

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP  
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

MARIA LUIZA FERREIRA VICENTE

Estudo da Localização das Enzimas *epaB* e *epaE* de *Enterococcus*  
*faecalis* por Microscopia Confocal

São Carlos

2020



MARIA LUIZA FERREIRA VICENTE

Estudo da Localização das Enzimas *epaB* e *epaE* de *Enterococcus faecalis* por Microscopia Confocal

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Programa de Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Bacharel em Física Biomolecular.

Orientador: Alessandro Silva Nascimento

São Carlos

2020

# 1. Introdução

Desde a migração da população do campo para as cidades, doenças infecciosas tornaram-se problemas importantes na saúde pública, especialmente sob condições precárias de saneamento e higiene. No ano 1900 nos Estados Unidos, as três principais causas de morte eram pneumonia, tuberculose, diarreia e enterite, causando 1/3 das mortes daquele ano. (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 1999) Com a melhoria da saúde pública e, posteriormente, com a introdução da penicilina em 1940, a expectativa de vida aumentou em 29,2 anos. Do começo do século XX até o seu fim, a introdução de antibióticos e de outros fármacos foi uma das causas mais importantes para o aumento da expectativa de vida e da introdução da ciência na saúde pública. (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 1999)

Logo no fim do século XX, 1980-1990, notou-se que o ressurgimento da tuberculose e o aparecimento da AIDS aumentaram a taxa de mortalidade por doenças infecciosas, esse aumento, especialmente nos últimos 20 anos, tem sido associado a diversos fatores e a resistência a antibióticos tem sido listado como um fator importante (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 1999) De acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), desde 2013, o número de pessoas infectadas por bactérias multirresistentes em estado grave nos Estados Unidos por ano chega a 2 milhões, levando a 23.000 óbitos. (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2013) A resistência a antibióticos, considerada um dos desafios aos sistemas de saúde contemporâneos, causa 700 mil mortes por ano, globalmente, e pode chegar a 10 milhões de óbitos por ano em 2050, caso não haja políticas para resolver o problema. Esse novo número de óbitos para 2050 é maior do que o de pessoas que morrem de câncer atualmente. (SHANKAR, 2016)

Em conjunto com a OMS, 66 países estão monitorando e notificando a resistência a antibióticos nos dias de hoje (2020) e através desse monitoramento foi possível constatar que os tratamentos para infecções comuns, como infecções do trato urinário (ITU) ou algumas formas de diarreias, estão sofrendo com a alta taxa de resistência a antimicrobianos. As pesquisas sugerem que o mundo está ficando sem meios eficazes para combater essas doenças. (OMS, 2020) Desta forma, há uma necessidade constante de novos ciclos de descoberta de antibióticos, já que não é mais uma questão de “se” haverá resistência, mas “quando” haverá resistência. (WALSH; WENCEWICZ, 2014)

As consequências de infecções causadas por bactérias multirresistentes causam um impacto financeiro importante nos sistemas de saúde. Nos EUA, estima-se um impacto de US\$ 20 bilhões em

custos adicionais na saúde e US\$35 bilhões em custos sociais anualmente. (BUSH et al., 2011) De acordo com o economista britânico Jim O'Neill, os dez milhões de óbitos por ano que serão atribuídos à resistência antimicrobiana até 2050 gerarão um impacto econômico mundial de cem trilhões de dólares. (O'NEILL, 2015)

A combinação de antibióticos surge como uma alternativa à monoterapia tipicamente utilizada. Algumas estratégias para sensibilizar a parede de bactérias Gram-positivas, por exemplo, vem sendo avaliadas para que assim, os tratamentos com antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, sejam mais efetivos. (WALSH; WENCEWICZ, 2014) Por exemplo, a família das epimerases *MnaA* são essenciais para a biossíntese de ácidos teicóicos (WTA) da parede celular bacteriana de *staphylococci*. Após a inativação genética da *MnaA*, Mann e colaboradores mostraram que não há formação de biofilme bacteriano, o que foi suficiente para reduzir a MIC de 32 para 0,25  $\mu\text{g/ml}$  para o antibiótico imipenem. (MANN et al., 2016).

A parede celular de bactérias Gram-positivas é composta por glicopolímeros, como ácidos teicóicos, ligados aos peptídeoglicanos e tem como característica diferenciadora das bactérias Gram-negativas uma maior espessura. Muitas bactérias Gram-positivas têm a capacidade de formar biofilmes que conferem resistência a antibióticos. (MANN et al., 2016) Biofilmes maduros formam complexos compostos de polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos que permanecem em uma matriz extracelular, envolvendo as bactérias. Nessa configuração, os microrganismos podem tornar-se 1000 vezes mais resistentes e por isso estão associados a causa de 65% das infecções bacterianas. (DALE et al., 2017)

Um estudo da *Society for Healthcare Epidemiology of America* de 2013 registrou que patógenos do grupo *Enterococcus spp.* (Gram-positivos) são responsáveis por 14% das infecções associadas a sistemas de saúde e que conferem resistência antimicrobiana pelo relato de 2039 hospitais. (SIEVERT et al., 2013) Segundo a ANVISA, existem 14 espécies de *Enterococcus* descritas, normalmente encontradas no intestino e no trato genital feminino, sendo *E. faecalis* e *E. faecium* as que geralmente promovem colonização e infecções em humanos como ITU, infecções da corrente sanguínea (ICS) e infecções de sítio cirúrgico e intra-abdominais. *E. faecalis* constitui de 85% a 95% dos *Enterococcus spp.* identificados, e, além de sua resistência intrínseca aos antimicrobianos comumente utilizados, também adquiriu resistência a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. (ANVISA, 2007, 2008)

Em especial, os polissacarídeos são um importante fator de virulência especialmente de *Enterococcus spp.* Além de estarem presentes na parede celular dessa bactéria, essas unidades

repetitivas de oligossacarídeos, podem ser associados a biofilmes e desempenham um importante papel na adesão e invasão de tecidos hospedeiros, entre outros fatores de virulência. (TENGG et al., 2009) Fang e colaboradores identificaram um grupo de genes envolvidos na biossíntese de polissacarídeos de *E. faecalis*, agrupados em um *cluster* denominado “*epa*” (do inglês - *enterococcal polysaccharide antigen*). Com essa identificação, é possível estudar os mecanismos envolvidos na síntese de polissacarídeos e avaliar a possibilidade de interrupção desta síntese, alterando a capacidade de formação de biofilmes e outras virulências de *Enterococcus faecalis*. (TENGG et al., 2009)

Dale e colaboradores realizaram a caracterização de duas glicosiltransferases (GT) em meio ao *cluster epa*, envolvidas na formação de biofilmes na presença de antibióticos. Os autores demonstraram que a deleção do gene *epaOX* resulta em um decréscimo de 60% na biomassa do biofilme na presença do antibiótico gentamicina. (DALE et al., 2015) Mais ainda, a deleção do gene *epaI* ou de *epaOX* resultou em maior suscetibilidade das células planctônicas a concentrações de daptomicina que eram sub-inibitórias à cepa mãe, mostrando como os genes de interesse influenciam na virulência das células. (DALE et al., 2015, 2017) A glicosiltransferase (GT) *epaB* e a glicose-1-fosfato timidiltransferase *epaE*, presentes no *cluster epa*, foram identificadas por Fang e colaboradores como parte responsável pela formação de biofilme, translocação, resistência à morte de leucócitos polimorfonucleares (PMN) e virulência em um modelo de peritonite de camundongo, em cepas de *E. faecalis*.(TENGG et al., 2009)

Com a deleção desses genes citados acima presentes no *cluster epa*, foi possível identificar proteínas importantes na biossíntese de biofilmes de *E. faecalis*. Essas novas proteínas de interesse passam a ser alvo de estudos para combinação de antibióticos, como citado para *MnaA* de *S. aureus*, utilizados no tratamento das infecções causadas por *E. faecalis*. (TENGG et al., 2009; DALE et al., 2015, 2017)

Embora as funções destas enzimas tenham sido inferidas pelas sequências, cabe salientar que aspectos fundamentais dessas proteínas ainda são desconhecidos, como suas estruturas tridimensionais e localização celular. (DALE et al., 2015, 2017) Sabe-se que algumas GTs de vias similares em *S. aureus* encontram-se aderidas à membrana enquanto outras, na mesma via, são proteína integrais de membrana. Já as glicose-1-fosfato timidiltransferases (*epaE*, RmlA ou RfbA), são usualmente proteínas citosólicas e são responsáveis por catalisar a formação de dTDP-L-ramnose, a partir de dTTP e glicose 1-fosfato. Diversas bactérias dos gêneros *Streptococcus* e *Enterococcus*,

por exemplo, utilizam L-ramnose em sua parede celular ou cápsula. Estes organismos contem o que se denomina *rhamnose-containing cell wall polysaccharide* ou *RhACWP*.

Tentativas iniciais de expressão de algumas enzimas do cluster *epa* de *E. faecalis* realizados no grupo do prof. Alessandro Nascimento mostraram que diversas glicosiltransferases (GTs) são muito insolúveis (LAIRSON et al., 2008). Como não há enzimas de alta similaridade com estrutura conhecida, imaginamos que algumas destas enzimas possam estar associadas à membrana, embora não haja na literatura nenhuma informação sobre a localização celular destas enzimas e a predição baseada na sequência das enzimas não indique que se trata de proteínas de membrana. Entendemos que o estudo da localização celular das enzimas do cluster é de suma importância para nortear estudos estruturais futuros e estratégias de expressão/purificação destas enzimas. Este projeto tem, portanto, como objetivos principais o estudo da localização destas enzimas em células bacterianas. Adicionalmente, planejamos a expressão e purificação de duas enzimas do cluster: *epaB* (GT) e *epaE* (RmlA).

## 2. Metodologia

### 2.1 Clonagens:

Com a intenção de fusionar as proteínas *epas* de interesse à GFP (*Green fluorescent protein*) para posterior visualização em microscopia confocal, o primeiro passo foi testar dois métodos de clonagem diferentes, *Gibson Assembly* e a Clonagem Independente do Ligante (do inglês *Ligase Independent Cloning* - LIC) em vetores de expressão que possuem a proteína GFP como proteína de fusão.

#### 2.1.1 Gibson Assembly

A clonagem utilizando o método Gibson Assembly consiste na inserção do gene de interesse, realizada em condições isotérmicas, através da atividade de três enzimas: exonuclease 5', DNA polimerase e DNA ligase. Esse método deve ser mais rápido e mais eficiente que outros métodos de clonagem, não utiliza enzimas de restrição no protocolo e parte da ideia de juntar vários fragmentos de DNA em um. Essas foram as razões que nos fizeram escolher testar essa técnica. (GIBSON et al., 2009)

Planejou-se a montagem do vetor pRSET-natTEVGFPHis: TEV (*Tobacco Etch Virus*) + GFP + 6xHis para inserção do gene de interesse, podemos ver seu mapa a esquerda na Figura 1, para que assim pudéssemos fusionar a proteína de interesse a GFP, além de um sítio de TEV (*Tobacco Etch Virus*) e cauda de histidina para posterior clivagem das proteínas e afinidade com coluna de resina de níquel respectivamente. O vetor foi linearizado por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

Os *primers forward* e *reverse* do vetor e dos genes escolhidos foram desenhados utilizando a ferramenta *NeBuilder*®, inicialmente para a enzima *epaI*, e prosseguiu-se com teste de clonagem. Toda reação foi realizada seguindo um protocolo modificado do protocolo publicado pela Nature (GIBSON et al., 2009) e realizado pela doutoranda Livia Clementino em conjunto com a técnica Livia Manzine. (SAMUEL MILLER LAB, UW, 2011)

### 2.1.2 Clonagem LIC

No processo de LIC, a atividade da T4 DNA polimerase do sentido 3' para o 5' cria uma fita simples de DNA específica para sobreposição, e assim, produtos de PCR feito com *primers* que complementam a sobreposição dos vetores, são também tratados com a T4 DNA polimerase e a reação de ligação se dá sem a necessidade de ligases. O protocolo empregado é baseado no protocolo desenvolvido pelo grupo em publicado previamente (CAMILO; POLIKARPOV, 2014)

Para essa estratégia empregou-se o vetor pLIC-EGFP que contém o sítio de inserção, seguido de sítio de clivagem para TEV e depois o gene EGFP (*enhanced-GFP*) fusionado à cauda de histidina, o mapa desse vetor pode ser observado na Figura 1 a direita.

O vetor e as proteínas foram linearizados por PCR e os *primers* foram desenhados utilizando a ferramenta online HTP-OligoDesigner (<http://www.ifsc.usp.br/htpoligo/>) (CAMILO et al., 2016). Todo procedimento foi realizado pela técnica Livia Manzine. O tratamento foi feito com dGTP para o vetor e dCTP para o inserto, incubado a uma temperatura de 54°C, como descrito por Camilo & Polikarpov. (CAMILO; POLIKARPOV, 2014)

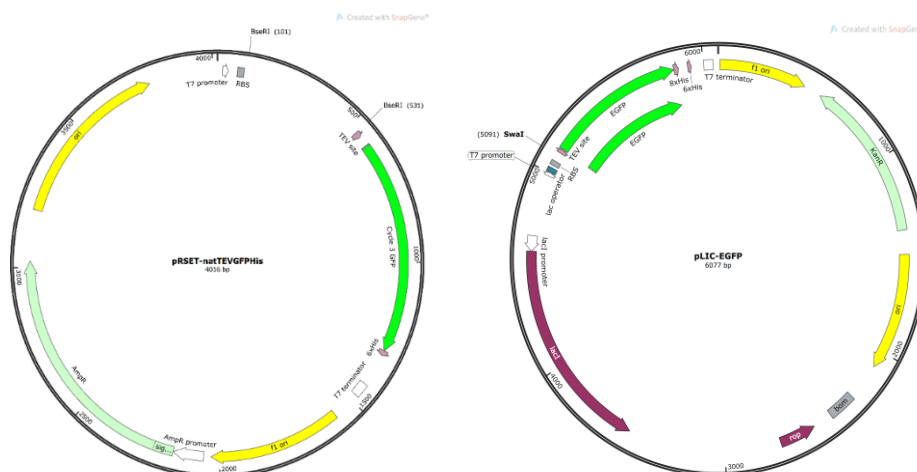


Figura 1. a) Mapa do vetor pRSET-natTEVGFPHis: Sítio de inserção, promotor T7, resistência a Ampicilina, Sítio de clivagem TEV (Tobacco Etch Virus), GFP e cauda de histidina. b) Mapa do vetor pLIC-EGFP: Sítio de inserção, promotor lacI, resistência a Kanamicina, Sítio de clivagem TEV (Tobacco Etch Virus), EGFP e cauda de histidina.



Os vetores foram usados para a transformação de *E.coli* DH5- $\alpha$  e posteriormente em células competentes para expressão *E.coli* (Rosetta DE3) e *Arctics Express*, por choque térmico. (CAMILO; POLIKARPOV, 2014)

## 2.2 Expressão Heteróloga e Lise:

As proteínas *epaB* e *epaE* foram expressas em *E. coli* Rosetta (DE3) utilizando 100 ml de meio LB, com adição de 50  $\mu\text{g/ml}$  do antibiótico Kanamicina e 10  $\mu\text{g/ml}$  do antibiótico Cloranfenicol ao meio. A expressão foi induzida com 0,5mM de isopropil- $\beta$ -D-galactosídeo (IPTG) após atingir um valor de  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  no intervalo de 0,5-0,7 do meio em crescimento, com tempo de expressão de 18h a uma temperatura pós indução de 18°C e também, em experimento concomitante, com uma temperatura pós indução de 25°C. Os pellets foram recuperados por centrifugação a uma velocidade de 7878 x g por 30 minutos a 4°C.

Além disso, essas proteínas foram expressas em *Arctics Express*, crescidas em 100 ml de meio LB com adição de 50 $\mu\text{g/ml}$  do antibiótico Kanamicina e 34  $\mu\text{g/ml}$  do antibiótico Gentamicina ao meio, induzindo a expressão com 0,5mM de IPTG após D.O de 0,6 em 600nm do meio em crescimento. Após chegar à  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  desejada, deixou-se o meio 10 minutos a 11°C antes da indução, a expressão foi de 18h a uma temperatura pós indução de 13°C.

Após a coleta por centrifugação, as células foram suspensas em 5 mL de tampão de lise, 200Mm NaCl, 50Mm Tris-HCl (pH 8.0) e, após 30 minutos de repouso no gelo, foi realizada a sonicação com amplitude de 20%, 30s on-30s off, até que o líquido viscoso ficasse transparente. Em seguida centrifugou-se a solução a 16000 x g por 40 min a 4°C.

As frações solúveis e insolúveis das enzimas de interesse expressas foram separadas e uma amostra de cada fração foi aplicada a um gel SDS-PAGE 12% para visualização. A construção proteína com a fusão possui massa molecular de 60,818 kDa para *epaE*, coeficiente de extinção de 52720 L/mol.cm; e massa molecular de 59,725 kDa para *epaB* com coeficiente de extinção 55240 L/mol.cm.

## 2.3 Medidas de fluorescência:

A GFP (do inglês – *Green fluorescent protein*) é capaz de ser incorporada a outras proteínas em organismos vivos como biomarcador e hoje é amplamente utilizada em estudos biotecnológicos e biomédicos. Ao ser irradiada por luz na faixa do azul (485nm), emite uma fluorescência na região do verde (509nm) e não requer nenhum aditivo adicional para a emissão do sinal fluorescente. (FARIAS, 2009)

O procedimento para as medidas de fluorescência da GFP foi realizado tanto para células inteiras como para porções solúvel e insolúvel dos lisados celulares. Essas medidas foram feitas utilizando tampão de lise como o *branco* (50mM Tris-HCl, 200mM NaCl, pH 8.00), no fluorímetro Infinite® F200 Microplate Reader, excitando as amostras em 480nm. As amostras foram colocadas em placas multipoços de leitura, preenchidos com 200µl. Para as medidas de células inteiras, o meio após a expressão overnight foi padronizado em relação a quantidade de células por medida de absorbância. No caso, todos os meios obtinham uma DO<sub>600nm</sub> de 1,4.

## 2.5 Microscopia Confocal:

Para visualização no microscópio óptico de fluorescência confocal foram expressas as proteínas *epaE* e *epaB* em *E. coli* (Rosetta) usando 50mL de meio LB a uma temperatura pós indução de 18°C, condições do resultado do teste de expressão feito anteriormente.

A preparação da amostra foi feita com 1 mL do meio, após a expressão, diluído 10x para que sua medida de DO<sub>600nm</sub> chegasse a 0,1. Como na curva de crescimento para *E. coli* em relação a absorbância, isso corresponderia a um número pequeno o suficiente de células planctônicas presente em uma gota (1cm<sup>3</sup>) e não houvesse sobreposição destas células para serem visualizadas corretamente. (JÚNIOR, 2020) Após a diluição, o meio foi centrifugado a 10000 x g por 10 minutos e lavado com PBS, esse procedimento foi repetido 3 vezes.

As imagens foram obtidas com uma lente 63x; 1,2NA; wd = 0,2mm (óleo), após a excitação das amostras em (488nm) com laser de Argônio. Com o software ZEN® foi possível analisar as medidas de fluorescência nas regiões (i) dentro das células, (ii) membrana celular, (iii) PBS, e um gráfico específico de cada enzima *epaE* e *epaB* foi plotado para nos mostrar a região de maior emissão de fluorescência detectada (500 – 695nm).

## 3. Resultados e Discussões

### 3.1 Clonagem e Expressão

A estratégia de clonagem empregada neste trabalho envolveu o uso da proteína GFP como fusão nas enzimas-alvo. Os vetores empregados anexam a GFP à porção C-terminal da proteína-alvo e, nesta construção, a proteína GFP possui uma mutação que garante que esta somente se enovelaria se a proteína na porção N-terminal também estiver enovelada (BRUCE ALBERTS, MARTIN RAFF, JULIAN LEWIS, KEITH ROBERTS, JAMES WATSON, 2017). Desta forma, a fluorescência funciona como um repórter do correto enovelamento da proteína alvo.

Os dois métodos utilizados para realizar essa clonagem, Gibson Assembly e LIC, foram testados separadamente. A clonagem através do método de Gibson Assembly inseriu os genes das

enzimas *epaI* e de sua construção truncada *epaI*<sup>130</sup> no vetor pRSET-natTEVGFPHis. A clonagem por LIC utilizou o vetor pLIC-EGFP que recebeu os insertos das enzimas *epaE* e *epaB* em sua construção.

A transformação em células DH5- $\alpha$  foi realizada para replicação dos vetores com seus insertos (pRSET-natTEVGFPHis e pLIC-EGFP), e por fim, a transformação em células de *E. coli* (Rosetta) e *Arctics Express* foi realizada para testes de expressão posteriores. Os testes iniciais de expressão foram feitos tanto para as enzimas *epaI* e *epaI*<sup>130</sup> inseridas em pRSET-natTEVGFPHis, como para os vetores pLIC-EGFP e pET-Trx1a fechados (sem inserto), todos os vetores expressam GFP em sua construção.

Medidas de fluorescência de célula inteira (*whole cell fluorescence*) foram realizadas para identificar a fluorescência da GFP enovelada resultante das expressões anteriormente citadas. Como controle negativo foi utilizado uma proteína de fácil expressão inserida em pET-Trx1a no sítio de expressão da GFP. Os dados coletados foram representados no gráfico abaixo:

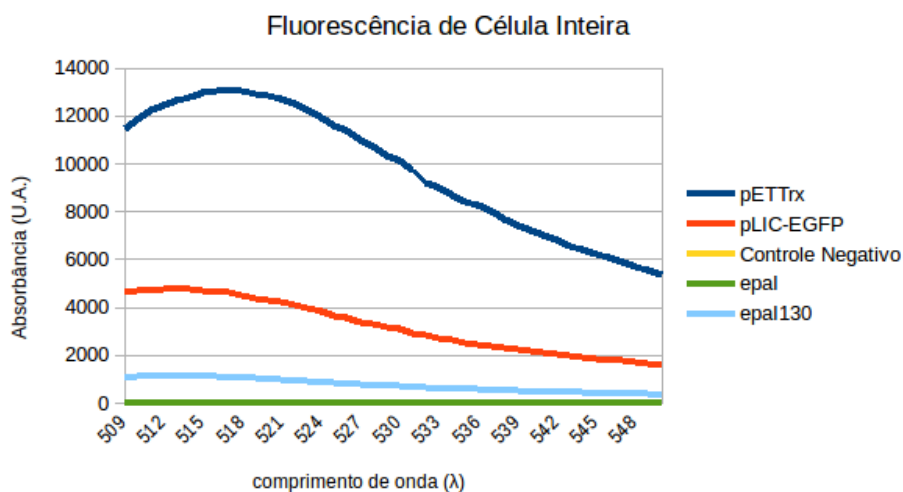


Figura 2. Gráfico de fluorescência de célula inteira, excitado em 485nm. Vetor fechado pET-Trx1a, vetor fechado pLIC-EGFP, proteína expressa inserida em pET-Trx1a no sítio da GFP, *epaI* inserida em pRSET-natTEVGFPHis, *epaI*<sup>130</sup> inserida em pET-Trx1a.

Do gráfico (Figura 2), percebemos que a proteína *epaI* inserida em pRSET-natTEVGFPHis não emite sinal significativo de fluorescência. O mesmo pode ser dito para a construção truncada *epaI*<sup>130</sup>, que apresenta uma pequena fluorescência na faixa 509nm – 530nm. Podemos observar nesse gráfico ainda que o vetor pET-Trx1a detém a maior intensidade de fluorescência em 515nm. No lugar de inserção do gene de interesse, temos a presença da GFP que ao ser excitada em 485nm emite em ~509nm. Desta forma, esta expressão funciona como um controle positivo. Logo abaixo vemos um pico em 515nm do vetor pLIC-EGFP fechado, chegando à conclusão de que a GFP foi expressa.

A diferença de intensidade entre o controle positivo e o vetor pLIC-EGFP pode indicar uma menor eficiência de expressão do vetor pLIC-EGFP em relação ao vetor pET-Trx1a. Contudo, o experimento demonstra a possibilidade de acompanhar a expressão em célula inteira, quando o vetor pLIC-EGFP é empregado. Já para o vetor pRSET-natTEVGFPHis, uma baixa intensidade de fluorescência foi observada, sugerindo uma baixa (ou ausência de) expressão ou a falta de expressão corretamente enovelada da enzima alvo. Como um teste adicional, o vetor fechado, como adquirido da empresa DNASU também não mostrou expressão da enzima com a fusão fluorescente. Desta forma, os testes com este vetor foram abandonados e os experimentos posteriores foram realizados apenas com o vetor pLIC-EGFP.

Prosseguiu-se com os testes de expressão das enzimas *epaE* e *epaB* em vetor pLIC-EGFP em 3 diferentes condições: cepa Rosetta a uma temperatura de expressão (pós-indução) de 18°C, cepa Rosetta a uma temperatura de expressão (pós-indução) de 25°C e cepa *Arctics Express* a uma temperatura de expressão (pós-indução) de 13°C. Os resultados podem ser vistos tanto nos géis de SDS-PAGE 12% abaixo, como nos gráficos de medida de fluorescência da GFP em células inteiras.

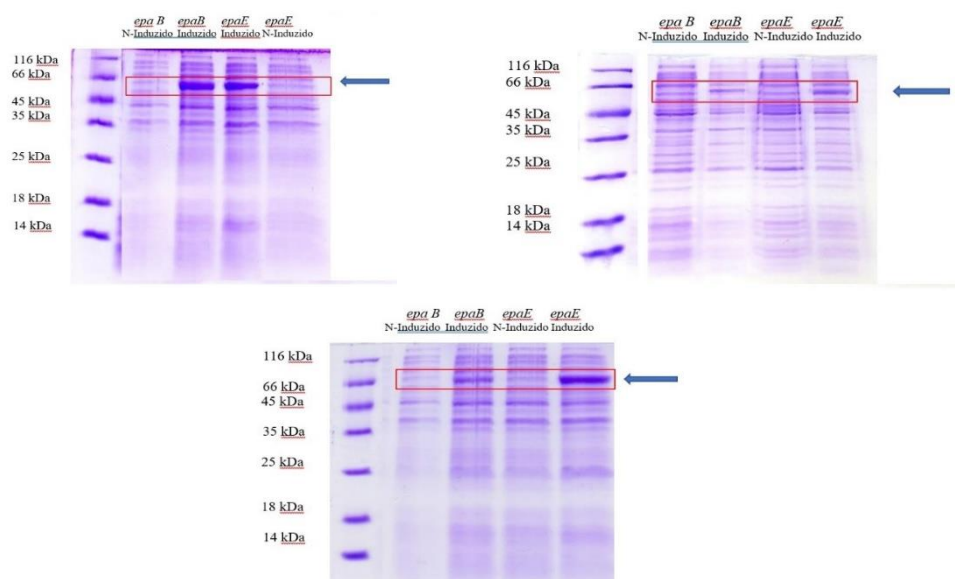


Figura 3. a) Gel de expressão *epaB* e *epaE* em *Arctics Express*, SDS-PAGE 12%, amostras: LMW; *epaB* não induzida; *epaB* induzida; *epaE* induzida; *epaE* não induzida. b) Gel de expressão *epaB* e *epaE* em cepa Rosetta a 18°C, SDS-PAGE 12%, amostras: LMW; *epaB* não induzida; *epaB* induzida; *epaE* não induzida; *epaE* induzida. c) Gel de expressão *epaB* e *epaE* em cepa Rosetta a 25°C, SDS-PAGE 12%, amostras: LMW; *epaB* não induzida; *epaB* induzida; *epaE* não induzida; *epaE* induzida.

Nos três casos, uma fração de células foi retirada do meio de cultura, fervida e aplicada diretamente no gel, sem a separação de frações solúvel e insolúvel. É importante ressaltar que as amostras foram normalizadas por absorvância ( $DO_{600nm}$ ) antes de serem aplicadas, na tentativa de

manter uma quantidade padrão de células para uma comparação mais precisa da quantidade de proteínas expressas em cada condição.

Observando os géis (Figura 3) podemos constatar que a proteína *epaE* foi mais expressa em quase todas as condições do que a *epaB*. Para *epaE* a expressão parece ter sido mais elevada em cepa Rosetta a 25°C enquanto que, para a *epaB*, a melhor condição observada foi em *Arctics Express*, seguido da cepa Rosetta a 25°C.

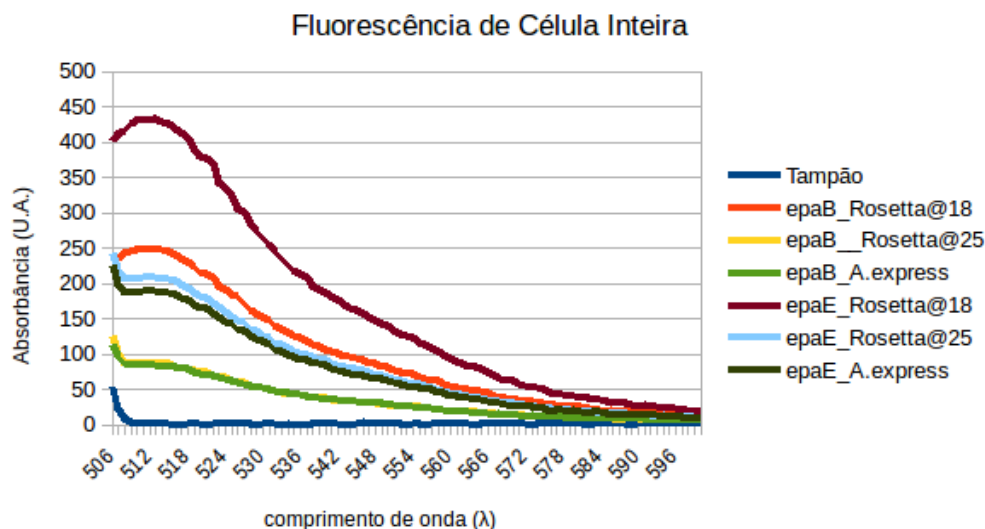


Figura 4. Gráfico de fluorescência de célula inteira (absorbância x comprimento de onda (nm)), amostras excitadas em 485nm. Tampão de lise pH 7.0, *epaB* expressa em cepa Rosetta a 18°C e 25°C, *epaB* expressa em *Arctics Express*, *epaE* expressa em cepa Rosetta a 18°C e 25°C, *epaE* expressa em *Arctics Express*.

Como a fusão fluorescente foi empregada, a análise pode também ser feita usando a intensidade de fluorescência das células antes da lise. Pelo gráfico de emissão de fluorescência (Figura 4), as maiores expressões são de *epaE* em cepa Rosetta a 18°C e *epaB* em cepa Rosetta a 18°C.

Uma justificativa para discrepância dos resultados acima no gráfico de fluorescência e nos géis de agarose pode ser de que as proteínas *epaE* e *epaB* expressas em cepa Rosetta a 25°C e em *Arctics Express* não foram enoveladas por completo, resultando assim na perda de fluorescência da GFP já que ela apenas se enovelaria caso a proteína de interesse fusionada fosse enovelada. Como no gel as amostras a serem aplicadas são desenoveladas, o motivo da diferença torna-se plausível.

Baseando nossos progressos nos maiores picos de emissão em ~509nm das medidas de fluorescência de células inteiras, prosseguimos os experimentos com as células transformadas em cepa Rosetta das clonagens LIC, com as proteínas *epaE* e *epaB* inseridas no vetor pLIC-EGFP. As

condições de expressão a serem utilizadas incluem a temperatura após indução de 18°C para nossas células de cepa Rosetta. Através dessas conclusões obtivemos ótimas condições de expressão para visualização das proteínas na microscopia óptica de fluorescência confocal.

### 3.2 Microscopia Confocal

Os experimentos de microscopia confocal foram realizados nas condições de expressão onde foram observadas as fluorescências mais altas, uma vez que o intuito do trabalho incluía a visualização das proteínas em sua localização celular através da fluorescência da GFP. A visualização em microscopia confocal foi possível a partir da excitação da GFP fusionada as proteínas em 488nm. Vemos através das imagens abaixo (Figura 5) que o comprimento de onda de emissão mais intenso foi entre 504nm – 531nm, como esperado para a fusão com GFP.

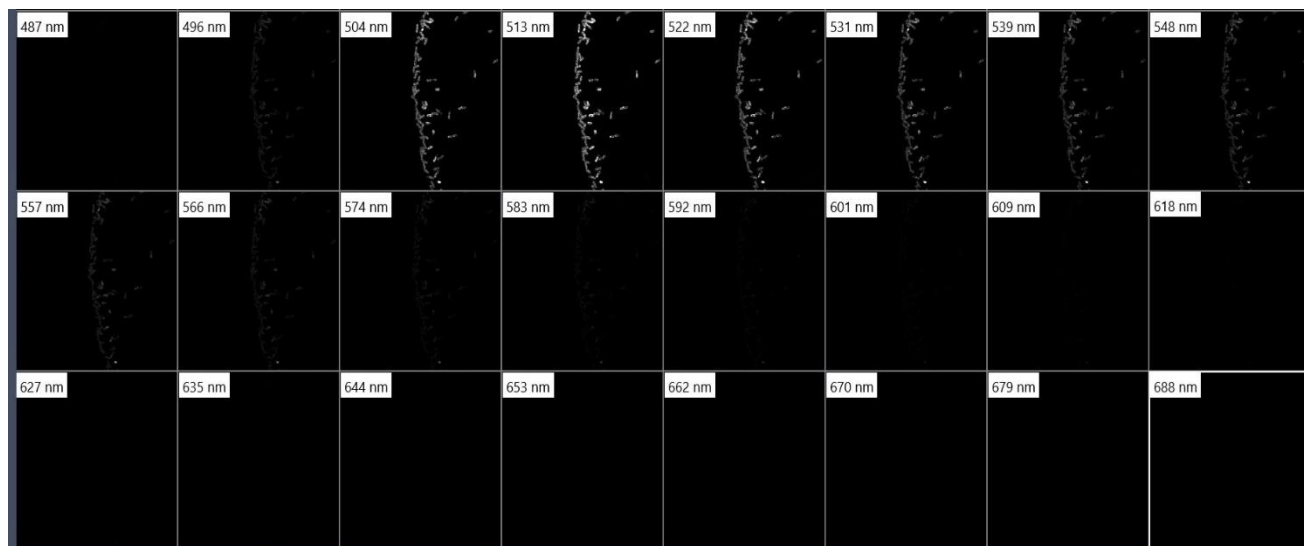


Figura 5. Imagens obtidas com microscopia óptica de fluorescência confocal, excitadas em 488nm, intervalo de emissão 500nm-695nm. *epaB* + GFP em *E. coli*.

O detector utilizado captura a emissão dos comprimentos de onda entre 500nm – 695nm e os valores de intensidade referem-se a soma dos valores de intensidade nesta faixa espectral. Como pode ser visto pela imagem acima (Figura 6), o que representa a maior intensidade de fluorescência visual fica no intervalo de 504nm – 531nm, como da GFP excitada em 488nm, por isso podemos dizer que identificamos a GFP no corpo celular da *E. coli* fusionadas a *epaB* e a *epaE*, conseqüentemente, podemos dizer que identificamos a posição dessa proteínas.

A Figura 6 mostra as enzimas *epaB* (a esquerda) e *epaE* (a direita) fusionadas à GFP. A amostra foi excitada em 488nm e, por conta da boa resolução (1024 x 1024) das imagens numa aproximação de 63x, é possível ver suas localizações celulares em *E. coli*.

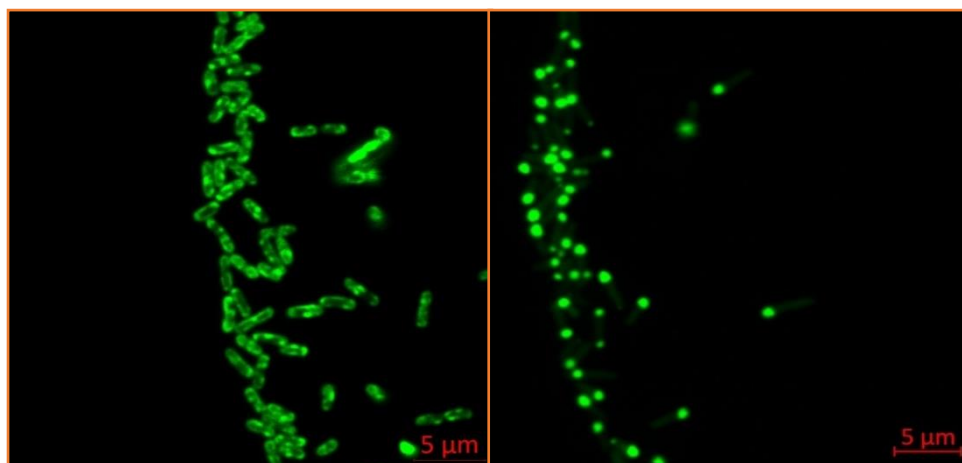


Figura 6. Imagens obtidas com microscopia óptica de fluorescência confocal, excitadas em 488nm, intervalo de emissão 500nm-695nm. A esquerda *epaB* + GFP em *E. coli*, a direita, *epaE* + GFP em *E. coli*.

Nas diferenças das localizações celulares das proteínas, contemplando nossas expectativas, pode-se observar que a *epaB* está localizada na região da membrana celular, já a *epaE* está concentrada em um lugar desconhecido do citosol, mas também, espalhada por ele.

Através do software ZEN® (*blue edition*), regiões de interesse foram demarcadas nas imagens acima. Marcou-se as regiões de membrana e citosólica de exemplos de células de cada imagem e cada região revelou um valor médio de intensidade de fluorescência emitida.

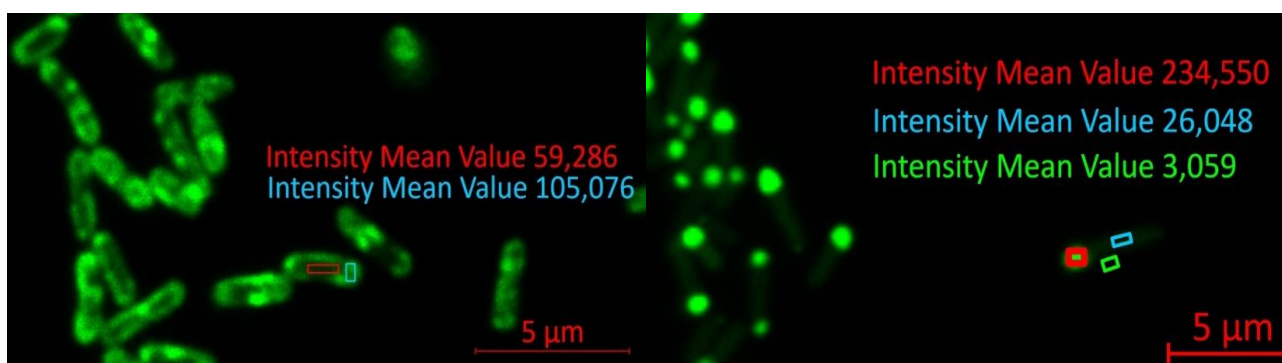


Figura 7. Imagens obtidas com microscopia óptica de fluorescência confocal, excitadas em 488nm, intervalo de emissão 500nm-695nm. Acima *epaB* + GFP em *E. coli*, regiões demarcadas: azul – membrana, vermelho - citosol, abaixo, *epaE* + GFP em *E. coli*, regiões demarca demarcadas: azul – citosol (i), vermelho – citosol (ii), verde – membrana.

Esses valores confirmaram os dados visualizados anteriormente quanto à localização celular das enzimas: para *epaB* a região da membrana apresenta a maior intensidade média, aproximadamente 105,076, quase duas vezes maior do valor apresentado na média do interior da

célula, demarcado pelo retângulo vermelho com um valor da média de 60 (Figura 7). Este dado indica claramente que a *epaB* concentra-se na membrana celular da *E. coli*.

Para *epaE* vemos que a região com maior valor de intensidade média é o retângulo vermelho localizado no interior celular onde visualizamos maior intensidade de fluorescência, sendo praticamente 10 vezes maior do que em outras regiões do citosol (retângulo azul) e 100x maior do que seria a região da membrana celular (retângulo verde), como mostrado na Figura 8. Conclui-se pelas informações obtidas que a enzima *epaE* concentra-se em um lugar desconhecido do citosol.

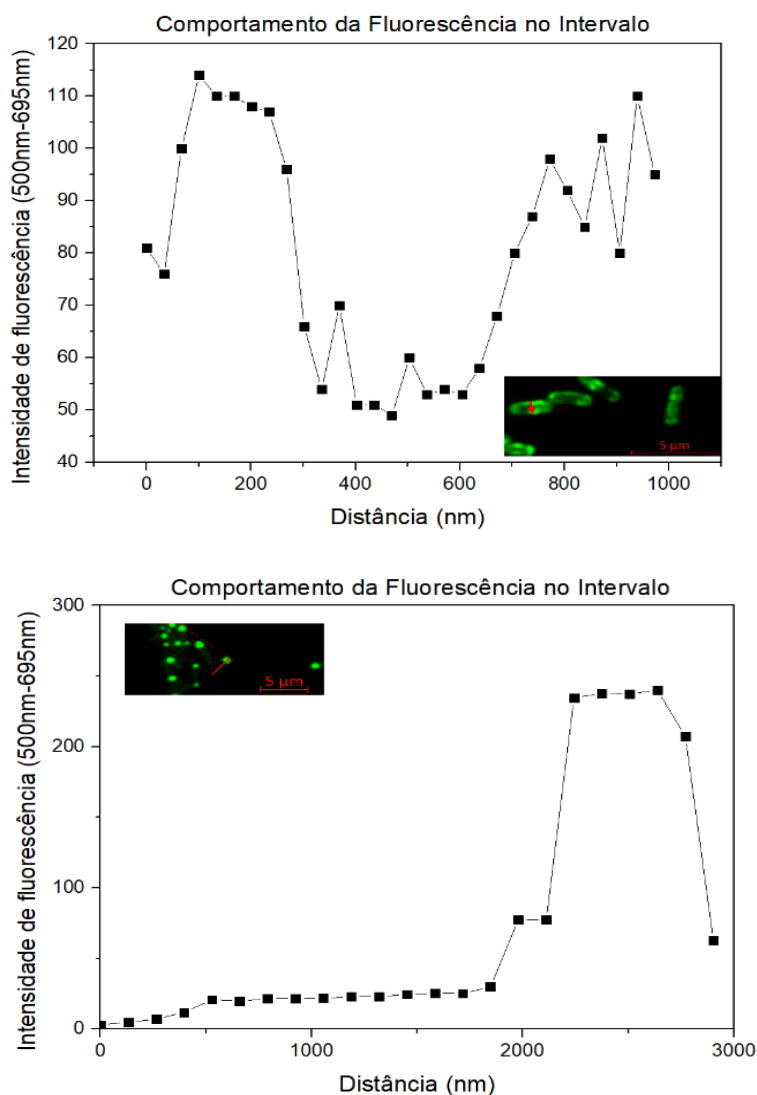


Figura 8. Gráficos de intensidade de fluorescência no intervalo 500nm-695nm por distância demarcada na célula. a) *epaB* + GFP em *E. coli*; b) *epaE* + GFP em *E. coli*.

Além de demarcar regiões, também foi possível utilizando o software ZEN® *blue edition*, recolher dados de intensidade de fluorescência por distância. Essa distância determinada por uma



“seta” previamente desenhada em cada imagem da Figura 6, pode mostrar o comportamento da fluorescência, ou seja, a localização celular pontual das proteínas através de um *eixo* da célula.

O comportamento da fluorescência da *epaB* fusão com GFP nos pontos da seta representada em uma célula de *E. coli* mostrados na Figura 8 acima revela um vale onde seria o citosol da célula e picos na região de membrana, mesmo que não seja visivelmente esclarecedor apenas com a imagem, esses valores mostram um acúmulo de nossa proteína *epaB* na região de membrana celular.

Semelhante ao que observamos apenas visualmente, o gráfico para o comportamento da fluorescência da *epaE* fusão com GFP nos pontos da seta mostrados na Figura 8 acima mostra um pico em uma região específica do citosol e uma fluorescência menor ao longo dele, iniciando-se do zero. Novamente concluiu-se um acúmulo da proteína numa região específica do citosol.

As informações obtidas das análises das imagens feitas em microscópio óptico de fluorescência confocal com o auxílio do software ZEN® *blue edition* caracterizam previamente a proteína *epaB* como uma proteína de região que ocorre próxima ou aderida à membrana. Esperamos, portanto, uma menor solubilidade desta, contudo não é possível dizer com os dados obtidos se a enzima *epaB* é uma proteína associada a membrana ou integral de membrana.

Caracterizamos também a *epaE* como uma proteína citosólica, embora mais presente em uma região específica desconhecida do citosol, ela também está presente ao longo deste e não apresenta fluorescência na região da membrana celular. Esperamos que a *epaE* seja uma proteína mais solúvel.

### 3.3 Lise

Com as conclusões da microscopia seguimos para um teste de lise seguindo as mesmas condições de expressão utilizadas ao longo dos experimentos anteriores afim de comparação das hipóteses com os resultados a serem obtidos. As lises de ambas as proteínas foram feitas conforme descrito nos métodos desse trabalho. Alíquotas de 200µl de amostras das frações solúvel e insolúvel foram excitadas em 485nm a fim de obter valores de fluorescência da GFP, esses valores foram organizados no gráfico (Figura 9).

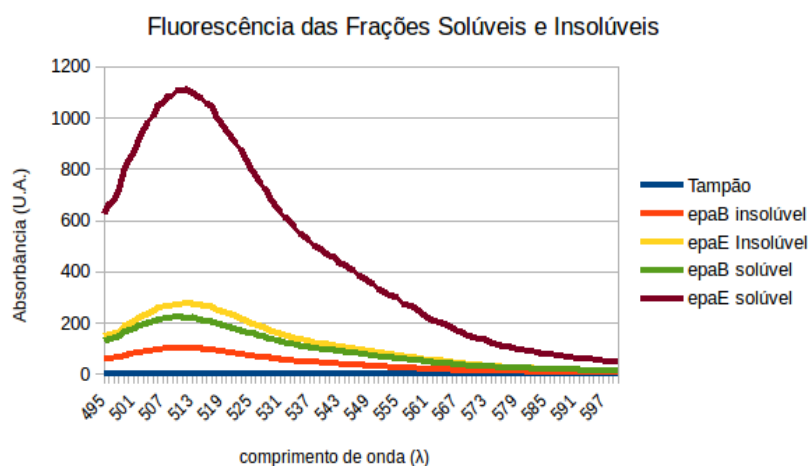


Figura 9. Gráfico de fluorescência das frações solúveis e insolúveis das proteínas *epaB* e *epaE* anteriormente expressas em Rosetta 18°C, comprimento de onda de excitação em 485nm.

A partir do gráfico acima, vemos, qualitativamente, que a GFP está mais presente na fração solúvel da *epaE* do que na fração insolúvel, indicando assim que uma parte considerável da proteína é solúvel e poderemos seguir com ele para as etapas de purificação. Uma relação simples entre as intensidades máximas revela que há entre 3 a 4 vezes mais proteína na fração solúvel do que na fração insolúvel. Já a enzima *epaB* não apresenta fluorescência elevada. Adicionalmente, a relação de proteína nas frações solúvel/insolúvel é praticamente 1, indicando que boa parte da proteína não é recuperada quando a lise celular é feita nas condições experimentais empregadas neste trabalho. Em concordância com outros experimentos já realizados no grupo, concluímos, portanto, que a enzima é pouco solúvel, o que dificulta bastante etapas posteriores de purificação.

Na imagem abaixo (Figura 10) temos uma caracterização qualitativa e visual da solubilidade das proteínas através da emissão visível da fusão GFP. Quase não vemos diferença da fluorescência dos pellets, mas conseguimos ver que há emissão neles. Já as frações solúveis mostram uma diferença marcante na intensidade da emissão na amostra. Vemos que a *epaE* possui uma cor verde fluorescente intensa enquanto na *epaB* a intensidade é consideravelmente mais baixa, indicando novamente a baixa solubilidade desta enzima.

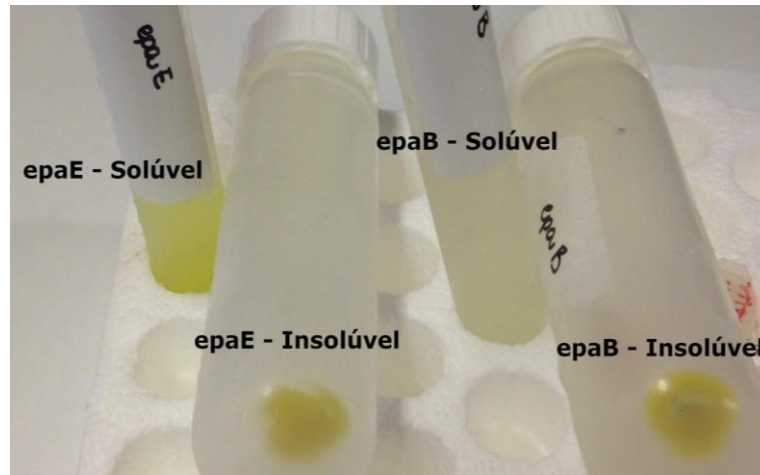


Figura 10: Frascos contendo parte solúvel e insolúvel de *epaE* e *epaB*, contraste entre fluorescência visível a olho.

#### 4. Conclusões:

Esse trabalho tinha como objetivo visualizar a localização celular das proteínas *epaB* e *epaE*, utilizando o microscópio óptico de fluorescência confocal e a fluorescência da GFP fusionada as proteínas de interesse, tornando possível obter mais informações através de suas localizações, que serão úteis para posteriores etapas do processo de descoberta e caracterização das proteínas.

Através da visualização de ambas as proteínas pudemos constatar que a *epaB* estaria mais presente na membrana celular de *E. coli* remetendo a uma menor solubilidade desta, caracterizando-a como uma proteína integral ou associada a membrana. Através de experimentos de lise celular foi possível observar, novamente com o auxílio da fluorescência da GFP, a insolubilidade dessa proteína. As estratégias a serem tomadas para caracterização biofísica e bioquímica da *epaB* deve incluir o fator de ser uma proteína de membrana e pouco solúvel, podemos aplicar os resultados para outras GTs.

A visualização da *epaE* revelou que a glicose-1-fosfato timidiltransferase é uma proteína citosólica, embora esteja acumulada em uma região desconhecida do citosol da *E. coli*, também está presente ao longo do resto dele. Sendo caracterizada como uma proteína solúvel, os testes de lise revelaram o acerto das conclusões obtidas através da visualização. É possível utilizar dessa característica para seguir com os experimentos para essa proteína e até mesmo para outras glicose-1-fosfato timidiltransferases.

## 5. Atividades Interrompidas por Conta da Pandemia da COVID-19

Por conta da pandemia causada pelo vírus SARS-Cov-2 as atividades em laboratório foram interrompidas no mês de março do ano de 2020. Nesse período o projeto ainda estava em fase experimental e teve de ser interrompido.

Como proposta para os meses de março e abril havíamos planejado experimentos para prosseguir com a purificação da *epaE*, desde sua cromatografia por afinidade, passando pela clivagem com TEV e seguindo para purificação em cromatografia por exclusão de tamanho. Ao serem completadas essas etapas, teríamos respostas quanto sua afinidade com a coluna de Ni<sup>2+</sup>, clivagem com TEV e também poderíamos seguir para alguns testes de atividade enzimática. Para a *epaB* planejávamos tentar uma abordagem inusitada para melhorar sua solubilidade, como por exemplo, experimento de *Refolding SDS*.

As imagens obtidas com o microscópio óptico fluorescente confocal para determinar a localização celular das enzimas poderiam ser feitas para as enzimas *epaI* e *epaOX*, outras GTs do cluster *epa* estudado, após a clonagem de ambas em pLIC-EGFP.

Além de novos experimentos, planejávamos retocar alguns resultados já obtidos como géis de SDS após a lise das proteínas mostrando suas porções solúveis e insolúveis, imagens de controle negativo e positivo para o confocal, seriam elas, controle negativo: *E. coli* sem a indução de proteínas e *E. coli* com a expressão da proteína GFP sem estar fusionada, utilizando o vetor pET-Trx1a.

Portanto, nesse trabalho, foram apresentados os resultados obtidos experimentalmente desde agosto de 2019 a março de 2020. O propósito inicial do trabalho, visualizar as proteínas no corpo celular e identificar sua localização, foi cumprido, mas, melhorias e avanços foram interrompidos.

## 6. Referências:

ANVISA. **Resistência Microbiana - Mecanismos de Impacto Clínico**. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosaudef/controlere/rede\\_rm/cursos/rm\\_controlere/opas\\_web/modulo3/gramp\\_entero4.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaudef/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo3/gramp_entero4.htm)>. Acesso em: 5 jun. 2020.

ANVISA. **Módulo 4 - Gram-positivos**. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosaudef/controlere/rede\\_rm/cursos/boas\\_praticas/modulo4/imp\\_ent.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaudef/controlere/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/imp_ent.htm)>. Acesso em: 5 jun. 2020.

BRUCE ALBERTS, MARTIN RAFF, JULIAN LEWIS, KEITH ROBERTS, JAMES WATSON, D. B. **Biologia Molecular da Célula**. 6<sup>a</sup> ed. [s.l: s.n.]

BUSH, K. et al. Tackling antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 12, p. 894–896, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2693>>.

CAMILO, C. M. et al. HTP-OligoDesigner: An online primer design tool for high-throughput gene cloning and site-directed mutagenesis. **Journal of Computational Biology**, v. 23, n. 1, p. 27–29, 2016.

CAMILO, C. M.; POLIKARPOV, I. High-throughput cloning, expression and purification of glycoside hydrolases using Ligation-Independent Cloning (LIC). **Protein Expression and Purification**, v. 99, p. 35–42, jul. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046592814000655>>.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Achievements in Public Health, 1900-1999: Control of Infectious Diseases**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm4829a1.htm>>. Acesso em: 11 jun. 2020.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS in the United States, 2013**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/drugresistance/Threat-Report-2013/PDF/AR-threats-2013-508.PDF>>.

DALE, J. L. et al. Multiple roles for *Enterococcus faecalis* glycosyltransferases in biofilm-associated antibiotic resistance, cell envelope integrity, and conjugative transfer. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 7, p. 4094–4105, 2015.

DALE, J. L. et al. Restructuring of *Enterococcus faecalis* biofilm architecture in response to antibiotic-induced stress. **npj Biofilms and Microbiomes**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41522-017-0023-4>>.

FARIAS, F. M. C. de. GFP: A shining tool to visualize life. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, p. 2–8, 2009.

GIBSON, D. G. et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. **Nature Methods**, v. 6, n. 5, p. 343–345, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>>.

JÚNIOR, F. F. P. **Interação e internalização de curcumina em culturas bacterianas**. 2020. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/76/76132/tde-11052020-141714/>>.

LAIRSON, L. L. et al. Glycosyltransferases: Structures, Functions, and Mechanisms. **Annual Review of Biochemistry**, v. 77, n. 1, p. 521–555, 2008.

MANN, P. A. et al. Chemical Genetic Analysis and Functional Characterization of Staphylococcal Wall Teichoic Acid 2-Epimerases Reveals Unconventional Antibiotic Drug Targets. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 5, p. 1–26, 2016.

O'NEILL, J. Antimicrobials in Agriculture and the Environment: Reducing Unnecessary Use and Waste the Review on Antimicrobial Resistance. n. December, 2015.

OMS. **Número recorde de países contribui com dados que revelam taxas preocupantes de resistência antimicrobiana**. Disponível em: <Número recorde de países contribui com dados que revelam taxas preocupantes de resistência antimicrobiana>. Acesso em: 5 jun. 2020.

SAMUEL MILLER LAB, UW, S. **Gibson Assembly**. Disponível em: <<http://miller-lab.net/MillerLab/protocols/molecular-biology-and-cloning/gibson-assembly/?fbclid=IwAR34lwxYDNPCXpX0epxWMyJqvAL25ASr6j384nxhcbKj3rHfgmtLYPOOAPs>>.

SHANKAR, Pr. Book review: Tackling drug-resistant infections globally. **Archives of Pharmacy Practice**, v. 7, n. 3, p. 110, 2016.

SIEVERT, D. M. et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 34, n. 1, p. 1–14, 2013.

TENG, F. et al. Further characterization of the epa gene cluster and epa polysaccharides of *Enterococcus faecalis*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 9, p. 3759–3767, 2009.

WALSH, C. T.; WENCEWICZ, T. A. Prospects for new antibiotics: A molecule-centered perspective. **Journal of Antibiotics**, v. 67, n. 1, p. 7–22, 2014.