Em 2017, dentre o total de mortes por TB, cerca de 300.000 foram de pacientes HIV positivos. A subnutrição, diabetes e uso de drogas tal como o álcool e o cigarro são outros fatores que também influenciam a infecção e desenvolvimento da doença (Simou et al., 2018).

1.3. Mecanismos de infecção e sobrevivência

Para sobreviver a diferentes eventos de *stress* e obter sucesso infectando o hospedeiro o Mtb desenvolveu mecanismos e ferramentas moleculares eficientes. Amberson (1938) descreveu a forma latente de tuberculose como uma infecção silenciosa que produz lesões que não ocasionam sintomas, assim, o hospedeiro só nota a presença do patógeno quando a doença está alojada e já se encontra em fase de desenvolvimento. Assim, a forma latente possibilita burlar e confundir as defesas do hospedeiro, e mesmo com tratamentos adequados, infecções de TB latente levam muito tempo para alcançar a cura e tendem a ser reincidentes (Gomez, McKinney, 2004). Já a dormência é um termo utilizado para definir o um estado de depressão metabólica do Mtb, baseando-se na progressão ou não da doença. (Gomez, McKinney, 2004).

Um dos exemplos de estratégia mais conhecidos é a resistência, na qual o microrganismo adquire a capacidade de sobreviver ao tratamento de um fármaco específico. Um dos mecanismos de resistência é adquirir um plasmídeo contendo genes que permitam resistir aos danos causados pelo antimicrobiano, inativando direta ou indiretamente sua atividade tóxica (Tenover, 2006). Quando há transferência de genes de resistência para futuras gerações é designado o termo resistência hereditária (*inherited antibiotic resistance*) (Levin, Rozen, 2006). Dentro de uma subpopulação da mesma espécie, uma bactéria que adquire resistência apresenta mutações em genes cromossômicos ou a aquisição externa de genes codificadores de resistência, diferindo-se genotipicamente das demais e torna-se apta a transferir essa característica para futuras gerações (Levin, Rozen, 2006). Mundialmente, no ano de 2017, foram contabilizados 160.684 casos de infecções por Mtb multirresistente (*Global Tuberculosis Report*, 2018).

O termo persistência é apresentado por Gomez (2004) em sua mais simples definição: “Continuar firme ou obstinadamente, especialmente em face de oposição ou adversidade” (Levin, Rozen, 2006). Associada ao Mtb, a persistência também é conhecida como resistência não herdada (*apud* Levin, Rozen, 2006), e pode ser compreendida como a capacidade de uma subpopulação de células geneticamente idênticas sobreviver a eventos de *stress*. Sabe-se que um dos mecanismos está relacionado à capacidade de modular o metabolismo com a transcrição de genes específicos que regulam diretamente o crescimento celular (Hayes, 2003; Lewis, 2010). Em sua publicação *Non-inherited antibiotic resistance*, Levin e Rozen esclarecem que a resistência não herdada é puramente fenotípica (2006), diferenciando-a

assim da resistência hereditária. O fenômeno de persistência está relacionado ao estado de latência, dormência, formação de biofilme, casos de infecção recorrente, tratamentos de longa duração e a baixa eficiência dos fármacos anti-TB, contribuindo assim para geração e ascensão da resistência hereditária em pacientes tratados (Gomez, McKinney, 2004; Levin, Rozen, 2006; Lewis, 2010).

1.4. Mecanismos moleculares: Sistemas toxina-antitoxina

Os sistemas toxina-antitoxina (TA) são mais comumente encontrados em procariotos e compreendem genes associados ao controle do crescimento e sobrevivência celular em resposta a múltiplos eventos de stress ambiental (Maisonneuve et al., 2011; Ramage et al., 2009). A modulação da expressão desses genes promove uma constante adaptação celular capaz de direcionar para a formação de biofilme e favorecer a geração de populações celulares persistentes (Maisonneuve et al., 2011; Levin, Rozen, 2006; Wang, Wood, 2011). Estudos (2009-2013) com alguns genes TA de *Mtb* demonstraram *upregulation* durante hipóxia, infecção em macrófagos e em resposta a limitação de nutrientes, sugerindo uma relação direta do sistema TA com adaptação celular e virulência (Ramage et al., 2009; Lewis, 2010; Albrethsen, et al., 2013).

Os genes TA codificam toxinas e antitoxinas que juntas formam um complexo estável que não apresenta efeitos negativos para a bactéria. Em situações fisiológicas normais, a antitoxina (RNA ou proteína) neutraliza a toxina (proteína) inativando-a. Por decorrência de um evento de stress, proteases clivam a antitoxina, cessando assim o mecanismo de inibição. O metabolismo sofre então a regulação pela toxina, que geralmente possui uma atividade bacteriostática reversível. O microrganismo pode entrar em um estado de baixo metabolismo ou dormência celular, até que se estabeleça, em um ambiente favorável, a produção da antitoxina novamente (Gerdes et al., 2012; Mruk e Kobayashi, 2013).

Esse sistema encontra-se organizado no genoma do *Mtb* em *operons*, nos quais a primeira ORF (*open read frame*) usualmente codifica uma antitoxina e a segunda ORF codifica uma toxina. Existem alguns tipos de sistema TA que se diferenciam no mecanismo de inibição da antitoxina (**Figura 2**). O tipo I, quando o RNA da antitoxina impede a tradução do RNA da

toxina; tipo II, se a proteína antitoxina se liga e inibe a proteína toxina; e tipo III, se o RNA da antitoxina se liga e inibe a proteína toxina. Além desses, foram propostos ainda os tipos IV e V com mecanismos diferenciados dos demais (Mruk e Kobayashi, 2013).

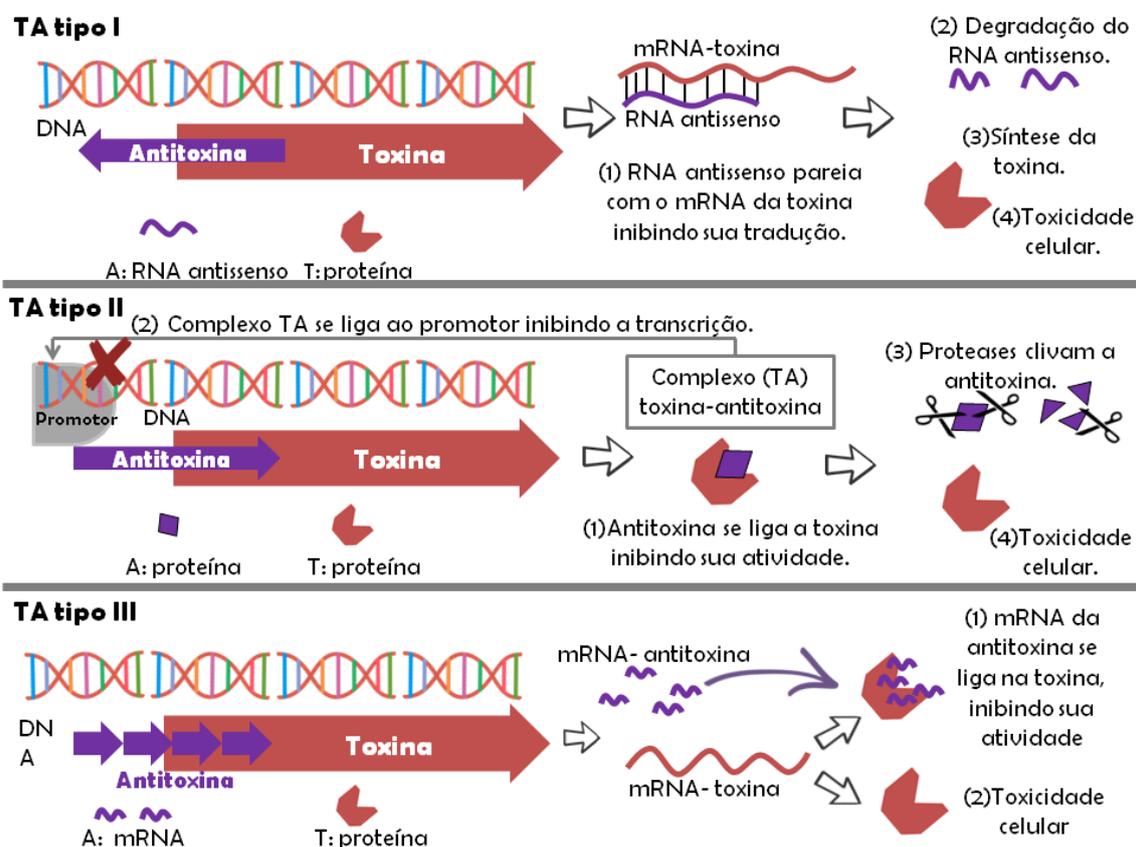


Figura 2. Ilustração esquemática dos sistemas TA do tipo I, II e III. Imagem foi construída baseada no trabalho de Mruk e Kobayashi (2013).

Diversas toxinas codificadas por *operons* toxina-antitoxina de tipo II são enzimas que tem como substrato o RNA, e entre as atividades descritas na literatura encontram-se de ribonuclease (Ramage et al., 2009; Miallau et al., 2009), ribonuclease sequência específica (Ahidjo et al., 2011), ribonuclease seletiva para mRNA (Maisonneuve et al., 2011), ribonuclease específica para a sequência ACA em mRNA (Gerdes, Maisonneuve, 2012; Amitai, 2009), endorribonuclease seletiva para o tRNA iniciador (tRNA^{fMet}) (Winther, Gerdes, 2011) e de endorribonuclease específica para o *loop* Sarcin-Ricin do rRNA 23S (Winther et al., 2013). No genoma do Mtb, existem 88 *loci* relacionados aos sistemas TA, dos quais 48 pertencem à família de proteínas associadas à virulência (Vap, *Virulence Associated Protein*) (Ramage, et al., 2009). Existem nove tipos diferentes de classificação para a família

TA, dentre elas, os genes *vapBC* são considerados a maior família e são categorizados como TA do tipo II (Das, et al., 2014).

1.5. Família VapBC

As VapC pertencem a uma família de proteínas que apresentam o domínio PIN, em geral, essas proteínas são caracterizadas funcionalmente como RNAses de sequência-específica e apresentam um sítio catalítico que funciona de forma similar (Arcus et al., 2010; Ahidjo et al., 2011; Das et al., 2014; Deep, et al., 2017). Este domínio é amplamente encontrado em procariotos e possui estrutura, em sua maioria, conservada, apresentando uma folha- β antiparalela com hélices α s em ambos os lados (Arcus, et al., 2010; Jardim, et al., 2016). A **Figura 3** apresenta o potencial eletrostático de superfície da VapC21. A extensa cavidade onde se encontra sítio de ligação ao substrato RNA apresenta carga substancialmente positiva e indica local onde o substrato ou inibidores podem se ligar. No sítio ativo pode ocorrer a ligação de íons bivalentes, como o Mg^{+2} , que exercem o papel de cofator e usualmente interagem com resíduos conservados de ácido aspártico (Min, et al., 2012; Das, et al., 2014). Existe pouca identidade entre as sequências de VapC de Mtb, alguns estudos mencionam valores de 9 a 20 % (Deep, et al., 2017), chegando até 38 % (Jardim, et al., 2016), dependendo das sequências comparadas. No geral, as toxinas são proteínas estruturadas, compactas, e em sua maioria, encontram-se em solução como homodímeros (Jardim, et al., 2016).

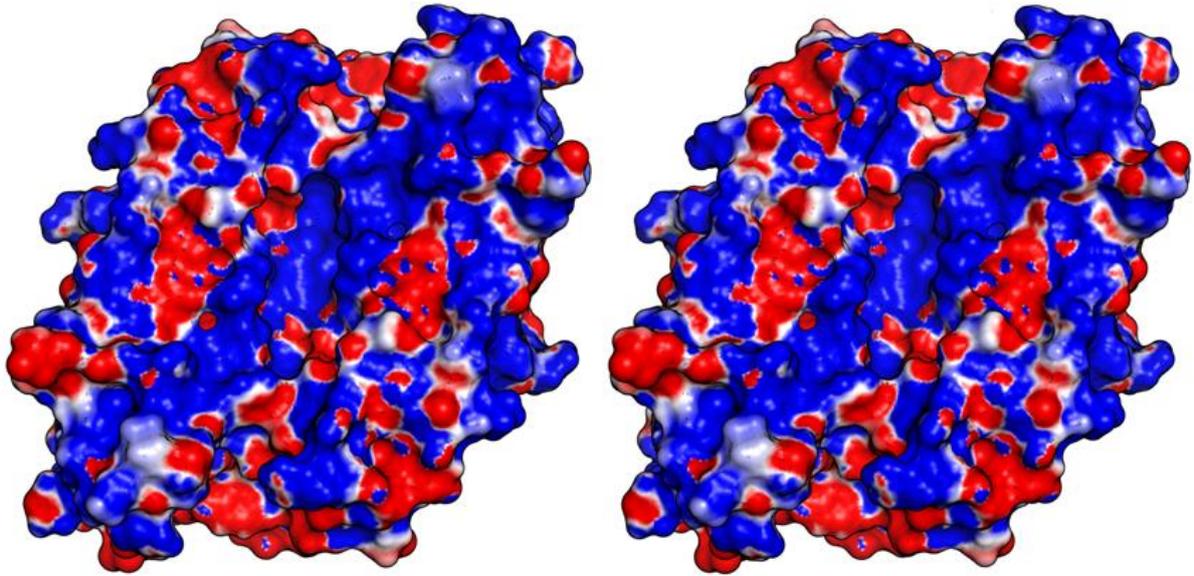


Figura 3. Imagem estéreo do dímero de VapC21 colorida de acordo com o potencial eletrostático na superfície, sendo as regiões negativas coloridas em vermelho e as regiões positivas coloridas em azul. A extensa região de potencial eletrostático positivo (azul) que se estende do canto inferior esquerdo ao canto superior direito é o sítio de reconhecimento e ligação ao RNA (PDB *code* 5SV2). **Fonte:** figura adaptada do artigo: Jardim, et al., 2016.

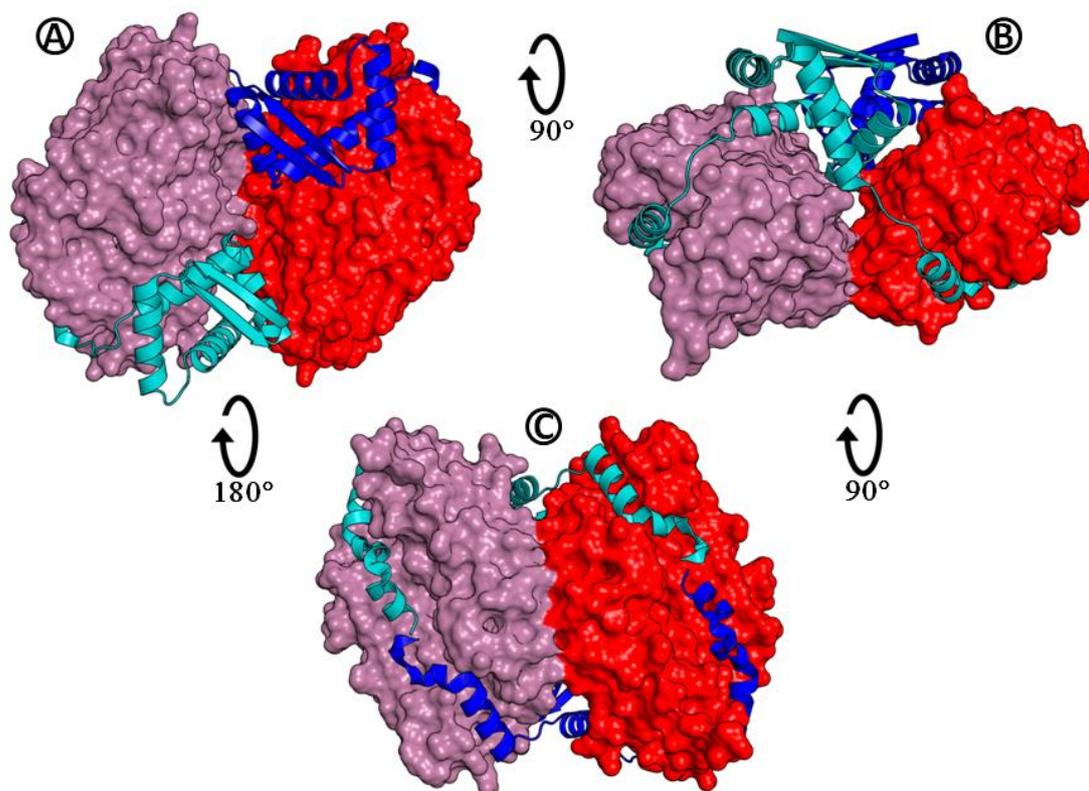


Figura 4. Complexo de VapBC3. Cada imagem foi rotacionada 90° para melhor visualização da estrutura. O dímero de VapC está colorido em rosa (cadeia A) e vermelho (cadeia B). Para as antitoxinas, um dímero está em ciano e outro em azul. **(A)** Visão de cima, fica em evidência o sítio de ligação ao DNA, duas fitas- β das antitoxinas coloridas em ciano e azul. **(B)** Vista lateral, pode-se observar tanto o domínio de ligação ao DNA quanto a interação toxina-antitoxina. **(C)** Está em evidência a cavidade da VapC por onde a VapB se liga, incluindo o sítio ativo, ressaltando que o mesmo dímero de VapB pode inativar cadeias de toxinas diferentes. **Fonte:** (PDB *code* 3H87) (Min, et al., 2012).

As VapB são antitoxinas que apresentam especificidade para inibir apenas sua toxina cognata (Deep, 2017; Kang, et al., 2017). Sua estrutura alongada e flexível garante que seja possível envolver a toxina, inativando-a e formando um complexo estável (**Figura 4**) (Kang, et al., 2017; Das, et al., 2014). Apesar da região N-terminal apresentar uma estrutura estável responsável pela dimerização e interação com o DNA, em solução parte considerável das antitoxinas é intrinsecamente desenovelada. Ao interagir com o dímero de sua toxina cognata, a região C-terminal das proteínas VapB assume uma conformação helicoidal característica (**Figura 4**) (Kang, et al., 2017). A **Figura 5** apresenta o alinhamento estrutural das VapB utilizadas neste trabalho, onde é possível visualizar a baixa identidade entre as antitoxinas. A única parte com maior identidade corresponde à porção N-terminal, responsável pela

dimerização e reconhecimento da região promotora no DNA (Das, et al., 2014; Lee, et al., 2015). Já a região C-terminal apresenta especificidade para a toxina, o que contribui para explicar a ausência de identidade no alinhamento (**Figura 5**) (Min, et al., 2012). Em alguns casos, a porção C-terminal da antitoxina contém resíduos carregados positivamente que se ligam diretamente no sítio ativo (**Figura 4**, item C), deslocando os íons metálicos e abolindo sua atividade (Das, et al., 2014; Lee, et al., 2015). Algumas antitoxinas podem se ligar a suas toxinas cognatas em diferentes razões estequiométricas, por exemplo, VapB15 pode se ligar a um dímero de VapC15 nas proporções de 1:1 ou 1:2. Nesse último caso, uma única molécula de VapB15 inibe dois sítios de VapC15 distintos (Das, et al., 2014).

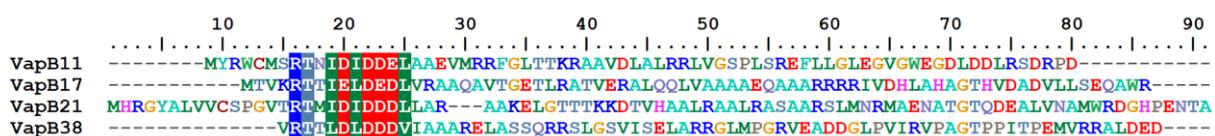


Figura 5. Alinhamento de algumas VapB. As sequências foram retiradas do servidor *Tuberculist*. Os dados foram processados e analisados pelo *software* Clustal.

A diversidade estrutural das antitoxinas VapB é surpreendente. Por exemplo, a identidade entre quaisquer duas das 47 antitoxinas de Mtb encontra-se abaixo de 35 %, e essas proteínas podem se estruturar em diferentes domínios e motivos (Pagani, et al., *to be published*). Por exemplo, estruturas cristalográficas do complexo VapBC de *Shigella flexneri* (Dienemann, et al., 2011) (PDB code 3TND) e VapBC2 de *Rickettsia felis* (Mate, et al., 2011) (PDB code 3ZVK) revelam que essas proteínas apresentam um *swapped-hairpin* β -barrel característico de proteínas que se ligam ao DNA como as antitoxinas Maze (Dienemann, et al., 2011; Mate, et al., 2011), enquanto a proteína FitAB de *Neisseria gonorrhoeae* (Mattison, et al., 2006) (PDB code 2H1O) e a VapB2 de Mtb H37Rv (Min, et al., 2012) (PDB code 3H87) se utilizam do motivo *ribbon-helix-helix* para se ligar às suas regiões promotoras (Mattison, et al., 2006; Min, et al., 2012). Adicionalmente, dados de ressonância magnética nuclear (RMN) apontam que a VapB46 de Mtb apresenta um domínio Phd/YefM, cuja função é se ligar a sua região promotora (Roy, et al., 2018).

Atualmente, existem estruturas de Vap de Mtb disponíveis no PDB que foram resolvidas por cristalografia e difração de raios-X. Sete delas são de complexos VapBC: **VapBC5** (PDB code 3DBO) **VapBC3** (Min, et al., 2012) (PDB code 3H87), **VapBC11** (Deep, Thakur, *to be published*) (PDB code 6A7V), **VapBC15** (Das, et al., 2014) (PDB code 4CHG), **VapBC26** (Kang, et al., 2017) (PDB code 5X3T), **VapBC30** (Lee, et al., 2015)

(PDB *code* 4XGR) e **VapBC49** (Holton, et al. *to be published*) (PDB *code* 5AF3). Apenas duas estruturas de toxina foram elucidadas não complexadas com sua cognitiva antitoxina, a primeira delas foi obtida pelo nosso próprio grupo de pesquisa em 2016, **VapC21** (PDB *code* 5SV2) (Jardim, et al., 2016), e em 2017, um grupo indiano publicou a estrutura da **VapC20** (PDB *code* 5WZ4) (Deep, et al., 2017). Até o momento não foi depositada nenhuma estrutura de VapB de Mtb sem estar associada à sua toxina cognata. A recente publicação de um trabalho de caracterização estrutural da VapB46 sinaliza o início de uma mudança nesse quadro de escassez de informação estrutural a respeito de antitoxinas VapB (Ray, et al., 2018).

A principal justificativa para a realização do trabalho está em compreender melhor as características biofísicas e estruturais das proteínas Vap, facilitando o entendimento dos mecanismos moleculares dos sistemas toxina-antitoxina de Mtb que estão ligados a persistência e geração de cepas multirresistentes. Os resultados desse e de outros trabalhos podem fornecer informações de base para o melhor entendimento da doença e mapear possíveis alvos farmacológicos.

OBJETIVO

Objetivo geral:

Expressão, purificação e caracterização biofísica das proteínas VapC20, VapC19, VapB11, VapB17, VapB21 e VapB38.

Objetivos específicos

- Expressão e produção das VapB e VapC na forma solúvel e em grande quantidade;
- Purificação e obtenção de proteínas com alto grau de pureza;
- Cristalização e obtenção de cristais possíveis de difração;
- Caracterização de estrutura secundária e termoestabilidade por dicroísmo circular;
- Identificação de diferentes estados oligoméricos por ultracentrifugação analítica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Vetores de expressão

As sequências dos genes *vapB11* (Rv1560), *vapB17* (Rv2526), *vapB21* (Rv2758c), *vapB38* (Rv2493), *vapC19* (Rv2548) e *vapC20* (Rv2549c) correspondem a linhagem H37Rv de *M. tuberculosis* e foram obtidas pelo servidor TubercuList (Lew et al., 2011). A cepa do bacilo de Mtb H37 foi isolada em 1905, alguns anos após, em 1934, essa cepa foi dissociada em duas linhagens, uma virulenta (Rv) e outra avirulenta (Ra) (Steenken et al., 1934). Desde então, seus isolados H37Rv e H37Ra tem sido amplamente utilizados em pesquisas (Bifani et al., 2000). Os genes relacionados às proteínas VapB e VapC também são denominados pela sua localização no genoma do *M. tuberculosis*.

Todas as proteínas estudadas foram fusionadas a uma *tag* contendo seis resíduos de histidina (*6xHis-tag*) em sua porção C-terminal, isso possibilitou a execução de uma etapa de purificação utilizando uma coluna de cromatografia de afinidade a níquel (Ni²⁺). A mutação D5A (aspartato 5 mutado para alanina 5) foi adicionada às toxinas VapC20 e VapC19 com o propósito de inibir sua atividade RNase, reduzindo a toxicidade para as células.

O vetor de expressão escolhido para o estudo foi o pET24a+. Esse vetor apresenta marca de seleção por canamicina e possibilita a expressão heteróloga do gene de interesse em cepas de *E. coli*. Os genes *vapB11* e *vapB21* também foram clonadas no vetor pGS-21a, um vetor que apresenta marca de seleção por ampicilina e propicia a expressão do gene alvo fusionado à GST. Todos os plasmídeos foram sintetizados pela empresa GeneOne.

2.2. Escolha da linhagem de *Escherichia coli* para produção da proteína heteróloga

Foram realizados testes de expressão com diferentes cepas de *E. coli*: BL21(DE3) pLys-S, BL21(DE3) pLys-E, Rosetta, Lemo21(DE3) e SHuffle. As cepas foram utilizadas nos procedimentos de transformação (Chung et al., 1989) e expressão. Após alguns ensaios de otimização, notou-se que a cepa Lemo21 apresentou melhores resultados para a expressão da maioria dos genes. Sendo assim, a Lemo21(DE3) foi estabelecida como cepa de uso padrão para todos os ensaios subseqüentes. De acordo com o fabricante, essa cepa apresenta resistência a cloranfenicol e possibilita ajustes finos na expressão da T7 RNA polimerase, reduzindo a formação de corpos de inclusão e os efeitos inibitórios no crescimento devido a expressão de proteínas tóxicas.

2.3. Transformação pela metodologia de choque térmico

Para a transformação das células foi misturado 1 μL do plasmídeo na concentração de 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ a 100 μL de células competentes com densidade ótica a 600 nm (DO_{600}) de $\sim 9,0$. A mistura foi incubada no gelo por 40 minutos e posteriormente submetida a um choque térmico de $42\text{ }^\circ\text{C}$ por 90 segundos. Os tubos contendo as células foram transportados em gelo até o fluxo laminar, suplementados com 900 μL de meio Luria Bertani (LB) líquido (peptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L e NaCl 5 g/L, pH 7,0) e incubados a $37\text{ }^\circ\text{C}$ por 1 hora, sob agitação de 220 RPM. No fluxo laminar foram pipetados 50 μL da cultura de células em uma placa de Petri contendo meio LB sólido (peptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L e NaCl 5 g/L pH 7,0 e ágar 2 % (m/v)) e antibióticos. As concentrações de cloranfenicol e canamicina estabelecidas para todos os ensaios foram de 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. Para as células transformadas com pGS-21a foi padronizado as concentrações de cloranfenicol a 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e ampicilina a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As placas foram deixadas na estufa por 14 horas a $37\text{ }^\circ\text{C}$. A seleção de clones positivos foi feita por colônias que cresceram na placa com antibiótico.

2.4. Expressão

2.4.1. Pré-inóculo

Uma colônia isolada foi repassada para um tubo Falcon de 15 mL contendo 5 mL de meio LB suplementado com glicose 1 %, cloranfenicol 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e canamicina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ou ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Os tubos foram transferidos para um agitador e permaneceram por 14 horas a $37\text{ }^\circ\text{C}$, sob agitação de 220 RPM.

2.4.2. Testes de solubilidade

Foram executados diferentes testes de solubilidade com a finalidade de identificar as condições em que cada proteína seja expressa em sua forma solúvel e em grande quantidade. Os principais parâmetros alterados de um teste para outro foram o meio de cultura, tempo de crescimento, temperatura e concentração de agente indutor (Saída, et al., 2006). Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 150 mL, contendo 25 mL de meio

LB ou ZYM-5052 (suplementado com FeCl_3 100 μM) (Studier, 2014) suplementados com antibióticos. A quantidade estabelecida de pré-inóculo para ambos os meios foi de 100 μL , com agitação fixa de 220 RPM em todas as etapas. Para os testes com meio ZYM-5052 variou-se a temperatura entre 18 °C a 37 °C com o tempo de expressão de 6 a 15 horas. Nos testes com meio LB a cultura permaneceu no agitador a 37 °C até atingir uma DO_{600} de 0,8, logo após o agitador foi resfriado a 16 °C e foi adicionado a cultura de 0,05 a 0,5 mM do agente indutor isopropil β -D-1-thiogalactopiranosídeo (IPTG). O tempo pós indução variou de 6 a 12 horas.

Ao final de cada ensaio, 10 mL de cultura celular foram transferidos para um tubo cônico e centrifugados por 15 minutos a 4340 g, 4 °C, em uma centrífuga CR22N (Hitachi). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 5 mL de tampão padrão (Tris 75 mM, NaCl 300 mM, pH 7,4) suplementado com β -mercaptoetanol 3 mM. As células ressuspensas seguiram para lise por sonicação (ultrasonicador S250A, Branson Ultrasonics) durante 80 s, com *duty cycle* de 20 %, amplitude de 30 J e 50 s de intervalo entre os pulsos. Após a lise, a amostra foi centrifugada por 30 minutos, a 17400 g e 4 °C. Durante o processo foram coletadas alíquotas de 100 μL para análise por eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). As metodologias de expressão que obtiveram maior sucesso na produção da proteína de interesse foram escalonadas para frascos de 1 L.

2.4.3. Seleção de clones

Com o objetivo de selecionar clones que apresentassem uma maior produção das proteínas VapC20 e VapC19 em sua forma solúvel foram preparados 20 pré-inóculos com diferentes clones de uma mesma placa, sendo o critério de escolha abranger colônias que diferem em tamanho, coloração e textura. As DO_{600} dos pré-inóculos foram registradas e cálculos de diluição foram realizados para que a DO_{600} inicial fosse de aproximadamente 0,8. Como recipiente para crescimento celular utilizou-se de uma placa de 24 poços (6x4) de volume 1 mL. Para garantir que os reagentes não estavam contaminados, os quatro primeiros poços foram utilizados como controle negativo e continham: meio LB; meio LB e 0,5 mM IPTG; meio LB e antibióticos; meio LB, antibióticos e IPTG. A cada poço foi adicionado o pré-inóculo, IPTG, antibióticos e meio LB para um volume final foi 1 mL. A concentração usada foi de IPTG 0,5 mM, cloranfenicol 34 mg/ mL e canamicina 100 mg/ mL. A placa foi selada com parafilme e colocada no agitador em agitação de 200 RPM, a 16 °C durante

6 horas. Após o ensaio, as culturas foram retiradas da placa, centrifugadas, ressuspensas em tampão de lise (Tris 75 mM, NaCl 300 mM, 5 % de glicerol e MgCl₂ 3 mM, pH 7,4) e analisadas por SDS-PAGE. Foram selecionados os clones que apresentaram a banda mais intensa no gel SDS-PAGE referente a proteína de interesse.

2.4.4. Expressão dos genes que codificam as proteínas Vap

As etapas de expressão em maior escala foram realizadas em Erlenmeyer de 1 L contendo 500 mL de meio autoindutor ZYM-5052 ou com meio LB, suplementados com antibióticos na mesma concentração dos testes anteriores.

Todas as antitoxinas (VapB) foram expressas em meio autoindutor (ZYM-5052). A partir do inóculo os frascos permaneceram a 37 °C, sob agitação de 220 RPM por 10 horas. A expressão da toxina VapC20 ocorreu em meio ZYM-5052 a 37 °C, 220 RPM até atingir uma DO₆₀₀ de 0,9. Em seguida, a temperatura foi reduzida para 18 °C por 7 horas. A toxina VapC19 foi expressa em meio LB, após o inóculo, a cultura permaneceu sob agitação de 220 RPM a 37 °C até atingir a DO₆₀₀ de 0,8, então a expressão foi induzida pela adição de IPTG 0,05 mM e a cultura permaneceu no agitador 16 °C por 8 h. Ao final de cada expressão, o meio de cultura foi transferido para um frasco de centrífuga de 500 mL e centrifugado por 20 minutos a 4 °C, 4340 g. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* imediatamente congelado.

2.5. Purificação

2.5.1. Lise

O *pellet* produzido ao final da etapa de expressão foi ressuspensado em 45 mL tampão de lise (tampão padrão) e transferido em um recipiente com gelo. Para a VapC20 e VapC19 o tampão de lise foi suplementado com 5 % de glicerol e MgCl₂ 3 mM. Foi utilizado um sonicador Sonifier 450 (BRANSON) com *output control* de 3 e *duty cycle* de 30 %. O tempo de lise para cada amostra foi de 25 min. Logo após as amostras foram centrifugadas por 45 minutos a 4 °C e 17400 g e uma alíquota de 50 µL foi coletada para análise por SDS-PAGE. O restante do sobrenadante foi filtrado em uma membrana com poro de 0,45 µm, e

suplementado com 15 mM de imidazol, visando reduzir interações inespecíficas de contaminantes com a matriz da coluna de purificação.

2.5.2. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC)

Uma coluna de afinidade HisTrap™ HP de 1 mL (GE) previamente equilibrada com tampão contendo Tris 75 mM, NaCl 300 mM, β-mercaptoetanol 3 mM, pH 8,0 foi conectada ao equipamento ao equipamento ÄKTA Prime (GE Healthcare). O extrato celular anteriormente filtrado foi injetado na coluna em um fluxo de 1 mL/min. Para remoção de proteínas contaminantes etapas de lavagem se sucederam com tampão de eluição (tampão padrão suplementado com 500 mM de imidazol, pH 8,0) variando a concentração de imidazol de 25 mM até 80 mM. Concentrações de imidazol entre 100 mM a 300 mM foram utilizadas para eluir a maioria das proteínas Vap. Para a proteína VapB21+GST foi utilizado um tampão de eluição contendo imidazol 1 M. A quantidade de etapas de lavagem variou em cada caso. Várias alíquotas foram coletadas durante todo processo de purificação para análise por SDS-PAGE. Ao final da etapa de eluição, as frações coletadas referentes às proteínas de interesse foram direcionadas para purificação por cromatografia de exclusão molecular.

2.6.3. Cromatografia de exclusão molecular (SEC)

A fim de reduzir ainda mais a presença de contaminantes, as amostras obtidas pela cromatografia de afinidade foram direcionadas para mais uma etapa de purificação, cromatografia de exclusão molecular. 1 mL de amostra foi injetado em uma coluna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) conectada ao equipamento ÄKTA Purifier (GE Healthcare) e previamente equilibrada em tampão padrão a um fluxo de 0,5 mL/min. As proteínas foram eluídas em diferentes volumes devido a diferença de tamanho e forma, o que influencia diretamente na migração pela matriz da coluna. Os picos referentes às proteínas de interesse foram coletados e imediatamente acondicionados em gelo.

2.6. Quantificação

O cálculo da concentração das amostras foi realizado pela lei de Lambert Beer (eq 1):

$$C = \frac{A_{\lambda} \cdot MW}{\epsilon_{\lambda} \cdot l} \quad (\text{eq. 1})$$

Onde C é a concentração em mg/ mL, A_{λ} é a absorbância a 280 nm, MM é massa molecular em g/mol, ϵ_{λ} é coeficiente de absorvidade molar em $M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e d é a distância percorrida pelo feixe luminoso através da amostra (1 cm). Os coeficientes de extinção teóricos das proteínas foram obtidos pela ferramenta ProtParam disponível pelo servidor ExPasy. Utilizou-se de um espectrofotômetro V-530 (JASCO) para medir a absorbância a 280 nm. Todas as medidas foram realizadas em uma cubeta de quartzo.

A proteína VapB38 não apresenta nenhum resíduo de aminoácido aromático em sua sequência, o que impossibilitou a quantificação pelo método de absorbância a 280 nm. Para determinar a sua concentração proteica foi escolhido o método do ácido bicinonínico (BCA). Este ensaio com BCA é mais sensível e aplicável do que os de biureto e Lowry e tem menos variabilidade do que o ensaio de Bradford (Smith, et al., 1985; Walker, 2002). Foi utilizado kit de BCA (Sigma, BCA1 B9643) e uma microplaca de 96 poços (12x8). Todo o procedimento foi executado segundo o protocolo do fabricante. As medidas de absorbância das amostras e da curva padrão foram obtidas pelo espectrofotômetro spectraMax-M2e (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) no comprimento de onda de 560 nm.

2.7. Cristalização

2.7.1. Triagem de condições

As proteínas passaram por duas etapas de purificação (IMAC e SEC) garantindo um elevado grau de pureza. A faixa de concentração adotada para os primeiros ensaios de cristalização foi em torno de 10 a 15 mg/ mL. Foi utilizada uma microplaca (12x8) para ensaios robotizados, utilizando a metodologia de gota pendurada (Jancarick e Kim, 1991) com kits de cristalização Crystal Screen HR2-112 (Hampton Research) e JB-JCSG (Jena Bioscience). Com auxílio do equipamento mosquito[®] HTS (TTP Labtech), volumes de 100 nL a 200 nL de proteína foram misturados automaticamente a 200 nL das soluções dos kits. As placas foram avaliadas semanalmente quanto ao aparecimento de micro cristais. Apenas as proteínas VapC20, VapC19, VapB17 e VapB38 apresentaram possíveis formas cristalinas e seguiram para etapa de refinamento manual.

2.7.2. Ensaios manuais de cristalização

Os ensaios foram realizados em placas de 24 poços utilizando o método de gota sentada (Jancarick e Kim, 1991) onde foram variados o pH, concentração dos reagentes e concentração de proteína. A condição em que observou pequenos cristais para VapB17 foi citrato de sódio 100 mM, cloreto de lítio 1 M, PEG 8000 20 %, pH 4,0. Para a VapB38 foi a condição sulfato de amônia 1,4 M, 2-propanol 4 % m/v e acetato de amônia 100 mM. Duas condições de cristalização para a VapC19 se mostraram promissoras para ensaios manuais: PEG 8000 30 % w/v, acetato de sódio 100 mM, sulfato de lítio 200 mM, pH 4,5 e PEG 6000 10 % w/v, bicina 100 mM, pH 9,0.

A proteína VapC20 apresentou duas condições promissoras para cristalização: condição 1 (fosfato de potássio citrato 0,1 M, cloreto de sódio 0,2 M, PEG 8000 20 %, pH 4,2) e condição 2 (acetato de sódio triidratado 0,1 M pH 4,6, sulfato de amônia 0,2 M, PEG 4000 25 %). Três ensaios foram executados para VapC20 com a condição 1. O primeiro foi realizado variando a concentração de proteína de 4 mg/ mL a 13 mg/ mL, pH de 3,8 a 4,4 e variando o PEG 8000 de 16 % a 26 %. No segundo ensaio a influência da concentração de PEG foi testada variando em 16 %, 18 % e 20 %, no pH de 4,0 e 4,2 mantendo a concentração fixa para os outros componentes. O terceiro ensaio visou identificar a melhor concentração de proteína, dentre as condições testadas de 8 mg/ mL a 13 mg/ mL, com variação de PEG de 18 %, 16 % e 20 %, com o pH de 4,2 e 4,0.

2.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida

2.8.1. SDS-PAGE

O gel separador foi preparado contendo poliacrilamida 15 % m/v (acrilamida 14,5 % e bisacrilamida 0,5 %), tris-HCl 250 mM pH 8,8, SDS 0,3 % m/v, persulfato de amônia (PSA) 0,1 % m/v e 3 µL tetrametiletilenodiamina (TEMED). O gel concentrador foi feito com poliacrilamida 5 % m/v (acrilamida 4,85 % e bisacrilamida 0,15 %), tris-HCl 140 mM pH 6,8, m/v SDS 0,3 %, PSA 0,1 % m/v e 3 µL de TEMED. O tampão de corrida continha tris 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1 % m/v. Uma fonte de eletroforese EPS301 (Amersham Pharmacia Biotech) foi utilizada durante a corrida, e a corrente e tensão aplicadas no gel foram de 35 mA e 220 V, respectivamente.

Os géis foram corados com *Coomassie Blue* (0,1 % m/v *Coomassie brilliant blue* R-250, metanol 50 % v/v e ácido acético 10 % v/v) e permaneceram sob agitação por no mínimo 30 minutos. Subsequentemente, a solução corante foi descartada e uma solução de ácido acético 20 % v/v foi utilizada para descorar o gel.

2.9. Diálise

A proteína previamente purificada por exclusão molecular foi dialisada contra água milli-Q em um Amicon (Ultra 15 mL MWCO) com um poro de 3 kDa. Foram adicionados 5 mL de amostra para 10 mL a 15 mL de água milli-Q e centrifugado a 4 °C a 4340 g. Esse procedimento foi repetido por pelo menos 5 vezes. Algumas amostras foram dialisadas contra uma solução de 50 mM NaCl.

2.10. Western blot

Western blot (WB) foi o método utilizado para imunodeteção das proteínas heterólogas. A técnica se baseia na detecção específica de proteínas após sua transferência de um gel de SDS para uma membrana de nitrocelulose (Mahmood, Yang, 2012). Para o procedimento foi usado o anticorpo Anti-HisTag (Sigma), possibilitando que proteínas fusionadas com His-tag fossem especificamente detectadas pela técnica.

Foi realizada previamente uma eletroforese em gel SDS-PAGE 15 % utilizando as amostras de interesse, e ao final, o gel foi incubado por 15 min em tampão Trizima 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0,037 %, metanol 20 %. A transferência das amostras contidas no gel para a membrana de nitrocelulose 0,45 µm, foi realizada por meio do equipamento Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic transfer Cell (Bio-Rad Laboratories). Uma fonte de eletroforese EPS301 (Amersham Pharmacia Biotech) foi utilizada durante a transferência, e a corrente e tensão aplicadas no gel foram de 200 mA e 15 V, respectivamente, por 15 min. Subsequentemente, a membrana foi incubada por 14 horas a 4° C em uma solução PBS (NaCl 1,37 mM, KCl 0,27 mM, Na₂HPO₄ 1 mM, KH₂PO₄ 0,2 mM) suplementada com 5 % de leite desnatado. Em seguida, foram realizadas três etapas de lavagem com tampão PBS-T (*Tween* 0,05 %). A membrana foi incubada com o anticorpo anti-poli histidina (diluição 1:1000) conjugados à fosfatase alcalina (Sigma) por 2 horas sob leve agitação. Após mais três lavagens com PBS-T, a membrana foi lavada rapidamente com tampão APB (Tris HCl 100 mM NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, pH 9,5). Foi revelada utilizando-se do substrato

BCIP/NBT (Sigma) até que as bandas na membrana se tornassem visíveis. Na última etapa foi utilizada água em excesso para remover a solução reveladora.

2.11. Análise de estrutura secundária e estabilidade estrutural por dicroísmo circular

Os estudos de perfil de estrutura secundária das proteínas VapB foram realizados por dicroísmo circular (DC) utilizando o espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco Corporação, Tóquio, Japão) equipado com um sistema de controle de temperatura do tipo *Peltier*, conectado a uma bomba de água (Instrumentos Analíticos, Japão). Os espectros dicroicos foram coletados em cubetas de quartzo de 0,1 cm, na faixa de comprimentos de onda distantes da luz ultravioleta (190- 260 nm) com intervalos de 0,2 nm, uma taxa de escaneamento de 100 nm/min, tempo de resposta de 4 segundos e largura da banda de 1,0, na temperatura de 25 °C. As amostras de antitoxinas foram preparadas nos tampões acetato de sódio 4 mM, pH 4,0, Tris-HCl 4 mM, pH 7,0, e Glicina 4 mM, pH 9,5. Para a realização dos experimentos de DC, a proteína VapB38 foi dialisada em água apresentando concentração final de 0,18 mg/ mL; a proteína VapB17 foi dialisada em tampão Tris HCl 4mM pH 7,0, com concentração de 0,085 mg/ mL; e a proteína VapB21 foi dialisada em tampão Tris HCl 4 mM, pH 7,0 contendo NaCl 50 mM, apresentando concentração de 0,1 mg/ mL. Essas condições foram estabelecidas após realização de vários testes de solubilidade para essas proteínas, sendo estas as concentrações proteicas utilizadas nos ensaios de DC. Para a condução dos experimentos foram registradas três leituras consecutivas e o espectro resultante da média entre os 3 espectros dicroicos foi considerado e ajustado com a subtração dos valores do sinal dicroico do espectro do tampão utilizado como brancos. As elipticidades (mdg) obtidas no ensaio foram convertidas em elipticidade molar ($[\theta]$) ($\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$) baseado na massa calculada por resíduo de 115 Da segundo a equação (2):

$$[\theta] = 115 \times \alpha / 10 \times C \times l \quad (\text{eq.2})$$

Onde, α é o sinal dicroico em miligraus, C é a concentração da amostra (mg. mL^{-1}) e l é o trajeto óptico (cm) da cubeta utilizada.

Os ensaios de termoestabilidade das antitoxinas foram realizados nos pHs 4,0; 7,0 e 9,5; nos comprimentos de onda de 208 nm para a proteína VapB38 e 222 nm para VapB17 e VapB21, por corresponderem as regiões mais estruturadas das proteínas em estudo. As temperaturas dos ensaios variaram de 25 a 95 °C para todas as proteínas, com coleta de dados

em intervalos de 0,2 °C/min. Durante todo o ensaio foi realizada a coleta de espectros dicróicos com intervalos de 10 °C (25 a 95 °C) na região distante do ultravioleta (190-260 nm). As curvas de desnaturação térmica foram apresentadas considerando os valores da elipticidade molar em diferentes temperaturas e as frações da proteína desenovelada (f_U), estimadas de acordo com a **eq. 3**. A temperatura de fusão da proteína (T_m), na qual metade dela se encontra desenovelada e metade na forma nativa, foi estimada pelo ajuste sigmoidal das curvas de desnaturação.

Os parâmetros termodinâmicos (entalpia [ΔH_m], entropia [ΔS_m], à temperatura de fusão e a energia livre de *Gibbs* a 25 °C [ΔG^{25}]) foram calculados com base na aproximação van't Hoff (**eq 3 a eq 7**) (Pace, 1997).

$$f_U = (S_n - [\theta]M) / (S_n - S_u) \quad (\text{eq. 3})$$

$$K_{eq} = f_U / (1 - f_U) \quad (\text{eq. 4})$$

$$\Delta G = -R T \ln K_{eq} \quad (\text{eq. 5})$$

$$R \ln K_{eq} = -\Delta H (1/T) + \Delta S \quad (\text{eq. 6})$$

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (\text{eq. 7})$$

S_n e S_u representam a fração nativa e desenovelada obtida por regressão linear; R é a constante de gás universal (1.987 cal K⁻¹ mol⁻¹), e T é a temperatura em Kelvin (K). A temperatura de fusão (T_m) foi calculada a partir do ajuste não linear das curvas desnaturadas e também do gráfico ΔG versus temperatura, sendo T_m correspondente à temperatura em $\Delta G = 0$ ($\Delta G = 0 = \Delta H_m - T_m \Delta S_m$). A função de *Boltzmann* no programa Origin Lab 8 (Origin Lab, Northampton, MA) foi utilizada para estimar esses parâmetros.

2.12. Ultracentrifugação analítica (UCA)

Os Experimentos ultracentrifugação analítica por velocidade de sedimentação (UCA-VS) foram realizados para obter informações hidrodinâmicas das proteínas como massa molecular (MM), coeficiente de sedimentação (S) e grau de oligomerização. Os ensaios foram realizados a 20 °C em uma ultracentrífuga analítica *ProteomeLab XL-A/XL-I* (Beckman Coulter, EUA), equipada com um rotor de titânio *An-60 Ti* de quatro posições (Beckman, EUA). Foram utilizadas células de alumínio padrão com uma peça central de duplo canal e

janelas de quartzo. Os dados de varredura de absorvância foram adquiridos a 280 nm ou 220 nm, de acordo com as proteínas, com resolução radial de 0.003 cm, em intervalos de 5 minutos para cada leitura da amostra e realizadas a 50.000 RPM. As análises das proteínas foram realizadas em tampão padrão, concentrações variaram para cada proteína: 0,8 e 0,4 mg/mL para vapB21; 0,29 e 0,07 mg/mL para VapB11; e 1,44, 0,93 e 0,4 mg/mL para VapC19. Para a VapB38 foi estabelecido uma DO_{220} de 1,0 e 0,5, pois não foi possível obter a concentração pelo método de absorvância a 280 nm. O volume específico parcial proteico (v), a densidade (ρ) e a viscosidade do tampão (η) foram estimados por meio do software *SEDENTERP* (Hayes, et al., 1995). O programa *SEDFIT v14.7* (Schuck, et al., 2002) foi utilizado para processar conjuntos de dados para o modelo de distribuição contínua $c(S)$. Para a VapB38 foi utilizado o comprimento de onda de 220 nm. O coeficiente de sedimentação [$c(S)$] foi obtido pelos softwares *SEDFIT* e *SEDPHAT* (Zhao, et al., 2015) utilizando a equação de *Lamm*. As análises estatísticas do erro de *Monte-Carlo* foram realizadas com 200 interações e 68 % nível de confiança de 0,68.

2.13. Testes físico-químicos

Foram realizados alguns testes para estabelecer protocolos de armazenamento eficientes para cada proteína. Foram testadas diferentes soluções variando a concentração de sal (NaCl) e a presença de solutos estabilizadores, como glicerol. A temperatura de estocagem variou entre próxima a 30 °C (temperatura ambiente), 9 °C (geladeira), próximo a 0 °C (submersa em gelo) e a - 5 °C (freezer).

3. RESULTADOS

3.1. Expressão

Durante a realização desse trabalho, diversas proteínas Vap foram selecionadas (VapC3, VapC11, VapC19, VapC20, VapC22, vapC27, VapC29, VapC38, VapB11, VapB17, VapB21, VapB38) e adquiridas da empresa GenOne já clonadas no vetor pET24a. Todos os genes foram submetidos a etapas de transformação em diferentes cepas de *E. coli* e suas expressões foram avaliadas em diferentes meios de cultura, variando temperatura e tempo de expressão. A avaliação da expressão dessas proteínas foi feita pela comparação da intensidade de suas bandas em géis SDS-PAGE. Todas as VapB foram produzidas em forma

solúvel. No entanto, não se obteve sucesso algum na produção das VapC3, VapC11 e VapC38 (dados não apresentados). A *vapC27* foi expressa apenas na cepa Lemo21, apresentou proteína em baixa quantidade e insolúvel (dados não apresentados). Já a *vapC22* e *vapC29* foram expressas em todas as cepas, porém também apresentaram produção de proteínas insolúveis e em pouca quantidade (dados não apresentados). Dentre todas as toxinas, após diversas abordagens, apenas as VapC19 e VapC20 foram produzidas de forma solúvel. Devido ao grande número de proteínas testadas inicialmente, os dados apresentados a seguir referem-se apenas as proteínas em que se obteve sucesso na etapa de produção: VapC19, VapC20, VapB11, VapB17, VapB21 e VapB38.

A **Figura 6** retrata o perfil de expressão bruta (fração de células totais), o objetivo desse ensaio foi avaliar a expressão, analisando e comparando a intensidade das bandas em diferentes poços do gel SDS-PAGE. A VapC19 foi a proteína que apresentou o perfil de banda mais expressivo, seguido da VapC20 e da VapC22, o que sugeriu que são as que melhor foram produzidas (expressão bruta) nessas condições. A fim de encontrar condições ideais para produção solúvel dessas proteínas, foi realizado o ensaio para encontrar o momento no qual a expressão teve seu início (**Figura 7**). Foi observado que a VapC20 e VapC19 só começaram a ser efetivamente produzidas a partir de 7 horas. A **Figura 8** retrata o ensaio de solubilidade (fração solúvel) para estas proteínas, foi avaliado entre um período de 6 e 7 horas, indicou que às 7 horas a proteína VapC20 apresentava-se solúvel. Ensaio posteriores com a mesma proteína demonstraram que a partir de 8 horas já se identificava uma fração insolúvel (dados não apresentados), indicando que, na condição testada, o intervalo no qual a VapC20 encontra-se na forma solúvel varia de 6 a 8 horas. Assim, a expressão foi padronizada (37°C, 220 RPM até atingir DO₆₀₀ 0,8, subsequentemente agitação a 18 °C por 7 horas em meio autoindutor, 220 RPM), pois nestas condições a proteína foi produzida de forma solúvel e em quantidade adequada para os ensaios subsequentes. Para a proteína VapC19 foi estabelecido o protocolo de expressão em meio LB suplementado com 1% de glicose, com a adição de 0,05 mM de IPTG após DO₆₀₀ de 0,8 e subseqüente agitação a 220 RPM por 8 horas a 16 °C.

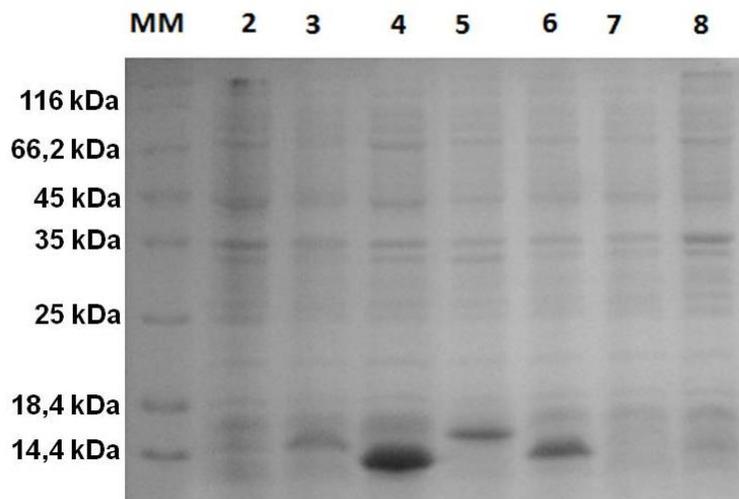


Figura 6. Eletroforese em SDS-PAGE (15 %) das proteínas VapC. Corado com *Coomassie Brilliant Blue*. Teste de expressão em meio LB, após atingir DO_{600} de 0,8, foi adicionado 0,5 mM de IPTG e a cultura permaneceu por 4 horas a 37 °C e 220 RPM. As amostras correspondem a *pellets* de células totais. As bandas do marcador molecular (MM) têm suas massas correspondentes ao lado do Gel. Conteúdo dos poços: 1-MM; 2-Pré-indução; 3-VapC3 (14,7 kDa); 4-VapC19 (13,7 kDa); 5-VapC20 (14,7 kDa); 6-VapC22 (14,7 kDa); 7-VapC27 (14,8 kDa); 8-VapC29 (14,0 kDa).

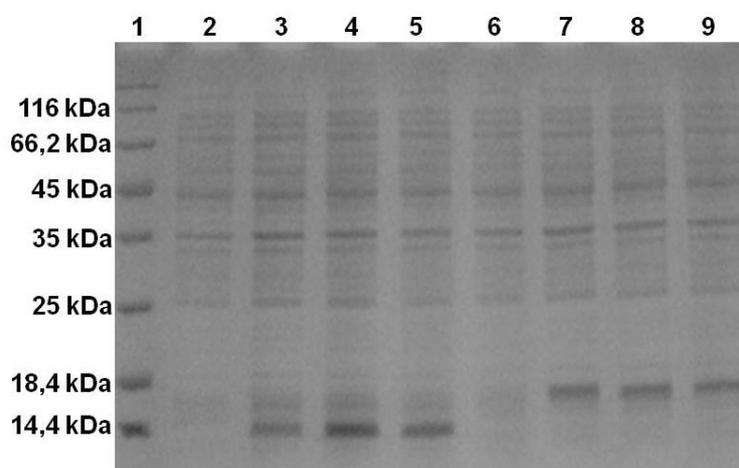


Figura 7. Perfil eletroforético em SDS-PAGE (15 %) das proteínas VapC20 e VapC19 corado com *Coomassie Brilliant Blue*. As amostras dos poços correspondem a alíquotas de *pellets* de células coletados entre 6 a 8 horas e 30 minutos de expressão. As bandas do marcador de massa molecular (1) têm suas massas correspondentes ao lado do gel. Conteúdo dos poços: 1- MM; 2-VapC19 (6 h); 3-VapC19 (7 h); 4-VapC19 (8 h); 5-VapC19 (8:30 h); 6-VapC20 (6 h); 7-VapC20 (7 h); 8-VapC20 (8 h); 9-VapC20 (8:30h).

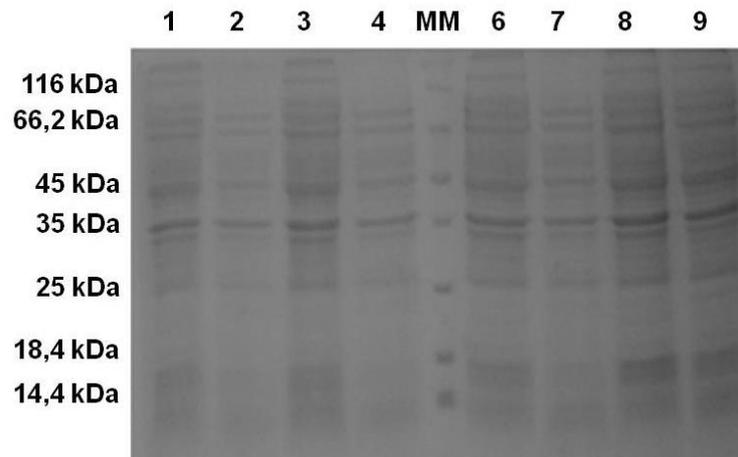


Figura 8. Eletroforese em SDS-PAGE (15 %) das proteínas VapC20 (14,7 kDa) e VapC19 (13,7 kDa) corado com *Coomassie Brilliant Blue*. Expressão variando de 6 a 7 horas após atingir OD₆₀₀ de 0,8. As amostras correspondem a pellets pós-expressão e sobrenadantes da lise (S/ lise), ou seja, apenas as proteínas que estão em solução. As bandas do marcador molecular (MM) têm suas massas correspondentes ao lado do Gel. Conteúdo dos poços ordenados por (1) número do poço, (2) proteína, (3) tipo de amostra e (4) tempo de expressão: 1-VapC19 pellet 6h; 2-VapC19 S/ lise 6h; 3-VapC19 pellet 7h; 4-VapC19 S/ lise 7h; 5-MM; 6-VapC20 pellet 6h; 7-VapC20 S/ lise 6h; 8-VapC20 pellet 7h; 9-VapC20 S/ lise 7h.

Todas as VapB do estudo foram produzidas com sucesso e encontravam-se solúveis após 9 horas nas condições de expressão adotada (**Figura 9**). Para investigar o intervalo de solubilidade das VapB outro ensaio foi realizado (dados não apresentados) variando o tempo de expressão até 15 horas, todas permaneceram solúveis.

Os testes de solubilidade para aprimoramento da expressão demonstraram que fatores como temperatura e quantidade de agente indutor influenciam diretamente na solubilidade das VapC. Temperaturas acima de 18 °C e quantidades de IPTG acima de 0,1 mM direcionaram para produção de corpos de inclusão. Foi observado que a solubilidade das toxinas é muito mais sensível a variações nas condições de expressão que a das antitoxinas.

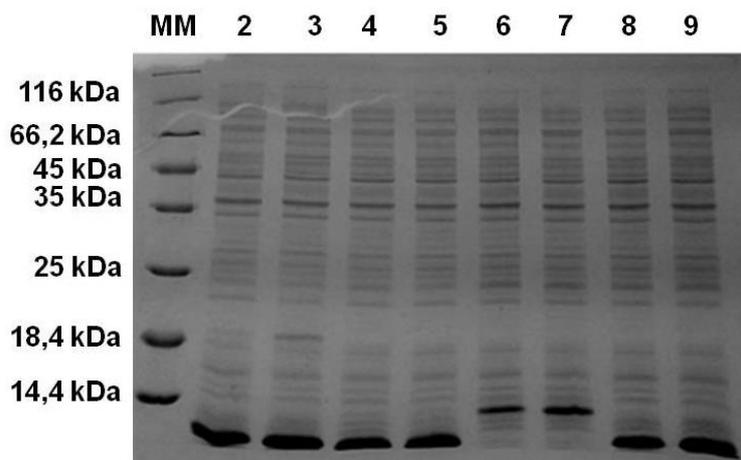


Figura 9. Eletroforese em SDS-PAGE (15 %) das amostras de VapB. Corado com *Coomassie Brilliant Blue*. Gel confirmando a presença de proteína solúvel nos sobrenadantes da lise (S/ lise) das amostras de VapB11 (9,3 kDa), VapB17 (9,3 kDa), VapB21 (10,5 kDa) e VapB38 (9,1 kDa) em uma expressão de 9 horas em meio autoindutor. Sequência corresponde: MM- Marcador de massa molecular; 2-VapB11 *pellet*; 3-VapB11 S/ lise; 4-VapB17 *pellet*; 5-VapB17 S/ lise; 6-VapB21 *pellet*; 7-VapB21 S/ lise; 8-VapB38 *pellet*; 9-VapB38 S/ lise.

A **Tabela 1** apresenta de forma resumida os resultados de alguns ensaios realizados durante as etapas de otimização da expressão. É possível identificar as condições em que apenas a VapC19 e VapC20 encontram-se solúveis.

Tabela 1. Exemplo da variação das condições experimentais em ensaios de expressão heteróloga visando a obtenção das proteínas em sua forma solúvel. A solubilidade das toxinas VapC foi avaliada por meio de gel de SDS-PAGE 15%. Foram assinaladas com um “X” as condições nas quais a proteína foi produzida e estava presente no extrato de células totais; “XX” quando a proteína foi produzida em maior quantidade que ensaios anteriores; e as duas marcações em azul apresentam condições nas quais a proteína estava presente na forma solúvel.

Data	Ensaio	Vap C3	Vap C19	Vap C20	Vap C22	Vap C27	Vap C29
21/12/16	LB, LEMO, 37°C, 4h de indução, 0.5mM IPTG.	-	XX	X	XX	-	-
21/12/16	LB, PLYSE, 37°C, 4h de indução, 0.5mM IPTG.	-	X	X	-	X	X
21/12/16	LB, DE3, 37°C, 4h de indução, 0.5mM IPTG.	-	XX	XX	-	-	-
22/12/16	AUTO, DE3, 16°C, 12h de indução.	-	X	X	-	-	-
22/12/16	AUTO, LEMO, 16°C, 12h de indução.	-	X	x	-	-	-

26/12/16	LB, DE3, 16°C, 4h de indução, 0.3mM IPTG.	-	XX	X	-	-	-
26/12/16	LB, LEMO, 16°C, 4h de indução, 0.3mM IPTG.	-	X	X	-	-	-
26/12/16	AUTO, DE3, 16°C, 12h de indução.	-	X	X	-	-	-
26/12/16	AUTO, LEMO, 16°C, 12h de indução.	-	X	X	-	-	-
02/01/17	AUTO, LEMO, 37°C.	-	X	X	X	-	-
02/01/17	AUTO, PLYSE, 37°C, 8h de indução.	-	X	X	-	-	-
02/01/17	AUTO, DE3, 37°C, 8h de indução.	-	X	X	-	-	-
04/01/17	AUTO, DE3, 37°C, 12h de indução.	-	-	-	X	-	X
04/01/17	AUTO, LEMO, 37°C, 12h de indução.	-	-	-	X	-	X
09/01/17	AUTO, DE3, 18°C, 24h de indução.	-	-	-	X	-	X
16/01/17	AUTO-1, LEMO, 18°C, coleta 6-7h	-	X	X	-	-	-
17/01/17	AUTO-1, LEMO, 18°C, coleta 7-8:30h	-	X	X	-	-	-
20/01/17	AUTO-1, LEMO, 18°C, coleta 10-13h	-	X	X	-	-	-
25/01/17	LB-1, LEMO, 16°C, 0,05 IPTG, coleta 1-8h	-	-	X	-	-	-
25/01/17	LB-1, LEMO, 16°C, 0,05 IPTG, coleta 1-8h	-	X	-	-	-	-
25/01/17	AUTO-1, LEMO, 20°C, coleta 6-8:30h	-	XX	-	-	-	-
25/01/17	AUTO-1, LEMO, 20°C, coleta 6-8:30h	-	-	X	-	-	-

3.2. Purificação

3.2.1. VapC20

A purificação da VapC20 foi dividida em duas etapas e seus cromatogramas podem ser observadas na **Figura 10**, purificação por afinidade, e **Figura 11**, exclusão molecular. Em purificações anteriores (dados não apresentados), obteve-se uma baixa quantidade de proteína

quando purificando o correspondente a 1 L de cultura. Pode-se inferir que a baixa quantidade obtida estava relacionada com a etapa de expressão, como a cultura é retirada assim que a proteína começa a ser expressa, não há tempo para produzir a proteína em grande quantidade (**Figura 7**). Supõe-se que o tempo de expressão não foi suficiente para o acúmulo intracelular da proteína em grande quantidade, e sabemos que aumentar o tempo leva à formação de corpos de inclusão. Assim, padronizou-se o uso do correspondente a 2 L de cultura de células como quantidade de amostra para a purificação. As amostras contendo proteína sempre foram acomodadas em gelo, principalmente após a purificação. A etapa de exclusão molecular sempre foi executada imediatamente após a purificação por afinidade, um intervalo de tempo maior que 4 horas entre os procedimentos ocasionava a precipitação e perda da amostra. A **Figura 12** apresenta o perfil de purificação da proteína, onde foi possível acompanhar visualmente a retirada da maioria dos contaminantes.

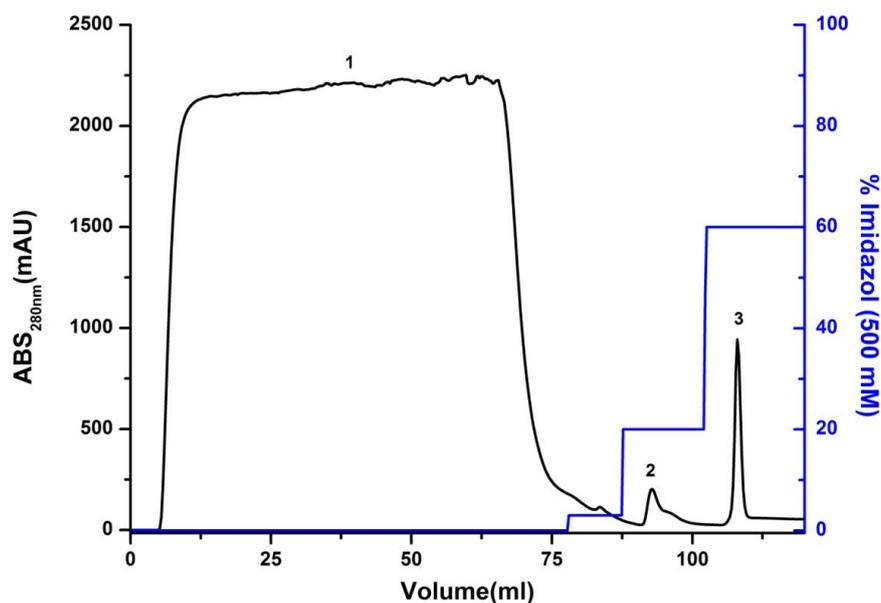


Figura 10. Cromatograma de purificação por afinidade a níquel da proteína VapC20 com 6xHis-Tag. (1) *flow-through*; (2) Primeira lavagem com 100 mM de imidazol; (3) Eluição da proteína com 300 mM de imidazol.

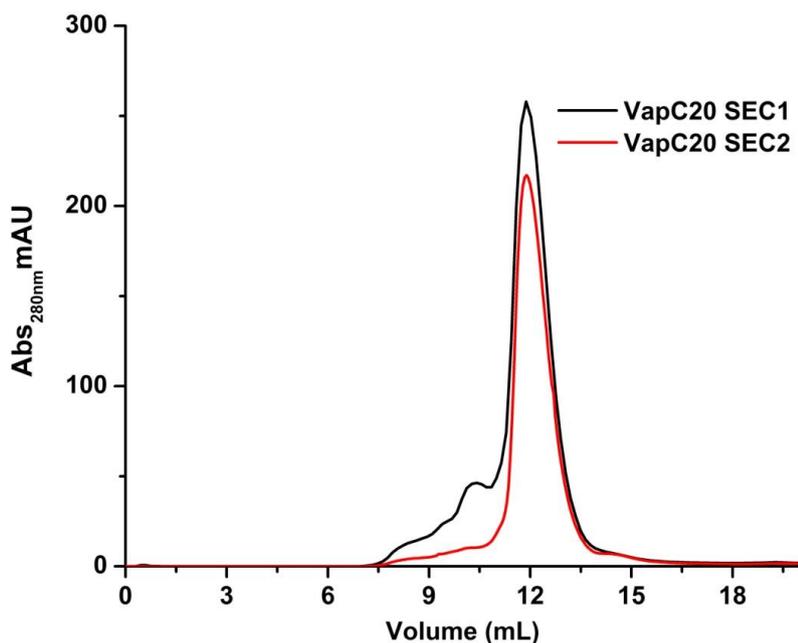


Figura 11. Cromatograma de exclusão molecular da proteína VapC20, que foi previamente purificada por cromatografia de afinidade como apresentado na **Figura 10**. 1 mL de proteína foi injetado na coluna Superdex 75 10/300 (GE). Foram coletadas as frações correspondentes de 12 a 14 mL. SEC 1 e SEC 2 representam duas purificações diferentes de amostras de VapC20, indicando a reprodutibilidade da técnica.

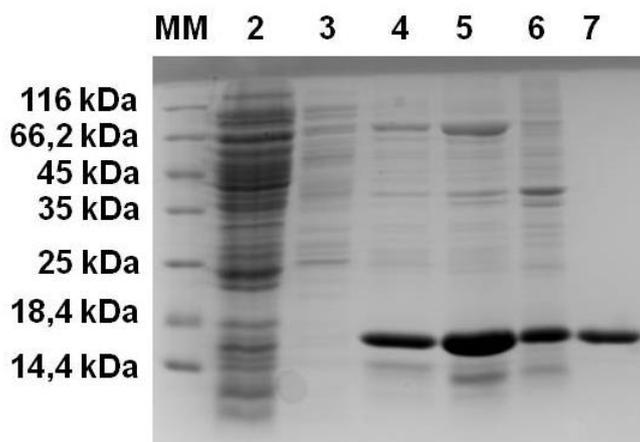


Figura 12. Eletroforese em SDS-PAGE (15 %), perfil de purificação das amostras de VapC20 (Figura 10 e Figura 11), corado com *Coomassie Brilliant Blue*. As bandas do (MM) marcador de massa molecular (MM) têm suas massas correspondentes ao lado do gel. Sequência: 1- MM; 2- *flow-through*; 3- Lavagem com 100 mM de imidazol; Poço 4 a 6 - são referentes a alíquotas da eluição com 300 mM de imidazol da cromatografia de afinidade; 7- Amostra de exclusão molecular.

3.2.2. VapC19

A proteína VapC19, assim como a VapC20, também apresentava termoestabilidade baixa, elevações de temperatura ocasionavam a precipitação da amostra. Esse resultado de purificação (**Figura 13** e **Figura 14**) foi um dos melhores já obtidos para as toxinas, e proveu amostras com alto grau de pureza, utilizadas para os primeiros ensaios de UCA e cristalografia. Infelizmente, o clone correspondente para essa purificação foi perdido, e os clones testados posteriormente não obtiveram resultados similares.

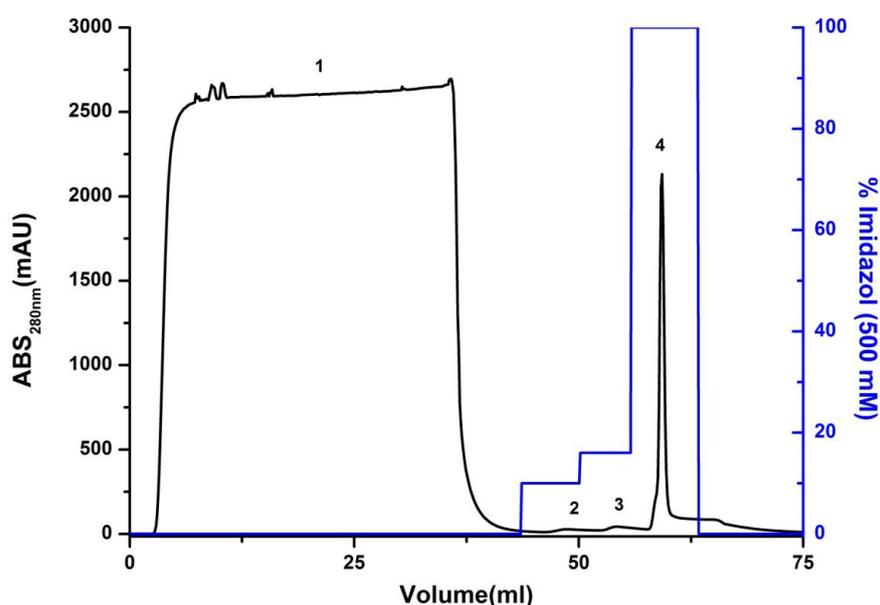


Figura 13. Cromatograma de purificação por afinidade a níquel da proteína VapC19 com 6xHis-Tag. (1) *flow-through*; (2) primeira lavagem com 50 mM de imidazol; (3) segunda lavagem com 80 mM de imidazol (4) Eluição da proteína com 500 mM de imidazol.

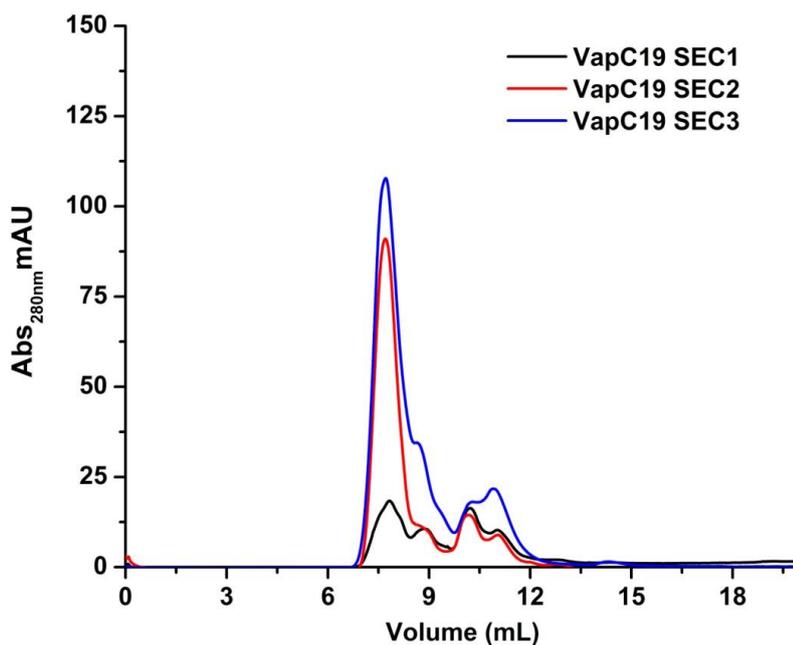


Figura 14. Cromatograma de exclusão molecular da proteína VapC19, que foi previamente purificada por cromatografia de afinidade como apresentado na Figura 13. 1 mL de proteína foi injetado na coluna Superdex 75 10/300 (GE). Foram coletadas as frações correspondentes de 12 a 14 mL. SEC 1, SEC 2 e SEC 3 representam purificações de diferentes amostras de VapC19, indicando a reprodutibilidade da técnica.

3.2.3. VapB11

A purificação da VapB11 é apresentada nos cromatogramas das **Figura 15** e **Figura 16**, sendo cromatografia de afinidade e cromatografia de exclusão molecular, respectivamente. Os diferentes picos observados no cromatograma de exclusão molecular sugerem a presença de diferentes populações oligoméricas em solução.

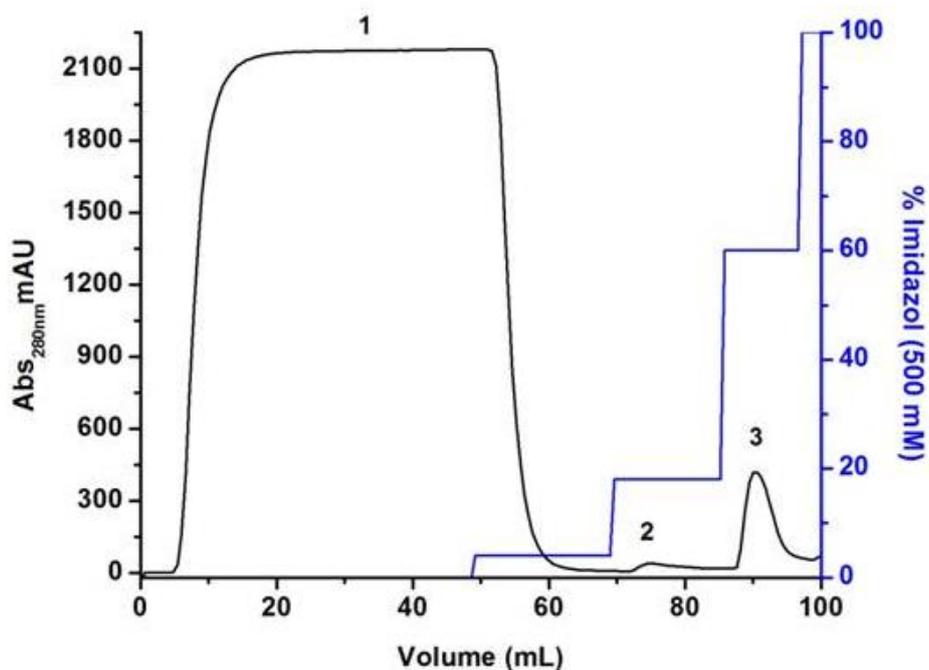


Figura 15. Cromatograma de afinidade por níquel ilustrando a purificação da VapB11 com 6xHis-Tag. (1) *flow-through*; (2) Primeira lavagem com 80 mM de imidazol; (3) Eluição da proteína com 300 mM de imidazol.

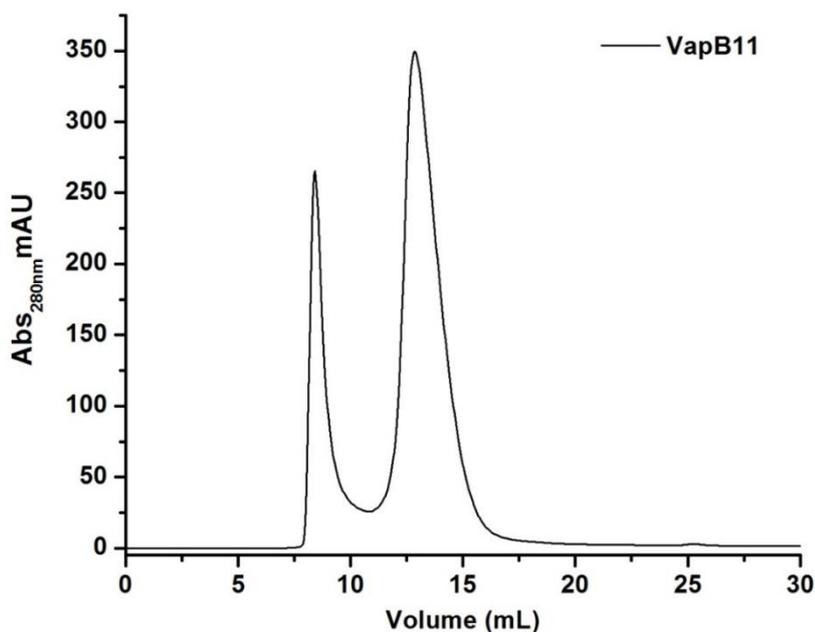


Figura 16. Cromatograma de exclusão molecular da amostra de VapB11, que foi previamente purificada por cromatografia de afinidade como apresentado na **Figura 15**. 1 mL de amostra foi injetado em uma coluna Superdex 75 10/300 (GE).

3.2.4. VapB21

A purificação da VapB21 foi realizada utilizando uma quantidade referente a 1,5 L de cultura celular. Os cromatogramas de purificação por afinidade e de exclusão molecular estão ilustrados pela **Figura 17** e **Figura 18**, respectivamente. Como também observado para VapB11, a VapB21 apresenta dois picos na cromatografia de exclusão molecular, isso caracteriza possivelmente um perfil com diferentes estados oligoméricos.

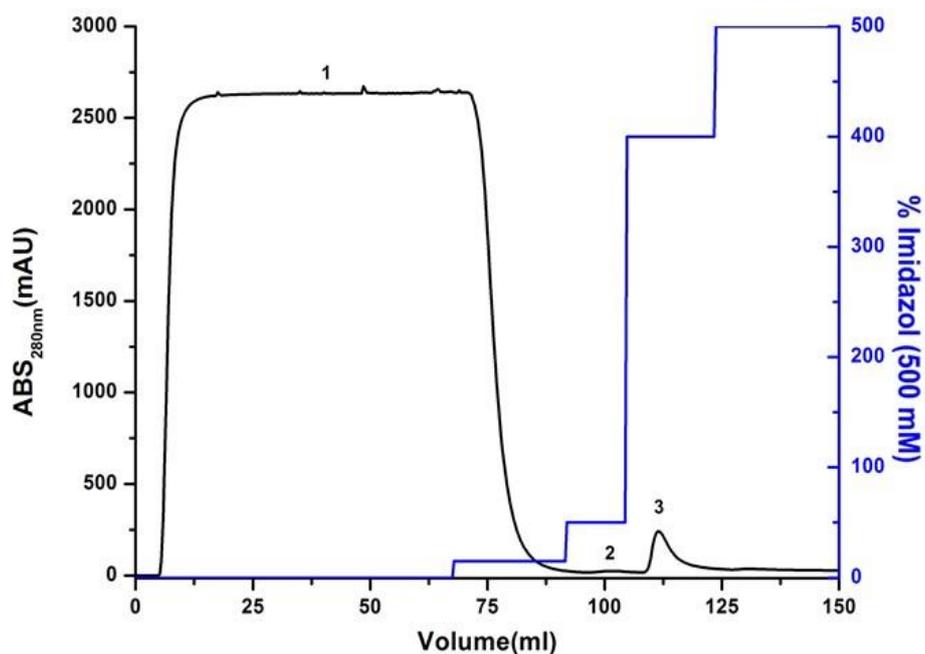


Figura 17. Cromatograma de afinidade por níquel ilustrando a purificação da VapB21 com 6xHis-Tag. (1) *flow-through*; (2) Primeira lavagem com 50 mM de imidazol; (3) Eluição da proteína com 300 mM de Imidazol.

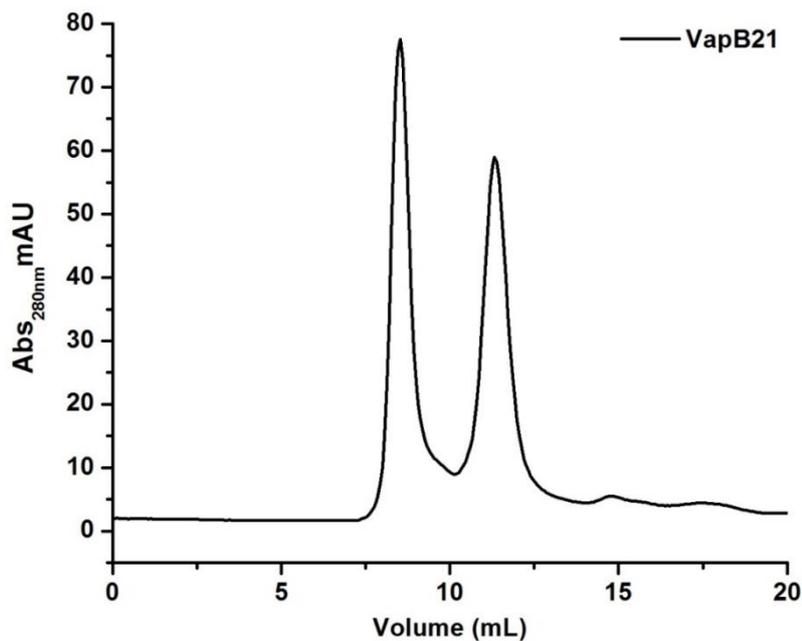


Figura 18. Cromatograma de exclusão molecular da amostra de VapB21, que foi previamente purificada por cromatografia de afinidade como apresentado na **Figura 17**. 1 mL de proteína foi injetado em uma coluna Superdex 75 10/300 (GE).

3.2.5. VapB17

A **Figura 19** refere-se ao cromatograma de afinidade da VapB17. Em cromatografias anteriores (dados não apresentados) notou-se que uma concentração de 50 mM de imidazol foi suficiente para eluir parte considerável da proteína. Portanto, foi padronizada apenas uma etapa de lavagem com 20 mM de imidazol, a fim de minimizar perdas da proteína de interesse. A amostra coletada no volume correspondente ao ápice do pico 3 (**Figura 19**) apresentou presença de precipitados logo em seguida, indicando que mesmo armazenadas no gelo, em tampão padrão, a VapB17 tende a precipitar em altas concentrações. As amostras referentes ao pico 3 foram direcionadas para a exclusão molecular (**Figura 20**), onde foram sobrepostos dois cromatogramas. Foi observada a presença de apenas um pico durante a exclusão molecular, inferindo a presença de apenas um estado oligomérico na amostra.

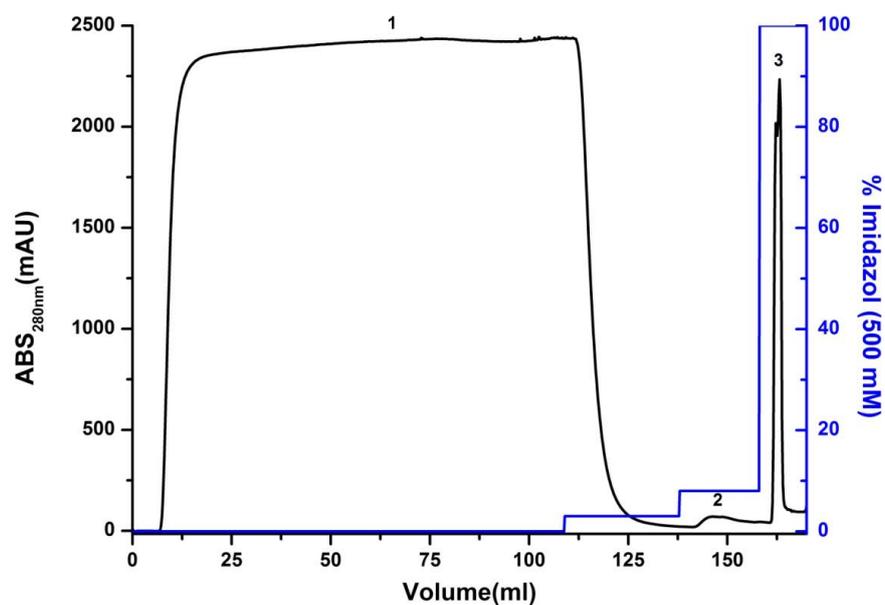


Figura 19. Cromatograma de afinidade por níquel ilustrando a purificação da VapB17 com 6xHis-Tag. (1) *flow-through*; (2) Primeira lavagem com 20 mM de imidazol; (3) Eluição da proteína com 100 mM de Imidazol.

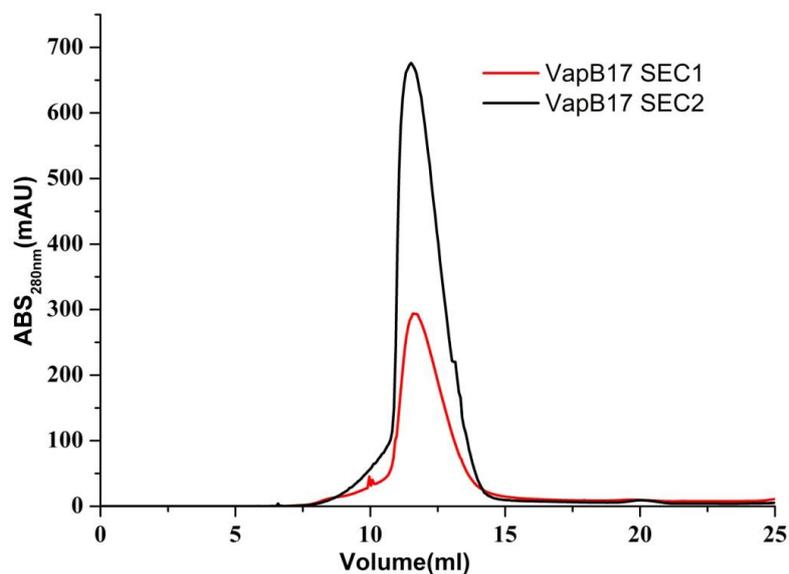


Figura 20. Sobreposição de dois cromatogramas de exclusão molecular da amostra de VapB17. A linha vermelha representa uma amostra mais diluída e em preto uma amostra mais concentrada da mesma proteína, ilustrando a reprodutibilidade da purificação. 1 mL de amostra foi injetado na coluna Superdex 75 10/300 (GE).

3.2.6. VapB38

A VapB38 não apresenta nenhum aminoácido aromático em sua sequência, impossibilitando o monitoramento do processo de purificação, que é comumente realizado por meio de leitura da absorbância a 280 nm. A purificação foi acompanhada apenas pelo sinal de absorção de possíveis contaminantes presentes durante a cromatografia de afinidade (**Figura 21**). O perfil eletroforético apresentado na **Figura 23** indica que parte da proteína foi perdida no *flow-through* e que a lavagem com 80 mM de imidazol gerou uma amostra que aparenta estar em um estado de pureza maior comparado com as outras amostras. Já na eluição com 500 mM de imidazol, notou-se a presença de alguns contaminantes de massas moleculares maiores que a da Vap38 (**Figura 23**). Devido às características da proteína, a visualização do pico referente à eluição da proteína, como apresentado no cromatograma SEC da **Figura 22**, não foi possível. Portanto, foram coletadas amostras durante a purificação, fracionando-as em alíquotas de 1 mL. Essas alíquotas foram analisadas qualitativamente por SDS-PAGE. O perfil eletroforético apresentado na **Figura 24** indica que proteína foi eluída da coluna de exclusão entre 9 e 12 mL, apresentando sua fração mais concentrada em 11 mL.

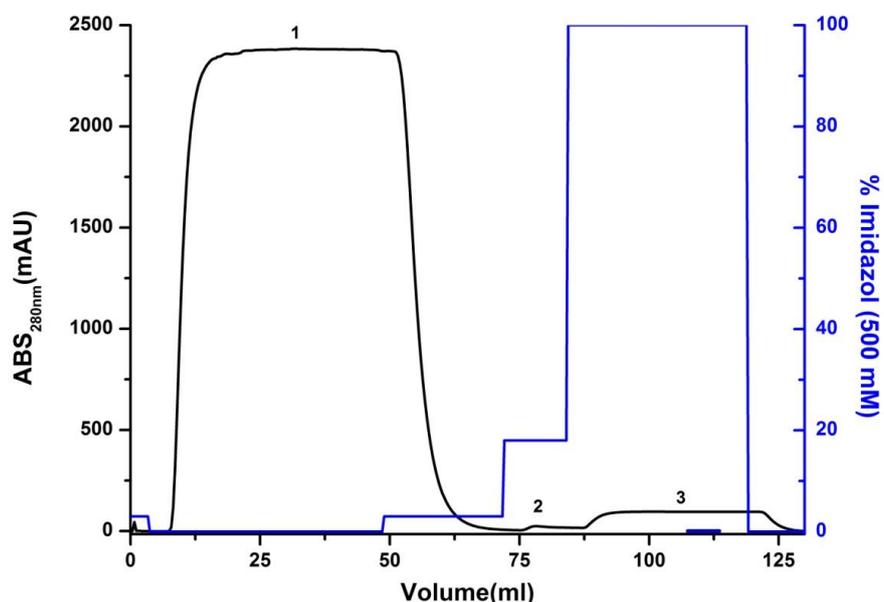


Figura 21. Cromatograma de afinidade por níquel ilustrando a purificação da VapB38 com 6xHis-Tag. (1) *flow-through*; (2) Primeira lavagem com 80 mM de imidazol; (3) Segunda lavagem com 500 mM de Imidazol.

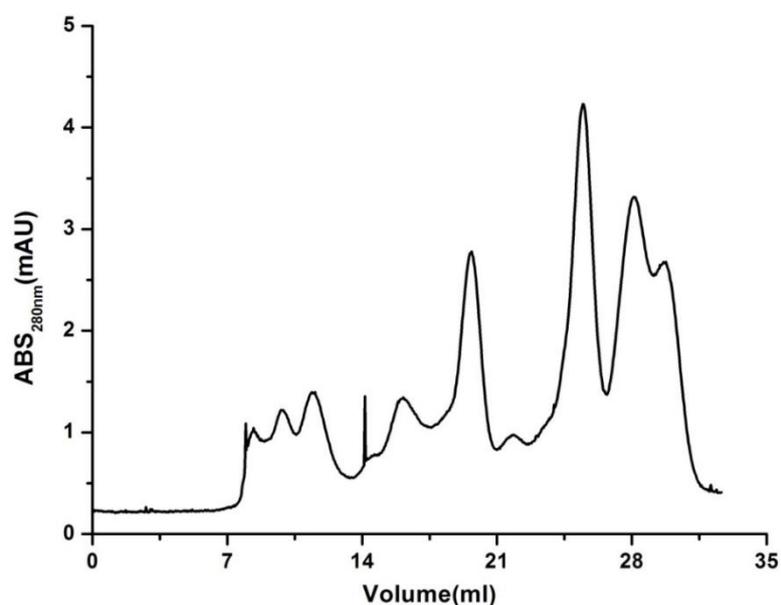


Figura 22. Cromatograma de exclusão molecular da amostra de VapB38, que foi previamente purificada por cromatografia de afinidade como apresentado na **Figura 21**. 1 mL de proteína foi injetado em uma coluna Superdex 75 10/300 (GE).

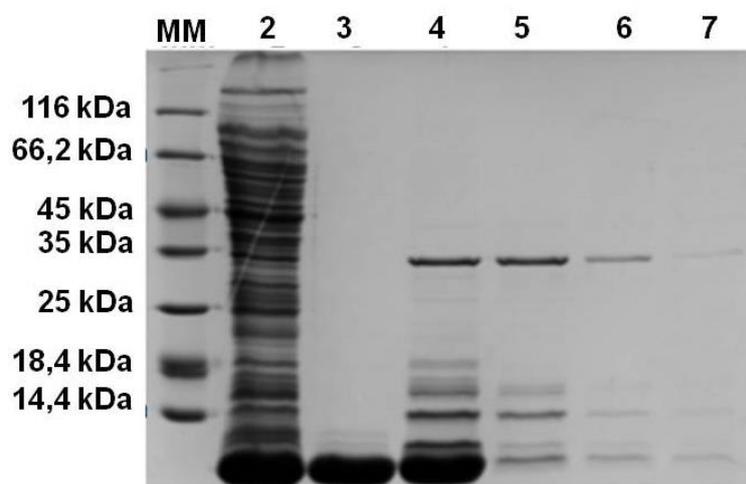


Figura 23. Eletroforese em SDS-PAGE (15 %) das amostras de cromatografia de afinidade da VapB38 (**Figura 21**), corado com *Coomassie Brilliant Blue*. As bandas do marcador de massa molecular (MM) têm suas massas correspondentes ao lado do gel. Sequência: 1- MM; 2- *flow-through*; 3- Lavagem com 80 mM de imidazol; 4- lavagem com 500 mM de imidazol, início do pico 3 entre 87 e 93 mL (volume da purificação); 5, 6 e 7 são amostras coletadas do pico 3 entre 100 mL, 112 mL e 125 mL, respectivamente.

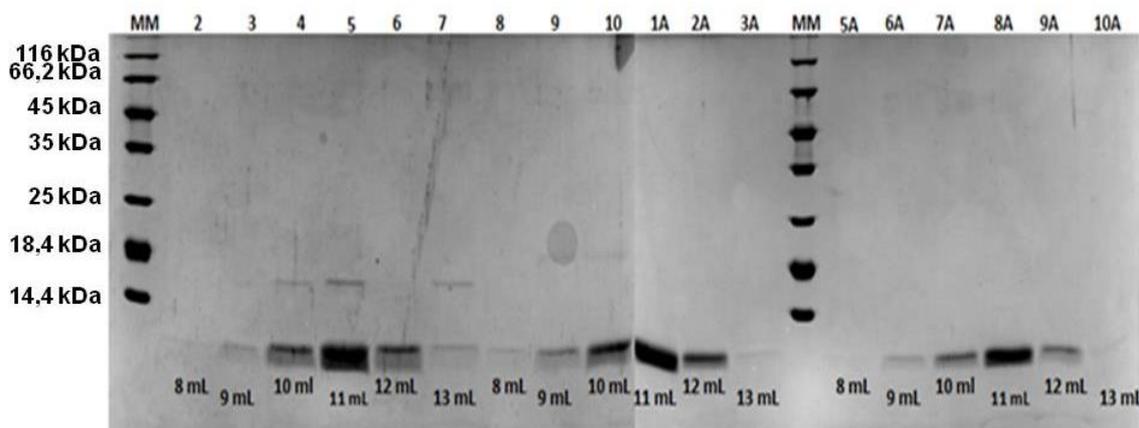


Figura 24. Eletroforese em SDS-PAGE (15 %) das amostras de três cromatografias de exclusão molecular da VapB38, corado com *Coomassie Brilliant Blue*. De 2 a 10 corresponde ao primeiro gel, de 1A a 10 A corresponde ao segundo gel. As bandas do (MM) marcador de massa molecular têm suas massas correspondentes ao lado do Gel. O volume abaixo de cada banda corresponde ao volume de eluição no cromatograma (**Figura 22**). O volume de 8 a 13 mL foi analisado. VapB38 é eluída da coluna entre 9 e 12 mL, sendo 11 mL a fração que corresponde a maior concentração.

3.2.7. VapB11 e VapB21 fusionadas à GST

Os cromatogramas das etapas de purificação das proteínas VapB11+GST e VapB21+GST estão apresentados nas **Figura 25** a **Figura 27**. Foi observado que durante a etapa de eluição e lavagem com 500 mM de Imidazol a VapB11+GST foi eluída lentamente da coluna por quase 50 mL. A estratégia de aumentar a concentração para 1 M de imidazol na purificação da VapB21+GST resultou em uma eluição mais rápida, diminuindo pela metade o volume de eluição (dados não apresentados). Os cromatogramas de SEC das duas proteínas (**Figura 26** e **Figura 27**) são similares, e pode-se inferir que ambas apresentam diferentes picos, que sugerem diferentes populações oligoméricas, resultado que também foi observado para as respectivas proteínas sem a GST fusionada.

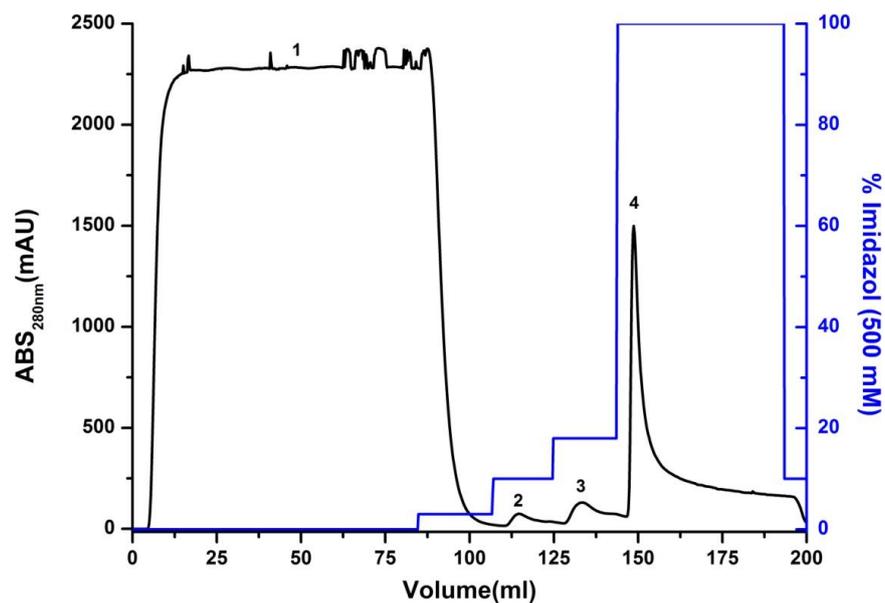


Figura 25. Cromatograma de afinidade por níquel ilustrando a purificação da VapB11+GST com 6xHis-Tag. (1) *flow-through*; (2) Primeira lavagem com 50 mM de imidazol; (3) Segunda lavagem com 80mM de imidazol; (4) Eluição da VapB11+GST em 500 mM de imidazol.

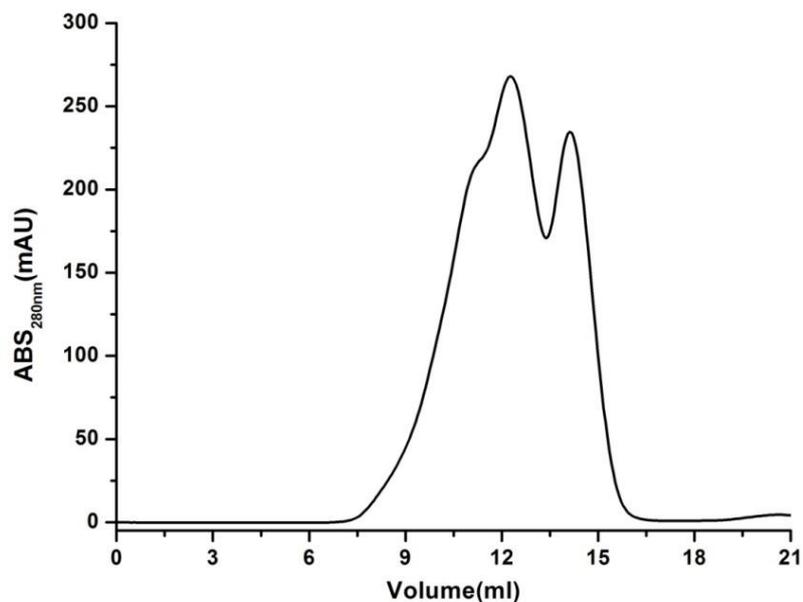


Figura 26. Cromatograma de exclusão molecular da amostra de VapB11+GST, que foi previamente purificada por cromatografia de afinidade como apresentado na **Figura 25**. 1 mL de proteína foi injetado numa coluna Superdex 75 10/300 (GE).

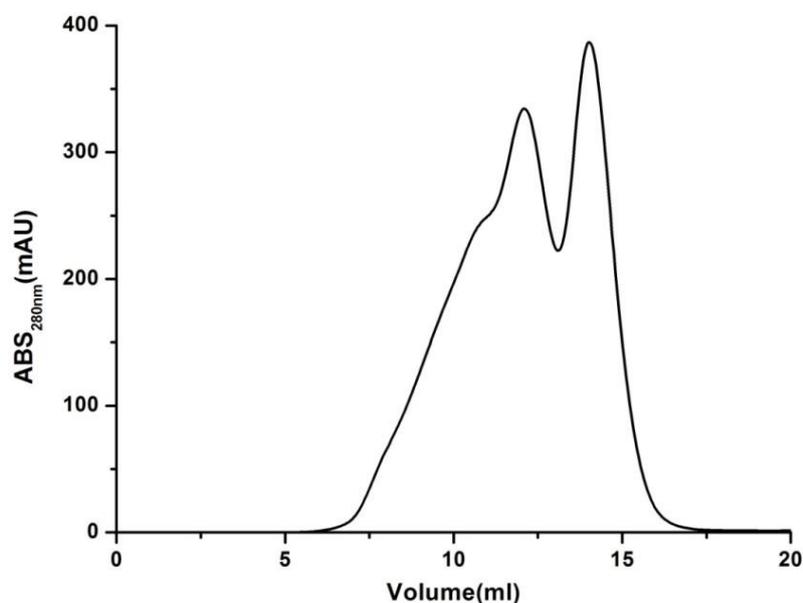


Figura 27. Cromatograma de exclusão molecular da amostra de VapB21+GST, que foi previamente purificada por cromatografia de afinidade. 1 mL de proteína foi injetado em uma coluna Superdex 75 10/300 (GE).

3.3. Western Blot

Foram realizados experimentos de *Western Blot* para confirmar a identidade das proteínas utilizando como sonda um anticorpo monoclonal de camundongo (anti-poli histidina). A **Figura 28** apresenta bandas positivas para as amostras VapB11 e VapB21. As bandas correspondem a diferentes oligômeros com valores teóricos de 18,6 kDa para um dímero de vapB17 e 10,5 kDa a 21 kDa para monômeros e dímeros de VapB21. Assim, pode-se inferir que as proteínas produzidas são realmente as proteínas heterólogas de interesse. As duas bandas para VapB21 possivelmente indicam diferentes populações oligoméricas que se mantiveram estáveis mesmo com o tratamento desnaturante utilizado para as amostras na eletroforese.

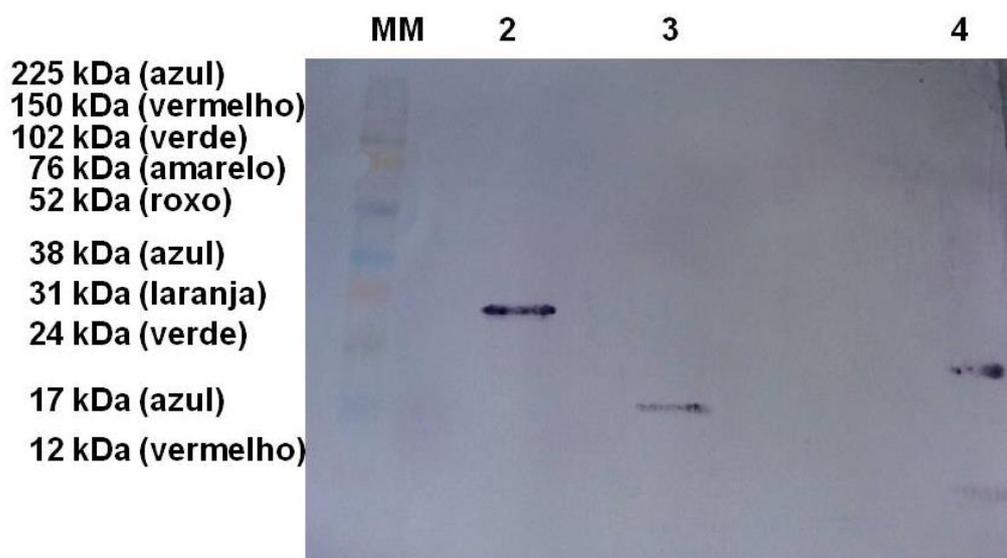


Figura 28. *Western Blot* da VapB11 e VapB21 Membrana de nitrocelulose. O marcador de massa molecular (MM) (*Hight-Range* RN756E) têm suas massas correspondentes ao lado do gel. Para controle positivo foi utilizado à proteína PPAR- γ , (MM \approx 33 kDa). Sequência: 1- MM; 2- controle positivo; 3- VapB11 (9,3 kDa); 4- VapB21 (10,5 kDa).

3.4. Cristalização

3.4.1. VapB

Foram realizados vários ensaios de cristalização com diferentes concentrações de proteína utilizando três kits de *screening*. Foi observada a presença de possíveis formas cristalinas para VapB17 e VapB38 nas etapas do *screening*, no entanto, em ensaios de refinamento posteriores, não se obteve sucesso na replicação dessas condições. As formas cristalinas da VapB17 e VapB38 eram menores que o mínimo necessário (por volta de 100 microns) para se obter qualquer informação utilizando das técnicas e equipamentos disponíveis. Não foi observado nenhum cristal ou forma cristalina em nenhuma das condições dos kits de *screening* para VapB11, VapB21, VapB11+GST e VapB21+GST, apenas precipitados, gotas transparentes e agregados amorfos.

3.4.2. VapC20

Os cristais da etapa de refinamento para VapC20 (condição: fosfato de potássio citrato 0,1 M, pH 4,2, cloreto de sódio 0,2 M, PEG 8000 20 % do kit de *screening*) (**Figura 30 a**

Figura 32) eram semelhantes aos inicialmente observados nas condições de *screening* (**Figura 29**), sugerindo sucesso na replicação. Os cristais apareceram com o tempo mínimo de duas semanas, e também após meses de incubação. Estes cristais apresentam forma bem definida de losangos. Um mês após o surgimento do cristal, foi visualizada uma mudança em sua forma, como a de crescimento em *cluster* (dados não apresentados). De dois a três meses os cristais começaram a se desfazer e perder a forma característica. Todos os poços com cristais apresentam precipitado leve. Quando a gota apresentava muito precipitado amorfo e de cor escura, não era observada a posterior formação de nenhum cristal.

Os ensaios manuais de cristalização (dados não apresentados) demonstraram que a melhor faixa de pH para o aparecimento de cristais foi de 4,0 a 4,2, sem diferença aparente entre elas. As concentrações de PEG 8000 que resultaram no aparecimento de cristais foram 16 %, 18 % e 20 %, maiores concentrações geravam precipitados amorfos. A concentração da proteína foi o fator de maior influência no tamanho dos cristais. 10 mg/ mL e 13 mg/ mL foram as concentrações que resultaram em cristais pequenos e médios, entre 80 e 130 μm , na sua maior dimensão, enquanto concentração de 13 mg/ mL geravam cristais maiores (**Figura 32**). A concentração de 8 mg/ mL de proteína propicia a formação de dois padrões na gota, o primeiro apresenta vários micro cristais (**Figura 31**), e o segundo apresenta precipitados moderados com aglomerado de micro cristais próximos a superfície (**Figura 30**). Menores concentrações de proteínas resultaram em gotas com precipitados leves, além de pequenas formas cristalinas pontuais espalhadas próximas a superfície da gota e gotas transparentes sem nenhum cristal. A proteína VapC20 era muito sensível a diferenças de temperatura e facilmente precipitava quando concentrada com o *amicon* (Merck), o que dificultou muito para alcançar a concentração certa para os ensaios.

Foi coletado o padrão de difração (dados não apresentados) dos cristais da gota da **Figura 29**, devido ao tamanho dos cristais a resolução foi por volta de 8,0 Å, o que impossibilitou a resolução da estrutura. Porém, foi o suficiente para descartar a possibilidade de ser um cristal de sal, o que sugere fortemente que de fato é um cristal da proteína VapC20. Os cristais da **Figura 33** apareceram com uma semana e desapareceram logo após uma semana, porém não se obteve sucesso para repetir essa condição. Comparando a condições, **Figura 29** com a da **Figura 33**, estas diferem apenas no agente precipitante, PEG 8.000 para PEG 300, respectivamente.



Figura 29. Cristais de VapC20 em uma gota de 200 nL obtidos a partir do ensaio com kit Crystal Screen HR2-112 (Hampton Research). A condição de cristalização foi fosfato de potássio citrato 0,1 M, pH 4,2, cloreto de sódio 0,2 M, PEG 8000 20 % m/v.

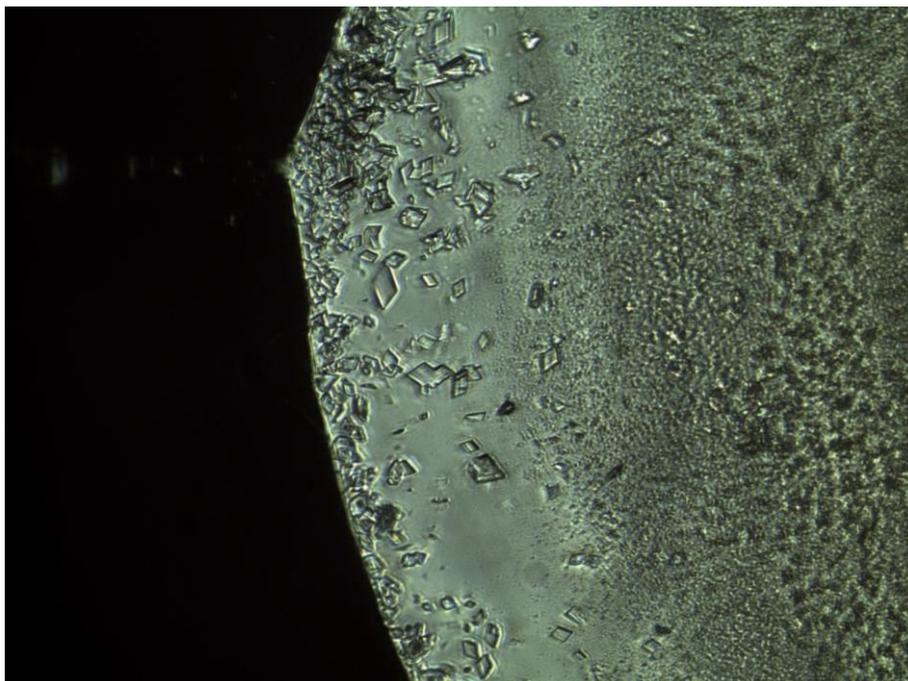


Figura 30. Micro cristais de VapC20 em uma gota de 2 μL , na concentração de 8 mg/ mL de proteína. A solução contém fosfato de potássio citrato 0,1 M, pH 4,0, cloreto de sódio 0,2 M e de PEG 8000 20 %. A imagem foi ampliada para possibilitar uma melhor visualização, os tamanhos dos cristais variam até 4 microns.

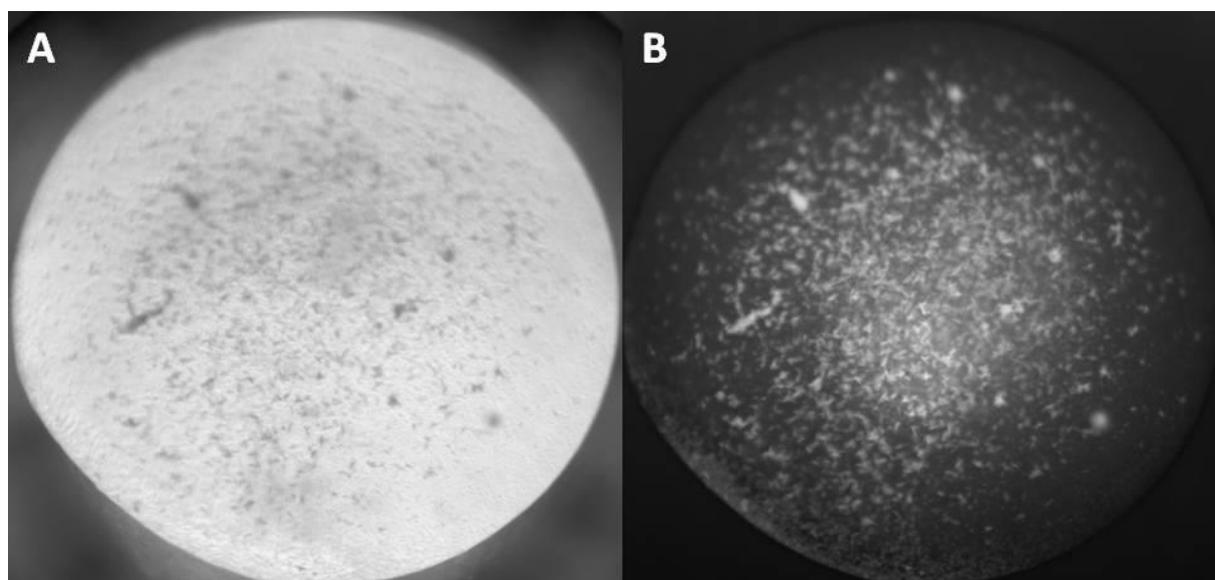


Figura 31. Micro cristais de VapC20 em uma gota de 2 μL , na concentração de 8 mg/ mL de proteína. A solução contém fosfato de potássio citrato 0,1 M, pH 4,0, cloreto de sódio 0,2 M e de PEG 8000 20 %. (A) imagem da gota; (B) imagem utilizando UV.

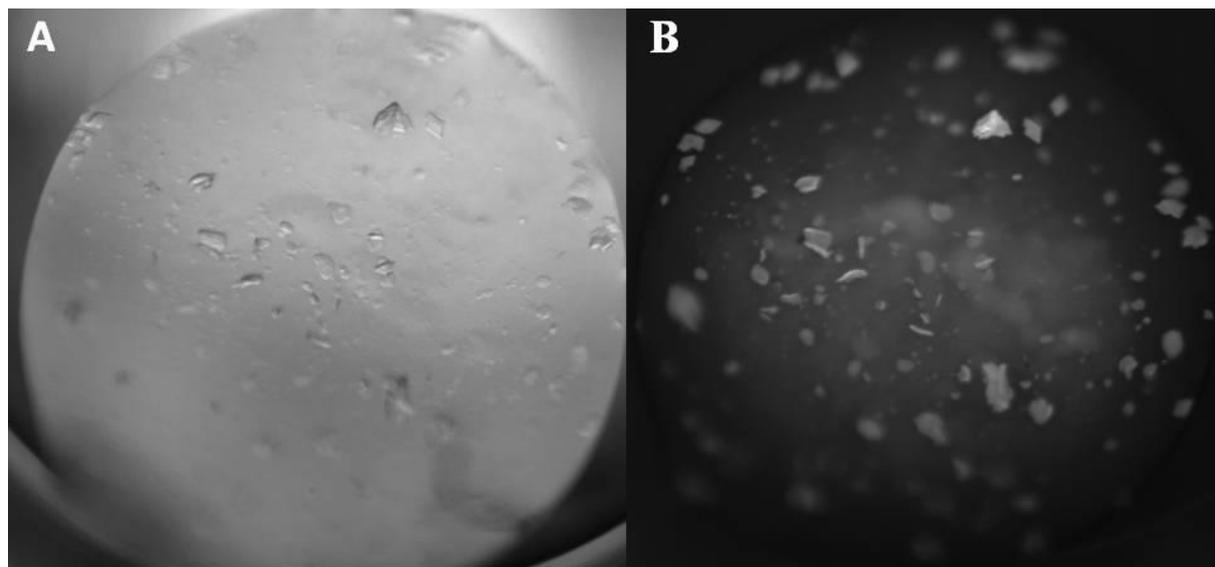


Figura 32. Cristais de VapC20 duas semanas depois da montagem da placa de cristalização. A concentração da proteína foi de 13 mg/ mL, a solução do poço contém fosfato de potássio citrato 0,1 M pH 4,0, cloreto de sódio 0,2 M e de PEG 8000 20 %. (A) imagem da gota; (B) imagem utilizando UV.

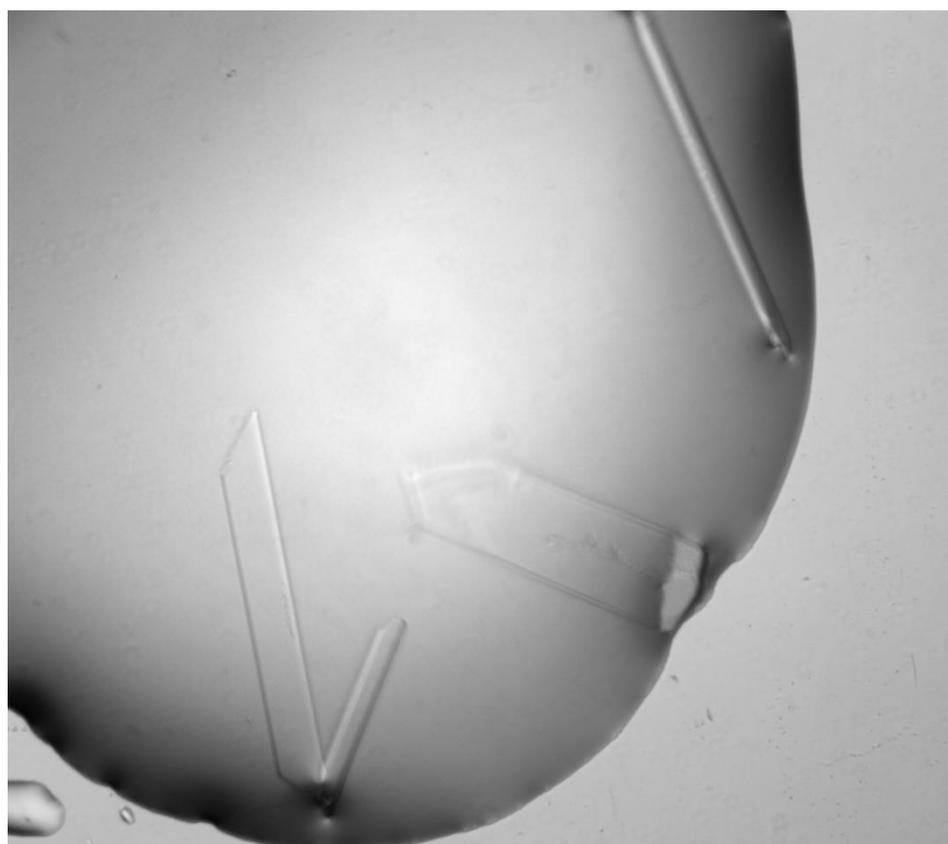


Figura 33. Cristais de VapC20 em uma gota de 200 nL. Os cristais foram obtidos a partir do ensaio com kit JBScreen JCSG (Jena Bioscience). Condição 40 % PEG 300, fosfato de potássio citrato 0,1 M pH 4,2.

3.4.3 VapC19

As formas cristalinas obtidas para a VapC19 apareceram três dias após a realização da gota (**Figura 34**). Apenas a condição C foi replicada com sucesso nos testes de refinamento, porém os tamanhos dos cristais variaram de 5 a 13 μm , não foram grandes o suficiente para difratar. O cristal da condição A (118-79 por 105-97 μm) foi muito danificado durante a coleta de dados, inviabilizando-o. Os cristais da condição C foram difratados e apresentaram um padrão de difração de sal (dados não apresentados). A condição D apresentava formas cristalinas em forma de agulhas, no entanto, não apresentavam dimensões necessárias para coleta de dados.

Não foi possível repetir esse ensaio de cristalização da mesma forma, pois não se conseguiu obter proteína na mesma concentração, quantidade e pureza que o primeiro ensaio. Uma das suposições é que o clone que expressava *vapC19* para este ensaio foi perdido, e os outros clones testados posteriormente produziram menos da metade da quantidade de proteína que o primeiro, o que dificultou muito a etapa de purificação e posterior cristalização.

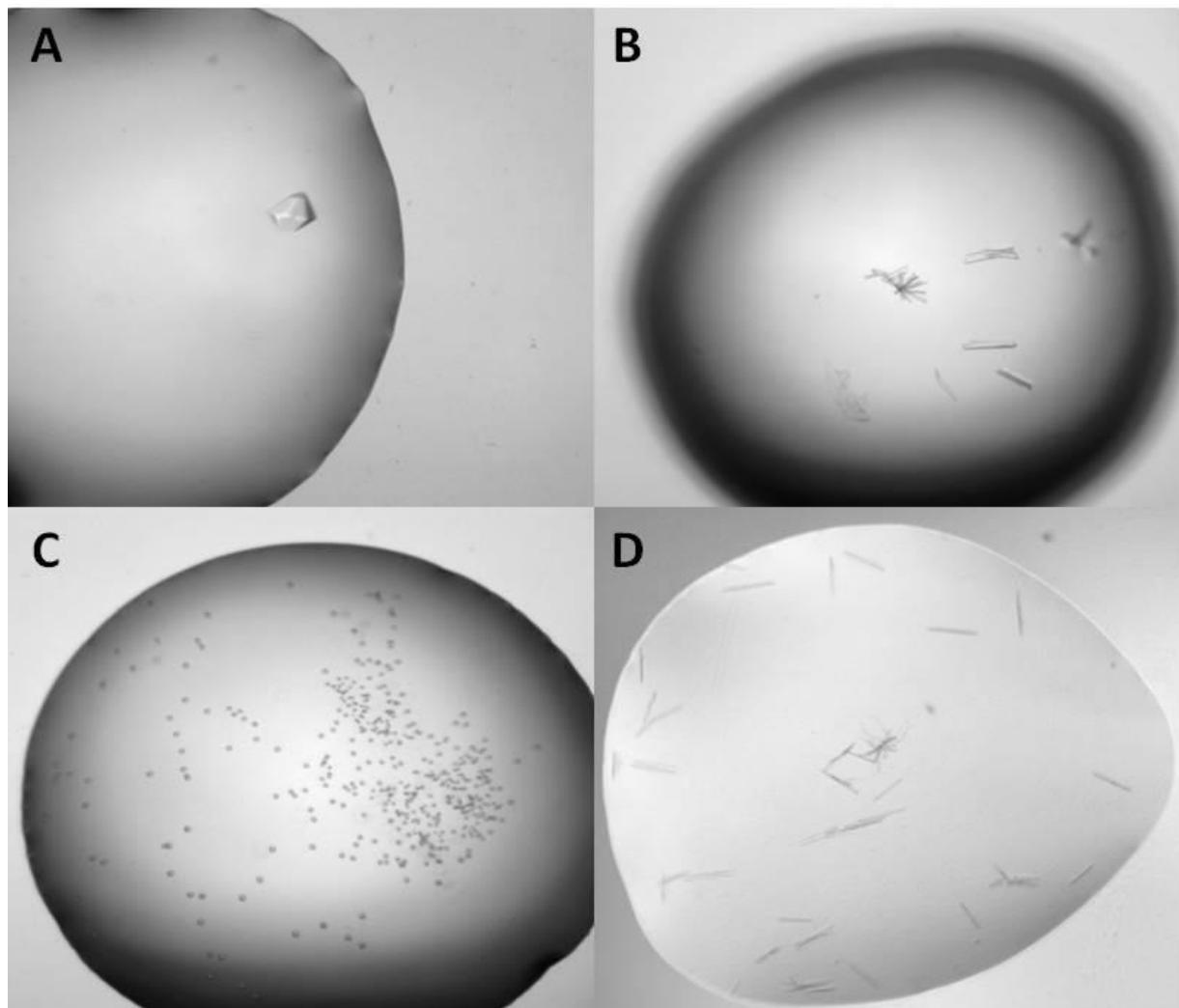


Figura 34. Cristais de VapC19 em uma gota com volume de 200 nL, pela técnica de gota pendurada. Os cristais foram obtidos a partir do ensaio com kit Screening Crystal Screens JBScreen JCSG (Jena Bioscience). Condições: **(A)** 30 % PEG 8000, acetato de sódio 100 mM pH 4,5, sulfato de lítio 200 mM; **(B)** 10 % PEG 6000, bicina 100 mM, pH 9,0. **(C)** Acetato de sódio 100 mM, pH 4,5, di-amonium *hydrogen phosphate* 1 M; **(D)** 45 % 2-metil-2-4-pentadiol, BIS-TRIS 100 mM pH 5,5, cloreto de cálcio 100 mM.

3.5. Análise do perfil de oligômeros por UCA

3.5.1. VapC19

O valor médio de rmsd nas análises das curvas da varredura de absorvância em relação à distância radial de acordo com a solução da equação de *Lamm* se comportou entre 0,0087 e 0,01. Os valores de $S_{20,w}$ e MM para cada concentração de proteína testada foram determinados individualmente pelo software *SEDFIT* e *SEDPHAT*. A **Figura 35** corresponde

ao ajuste da varredura de absorvância em relação à distância radial de acordo com a solução da equação de *Lamm* ao perfil de sedimentação da amostra. As curvas de distribuição de $c(S)$ para VapC19 em diferentes concentrações mostraram apenas um pico (**Figura 36**), com coeficientes de sedimentação de $2,8 \pm 0,1$ (**Tabela 2**). A área do pico foi utilizada para estimar as contribuições percentuais de cada espécie oligomérica em solução. O valor mais próximo obtido em comparação com a MM teórica foi para a célula 2 com apenas um pico representando 97 % do total da amostra. Os valores correspondentes de MM e raio de *Stokes* calculados foram 29,5 kDa e 2,9 nm, respectivamente, o que se assemelha mais próximo com a MM teórica de um dímero de VapC19 (29,5 kDa). A mediana da MM encontrada para todas as células foi $28,2 \pm 1.3$ kDa.

Tabela 2. Parâmetros de UCA-VS obtidos a partir do ajuste dos dados de sedimentação para amostras da proteína VapC19.

Parâmetros	Cell 1	Cell 2	Cell 3	Ajuste Global
Concentração proteica (mg/ mL)	1,15	0,71	0,35	
Dímero teórico (kDa)	29,5			
MM (kDa)	26,9	29,5	27,1	27,6
$S_{20,w}$ (S)	2,8*	2,8*	2,9*	2,9
Raio de <i>Stokes</i> (nm)	2,3	2,9	2,3	

Parâmetros de ultracentrifugação analítica obtidos a partir do ajuste dos dados de velocidade de sedimentação (SV-UCA) utilizando o software *SEDFIT* e *SEDPHAT*. O ajuste global para as três células foi de 27,6 kDa. A MM teórica de um dímero de VapC19 é 29,6 kDa, foi obtida pela plataforma *ExPASy* (<http://web.expasy.org/>).* Erro de *Monte Carlo* para $c(s)$ variou entre 0,0002 a 0,0008 S.

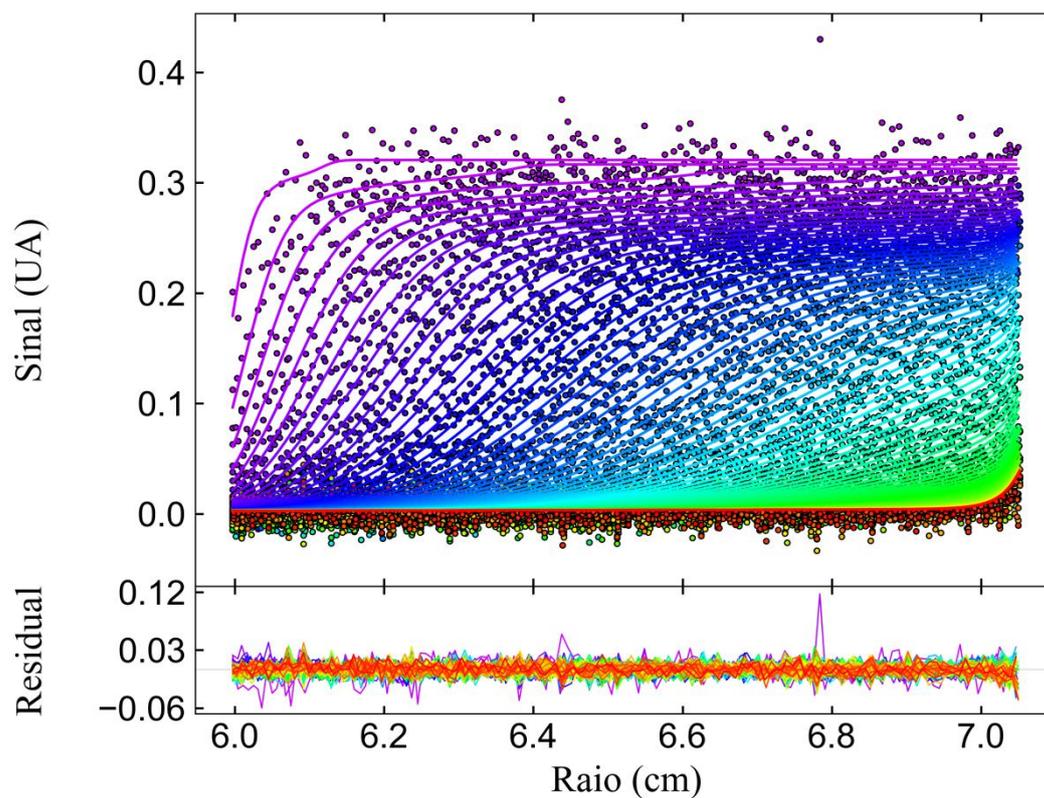


Figura 35. Perfil de sedimentação da proteína VapC19. Ajuste realizado pelo *SEDFIT* para VapC19 com dados de UCA-VS. O gráfico acima apresenta perfis de sedimentação, absorvência a 280 nm em relação à distância radial da célula. A amostra estava em uma solução tampão Tris-HCl 75 mM contendo NaCl 300 mM, pH 7,4. Na parte inferior, os valores de erro residual dos dados ajustados são apresentados.

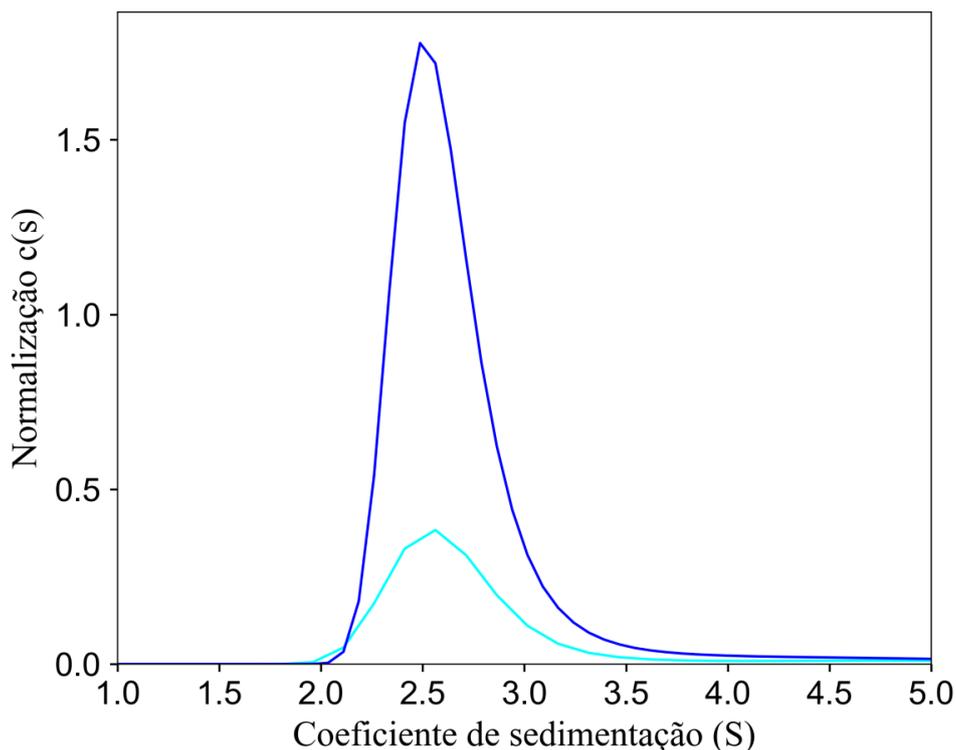


Figura 36. Distribuição contínua do coeficiente de sedimentação da proteína VapC19. Curva $c(S)$, obtida com um procedimento de regularização a partir dos dados apresentados na **Figura 35**. Em azul está uma amostra de VapC19 mais concentrada (1,4 mg/ mL) e em ciano uma menos concentrada (0,4 mg/ mL). O valor de fricção (f / f_0) de 1,1 foi obtido usando o programa *SEDFIT* em um nível de confiança de 0,95. O volume específico parcial (v) dos monômeros de VapC19 de 0,745002/g, a densidade da solução tampão ($\rho = 1,01270$ g / mL) e a viscosidade ($\eta = 0,01053$ poise) foram determinados pelo software *SEDENTERP*. A análise de sedimentação para proteína VapC19 mostra apenas um pico em 2,9 S do coeficiente de sedimentação corrigido para condições padrão ($S_{20,w}$). O peso molecular aparente estimado varia de 26,9 a 29,5 kDa, de acordo com o valor teórico (29,5 kDa).

3.5.2. VapB11

Para a VapB11, as amostras analisadas foram referentes aos diferentes picos observados em seu cromatograma de exclusão molecular (**Figura 16**). Os valores da razão friccional, raio de *Stokes* e de MM experimental para cada amostra foram descritos na **Tabela 3**. A curva $c(S)$ para VapB11 mostraram um perfil com diferentes populações oligoméricas, dois picos distintos (**Figura 38**), com coeficientes de sedimentação $S_{20,w}$ de 1,9 S (pico 1) e 2,5 S (pico 2). A área do pico foi utilizada para estimar as contribuições percentuais de cada espécie em solução. O pico 1 do cromatograma de exclusão molecular, apresenta uma MM experimental de dímero de 18,1 kDa, e o segundo pico do cromatograma apresenta monômero de 9,1 kDa. A **Figura 37** apresenta o ajuste do perfil de distribuição do

coeficiente de sedimentação contínua (**Figura 38**). É possível observar pelo perfil de sedimentação que existem duas populações diferentes, e que o pico 1 do cromatograma sedimentou mais rápido, quando comparado ao pico 2 (**Figura 38**).

Tabela 3. Parâmetros de UCA-VS obtidos a partir do ajuste dos dados de sedimentação para amostras de VapB11.

Amostras de VapB11	Razão friccional	rmsd	MM experimental	Raio de Stokes	Oligômero
Pico 1	1,27	0,0007	18,1 kDa	2,21 nm	Homodímero
Pico 2	0,63	0,0007	9,1 kDa	0,87 nm	Monômero

Parâmetros de ultracentrifugação analítica obtidos a partir do ajuste dos dados de velocidade de sedimentação utilizando o software *SEDFIT*. A MM teórica de monômero de VapB11 (9,3 kDa) foi obtida pela plataforma *ExpASY*. A forma de oligômero proposta foi baseada na MM teórica (<http://web.expasy.org/>).*

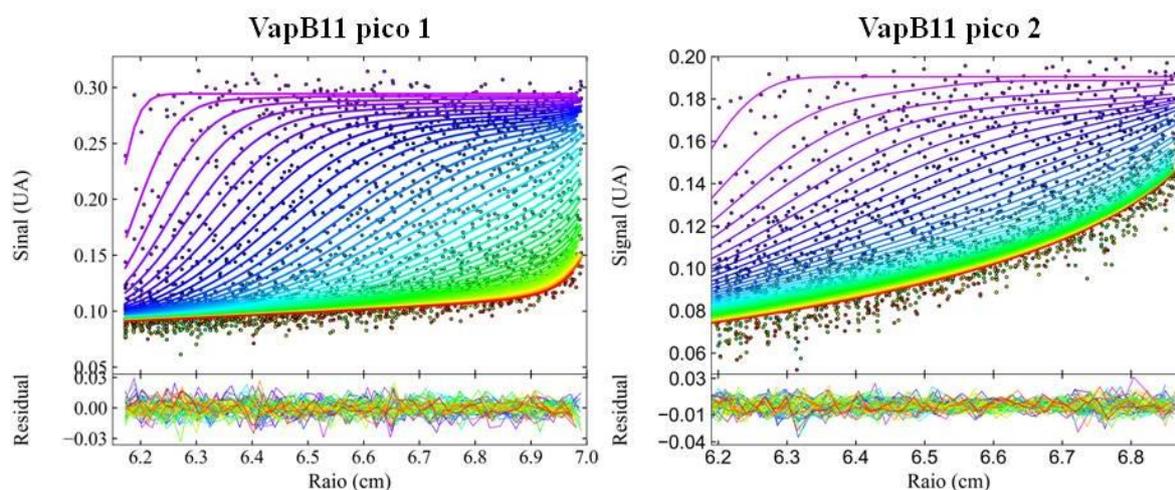


Figura 37. Perfil de sedimentação da proteína VapB11. Ajuste realizado pelo *SEDFIT* para a proteína VapB11 com dados de UCA-VS. O gráfico acima apresenta perfis de sedimentação, absorvência a 280 nm em relação à distância radial da célula. A amostra estava em uma solução tampão Tris-HCl 35 mM contendo NaCl 150 mM, pH 7,4. Na parte inferior, os valores de erro residual dos dados ajustados são mostrados.

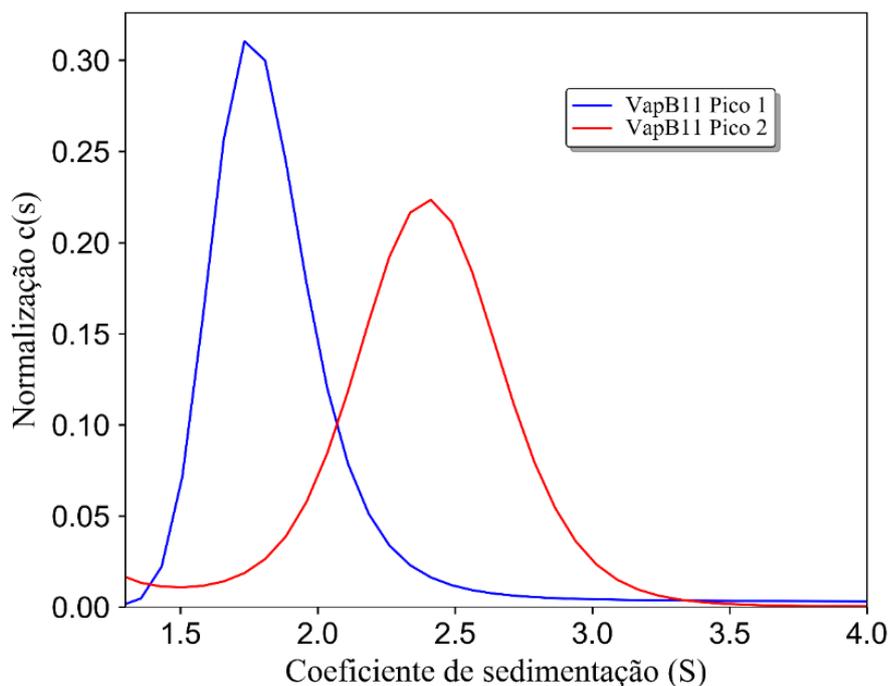


Figura 38. Distribuição contínua do coeficiente de sedimentação continuada proteína VapB11. Curva $c(S)$, obtida com um procedimento de regularização a partir dos dados apresentados na **Figura 37**. O valor de fricção (f/f_0) foi de 1,2 obtido usando o programa *SEDFIT* em um nível de confiança de 0,95. O volume específico parcial (v) dos monômeros de VapB11 de 0,72997/g, a densidade da solução tampão ($\rho = 1,00500$ g / mL) e a viscosidade ($\eta = 0,01021$ poise) foram determinados pelo software *SEDENTERP*. A análise de sedimentação para VapB11 mostra dois picos em 1,85-1,96 S e 2,41-2,51 S do coeficiente de sedimentação corrigido para condições padrão ($S_{20,w}$). O peso molecular aparente estimado variou próximo de 18,19 kDa (pico 1) e 9,2 kDa (pico 2).

3.5.3. VapB21

Para a proteína VapB21, as amostras analisadas foram referentes aos diferentes picos observados em seu cromatograma de exclusão molecular (**Figura 18**). A área do pico foi utilizada para estimar as contribuições percentuais de cada espécie em solução. Os valores de rmsd, razão friccional, raio de *Stokes*, e de MM experimental para cada amostra foram descritos na **Tabela 4**. A **Figura 39** apresenta o ajuste do perfil de distribuição contínua do coeficiente de sedimentação (**Figura 40**). A curva $c(S)$ para VapB21 mostraram um perfil com diferentes populações oligoméricas, no qual o mesmo padrão de picos é observado nas duas amostras (**Figura 40**), inferindo-se que exista um equilíbrio oligomérico entre as populações com coeficientes de sedimentação $S_{20,w}$ de 1,95 S (pico 1) e 2,50 S (pico 2). A diferença entre os picos está na contribuição total de cada população oligomérica, percebida

no perfil de sedimentação (**Figura 39**) e no gráfico de coeficiente de sedimentação c (s) (**Figura 40**).

O pico 1 apresenta uma MM experimental de hexâmero ($66,1 \pm 1$ kDa), e o pico 2 de dímero ($18,9 \pm 2,0$ kDa), caracterizando um perfil com duas populações oligoméricas diferentes.

Tabela 4. Parâmetros de UCA-VS obtidos a partir do ajuste dos dados de sedimentação para amostras da proteína VapB11.

Amostras de VapB11	rmsd		% total	MM experimental	Raio de Stokes	Oligômero
Pico 1	0,007	A	13,7 %	20,9 kDa	2,14 nm	Dímero
		B	37 %	65,1 kDa	3,06 nm	Hexâmero
Pico 2	0,006	A	62 %	16,8 kDa	1,98 nm	Dímero
		B	5,01 %	67,1 kDa	3,15 nm	Hexâmero

Parâmetros de ultracentrifugação analítica obtidos a partir do ajuste dos dados de velocidade de sedimentação utilizando o software *SEDFIT*. A relação de fricção para ambas as amostras foi de 1,2. O MM teórica de um monômero de VapB21 é 9,3 kDa, e foi obtida pela plataforma *ExpASy* (<http://web.expasy.org/>).* A linha A (azul) corresponde ao primeiro pico, a linha B (branca) corresponde ao segundo pico, ambos observado no gráfico de coeficiente de sedimentação **Figura 40**.

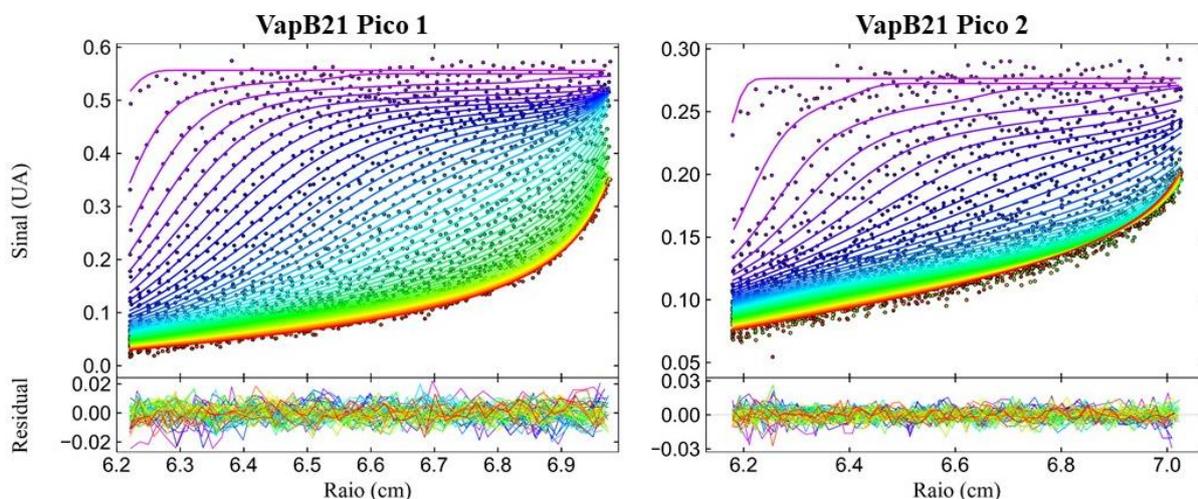


Figura 39. Perfil de sedimentação da proteína VapB21. Ajuste realizado pelo *SEDFIT* para VapB21 com dados de UCA-VS. O gráfico acima apresenta perfis de sedimentação, absorvência a 280 nm em relação à distância radial da célula para a proteína. A amostra estava em uma solução tampão Tris-HCl 75 mM contendo NaCl 300 mM, pH 7,4. Na parte inferior, os valores de erro residual dos dados ajustados são mostrados.

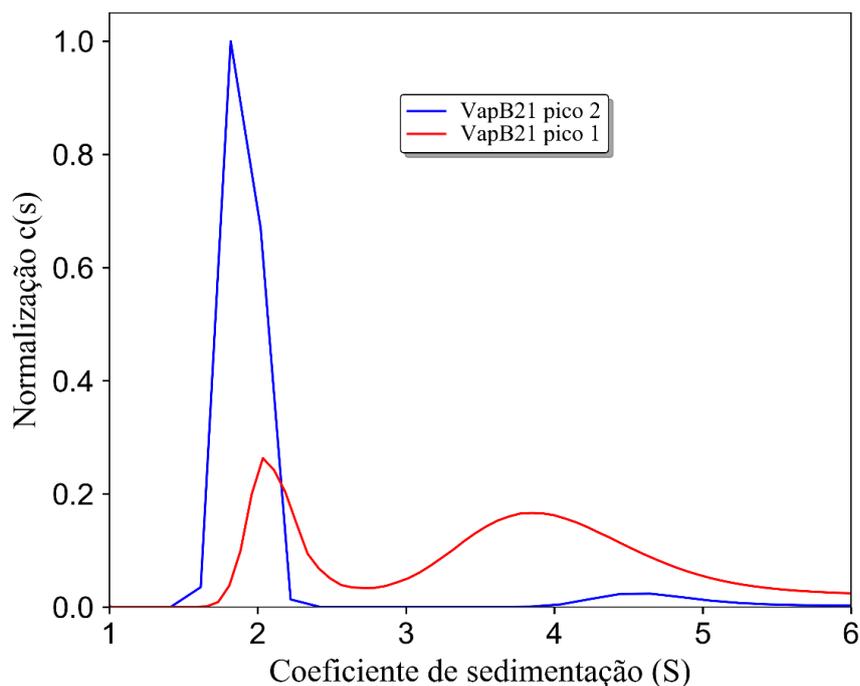


Figura 40. Distribuição contínua do coeficiente de sedimentação da proteína VapB21. Curva $c(S)$, obtida com um procedimento de regularização a partir dos dados apresentados na **Figura 39**. A linha em vermelho e azul correspondem ao primeiro e ao segundo pico das amostras de cromatografia da VapB21, respectivamente. O valor de fricção (f/f_0) foi de 1,26 (A) e 1,5 (B) obtido usando o programa *SEDFIT* em um nível de confiança de 0,95. O volume específico parcial (v) dos monômeros de VapB21 de 0,72340 g/ mL, a densidade da solução tampão ($\rho = 1,01270$ g / mL) e a viscosidade ($\eta = 0,01053$ poise) foram determinados pelo software *SEDENTERP*. A análise de sedimentação para VapB21 mostram dois picos 2,2 S (pico 1), 5.8 (pico 2) do coeficiente de sedimentação corrigido para condições padrão ($S_{20,w}$). O peso molecular aparente estimado para os diferentes picos varia próximo 17,716-20,988 kDa (pico entre 1,5 a 2,3 S), e 6,515 a 6,743 kDa (pico entre 3 a 5 S).

3.5.4. VapB38

Para a proteína VapB38, as amostras analisadas foram referentes a cromatografia de exclusão molecular. Como não foi possível saber se existiam diferentes picos no cromatograma de exclusão molecular, toda amostra foi coletada, reunida e utilizada neste ensaio. A área do pico foi utilizada para estimar as contribuições percentuais de cada espécie em solução. Os valores de rmsd, razão friccional, raio de *Stokes*, e de MM experimental para cada amostra foram descritos na **Tabela 5**. A **Figura 41** apresenta o ajuste do perfil de distribuição contínua do coeficiente de sedimentação (**Figura 42**). A curva $c(S)$ para VapB38 mostraram um perfil com diferentes populações oligoméricas, no qual o mesmo padrão de picos é observado nas duas amostras. Infere-se que exista um equilíbrio

oligomérico entre as populações com coeficientes de sedimentação $S_{20,w}$ de $S 1,45 \pm 0,02$ (pico 1) e $2,21 \pm 0,05 S$ (pico 2). A diferença entre as células está na concentração, o que interfere no total percentual de cada população oligomérica, percebida no gráfico de coeficiente de sedimentação $c(S)$ (**Figura 42**). O perfil de sedimentação (**Figura 41**) sugere que não ocorreu sedimentação completa da amostra. O pico 1 apresenta uma MM experimental de dímero (~18 kDa), e o pico 2 de tetrâmero (~ 36 kDa), caracterizando um perfil com duas populações oligoméricas diferentes. A mediana dos valores encontrados para a MM foi de $18,9 \pm 0,4$ kDa e $35,7 \pm 1,1$ kDa.

Tabela 5. Parâmetros de UCA-VS obtidos a partir do ajuste dos dados de sedimentação para amostras da proteína VapB38.

	rmsd		% <i>total</i>	MM experimental	Raio de <i>Stokes</i>	Oligômero
Cel 1	0,015	Pico 1	19,4 %	18,5 kDa	3,08 nm	Dímero
		Pico 2	7,3 %	36,8 kDa	3,88 nm	Tetrâmero
Cel 2	0,025	Pico 1	50 %	19,3 kDa	3,13 nm	Dímero
		Pico 2	9,3 %	34,6kDa	3,83 nm	Tetrâmero

Parâmetros de ultracentrifugação analítica obtidos a partir do ajuste dos dados de velocidade de sedimentação utilizando o software *SEDFIT*. A razão friccional para ambas as amostras foi de 1,76. $\text{Ablato } 11.7$ e $\text{problato } 14.44$. O MM teórica de um monômero de VapB38 é 9,0 kDa, e foi obtida pela plataforma *ExpASy* (<http://web.expasy.org/>).* A linha A em azul, corresponde ao primeiro pico no gráfico de coeficiente de sedimentação (**Figura 42**) e a linha B em branco, corresponde ao segundo pico observado.

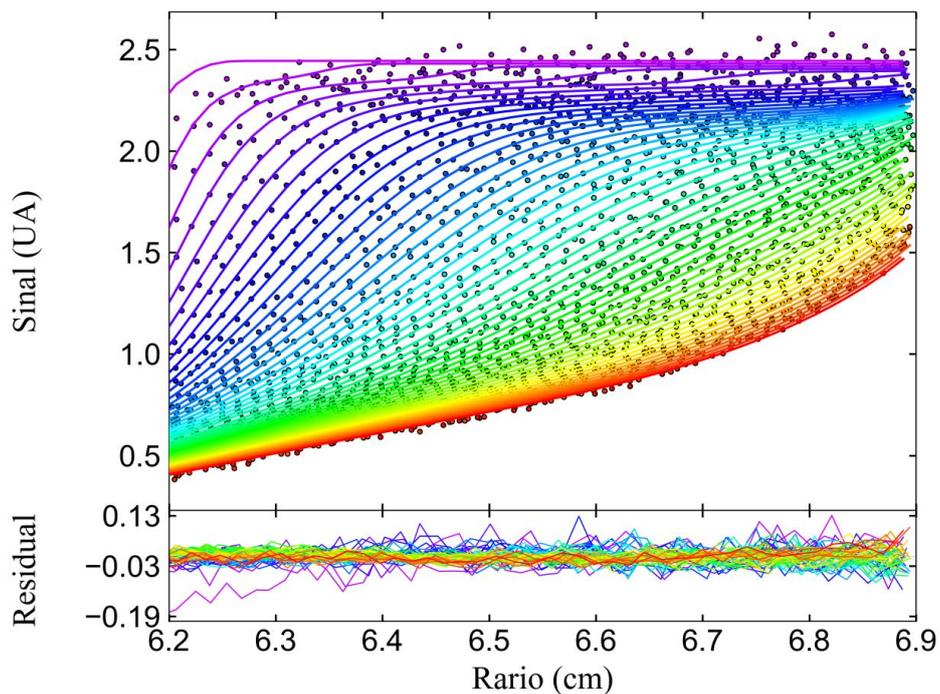


Figura 41. Perfil de sedimentação da proteína VapB38. Ajuste realizado pelo *SEDFIT* para VapB38 com dados de UCA-VS. O gráfico acima apresenta perfis de sedimentação, absorvência a 220 nm em relação à distância radial da célula para a proteína. A amostra estava em uma solução tampão Tris-HCl 75 mM contendo NaCl 300 mM, pH 7,4. Na parte inferior, os valores de erro residual dos dados ajustados são mostrados.

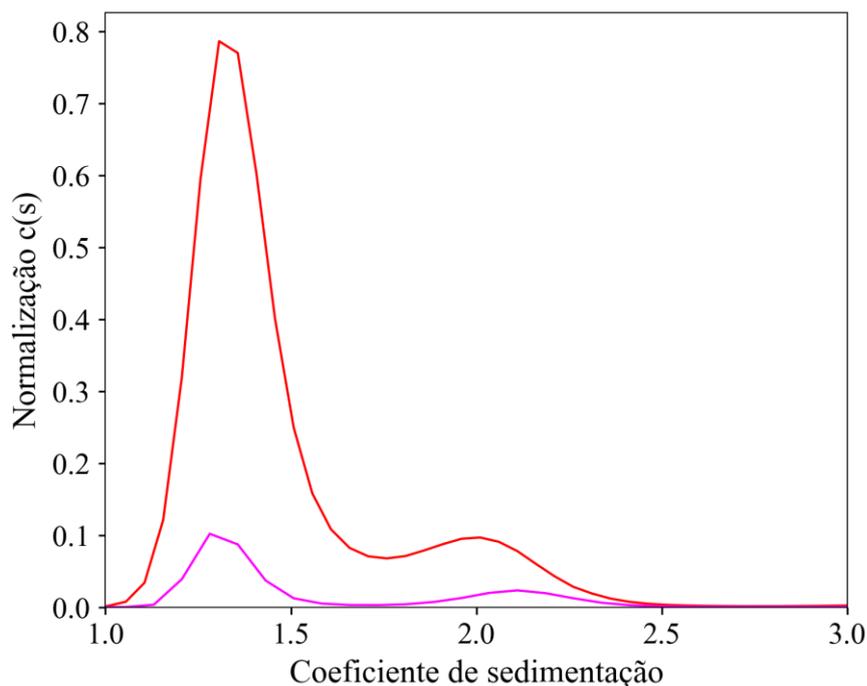


Figura 42. Distribuição contínua do coeficiente de sedimentação da proteína VapB38. Curva $c(S)$, obtida com um procedimento de regularização a partir dos dados apresentados na. Em vermelho e magenta estão representadas as curvas $c(s)$ uma amostra de VapB38. O valor de fricção (f/f_0) de 1,76 foi obtido usando o programa *SEDFIT* em um nível de confiança de 0,95. O volume específico parcial (v) dos monômeros de VapC19 de 0,745002/g, a densidade da solução tampão ($\rho = 1,01270$ g / mL) e a viscosidade ($\eta = 0,01053$ poise) foram determinados pelo software *SEDENTERP*. A análise de sedimentação para proteína VapB38 mostra apenas um pico em 2,9 S do coeficiente de sedimentação corrigido para condições padrão ($S_{20,w}$). A massa molecular aparente estimada foi de $18,9 \pm 0,4$ kDa e $35,7 \pm 1,1$ kDa, de acordo com o valor teórico (9 kDa para um monômero).

3.5.5 Análise geral dos resultados obtidos para AUC

Para todas as antitoxinas foram observadas duas populações oligoméricas, sendo um perfil dimérico comum a todas. A toxina VapC19 apresentou apenas uma população dimérica. O maior valor de rmsd foi observado para proteína VapB38, o restante das proteínas apresentaram valores menores de 0,007. Os oligômeros propostos foram baseados na massa dos respectivos monômeros.

Tabela 6. Resumo dos parâmetros de UCA-VS obtidos a partir do ajuste dos dados de sedimentação para amostras das proteínas VapB e VapC testadas

Proteína	Diferentes picos observados na AUC	MM experimental	Raio de Stokes	Oligômero
VapC19	Pico 1	28,2 ± 1,3 kDa	2,6 ± 0,3 nm	Dímero
VapB11	Pico 1	9,1 kDa	0,87 nm	Monômero
VapB11	Pico 2	18,1 kDa	2,21 nm	Dímero
VapB21	Pico 1	18,9 ± 2,0 kDa	2,06 ± 0,08 nm	Dímero
VapB21	Pico 2	66,1 ± 1,0 kDa	3,10 ± 0,045 nm	Hexâmero
VapB38	Pico 1	18,9 ± 0,4 kDa	3,10 ± 0,025 nm	Dímero
VapB38	Pico 2	35,7 ± 1,1 kDa	3,85 ± 0,025 nm	Tetrâmero

Parâmetros de ultracentrifugação analítica obtidos a partir do ajuste dos dados de velocidade de sedimentação utilizando o software *SEDFIT*. A razão friccional variou para cada proteína. As MM teóricas dos monômero foram obtidas pela plataforma *ExpPASy* (<http://web.expasy.org/>).*

3.6. Perfil de estrutura secundária e termoestabilidade das antitoxinas VapB por DC

Os espectros dicróicos apresentados nas **Figuras 43 a 48** mostram que as proteínas VapB avaliadas por DC apresentam perfil de proteína estruturada nos pHs 4,0, 7,0 e 9,5 a 25 °C, com sinal dicróico em regiões que correspondem a estrutura secundária em alfa hélice (banda positiva em 190 nm, banda negativa em 208 e 220 nm) e folhas beta (banda positiva em 195 nm e banda negativa em 218 nm) (Berova, et al., 2000).

A proteína VapB11 em solução apresentou padrão de agregação e formação de precipitados visíveis quando dialisada contra água e em uma solução de NaCl 50 mM. A proteína apenas apresentou uma maior solubilidade em uma solução de NaCl 100 mM, Tris-HCl 4 mM, pH 7,0. Esta quantidade de sal e a presença de agregados gerou uma voltagem acima de 700 V o que dificultou a coleta de dados na região distante da UV visível (190-260 nm), inviabilizando sua análise por dicróismo circular.

3.6.1. VapB17

A termoestabilidade da VapB17 foi estudada sob temperaturas variando entre 25 e 95 °C (**Figura 43**). As curvas de desnaturação obtidas nos diferentes pHs, bem como, os espectros dicróicos coletados em diferentes temperaturas, mostraram uma redução gradual do

sinal dicróico nas regiões de 208, 218 e 222 nm, e um deslocamento da banda dicróica para região de estrutura desordenada (200 nm) (**Figura 43 e Figura 44**). Este deslocamento foi mais pronunciado nos pHs 4,0 e 9,5; entretanto, com uma diferença, pois em pH básico a proteína desenovelou-se e agregou a 95 °C. No entanto, em pH ácido não foi observado agregação proteica, e ao retornar para 25 °C a proteína aparentemente se reenovelou apresentando um espectro dicróico bem próximo ao espectro inicial obtido a 25 °C. Em pH 7,0 VapB17 desenovelou-se somente após 65 °C, mantendo sinal dicróico estável em -7000 deg.cm²/dmol, com redução para -2800 deg.cm²/dmol em 95 °C. Para esse pH também foi observado deslocamento da banda dicróica para região próxima de 200 nm, e capacidade de reenovelamento ao retornar a solução proteica para 25 °C. As curvas de desnaturação obtidas para os pHs 4,0 e 9,5 são do tipo de dois estados, nativo e desenovelado, entretanto, este processo não foi reversível para o pH 9,5, o que impossibilitou o cálculo dos parâmetros termodinâmicos que caracterizam a estabilidade estrutural da proteína em estudo. O ponto de transição entre o estado nativo e desenovelado no pH 4,0, que representa a temperatura de transição entre estes estados T_m , foi de 75,6 °C, conforme mostrado na **Figura 43**. No pH 7,0, a curva de desnaturação obtida não apresentou características de desnaturação completa a 95 °C, o que impossibilitou cálculo de T_m e parâmetros termodinâmicos, resultado este que mostra que VapB17 é mais estável nesse pH que nos pHs 4,0 e 9,5. Os parâmetros termodinâmicos, calculados de acordo com a aproximação de van't Hoff para o pH 4,0, foram $\Delta H_m = 70,82$ kcal/mol, $\Delta S_m = 203,19$ cal/mol.K, e energia livre Gibbs (ΔG^{25}) = 10,27 kcal/mol, que são compatíveis com processo endotérmico e com alta estabilidade estrutural de VapB17.

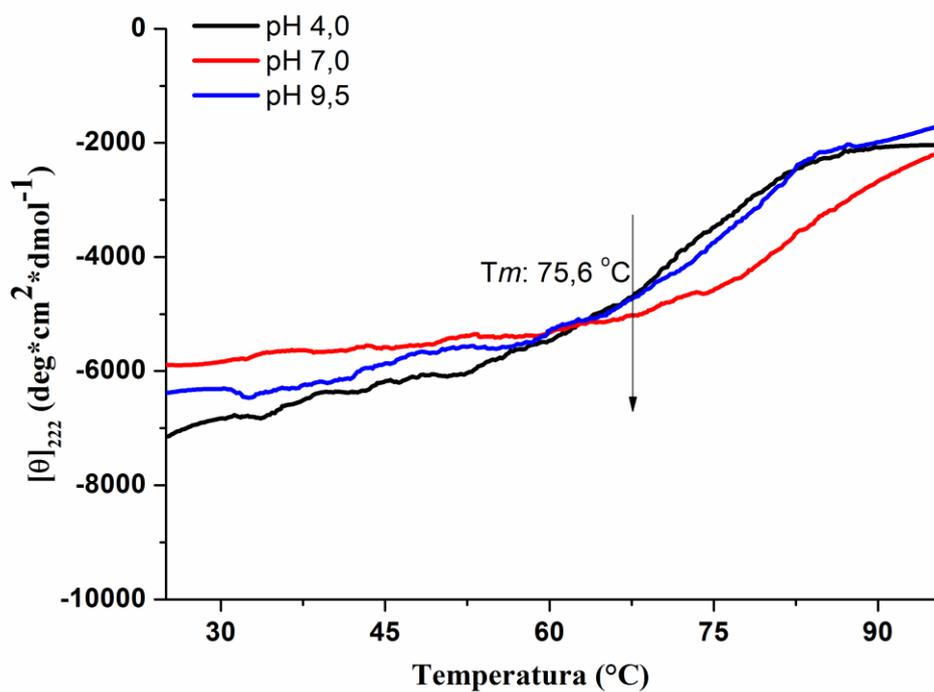


Figura 43. Curvas de termostabilidade da proteína VapB17 nos pHs 4,0, 7,0 e 9,5. A curva de desnaturação foi realizada no comprimento de onda fixado em 222 nm, com variação da temperatura de 25 °C para 95 °C. O valor de T_m calculado para pH 4,0 está representado pela seta preta com T_m : 75,6°C

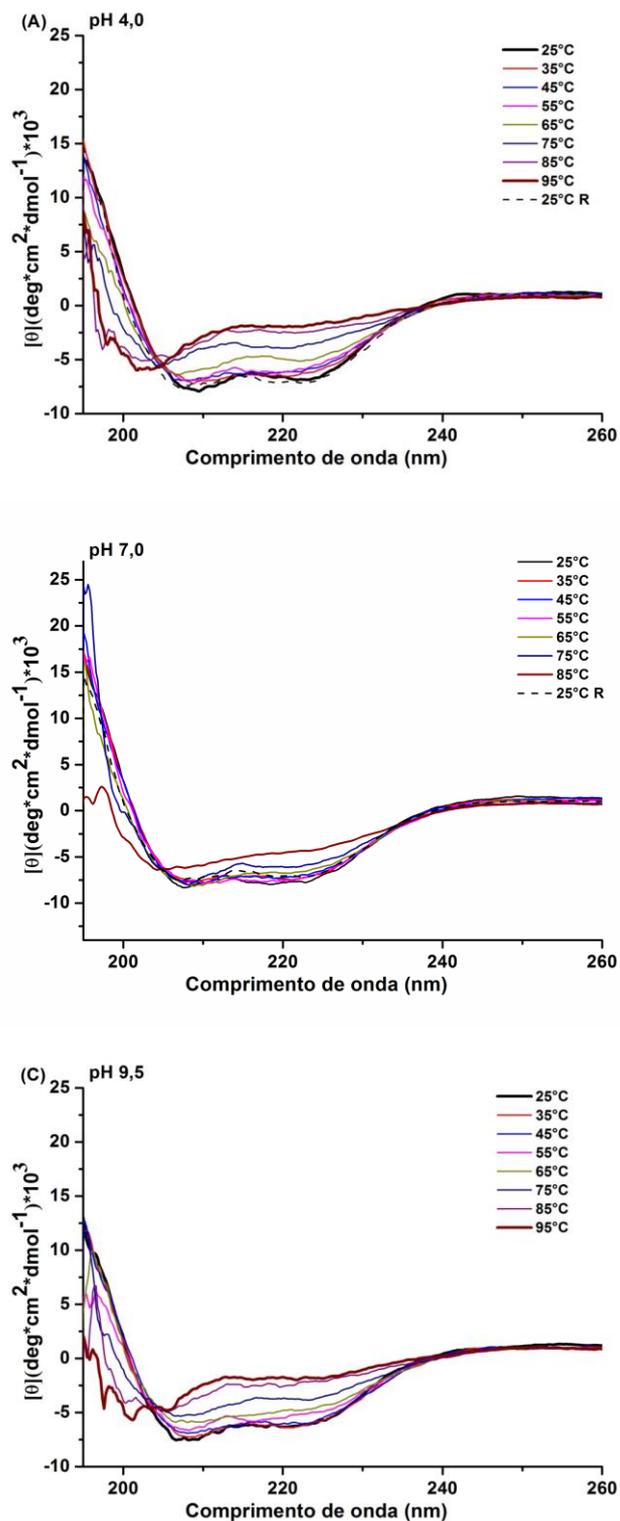


Figura 44. Espectros dicróicos da proteína VapB17 na região distante da luz UV em pH 4,0 (A), pH 7,0 (B) e pH 9,5 (C) em diferentes temperaturas. Os espectros foram obtidos de 200-260, de 25 °C a 95 °C, com intervalos de 10 °C. No pH 7,0 houve falha na coleta do *software*, portanto, não houve coleta do espectro em 95 °C para VapB17 no pH 7,0.

3.6.2. VapB21

A termoestabilidade da VapB21 foi estudada a temperaturas entre 25 e 95 °C (**Figura 45**). As curvas de desnaturação foram obtidas nos diferentes pHs, e os espectros dicróicos coletados nas diferentes temperaturas. Os resultados mostram que houve redução gradual do sinal dicróico nas regiões de 222 nm, e um tendência da perda da banda dicróica para todos os pHs, nos espectros coletados concomitantemente à desnaturação (**Figura 45 e Figura 46**). Nos pHs 4,0 e 9,5 houve redução do sinal de $-3500 \text{ deg.cm}^2/\text{dmol}$ para $-1000 \text{ deg.cm}^2/\text{dmol}$, entretanto, com uma diferença, em pH ácido a proteína desenovelou-se e agregou a 95 °C, já em pH básico não foi observado agregação proteica, e ao retornar para 25 °C, a proteína reenovelou com sinal menor do que do espectro dicróico inicial obtido a 25 °C. No pH 7,0, VapB21 desenovelou-se com redução do sinal de $-4200 \text{ deg.cm}^2/\text{dmol}$ para $-1600 \text{ deg.cm}^2/\text{dmol}$ em 95 °C. Para esse pH também foi observado agregação a 95 °C, e não ocorreu reenovelamento proteico. As curvas de desnaturação obtidas para os pHs 4,0; 7,0 e 9,5 não são do tipo de dois estados, nativo e desenovelado, o que impossibilitou o cálculo dos parâmetros termodinâmicos que caracterizam a estabilidade estrutural da proteína em estudo.

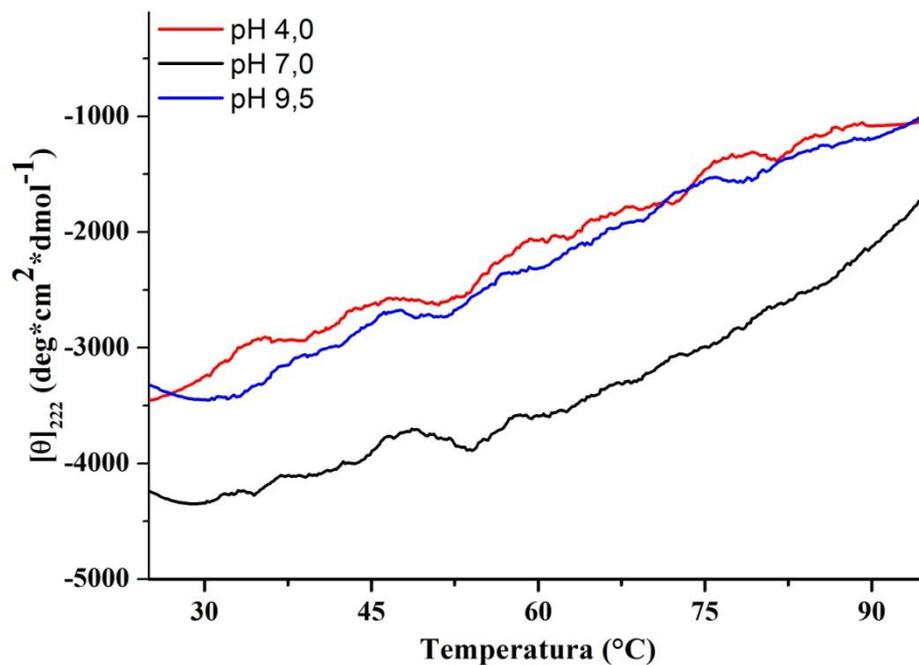


Figura 45. Curvas de termoestabilidade da proteína VapB21 nos pHs 4,0, 7,0 e 9,5. A curva de desnaturação foi obtida no comprimento de onda fixado em 222 nm, com variação da temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$ para 95 $^{\circ}\text{C}$.

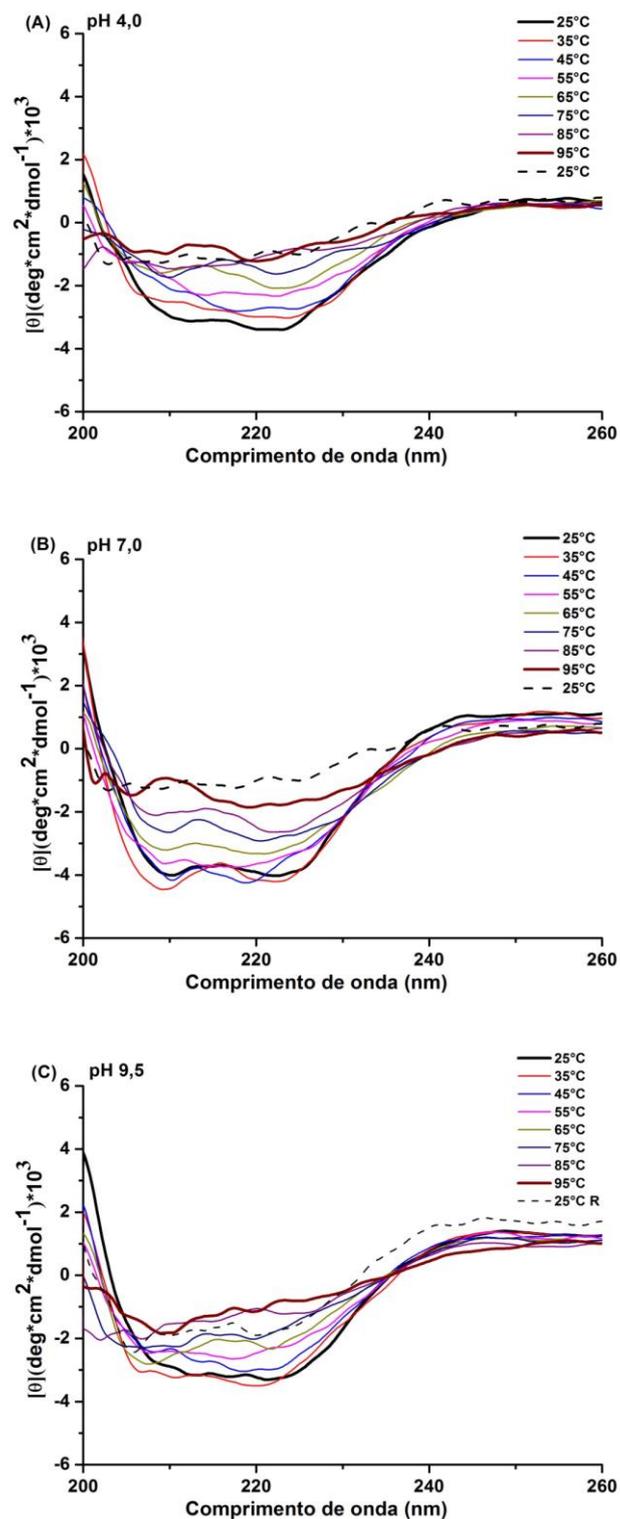


Figura 46. Espectros de dicroísmo circular da proteína VapB21 em pH 4,0, pH 7,0 e pH 9,5 em diferentes temperaturas. Os espectros foram obtidos de 200-260 nm, de 25 °C a 95 °C, com intervalos de 10 °C.

3.6.3. VapB38

As curvas de desnaturação obtidas nos ensaios de termoestabilidade de VapB38 e os espectros obtidos para os pHs 4,0; 7,0 e 9,5 mostram alterações na estrutura secundária da proteína, conforme diferenças nas bandas em 208, 218 e 222 nm (**Figura 47** e **Figura 48**). No pH 4,0, houve redução do sinal dicróico em 208 nm após 65 °C, de -4300 para -1900 deg.cm²/dmol em 95 °C. Os espectros dicróicos obtidos nesse pH mostraram que VapB38 após 65 °C apresenta-se com estrutura desordenada, com deslocamento banda dicróica para região de 200 nm, sugerindo processo de desnaturação proteica. Após retorno da temperatura para 25 °C foi observado o reenovelamento das moléculas de VapB38, apresentando espectro dicróico muito semelhante ao obtido inicialmente para proteína a 25 °C (**Figura 48**). No pH 7,0, a curva de desnaturação se manteve estável sem alteração de sinal, até temperatura próxima de 75 °C, em seguida, houve redução do sinal de -2700 para -1140 deg.cm²/dmol. Entretanto, não houve deslocamento da banda dicróica, como observado no pH 4,0 e o sinal dicróico foi mantido estável em 208, 218 e 222 nm. Após retorno da temperatura para 25 °C foi observado reenovelamento das moléculas de VapB38 em solução, com um ganho de estrutura secundária, caracterizado pelo aumento do sinal dicróico, em relação espectro inicial obtido a 25 °C. Os resultados mostrados no pH 7,0 sugerem o desenovelamento parcial e estabilidade estrutural da proteína (**Figura 48**). A curva de desnaturação de VapB38 obtida em pH 9,5 mostrou que houve redução do sinal de -3300 para -2200 deg.cm²/dmol após 65 °C, com deslocamento da banda dicróica para região de 200 nm (**Figura 47** e **Figura 48**). Para este pH foi observado reenovelamento das moléculas de VapB38 após retorno da temperatura do ensaio para 25 °C, com um ganho de estrutura secundária, caracterizado pelo aumento do sinal dicróico, em relação espectro inicial obtido a 25 °C. Este resultado foi semelhante ao observado para o pH 7,0.

Para todos os pHs avaliados houve desdobramento e/ou alterações conformacionais da proteína. No pH 9,5 a curva de desnaturação de VapB 38 indica que a proteína desenovelou-se apresentando-se em dois estados, nativo e desenovelado. O ponto de inflexão entre os dois estados, T_m , foi determinado para o pH 9,5 em T_m : 69 °C. Os parâmetros termodinâmicos, calculados para o pH 9,5 de acordo com a aproximação de van't Hoff, foram $\Delta H_m = 57,655$ kcal/mol, $\Delta S_m = 202,25$ cal/mol.K, e energia livre Gibbs (ΔG^{25}) = 3,04 kcal/mol, que são compatíveis com processo endotérmico e com a estabilidade moderada de VapB38 neste pH.

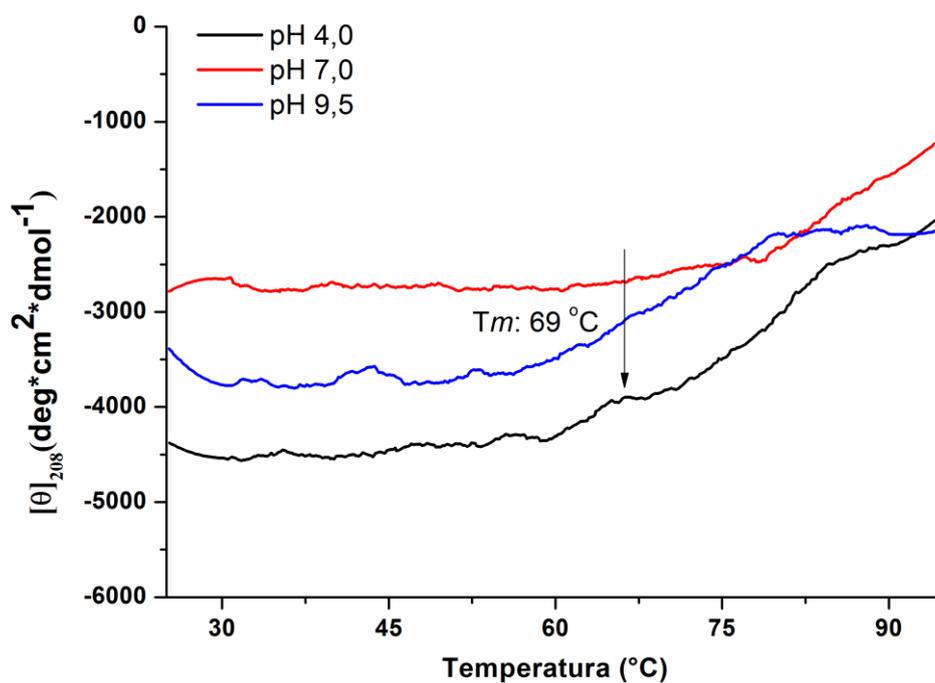


Figura 47. Curvas de termoeabilidade da proteína VapB38 nos pHs 4,0, 7,0 e 9,5. A curva de desnaturação foi obtida no comprimento de onda fixado em 208 nm, com variação da temperatura de 25 °C para 95 °C. O valor de T_m calculado para pH 9,5 está representado pela seta preta com T_m : 69 °C.

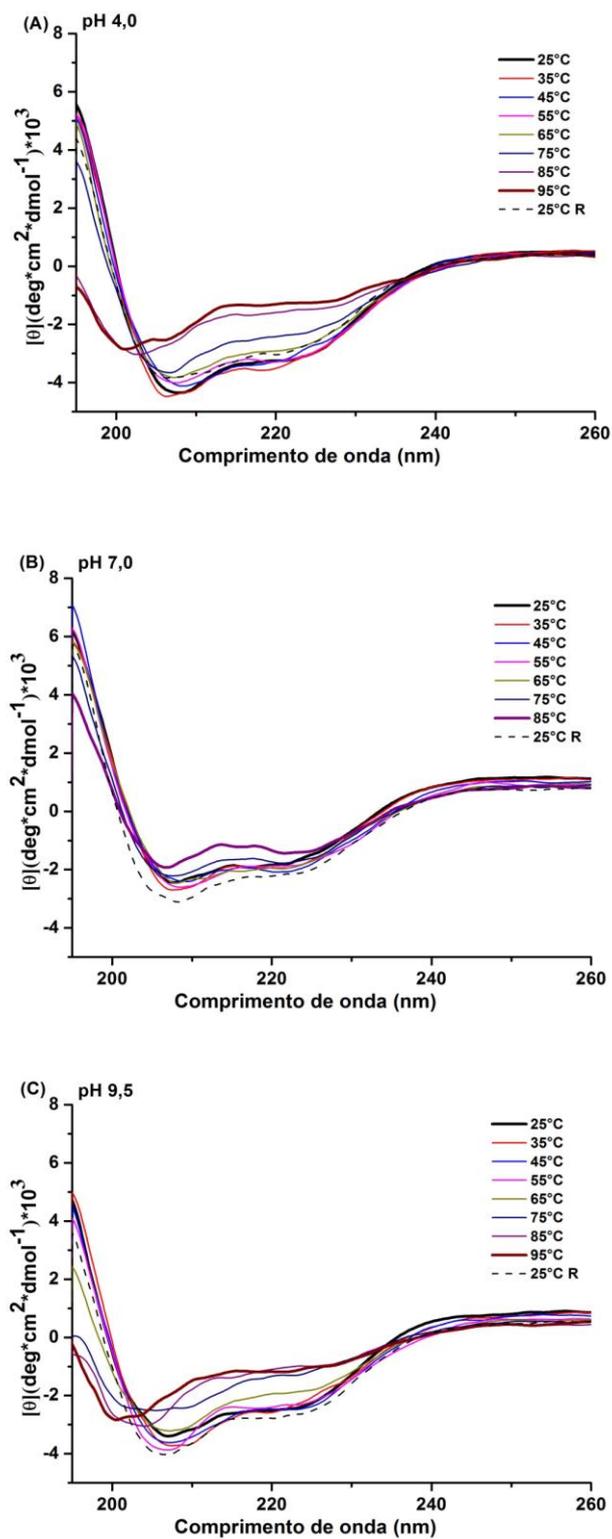


Figura 48. Espectros de dicroísmo circular da proteína VapB38 em pH 4,0, pH 7,0 e pH 9,5 em diferentes temperaturas. Os espectros foram obtidos de 200-260 nm, de 25 °C a 95 °C, com intervalos de 10 °C.

3.7. Análises físico-químicas

As toxinas VapC apresentam agregação e formação precipitados visíveis em temperaturas maiores que 5 °C. Para uma maior durabilidade da amostra, a proteína necessariamente deveria estar acondicionada em gelo durante todo tempo. As etapas de cromatografia de afinidade e exclusão molecular deveriam ser realizadas sempre no mesmo dia, pois amostra tendia a precipitar rapidamente no tampão com imidazol. Uma vez purificada, todos os experimentos eram realizados com no máximo uma semana, pois após isso, a proteína tendia a agregar. Congelar alíquotas em glicerol 5 % não impediu que ocorresse formação de agregados. Tampões com baixa concentração de sal geravam precipitados, os tampões com 300 mM de NaCl estabilizaram melhor a proteína.

As antitoxinas apresentavam uma menor sensibilidade a temperatura, quando comparadas com as toxinas. A VapB38 foi a que apresentou uma solubilidade maior, mesmo em água e a temperatura ambiente, sua amostra permanecia solúvel por até duas semanas. VapB11 foi a menos estável, suas amostras apresentaram precipitados em tampões com menos de 100 mM NaCl. Em tampões com 300 mM de NaCl, condicionado em gelo, as amostras de VapB11 apresentavam maior estabilidade. VapB17 e VapB21 permaneceram estáveis em tampão 5 mM Tris, pH 7, 50 mM NaCl, em temperaturas próximas a 5 °C.

4. DISCUSSÃO

4.1. Expressão

Os resultados obtidos durante os testes de expressão ressaltam a dificuldade de se obter um protocolo de expressão eficiente para produção da toxina na forma solúvel. Parte disso também se dá pela falta de informação sobre essas proteínas. Temperaturas de expressão acima de 20 °C direcionaram a produção de todas toxinas para corpos de inclusão, resultado semelhante a VapC21 (Jardim, et al., 2016) e VapC20 (Deep, et al., 2017) que tiveram sua expressão a baixas temperaturas, 16 °C. O mesmo é observado para intensidade de expressão: concentrações maiores que 0,2 mM de IPTG também levaram a produção de todas as toxinas testadas neste trabalho para corpos de inclusão. Para produção da VapC21 e VapC20 foram utilizadas 0,5 e 0,3 mM de IPTG, respectivamente, (Jardim, et al., 2016;

Deep, et al., 2017). A produção das VapC na forma solúvel é diretamente influenciada pela temperatura e nível de expressão (Jardim, et al., 2016) o que corrobora com os dados experimentais encontrados.

Ensaio preliminares de toxicidade (dados não apresentados) apontam uma baixa considerável no crescimento celular durante a expressão da VapC19, o que entra em acordo com Winther (2016) que cita que a expressão das VapC4, VapC11, VapC25, VapC26, VapC28, VapC29, VapC30, VapC33, VapC37 e VapC39 (Mtb) inibiu fortemente o crescimento celular das cepas de expressão (Winther, et al., 2016). A mutação D5A foi realizada em todas as VapC do trabalho, no entanto, devido a diversidade de atividade de RNase (Ahidjo, et al., 2011;), não se sabe ao certo se essa mutação foi suficiente para abolir a atividade. Foi relatada uma expressão fraca em cepas de *E. coli* expressando mutantes tóxicos de VapC20. Baseado nisso, pode-se inferir que a baixa produção das VapC em *E. coli* pode estar associada a uma possível atividade residual da toxina. Possivelmente, a produção dessas proteínas em corpos de inclusão poderia ser um mecanismo de defesa da própria célula (Arrasate, et al., 2004). As únicas proteínas expressas de forma solúvel foram as VapC19 e VapC20, ambas em baixa quantidade e em condições bem específicas. A toxicidade das VapC de Mtb é influenciada pelo nível de expressão (Ahidjo, et al., 2011; Deep, et al., 2017), logo, razoável supor que mesmo que a VapC19 e a VapC20 ainda apresentem resquícios de atividade, durante as primeiras horas em que a cultura produz a proteína, a quantidade intracelular de toxina ainda não é suficiente para causar efeitos inibitórios proeminentes em seu crescimento (Ahidjo, et al., 2011).

Em seu trabalho com a VapC20 Deep (2017) propõe que mutações para gerar versões não tóxicas de VapC poderiam levar a um desenovelamento da interface dimérica, e induziriam a produção proteica em corpos de inclusão, concluindo assim que a dimerização da VapC20 é obrigatória para sua atividade, além de estabilizar a estrutura da toxina (Deep, et al., 2017).

As proteínas que não foram produzidas de forma alguma, como as VapC3, VapC11 e VapC38, são intrigantes. O procedimento de transformação com esses genes foi realizado com sucesso, ou seja, as colônias utilizaram da resistência encontrada no plasmídeo para sobreviver ao antibiótico presente no meio de cultura da placa. No entanto, a banda corresponde à proteína nunca foi detectada no gel SDS, mesmo depois de diversas abordagens de expressão, os extratos brutos dessas culturas sempre apresentavam o mesmo

padrão de bandas da cepa controle, que não foi induzida. Não foi encontrado na literatura nenhuma explicação para o fenômeno observado.

As antitoxinas foram facilmente expressas na forma solúvel e em quantidades significativas para realização de outros ensaios. A temperatura de 37 °C na etapa de expressão não influenciou na solubilidade das VapB, dado que entra em acordo com as análises de DC, que mostraram que essas proteínas em solução, independentemente do pH, se mantiveram estruturadas a 35 °C, não apresentando agregação. Foi escolhido o meio autoindutor, pois nele se obteve uma maior produção das proteínas VapB comparado ao LB, resultado também observado para produção de outras proteínas (Studier, 2014).

Ensaio com as proteínas fusionadas a GST foram feitos numa tentativa de aumentar a solubilidade das proteínas alvo, e também como uma abordagem para testar se esse tipo de construção seria melhor expressa em *E. coli*. Em caso de sucesso na expressão também poderia ser avaliada a purificação em uma coluna de afinidade por GST. (Davis, et al., 1999; Hayashi, Kojima, 2008)

4.2. Cristalização

A proteína VapC20 apresentou duas condições de cristalização, mas apenas em uma delas se obteve sucesso na replicação dos cristais. Foi possível estabelecer a melhor faixa de pH (4,0 a 4,2), concentração de PEG 8000 (18-20 %) e concentração proteica (8 a 13 mg/mL) para condição de cristalização da VapC20. O tempo estimado para a formação inicial dos cristais foi de 2 semanas, e logo após aparecerem, tiveram a durabilidade de aproximadamente dois meses. Para eles, foi observado um padrão de forma losangular e variam de tamanho de acordo com a concentração da proteína na gota. A VapC20 foi cristalizada em uma concentração de 10 a 13 mg/mL contrastando com as VapC21 e VapC20 (estrutura resolvida) que foram cristalizadas em concentrações entre 5 a 8 mg/mL, respectivamente (Jardim, et al., 2016). Acredita-se que o cristal da VapC20 seja de proteína, pois apresentou fluorescência quando excitado a 260 nm (UV) (Desbois, et al., 2004). Infelizmente, quando chegou data da coleta dos dados LNLS (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron) os cristais já haviam desaparecido. O experimento deve então ser planejado de forma que com que os cristais sejam formados e estejam intactos poucos dias antes da coleta de dados.

Durante os testes de *screening* das amostras de VapC19 apareceram muitas formas cristalinas em todos os kits testados. No entanto, não se obteve sucesso nos ensaios de refinamento dessas condições. O motivo principal foi não conseguir mais replicar as etapas de a expressão e purificação que proovessem amostra proteica em grande quantidade e nível de pureza elevado. Devido à falta de amostra, os ensaios de cristalização da VapC19 foram descontinuados.

Os resultados obtidos para a cristalização das VapB não foram promissores e também não se obteve sucesso na replicação das poucas condições em que apareceram formas cristalinas de VapB17 e VapB38. As antitoxinas VapB são conhecidas por sua flexibilidade estrutural (Fasani, et al., 2013). A VapB26, por exemplo, apresenta uma região de *loop* flexível sem nenhuma estrutura secundária característica (Kang et al., 2017), a estrutura da VapB46 resolvida por RMN salienta a presença dessas regiões desenoveladas (Ray, et al., 2018). Estas regiões são conhecidas como regiões intrinsecamente desenoveladas (Dversky, 2017). Os resíduos de aminoácidos em maior quantidade observados para a maioria das sequências das VapB analisadas é a Ala e Gly, totalizando cerca de 17 a 29 %. Estes aminoácidos são pequenos, apolares e promovem a flexibilidade estrutural da antitoxina. Provavelmente, essas regiões intrinsecamente desenoveladas de flexibilidade podem dificultar ou impedir a cristalização das antitoxinas (Poon, 1997; Dale, et al., 2003). Já as toxinas, por apresentarem estrutura globular (Jardim, et al., 2016), possivelmente podem ser cristalizadas mais facilmente (Poon, 1997). Ray e colaboradores (2018) demonstraram por espectros dicróicos que um mutante de VapB46, que continha ~ 50 resíduos da porção N-terminal, apresentava um maior conteúdo de estrutura secundária do que a VapB46 inteira, concluindo que a porção C-terminal é desenovelada e influência na perda de estrutura da antitoxina (Ray, et al., 2018). Logo, uma outra abordagem para a cristalização das antitoxinas seria a construção de um mutante apenas com a porção N-Terminal e subsequentemente a realização de ensaios de cristalização.

4.3. Dicroísmo circular

Experimentos de dicroísmo circular foram realizados com a finalidade de obter informações sobre a estrutura secundária, estabilidade térmica, influência do pH na estrutura, desnaturação e reenovelamento das antitoxinas VapB. Estas proteínas apresentam uma região específica de ligação ao DNA, que tipicamente se localiza na região N-terminal (Lee, et al.,

2015; Deep, Thakur, *to be published*; Das, et al., 2014; Kang, et al., 2017; Min, et al., 2012; Holton, et al. *to be published*). A VapB apresenta uma porção C-terminal de alta especificidade a sua toxina cognata, ligando-a com afinidade próximo ao sítio ativo da VapC. A interação toxina-antitoxina gera o complexo VapBC, no qual o substrato não tem mais acesso ao sítio ativo da VapC, o que caracteriza a inativação de sua atividade tóxica. Este complexo pode se ligar a região promotora e inibir a transcrição de seu respectivo *operon* (Lee, et al., 2015; Das, et al., 2014; Kang, et al., 2017; Min, et al., 2012). Foi descrito que o mesmo dímero de VapB15 inibiu dímeros de VapC15 diferentes. Ray (2018) mostrou que a flexibilidade estrutural das antitoxinas está relacionada a regiões intrinsicamente desordenadas em sua sequência e propôs que o mesmo tetrâmero de VapB46 pode se ligar na região do promotor e do operador simultaneamente (Ray, et al., 2018).

Influência do pH na estrutura e função das VapB

Dentre o gênero *Mycobacteria*, o *Mtb* se difere dos demais por apresentar crescimento ótimo na faixa de pH de 6,2 a 7,3 e um crescimento limitado em pHs levemente ácidos próximos de 5,4 (Chapman, Bernard, 1962; Iivanainen, et al., 1999; Sturgill-Koszycki, et al., 1994). Este organismo pode ser encontrado em vacúolos fagocíticos de macrófagos do hospedeiro, no qual o pH intrafagossômico é de 6,3 a 6,5 (Sturgill-Koszycki, et al., 1994). Foi constatado que em resposta a ambientes extracelulares ácidos ou levemente ácidos, o *Mtb*, *M. Bovis* e *M. smegmatis* tendem a manter o pH intracelular próximo ao neutro (pH 7,0) (Rao, et al., 2001; Chapman, Bernard, 1962). A chave para o sucesso do *Mtb* como patógeno está na sua interação com o macrófago do hospedeiro e na capacidade de sobreviver dentro desta célula (Sturgill-Koszycki, et al., 1994). A estratégia de manter seu pH intracelular neutro, mesmo quando o ambiente extracelular é desfavorável, pode indicar a importância que este pH tem para o *Mtb* nos processos bioquímicos e moleculares durante a infecção (Rao, et al., 2001).

Os dados de DC obtidos indicaram que as proteínas VapB17, VapB21 e VapB38 apresentam conteúdo de estrutura secundária e estabilidade estrutural dependente do pH. Em pH 7,0 estas proteínas apresentaram maior conteúdo de estruturas secundárias, bem como maior estabilidade estrutural. Vale ressaltar que o pH do ambiente intracelular do *Mtb* é 7,0 e os valores do ponto isoelétrico das três proteínas é próximo de 7,0 (VapB17 = 6,5; VapB21 = 6,7 e VapB38 = 5,8). Estes resultados mostram que pode haver uma relação de estrutura e função destas proteínas, pois os resultados de DC mostram mudanças estruturais dependentes do pH.

A influência do pH na estrutura secundária das proteínas está relacionada com o percentual e a ionização dos aminoácidos carregados, em outras palavras com os pKa efetivos dos grupos ionizáveis, principalmente encontrados no ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina, arginina e histidina. As VapB analisadas apresentam em sua sequência um total de 12 a 20 % de resíduos de ácido aspártico, ácido glutâmico e histidina, sendo a maior parte encontrada na porção N-terminal. Nas estruturas de VapB de Mtb disponíveis no PDB, a porção N-terminal está relacionada com a dimerização das antitoxinas (Ray, et al., 2018; Lee, et al., 2015; Das, et al., 2014; Kang, et al., 2017; Min, et al., 2012). Em um trabalho publicado recentemente Ray e colaboradores (2018) indicam que a porção N-terminal da VapB46 em solução é a região mais estruturada e a porção C-terminal apresenta-se desordenada (Ray, et al., 2018). Os dados de DC indicaram que nos pHs 4,0 e 9,5; as proteínas apresentaram redução do conteúdo de estruturas secundárias e menor estabilidade estrutural com aumento de temperatura, quando comparados ao pH 7,0, devido a diferença do sinal dicróico das bandas negativas. Portanto, baseando-se na composição de aminoácidos das VapB, infere-se que nos pHs 4,0 e 9,5 ocorreu uma mudança de carga da região N-terminal, ocasionada pela protonação ou desprotonação dos resíduos ionizáveis desta região. Essa mudança de carga pode influenciar na dimerização da proteína, fragilizando as interações da interface dímica, assim a antitoxina tenderia a assumir estados oligoméricos de menor ordem (monômeros) (Ray, et al., 2018), levando a assumir uma estrutura desordenada e com baixa estabilidade térmica em altas temperaturas nesses pHs, conforme indicado pelos ensaios de dicróismo circular.

Influência da temperatura e estabilidade estrutural das VapB

O aumento da temperatura é um fator que pode ocasionar mudanças conformacionais e desenovelamento proteico. Nos estudos de termo estabilidade por DC, em geral, os espectros das VapB indicam que em temperaturas acima de 65 °C, as proteínas perdem acentuadamente a estrutura secundária, apresentando valores de T_m próximos de 70 °C (VapB17, pH 4,0) e 75 °C (VapB38, pH 9,5). Valor encontrado para VapB46 foi $T_m = 59$ °C (Ray, et al., 2018). As curvas de desnaturação térmica das proteínas VapB38 e VapB17 em pH 7,0 indicam um perfil de desnaturação parcial, apresentando mudanças conformacionais. Adicionalmente, essas mudanças conformacionais, indicadas por bandas dicróicas levemente alteradas, foram reversíveis, conforme mostrado no espectro dicróico obtido após retorno da temperatura de 95 °C para o estado inicial de 25 °C. Entretanto, a proteína VapB21 não apresentou perfil de reenovelamento semelhante ao espectro inicial

obtido em 25 °C. Este resultado também foi observado nos testes físico-químicos de solubilidade dessas moléculas, uma vez que a VapB21 agregava em pH 7,0, e não retornava a forma solúvel, resultado diferente do que foi observado para as proteínas VapB38 e VapB17.

Os parâmetros termodinâmicos caracterizam a estabilidade estrutural de proteínas e foram calculados somente para VapB17, no pH 4,0 e VapB38, no pH 9,5, uma vez que as curvas de desnaturação térmica foram reversíveis para esses pHs (Pace, Scholtz, 1997). Estabilidade correspondente a 25 °C (ΔG^{25}) para as antitoxinas foi estimada a partir da constante de equilíbrio, variação da entalpia, variação da entropia e temperatura (Teles, et al., 2005). Os parâmetros termodinâmicos estimados indicam que a VapB17 em pH 4,0 apresenta estrutura estável e que a VapB38 em pH 9,5 apresenta baixa estabilidade estrutural, essa afirmação está baseada nos valores de ΔG^{25} de 10,27 kcal/mol e 3,04 kcal/mol, respectivamente (Teles, et al., 2005).

As análises de DC indicam que as proteínas VapB21, VapB17 e VapB38 em solução apresentam um conteúdo de estrutura secundária dependente de pH e temperatura. As antitoxinas analisadas apresentaram um perfil dicroico mais centrado em estrutura de hélice α , contrastando com o perfil dicroico apresentado pela VapB46, que foi mais acentuado em estrutura do tipo fita- β (Ray, et al., 2018). As estruturas cristalográficas já resolvidas para outras VapB (Lee, et al., 2015; Das, et al., 2014; Kang, et al., 2017; Min, et al., 2012) e a estrutura resolvida por RMN da VapB46, apresentam uma maior regularidade da região N-terminal em assumir conformações com maior quantidade de folha- β e da porção C-terminal de hélice α . O conteúdo de estrutura secundária pode variar de uma antitoxina para outra devido à baixa identidade entre elas (~ 35 %) (Pagani, et al., *to be published*). Vale ressaltar que, até o momento, na literatura existe apenas um trabalho com dados de DC, para VapB46 de Mtb (Ray, et al. 2018). O que reforça a importância dos dados apresentados neste trabalho, que é pioneiro para compreender a influência do pH e temperatura na estrutura secundária de antitoxinas VapB e agrega informações estruturais relevantes sobre essas proteínas em solução.

4.4. Ultracentrifugação analítica

Os dados de UCA para as amostras VapC19 indicaram a predominância de uma única população oligomérica na amostra (97 % do total) correspondente a um homodímero. A configuração dimérica encontrada é similar aos resultados de experimentos de UCA para VapC20 (Deep, et al., 2017), e resultados de cristalografia da VapC21 (Jardim, et al., 2016), e

outras toxinas associadas ao complexo (Min, et al., 2012; Das, et al., 2014). O valor experimental encontrado para célula 2 foi igual ao da massa do dímero teórico, e MM experimental do ajuste global das três medidas também apresentou um valor muito próximo. O valor da razão friccional para a VapC20, foi de 1.48 (Deep, et al., 2017), maior que o valor encontrado para VapC19 de 1,12. No entanto, a baixa identidade entre essas proteínas (~30 %) indica que possa haver uma diferença estrutural entre elas, o que já explicaria valores de razão friccional diferentes.

Para todas as antitoxinas foi observada a presença de duas populações oligoméricas diferentes: monômeros e dímeros (VapB11); dímeros e hexâmetros (VapB21); e dímeros e tetrâmeros (VapB38). A conformação dimérica foi encontrado em todas as antitoxinas analisadas, resultado também observado nos dados de AUC para VapB20 (Deep, et al., 2017), e em outras antitoxinas que também mostraram existir como dímero (Das, et al., 2014; Kang, et al., 2017; Ray, et al., 2018). A região tipicamente responsável por essa dimerização é a porção N-terminal e a região que demonstrou ser responsável por gerar oligômeros de maior ordem para VapB46 foi a região C-terminal (Ray, et al. 2018).

Para a VapB11 foi observado que as populações oligoméricas podem ser separadas durante a cromatografia de exclusão sem retornar ao equilíbrio rapidamente, seu gráfico $c(s)$ mostra picos diferentes para amostras de VapB11 diferentes (18,1 kDa e 9,1 kDa). Já para a VapB21 e VapB38, percebe-se um equilíbrio na população oligomérica, apresentam o mesmo perfil no gráfico $c(s)$, alterando apenas as intensidades entre eles, o que indicou uma diferença entre o balanço estequiométrico das populações oligoméricas. Essas análises corroboram o observado nos cromatogramas de exclusão molecular, amostras que foram eluídas em volumes menores (entre 7 a 10 mL) representam uma maior porcentagem de oligômeros de ordem maior, e os picos eluídos em volumes maiores (>10 mL) apresentaram um maior conteúdo de oligômeros de menor ordem.

Para a VapB38 foi encontrado uma população de dímeros ($18,9 \pm 0,6$ kDa) e tetrâmeros ($35,7 \pm 1,1$ kDa), que apresentaram uma MM experimental próximo a massa teórica (monômero de 9 kDa e tetrâmero de 36 kDa). Tetrâmeros de antitoxinas também foram encontrados para a VapB46 de Mtb e RelB de *E. coli* (Ray, et al., 2018; Li, et al., 2008), de acordo com o observado neste trabalho. O resultado de UCA para VapB21 demonstrou a presença de uma população de hexâmeros de $66,1 \pm 1$ kDa, peso teórico seria ~ 60,6 kDa. Ainda não foram descritos oligômeros de VapB de Mtb dessa ordem, no entanto,

devido à baixa identidade entre as VapB (< 35 %), a interação de três dímeros para formar um hexâmero é possível.

A VapB38 apresentou um rmsd de 0,02, esse valor é alto quando comparado aos valores encontrados para as VapB analisadas. A VapB38 não apresenta resíduos aromáticos e sua leitura durante o experimento de UCA foi feita a 220 nm (Johnson, 1990), nesse comprimento de onda pode ocorrer a absorção de outros solutos presentes no tampão da amostra (Good, Izawa, 1972), o que contribuiria com o valor alto de rmsd nas análises.

5. CONCLUSÃO

-As proteínas VapB11, VapB17, VapB21, VapB38 são produzidas a 37 °C na forma solúvel;

-A expressão das toxinas na forma solúvel é fortemente influenciada por temperatura e concentração do agente indutor. Na maioria dos casos, ocorre a produção insolúvel das VapC em corpos de inclusão;

-As toxinas e antitoxinas analisadas demonstraram uma maior solubilidade em tampões com maiores concentrações de sal (NaCl 100 a 300 mM), a concentração ideal variou para cada proteína;

-Temperaturas acima de 5 °C ocasionam precipitação e formação de aglomerados proteicos nas amostras de VapC20 e VapC19 purificadas;

-As VapB7 e VapB38 são proteínas estruturadas com um T_m de 70 e 75 °C, respectivamente. Em pH 7 todas as antitoxinas são mais estáveis e apresentam um maior conteúdo de estrutura secundária;

-As Antitoxinas VapB11, VapB21 e VapB38 demonstraram um perfil com duas populações oligoméricas distintas. Sendo a forma dimérica comum a todas;

-VapC19 demonstrou um perfil com apenas uma população dimérica;

-As toxinas se mostraram alvos promissores para cristalização;

-Para as antitoxinas VapB11, VapB11+GST, VapB17, VapB21, VapB21+GST, não se obteve nenhum progresso nos experimentos de cristalização;

-As proteínas deste trabalho apresentaram diferenças de solubilidade, tipo de expressão, estabilidade térmica, conteúdo de estrutura secundária, e estados oligoméricos. O que reforça que mesmo que sejam da mesma família Vap, apresentam especificidades únicas.

6. REFERÊNCIAS

Agarwal, S., Tiwari, P., Deep, A., Kidwai, S., Gupta, S., Thakur, K. G., & Singh, R. (2018). System-Wide Analysis Unravels the Differential Regulation and In Vivo Essentiality of Virulence-Associated Proteins B and C Toxin-Antitoxin Systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Infectious Diseases*, 217(11), 1809-1820.

Agarwal, Sakshi, et al. "System wide analysis unravels differential regulation and in vivo essentiality of VapBC TA systems from *Mycobacterium tuberculosis*." *The Journal of Infectious Diseases* (2018).

Ahidjo, B. A., Kuhnert, D., McKenzie, J. L., Machowski, E. E., Gordhan, B. G., Arcus, V., ... & Mizrahi, V. (2011). VapC toxins from *Mycobacterium tuberculosis* are ribonucleases that differentially inhibit growth and are neutralized by cognate VapB antitoxins. *PLoS one*, 6(6), e21738.

Albrethsen, J., Agner, J., Piersma, S. R., Hojrup, P., Pham, T. V., Weldingh, K., ... & Rosenkrands, I. (2013). Proteomic profiling of the *Mycobacterium tuberculosis* identifies nutrient starvation responsive toxin-antitoxin systems. *Molecular & Cellular Proteomics*, mcp-M112.

Amberson Jr, J. B. (1938). The significance of latent forms of tuberculosis. *New England Journal of Medicine*, 219(15), 572-576. Gomez, J. E., & McKinney, J. D. (2004). M. tuberculosis persistence, latency, and drug tolerance. *Tuberculosis*, 84(1-2), 29-44.

Amitai, S., Kolodkin-Gal, I., Hananya-Meltabashi, M., Sacher, A., & Engelberg-Kulka, H. (2009). *Escherichia coli* MazF leads to the simultaneous selective synthesis of both "death proteins" and "survival proteins". *PLoS genetics*, 5(3), e1000390.

Arcus, V. L., McKenzie, J. L., Robson, J., & Cook, G. M. (2010). The PIN-domain ribonucleases and the prokaryotic VapBC toxin-antitoxin array. *Protein Engineering, Design & Selection*, 24(1-2), 33-40.

Arrasate, M., Mitra, S., Schweitzer, E. S., Segal, M. R., & Finkbeiner, S. (2004). Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *nature*, 431(7010), 805.

Berova, N., Nakanishi, K., Woody, R. W., & Woody, R. (Eds.). (2000). *Circular dichroism: principles and applications*. John Wiley & Sons.

Bifani, P., Moghazeh, S., Shopsis, B., Driscoll, J., Ravikovitch, A., & Kreiswirth, B. N. (2000). Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv/Ra variants: distinguishing the mycobacterial laboratory strain. *Journal of clinical microbiology*, 38(9), 3200-4.

Brasil. Ministério da Saúde. Portal MS (Portal Principal de Notícias da Saúde): Tuberculose. Acesso em janeiro de 2019 pelo link: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/tuberculose>.

Chapman, J. S., & Bernard, J. S. (1962). The tolerances of unclassified mycobacteria: I. Limits of pH tolerance. *American Review of Respiratory Disease*, 86(4), 582-583.

Dale, G. E., Oefner, C., & D'Arcy, A. (2003). The protein as a variable in protein crystallization. *Journal of structural biology*, 142(1), 88-97.

Das, U., Pogenberg, V., Subhramanyam, U. K. T., Wilmanns, M., Gourinath, S., & Srinivasan, A. (2014). Crystal structure of the VapBC-15 complex from *Mycobacterium tuberculosis* reveals a two-metal ion dependent PIN-domain ribonuclease and a variable mode of toxin-antitoxin assembly. *Journal of structural biology*, 188(3), 249-258.

Davis, G. D., Elisee, C., Newham, D. M., & Harrison, R. G. (1999). New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli*. *Biotechnology and bioengineering*, 65(4), 382-388.

Deep, A., Kaundal, S., Agarwal, S., Singh, R., & Thakur, K. G. (2017). Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* VapC20 toxin and its interactions with cognate antitoxin, VapB20, suggest a model for toxin–antitoxin assembly. *The FEBS journal*, 284(23), 4066-4082.

Deep, A., Thakur, K.G. Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* VapBC11 toxin-antitoxin complex. *To be published*.

Desbois, S., Seabrook, S. A., & Newman, J. (2013). Some practical guidelines for UV imaging in the protein crystallization laboratory. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 69(2), 201-208.

Dienemann, C., Bøggild, A., Winther, K. S., Gerdes, K., & Brodersen, D. E. (2011). Crystal structure of the VapBC toxin–antitoxin complex from *Shigella flexneri* reveals a hetero-octameric DNA-binding assembly. *Journal of molecular biology*, 414(5), 713-722.

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In *The proteomics protocols handbook* (pp. 571-607). Humana press.

Gerdes, K., & Maisonneuve, E. (2012). Bacterial persistence and toxin-antitoxin loci. *Annual review of microbiology*, 66, 103-123.

Global Burden of Disease Collaborative Network. Global Burden of Disease Study 2016 (GBD 2016) Results. Seattle, United States: Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME), 2017 <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool>.

Global tuberculosis report 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Good, N. E., & Izawa, S. (1972). [3] Hydrogen ion buffers. In *Methods in enzymology* (Vol. 24, pp. 53-68). Academic Press.

Hayashi, K., & Kojima, C. (2008). pCold-GST vector: a novel cold-shock vector containing GST tag for soluble protein production. *Protein expression and purification*, 62(1), 120-127.

Herskovitz, I., Donoghue, H. D., Minnikin, D. E., May, H., Lee, O. Y. C., Feldman, M., ... & Bar-Gal, G. K. (2015). Tuberculosis origin: the Neolithic scenario. *Tuberculosis*, 95, S122-S126.

Holton, S. J., Pogenberg, V., Iborra, V., Wilmanns, M. Crystal Structure and DNA Binding Ability of Myco *Tuberculosis* Vapbc49 Anti-Toxin Protein Bacterium. *To be published*.

Iivanainen, E., Martikainen, P. J., Väau mL; nänen, P., & Katila, M. L. (1999). Environmental factors affecting the occurrence of mycobacteria in brook sediments. *Journal of applied microbiology*, 86(4), 673-681.

Jardim, P., da Silva Santos, I. C., Barbosa, J. A. R. G., de Freitas, S. M., & Valadares, N. F. (2016). Crystal structure of VapC21 from *Mycobacterium tuberculosis* at 1.31 Å resolution. *Biochemical and biophysical research communications*, 478(3), 1370-1375.

Johnson Jr, W. C. (1990). Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 7(3), 205-214.

Kang, S. M., Kim, D. H., Lee, K. Y., Park, S. J., Yoon, H. J., Lee, S. J., ... & Lee, B. J. (2017). Functional details of the *Mycobacterium tuberculosis* VapBC26 toxin-antitoxin system based

on a structural study: insights into unique binding and antibiotic peptides. *Nucleic acids research*, 45(14), 8564-8580.

Koch, R., Pinner, B. R., & Pinner, M. (1932). *The aetiology of tuberculosis*. New York: National Tuberculosis Association. <https://ourworldindata.org/causes-of-death#tuberculosis>.

Lee, I. G., Lee, S. J., Chae, S., Lee, K. Y., Kim, J. H., & Lee, B. J. (2015). Structural and functional studies of the Mycobacterium tuberculosis VapBC30 toxin-antitoxin system: implications for the design of novel antimicrobial peptides. *Nucleic acids research*, 43(15), 7624-7637.

Levin, B. R., & Rozen, D. E. (2006). Non-inherited antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 4(7), 556.

Lew JM, Kapopoulou A, Jones LM, Cole ST. TubercuList - 10 years after. *Tuberculosis (Edinb)*. Jan 91(1):1-7 (2011).

Lewis, K. (2010). Persister cells. *Annual review of microbiology*, 64, 357-372.

Li, G. Y., Zhang, Y., Inouye, M., & Ikura, M. (2008). Structural mechanism of transcriptional autorepression of the Escherichia coli RelB/RelE antitoxin/toxin module. *Journal of molecular biology*, 380(1), 107-119.

Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*, 4(9), 429.

Maisonneuve, E., Shakespeare, L. J., Jørgensen, M. G., & Gerdes, K. (2011). Bacterial persistence by RNA endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(32), 13206-13211.

MATÉ, María J. et al. Crystal structure of the DNA-bound VapBC2 antitoxin/toxin pair from Rickettsia felis. *Nucleic acids research*, v. 40, n. 7, p. 3245-3258, 2011.

Mattison, K., Wilbur, J. S., So, M., & Brennan, R. G. (2006). Structure of FitAB from Neisseria gonorrhoeae bound to DNA reveals a tetramer of toxin-antitoxin heterodimers containing pin domains and ribbon-helix-helix motifs. *Journal of Biological Chemistry*.

Miallau, L., Faller, M., Chiang, J., Arbing, M., Guo, F., Cascio, D., & Eisenberg, D. (2009). Structure and proposed activity of a member of the VapBC family of toxin-antitoxin systems VapBC-5 from Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Biological Chemistry*, 284(1), 276-283.

Min, A. B., Miallau, L., Sawaya, M. R., Habel, J., Cascio, D., & Eisenberg, D. (2012). The crystal structure of the Rv0301-Rv0300 VapBC-3 toxin—antitoxin complex from M. tuberculosis reveals a Mg²⁺ ion in the active site and a putative RNA-binding site. *Protein Science*, 21(11), 1754-1767.

Mruk, I., & Kobayashi, I. (2013). To be or not to be: regulation of restriction–modification systems and other toxin–antitoxin systems. *Nucleic acids research*, 42(1), 70-86.

OMS: Repository for information sharing (IRIS). (1994). <http://apps.who.int/iris/handle/10665/58749>.

Pace, C. N., & Scholtz, J. M. (1997). Measuring the conformational stability of a protein. *Protein structure: A practical approach*, 2, 299-321.

Pagani. Functional studies and insights to the regulation of VpBC47 toxin-antitoxin system. *To be published*.

Poon, W. C. K. (1997). Crystallization of globular proteins. *Physical Review E*, 55(3), 3762.

Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005). pp. 571-607

Ramage, H. R., Connolly, L. E., & Cox, J. S. (2009). Comprehensive functional analysis of Mycobacterium tuberculosis toxin-antitoxin systems: implications for pathogenesis, stress responses, and evolution. *PLoS genetics*, 5(12), e1000767.

Ramage, H. R., Connolly, L. E., & Cox, J. S. (2009). Comprehensive functional analysis of Mycobacterium tuberculosis toxin-antitoxin systems: implications for pathogenesis, stress responses, and evolution. *PLoS genetics*, 5(12), e1000767.

Rao, M., Streur, T. L., Aldwell, F. E., & Cook, G. M. (2001). Intracellular pH regulation by Mycobacterium smegmatis and Mycobacterium bovis BCG. *Microbiology*, 147(4), 1017-1024.

Roy, M., Kundu, A., Bhunia, A., DasGupta, S., De, S., & Das, A. K. (2018). Structural characterization of VapB46 antitoxin from Mycobacterium tuberculosis: insights into VapB46-DNA binding. *The FEBS journal*.

Saida, F., Uzan, M., Odaert, B., & Bontems, F. (2006). Expression of highly toxic genes in E. coli: special strategies and genetic tools. *Current Protein and Peptide Science*, 7(1), 47-56.

Sawicki, M. (2012). SEDfit: Software for spectral energy distribution fitting of photometric data. *Publications of the Astronomical Society of the Pacific*, 124(921), 1208.

Simou, Evangelia and Britton, John and Leonardi-Bee, Jo (2018) *Alcohol consumption and the risk of tuberculosis: a systematic review and Meta-analysis*. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease . ISSN 1815-7920 (In Press)

Smith, P. E., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M., ... & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, 150(1), 76-85.

Steenken Jr, W., Oatway Jr, W. H., & Petroff, S. A. (1934). Biological studies of the tubercle bacillus: III. Dissociation and pathogenicity of the R and S variants of the human tubercle bacillus (H37). *The Journal of experimental medicine*, 60(4), 515.

Studier, F. W. (2014). Stable expression clones and auto-induction for protein production in E. coli. In *Structural Genomics* (pp. 17-32). Humana Press, Totowa, NJ.

Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger, P. H., Chakraborty, P., Haddix, P. L., Collins, H. L., Fok, A. K., ... & Russell, D. G. (1994). Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science*, 263(5147), 678-681.

T. Wirth, F. Hildebrand, C. Allix-Béguec, F. Wölbeling, T. Kubica, K. Kremer, D. van Soolingen, S. Rüsche-Gerdes, C. Locht, S. Brisse, A. Meyer, P. Supply, S. Niemann Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex.

Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American journal of infection control*, 34(5), S3-S10.

Walker, J. M. (2002). The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. In *The Protein Protocols Handbook* (pp. 11-14). Humana Press.

Wang, X., & Wood, T. K. (2011). Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell formation and the general stress response. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(16), 5577-5583.

Winther, K. S., & Gerdes, K. (2011). Enteric virulence associated protein VapC inhibits translation by cleavage of initiator tRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(18), 7403-7407.

Winther, K. S., Brodersen, D. E., Brown, A. K., & Gerdes, K. (2013). VapC20 of *Mycobacterium tuberculosis* cleaves the Sarcin–Ricin loop of 23S rRNA. *Nature communications*, 4, 2796.

Winther, K., Tree, J. J., Tollervey, D., & Gerdes, K. (2016). VapC of *Mycobacterium tuberculosis* cleave RNAs essential for translation. *Nucleic acids research*, 44(20), 9860-9871.

Wirth T, Hildebrand F, Allix-Béguec C, Wölbeling F, Kubica T, Kremer K, et al. (2008) Origin, Spread and Demography of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *PLoS Pathog* 4(9): e1000160. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000160>.

Zhao, H., Piszczek, G., & Schuck, P. (2015). SEDPHAT—a platform for global ITC analysis and global multi-method analysis of molecular interactions. *Methods*, 76, 137-148.