

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**CARACTERIZAÇÃO DA MAQUINARIA *SUF* RESPONSÁVEL PELA FORMAÇÃO E
ASSOCIAÇÃO DOS COFADORES [Fe-S] EM *Enterococcus faecalis***

Tese de Doutorado

Gustavo Pelicioli Riboldi

Porto Alegre, 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CARACTERIZAÇÃO DA MAQUINARIA *SUF* RESPONSÁVEL PELA FORMAÇÃO E ASSOCIAÇÃO DOS COFADORES [Fe-S] EM *Enterococcus faecalis*

GUSTAVO PELICOLI RIBOLDI

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadores:

Dr. Jeverson Frazzon

Dr. Hugo Verli

Porto Alegre, fevereiro de 2011.

Este trabalho foi desenvolvido no Centro de Biotecnologia (Cbiot) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFGRS) e *Fralin Biotechnology Center* da *Virginia Polytechnic and State University* (Blacksburg, Virginia, Estados Unidos da América).

Agencias Financiadoras:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Coordenação Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

AGRADECIMENTOS

Aos orientadores, Dr. Jeverson Frazzon e Dr. Hugo Verli, pela atenção, incentivo e confiança.

À Dra. Ana Paula G. Frazzon, membro de minha Comissão de Acompanhamento, pela disponibilidade e auxílio, sempre competentes.

Ao Dr. Dennis R. Dean pela oportunidade de complementar este trabalho com experimentos realizados em seu laboratório, e à seu grupo de pesquisa pelo auxílio técnico.

Ao professor Dr. Giancarlo Pasquali pelas colaborações ao projeto, e aos colegas do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos, Laboratório de Biologia Molecular Vegetal e Laboratório de Bioinformática Estrutural, pela amizade e companheirismo.

Aos demais colegas, professores e funcionários do PPGBCM pela cooperação.

Principalmente aos meus pais, João e Doraci, meus exemplos de vida, às minhas irmãs Bianca, Bruna e Bárbara, e à Christine, pelo apoio, amor, dedicação e paciência.

Muito obrigado.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	
1.1 Cofatores [Fe-S]	
1.1.1 Estruturas e propriedades	15
1.1.2 Funções principais	17
1.1.3 Sistemas biológicos de formação dos cofatores [Fe-S]	19
1.1.3.1 Procariotos	
1.1.3.1.1 Sistema <i>NIF</i> (<i>nitrogen fixation</i>)	20
1.1.3.1.2 Sistema <i>ISC</i> (<i>iron sulfur cluster</i>)	22
1.1.3.1.3 Sistema <i>SUF</i> (<i>sulfur assimilation</i>)	26
1.1.3.2 Fatores regulatórios da formação dos cofatores [Fe-S]	30
1.1.3.3 Proteínas acessórias	32
1.1.4 Eucariotos	
1.1.4.1 Leveduras	33
1.1.4.1.1 Formação do cofator [Fe-S] em mitocôndria (<i>ISCmf</i>)	34
1.1.4.1.2 Maquinaria de Exportação <i>ISC</i> (<i>ISCme</i>)	
1.1.4.1.3 Maquinaria Citosólica (<i>CIA</i>)	36
1.1.4.2 Eucariotos Superiores	37
1.1.4.2.1 Processos Patológicos	39
1.1.4.3 Organismos Vegetais	
1.1.4.3.1 Plastídios	40
1.1.4.3.2 Mitocôndrias e Citosol	41
1.2 <i>Enterococcus spp.</i>	
1.2.1 Características Gerais	42
1.2.2 Importância Econômica	43
1.2.3 Importância Clínica	
1.2.3.1 Patogenicidade e Fatores de Virulência	45
1.3 Processos patogênicos e alvos moleculares	48
2. JUSTIFICATIVA	51
3. OBJETIVOS	

3.1	Objetivos Gerais	
3.2	Objetivos Especificos	52
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	
4.1	Bioinformática	
4.2	Modelagem Molecular	54
4.3	Simulações de Dinâmica Molecular	55
4.4	Análise de região promotora	
4.5	Linhagens, Construções plasmidiais e Meios de Cultura	56
4.6	Experimentos de estresse oxidativo e depleção de ferro	
4.7	Análise de Expressão Relativa	60
4.8	Clonagem de regiões de interesse	61
4.9	Mutação pontual <i>in vitro</i>	62
4.10	Experimentos <i>in vivo</i> de manipulações genéticas	63
4.11	Expressão recombinante e purificação de proteínas	65
4.11.1	SufU	
4.11.2	SufS e SufSU	
4.11.3	SufC	66
4.11.4	SufD	
4.12	Análise de espectroscopia e atividade cisteína desulfurase	67
4.13	Reconstituição dos cofatores [Fe-S]	
4.14	Caracterização de atividade ATPase	68
4.15	Espectrometria de massas e sequenciamento de DNA	69
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	
5.1	Identificação da maquinaria [Fe-S]: o sistema <i>sufCDSUB</i>	70
5.2	Análise de expressão de <i>E. faecalis sufCDSUB</i>	
5.2.1	Operon <i>SUF</i>	82
5.2.2	Análise de região promotora e identificação de <i>cis</i> - elementos	84
5.2.3	Estresse celular: depleção de ferro e estresse oxidativo	86
5.3	Complementação <i>in vivo</i> de <i>Proteobacteria</i>	
5.3.1	Complementação <i>ISC</i> de <i>Azotobacter vinelandii</i>	92

5.3.2 Complementação <i>Escherichia coli</i>	94
5.3.2.1 Sistema <i>ISC</i>	95
5.3.2.2 Sistema <i>SUF</i>	97
5.4 Proteínas do operon <i>sufCDSUB</i>	99
5.4.1 SufU	100
5.4.1.1 Análises estruturais de SufU	
5.4.1.1.1 Modelagem Molecular	104
5.4.1.1.2 Dinâmica Molecular	105
5.4.1.1.3 Comparação estrutural: IscU e SufU	108
5.4.1.1.4 A região Gram-positiva de 19 aminoácidos	109
5.4.1.2 Cisteína Desulfurase SufS e o Complexo SufSU	111
5.4.1.3 SufC	120
5.4.1.4 SufB	123
5.4.1.5 SufD	125
6. CONCLUSÃO	126
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130
8. ANEXOS	
8.1 Manuscrito publicado:	
<i>Structural studies of the Enterococcus faecalis SufU [Fe-S] cluster protein.</i>	148
9. CURRICULUM VITÆ RESUMIDO	174

LISTA DE ABREVIATURAS

NIF	<i>nitrogen fixation</i>
ISC	<i>iron sulfur cluster</i>
SUF	<i>sulfur assimilation</i>
FNR	<i>fumarate and nitrate reduction</i>
SAM	<i>S-adenosylmethionine</i>
DTT	<i>dithiothreitol</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
IHF	<i>integration host factor</i>
DIP	<i>2`2`-dipiridil</i>
PLP	<i>pyridoxal-phosphate</i>
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
RMSF	<i>root mean square fluctuation</i>

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1:	Cofatores [Fe-S] primordiais	16
Figura 2:	Mecanismo básico para a biosíntese de cofatores [Fe-S] e maturação de proteínas	19
Figura 3:	Organizações genéticas de genes envolvidos na montagem de cofatores [Fe-S]	23
Figura 4:	Análise filogenética de proteína SufU	72
Figura 5:	Resíduos conservados em proteínas arcabouço envolvidos na formação de cofatores [Fe-S]	73
Figura 6:	Resíduos conservados em cisteínas desulfurase envolvidas na formação de cofatores [Fe-S]	73
Figura 7:	Análise filogenética de proteína SufS	75
Figura 8:	Análise filogenética de proteína SufC	77
Figura 9:	Análise filogenética de proteína SufD	79
Figura 10:	Análise filogenética de proteína SufB	80
Figura 11:	Análise de expressão de <i>sufCDSUB</i> sob condições normais de crescimento	83
Figura 12:	Maquinaria <i>sufCDSUB</i> de <i>Enterococcus faecalis</i> e análise de região promotora	85
Figura 13:	Testes de expressão de <i>sufCDSUB</i> sob condições estressantes de crescimento	88
Figura 14:	Análise de expressão de <i>sufCDSUB</i> sob condições estressantes de crescimento	89
Figura 15:	Complementação da maquinaria <i>ISC</i> de <i>Azotobacter vinelandii</i>	93
Figura 16:	Complementação da maquinaria <i>ISC</i> e <i>SUF</i> de <i>Escherichia coli</i>	96
Figura 17:	Frações purificadas de SufS, SufU e complexo SufSU	102
Figura 18:	Reconstituição de cofactor [Fe-S] em SufU e SufSU	103
Figura 19:	Representação estrutural de SufU	105

Figura 20:	Análise de RMSD de SufU	106
Figura 21:	Análise de RMSF de SufU	108
Figura 22:	Características espectroscópicas associadas a processo de desulfurização de L-cisteína catalizada por cisteína desulfurases	114
Figura 23:	Gráficos de atividade desulfurase de SufS e ativador de desulfurase SufU	118
Figura 24:	Representação estrutural de SufS	119
Figura 25:	Frações purificadas de SufC e SufD	121
Figura 26:	Representação e análise estrutural de SufC	122
Figura 27:	Representação e análise estrutural de SufB e SufD	124
Tabela 1:	Linhagens bacterianas utilizadas no projeto	58
Tabela 2:	Vetores plasmidiais utilizados no projeto	59
Tabela 3:	Frequência de co-transdução observada em experimentos de complementação	99

RESUMO

Cofatores ferro-enxofre são grupos prostéticos inorgânicos ubíquos e evolutivamente ancestrais, cuja formação é dependente de complexas maquinarias protéicas. Três sistemas de formação distintos já foram determinados, denominados sistemas *NIF*, *ISC* e *SUF*. Apesar de bem descritos em diversos organismos, estas maquinarias são pouco caracterizadas no filo *Firmicutes*, o qual agrupa diversas bactérias patogênicas, e onde *Enterococcus faecalis* aparece como um representante clinicamente relevante. O objetivo deste estudo foi identificar a maquinaria biossintética de formação dos cofatores [Fe-S] de *E. faecalis* mediante análises de bioinformática, determinação das regiões promotoras do operon e de elementos *cis*-atuantes, padrão de expressão gênica, caracterização bioquímica dos elementos encontrados e comparação entre as maquinarias de associação do cofator [Fe-S] presente em *Proteobacteria* e *Firmicutes* através da capacidade de complementação deste sistema nos sistemas *ISC* e *SUF* de *Azotobacter vinelandii* e *Escherichia coli*, respectivamente. Metodologias de bioinformática permitiram identificar representantes da maquinaria *SUF* de formação dos cofatores [Fe-S], previamente identificado em *Proteobacteria*, apresentando os genes *sufB*, *sufC*, *sufD* e *sufS* e a presença de *sufU*, o único representante homólogo do sistema *ISC*, codificando possível proteína arcabouço, no lugar de *sufA*; da mesma forma, *sufE* e *sufR* não foram identificadas. A alta conservação deste sistema foi verificada em *Firmicutes* através de análises filogenéticas. Análise de sequências primária e estrutural de SufU verificaram um padrão estrutural similar à IscU. Modelagem molecular de SufU de *E. faecalis* apresentou dados de alta flexibilidade na região do sítio ativo, bem como a presença de região específica em *Firmicutes*, denominada região Gram-positiva (GPR), possivelmente envolvida em interações com outros fatores e/ou reguladores. SufU e o complexo SufSU são capazes de reconstituir cofactor [4Fe-4S], apresentando-se portanto como a proteína arcabouço do sistema. A enzima SufS purificada apresenta PLP ligado como cofator e atividade de cisteína desulfurase. Esta enzima apresenta um residuo catalítico essencial de cisteína na posição 365, e necessita SufU como ativador, onde outro residuo de cisteína (128) atua como acceptor do enxofre durante a

reação de transpersulfuração. SufC apresenta atividade ATPase, porém em nível reduzido em comparação ao homólogo de *E. coli*; SufD apresenta alta similaridade com homólogo de proteobactérias. Por outro lado, SufB não apresenta os resíduos de cisteína previamente descritos como importantes na formação dos cofatores [Fe-S] em outros organismos, assim sua função no sistema ainda deve ser determinada. Experimentos *in vivo* demonstraram a conservação específica de sistemas biossintéticos dos cofatores [Fe-S], onde o operon *SUF* de *E. faecalis* não foi capaz de complementar os sistemas *ISC* de *Proteobacteria*, porém complementou sistema *SUF* de *E. coli*, tornando viáveis mutantes de ambos os operons *sufABCDSE* e *iscRSU-hscBA-fdx*.

Palavras-chave: Maquinaria biossintética do cofator [Fe-S], *ISC*, *SUF*, *Enterococcus faecalis*.

ABSTRACT

Iron-sulfur clusters are ubiquitous and evolutionary ancient inorganic prosthetic groups, which biosynthesis depends on complex protein machineries. Three distinct assembly systems involved in the maturation of cellular Fe-S proteins have been determined, designated the *NIF*, *ISC* and *SUF* systems. Although well described in several organisms, these machineries are poorly understood in the *Firmicutes* phylum, which groups several pathological bacteria, where *Enterococcus faecalis* rises as a clinical relevant representative. The aim of this study was to identify the *E. faecalis* [Fe-S] cluster biosynthetic machinery through bioinformatics analysis, determination of operon promoter regions and *cis*-acting elements, relative genetic expression pattern, biochemical characterization of putative elements, and comparison of *Proteobacteria* and *Firmicutes* machineries through the ability of complementing *Azotobacter vinelandii* and *Escherichia coli* *ISC* and *SUF* systems, respectively. Bioinformatics methods enabled us to identify representatives of the *SUF* machinery for [Fe-S] cluster biosynthesis, previously verified in *Proteobacteria* showing conserved *sufB*, *sufC*, *sufD* and *sufS* genes and the presence of *sufU*, the only *ISC* homolog representative, coding for putative scaffold protein, instead of *sufA*; neither *sufE* nor *sufR* are present. High conservancy of this system for *Firmicutes* bacteria was verified through phylogenetic analysis. Primary sequences and structural analysis of the SufU protein demonstrated its structural-like pattern to the scaffold protein IscU. *E. faecalis* SufU molecular modeling showed high flexibility over the active site regions, and demonstrated the existence of a specific region in *Firmicutes*, the Gram positive region (GPR), a possible candidate for interaction with other factors and/or regulators. SufU is able to reconstitute a [4Fe-4S] cluster, such as the complex SufSU, arising as the scaffold protein in the system. Purified SufS corresponds to a PLP containing enzyme with cysteine desulfurase activity. It encloses a catalytically essential cysteine residue at position 365, and requires SufU as activator, where another cysteine residue (128) works as a proximal sulfur acceptor site for transpersulfurization reaction. SufC presents ATPase activity, though in a reduced level, when compared to the *Escherichia coli* homolog; SufD also shares high similarity with proteobacterial SufD. On the other hand, SufB

does not present cysteine residues previously described as important involved in the [Fe-S] cluster formation process of other organisms, therefore its function in the system still have to be determined. *In vivo* experiments enabled us to demonstrate the conservancy of specific [Fe-S] cluster biosynthetic systems, where *E. faecalis* *SUF* operon was not able to complement *Proteobacteria* *ISC* systems, but complemented *E. coli* *SUF* system, turning viable mutants of both *sufABCDSE* and *iscRSU-hscBA-fdx* operons.

Keywords: [Fe-S] cluster biosynthetic machinery, *ISC*, *SUF*, *Enterococcus faecalis*.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Cofatores [Fe-S]

1.1.1 Estruturas e propriedades

A teoria da origem quimio-autotrófica da vida postula o aparecimento de um organismo pioneiro caracterizado por estrutura complexa que parte de uma subestrutura inorgânica cataliticamente ativa (contendo elementos de transição como ferro, cobalto e níquel, com ligantes como sulfito, carbonil e ciano) e promovendo o crescimento da super estrutura orgânica através de fixação de carbono, orientado por potencial redutor de exalações vulcânicas. Cofatores [Fe-S], particularmente, são considerados grupamentos inorgânicos primordiais utilizados em moléculas catalíticas no processo da evolução, onde a abundância de elementos Fe e S na superfície terrestre prebiótica e a versatilidade e reatividade química dos cofatores [Fe-S] facilitaram sua seleção como atuantes em tais processos (WACHTERSHAUSER, 2007; WACHTERSHAUSER & HUBER, 2007).

Cofatores Ferro-Enxofre [Fe-S] (*iron sulfur clusters*) são grupos prostéticos funcionalmente versáteis presentes em praticamente todos os organismos vivos. Esses grupamentos foram primeiramente identificados durante a década de 1960, na proteína ferredoxina de espinafre, e desde então identificado em diversas proteínas envolvidas em variados processos celulares (MALKIN & RABINOWICZ, 1966). Os cofatores [Fe-S] encontrados na natureza apresentam mais comumente as conformações [2Fe-2S] e [4Fe-4S], os quais são coordenados em suas proteínas principalmente por resíduos de cisteínas (Cys), com ligação às moléculas de Fe, para sua orientação dentro da proteína. Cofatores podem ainda ser ancorados por resíduos de ácido aspártico (Asp), histidina (His), serina (Ser) ou cadeias protéicas contendo grupamento lateral do tipo amida. De uma forma geral, cofatores biológicos de maior nuclearidade não se apresentam complexados à suas proteínas por ligantes de resíduos de cisteína. Da mesma forma, nem todos os cofatores apresentam o elemento Fe como o único metal, e o exemplo clássico de tal característica corresponde ao cofator da Molibdênio-Ferro

proteína da Nitrogenase, contendo um núcleo [7Fe-9S-Mo]. Outra característica importante desta enzima é que contém mais de um tipo do cofator, possibilidade comum a muitas proteínas Fe/S. Não existe uma única sequência primária de aminoácidos que definam um motivo ligante para um grupamento [Fe-S] ([Fe-S] *cluster-binding motif*). A diversidade no ambiente protéico e o tipo do cofator ligante, diferenciados entre as múltiplas proteínas Fe/S contribui para a alta diversidade química e eletrônica dos cofatores [Fe-S] (JOHNSON *et al.*, 2005).

Apesar da diversidade estrutural, reatividade e propriedades eletrônicas diversas, os cofatores apresentam a característica em comum de serem construídos a partir da redução e acoplamento de unidades de [2Fe-2S], construídos primariamente a partir de elementos $\text{Fe}^{2+/3+}$ e S^{2-} . O acoplamento de dois cofatores [2Fe-2S] permite a formação dos cofatores [4Fe-4S] (Figura 1), que podem por sua vez originar os tipos [3Fe-4S] e [8Fe-7S] através da perda de um elemento Fe e junção dos cofatores, respectivamente. Sob condições favoráveis e organização apropriada dos ligantes necessários, cofatores [Fe-S] biologicamente relevantes têm a capacidade de se formarem espontaneamente *in vitro*, simplesmente incubando a apo-proteína na presença de $\text{Fe}^{2+/3+}$ e S^{2-} , com a posterior formação de [2Fe-2S] e/ou [4Fe-4S] (BEINERT *et al.*, 1997). No entanto, tal formação espontânea não se caracteriza como uma possibilidade fisiológica, visto que ferro e enxofre livre são elementos metabolicamente tóxicos ao organismo, especialmente em concentrações e conformações como as necessárias para a formação química do cofator. Seria necessária, portanto, uma rota bioquímica envolvida fatores responsáveis pela síntese biológica dos cofatores [Fe-S], compreendendo formação e entrega a proteínas que necessitem destes elementos.

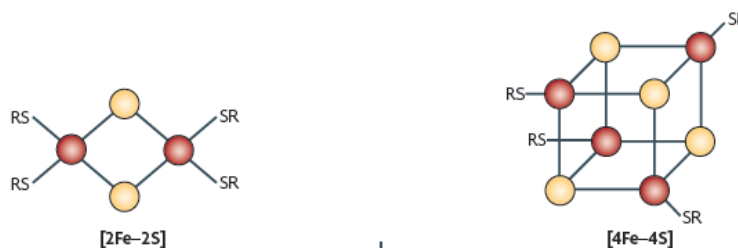


Figura 1: Cofatores [Fe-S] primordiais. O acoplamento de cofatores [2Fe-2S] permite a formação dos cofatores [4Fe-4S] e [8Fe-7S] (PY & BARRAS, 2010).

1.1.2 Funções principais

Cofatores [Fe-S] apresentam funcionalidade em processos de transferência de elétrons e catálise de reações de oxi-redução biologicamente importantes devido às suas propriedades eletrônicas versáteis, capacidade de acessar diversos estados de oxidação, como observado nas vias de fotossíntese e cadeia respiratória. Diferenças em ligantes que orientam estes cofatores, bem como o ambiente em que se encontram dentro das proteínas alvo permite que estes apresentem uma variação alta de potencial de oxi-redução, variando de -600 a +400 mV (BEINERT & KILEY, 1999). Cofatores envolvidos nesses processos apresentam conformações [2Fe-2S], [3Fe-4S], [4Fe-4S], [8Fe-7S] orientados por resíduo Cys; ocasionalmente, apresentam orientação por Asp, His e Ser, onde tais resíduos teriam funcionalidade no processo de oxi-redução (CALZOLAI *et al.*, 1996; LINK, 1999; HUNSICKER-WANG *et al.*, 2003). A maioria dos cofatores [Fe-S] envolvidos nesta atividade se apresentam como carregadores únicos de elétrons, porém o cofator [8Fe-7S] apresenta-se como carreador duplo (PETERS *et al.*, 1997).

Cofatores [Fe-S] servem como locais de ligação e ativação de substrato de uma série de enzimas, ocorrendo geralmente de três formas diferentes: o acoplamento do cofator [4Fe-4S] com um único átomo de Fe do cofator sem ligação à cisteína facilita a ligação de substratos e ativação de reações de hidratação/desidratação em hidratases e desidratases, como verificado em enzima aconitase (FLINT & ALLEN, 1996); enzimas com radical SAM (ligação de S-adenosilmetionina), envolvidas na catálise de cofatores, antibióticos, vitaminas e herbicidas (JARRETT, 2003); regulação de atividades enzimáticas em resposta a estímulos externos, onde a restauração da atividade necessita da formação ou reparo do cofator, como verificado em ferroquelatases de mamíferos (enzima terminal da biossíntese do grupamento heme), onde o cofator é essencial para sua atividade bioquímica, sendo degradado por óxido nítrico (NO) (SELLERS *et al.*, 1996).

Apresentam funcionalidade como estoque de ferro, em cofatores duplos de [Fe-S] contendo 8 moléculas do elemento Fe (2x[4Fe-4S]), em ferredoxinas ou

poliferrodoxinas contendo 12 átomos de Fe, e funcionando como arcabouços para formação ou estoque dos cofatores [4Fe-4S] (HEDDERICH *et al.*, 1992). Estão envolvidos em redução de dissulfito e doação de enxofre, como verificado na enzima dissulfito redutase, que possui no sítio ativo um cofator [4Fe-4S] o qual cliva dissulfito (DAI *et al.*, 2000), e em processos de biossíntese de biotina, que contém um cofator [2Fe-2S] para fornecer o enxofre à conversão de tiobiotina para biotina) e tiamina (UGULAVA *et al.*, 2001).

Cofatores [Fe-S] promovem uma reorganização protéica controlando homeostase estrutural na vizinhança do cofator (MULHOLLAND *et al.*, 1998). Além de estruturais, podem apresentar importantes funções regulatórias, como em enzimas envolvidas em processo de reparo de DNA (endonuclease III e MutY) (PORELLO *et al.*, 1998), onde o cofator [4Fe-4S] controlaria a estrutura de uma região *loop* essencial para o reconhecimento e reparo de DNA danificado. Atuam ainda em controle de homeostasia celular através de regulação da expressão gênica a nível transcricional ou traducional, apresentando sensibilidade a uma variedade de estímulos ambientais e regulação por mecanismos diferenciados, como formação do cofator, conversão ou de reações de oxi-redução. A proteína SoxR, por exemplo, é sensível ao estresse oxidativo devido à oxidação do cofator [2Fe-2S]^{2+,+}, estimulando com isto a expressão transcricional de SoxS responsável pela ativação da transcrição de diversas enzimas responsivas ao estresse oxidativo (DEMPLE *et al.*, 2002). Outro regulador transcricional, a proteína FNR (*fumarate and nitrate reduction*), tem cofator [4Fe-4S]²⁺ de forma dimérica (ligante de DNA) convertido a uma forma monomérica [2Fe-2S]²⁺ através de exposição ao oxigênio, visando o controle da expressão de genes envolvidos nas vias de respiração aeróbia e anaeróbia em *Escherichia coli* (KILEY & BEINERT, 2003). A proteína IRP1 (*iron regulatory protein*), em sua forma ativa, liga-se ao mRNA *alvo* pela formação do cofator [4Fe-4S] em IRP, promovendo desta maneira a regulação transcricional de receptores de ferritina e transferrina (BEINERT *et al.*, 1996). Elementos envolvidos em via de formação dos cofatores [Fe-S] estão também relacionados a processos de modificação de uridinas de RNA transportadores (tRNAs) e síntese de 2-tiouridina e 4-tiouridina (LAUHON, 2002).

Tal diversidade funcional quase sempre reflete a versatilidade química dos elementos Fe e S, e a identificação biológica desses grupamentos nos três principais processos necessários para sustentar a vida na Terra (fixação do nitrogênio, fotossíntese e respiração) corroboram com a idéia da importância destes no processo de surgimento e sustentação da vida no planeta.

1.1.3 Sistemas biológicos de formação dos cofatores [Fe-S]

De uma maneira geral, a formação dos cofatores [Fe-S] ocorre de acordo com os seguintes passos: liberação do elemento enxofre a partir da atividade catalítica da enzima cisteína desulfurase; doação do enxofre para a proteína arcabouço, onde será montado o cofator [Fe-S]; após a associação do cofator na proteína arcabouço, ocorre a transferência deste para a proteína alvo e maturação da proteína, etapa esta que exige a atuação de proteínas acessórias carreadoras e/ou facilitadoras da transferência do cofator (Figura 2). A seguir, uma breve descrição da maquinaria de formação dos cofatores [Fe-S] será apresentada, de acordo com uma cronologia relacionada às descobertas dos principais sistemas envolvidos em bactérias. Em um segundo momento, será descrita a maquinaria verificada em eucariotos, que tomam por base experimentos de análise genômica envolvendo conhecimentos adquiridos a partir de procariotos.

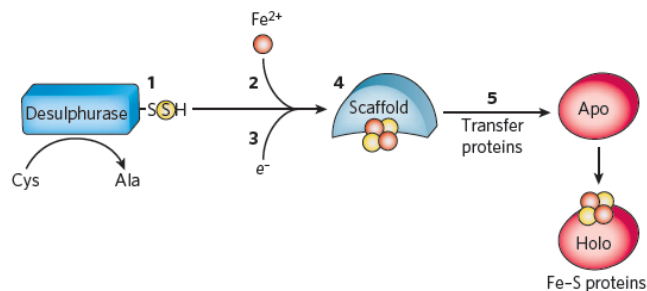


Figura 2: Mecanismo básico para a biosíntese de cofatores [Fe-S] e maturação de proteínas (LILL, 2010).

1.1.3.1 Procariotos

1.1.3.1.1 Sistema *NIF* (*nitrogen fixation*)

O primeiro modelo para formação biológica do cofator [Fe-S] partiu do estudo do microrganismo diazotrófico *Azotobacter vinelandii*, mais especificamente pela análise do cofator Ferro-Molibdênio (FeMo-co) da enzima nitrogenase, sítio este que permite a redução do nitrogênio em duas moléculas de amônio, processo conhecido como fixação biológica do nitrogênio (JACOBSON *et al.*, 1989). A nitrogenase corresponde a uma enzima cataliticamente inativa em condições não-nitrificantes, e produzida somente por organismos envolvidos na fixação de nitrogênio. Duas enzimas compõem o complexo da nitrogenase: dinitrogenase e dinitrogenase redutase. A dinitrogenase, também conhecida como Ferro-Molibdênio proteína (MoFe-proteína), constitui um tetrâmero de 240 kDa codificada pelos genes *nifD* e *nifK* contendo dois pares de dois cofatores de vital importância para a proteína: o FeMo-co (composto de homocitrato e [Mo-3Fe-3S] ligados à [4Fe-3S]), e o *P cluster* (composto de dois cofatores [4Fe-3S] ligados por átomo central de enxofre, formando [8Fe-7S]). A dinitrogenase redutase, também conhecida como Ferro proteína (Fe-proteína), constitui dímero de 60 kDa codificada pelo gene *nifH* apresentando o cofator [4Fe-4S], responsável pela transferência de elétrons da Fe-proteína ao *P cluster* da MoFe-proteína (REES & HOWARD, 2000; FRAZZON & DEAN, 2002; RUBIO & LUDDEN, 2008).

Um sistema biossintético especializado na formação do cofator [Fe-S] seria necessário para satisfazer a alta demanda de cofatores [Fe-S] para manutenção da nitrogenase ativa sob condições de fixação de nitrogênio, o que não seria observado em condições de crescimento do microrganismo na presença de nitrogênio (como amônia, por exemplo). Estudos genéticos e moleculares estabeleceram que uma associação de proteínas seria necessária para a formação do FeMo-co, o qual seria formado separadamente e então inserido na MoFe proteína. Dentre os elementos envolvidos na biosíntese do FeMo-co, verifica-se: *NifB*, necessário para doação de

Ferro e Enxofre para a síntese de FeMo-co; NifQ envolvido na doação de Molibdênio; NifX, para o acúmulo de precursores de FeMo-co; complexo NifN-NifE, proteína arcabouço para a formação de FeMo-co; NifV, homocitrato-sintase para a formação de FeMo-co; NifY, apresentando papel de chaperona carreadora de FeMo-co para a maturação da MoFe proteína. NifM é elemento necessário para maturação da Fe-proteína. Além disso, NifH também está envolvida em processos de biosíntese de FeMo-co e maturação da MoFe-proteína, e NifA e NifL estão envolvidos em processos regulatórios positivo e negativos, respectivamente, da síntese de componentes da nitrogenase (RUBIO & LUDDEN, 2005).

Caracterizações bioquímicas de linhagens mutantes inativadas individualmente para os genes *nifU* e *nifS* apresentaram atividades significativamente mais baixas para Ferro proteína e Molibdênio-Ferro proteína. Constatou-se, portanto, a possibilidade de um modelo onde as proteínas NifU e NifS trabalhariam juntas na produção dos cofatores [Fe-S] precursores destinados à maturação da nitrogenase, e quando da inativação de NifU ou NifS, outras proteínas assumiriam suas funções, porém a um nível muito mais baixo (JACOBSON *et al.*, 1989).

Após a purificação da proteína NifS, constatou-se que esta é um homodímero dependente de piridoxal-fosfato (PLP) que catalisa a desulfurização da L-cisteína, liberando L-alanina e enxofre. NifS apresenta-se expressa somente sob condições de fixação de nitrogênio, tornando clara a sua participação no processo de maturação da nitrogenase (ZHENG *et al.*, 1993). O mecanismo de reação de cisteína desulfurases envolve a formação de uma base de Schiff (*Schiff base*) entre a cisteína livre e coenzima PLP no sitio ativo da desulfurase, mais especificamente no resíduo conservado Cys³²⁵. Posteriormente ocorre a formação de cisteinil-*persulfide* através do ataque nucleofílico realizado pelo ânion tiolato da Cys no enxofre do intermediário cisteína-PLP descrito anteriormente, liberando alanina. O *persulfide* ligado à enzima pode então ser transferido ao resíduo Cys na proteína aceptora, como proteínas arcabouço, através de outro ataque nucleofílico envolvendo a reação que é fundamentalmente similar à troca de ponte *disulfide* em proteínas. Segundo este mecanismo, ocorre de produção de *sulfide* livre (-SH), um veneno metabólico, mas a

desulfurização controlada previne a liberação em solução de deste elemento tóxico (MUELLER, 2006).

A proteína NifU constitui um homodímero que contém um cofator redox ativo $[2\text{Fe-2S}]^{2+/+}$ por monômero (FU *et al.*, 1994). Analisando-se a sequência primária de NifU observou-se a presença de 9 resíduos Cys conservadas: 3 resíduos na região N-terminal da proteína nas posições Cys³⁵, Cys⁶², Cys¹⁰⁶, envolvidos na formação do cofator transitente $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ e/ou $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ envolvido na maturação da nitrogenase; 4 resíduos no domínio central (Cys¹³⁷, Cys¹³⁹, Cys¹⁷², Cys¹⁷⁵) orientando o cofator permanente $[2\text{Fe-2S}]$, envolvido em reações de oxi-redução; 2 resíduos (Cys²⁷², Cys²⁷⁵) na porção C-terminal da proteína, orientando cofatores $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ e/ou $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$, possivelmente envolvidos transferência e/ou carregamento do cofator sintetizado (HWANG *et al.*, 1996; DOS SANTOS *et al.*, 2004).

Outras proteínas envolvidas na formação dos cofatores [Fe-S] na nitrogenase também são codificadas pelos genes *nif*. IscA^{Nif} constitui um homodímero com funções ainda não esclarecidas, mas que poderia estar envolvido na aquisição do elemento ferro para a formação ou no auxílio ao processo de transferência do cofator. CysE1 corresponde à enzima O-acetylserina syntase, elemento controlador de cisteína, e seria co-transcrita com o gene de *nifS*, com a função de limitar a biossíntese de cisteína (NACHIN *et al.*, 2001).

1.1.3.1.2 Sistema ISC (*iron sulfur cluster*)

Após a verificação inicial da atividade de cisteína desulfurase por parte de NifS e seu envolvimento na maturação da nitrogenase, estudos paralelos em *A. vinelandii* e *E. coli* apresentaram outros tipos de sistemas envolvidos com a formação dos cofatores [Fe-S]. A viabilidade de linhagens *A. vinelandii* diazotróficas nocaute para os genes *nifS* e *nifU*, ainda capazes de produzir nitrogenases (mesmo que em baixos níveis) e se reproduzir sob condições de fixação de nitrogênio, sugeriu a possibilidade de que

outros elementos relacionados à biossíntese dos cofatores poderiam mimetizar as funções de NifU e NifS. Através de análise de sequências de DNA e estudos bioquímicos em *A. vinelandii* identificaram-se 9 genes que foram designados *cysE2*, *iscR*, *iscS*, *iscU*, *iscA*, *hscB*, *hscA*, *fdx* e *iscX*, os quais estariam relacionados à biossíntese dos cofatores [Fe-S], e seriam regulados por um único promotor, *iscR*. Comparando os produtos do operon *NIF* com os transcritos de *ISC*, observou-se: (i) proteínas homólogas a CysE1, NifS e IscA^{Nif}; (ii) proteína similar à região N-terminal de NifU (IscU), apresentando os resíduos conservados Cys; (iii) identificação de proteína ferredoxina ancorando [2Fe-2S] com propriedades praticamente idênticas às apresentadas pelo cofator central de NifU (ZHENG *et al.*, 1998) (Figura 3).

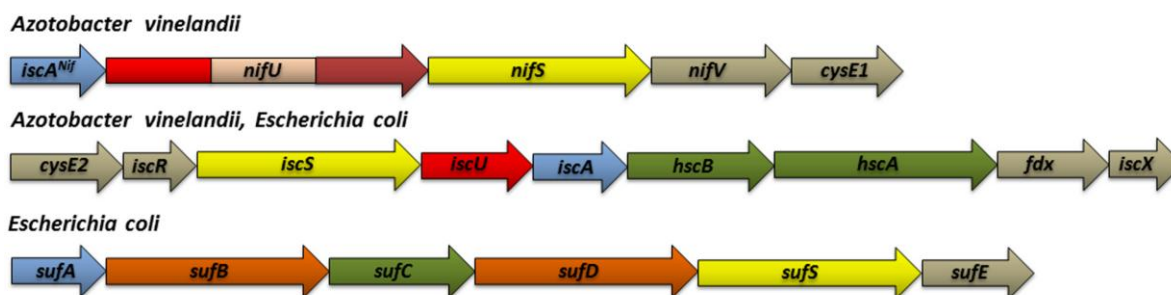


Figura 3: Organizações genéticas de elementos envolvidos na montagem de cofatores [Fe-S]. *Azotobacter vinelandii* apresenta o sistema *NIF*, envolvido na maturação da enzima nitrogenase e fixação biológica de nitrogênio, e o sistema *ISC*, envolvido na maturação geral de proteínas que necessitem do cofator [Fe-S] (como aconitase, por exemplo). O mesmo sistema *ISC* é verificado em *Escherichia coli*, cujo genoma também apresenta o sistema *SUF*, envolvido em processos de estresse oxidativo e de depleção de ferro. Regiões com seqüências homólogas ou funções similares entre os sistemas estão codificados por cores similares; cores diferenciadas em NifU representam seus diferentes domínios proteicos.

A atividade desulfurásica para o sistema *ISC* foi verificada na enzima IscS. A análise das sequências primárias em diversos genomas bacterianos demonstra que IscS e NifS apresentam alta similaridade com um particular grau de conservação entre seus respectivos sítios ativos. IscS apresenta uma alça altamente flexível, correspondendo à região da proteína que contém o sítio ativo da enzima, particularmente no resíduo conservado Cys³²⁸. Tamanha flexibilidade é explicada pelo seu papel multifuncional, visto que esta está envolvida em processos alternativos à

formação dos cofatores [Fe-S] (como a modificação pós-traducional de tRNA e biosíntese de coenzimas), e pelos contatos proteína-proteína, principalmente na interação com IscU, Fdx e IscX (KATO *et al.*, 2002; MIHARA *et al.*, 2002; TOKUMOTO *et al.*, 2002).

A proteína arcabouço do sistema ISC seria correspondente à proteína IscU, cujos resíduos de maior importância para a orientação do cofator correspondem a Cys^{37, 63, 106} e His¹⁰⁵ (JOHNSON *et al.*, 2006). No entanto, o resíduo Asp³⁹ apresentaria extrema importância para a transferência do cofator, visto que neste processo estaria envolvido em sua orientação, juntamente com os resíduos Cys, e uma eventual mutação neste resíduo produziria um cofator estabilizado e intransferível dentro da proteína arcabouço (RAULFS *et al.*, 2008).

In vitro, IscU é capaz de formar o cofator [Fe-S] na presença de IscS, FeCl₃ e L-cisteína, e tal processo ocorre de maneira sequencial, primeiramente pela formação de dois cofatores [2Fe-2S] localizados na interface do homodímero IscU (AGAR *et al.*, 2000). Caso a proteína alvo necessite um cofator do tipo [2Fe-2S], chaperonas (HscA e HscB, descritas posteriormente) auxiliam na entrega e maturação do elemento em questão. Alternativamente, ocorre um segundo passo envolvendo o auxílio de agentes redutores (*dithiothreitol*-DTT, *in vitro*; ferredoxina-Fdx, *in vivo*), onde se forma um cofator [4Fe-4S] no homodímero IscU através da redução de um elétron em cada [2Fe-2S] formado. Finalmente, o cofator presente em apo-IscU pode, ainda, voltar a [2Fe-2S], pela exposição a oxigênio (CHANDRAMOULI *et al.*, 2007). O equilíbrio entre as isoformas de IscU (holo-IscU, apo-[2Fe-2S]IscU e apo-[4Fe4S]IscU) é controlado pela atividade de Fdx, pelo estado de oxi-redução celular (nível de oxigênio, especialmente, descrito posteriormente) e pela demanda de apo-proteínas na célula.

A proteína ferredoxina apresenta um cofator [2Fe-2S], porém não se verificam sequências primárias consenso quando comparadas à região do cofator permanente contido na região central de NifU. No entanto, ambas as proteínas apresentam propriedades biofísicas similares, o que indicaria que estas poderiam apresentar funções equivalentes. IscA corresponde a uma proteína arcabouço do tipo A, família de proteínas que apresentam resíduos Cys conservados na sua porção C-terminal e

orientam a formação dos cofatores tipo [2Fe-2S] e/ou [4Fe-4S], e apresenta estruturas cristalográficas relacionadas a dímero, tetrâmero ou oligômero. A função bioquímica ligada a este elemento está provavelmente relacionada à sua atuação como proteína arcabouço alternativa na formação dos cofatores, entrega/carregamento dos cofatores para as proteínas alvo e/ou doador de Fe na formação dos cofatores (OLLAGNIER-DE-CHOUDENS *et al.*, 2004). Apesar de reconstituírem *in vitro* cofatores *transientes*, estas proteínas não complementam *in vivo* mutantes para IscU, além de não promoverem interação proteína-proteína com a enzima desulfurase (OLLAGNIER-DE-CHOUDENS *et al.*, 2001). Da mesma forma, ensaios cinéticos de maturação de apo-Fdx através de apo-[2Fe-2S]IscU e apo-[2Fe-2S]IscA apontam dados de $K_m \sim 210\mu M$ e $27\mu M$, respectivamente, o que demonstra que a entrega do cofator apresenta maior interação para IscU. Por outro lado, IscA possui uma constante de ligação de ferro de $3.0 \times 10^{19} M^{-1}$, e é capaz de entregá-lo a IscU para formação do cofator, o que sugeriria sua função como doador de ferro (BONOMI *et al.*, 2005).

A maquinaria ISC apresenta, além dos fatores acima descritos, a codificação de chaperonas moleculares que estão envolvidas na formação dos cofatores [Fe-S]. Chaperonas HscA e HscB apresentam alto grau de similaridade com DnaK e DnaJ, respectivamente, as quais constituem membros de família de proteínas com atividade ATPase intrínseca e fortemente estimuladas pela sua interação com proteínas alvo, que normalmente envolvem remodelamento tridimensional de proteínas (TOKUMOTO & TAKAHASHI, 2001). Experimentos genéticos e bioquímicos estabeleceram que estes elementos estariam diretamente associados à maturação de proteínas Fe/S e entrega do cofator por parte de IscU. Uma sequência primária curta e altamente conservada dentro de IscU (LPPVK), localizada próxima à terceira Cys conservada, é necessária e suficiente para interação entre apo-IscU e/ou holo-IscU e HscA e para estimular a hidrólise de nucleotídeo em HscA (CUPP-VICKERY *et al.*, 2004; TAPLEY *et al.*, 2006). A interação é aumentada pela associação de HscB, proteína que também aumenta atividade ATPase de HscA. A formação desse complexo está relacionada à entrega dos cofatores do tipo [2Fe-2S], somente; proteínas arcabouço que não possuem tal motivo LPPVK em seu genoma (NifU e/ou SufU, ver adiante) também não apresentam

regiões codificantes para estas chaperonas em seu operon (VICKERY & CUPP-VICKERY, 2007).

Sistema *ISC* mostrou-se extremamente importante em *A. vinelandii*, onde a anulação de elementos chave como *iscS* e *iscU* tornou a bactéria inviável, garantindo que tal sistema é de vital importância para garantir a homeostasia dos cofatores e proteínas Fe/S na célula. Em *E. coli*, a inativação de genes individuais de *iscS*, *iscU*, *hscB*, *hscA* ou *fdx* determinaram efeitos graves na formação dos cofatores, garantindo que estes são necessários para a incorporação completa dos cofatores [Fe-S] em suas respectivas proteínas, e uma depleção de qualquer um destes genes corresponde a inativação na capacidade de maturação de uma variedade de diferentes proteínas Fe/S presentes no organismo.

1.1.3.1.3 Sistema *SUF* (*sulfur assimilation*)

Uma vez identificada a importância do sistema *ISC* no metabolismo intermediário de *E. coli*, verificou-se a viabilidade de linhagens nocaute para *iscS* e *iscU* (fenótipo contrário ao verificado anteriormente em *A. vinelandii*), o que conduziu a observação de que um segundo sistema biossintético para formação e associação do cofator em *E. coli* estaria presente (TAKAHASHI & TOKUMOTO, 2002). Este sistema foi denominado de *SUF* e se apresenta como a maquinaria mais simples de produção do cofator, uma vez que apenas 6 proteínas codificadas pelo operon *sufABCDSE* estariam envolvidas na formação dos cofatores [Fe-S](FONTECAVE *et al.*, 2006).

De uma maneira geral, as cisteínas desulfurases envolvidas na formação dos cofatores [Fe-S] são divididas em dois grupos, os quais são distinguidos pela presença de resíduos de aminoácidos diferenciados nas redondezas do sítio ativo, apesar de conterem em comum o resíduo de Cys conservado, na porção C-terminal. Proteínas do tipo I (NifS e IscS) apresentam o motivo conservado SSGSACTS, e do grupo II (SufS, CsdA) o motivo RXGHHCA. A atuação catalítica corresponde à segunda diferença

observada entre os dois grupos, visto que proteínas do tipo II requerem uma proteína acessória para ativação e aumento da capacidade catalítica na sua função de desulfurase (AYALA-CASTRO *et al.*, 2008). A proteína SufS de *E. coli* apresenta uma similaridade de sequência primária com IscS e corresponde a um homodímero dependente de PLP, cujo sítio ativo apresenta o resíduo essencial Cys³⁶⁴, porém apresenta motivo correspondente a desulfurase tipo II. SufE, por sua vez, corresponde a um homodímero que se liga fortemente a SufS formando um complexo. A atividade de desulfurase de SufS pode ser aumentada em até 50 vezes na presença de SufE devido ao resíduo de Cys⁵¹ presente nesta proteína, correspondendo a um importante efeito estimulatório do complexo. Dessa maneira, SufE atuaria como uma enzima sulfur-transferase entre as proteínas desulfurase e arcabouço, baseado na transferência acessível de *persulfide* da cisteína formados em SufS para SufE, respectivamente (LOISEAU *et al.*, 2003). Além do complexo SufSE, *E. coli* apresenta um segundo complexo de desulfurase também relacionada ao Grupo II, CsdA (desulfurase) e CsdE (ativador) (LIMA, 2002).

Dados estruturais de SufS apresentam que o sítio ativo Cys³⁶⁴ está orientado para o interior da proteína, ao contrario de IscS que apresenta nesta região um *loop* acessível ao solvente, o que poderia explicar a atividade desulfurase aproximadamente 20 vezes maior para SufS (sem atuação de ativador). O ativador SufE, por sua vez, também apresenta o resíduo de cisteína orientado para o interior da molécula; portanto, interações entre as duas estruturas devem ser essenciais para que SufSE atinja o valor desulfurásico comparável com IscS (FUJII *et al.*, 2000). Apesar da diversidade de estrutura primária (similaridade inferior a 10%), SufE e IscU apresentam similaridade estrutural, o que sugeriria que ambas proteínas poderiam atuar com sua respectiva desulfurase cognata de maneira espacialmente similar (Liu *et al.*, 2005). Ao verificar as duas estruturas sobrepostas se observa que a região que contém sítio ativo Cys⁵¹ de SufU está em mesmo local de Cys³⁷ de IscU, apesar de os outros dois resíduos ativos de IscU (Cys⁶³ e Cys¹⁰⁶) se apresentarem expostos ao solvente.

As proteínas SufB, SufC e SufD formam um complexo compacto *in vivo*. SufB e SufD são homólogos em regiões C-terminal, regiões estas que complexam com SufC, formando SufBC₂D (OUTTEN *et al.*, 2003). Em *E. coli*, SufB apresenta 13 resíduos Cys

na porção N-terminal, recebe *sulfide* do complexo SufSE e é capaz de coordenar um cofator $[4\text{Fe-4S}]^{+2}$. Porém, este cofator não é transitente, o que caracteriza tal complexo como uma molécula alternativa de proteína arcabouço, embora tenha sido observado a transferência do cofator tanto para apo-SufA, como para apo-Aconitase. Apesar de o sistema *SUF* não apresentar Fdx, verificou-se recentemente a presença de uma molécula de FADH_2 ligada ao complexo SufBC₂D, possivelmente envolvido no processo de redução do cofator (WOLLERS *et al.*, 2010). SufD apresenta 23 resíduos His, apresentando-se, portanto como excelente alternativa como ligante de ferro no processo de coordenação de ferro ferroso (SAINI *et al.*, 2010).

SufC apresenta uma estrutura de ABC *transporter*, com subunidade ATPase, motivos *Walker A* e *Walker B* e motivos *Q loop* e *D loop*. Tal estrutura é característica de proteínas transmembrana, porém o complexo SufBC₂D é solúvel e presente no citosol (NACHIN *et al.*, 2003). SufC apresenta atividade ATPase dependente do resíduo conservado Glu¹⁷¹, a qual é aumentada em torno de 100x em presença de SufB, possivelmente por reorientar espacialmente e estabilizar resíduo ativo, ou por fornecer um resíduo catalítico na reação (ECCLESTON *et al.*, 2006). A funcionalidade da atividade ATPase ainda é desconhecida, mas pode estar relacionada à ajuda na formação do cofator, no processo de aquisição de ferro ou ainda no processo de transferência do cofator, talvez funcionando como uma chaperona análoga à HscA (que também apresenta atividade ATPase). Por mecanismo ainda desconhecido, observou-se que o complexo SufBC₂D aumenta a atividade do complexo SufSE, onde SufE interage diretamente com SufB para a transferência de *sulfide* e formação do cofator [Fe-S] (LAYER *et al.*, 2007).

SufA é um homodímero que exibe uma similaridade de sequência primária com IscA, incluindo os 3 resíduos Cys que orientam o cofator $[2\text{Fe-2S}]$, SufA recebe o *sulfide* produzido no complexo SufSE para a associação do cofator (SENDRA *et al.*, 2007), assim SufA corresponde a uma proteína arcabouço envolvida no processo de transferência do cofator [Fe-S] à apoproteína alvo.

SufU corresponde a uma subclasse de IscU, e é encontrado juntamente com as proteínas do sistema *SUF* em determinados organismos. No entanto, esta proteína

apresenta uma inserção de 18-21 aminoácidos entre a segunda e terceira Cys conservadas. Ainda, a região LPPVK não está presente nesta proteína. SufU não é identificada em organismos Gram-negativos, mas apresenta-se conservada em Gram-positivos e será, portanto, discutida em seções posteriores.

Em um primeiro momento, o sistema *SUF* apresentou-se como um sistema de menor contribuição para a formação dos cofatores [Fe-S], visto que sua anulação não acarretaria maiores efeitos na atividade das enzimas [Fe-S] em *E. coli*. Por outro lado, fenótipos observados por linhagens *SUF* mutantes sob condições de estresse oxidativo ou de limitação de ferro sugerem sua função na ativação, proteção ou reparo de proteínas Fe/S nessas situações. A indução do operon *SUF* em resposta à limitação de Fe é dependente da proteína reguladora global Fur (*ferric uptake regulator*), cuja ligação ao elemento Fe⁺² reprime genes relacionados à aquisição de ferro em condições celulares normais. Por outro lado, com a verificação de depleção celular de ferro, ocorre a perda da repressão e aumento da transcrição de genes adaptativos à falta de ferro. Em condições normais, Fur ligado a Fe⁺² está ancorado em seu sítio de ligação (entre as posições -10 e -35 da região promotora de *SUF*) reprimindo sua transcrição que é, portanto, induzida sob baixas concentrações de ferro. Cofatores [Fe-S] sofrem ataque de elementos oxidativos levando à destruição do cofator e perda de Fe⁺², o qual age como combustível para reação de Fenton e formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que compromete enzimas e fatores protéicos contendo cofatores [Fe-S], além de promover danos ao DNA. Genes do operon *SUF* apresentam-se induzidos em presença de elementos geradores de radical superóxido e/ou peróxido de hidrogênio, e estão sob controle dos reguladores responsivos a estresse oxidativo, que serão discutidos a seguir (OUTTEN *et al.*, 2004; YEO *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2008).

1.1.3.2 Fatores regulatórios da formação dos cofatores [Fe-S]:

O processo de formação do cofator é um importante aspecto de compreensão dos papéis regulatórios das proteínas Fe/S, pois alguns cofatores são lábeis sob determinadas condições e devido a isto necessitam uma ressíntese ou reparo do seu centro metálico. Cofatores [Fe-S] estão diretamente envolvidos em processos regulatórios de 3 fatores de transcrição; IscR, SoxR e FNR, onde mediarão respostas celulares a fatores oxidantes específicos como O₂, espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO). O elemento superóxido (exemplo de ROS) está normalmente presente em níveis baixos devido à ação de superóxido dismutases que catalisam sua conversão à peróxido de hidrogênio. O fato de o superóxido danificar certas classes de macromoléculas (particularmente cofatores [Fe-S]) explica o porquê de as células terem desenvolvido mecanismos de adaptação ao processo de estresse oxidativo. NO é um dos reagentes mais versáteis, podendo reagir sob as formas NO, NO⁺ e NO⁻, e não possui barreira para sua difusão; por outro lado, esta reatividade é limitada pela sua meia-vida. NO apresenta uma afinidade alta pelo elemento Fe e rapidamente desloca o ligante S do ferro no cofator [Fe-S]. Em alguns casos, tratamento com oxidantes específicos danifica o cofator, que pode então necessitar de reparo ou ressíntese (PY & BARRAS, 2010).

IscR é um regulador transcricional que apresenta o domínio de ligação ao DNA *helix-turn-helix*, além de 3 resíduos conservados de Cys que ancoram um cofator [2Fe-2S]. IscR é o primeiro gene a ser transcrito no operon responsável pelo sistema *ISC*, tendo portanto o seu próprio cofator [Fe-S] sintetizado pelo mesmo sistema. Devido a essa característica, IscR promove uma regulação do sistema *ISC* através de mecanismo de *feedback*, onde a sua maturação compete com outras proteínas Fe/S alvo de *ISC*. Dessa maneira, quando a capacidade de formação do cofator [Fe-S] excede a demanda, a holo-IscR limita uma maior acumulação na maquinaria de formação do cofator [Fe-S]. Tal tipo de controle ocorre em condições plenas de concentrações celulares de ferro, servindo como regulador da concentração dos cofatores na célula (SCHWARTZ *et al.*, 2001).

Como descrito anteriormente, IscR induz a expressão do operon *SUF*, porém através da atuação de apo-IscR. Portanto, a atuação de IscR é versátil e duas regiões de ligação ao DNA já foram identificadas: sítio tipo I, de 25 pares de base (pb) no DNA, verificado na região promotora de *ISC* (ATASYGACTRWWWYAGTCRRSTAT); tipo II, 26 pb no DNA, verificado na região promotora de *SUF* (AWARCCCYTSNGTTTGMNGKKKTKWA); [S=G/C, Y=CT, R=A/G, W=A/T, M=A/C, K=T/G]. O operon *SUF* é controlado, além de IscR, pelo regulador OxyR (sensível a H₂O₂) e Fur (sensível a baixas concentrações de Ferro) (GIEL *et al.*, 2006). Em situação de estresse oxidativo, a indução de expressão por OxyR necessita ainda do fator IHF (*integration host factor*) para promover a torção no DNA, visto que a região de ligação de OxyR está localizada entre -236 e -196 bp *upstream* ao sítio de iniciação da transcrição. IscR, por sua vez, liga diretamente na posição do tipo II (entre -56 e -35 *upstream*) (SCHWARTZ *et al.*, 2001). Em condições de diminuição celular de ferro, Fur promove a indução da expressão de RhyB (*small regulatory RNA*), RNA não traduzido que tem a função de promover o recrutamento da maquinaria para a degradação dos mRNA codificantes de IscA, IscS, IscU, mas não de IscR, devido à formação de estruturas secundárias (DESNOYERS *et al.*, 2009). Dessa maneira, não ocorre a maturação de IscR pelo sistema, e apo-IscR é capaz de promover a expressão de operon *SUF*.

O fator de regulação SoxR ancora um cofator [2Fe-2S], necessário para sensibilização por superóxido ou NO. Em *E coli*, SoxR estimula a expressão do fator de transcrição SoxS, que leva à ativação de aproximadamente 45 genes cujos produtos facilitam a remoção do superóxido e reparo de tipos específicos de danos oxidativos que podem ocorrer durante o estresse. SoxR é um homodímero contendo [2Fe-2S]²⁺ por monômero, estado oxidativo ativo para ligação ao DNA e estimulação de transcrição, e a redução à forma [2Fe-2S]⁺¹ elimina a atividade de ativação de transcrição, porém sem desligar da região promotora de SoxS. Sob condições celulares normais, SoxR estaria em seu estado inativo de transcrição, sob a forma reduzida, e o aumento do estresse oxidativo poderia levar ao acúmulo da forma oxidada de SoxR. NO, por outro lado, ativa SoxR através da nitrosilação dos cofatores; visto que a

ativação por NO ocorre em condições anaeróbias, este não requer oxigênio ou qualquer tipo de ROS .

O fator FNR é um regulador global de *E. coli* que controla a expressão de mais de 100 genes em resposta à limitação de oxigênio, geralmente em regiões que permitem ao microrganismo adaptar sua fisiologia à uma via anaeróbia como reprimir genes envolvidos em respiração aeróbia e ativar os que permitem a redução de aceptores de elétrons alternativos. FNR pertence à família de proteínas *helix-turn-helix DNA-binding proteins* que tipicamente funcionam como dímeros. Ao contrário de SoxR, sua habilidade em se ligar em locais específicos do DNA é o que usualmente controla a atividade desta classe de fatores de transcrição. A sua forma ativa de ligação corresponde a um homodímero contendo um cofator $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ por subunidade, sendo o cofator essencial à dimerização, ligação em local específico do DNA e ativação da transcrição. O cofator $[4\text{Fe-4S}]$ da FNR apresenta propriedades redox não usuais, visto que a exposição de FNR contendo cofator $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ a O_2 ocasiona uma rápida conversão a $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$, conversão esta que leva à inativação da capacidade de ligação ao DNA.

1.1.3.3 Proteínas acessórias

Além das proteínas classicamente identificadas com os respectivos sistemas de operon *NIF*, *ISC* e *SUF* descritos anteriormente, verificam-se alguns fatores que não seriam produtos diretos de tais elementos, porém apresentariam função na homeostasia celular de proteínas Fe/S. Destaca-se principalmente proteínas do tipo Nfu, que correspondem à porção C-terminal de NifU de *A. vinelandii* que ancora um cofator $[4\text{Fe-4S}]$, podendo exercer função de arcabouço, e estão envolvidas em processos da maturação da aconitase em *A. vinelandii* e em adaptação a estresse oxidativo e depleção de ferro em *E. coli* (ANGELINI *et al.*, 2008; BANDYOPADHYAY *et al.*, 2008).

O passo inicial para qualquer uma das maquinarias de formação dos cofatores [Fe-S] envolve a mobilização de elementos Fe e S a partir de seus estoques. No entanto, a origem do elemento Fe para a formação do cofator corresponde a mecanismo de difícil compreensão. Não há indícios/estudos relacionados a proteínas clássicas de estoque de Fe, como ferritinas (Ftn) e/ou bacterioferritina (Bfr), por exemplo. A fonte de ferro para a formação dos cofatores [Fe-S] deve ser por uma via estritamente controlada, preventiva de qualquer tipo de sobra/vazamento, para evitar a presença de ferro livre em solução, o qual é potencialmente tóxico; portanto, é necessária uma forte interação entre o doador de ferro e componentes de sistema de formação do cofator [Fe-S]. Fontes sugeridas atualmente residem em: CyaY, proteína homóloga à frataxina eucariótica, que interage com elementos IscU e IscS, porém apresenta baixa afinidade para ligação de ferro (PANDOLFO & PASTORE, 2009); IscA, por sua vez, apresenta alta capacidade de ligação de ferro, mas não interage nem com as proteínas arcabouço e nem com a desulfurase (DJAMAN *et al.*, 2004); SufD foi recentemente citada como possível fonte de ferro para a maquinaria *SUF* em *E. coli*.

1.1.4 Eucariotos

1.1.4.1 Leveduras

Dos mecanismos de formação dos cofatores [Fe-S] verificados em organismos procarióticos, dois deles são observados em eucariotos, *SUF* e *ISC*. Tais maquinarias foram herdadas por células eucarióticas, onde o sistema *ISC* é identificado em mitocôndrias, e o sistema mais suscetível a oxigênio, *SUF*, verificado em plastídios. Por outro lado, duas maquinarias específicas de organismos eucarióticos foram identificadas em leveduras: a matriz mitocondrial de exportação *ISC*, e a maquinaria de formação de proteínas Fe/S citosólica *CIA* (BALK & LILL, 2004).

Proteínas contendo cofatores [Fe-S] em eucariotos podem ser verificadas em mitocôndria, citosol e núcleo e assim como em bactérias estão envolvidas nas mais diversas funções celulares essenciais. Em mitocôndrias, verificam-se os complexos da cadeia respiratória Complexo I (oito cofatores, ligados a domínios expostos da matriz mitocondrial) (SAZANOV & HINCHLIFFE, 2006; SAZANOV, 2007), Complexo II ([2Fe-2S], [3Fe-4S], [4Fe-4S]) e Complexo III (proteína Rieske, contendo cofator coordenado por dois resíduos Cys e dois His) (SUN *et al.*, 2005). Ainda nessa organela, proteínas envolvidas em processos de biossíntese de cofatores (biotina sintase - BioB), no ciclo do ácido cítrico (aconitase - AcoI), síntese de aminoácidos (glutamato sintase), síntese de proteínas Fe/S (ferrodoxina). No citosol, enzimas envolvidas em processos de síntese de aminoácidos (isopropilmalato-isomerase), metabolismo de nucleotídeos (xantina oxidoreductase), regulação de *uptake* de ferro (*iron regulatory protein 1*, IRP1), início de tradução (inibidor de RNase), modificação de tRNA (proteína de alongamento), síntese de proteínas Fe/S (membros da maquinaria CIA) e sinalização de receptores (proteína inibidora de sinalização em receptor tirosina kinase). Finalmente, no núcleo celular, enzimas envolvidas em processos de síntese de DNA (primase), reparo de DNA (helicase) e formação do complexo ribossômico (inibidor de RNase).

1.1.4.1.1 Formação do cofator [Fe-S] na mitocôndria (ISCmf)

A mitocôndria constitui organela necessária para formação de todas as proteínas Fe/S na célula eucariótica, pois possui a denominada “maquinaria de formação ISC mitocondrial” (posteriormente citada como ISCmf), herdada de célula bacteriana durante o evento de endossimbiose. Em torno de 15 proteínas envolvidas em processo de formação biossintética do cofator [Fe-S] em célula eucariótica estão presentes. De uma maneira geral, o cofator é primeiramente formado transientemente em proteína arcabouço conhecida como Isu1 (que corresponde a proteína IscU *like* de procariotos), e posteriormente transferido a proteínas receptoras através do apoio e coordenação de

aminoácidos específicos. Para atuação de Isu1 é necessário primeiramente a atuação do complexo desulfurase Nfs1-Isd11, onde a enzima Isd11 é essencial para a catálise do complexo e liberação de *sulfide*. Embora Isd11 atue como ativador da desulfurase e seja essencial para o sucesso da catálise, não se verificam homólogos de tal proteína em procariotos, ou seja, ela não seria similar em sequência primária a nenhum dos elementos identificados até o momento como ativadores de desulfurases em bactérias (CsdE, SufE). A fonte de ferro para a formação do cofator ainda não foi determinada, porém a única isoforma de ferro presente na mitocôndria seria a forma Fe^{+2} . Carreadores de ferro estão envolvidos em seu processo de entrada na organela (Mrs3/4), e a proteína frataxina (Yfh1) poderia estar envolvida no processo de entrega de ferro a Isu1, bem como proteínas ferredoxina redutases (Arh1, Yah1) estariam envolvidas no processo de redução necessária para a formação do cofator (LILL & MUHLENHOFF, 2008).

Semelhantemente ao verificado em procariotos, o processo para formação do cofator prossegue com os eventos de liberação do cofator de Isu1, transferência para apoproteínas e coordenação deste em aminoácidos específicos. Ssq1, chaperona da família Hsp70 (como HscA de bactéria) interage com a porção LPPVK de Isu1, deslocando o cofator e facilitando sua transferência; Jac1 (HscB-like, co-chaperona) estimula a função ATPase de Ssq1. Um terceiro fator descrito apenas em leveduras (Mge1) permite a troca de ADP por ATP e o início da atividade ATPase (SCHILKE *et al.*, 2006). Outras proteínas verificadas no sistema podem vir a exercer papel chave na entrega dos cofatores e/ou ativação para enzimas alvo. Isa1/2, por exemplo, são necessárias para ativação de Aco1 (MUHLENHOFF *et al.*, 2007) e regeneração do cofator [2Fe-2S] de BioB (JARRETT, 2005), e agiria mimetizando a função de IscA de procariotos.

1.1.4.1.2 Maquinaria de Exportação ISC (ISCme)

A atuação de proteínas Fe/S tanto no citosol quanto no núcleo depende da atividade da função mitocondrial e do sistema ISC mitocondrial, uma vez que a proteína Isu1 presente no citosol não é capaz de formar um cofator transiente, e portanto não exerce a função de maturação das proteínas Fe/S. De uma maneira geral, um fator ainda desconhecido (fator X) é produzido pela maquinaria ISCMf e exportado para o citosol onde atua como fator essencial para maturação de proteínas Fe/S citosólicas. O transporte desse fator é conhecido como Maquinaria de Exportação ISC (ISCme), o qual envolve uma série de componentes, entre eles: Atm1, ABC *transporter* de membrana interna da mitocôndria, Erv1 sulfidril-oxidase e GSH glutationa-oxidase (GELLING *et al.*, 2008; LILL & MUHLENHOFF, 2008).

1.1.4.1.3 Maquinaria Citosólica (CIA)

A Maquinaria Citosólica corresponde a fatores citosólicos envolvidos na maturação de proteínas Fe/S citosólicas e nucleares, todos altamente conservados em eucariotos, e cujo processo de formação do cofator se assemelha ao observado na mitocôndria. Primeiramente, ocorre a formação de um cofator transiente em Cfd1 e Nbp35, que complexadas servem como arcabouço (esse passo necessita auxílio de sistemas ISC mitocondriais, como verificado posteriormente). O passo seguinte, de transferência e maturação de enzimas alvo, envolveria somente as proteínas da maquinaria CIA Nar1 e Cia1.

Elementos Cfd1 e Nbp35 possuem 4 resíduos conservados de cisteína na porção C-terminal para formação do cofator [4Fe-4S], e domínio de ligação de nucleotídeo (ATP ou GTP); Nbp35 possui ainda um segundo cofator na porção N-terminal, no domínio ferredoxina-*like*. Tal complexo arcabouço não interage diretamente com a desulfurase citosólica, mas Nfs1 e outros fatores mitocondriais

(como Atm1, por exemplo) estariam envolvidos na exportação de elementos contendo o elemento enxofre, o qual seria posteriormente entregue à proteína arcabouço. Nar1 possui dois cofatores [Fe-S] orientados por 8 resíduos conservados de cisteína, e Cia1 serviria como sítio de interação entre Nar1 e outros elementos do sistema. Proteínas nucleares contendo cofatores [Fe-S] necessitam tanto a maquinaria ISC mitocondrial quanto CIA citosólica para suas respectivas maturações (NETZ *et al.*, 2007; SRINIVASAN *et al.*, 2007).

1.1.4.2 Eucariotos superiores

Componentes das maquinarias ISCmf/e e CIA são altamente conservados, de eucariotos inferiores a superiores. Visto que os dados acima são relacionados principalmente a espécies de leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, mecanismos similares devem ocorrer em organismos superiores (LILL & MUHLENHOFF, 2005). A determinação de elementos importantes em organismos complexos é realizada por diversas técnicas, onde a técnica de RNA de interferência (RNAi) se apresenta em maior número na literatura. A inibição da proteína frataxina humana (homólogo de *S. cerevisiae* Yfh1), apresenta um fenótipo defectivo na atividade mitocondrial e de enzimas contendo cofatores [Fe-S], também se observa o aumento de ligação de ferro em IRP1 (STEHLING *et al.*, 2004). Nfs1 (huNfs1) e hulsu1 de *Homo sapiens* (componentes centrais de ISCmf) apresentam importância na atividade e morfologia mitocondriais (BIEDERBICK *et al.*, 2006), mesmo fenótipo verificado para *Trypanosoma cruzi* (SMID *et al.*, 2006). Mutante de Grx5 *Danio rerio* estancou a maturação de enzimas [Fe-S] e aumentou a ligação de Fe a IRP1 e síntese de heme, revelando fenótipo anêmico, também verificado em mutação de huGrx5 humana (WINGERT *et al.*, 2005). A avaliação de função de proteínas da maquinaria ISCme na maturação de proteínas citosólicas através de análise de proteína ABCB7 (homólogo humano de Atm1) revelou a diminuição da maturação das enzimas [Fe-S], aumento de ligação Fe em IRP1, mas sem efeito em funções mitocondriais (como de aconitase, por

exemplo) (CAVADINI *et al.*, 2007). A atenuação de huNbp35 humana apresentou fenótipos de drástica redução de crescimento, com alteração nas funções citosólicas, porém não foi observado alterações mitocondriais. Portanto, de uma maneira geral, observa-se certa similaridade de funções e conservação de elementos em maquinarias ISCmf e ISCme, bem como na atuação da maquinaria CIA em eucariotos.

Por outro lado, identificou-se determinantes alternativos envolvidas na maquinaria ISCmf/e no citosol e núcleo de células humanas, como huNfs1 (funcional como cisteína desulfurase), hulsu1, huNfu1 e frataxina (ROUAULT & TONG, 2005). A presença dessas diferenças entre organismos eucariotos podem estar relacionadas a alguma vantagem evolutiva oferecida por tais elementos a organismos superiores. Diferenças relacionadas à homeostase de ferro também são observadas. Em leveduras, o principal fator envolvido no controle da aquisição celular de ferro corresponde ao Aft1, que é translocado para o núcleo onde ativa transcricionalmente genes do regulon de ferro. Este processo estaria ligado à disponibilidade celular de ferro para o metabolismo dos cofatores [Fe-S] na mitocôndria, que por sua vez sintetiza um componente regulatório (através de ISCmf), que é exportado ao citosol pelo sistema ISCme (Atm1), e que o fator Aft1 entre no núcleo e ative o regulon ferro. Tal evento é comprovado verificando-se que a inatividade de sistemas ISCme/f levam a *overload* de ferro mitocondrial. Por outro lado, em mamíferos a homeostase de ferro é regulada de maneira pós-transcricional através dos reguladores IRP1 (que contém cofator [4Fe-4S]) e IRP2 (sem cofator, porém também sensível a ferro). O mecanismo de regulação envolve a mudança conformacional na apoforma e estabilização mRNAs por ele regulados ao ligar-se na porção 3' (*transporter*, receptor transferrina), ou impedindo a tradução ao ligar-se na porção 5' (ferritina). Como determinado anteriormente, IRP1 é dependente de uma função mitocondrial ISCm para ancorar seu cofator [Fe-S]. Além disso, outra diferença em relação às leveduras seria que a maquinaria CIA (através de huNbp35) também está envolvida no metabolismo de IRP1, adquirindo papel na regulação de Fe da mesma maneira, em eucariotos superiores (ROUAULT, 2006; WALLANDER *et al.*, 2006).

1.1.4.2.1 Processos Patológicos

Diversos processos patológicos são observados em eucariotos superiores envolvendo tanto defeitos em proteínas Fe/S quanto a alteração no processo de formação dos cofatores e maturação de apoproteínas. A diminuição de frataxina em mais de 70% causa a ataxia autossômica recessiva conhecida como ataxia de Friederich, onde se constata defeitos nas proteínas Fe/S mitocondriais, acúmulo de ferro na mitocôndria, tecidos cardíaco e neuronal levando a deficiência em enzimas do complexo I e III da cadeia respiratória e aconitase, hipertrofia cardíaca, disfunção neuronal, diminuição de expectativa de vida e susceptibilidade a crescimento tumoral (ROTIG *et al.*, 1997; PUCCIO & KOENIG, 2002). Mutações na ABCB7 é a causadora da Anemia Sideroblástica e Ataxia Cerebelar ligada a cromossomo X (XLSA/A), onde se conferem acúmulo de ferro na forma de anéis sideroblásticos na mitocôndria, levando a defeito nas proteínas Fe/S do citosol e defeitos de heme. Defeito funcional em glutaredoxina (Grx5) é verificado na anemia microcítica com acúmulo de ferro e modificações na mitoferrina (homólogo de Mrs3/4) é causadora de protoporfiria eritropoiética (CAMASCHELLA *et al.*, 2007). Outros casos menos comuns tratam de defeitos genéticos em Adrenodoxina redutase (ADR, homólogo de Arh1) e Succinato desidrogenase (complexo II de cadeia respiratória), ambas proteínas envolvidas no processo de supressão tumoral (HWANG *et al.*, 2001). Defeitos em NADH ubiquinona redutase (complexo I de cadeia respiratória) levam a doenças mitocondriais como encefalomiopatia mitocondrial e acidose láctica.

Processos patogênicos ligados diretamente à homeostase de DNA também estão relacionados, como XPD helicase, que possui cofator [Fe-S] essencial para atividade e está envolvida em processos de excisão e reparo de DNA e em processos patológicos verificados em Xeroderma Pigmentoso e Síndrome de Cockayne; mutações na proteína FancJ são constatadas na anemia de Fanconi, e MYH (homólogo Ntg2) que atua fisiologicamente como DNA glicosilase no processo de reparo de DNA e está associada ao câncer de colo do útero (SHEFTEL *et al.*, 2010).

1.1.4.3 Organismos Vegetais

As organelas celulares vegetais plastídio e mitocôndria possuem mecanismos genética e bioquimicamente diferentes para a formação dos cofatores [Fe-S], o que evidencia que plantas possuem sistema único de formação dos cofatores e maturação de proteínas, de maneira compartimentalizada e adaptada às necessidades específica de uma célula eucariótica fotossintetizante.

1.1.4.3.1 Plastídios

A verificação de que cloroplastos são capazes de maturar apo-ferrodoxinas possibilitou a identificação de um sistema de formação dos cofatores [Fe-S] nesta organela. De fato, existe um sistema de síntese no estroma de plastídios, o qual é diretamente dependente de ATP e NADPH fornecido através da incidência de luz, o que relaciona ambos os eventos de formação dos cofatores [Fe-S] e fotossíntese.

Análise genômica de *Arabidopsis thaliana* permite a identificação da desulfurase PLP dependente NFS2 em plastídio, envolvida em doação de enxofre para a formação do cofator. De acordo com análise de sequências primárias, NFS2 está ligada ao tipo II de desulfurases (*SufS-like*), corroborada pelo fato de utilizar uma segunda molécula (ativadora) para aumento de sua ação desulfurase (LEON *et al.*, 2002). Outros elementos também homólogos ao sistema *SUF* bacteriano foram identificados, como CpISCA (*SufA-like*, envolvida em transferência/carreamento do cofator) (ABDELGHANY *et al.*, 2005) e NAP7, NAP6 e NAP1 homólogas de SufC, SufD e SufB, respectivamente (XU & MOLLER, 2004; HJORTH *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2005). A similaridade de elementos plastidiais com fatores do sistema *SUF* bacteriano é interessante, visto que este sistema está ligado a processos de estresse oxidativo em bactérias e os cofatores [Fe-S] formados no cloroplasto, por sua vez, requerem uma maior resistência ao oxigênio, visto sua relação ao metabolismo de oxigênio. No

entanto, proteínas homólogas a outros sistemas que não o *SUF* também são verificados em cloroplastos, como os genes NFU (NifU C-terminal-*like*), NFU1, NFU2 (com função de arcabouço comprovada *in vivo*) e NFU3 (LEON *et al.*, 2003). De fato, maquinarias distintas podem estar envolvidas na formação e associação dos cofatores [Fe-S] no plastídios, visto que nem todas as proteínas Fe/S maturadas nesta organela estão diminuídas após experimentos genéticos de depleção de moléculas chave, como *nfu*. Este fato permitiu a identificação de outras proteínas Fe/S na organela, como HCF101 e Apo1, do fotossistema 1 de fotossíntese (AMANN *et al.*, 2004; SCHWENKERT *et al.*, 2010).

1.1.4.3.2 Mitocôndrias e Citosol

Em mitocôndrias, verifica-se a presença de desulfurases PLP dependente NFS1, pertencente a grupo I de cisteínas desulfurase e, portanto, não necessitando ativador molecular acessório. Além disso, apresenta diversos componentes homólogos à maquinaria *ISC* bacteriana e de leveduras, como dois representantes NFU (NFU4 e NFU5) e os elementos *IscU/IscU-like* (*AtISU1*) verificados em *A. Thaliana*, bem como *ISA* (*IscA-like*), frataxina e *HSP70 like*. Dessa forma, identificam-se em mitocôndria de plantas diversos componentes chaves para a formação dos cofatores [Fe-S], como previamente descrito em leveduras, indicando que a organela é capaz de formar seus cofatores [Fe-S] para maturação das proteínas alvo. Da mesma maneira, a identificação dos homólogos de elementos conferidos no citosol de leveduras constata a presença de *AtATM3* (*Atm1 like*) e *Erv1p*, bem como *Nar1-like* e *Nbp35-like* (BALK & LOBREAUX, 2005).

1.2 *Enterococcus spp.*

1.2.1 Características Gerais

Microrganismos representantes do gênero *Enterococcus spp.* apresentam-se em forma de cocos aos pares ou cadeias curtas e possuem fenótipo positivo para a coloração clássica de Gram. Primeiramente classificados como membros do gênero *Streptococcus*, descritos como “estreptococos do grupo D de Lancefield”, ou ainda “estreptococos de origem fecal”, estes microrganismos receberam nova caracterização a partir de estudos sorológicos acompanhados de técnicas de classificação moleculares modernas. A nova classificação permitiu a separação do gênero patogênico *Streptococcus* do não patogênico e tecnicamente importante *Lactococcus*. Ao microrganismo anteriormente citado como estreptococcus fecal denominou-se o gênero *Enterococcus*, pertencente à família *Enterococcaceae* (DEVRIESE *et al.*, 1995).

Enterococos se caracteriza como um complexo e diversificado grupo de bactérias, importante em termos de interação com mamíferos e humanos. São microrganismos anaeróbios facultativos, que apresentam um crescimento ótimo a 35°C, sendo que a maioria das linhagens cresce entre 10 e 45°C. Todas as espécies apresentam crescimento em meio contendo altas concentrações de sal (6,5% NaCl), hidrolizam esculina em presença de 40% de sais biliares e pH 9.0, além de admitirem extensa variação de pH para crescimento. A característica de motilidade é observada em algumas espécies. A maioria das espécies hidrolizam *pyrrolidonyl-β-naphthylamide* (PYR) e *leucine-β-naphthylamide* (LAP), são homofermentativas, sem produção de gás, e apresenta o ácido láctico como produto final de fermentação da glicose. Muitas linhagens possuem um antígeno associado à parede celular (ácido teicóico), que pode ser identificado como antígeno de estreptococos do grupo D. O conteúdo G+C de DNA se situa entre 37 - 45 mol % (MURRAY, 1990).

Enterococcus spp. são consideradas bactérias com natureza vigorosa, com características de tolerância ao calor, salinidade, pH e dessecação. Isto permite seu crescimento e sobrevivência nos mais diferenciados ambientes, mesmo que não propícios. Portanto, podem colonizar vários nichos, sendo encontrados em solo, alimentos, água, plantas e animais (mamíferos, pássaros e insetos). Em mamíferos, especialmente humanos, habitam o trato gastrointestinal e genitourinário. A persistência de determinadas espécies de *Enterococcus spp.* varia de acordo com o hospedeiro, bem como idade e dieta do mesmo. O ambiente do trato gastrointestinal humano é um ecossistema bacteriano complexo, onde em média de 400 a 500 espécies podem estar presentes, apesar de geralmente haver o predomínio de poucas espécies. A microbiota intestinal apresenta uma rede complexa de interações mútuas ou antagônicas entre os microrganismos. Para se estabelecer no intestino, a bactéria deve primeiramente aderir à mucosa para não sofrer ação mecânica do peristaltismo, ou multiplicar-se a uma taxa que exceda a sua taxa de eliminação. A bactéria necessita ainda competir por nutrientes, fatores de crescimento, e se ligar a locais e confrontar uma eventual colonização de bactérias já estabelecidas resistentes a ela, o que gera um ambiente inibitório entre competidores em potencial. *Enterococcus* compreendem os cocos Gram positivos predominantes em fezes humanas, apresentando uma taxa de 10^5 a 10^8 UFC/g de fezes, sendo a espécie *Enterococcus faecalis* uma das bactérias mais facilmente isoladas do trato gastrointestinal de humanos (AARESTRUP *et al.*, 2000).

1.2.2 Importância Econômica

Linhagens de *Enterococcus spp.* apresentam importância industrial devido à sua função no desenvolvimento de características organolépticas em alimentos, sendo encontrados como componentes de microbiota natural em determinados alimentos onde podem contribuir com efeitos benéficos ao produto. Como exemplo, estes microrganismos são essenciais da microbiota natural de vários produtos derivados de leite e, em alguns casos, aparecem em número maior que lactobacilos e lactococcus.

Estão associados à produção de queijos tradicionais na região europeia do mediterrâneo, podendo ter origem em fontes diferenciadas (fezes de animais que fornecem o leite, água contaminada, aparelhos de estocagem do material, durante processo de ordenha, etc), e sua prevalência ocorre possivelmente pelas condições não higiênicas durante o processo de coleta e processamento, e à sua habilidade de crescimento em diferentes substratos, como ambientes de alta salinidade e baixo pH. Neste ambiente, contribuem para o desenvolvimento de sabor, aroma, cor e estrutura característica dos produtos devido a aumento da atividade proteolítica, estereolítica e à presença de grupos amino livres, bem como à ação positiva ao crescimento de bactérias produtoras de ácido lático. Em carnes, enterococos apresentam um alto potencial de contaminação devido à sua presença no trato gastrointestinal dos animais de abate que provêm uma gama de produtos para alimentação. Por serem termotolerantes, estão associados à contaminação de carnes tanto não-processadas quanto processadas; entretanto, em determinadas iguarias podem atuar positivamente conferindo características organolépticas particulares (FRANZ *et al.*, 2003; GIRAFFA, 2004).

Dessa maneira, colônias de *Enterococcus spp.* são utilizadas como *starter culture* na indústria alimentícia, adicionadas aos produtos (com o devido controle tecnológico e metabólico) com o intuito de proporcionar o desenvolvimento de diferenciados tipos de queijos e salames, bem como para se utilizar de duas características interessantes desse microrganismo: produção de bacteriocinas, peptídeos que conferem proteção a microrganismos como AS-48, ativa contra *Listeria monocytogenes*, envolvida em processos de infecção alimentar; atividade probiótica, onde o consumo de determinados microrganismos vivos afetam benéficamente o hospedeiro melhorando a microbiota normal endógena deste, através da inibição de organismos patogênicos, solidificação da barreira da mucosa intestinal e estimulação do sistema imune (CINTAS *et al.*, 2000; SARANTINOPOULOS *et al.*, 2002; MORENO *et al.*, 2006).

1.2.3 Importância Clínica

Linhagens de *Enterococcus spp.* estão envolvidas em infecções de trato urinário, abscessos intra-abdominal, bacteremia, endocardite, infecções osteo-articulares e meningites. Bacteremia com posterior endocardite, frequentemente observada em pacientes idosos e/ou imunodeprimidos corresponde à principal complicação associada a este microrganismo e, pela característica de microrganismos comensais no trato gastrointestinal de humanos, atuam principalmente como patógenos oportunistas, em indivíduos imunossuprimidos. O gênero *Enterococcus spp.* é de especial importância na medicina devido à sua alta incidência em doenças decorrentes de infecções nosocomiais. Bactérias do gênero se apresentam como o maior patógeno associado a este tipo de infecções, onde *E. faecalis* é o de maior prevalência (aproximadamente 80%) seguido por *Enterococcus faecium* (PATTERSON *et al.*, 1995; SAMUELSSON *et al.*, 2003; TENDOLKAR *et al.*, 2003).

1.2.3.1 Patogenicidade e Fatores de Virulência

Através da atuação de uma variedade de fatores de virulência, enterococos promovem mudanças patológicas relacionadas a uma inflamação aguda. A atividade de adesão celular ocorre devido à produção da substância de agregação (AS), uma adesina codificada por plasmídios sexuais que promove a formação de agregados celulares. A sua atividade consiste na ligação a uma grande variedade de células nas proteínas integrinas B2 (como macrófagos e células epiteliais intestinais) e também a proteínas da matriz extracelular (como fibronectina e colágeno tipo 1) (SARTINGEN *et al.*, 2000). A proteína de superfície de *Enterococcus spp.* (Esp), constitui uma segunda adesina, de codificação cromossomal, com maior prevalência em *E. faecalis*, e contribui para a colonização e persistência do patógeno, com atividade direta na ligação com a matriz extracelular do hospedeiro humano (SHANKAR *et al.*, 1999), e

está associada à formação de biofilme por parte do microrganismo (CRETI *et al.*, 2006). A adesina de colágeno do *E.faecalis* (Ace), por sua vez, liga-se não somente ao colágeno (I e IV), mas também à laminina de matriz extracelular (KOWALSKI *et al.*, 2006).

As atividades de invasão e translocação do enterococos também são mediadas pela substância AS que agem como adesina e invasina, e promovem a aderência a células polimorfonucleares (neutrófilos) e macrófagos humanos. Esse fato confere a característica de evasão aos mecanismos de defesa do hospedeiro, visto que aumenta a sobrevivência dos enterococos nas células hospedeiras como neutrófilos e macrófagos. Em neutrófilos ativados, fagossomas contendo AS ligados se apresentam maiores em enterococos quando comparados a fagossomas contendo enterococos opsonizados, sugerindo que a modificação na maturação do fagossoma estaria envolvida na resistência à morte de enterococos ligados ao fator de virulência AS. Além disso, o pH no interior de fagossomas polimorfonucleares contendo células não opsonizadas é maior, o que confere maior resistência à atuação dos macrófagos. Os neutrófilos polimorfonucleares são a primeira linha de defesa em resposta a uma invasão de microrganismos, e a atividade de neutrófilos é primeiramente dependente do complemento ativado tanto por via clássica quanto alternativa. A característica de resistência à fagocitose pelos enterococos é considerada como uma das linhas de escape promovida pela resposta imune do hospedeiro (TENG *et al.*, 2002).

Enterococcus spp. têm a capacidade de produção de um tipo de toxina, a citolisina (Cyl), uma beta-hemolisina responsável pela promoção da lise de células do sistema imune. Apesar de ser considerado um fator de virulência celular que aumenta a patogenicidade do microrganismo, a citolisina não representa um pré-requisito para a virulência, visto que linhagens não-hemolíticas podem causar infecção (GILMORE *et al.*, 1994). A produção de proteases também está ligada à patogenicidade de enterococos, visto que gelatinase/metalloendopeptidase extracelulares agem no colágeno dos tecidos do hospedeiro (OKAMOTO *et al.*, 1997) favorecendo sua virulência.

Por serem patógenos oportunistas, e pela caracterização crescentes de linhagens de *E. faecium* e *E. faecalis* multi-resistentes em surtos de infecções nosocomiais, a grande variedade de resistência a antibióticos é considerada atualmente como um fator de patogenicidade. *Enterococcus* apresentam resistência intrínseca cromossomal a antibacterianos como cefalosporinas, beta-lactâmicos, sulfonamidas, baixos níveis de clindamicina e aminoglicosídeos. Através da transferência horizontal de genes estes microrganismos são capazes de adquirir resistência a cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina, altos níveis de beta-lactâmicos, fluoroquinolonas e glicopeptídeos incluindo a vancomicina, o antibacteriano de última escolha em hospitais para o tratamento de infecção causado por enterococos multiresistentes (HUYCKE *et al.*, 1998; KAYSER, 2003).

A exposição dos microrganismos a substâncias antimicrobianas induz a produção de espécies reativas de oxigênio (SZEMES *et al.*, 2010). Em *E. faecalis*, a função de enzimas envolvidas em resposta e defesa a estresse oxidativo exibem papel central na habilidade de *E. faecalis* em resistir e suportar a morte celular induzida pelo antimicrobiano e/ou por processos fagocíticos, onde o radical superóxido parece ter papel efetor chave no processo de morte bacteriana (BIZZINI *et al.*, 2009). O regulador transcricional Ers (*enterococcal regulator of survival*), membro de família Crp/Fnr e similar a reguladores PrfA-like (*Streptococcus*, *Listeria*) é essencial para suportar os processos de estresse oxidativo, principalmente em modelos de infecção em macrófagos contribuindo, portanto para o processo de virulência do microrganismo (GIARD *et al.*, 2006; RIBOULET-BISSON *et al.*, 2008), assim como, os reguladores HypR e PerR, envolvidos em ativação de enzimas como a catalase, glutatona redutase e hidroperóxido redutase durante esses processos (VERNEUIL *et al.*, 2004; VERNEUIL *et al.*, 2005; VERNEUIL *et al.*, 2005).

1.3 Processos patogênicos e alvos moleculares

A caracterização genética e bioquímica das maquinarias para formação e associação dos cofatores [Fe-S] possibilitou a identificação de diferenciadas proteínas ligadas ao metabolismo dos cofatores [Fe-S] em organismos patogênicos e oportunistas. Microrganismos patogênicos podem apresentar características interessantes, como a apresentação de elementos *NIF* de formação dos cofatores [Fe-S]. O parasita protozoário amitocondrial *Entamoeba histolytica*, por exemplo, apresenta proteínas Fe/S envolvidas no metabolismo energético maturadas por EhNifS e EhNifU, ortólogos do sistema *NIF* (ALI *et al.*, 2004).

Dentre os microrganismos patogênicos mais estudados recentemente, dois procarionotes já apresentam uma base de dados extensa, *Mycobacterium tuberculosis* (patógeno de animais) e *Erwinia chrysanthemi* (patógeno de vegetais). Análise do genoma de *M. tuberculosis* H37Rv demonstrou a presença de diversas regiões de leitura contendo resíduos conservados de cisteína (CXXC) orientando cofatores [2Fe-2S] e [4Fe-4S] e que estariam envolvidos em atividades como divisão celular, patogênese, resistência a antimicrobianos, sensibilidade ao estresse oxidativo e assimilação à falta de nutrientes, (ALAM *et al.*, 2007; SINGH *et al.*, 2007; ALAM & AGRAWAL, 2008 CARROLL *et al.*, 2005). A via de formação dos cofatores [Fe-S] apresenta o sistema *SUF*, sistema atualmente considerado como alvo molecular para desenho de antimicrobianos focando o tratamento de infecções por *M. tuberculosis*. *E. chrysanthemi* compreende o microrganismo causador de diversos processos patológicos em plantas, onde aquisição de ferro e estresse oxidativo contribue para o processo patológico, este microrganismo apresenta os três sistemas responsáveis pela formação e associação dos cofatores [Fe-S]; *NIF*, *ISC* e *SUF*. Tal multiplicidade parece estar envolvida com a capacidade do microrganismo de infectar diferenciados hospedeiros vegetais onde IscR, especificamente, atua na capacidade de colonização de diversos hospedeiros por parte desse microrganismo. Genes do sistema *SUF* também apresentam função importante, visto que a inativação do gene *sufC* identificou os seguintes fenótipos no microrganismo: aumento da sensibilidade a agentes oxidantes, diminuição da

capacidade de causar uma infecção efetiva nas plantas, atividade diminuída das enzimas que contêm cofatores [Fe-S] lábeis oxidativos, e perda da capacidade de assimilar ferro a partir de sideróforo criobactina (NACHIN *et al.*, 2001; NACHIN *et al.*, 2003; EXPERT *et al.*, 2008; RINCON-ENRIQUEZ *et al.*, 2008).

Diversos outros organismos caracterizadamente patogênicos apresentam dados iniciais ligando a maquinaria de produção de elementos [Fe-S] com processos de patogenicidade, podendo envolver proteínas diretamente ligadas ao processo de formação dos cofatores, ou simplesmente proteínas que ancorem esses cofatores. A proteína YtfE, ligada a reparo dos cofatores danificados por ação de estresse oxidativo está também relacionado ao processo de virulência em *Haemophilus influenzae*. Genes regulados por FNR em *Neisseria meningitidis* estão relacionados aos processos de proliferação do microrganismo (BARTOLINI *et al.*, 2006). IscR em *Pseudomonas aeruginosa* é necessária para atividade de KatA, enzima essencial para os processos de virulência desse microrganismo (KIM *et al.*, 2009). *Yersinia pestis*, causadora da peste bubônica, apresenta o sistema *SUF* induzido sob condições de diminuição de ferro, evasão de resposta imune de hospedeiro e auxílio na capacidade de infecção e disseminação em hospedeiros mamíferos (PIEPER *et al.*, 2010). O patógeno causador de desintéria *Shigella flexneri* apresenta os sistemas *ISC* e *SUF*, e ambos apresentam expressão aumentada em ensaios de virulência utilizando células de Henle (RUNYEN-JANECKY *et al.*, 2008). *Listeria* spp. apresenta reguladores de transcrição do tipo Crp-Fnr, associados a processos de patogenicidade (LAMPIDIS *et al.*, 1994). O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* apresenta fatores relacionados ao metabolismo e transporte de ferro, genes *isc*, e enzimas relacionadas a metabolismo de enxofre superexpressas, indicando possível função destas vias no processo de patogenicidade (ANDRADE *et al.*, 2006). Patógenos clássicos apresentam proteínas que orientam cofatores [Fe-S] e estão associados a seus respectivos processos de virulência. Três proteínas contendo cofatores [Fe-S] no operon *lutABC*, envolvido no catabolismo de L-lactato em *Bacillus subtilis*, estão também envolvidos na síntese de biofilme (CHAI *et al.*, 2009). A proteína WhiD, necessária para processos de esporulação no microrganismo Gram-positivo *Streptomyces coelicolor* orienta cofatores [2Fe-2S] e [4Fe-4S] através de resíduos Cys conservados (JAKIMOWICZ *et al.*, 2005). Inativação

da aconitase, em *Staphylococcus aureus* promove fenótipo de redução na produção de diversos fatores de virulência e de processo de patogenicidade em camundongos (SOMERVILLE *et al.*, 2002). Ferritina B, envolvida em homeostase e estoque de Fe de *Salmonella enterica* apresenta função essencial para processo de virulência em modelos animais de camundongos (VELAYUDHAN *et al.*, 2007).

A ligação do metabolismo de proteínas Fe/S celulares e uma possível função como potencial alvo molecular para o desenvolvimento de drogas contra os microrganismo também deve ser considerado, seja proteínas da maquinaria de formação [Fe-S] (como verificado em *M. tuberculosis*) ou enzimas que ancorem este cofator. Atualmente, considera-se o metabolismo de ferro como um alvo promissor para estratégias antibacterianas, visando contornar o problema de adaptação bacteriana a antimicrobianos, visto a dependência de microrganismos de assimilação de ferro para seus processos de desenvolvimento e virulência. O reconhecimento do elemento ferro e seu transporte ativo se baseiam na biosíntese e uso de componentes quelantes, seletivos de microrganismos denominados sideróforos. Três estratégias estariam envolvidas na exploração das fraquezas do metabolismo de ferro microbiano: a estratégia “cavalo de tróia” que toma proveito de sistemas de *uptake* de ferro naturais para entrega de componentes antimicrobianos dentro das células; o uso de antagonistas e quelantes de ferro para reduzir a avaliabilidade de ferro ao microrganismo; e/ou a inibição de passos enzimáticos de metabolismo de ferro através de compostos químicos (MILLER *et al.*, 2009).

2. JUSTIFICATIVA

Microrganismos Gram-negativos como *A. vinelandii* e *E. coli* apresentam maquinarias de formação dos cofatores [Fe-S] bem determinadas e caracterizadas, que são também observadas em microrganismos filogeneticamente relacionados a elas, *Proteobacteria*. Embora não se verifique caracterização genética e bioquímica das maquinarias de formação de proteínas Fe/S para *Firmicutes*, evidências apontando para proteínas de formação dos cofatores ou ancorando [Fe-S] são verificadas na literatura. Interessantemente, diversos processos patológicos estão também associados a estes elementos. Maquinarias identificadas previamente em *Proteobacteria*, como *NIF*, *ISC* e *SUF*, podem servir de base para estudos em microrganismos de localização evolutiva mais longínqua, como *Firmicutes*, por exemplo. Recentemente, o transcriptoma de *E. faecalis* sob condições de cultivo em presença de sangue apresentou aumento de diversos genes ligados ao processo de virulência (VEBO *et al.*, 2009), demonstrando a importância do elemento ferro para o processo de patogenicidade do microrganismo. Da mesma maneira, *E. faecalis* apresenta relação entre patogenicidade e processos de estresse oxidativo, eventos estritamente relacionados a sistemas de formação dos cofatores [Fe-S] em *Proteobacteria*. Dessa forma, é de relevante importância a caracterização da maquinaria de formação e associações dos cofatores [Fe-S] em *E. faecalis*, o que permitiria uma posterior avaliação desta rota em processos de patogenicidade do microrganismo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

O presente trabalho tem como objetivo geral caracterizar a maquinaria de biossíntese do cofator [Fe-S] em *E. faecalis* através da análise bioinformática aplicada, produção recombinante e análise de expressão dos genes relacionados com o intuito da caracterização bioquímica do microrganismo. Além disso, através de técnicas de bioinformática estrutural, caracterizar mudanças estruturais em proteínas envolvidas no processo de formação dos cofatores [Fe-S] e seu envolvimento na entrega dos cofatores as proteínas alvo.

3.2 Objetivos específicos

- i. Pesquisa de genes envolvidos na biossíntese dos cofatores [Fe-S] em microrganismos Gram-positivos, particularmente *E. faecalis*, por meio da análise de sequências primárias depositadas em banco de genomas, utilizando como modelo os genes responsáveis pela biossíntese em procariotos previamente caracterizados como *E. coli* e *A. vinelandii*;
- ii. Análise de região promotora de regiões observadas e verificação de possíveis sítios para atuação de elementos reguladores e controladores da expressão do sistema;
- iii. Análise de perfil de expressão sob condições diferenciadas de crescimento celular deste sistema em *E. faecalis* sob condições normais e estressantes

- de crescimento, envolvendo depleção dos níveis de ferro e indução do estresse oxidativo, e caracterização dos genes *tuf*, *23SrRNA*, *kat*, *oxyR* e *fur* segundo seu nível de transcrição pelo método de PCR em Tempo Real;
- iv. Amplificação e clonagem, dos genes *sufC*, *sufD*, *SufS*, *sufU*, *sufB* em vetores de expressão sob controle de promotores diferenciados;
 - v. Produção recombinante através de superexpressão em hospedeiro *E. coli*, e purificação das proteínas SufC, SufD, SufS, SufU, SufB;
 - vi. Determinação da atividade bioquímica das proteínas SufU, SufS, SufC, SufSU para identificação de elementos responsáveis por atividades específicas no sistema de formação dos cofatores [Fe-S] através da reconstituição *in vitro* dos cofatores, ensaios de atividade da cisteína desulfurase e ATPase, respectivamente;
 - vii. Experimentos *in vivo* de complementação das *Proteobacteria A. vinelandii* (sistema *ISC*) e *E. coli* (sistemas *ISC* e *SUF*);
 - viii. Experimentos de modelagem molecular de proteínas do sistema *sufCDSUB*, utilizando como molde dados cristalográficos presentes em bancos de dados estruturais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Bioinformática

Os genomas de *E. faecalis* V583, *A. vinelandii* DJ, *E. coli* K12 utilizados como base para diferenciadas metodologias descritas nessa seção, bem como sequências de outros organismos utilizadas para experimentos adicionais, foram previamente sequenciadas e depositadas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>).

Busca de sequências ortólogas em diferenciados genomas foram realizadas através da ferramenta BLAST (blastn, tblastn, blastp, psi-blast) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) e do *DOE JOINT Genome Institute* (www.jgi.doe.gov).

Alinhamentos múltiplos de sequências foram realizados utilizando ferramentas MUSCLE e ClustalW2 do *European Bioinformatics Institute* (EBI-EMBL - www.ebi.ac.uk/clustalw). Alinhamentos foram curados utilizando o algoritmo GBlocks. Análises filogenéticas foram realizadas utilizando programa PhyML, e árvores genealógicas foram curadas e visualizadas utilizando programas TreeDyn e o servidor da árvore da vida, Itol (www.itol.embl.de).

Análises de sequências consenso e resíduos conservados foram realizados através de ferramentas ClustalX2, MEGA e Geneious.

4.2 Modelagem Molecular

Modelagens moleculares (MM) comparativas foram realizadas utilizando dados estruturais cristalográficos depositados no *Protein Data Bank* (PDB), e estruturas primárias de proteínas de interesse obtidas a partir de *GenBank* foram utilizadas para a

construção do modelo. Os pares molde/modelo apresentados neste trabalho foram os seguintes: *Streptococcus pyogenes* SufU (PDB ID 1su0)/*E. faecalis* SufU; *S. pyogenes* SufU (PDB ID 1su0)/*E. coli* IscU; *Synechocystis* SufS (PDB ID 1t3i)/ *E. faecalis* SufS; *E. coli* SufC (PDB ID 2d3w)/ *E. faecalis* SufC; *E. coli* SufCD (PDB ID 2zu0)/ *E. faecalis* SufD; *E. coli* SufCD (PDB ID 2zu0)/*E. faecalis* SufB.

Projetos de modelagem molecular foram curados e validados através do SWISS-MODEL. DSSP e PROCHECK foram utilizados para controle de modificação de estrutura secundária das estruturas e para validação de modelos construídos.

4.3 Simulações de Dinâmica Molecular

Simulações de dinâmica molecular (DM) foram realizadas utilizando os pacotes de simulação GROMACS e o campo de força GROMOS96 *force field* (BERENDSEN *et al.*, 1995; VAN DER SPOEL *et al.*, 2005). Estruturas protéicas (mole ou modelo) foram solvatadas em seus estados monoméricos em uma caixa dodecaédrica utilizando moléculas de água como solvente (*periodic boundary conditions and the SPC water model*) e contra íons foram adicionados para a neutralização do sistema. O protocolo de DM foi baseado em estudos prévios, onde cada sistema foi submetido primeiramente à minimização de energia utilizando o algoritmo *Steepest Descents*. Variáveis importantes como temperatura e pressão foram mantidas constantes, com a constante dielétrica ajustada para $\epsilon = 1$, e temperatura para 310 K. O sistema foi aquecido lentamente de 50 para 310 K, com o aumento gradual de 50K na temperatura. Os programas VMD e Swiss-PDB Viewer (SPDBV - <http://www.expasy.org/spdbv>), foram utilizados para monitoramento e análise das estruturas obtidas e PyMOL (<http://www.pymol.org>) foi utilizado para visualização das moléculas e confecção de gráficos.

4.4 Análises de região promotora

Análise de regiões promotoras e caracterização de genes pertencentes a operon e regulon em *sufCDSUB* de *E. faecalis* e *sufABCDSE* de *E. coli* foram realizadas utilizando as ferramentas *Database of Prokaryotic Operons - DOOR* (<http://csbl1.bmb.uga.edu/OperonDB/DOOR.php>) (DAM *et al.*, 2007) e *Microbesonline* (<http://www.microbesonline.org/>) (DEHAL *et al.*, 2010). Caracterização de regiões regulatórias foram realizadas através da construção de matrizes de similaridade entre regiões *upstream* de operon *sufCDSUB* de *E. faecalis*, tomando por base regiões descritas em *sufABCDSE* de *E. coli* utilizando a ferramenta *PREDetector* (<http://www.montefiore.ulg.ac.be/~hiard/PreDetector>) (HERTZ & STORMO, 1999).

4.5 Linhagens, Construções plasmidiais e Meios de Cultura

Linhagens de *E. faecalis*, *A. vinelandii* e *E. coli* utilizadas neste estudo estão listadas na Tabela 1, e plasmídeos utilizados para experimentos *in vivo* e vetores utilizados para superexpressão de proteínas recombinantes estão listados na Tabela 2.

O crescimento de microrganismos foi realizado utilizando os seguintes meios de cultura: *Lauria Broth* (10.0 g triptona, 5.0 g extrato de levedura, 5.0 g NaCl por litro); meio mínimo M9; meio M9 suplementado (5.0 mM Adenina, 0.3 mM Leucina, 0.3 mM Isoleucina, 0.1 mM Ácido Nicotínico, 0.3 mM Tiamina e 0.3 mM Valina); Meio *Brain Heart Infusion* (BHI); Meio Burk (BN) modificado (STRANDBERG & WILSON, 1968), contendo 2% sacarose como fonte de carbono e 13.0 mM Acetato de Amônio como fonte de nitrogênio.

Antibióticos utilizados e respectiva concentração: Ampicilina (100 µg/mL), Rifampicina (100 µg/mL), Canamicina (50 µg/mL), Gentamicina (50 µg/mL), Tetraciclina (50 µg/mL).

Demais reagentes químicos: Lactose 1% peso/volume (p/v) foi utilizada em caso de superexpressão de vetor com controle de operon *lac* em hospedeiro *E. coli*; Arabinose 0.3% (p/v) foi utilizada para superexpressão de vetor com controle de promotor arabinose em hospedeiro *E. coli* e/ou *A. vinelandii*. X-gal foi utilizada como meio seletivo a uma concentração final de 0.6 mg/ml em experimentos de clonagem e recombinação homóloga.

Tabela 1: Linhagens bacterianas utilizadas no projeto.

Linhagem	Descrição	Marcador*	Origem/Referência
<i>E. faecalis</i>			
FA22	linhagem laboratorial	-	(Jacob <i>et al.</i> , 1975)
JH22	linhagem laboratorial	-	(Yagi & Clewell, 1980)
X1	amostra clínica	VAN	(Swenson <i>et al.</i> , 1995)
<i>A. vinelandii</i>			
DJ1418	$\Delta scrX::lacZ:KanR$	KAN	(Johnson <i>et al.</i> , 2006)
AES1	$\Delta scrX::(araC sufC)$	RIF	DJ1418 x pEFSE3 x pDB303 ^a
AES2	$\Delta scrX::(araC sufD)$	RIF	DJ1418 x pEFSE13 x pDB303 ^a
AES3	$\Delta scrX::(araC sufS)$	RIF	DJ1418 x pEFSE24 x pDB303 ^a
AES4	$\Delta scrX::(araC sufU)$	RIF	DJ1418 x pEFSE33 x pDB303 ^a
AES5	$\Delta scrX::(araC sufB)$	RIF	DJ1418 x pEFSE53 x pDB303 ^a
AES6	$\Delta scrX::(araC sufSU)$	RIF	DJ1418 x pEFSE73 x pDB303 ^a
AES7	$\Delta scrX::(araC sufCDSUB)$	RIF	DJ1418 x pEFSE121 x pDB303 ^a
<i>E. coli</i>			
BL21 (DE3)	<i>hsdS gal</i> ($\lambda cl857 ind-1 Sam7 nin-5 lacUV5-T7$ gene 1)	-	Novagen
TB1	F ⁻ <i>ara</i> $\Delta(lac-proAB)$ [$\phi 80dlac D(lacZ)M15$] <i>hsdR rpsL</i>	-	New Engald Biolabs
CAG18470	<i>purC::Tn10</i>	TET	(Nichols <i>et al.</i> , 1998)
TL524	MG1655 $\Delta(lacZYA-argF)$ U169	-	(Donahue <i>et al.</i> , 2000)
PJ23	TL524 <i>iscS</i> $\Delta purC80::Tn10$	TET	P1(PJ19) → TL523
MC1061	F ⁻ <i>araD139</i> $\Delta(ara, leu)7696$ $\Delta(lacY74)$ <i>galU galK hsdR rpsL</i>	-	(Lauhon & Kambampati, 2000)
CL100	MC1061 $\Delta iscS$	-	(Lauhon & Kambampati, 2000)
PJ19	CL100 <i>purC80::Tn10</i>	TET	P1(CAG18470) → CL100
JW1670-1	$\Delta(araD-araB)567$ $\Delta lacZ4787(::rrnB-3)$, λ -, $\Delta sufS755 :: kan$	KAN	(Baba <i>et al.</i> , 2006)
EESC41	JW1670-1 $\Delta sufS :: FRT$	-	Remoção de Kan ^R
GSO97	MG1655 $\Delta sufSE::FRT$	-	(Outten <i>et al.</i> , 2004)
GSO92	MG1655 $\Delta sufABCDSE::FRT$	-	(Outten <i>et al.</i> , 2004)
CAG18481	λ -, <i>zfh-208 :: Tn10, rph-1</i>	TET	(Nichols <i>et al.</i> , 1998)
JW2514-4	$\Delta(araD-araB)567$ $\Delta lacZ4787(::rrnB-3)$, λ -, $\Delta iscS776 :: kan$	KAN	(Baba <i>et al.</i> , 2006)
EESC42	JW2514-4 $\Delta iscS776::kan$ <i>zfh-208::Tn10</i>	KAN, TET	P1(CAG18481) → JW2514-4
EESC54	GSO92 $\Delta iscS776::kan$ <i>zfh-208::Tn10</i> (pEFSE121)	KAN, TET	GSO92 x EESC42 + pEFSE121

(*) marcadores de resistência utilizados: Vancomicina (VAN), Tetraciclina (TET), Canamicina

(KAN), Rifampicina (RIF).

Tabela 2: Vetores plasmidiais utilizados no projeto.

Plasmideo	Genótipo	Marcador*	Referência
pCP20	<i>flp</i>	temperature sensitive	(Cherepanov & Wackernagel, 1995)
pDB943	<i>iscS</i>	AMP	(Zheng <i>et al.</i> , 1993)
pDB551	<i>nifS</i>	AMP	(Zheng <i>et al.</i> , 1998)
pDB1568	<i>pBAD</i>	AMP	(Dos Santos <i>et al.</i> , 2007)
pDB303	<i>rpoB113</i>	RIF	(Brigle <i>et al.</i> , 1987)
pEFSE3	<i>pBAD :: sufC</i>	AMP	Este trabalho
pEFSE13	<i>pBAD :: sufD</i>	AMP	Este trabalho
pEFSE24	<i>pBAD :: sufS</i>	AMP	Este trabalho
pEFSE33	<i>pBAD :: sufU</i>	AMP	Este trabalho
pEFSE53	<i>pBAD :: sufB</i>	AMP	Este trabalho
pEFSE73	<i>pBAD :: sufSU</i>	AMP	Este trabalho
pEFSE121	<i>pBAD :: sufCDSUB</i>	AMP	Este trabalho
pDB1005	<i>hscA::kan^R</i>	KAN	(Zheng <i>et al.</i> , 1998)
pDB933K	<i>iscS :: kan^R</i>	KAN	Este trabalho
pDB954K	<i>iscSU :: kan^R</i>	KAN	Este trabalho
pDB1018	<i>iscU :: kan^R</i>	KAN	Dean lab archive
pDB1370	<i>iscSUA-hscBA-fdx :: gen^R</i>	GEN	Dean lab archive
pCRBlunt	cloning vector	KAN	Invitrogen
pTOPO4	cloning vector	KAN	Invitrogen
pEFSC1	<i>sufC</i>	KAN	Este trabalho
pEFSC11	<i>sufD</i>	KAN	Este trabalho
pEFSC22	<i>sufS</i>	KAN	Este trabalho
pEFSC31	<i>sufU</i>	KAN	Este trabalho
pEFSC51	<i>sufB</i>	KAN	Este trabalho
pEFSC72	<i>sufSU</i>	KAN	Este trabalho
pET23a(+)	<i>pT7</i>	AMP	Este trabalho
pEFSE79	<i>pT7 :: sufS</i>	AMP	Este trabalho
pEFSE80	<i>pT7 :: sufS^{Cys365ΔAla}</i>	AMP	Este trabalho
pEFSE34	<i>pT7 :: sufU</i>	AMP	Este trabalho
pEFSE36	<i>pT7 :: sufU^{Cys41ΔAla}</i>	AMP	Este trabalho
pEFSE38	<i>pT7 :: sufUAsp^{43ΔAla}</i>	AMP	Este trabalho
pEFSE40	<i>pT7 :: sufU^{Cys128ΔAla}</i>	AMP	Este trabalho

(*) marcadores de resistência utilizados: Canamicina (KAN), Gentamicina (GEN), Ampicilina (AMP).

4.6 Experimentos de estresse oxidativo e depleção de ferro

Para indução celular de estresse oxidativo, linhagens de *E. faecalis* FA22, JH22 e X1 foram crescidas em meio BHI até uma OD₆₀₀ de 0.5 e imediatamente coletadas por centrifugação e solubilizadas em uma concentração NaCl 0.9% (p/v) adicionadas das seguintes concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂): 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0 e 40.0 mM. Incubações em banho 37 °C foram realizados com as culturas que foram encaminhadas posteriormente à extração de RNA.

Para indução celular de depleção de ferro, linhagens de *E. faecalis* FA22, JH22 e X1 foram crescidas em meio BHI previamente tratados com o quelante de ferro 2,2-dipiridil (DIP) nas determinadas concentrações: 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 e 1.0 mM. As linhagens foram crescidas até uma OD₆₀₀ de 0.5 e imediatamente coletadas por centrifugação e encaminhadas à extração de RNA.

4.7 Análises de Expressão Relativa

O RNA total de linhagens de *E. faecalis* descritas foram isoladas de crescimentos em fase exponencial de linhagens controle ou de células submetidas a processos de estresse descritos anteriormente. RNA total das linhagens foi obtido através de extração de RNA total pelo método CTAB modificado para extração de RNA total de célula bacteriana (Salter & Conlon, 2007). Síntese de cDNA foi realizada com 2.0 µg de RNA total utilizando transcriptase reversa M-MLV (Promega) utilizando *Oligo-dT primers* e/ou *primers* aleatórios. *Primers* internos aos genes de interesse de aproximadamente 150 pb foram desenhados utilizando sequência genômica de *E. faecalis* previamente sequenciado pelo *Institute for Genomic Research* (TIGR - <http://www.tigr.org>). Os seguintes genes de interesse foram utilizados nesse estudo: *sufC*, *sufD*, *sufS*, *sufU*, *sufB*, *oxyR*, *kat* e *fur*. Genes *tuf* e *23SrRNA* foram utilizados como constitutivos para posterior normalização dos dados obtidos. Gene *fur* foi ainda

utilizado como controle de estresse de depleção de ferro efetivo, por ser um elemento responsivo à estados de baixa concentração de ferro intracelular. Da mesma maneira, o gene *kat* foi utilizado como controle de estresse oxidativo celular, por ser um elemento responsivo a tal condição. Experimentos de PCR quantitativo em tempo real (RTqPCR) foram realizados em aparelho ABI-7500 para placas de 96 poços (Applied Biosystems). Cerca de 4.5 µl cDNA foi diluído e adicionado a 10.5 µl de mix de PCR contendo 7.5 µl SYBR green (Bio-Rad) e 1.5 µl de cada primer a concentração inicial de 20.0 mM. Amplificação de DNA complementar (cDNA) ocorreu através da utilização das seguintes condições de ciclo: desnaturação inicial (3', 95°C), seguido por 45 ciclos de 15", 95°C e 45", 58°C. Os dados obtidos foram analisados através do método comparativo $\Delta\Delta C_t$ (*critical threshold method*) onde o RNA alvo é ajustado a um RNA de referência (constitutivo ou RNA de controle interno) para a normalização dos dados e análise das expressões relativas observadas; C_t corresponde ao número de ciclos onde a emissão de fluorescência devido aos amplicons excede o ponto de corte (*threshold*). As equações utilizadas para determinar o ΔC_t e $\Delta\Delta C_t$ foram descritas previamente (Livak & Schmittgen, 2001) e, de uma maneira geral, $\Delta C_t = C_t$ de gene referência controle - C_t gene alvo, $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ condição de stress e/ou tratamento - ΔC_t condição ambiental e/ou controle, e a expressão relativa = $2^{-\Delta\Delta C_t}$. O controle interno foi determinado utilizando o mesmo método. Resultados de expressão relativa obtidos por RT-qPCR foram analisados estatisticamente através de cálculo estatístico One-Way ANOVA utilizando o pacote SAS *software*. Resultados apresentando $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas e quadruplicatas experimentais.

4.8 Clonagens das regiões de interesse

Regiões identificadas como proteínas homólogas para formação dos cofatores [Fe-S] foram isoladas do DNA cromossomal de *E. faecalis* para posterior caracterização genética e bioquímica. Como exemplo, o gene *sufU* foi amplificado

através de reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando *Pfu* DNA Polimerase (Invitrogen) e *primer* específico para a região, desenhados de modo a adicionar sítios de restrição para enzimas *NdeI* na porção N-terminal do amplicon *sufU* e um sítio *BglII* na porção C-terminal. O amplicon resultante, de tamanho ~ 0.7 kb foi ligado em vetor de clonagem pCR4-TOPO (Invitrogen TOPO TA sequencing kit) (ou pCR-Blunt - Invitrogen), originando o vetor de clonagem pEFSC31 (Tabela 2). O mesmo procedimento básico foi realizado para clonagem de genes *sufC* (~0.771kb), *sufD* (~ 1.287 kb), *sufS* (~ 1.236 kb), *sufU* (~ 0.468 kb), *sufB* (~1.395 kb) e *sufSU* (~1.694 kb), porém utilizando primers 3' *BamHI*, nessas situações. A inserção do amplicon foi confirmada através de análise de restrição com enzimas *EcoRI*, *NdeI*, *BamHI*, *BglII* e por sequenciamento utilizando primers T7 *forward* e T7 *reverse*. Fragmentos de genes individuais (*sufC*, *sufD*, *sufS*, *sufU*, *sufB*) foram subclonados em vetor de expressão pET23a(+) (Novagen), sob controle do promotor T7 (p^{T7}), utilizando as enzimas de restrição flanqueadoras dos respectivos *primers*. Fragmentos de genes co-expressos (*sufSU*) foram subclonados em vetor pDB1568, sob controle do promotor arabinose (p^{BAD}). Vetores de expressão foram utilizados para produção recombinante das proteínas. O procedimento de clonagem do operon *sufCDSUB* ocorreu através da amplificação inicial de *sufCDS* (~3.294 kb) (utilizando *primers sufC 5'NdeI forward* e 3' *BamHI reverse*) e *sufSUB* (~3.099 kb) (*primers sufS 5'NdeI forward* e 3' *BglII reverse*) e clonados em pCR4-TOPO. Posteriormente, através da utilização de enzimas de restrição *NdeI*, *BglII* e *BamHI*, os fragmentos foram subclonados em vetor de expressão pDB1568, sob controle de promotor arabinose, utilizando-se de sítio de restrição *BamHI* interno verificado em *sufS*.

4.9 Mutação pontual *in vitro*

Reações de mutação pontual *in vitro* foram realizadas visando a posterior produção de proteínas recombinantes mutantes para sítios ativos, ou para inibição de sítios de restrição. Para tanto, reações de PCR foram realizadas utilizando como molde

plasmídeo contendo DNA de interesse, produzido em linhagem de *E. coli* capaz de promover metilação, e *primers* específicos adicionando uma única mutação em sítio desejado. Posteriormente, o produto de PCR foi digerido com *DpnI*, transformado em hospedeiro, e DNA produzido analisado por análise de restrição e sequenciamento. Sítios ativos de SufU Cys⁴¹, Asp⁴³ e Cys¹²⁸ foram mutados para alanina, originando SufU^{Cys41ΔAla}, SufU^{Asp43ΔAla}, SufU^{Cys128ΔAla}, SufSU^{Cys41ΔAla}, SufSU^{Asp43ΔAla} e SufSU^{Cys128ΔAla}. Sítio ativo Cys365 de SufS foi mutado para alanina originando SufS^{Cys365ΔAla} e SufS^{Cys365ΔAla}U^{Asp43ΔAla}. Clones contendo o gene *sufS* foram mutados em vetor de clonagem para silenciamento de sítio interno de restrição *NdeI*.

4.10 Experimentos *in vivo* de manipulações genéticas

Experimentos focados em genética de microrganismos foram realizados com o intuito de verificar complementações *in vivo* para os sistemas estudados em bactérias de origem genealógica diferenciadas.

Experimentos de transformação e recombinação genética em foram realizados em linhagens bem caracterizadas de *A. vinelandii* para construção de novas linhagens contendo regiões de sistema *sufCDSUB* de *E. faecalis* através da utilização de plasmídeo recombinante contendo a região de interesse a ser adicionada. O procedimento de inserção ocorreu pelo mecanismo de recombinação homóloga recíproca entre o DNA cromossomal e DNA plasmidial, com regiões equivalentes às do genoma cromossomal flanqueando o gene de interesse. Como exemplo, o plasmídeo pEFSE33 (Tabela 2) foi utilizado para transformação de linhagem DJ1418 para inserção de *sufU* em genoma de *A. vinelandii*, originando a linhagem AES3 (Tabela 1). O plasmídeo utilizado para clonagem de *sufU* corresponde ao vetor pDB1568, digerido com enzimas de restrição *NdeI* e *BglII*, utilizados para a clonagem de *sufU* sob o controle de p^{BAD} em região contendo o gene *scrX*. O mesmo procedimento foi realizado para os genes *sufC*, *sufD* e *sufB*. Os genes *sufS* e *sufSU* foram clonados utilizando-se enzimas de restrição *NdeI* e *HindIII*, e *sufCDSUB* foi clonado em duas etapas,

utilizando as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*, e *BamHI* e *HindIII*, fazendo uso do sítio interno de *BamHI* de *sufS*.

A incorporação de gene *SUF* em genoma de *A. vinelandii* foi realizada como descrito previamente (JACOBSON *et al.*, 1989a; JACOBSON *et al.*, 1989b). De uma forma geral, a linhagem recipiente DJ1418 apresenta o operon *ISC* completo e o cassette *lacZ*:canamicina inserido em *scrX*, que permite à linhagem apresentar fenótipo azul quando cultivada em presença de X-gal, favorecendo rápido passo de identificação de linhagens recombinantes. A linhagem AES4 apresentando $\Delta scrX::(araC\ sufU)$, foi construída pela transformação por congressão (transferência coincidente de marcadores genéticos) com pEFSC31 e pDB303 (Rif^R), e linhagens contendo dupla recombinação recíproca selecionadas por fenótipo branco em placas contendo rifampicina e X-gal. Dessa maneira, o operon *ISC* foi mantido intacto e modificações por recombinação homóloga realizadas somente na região *scrX*, com verificação de expressão de SufU em presença de arabinose. Todas as linhagens utilizadas nesse trabalho (AES1-7) foram construídas de maneira similar. Para a verificação da capacidade de genes *SUF* de *E. faecalis* complementar genes *ISC* de *A. vinelandii*, uma segunda etapa de reações de recombinação homóloga foram realizadas para remover os elementos *ISC* específicos de genoma de *A. vinelandii*. Como exemplo, para a verificação de complementação de *iscU* por parte de *sufU*, realizou-se a transformação de AES7 com o vetor pDB1018 que contém região codificante para resistência a canamicina em região *iscU*, com reação de recombinação ocorrendo como descrito acima, e a seleção de linhagens mutantes para *iscU* e contendo *sufU* através de verificação de crescimento em meio contendo canamicina e arabinose. O mesmo mecanismo foi realizado para os outros recombinantes obtidos.

E. coli $\Delta iscS$ previamente construídas foram utilizadas para verificação de complementação da maquinaria *ISC*. Microrganismos mutantes para *iscS* apresentam-se auxotróficos para determinados elementos, necessitando ácido nicotínico e tiamina para crescimento. Vetores contendo *sufS*, *sufSU* e *sufCDSUB* sob controle de p^{BAD} foram testados para complementação, e testados em meio mínimo M9, e M9 suplementado. Vetores contendo regiões codificantes para cisteína desulfurases NifS e

IscS de *A. vinelandii* foram utilizados como controle positivo, e o vetor de clonagem (pDB1568) como controle negativo nos experimentos.

Avaliação de complementação de sistema *SUF* foi realizada através de experimentos de mutação envolvendo linhagens *E. coli* construídas através de experimentos sucessivos de transdução (utilizando lisados de bacteriófago P1) e transformação, com o intuito final de obter linhagem duplo mutante Δisc e Δsuf , onde viabilidade celular ocorreria devido à presença do plasmídeo de complementação. Primeiramente, linhagens *E. coli* mutantes para maquinaria *SUF* ($\Delta sufSE$, $\Delta sufABCDSE$, $\Delta sufS$) contendo região codificante para canamicina foram obtidas a partir de banco de linhagens mutantes. O marcador de resistência foi removido através da utilização do plasmídeo termo-lábil pCP20, como descrito previamente (Outten *et al.*, 2004). Após isso, bacteriófagos P1 contendo transposon *Tn10* (Tet^R) foram produzidos para posterior infecção de linhagem *E. coli* $\Delta iscS$, para inserção de resistência a tetraciclina perto de região codificante mutante de *iscS*, originando linhagem *E. coli* $\Delta iscS::Tn10$. O mesmo procedimento de produção de bacteriófagos P1 foi realizado com esta linhagem. *E. coli* $\Delta sufSE$, $\Delta sufABCDSE$ ou $\Delta sufS$ contendo os plasmídeos de complementação (*sufS*, *sufSU* ou *sufCDSUB*) foram infectadas com bacteriófagos contendo $\Delta iscS::Tn10$. Plaqueamentos em meio LB contendo canamicina, tetraciclina e ampicilina foram realizadas para identificação de complementação.

4.11 Expressão recombinante e purificação de proteínas

Células *E. coli* BL21DE3 foram utilizadas como hospedeiro para expressão recombinante de SufC, SufD, SufS, SufU e SufSU. A seguir serão descritas características específicas para expressão e purificação de cada elemento:

4.11.1 SufU

Células foram lisadas por sonicação em tampão contendo 25.0 mM Tris-Cl, pH 8.00, 500.0 mM NaCl, 20.0 mM imidazol, e material submetido a sulfato de streptomicina (1%) e inibidor de proteases PMSF (0.173 g/mL). Após ultracentrifugação de 35000 rpm por 30 minutos, o lisado celular foi aplicado em coluna de afinidade (HisTrap FF 5.0 mL - GE Healthcare) submetida a gradiente linear de 0-500.0 mM imidazol. Frações de interesse foram dialisadas em tampão contendo 25.0 mM Tris-HCl, pH 8.00 e aplicadas em segunda coluna, de troca iônica (HiTrap Q HP 5.0 mL - GE Healthcare), e eluída em gradiente linear de 0–1.0 M NaCl. Posteriormente, a amostra com frações identificadas foram aplicadas em coluna de gel filtração (Superose 12). Todos os experimentos foram realizados em condições de anaerobiose. A produção dos mutantes SufU^{Cys41ΔAla}, SufU^{Asp43ΔAla} e SufU^{Cys128ΔAla} seguiu o mesmo procedimento descrito acima.

4.11.2 SufS e SufSU

Purificação do complexo SufSU seguiu a mesma metodologia descrita para SufU, utilizando-se colunas de afinidade, troca iônica e gel filtração. No entanto, é importante ressaltar que o gradiente necessário para a eluição do complexo SufSU de Ni-HiTrap Fast Flow foi de 0-1000.0 mM imidazole.

4.11.3 SufC

Células foram lisadas por sonicação em tampão contendo 25.0 mM Tris-HCl, pH 8.00, 25.0 mM NaCl, e material submetido a sulfato de streptomicina (1%) e inibidor de

proteases PMSF (0.173 g/mL). Após ultracentrifugação de 35000 rpm por 30 minutos, o lisado celular foi submetido a gradiente de Sulfato de Amônio, utilizando-se a fração de 60% para proceder com purificação. Frações de interesse foram dializadas em tampão contendo 25.0 mM Tris-HCl, pH 8.00, aplicadas em coluna de troca iônica (HiTrap Q HP 5.0 mL - GE Healthcare), e eluída em gradiente linear de 0–1.0 M NaCl. Posteriormente, a amostra com frações identificadas foi aplicada em coluna de gel filtração (Superose 12).

4.11.4 SufD

Células foram lisadas por sonicação em tampão contendo 25.0 mM Tris-Cl, pH 8.00, 25.0 mM NaCl, e material submetido a sulfato de streptomicina (1%) e inibidor de proteases PMSF (0.173 g/mL). Após ultracentrifugação de 35000 rpm por 30 minutos, o *pellett* celular foi totalmente resuspendido em solução de Uréia 8.0 M. Diluições com tampão 25.0 mM Tris-HCl, pH 8.00 foram realizados até a concentração final de 0.125M Uréia, aplicado em coluna de troca iônica (HiTrap Q HP 5.0 mL - GE Healthcare), e eluída em gradiente linear de 0–1.0 M NaCl. Posteriormente, a amostra com frações identificadas foi aplicada em coluna de gel filtração (Superose 12).

4.12 Análises de espectroscopia e atividade de cisteína desulfurase

Ensaio foram realizados a temperatura ambiente em tampão contendo 20.0 mM Tris-HCl (pH 8.00), com posterior adição de 0.5 mM L-cisteína, 1.0 mM DTT e 2.0 mg/mL de proteína. A atividade específica de cisteína desulfurase foi verificada através da quantificação de *sulfide* total pelo método de formação de azul de metileno, como descrito previamente (Siegel, 1965). A reação foi finalizada pela adição de 0.1 mL *N,N*-dimethyl-*p*-phenylenediamine sulfato 0.02 M em 7,2 M HCl e 0.1 mL FeCl₃ 0.03 M em

1.2 M HCl em tubo de reação lacrado. Após 60 minutos, para desenvolvimento de cor, a absorbância a 650 nm foi medida em espectrofotômetro Varian Cary 50 Bio UV/Vis, e a concentração de *sulfide* calculada tomando por base curva padrão de Na₂S. Tempo de relaxamento tempo-dependente de ΔAbs_{420} foi obtido pela dosagem de espectro UV/Vis a cada 5 segundos após a adição de substrato.

4.13 Reconstituição dos cofatores [Fe-S]

SufU (50.0 μM) foi reduzido anaerobicamente com 5.0 mM β -mercaptoetanol em tampão Tris-HCl 20.0 mM (pH 8.00) pelo tempo de 60 minutos contendo SufS (0.5 μM), antes de adição de Fe³⁺ e L-cisteína. Após isso, adicionou-se citrato de amônio férrico a uma concentração final de 250.0 μM e a mistura incubada até estabilização da cor. Adicionou-se então L-cisteína a uma concentração final de 5.0 mM e a reação foi incubada pelo período de 60 minutos. A formação do cofactor foi detectada através de espectrofotômetro (300-800 nm) verificado em UV/Vis durante diferenciados intervalos de tempo. A reconstituição no complexo SufSU foi realizada pela incubação anaeróbia de 50.0 μM do complexo, 5.0 mM β -mercaptoetanol, 500.0 μM L-cisteína e 250.0 μM citrato de amônio férrico em tampão 20.0 mM Tris-HCl (pH 8,0) pelo período de 10 minutos.

4.14 Caracterização de atividade ATPase

A metodologia utilizada seguiu experimentação descrita previamente para quantificação de fosfato inorgânico (P_i) (Martin & Doty, 1949), modificado. Resumidamente, a atividade de fosfatase foi verificada pela incubação de ³²P-fosfoproteína com a enzima de interesse, com posterior adição de ácido tricloroacético (TCA) para a precipitação da proteína. Após centrifugação, o ³²P_i (solúvel em TCA) é

medido, após tratamento com ácido molíbdico e solvente orgânico para eliminar fontes de P_i não específicas.

4.15 Espectrometria de massas e sequenciamento de DNA

Espectros LC/MS/MS foram obtidos através de digestão das amostras com tripsina e amostras de DNA de seqüenciadas para confirmação de insertos pelo método de Sanger; ambos os serviços foram realizados pelo *Virginia Tech Proteomics Research incubator service*.

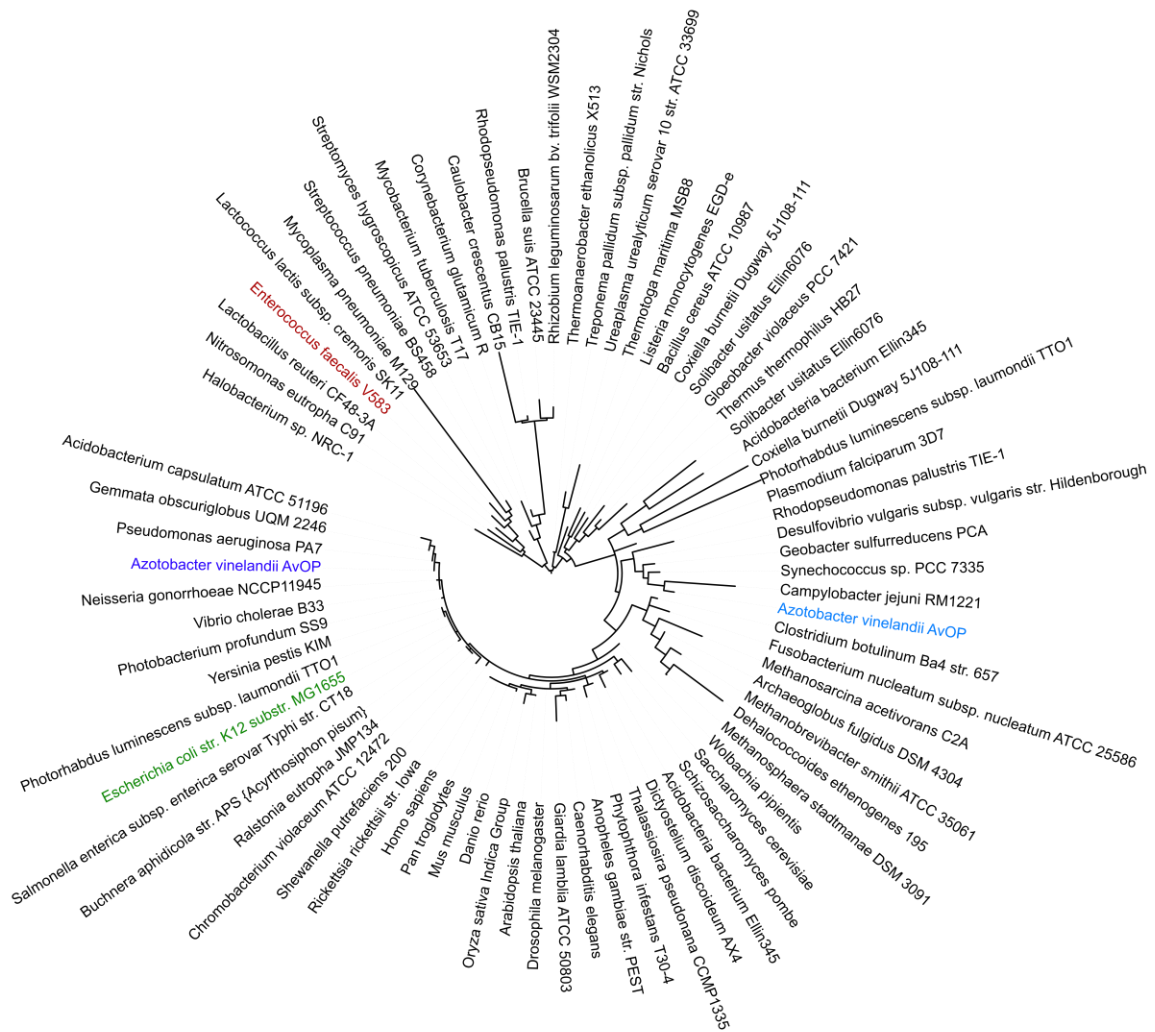
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação da maquinaria [Fe-S]: o sistema *sufCDSUB*

Análises de bioinformática de estrutura primária do genoma de *E. faecalis* verificou a presença do *loci* de genes codificando possíveis proteínas representantes de sistema *SUF* da maquinaria de formação dos cofatores [Fe-S]. As sequências abertas de leitura (*open reading frames*, ORFs) relacionadas a *E. faecalis* estão anotadas da seguinte maneira no *GenBank*: EF2390, 40% identidade com SufB de *E. coli*; EF2391, codificando possível proteína arcabouço NifU-like, homólogo de IscU de *E. coli* (identidade de 30%), e que será descrita como SufU neste trabalho; EF2392, homóloga a SufS de *E. coli* (identidade de 52%), que codifica a cisteína desulfurase, envolvida na doação de elemento enxofre para a formação do cofator [Fe-S]; EF3293 e EF2394 codificando ortólogos de proteínas SufD e SufC, apresentando identidades de 26% e 52% com representantes de *E. coli*, respectivamente.

NifU/IscU/SufU são consideradas proteínas chave de seus respectivos sistemas de formação dos cofatores [Fe-S] em bactérias. Proteínas arcabouço IscU e SufU apresentam alto grau de homologia com a porção N-terminal de NifU de *A. vinelandii*, preservando portanto resíduos chave da porção, como os três resíduos conservados de cisteína (Cys^{50, 76, 138} presentes em *A. Vinelandii*) e o resíduo de ácido aspártico (Asp⁵² em *A. Vinelandii*). Tais resíduos são identificados na proteína SufU de *E. faecalis* correspondendo aos resíduos Cys^{41, 66, 128} e Asp⁴³ e estariam envolvidos na coordenação da formação do cofator [Fe-S] através de três ligações cisteinil e uma ligação química não relacionada a resíduos de cisteína, mas ligada ao resíduo conservado de ácido aspártico. Presença de Asp⁴³ seria importante para a formação do cofator lábil, visto que a substituição deste por resíduo de alanina, acaba por estabilizar o cofator dentro de proteína arcabouço NifU/IscU (Figuras 4 e 5). Tal evento não é algo desejável *in vivo*, visto que dessa forma a proteína arcabouço perde a capacidade de maturar as proteínas alvo. Adicionalmente aos resíduos conservados, a

proteína IscU apresenta outras regiões conservadas e de essencial importância para interações proteína-proteína que devem ocorrer após a formação do cofator na proteína arcabouço. Essas interações estariam envolvidas nos processos de entrega do cofator, propriamente dito. Um exemplo corresponderia ao motivo conservado de aminoácidos LPPVK, diretamente relacionada à interação entre a proteína arcabouço IscU e proteínas HscA e HscB. SufU, por sua vez, não apresenta a sequência LPPVK. Tal fato pode estar relacionado à falta de outros representantes de sistema *ISC* verificado em *Proteobacteria*, uma vez que todos os outros elementos possivelmente ligados à formação dos cofatores [Fe-S] em *E. faecalis* são ortólogos de sistema *SUF* de *Proteobacteria*. Por outro lado, SufU apresenta na mesma região protéica (entre a segunda e a terceira cisteínas conservadas) uma sequência de 19 aminoácidos extras, que não estão presentes em representantes de *Proteobacteria*, e que correspondem a uma característica específica de proteínas homólogas a SufU presentes unicamente em microrganismos Gram-positivos. Visto que está localizada tridimensionalmente em uma região que mimetiza a localização espacial do motivo conservado LPPVK, serve como indício de sua possível interação com outros elementos protéicos do sistema, ainda não descritos. Análises filogenéticas apontam para uma separação de clades entre as proteínas do tipo IscU e SufU (Figura 4). De fato, IscU e SufU não podem ser classificados como mesma família de proteínas, pois várias diferenças e particularidades são observadas, principalmente relacionado à falta da relação entre proteínas SufU e HscA/B. A distância filogenética observada entre IscU de *Proteobacteria* e representantes eucarióticos, bem como o agrupamento de representantes *Firmicutes* envolvidos em processos patológicos em torno do SufU de *E. faecalis* pode estar relacionada à presença da alça de 19 aminoácidos descrita acima, que surge portanto como uma região potencial para estudos posteriores.



— 0.1

Figura 4: Análise filogenética de proteína SufU. Árvore filogenética apresentando sequências de proteína arcabouço do tipo U. *Enterococcus faecalis* SufU (vermelho), *Azotobacter vinelandii* NifU N-terminal (azul claro), *Azotobacter vinelandii* IscU (azul escuro) e *Escherichia coli* IscU (verde). Os alinhamentos foram realizados e curados através de algoritmo *maximum likelihood* e Gblocks, respectivamente; árvores foram construídas, curadas e visualizadas utilizando PhyMol, TreeDyn e ItoI.


```

E. coli      ...APACGDVMKLQIKVNDG-GIIEARFKTYGCGSAIA...AIK-----NTD...ELELPPVKIHC SILAEDA I KAAIADYKSK...
H. sapiens  ...APACGDVMKLQIQVDEK-GKIVDARFKTFGCGSAIA...TIK-----NTD...ELCLPPVKLHCSMLAEDA I KAAALADYK...
A. vinelandii ...APACGDVMRLQIKVNEQ-GIIEADAKFKTYGCGSAIA...TIK-----NTQ...ELALPPVKIHC SVLAEDA I KAAVRDYKHK...
A. thaliana ...APQCGDVMKLQVKFDGS-GQIIDAKFKTFGCGSAIA...TIK-----NSQ...HLSLPPVKLHCSMLAEDA I KAAIKNYKEK...
S. cerevisiae ...APACGDVMRLQIKVNDSTGVIEDVKFKTFGCGSAIA...KIK-----NTE...ELS LPPVKLHCSMLAEDA I KAAIKDYKSK...
E. faecalis ...NPTCGDVIELDVAIEDG-GVIKDIAFQSGSGSISTA...ALAEDFSQLVQNEVAEDEKLGDA...GVAKFPARIKCATLAWKALEQAVANNGQ-...
B. subtilis ...NPTCGDRIRLTMKLDGD-GIVEDAKFEGEGCSISMA...SMSKIFSDMMQKEYDDSIDLGDIE...GVSKFPARIKCATLSWKALEKGVAK-...

```

Figura 5: Resíduos conservados em proteínas arcabouço envolvidos na formação de cofatores [Fe-S] dos tipos IscU (*Escherichia coli*, *Azotobacter vinelandii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*, *Homo sapiens*) e SufU (*Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*). Resíduos conservados de cisteínas 41, 66 e 121 de *E. faecalis* (amarelo) e ácido aspártico 43 (cinza) são verificados, bem como regiões específicas características de cada uma das proteínas, como a região LPPVK (vermelho) em IscU e a presença de uma alça adicional de aproximadamente 20 aminoácidos (azul) em SufU.

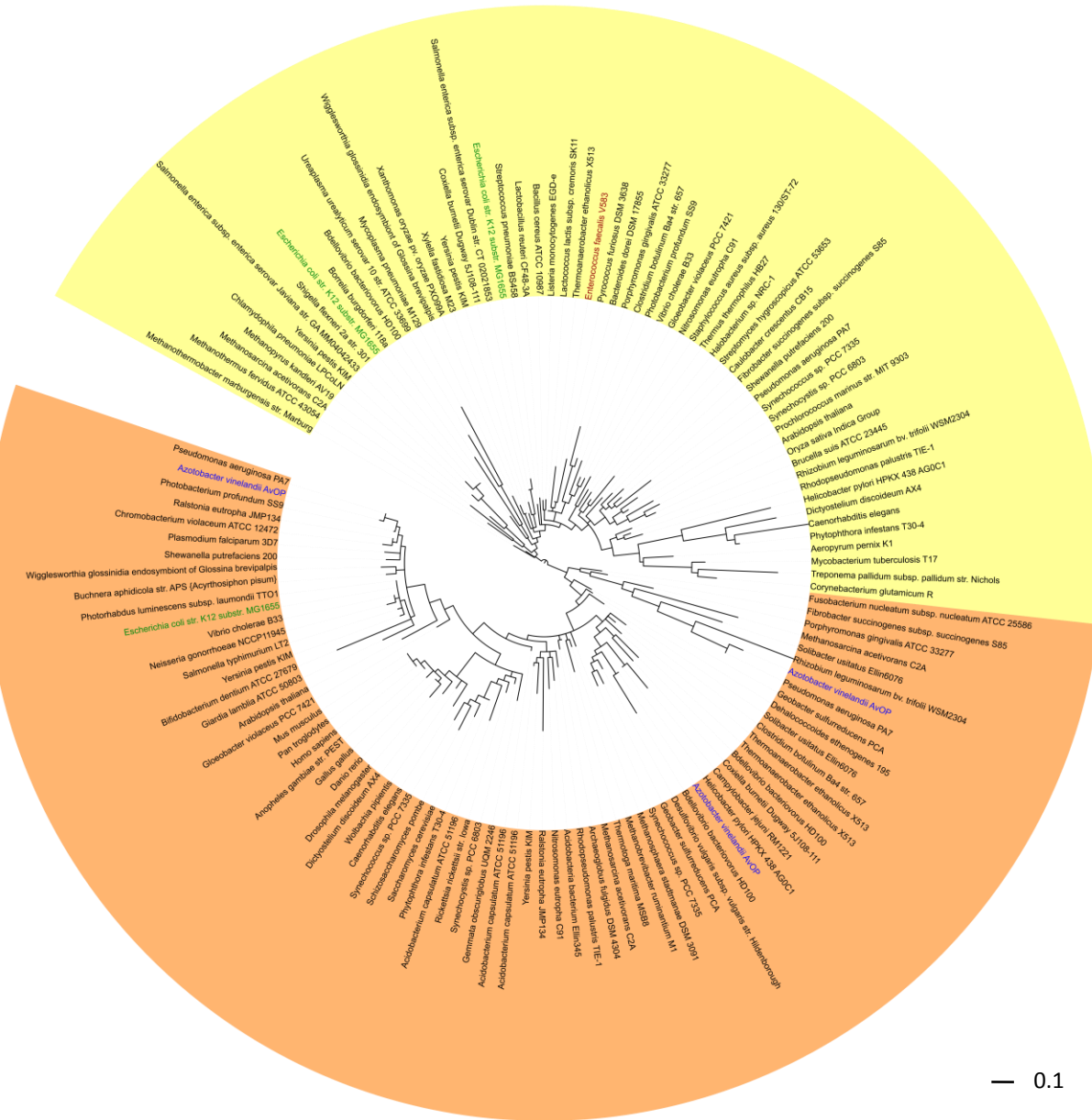
```

E. faecalis  ...FYAFSGHKMCGPTGIGVLYGKRH...FNIEGLPHPHDVATALDMEG-VAVRAGHHCAQPLLNYLS-----VPATARA...
B. subtilis  ...FFALSSHKMCPTGIVGVLYGKKA...FNLDVPHPHDVATVLD AEG-IAVRAGHHCAQPLMKWLD-----VTATARA...
A. thaliana  ...FLVASSHKMCGPTGIGFLYGKSD...FNVEGLHPTDLATFLDQOHGVAIRSGHHCAQPLHRYLG-----VNASARA...
E. coli      ...FYVFSGHKLYGPTGIGILYVKEA...FNLGKHHAYDVGSFLDNYG-IAVRTGHHCAAMPLMAYYN-----VPAMCRA...
A. vinelandii ...FFVFSGHKLVFGPTGIGVVYKQE...FVLQGYRTEEI GAALNREG-VAVRSGHHCAQPI LRRFG-----VETTVRP...
S. cerevisiae ...LLSISSHKIYGPKGIGAIYVRRR...AYVEGESLLMALRDIALSSGSACTSASLEPSYVLHALGKDDALAHSSIRF...
H. sapiens   ...LMSISGHKIYGPKGVGA IYIRRR...AYVEGESLLMALKDVALSSGSACTSASLEPSYVLRAIGTDEDLAHSSIRF...

```

Figura 6: Resíduos conservados em cisteínas dessulfurases envolvidas na formação de cofatores [Fe-S] dos tipos IscS (*Saccharomyces cerevisiae*, *Homo sapiens*) e SufS (*Escherichia coli*, *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Arabidopsis thaliana*). Resíduos conservados de cisteína 365 de *E. faecalis* (amarelo) e lisina 225 (cinza) são verificados, bem como a região conservada HKXXXPXGXG (azul). Regiões específicas características de cada uma das proteínas, como a região RXGHHCA (vermelho) em SufS e SSGSACTS (verde) de IscS são também apresentadas.

A cisteína desulfurase identificada em *E. faecalis* pôde ser caracterizada através de análises de estrutura primária e filogenética. *E. faecalis* SufS apresenta o sítio catalítico conservado de cisteína na posição 365, bem como a seqüência RXGHHCA nesta região, características de desulfurases do tipo II (Figura 6). Por outro lado, não se verifica nenhum gene homólogo de proteína previamente descrita como ativador de desulfurase no genoma deste microrganismo. Análise filogenética permitiu a visualização da separação da SufS de *E. faecalis* em grupo contendo SufS de *E. coli*, com proximidade de CsdA de *E. coli*, agrupando-a portanto no grupo de desulfurases que necessitam auxílio de ativador, e apresentando distância filogenética de desulfurases do tipo I de *E. coli* (IscS) e *A. vinelandii* (NifS e IscS) (Figura 7). Da mesma forma, verifica-se um agrupamento de proteínas relativas a outros *Firmicutes*, bem como de seqüências relativas a patógenos de outros gêneros (*Mycobacterium*) e representantes de eucariotos superiores vegetais (*Oryza sativa*, *A. thaliana*), devido às desulfurases plastídicas observadas nesses organismos. Uma eventual comparação entre genes *SUF* verificados em genoma de *Firmicutes* e o sistema classicamente identificado em *E. coli* para *Proteobacteria* apresentam diferenças entre os dois sistemas. SufE, por exemplo, é considerada uma proteína de vital importância dentro do sistema *SUF* de *E. coli*, por estar envolvida na ativação da atividade da cisteína desulfurase de SufS; no entanto, esta proteína não é verificada em genoma de *E. faecalis*. Tal situação levanta dúvidas com relação ao seguinte aspecto: visto que genoma de *E. faecalis* também apresenta SufS, qual elemento poderia estar envolvido no aumento da atividade de SufS, mimetizando SufE? Como será descrito posteriormente, SufU possui uma organização tridimensional parecida a SufE (apesar de não possuir seqüência primária homóloga), e foi testado com possível ativador para SufS em *E. faecalis*. Tal hipótese é plausível devido ao fato de apresentar resíduos conservados de cisteína, e da possibilidade de mimetizar as funções de SufE por esta receber o *sulfide* liberado pela desulfurase quando da formação do complexo SufS–SufE durante a síntese do cofator [Fe-S] em *Proteobacteria*.

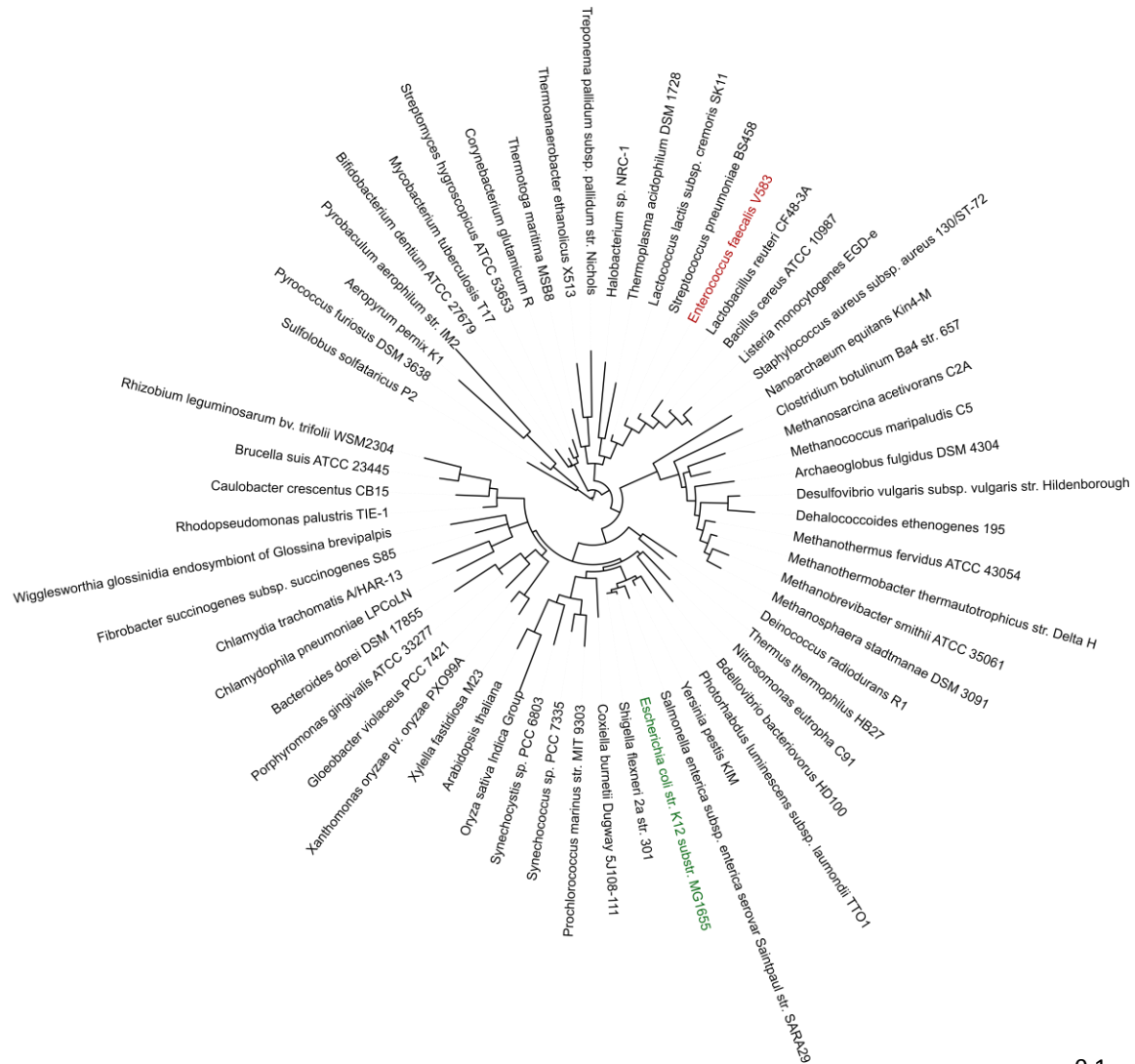


— 0.1

Figura 7: Análise filogenética de proteína SufS. Árvore filogenética apresentando seqüências de proteína cisteína desulfurase. *Enterococcus faecalis* SufS (vermelho), *Azotobacter vinelandii* NifS/IscS (azul) e *Escherichia coli* IscS/CsdA/SufS (verde). Colorações ao fundo da árvore compreendem as regiões de alinhamento de cisteínas desulfurase do grupo I (laranja) e/ou grupo II (amarelo). Os alinhamentos foram realizados e curados através de algoritmo *maximum likelihood* e Gblocks, respectivamente; árvores foram construídas, curadas e visualizadas utilizando PhyMol, TreeDyn e ItoI.

SufC corresponde à proteína que apresenta atividade ATPase em *E. coli* e está envolvida na formação do complexo SufBC₂D para formação do cofator nesta bactéria. Em *E. faecalis*, o homólogo verificado é o que apresenta maior similaridade à proteína verificada em *E. coli*, com valor de positividade de 73% e 0% de *gaps* em alinhamento de estruturas primárias de aminoácidos, e esta alta similaridade também pode ser verificada estruturalmente, como será descrito posteriormente. Análise filogenética de SufC permite a verificação da alta conservação de estrutura primária de SufC nos organismos, verificada pelo agrupamento de sequências de *Firmicutes*, *Proteobacteria* e cloroplastos de eucariotos superiores vegetais, com uma separação relevante verificada somente para arqueobactérias (*Archeoglobus fulgidus*, *Methanosarcina*, *Methanococcus*) (Figura 8). Por outro lado, apresenta tanto estrutura primária quanto tridimensional diferenciada de chaperona HscA de sistema *ISC* de *E. coli*, a qual também apresenta atividade ATPase e está envolvida em interação proteína-proteína com IscU. Isto nos permite hipotetizar que SufC estaria envolvida em interações com outros elementos *SUF* de *E. faecalis*, e não com SufU. Além disso, a verificação de resíduo conservado de ácido glutâmico em posição 171 (Glu 171), essencial para a atividade ATPase em SufC de *E.coli*, indica um possível papel similar para essa proteína em *E. faecalis*, possivelmente interagindo com proteínas SufB e/ou SufD do mesmo sistema.

As duas últimas regiões verificadas em genoma de *E. faecalis* correspondem a ORFs codificando produtos similares a SufB e SufD de *E. coli*. Neste microrganismo, SufB e SufD apresentam estrutura primária bastante parecidas, onde os seguintes fatores caracterizam ambas as duas: (i) a porção C-terminal conservada e envolvida na formação do complexo SufBC₂D; (ii) a porção N-terminal distinta, envolvida em formação do cofator [4Fe-4S] por parte de SufB; (iii) a presença de alto número de resíduos de cisteína em SufB, e de histidina em SufD. SufD apresenta atividade bioquímica ainda indefinida em *Proteobacteria*, porém pode estar envolvida em aquisição de elemento Ferro para o sistema, possivelmente devido à grande quantidade de resíduos de histidina (19 resíduos em *E.coli*) presentes na proteína. Análise de estrutura primária de homólogo de *E. faecalis* permite a verificação de 16 resíduos de histidina nessa proteína, mimetizando a característica verificada em proteobactérias. Verifica-se certa distância em relação à estrutura de SufD de *E. faecalis* e estruturas de *Proteobacteria* e eucariotos, como verificado em análise filogenética, agrupada em clade contendo principalmente outros representantes *Firmicutes*. Isso é devido principalmente pela verificação de uma maior similaridade entre as regiões C-terminal de SufD, podendo portanto estar envolvida em formação de complexo SufBCD (ou outros) também em *E. faecalis* (Figura 9). Por outro lado, o ortólogo de SufB verificado em *E. faecalis* apresenta tão somente a região C-terminal com grau aceitável de similaridade. Dessa forma, os resíduos de cisteína verificados em porção N-terminal de SufB de *E.coli* não são observados em *E. faecalis*, que como representante de *Firmicutes* possui uma porção N-terminal totalmente distinta da verificada em *Proteobacteria* e plastídios de eucariotos (Figura 10). Visto que a atividade bioquímica predita em SufB seria a formação do cofator em porção N-terminal e pelo alto número de resíduos de cisteína, a função dessa proteína em *E. faecalis* ainda é discutível, principalmente pelo fato desta apresentar apenas dois resíduos de cisteína (sendo apenas um conservado).



— 0.1

Figura 9: Análise filogenética de proteína SufD. Árvore filogenética apresentando seqüências de proteína SufD. *Enterococcus faecalis* (vermelho) e *Escherichia coli* (verde). Os alinhamentos foram realizados e curados através de algoritmo *maximum likelihood* e Gblocks, respectivamente; árvores foram construídas, curadas e visualizadas utilizando PhyMol, TreeDyn e ItoI.



— 0.1

Figura 10: Análise filogenética de proteína SufB. Árvore filogenética apresentando sequências de proteína SufB. *Enterococcus faecalis* (vermelho) e *Escherichia coli* (verde). Os alinhamentos foram realizados e curados através de algoritmo *maximum likelihood* e Gblocks, respectivamente; árvores foram construídas, curadas e visualizadas utilizando PhyMol, TreeDyn e ItoI.

De uma maneira geral, o sistema de formação dos cofatores [Fe-S] presente em *E. faecalis* apresentaria uma junção de fatores provenientes de duas maquinarias verificadas em *Proteobacteria*, a proteína SufU (homóloga de IscU), e os elementos *sufB*, *sufC*, *sufD* e *sufS* (homólogos de sistema *SUF*). Da mesma maneira, o sistema *sufCDSUB* foi verificado em outros microrganismos Gram-positivos também representantes de *Firmicutes*, como *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* e *Listeria* (altamente relevantes em estudos de importância clínica), bem como em representantes de *Lactococcus* e *Lactobacillus* (de grande relevância e uso em processo industriais). A alta similaridade destes elementos pode ser verificada pela constante associação em grupos de clades na análise filogenética realizada com todas as proteínas descritas. Genes homólogos a *SUF* foram constantemente identificados em plantas, onde participariam da maquinaria de biogênese do cofator [Fe-S] em plastídios, o que é consistente com a teoria de que plastídios evoluíram de uma cianobactéria endossimbiótica contendo maquinaria *SUF* (e ausente de *ISC*).

Interessantemente, dados da literatura ligam a ativação de sistemas *SUF* em *Proteobacteria* a situações de estresses induzidos por espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, por depleção de ferro, ou ainda em situações de processos virulentos por parte de microrganismos. Dessa maneira, seria de grande importância determinar em *E. faecalis*, um organismo potencialmente virulento e que apresenta somente a maquinaria *SUF* para formação do cofator [Fe-S], o comportamento de tal sistema frente a situações estressantes. Tal caracterização será descrita posteriormente pela verificação de padrão de transcrição pela técnica de RTqPCR. Da mesma maneira, os dados aqui descritos apresentam uma nova, e não usual, apresentação de genes de formação biosintética dos cofatores [Fe-S].

5.2 Análise de expressão de *E. faecalis* *sufCDSUB*

5.2.1 Operon *SUF*

Experimentos de RT-qPCR foram realizados com o objetivo de caracterizar geneticamente a maquinaria *sufCDSUB* e analisar a expressão relativa do operon *SUF* em condições normais de crescimento, bem como relativo ao crescimento sob condições de estresses oxidativo e por depleção de ferro. Para tanto, duas linhagens laboratoriais de *E. faecalis* FA22 e JH22 e uma amostra correspondente a isolado clínico resistente a vancomicina e proveniente de fluido peritoneal (X1), foram utilizados. Genes constitutivos *tuf* e *23SrRNA* foram utilizados para normalizar os resultados.

Os resultados de expressão genética verificados foram considerados específicos para cada linhagem, quando normalizados com o respectivo gene constitutivo. Tal especificidade pode estar relacionada às diferentes fontes das linhagens utilizadas apesar do fato de serem todas elas linhagens de *E. faecalis*. No entanto, uma comparação dos resultados obtidos permite a verificação de que todas as linhagens utilizadas apresentaram tendências similares (Figura 11). Devido a tal dado, análises estatísticas posteriores foram realizadas especificamente para cada linhagem utilizada. Não foi verificado nenhum dado estatisticamente relevante quando comparados genes teste com os genes constitutivos.

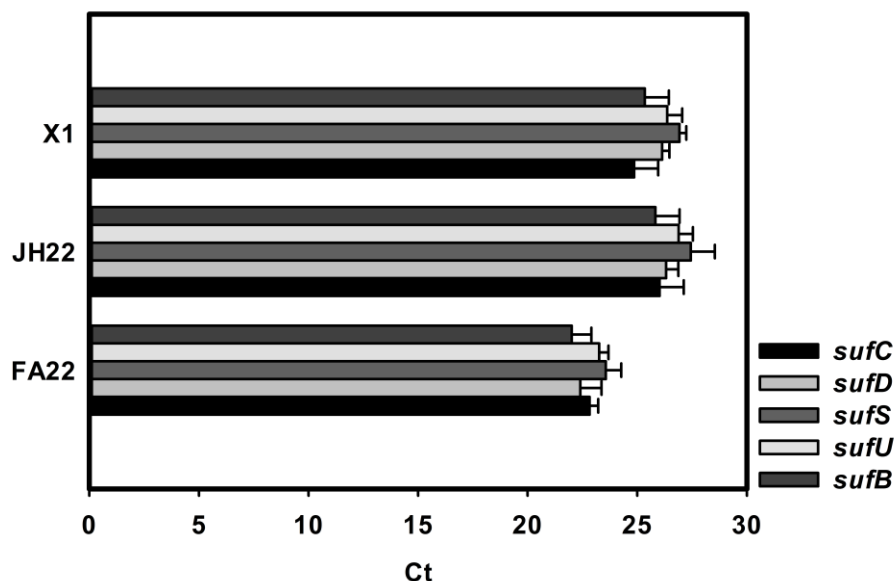


Figura 11: Análise de expressão de *SUF* sob condições normais de crescimento. Experimento de PCR em tempo real do operon *sufCDSUB* normalizado com o gene constitutivo *23S rRNA*, apresentando o *critical threshold* (Ct) verificado em condições controle de crescimento de *Enterococcus faecalis* FA22, JH22 e X1. Dados de Ct estatisticamente significantes ($p < 0.05$) foram considerados.

Uma vez caracterizado que *sufCDSUB* de *E. faecalis* possui características semelhantes ao operon *sufABCDSE* em *Proteobacteria*, foram realizados experimentos de análise de região promotora de tal operon e identificação de possíveis semelhanças com fatores já descritos. Para tanto, experimentos de análise de estrutura primária do genoma de *E. faecalis* foram realizadas para a procura de elementos regulatórios (*cis-acting elements*) e determinação de região promotora. A caracterização *in silico* da maquinaria *sufCDSUB* como operon pode ser facilmente realizada através de ferramentas de bioinformática. Utilizando as ferramentas DOOR e *microbesonline* identificou-se tais elementos com os códigos ID 9111 e VIMSS356533, respectivamente. O operon *sufABCDSE* de *E. coli* pôde ser caracterizado da mesma maneira através dos códigos ID 429364 e VIMSS5496861. A descrição de tais maquinarias por métodos de bioinformática como operon corrobora os dados bioquímicos apresentados anteriormente.

5.2.2 Análise da região promotora e identificação dos *cis*-elementos

A comparação de regiões regulatórias entre genomas de *E. coli* e *E. faecalis* foram realizadas através do mapeamento de regiões *upstream* não traduzidas e mapeamento do DNA de regiões de ligação de fatores *cis*-atuantes através da ferramenta de bioinformática PREDetector. Quatro regiões referentes à ligação de fatores *cis*-atuantes já foram descritas em genoma de *E. coli*, caracterizados como responsáveis por influenciar a transcrição do operon *sufABCDSE* em casos de estresse oxidativo (IscR, OxyR) e depleção de ferro (Fur), ambas condições associando o fator IHF. Genes responsáveis pela transcrição de tais elementos não estão espacialmente associados ao operon *SUF* e, da mesma maneira, genes ortólogos (*oxyR* e *fur*) verificados no genoma de *E. faecalis* também não se encontram nas redondezas do operon *sufCDSUB* (Figura 12). Matrizes construídas para comparação de ambas as regiões regulatórias e pesquisa de possíveis regiões de atuação de elementos *cis*-atuantes apresentaram dados relevantes. O genoma de *E. faecalis* apresentou regiões *cis*-atuantes similares à ORE I de *E. coli* (região de atuação de Fur), OREIII (região de atuação de OxyR) e IHF (região de torção de DNA, também relacionada ao controle de transcrição de operon *sufABCDSE*) (YEO *et al.*, 2006). Da mesma maneira, embora não tenha sido verificado nenhum gene ortólogo a IscR em genoma de *E. faecalis*, verifica-se uma região similar de atuação de tal elemento em região regulatória de operon *sufCDSUB* em genoma de *E. faecalis* (ORE III), sugerindo assim a possibilidade de outros elementos também estarem envolvidos na regulação de tal operon.

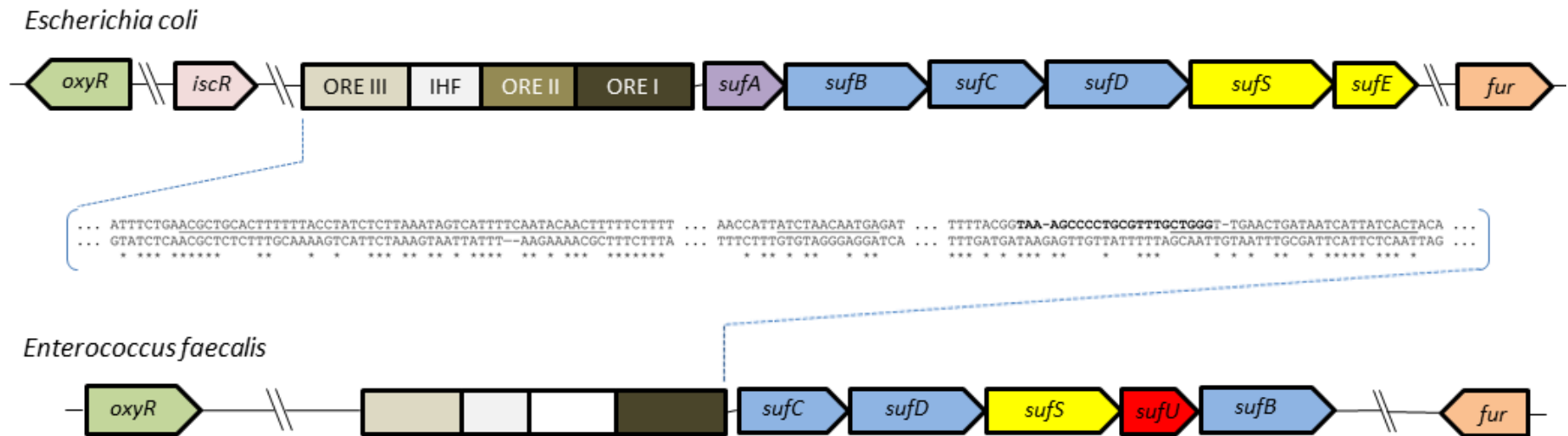


Figura 12: Maquinaria *sufCDSUB* de *Enterococcus faecalis* e análise de região promotora. Maquinarias *SUF* de formação dos cofatores [Fe-S] verificados em *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*. Alinhamento de seqüências primárias de DNA e verificação de similaridade em regiões promotoras em sistema *SUF* de *Proteobacteria* e *Firmicutes*. Genes e elementos *cis*-atuantes apresentando seqüências homologas estão identificados com mesma cor. Possíveis regiões para atuação de elementos *cis* em estão apresentadas da esquerda para a direita e correspondem a OREIII, IHF e OREI, respectivamente; a região em negrito corresponde a OREII.

5.2.3 Estresse celular: depleção de ferro e estresse oxidativo

E. coli apresenta duas maquinarias de formação dos cofatores [Fe-S], onde uma corresponde à maquinaria *housekeeping* (*ISC*), e outra é especializada em eventos de estresses oxidativo e por depleção de ferro (*SUF*). *E. faecalis*, por sua vez, apresenta apenas a maquinaria correspondente ao sistema *SUF*, portanto seria de vital importância uma análise de expressão relativa de tais genes frente a condições estressantes. Dessa maneira, linhagens descritas anteriormente de *E. faecalis* foram cultivadas em presença de quantidades crescentes de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e do quelante de ferro DIP. Juntamente com o operon *sufCDSUB* e os genes constitutivos, os genes *kat*, *oxyR* e *fur* foram utilizados para controle e verificação da situação de estresse celular, atestando o sucesso do tratamento na célula alvo. Da mesma maneira, tais genes foram utilizados para controle de atuação de seus produtos no controle da expressão de operon *sufCDSUB*, como verificado *in silico*. De uma maneira geral, quando normalizados com o gene constitutivo *tuf*, verificou-se uma diminuição de expressão relativa global. O resultado obtido era esperado para esse gene constitutivo, visto que já se verificou que tal elemento é também responsivo a estresses oxidativos, sendo também ativados e, portanto, atenuando os dados de expressão relativa de outros elementos quando normalizados frente a ele.

Em caso de expressão sob estresse por limitação de ferro, o operon *sufCDSUB* como um todo apresentou uma expressão relativa maior mesmo com a mais baixa concentração de DIP. Dados estatísticos significantes foram observados em diversas concentrações de DIP, estando mais pronunciados sobre concentrações mais altas, como verificadas principalmente para a linhagem X1. Por outro lado, para experimentos de estresse oxidativo, o operon inteiro também apresentou uma maior expressão relativa, porém somente quando submetidos a 20.0 mM H_2O_2 . Interessantemente, esta foi a única condição de estresse oxidativo em que os genes utilizados como controle acusaram alguma alteração na expressão relativa, confirmando a presença de estresse oxidativo na célula. Este resultado está de acordo com informações preliminares

presentes na literatura para experimentos de estresse oxidativo em *E. faecalis* utilizando peróxido de hidrogênio (VERNEUIL *et al.*, 2005a; VERNEUIL *et al.*, 2005b).

O elemento regulatório *fur* foi responsivo ao estresse de limitação de ferro para as três linhagens, e quase em todas as situações não resposivo a estresse oxidativo. O gene controle *kat*, por sua vez, foi responsivo a estresses de 0.2-1.0 mM DIP e 20.0 mM H₂O₂ e *oxyR* respondeu às mesmas concentrações de DIP e H₂O₂. Em todos os casos supracitados, a resposta observada está relacionada a aumento da expressão relativa dos genes mencionados, garantindo o sucesso das condições estressantes para as células em tais situações. Para realizar uma interpretação desses dados tendo uma confiança nos processos estressantes aplicados aos microrganismos, somente as situações onde ocorreu aumento da expressão do gene controle de tal estresse foram consideradas para análises posteriores. O regulador *fur* foi utilizado neste estudo de acordo com suas características de regulador intracelular das concentrações de ferro em organismos Gram-positivos através de sistema de *cis*-regulador em regiões promotoras de DNA (MOORE & HELMANN, 2005; LI *et al.*, 2009). A condição onde tal elemento apresentou-se com expressão relativa significativamente aumentada, estatisticamente, correspondeu aos diversos estresses submetidos. Dessa maneira, resultados de estresse contendo 1.0 mM DIP foi selecionado para posteriores análises. Nessa condição, aumento de expressão relativa para todos os genes do operon *sufCDSUB* bem como para elementos *kat* e *oxyR* foram observados (Figura 13), o que garante que sob condições de depleção de ferro intracelular, existe um aumento de transcrição de genes envolvidos na formação dos cofatores [Fe-S].

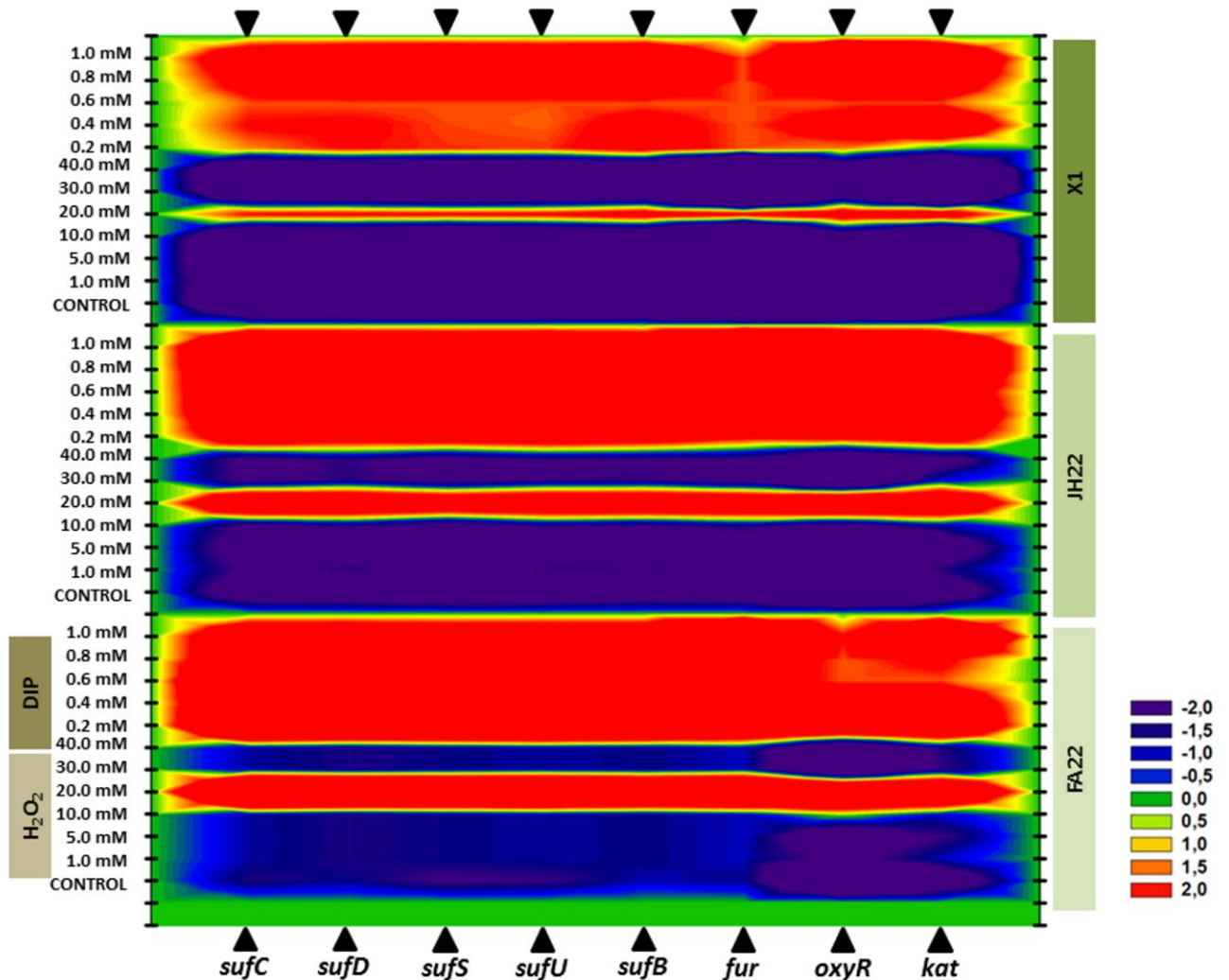
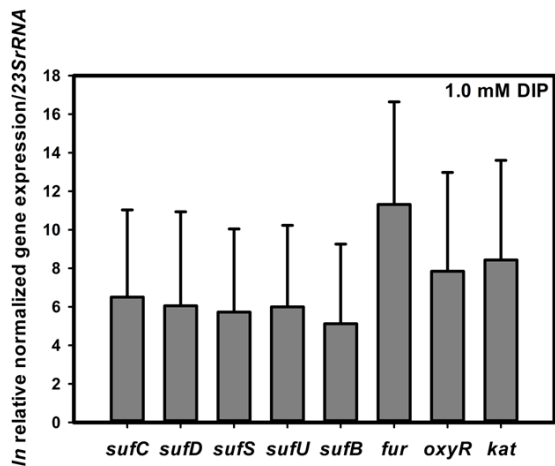


Figura 13: Testes de expressão de *sufCDSUB* sob condições estressantes de crescimento. Expressão relativa em escala \ln do operon *sufCDSUB* e genes *fur*, *kat* e *oxyR* normalizados com o gene constitutivo *23S rRNA*, apresentando o mapa geral de expressão observado nos diferenciados testes de realizados. As diferenciadas colorações representam a expressão relativa relacionada à repressão ou indução de transcrição das amostras biológicas de *E. faecalis* FA22, JH22 e X1 sob deiferenciadas concentrações do quelante dipiridil (DIP) e de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Dados de expressão relativa estatisticamente significantes ($p < 0.05$) foram considerados.

A.



B.

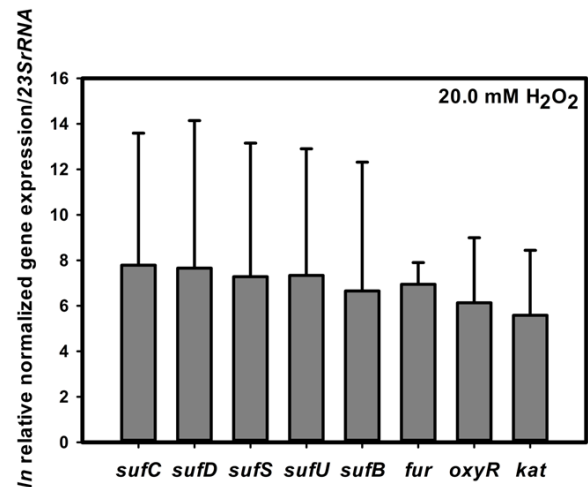


Figura 14: Análise de expressão de *sufCDSUB* sob condições estressantes de crescimento. Expressão relativa em escala *ln* do operon *sufCDSUB* e genes *fur*, *oxyR* e *kat* normalizados com o gene constitutivo *23S rRNA*. As barras representam a média acompanhada de coeficiente de variação para as amostras biológicas testadas, relacionadas ao crescimento sob condições de depleção de ferro (A) e estresse oxidativo (B). Dados de expressão relativa estatisticamente significantes ($p < 0.05$) foram considerados.

Diferentemente do que é observado para microrganismos Gram-negativos, onde *fur* está ligado à redução da expressão de *sufABCDSE* quando ligado a Fe^{+2} , bactérias Gram-positivas sob condições de diminuição de ferro respondem com aumento de expressão de *fur*. No caso aqui descrito, existe um aumento da produção de *fur*, porém diminuição de concentração intracelular de ferro, verificando que *fur* pode estar atuando de maneira diferenciada em *OREI-like* para controle de expressão de *sufCDSUB*, ou ainda simplesmente atuando em outras funções, visto tratar-se de um regulador global de concentrações intracelulares de ferro.

Da mesma maneira, o gene *kat* foi utilizado como gene repórter para as condições de estresse oxidativo submetidos às células de *E. faecalis*. A única condição estudada onde se verificou alterações com significância estatística para as linhagens corresponde ao tratamento com 20.0 mM H_2O_2 (Figura 14). Ainda, com o intuito de determinar rigorosamente a melhor condições de tal estresse para linhagens de enterococos, a expressão relativa do gene *oxyR* foi considerada, levando-se também em consideração a sua característica de possível *cis*-regulador da expressão de

elementos sob condições de estresse oxidativo em *Proteobacteria*; *oxyR* apresentou aumento significativo de expressão relativa sob condições de 20.0 mM H₂O₂. Sob essa condição, aumento de expressão relativa de genes *sufCDSUB* também foram observadas, bem como de *fur* (Figura 14). Diferentemente do observado para estresses com DIP, 20.0 mM H₂O₂ foi a única condição onde se observou modificação de expressão relativa. Dessa forma, observa-se que o aumento de genes expressão de *SUF* é responsivo a condições de estresse oxidativo, como verificado para *E. coli*, e pode estar sob o controle do elemento *cis*-atuante OxyR. Interessantemente, nota-se que em ambos os casos *fur* e *oxyR* parecem atuar concomitantemente para aumento de expressão de tal maquinaria em resposta às condições de estresses oxidativo e de depleção de ferro. Por outro lado, pode-se verificar que mesmo sem a presença de aumento da expressão de *fur*, existe aumento de expressão relativa do operon, verificado em tratamentos com concentrações menores de DIP. No entanto, observa-se que sempre que ocorre tal aumento de expressão relativa do operon, ele está associado a um dos dois possíveis elementos *cis*-atuantes.

Sob condições normais para crescimento de *E. coli*, ocorre a inibição de expressão de *sufABCDSE*, principalmente pela ligação de Fur-Fe⁺² em região promotora do operon. Condições de diminuição de ferro ou estresse oxidativo (e a consequente depleção dos cofatores [Fe-S]) leva à ativação de *sufABCDSE*. Neste caso, o repressor Fur apresenta-se sem ligação com Fe⁺², perdendo afinidade pela ligação ao DNA, o que permite a ligação de apo-IscR em seu local de ligação, visto que ambas sobrepõe-se e são mutuamente exclusivas. IscR é capaz de induzir expressão de *SUF* sozinho, porém a ligação de OxyR no DNA, bem como a ajuda de IHF em processo de torção de DNA para interação de IscR e OxyR, permite uma expressão ainda maior do operon de *E.coli*.

O que se observou com os dados de RTqPCR para *E. faecalis* foi um aumento de expressão de fatores Fur e OxyR sob condições de estresse oxidativo e depleção celular de ferro, acompanhando o aumento da transcrição do operon. Visto que *SUF* corresponde à única maquinaria presente nesse organismo, sua transcrição deve ter papel constante e, portanto, possuir mecanismo diferenciado ao proposto para *E. coli*.

Fur, por exemplo, apresenta região para ligação em *sufCDSUB*, onde poderia atuar de maneira diferenciada, visto a necessidade da homeostase dos cofatores [Fe-S] na célula. Por tratar-se de regulador global de ferro, *fur* tem sua expressão aumentada para a atuação em demais processos celulares, como repressão de genes que induzem depleção de ferro na célula. Este fenótipo é diferenciado do observado em *E. coli*, onde se verifica diminuição da expressão de Fur em estado de depleção celular de ferro, possivelmente por ação de RhyB. Ainda neste microrganismo, o regulador global Fur é induzido por OxyR em resposta a H₂O₂ e está envolvido em diminuição do *uptake* de ferro para atenuar possíveis problemas relacionados à reação de Fenton, o que poderia explicar a constante associação de indução de transcrição de ambos os elementos *fur* e *oxyR*.

Por outro lado, também se conferem semelhanças entre os sistemas *sufABCDSE* e *sufCDSUB*, relacionados à possibilidade de indução por elementos *cis*-atuantes. Apesar de não se encontrar homólogo *iscR* em *E. faecalis*, foi possível se identificar uma região para elementos *cis*-atuantes sobreposta ao local de ligação de Fur. OxyR se apresentou com transcrição aumentada, e poderia estar atuando no processo de transcrição de *sufCDSUB*, visto que também possui seu local de ligação *upstream* à região promotora, bem como o sítio para ligação de IHF-*like*. A necessidade de uma proteína acessória para ligação de OxyR corrobora a idéia de que deve haver outro elemento envolvido na indução desse sistema, IscR-*like*. Dessa maneira, deve haver um terceiro fator, que competiria com Fur para ligação no DNA (porém nesse caso possuindo maior afinidade, ao contrário do que ocorre em *E. coli*) visto que *sufCDSUB* é maquinaria *housekeeping* nesse caso, e sua repressão por parte de Fur-Fe⁺² não seria vantajoso para a célula.

5.3 Complementação *in vivo* de *Proteobacteria*

5.3.1 Complementação ISC de *Azotobacter vinelandii*

Azotobacter vinelandii utiliza as maquinarias *NIF* e *ISC* para formação dos cofatores [Fe-S], onde a maquinaria *NIF* encontra-se estritamente ligada a condições nitrificantes e transcrição da enzima nitrogenase. Por outro lado, espécies representantes de *Firmicutes* apresentam apenas o operon *SUF* como maquinaria com funções *housekeeping*, mimetizando a ação de *ISC* em *Proteobacteria*.

Experimentos de complementação gênica foram realizados para verificação da possibilidade de complementação de funções do sistema *ISC* de *A. vinelandii* por parte de sistema *SUF* de *E. faecalis*. Construções genéticas de linhagens de *A. vinelandii* contendo genes homólogos do sistema *SUF* de *E. faecalis*, foram realizadas através de experimentos de recombinação homóloga, partindo da linhagem *A. vinelandii* DJ1418 (Tabela 3, Figura 15), linhagem selvagem contendo todo o operon *ISC*. Diversas linhagens foram produzidas de acordo com a combinação de genes desejada, onde o gene *SUF* adicionado à linhagem encontra-se sob controle p^{BAD} , originando linhagens contendo *sufS*, *sufSU*, *sufC*, *sufD*, *sufU*, *sufB* ou *sufCDSUB*. Caracterizações fenotípicas e genotípicas foram posteriormente realizadas para a confirmação do sucesso da recombinação homóloga, evitando eventos de recombinação de sítio único, por exemplo. Fenotipicamente, a utilização de beta-galactosidase, meios de cultura contendo X-gal e antimicrobianos (como ampicilina e rifampicina) foram utilizados para a seleção de linhagens de interesse. Reação de PCR confirmatória foi realizada para todas as espécies, onde o amplicon de tamanho esperado foi verificado. As linhagens recombinantes de *A. vinelandii* produzidas foram nomeadas AES1 a AES7, de acordo com o gene inserido (Tabela 1).

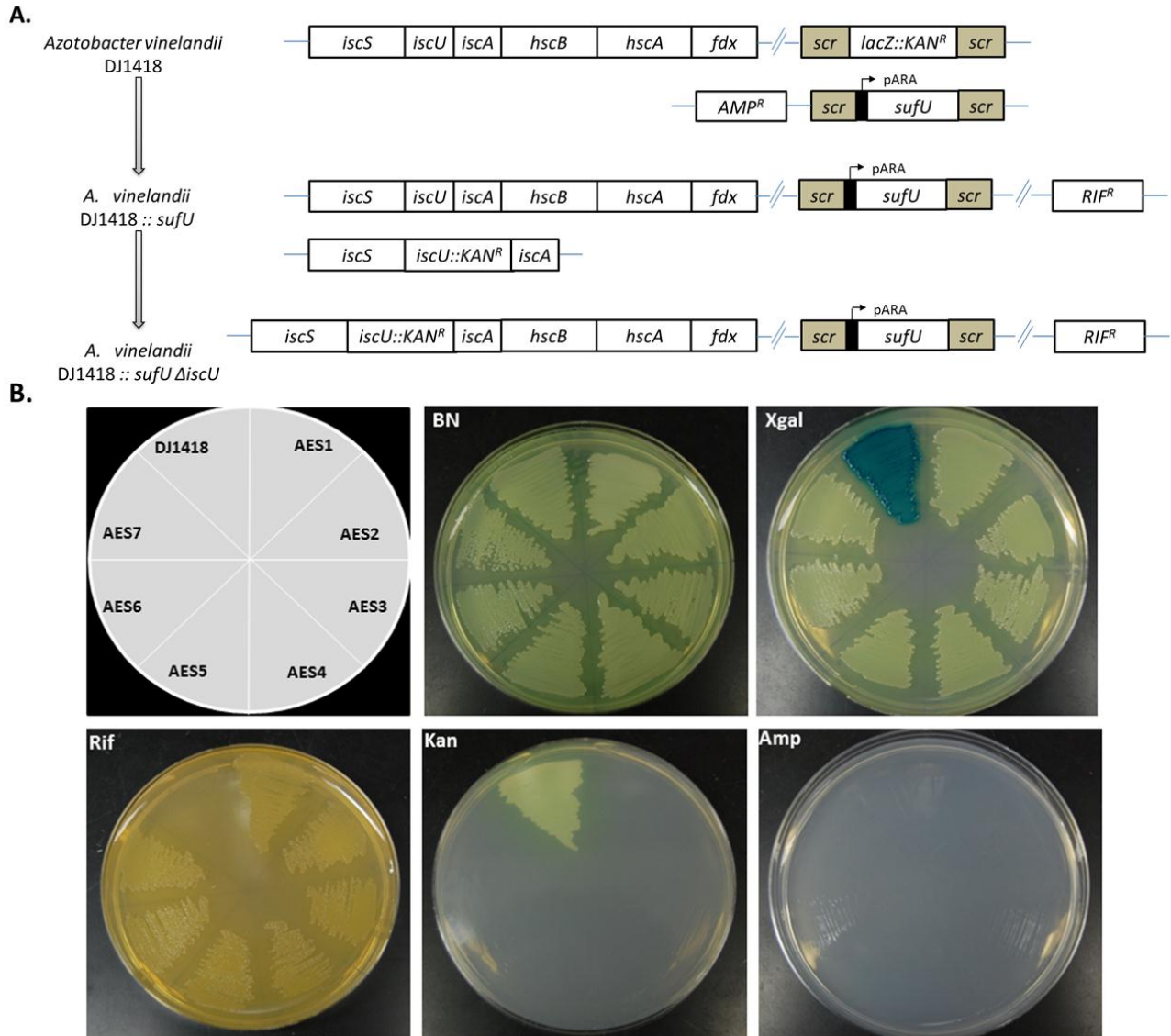


Figura 15: Complementação da maquinaria *ISC* de *Azotobacter vinelandii*. (A) Metodologia geral utilizada para experimentos de complementação, contendo elementos *SUF* de *Enterococcus faecalis*; (B) linhagens recombinantes de *Azotobacter vinelandii* apresentando fenótipo confirmatório para inclusão de *sufC* (AES1), *sufD* (AES2), *sufS* (AES3), *sufU* (AES4), *sufSU* (AES5) *sufB* (AES6) ou *sufCDSUB* (AES7) em cromossomo bacteriano, e linhagem recipiente *Azotobacter vinelandii* DJ1418.

Após a construção de linhagens contendo o gene *SUF* de interesse, um segundo passo de recombinação foi realizado para inativar o gene *ISC* nativo correspondente. Esta metodologia foi realizada levando-se em consideração os genes ortólogos e suas funções relacionadas. Dessa maneira, para a linhagem contendo SufU e/ou SufB

(possíveis proteínas arcabouço de formação do cofator), procedeu-se com a inativação de *iscU*; para SufC e/ou SufD inativou-se *hscA*; para a cisteína desulfurase SufS inativou-se *iscS*, para SufSU inativou-se *iscSU*, e o operon completo *iscSUAhscBAfdx* foi inativado na linhagem onde adicionou-se *sufCDSUB*. A viabilidade de linhagens contendo somente o representante *SUF* poderia indicar, portanto, uma complementação entre os elementos. A inativação do gene *ISC* em *A. vinelandii* foi realizada através de recombinação homóloga utilizando-se vetores construídos com os genes alvo contendo regiões codificantes de resistência para canamicina truncando o gene *ISC housekeeping* de interesse. O processo de seleção foi realizado mediante o uso de arabinose para expressão do gene em questão, e da presença/ausência de canamicina no meio. Este segundo efeito de recombinação não apresentou linhagens viáveis. O experimento foi validado por controles positivos de complementação. Dessa maneira, verificou-se que a inativação de qualquer que seja o elemento *ISC* em linhagens de *A. vinelandii* é letal para o microrganismo, e tal deleção não pode ser complementada por elementos ortólogos do sistema *SUF* de *E. faecalis*, nem mesmo por seu operon *sufCDSUB* completo sob controle de p^{BAD}.

5.3.2 Complementação de *Escherichia coli*

E. coli corresponde a uma bactéria representante do gênero *Proteobacteria* não nitrificante. Similarmente a *A. vinelandii*, apresenta o sistema *ISC* para formação *housekeeping* de proteínas Fe/S, porém por não ser nitrificante não apresenta o sistema *NIF*. Por outro lado, apresenta um terceiro sistema, *SUF*, ligado diretamente à síntese dos cofatores [Fe-S] em situações de depleção de ferro e estresse oxidativo. Visando verificar a possibilidade de complementação desta espécie representante de *Proteobacteria* com o sistema *sufCDSUB* de *E. faecalis*, experimentos de complementação foram realizados tendo como alvo *E. coli* e os dois sistemas citados anteriormente.

5.3.2.1 Sistema ISC

Para a verificação da possibilidade de complementação do sistema *ISC* de *E. coli*, procedimentos *in vivo* foram realizados se utilizando principalmente as linhagens *E. coli* mutantes para a cisteína desulfurase *iscS* (Tabela 1). Uma vez que o crescimento de *E. coli* pode ocorrer, apesar de lentamente, em linhagens mutantes de *iscS* pela presença de *sufS* foram utilizadas linhagens auxotróficas para outros elementos, como purinas, por exemplo. Dessa forma, pares de linhagens selvagem/mutante foram utilizados, compreendendo os mutantes *E. coli* PJ23 e *E. coli* CL100 e seus respectivos pares selvagens (TL254 e MC1061, respectivamente). O procedimento de comprovação da complementação foi realizado pela transformação das linhagens em questão com vetores contendo genes de interesse sob controle p^{BAD} , como determinado anteriormente para *A. vinelandii*. Estes elementos correspondem a vetores plasmidiais contendo *sufS*, *sufSU* e *sufCDSUB*. Após o procedimento de transformação, as células foram triadas em meios de cultura mínimo (M9) e meio mínimo suplementados com aminoácidos essenciais não fornecidos na ausência de desulfurase, bem como o elemento para o qual a linhagem era auxotrófica. Em ambas as placas foram utilizadas arabinose. Controles negativo e positivo foram utilizados para a reação, correspondendo ao vetor de clonagem sem inserto (pDB1568) e vetores contendo *iscS* ou *nifS* de *A. vinelandii*, respectivamente. Similarmente ao verificado para *A. vinelandii*, não foi observado crescimento após 72 horas de incubação das placas a 37°C nos meios não-suplementados, somente em linhagens contendo vetores controle positivos verificou-se crescimento (Figura 16). De acordo com os dados supracitados, verificou-se que o sistema *SUF* de *E. faecalis* não é capaz de realizar a complementação *in vivo* do sistema *ISC* de *E. coli*.

Analisando-se conjuntamente o fato de *sufCDSUB* não ser capaz de complementar sistemas *ISC* de *A. vinelandii* e *E. coli*, observou-se a existência de uma diferença entre ambos os sistemas. Este resultado está de acordo com a grande dissimilaridade entre os sistemas analisados, onde o operon de *E. faecalis* apresenta somente SufU como o possível ortólogo de sistema *ISC*, e proteínas com funções

chave na formação do cofator por *sufCDSUB*, como a desulfurase SufS (ortólogo IscS) e a chaperona com atividade ATPase SufC (ortólogo HscA) apresentam regiões protéicas altamente diferenciadas, provavelmente envolvidas em interações protéicas durante procedimentos de formação e/ou entrega do cofator [Fe-S] formado pelo sistema.

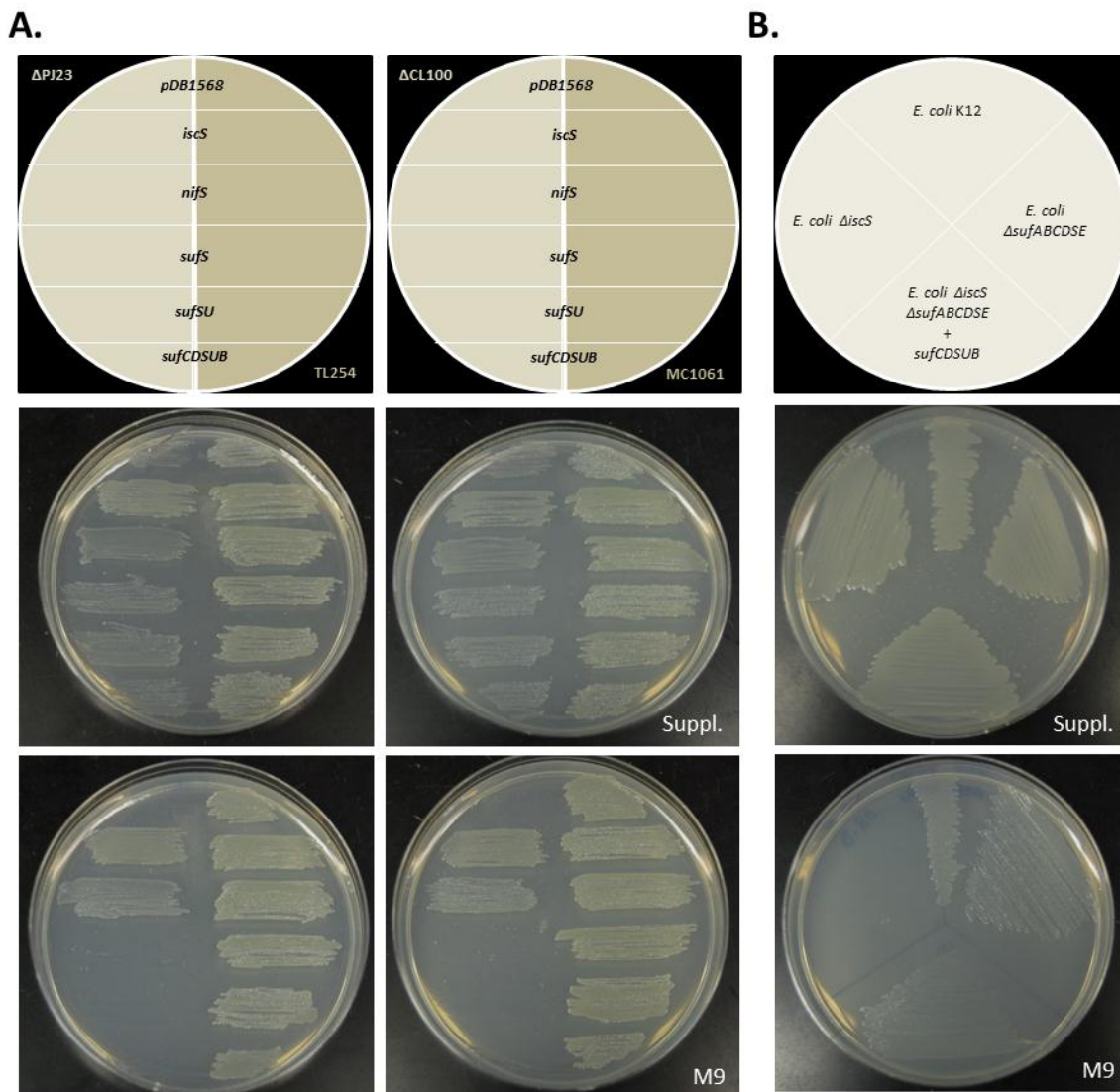


Figura 16: Complementação da maquinaria ISC e Suf de *Escherichia coli*. (A) Complementação da maquinaria ISC. Vetores de complementação correspondendo ao vetor vazio (controle negativo) pDB1568, controles positivo pDB551 e pDB943, pEFSE24, pEFSE73, pEFSE121. (B) Complementação da maquinaria Suf. *Escherichia coli* TB1, *Escherichia coli* Δ sufABCDSE, *Escherichia coli* Δ iscS, *Escherichia coli* Δ iscS Δ sufABCDSE complementado com pEFSE121 (EESC54).

5.3.2.2 Sistema *SUF*

Visto que o sistema *SUF* não foi capaz de complementar os sistemas *ISC* de *A. vinelandii* e *E. coli*, averiguamos a possibilidade de existir uma complementação do sistema *SUF* de *E. coli*. Como verificado anteriormente, o sistema *SUF* é na realidade o que melhor se assemelharia ao sistema presente em *Firmicutes*, apesar de apresentar algumas diferenças, como a presença de SufU, ausência de SufE e SufA, e uma sufB modificada quando comparada ao sistema *SUF* de *Proteobacteria*.

Experimentos de recombinação genética e transdução foram realizados com à finalidade de obtermos uma linhagem de *E. coli* que fosse mutante para elementos *iscS* e *sufS*. Como descrito anteriormente, a falta de *iscS* não é letal para *E. coli* devido à presença de uma segunda cisteína desulfurase, *sufS*. No entanto, uma linhagem mutante para ambos os elementos seria certamente letal e o microrganismo, portanto, inviável. Dessa maneira, desenhou-se uma metodologia de forma que pudéssemos obter esta linhagem contendo o gene ortólogo do sistema *SUF* de *E. faecalis* em vetor plasmidial sob controle de arabinose, onde a avaliação da viabilidade celular levaria, conseqüentemente, à complementação gênica (Figura 16).

Linhagens mutantes *E. coli* Δ *sufS*, Δ *sufSE* e Δ *sufABCDSE* foram utilizadas como recipientes para os procedimentos descritos. Todas as linhagens passaram pelo mesmo tipo de protocolo até que se obtivesse um resultado final. As linhagens utilizadas nesse experimento e processo detalhado dos procedimentos realizados estão descritos em Tabela 1 e sessão de Materiais e Métodos, respectivamente. Primeiramente, linhagens de *E. coli* contendo a região codificante para resistência a canamicina foram transformadas com plasmídeo pCP20, um plasmídeo termo-sensível que tem a função de retirar tal região, com a intenção de obtermos uma linhagem *E. coli* mutante sem nenhum tipo de resistência a antimicrobianos. Posteriormente, realizamos a construção da linhagem duplo-mutante através da utilização da linhagem mutante *E. coli* Δ *iscS::kan* (EESC42), a qual foi infectada com o bacteriófago contendo regiões de transposon Tn10, que confere resistência a tetraciclina, com o objetivo de

ancorar Tn10 perto de $\Delta iscS::kan$ em EESC42. Novamente, realizou-se a infecção desta célula com fago P1, e os lisados obtidos, contendo agora a região $\Delta iscS::kan::Tn10$, foram utilizados para infecção de linhagens *E. coli* mutantes para elementos *SUF*, permitindo a obtenção de linhagens duplo-mutantes $\Delta iscS\Delta sufS$, $\Delta iscS\Delta sufSE$, $\Delta iscS\Delta sufABCDSE$. Devido ao fato de linhagens duplo-mutantes não serem viáveis em *E. coli*, os experimentos de transdução foram realizados em linhagens contendo plasmídeos que complementassem tais mutantes e permitissem sua viabilidade, a qual foi fenotipicamente selecionada pela resistência a tetraciclina e escora a resistência a canamicina, como descrito previamente (OUTTEN *et al.*, 2004). A viabilidade de todas as linhagens duplo mutantes foi possível pela complementação com plasmídeo contendo região *IscS* de *A. vinelandii*, e os experimentos teste foram realizados com plasmídeos pEFSE24, pEFSE73, pEFSE121 ou pDB1568 (Tabela 3). Dentre os experimentos realizados para complementação, a única linhagem viável corresponde ao duplo mutante *E. coli* $\Delta sufABCDSE\Delta iscS::kan$ complementada com pEFSE121, apresentando resistência a canamicina, tetraciclina, ampicilina e capaz de crescer em meio mínimo M9 (complementado com arabinose) após 48 horas de incubação, portanto de maneira mais lenta quando em comparação às linhagens selvagens (Figura 16). Por outro lado, não se verificou complementação quando foi utilizado o plasmídeo contendo unicamente *SufS* e *SufSU* com as linhagens *SufS* e/ou *SufSE* mutantes, o que pode estar ligado especificamente à interações proteína-proteína formada entre os complexos e outros elementos do sistema. Como descrito em *E. coli*, diversas interações entre os elementos foram conferidos, como atuação sinérgica entre *SufE* e *SufBC₂D* para modular atividade de *SufS* e do complexo *SufBC₂D* atuando como arcabouço.

Dessa maneira, constatou-se que o operon *sufCDSUB* de *E. faecalis*, em sua totalidade, é capaz de complementar sistema *SUF* de *E. coli*, também em sua totalidade, o que indica que deve haver diferenças entre complexos desulfurásicos *sufSE* e *SufSU* formados *in vivo*, possivelmente relacionados a seus mecanismos de ação ou à interação desses elementos com outras proteínas do sistema, bem como a relevante importância indicando que a presença de todos os elementos do operon são fundamentais na complementação e viabilidade celular.

Tabela 3: Frequência de co-transdução observada em experimentos de complementação.

Linagem	Plasmídeo complementação	Frequência de Co-transdução (%) (<i>IscS::KanR::Tn10</i> + vetor complementação)
<i>ΔsufS</i>	controle positivo (pET:: <i>iscS</i>)	75
	controle negativo (pDB1568)	0
	pEFSE24 (pDB:: <i>sufS</i>)	0
	pEFSE73 (pDB:: <i>sufSU</i>)	0
	pEFSE121 (pDB:: <i>sufCDSUB</i>)	0
<i>ΔsufSE</i>	controle positivo	96
	controle negativo	0
	pEFSE24	0
	pEFSE73	0
	pEFSE121	0
<i>ΔsufABCDSE</i>	controle positivo	71
	controle negativo	0
	pEFSE24	0
	pEFSE73	0
	pEFSE121	93

5.4 Proteínas do operon *sufCDSUB*

Após identificação inicial *in silico* da presença da maquinaria de formação dos cofatores [Fe-S] em genoma de *E. faecalis*, experimentos de amplificação dos genes e clonagem foram realizados. Como descrito mais especificamente na seção de materiais e métodos, todos os genes em questão foram amplificados utilizando-se primers contendo sítios *NdeI* (*forward*) e *BamHI* ou *BglII* (*reverse*), e amplicons de tamanhos corretos foram obtidos para *sufC* (771 pb), *sufD* (1287 pb), *sufS* (1236 pb), *sufU* (468 pb), *sufB* (1395 pb), *sufSU* (1704 pb) e *sufCDSUB* (5157 pb). Posteriormente serão descritos os eventos de clonagem e expressão especificamente para cada representante, bem como procedimentos utilizados para purificação e para as respectivas atividades bioquímicas das proteínas.

5.4.1 SufU

Maquinarias de formação dos cofatores [Fe-S] devem apresentar uma proteína envolvida na aquisição de elementos Fe e S, referenciada como proteína arcabouço para formação do cofator, que será posteriormente entregue à proteína alvo. Caracteristicamente, tal proteína apresenta uma sequência primária de três resíduos conservados de cisteínas e um resíduo de ácido aspártico, que irão coordenar o cofator formado. A análise da maquinaria *sufCDSUB* de *E. faecalis* apresenta uma proteína com tal assinatura primária, SufU. Para caracterizarmos tal proteína com relação à sua atividade bioquímica e capacidade de formação do cofator [Fe-S], esta foi produzida recombinantemente, purificada e testada para as características bioquímicas descritas.

A clonagem inicial foi realizada em vetor de clonagem pTOPO4, posteriormente subclonado em dois vetores: pET23a(+), vetor sob controle de promotor p^{T7}, utilizado posteriormente para superexpressão, produção recombinante e purificação, e pDB1568, vetor sob controle de promotor arabinose p^{BAD}, utilizado em experimentos de complementação *in vivo*. Posteriormente, uma cauda de histidina foi adicionada à porção N-terminal do vetor pET::*sufU*. Todos os clones foram confirmados por seqüenciamento de DNA das porções *forward* e *reverse*.

Para a produção da proteína recombinante SufU, o clone pET::*sufU* foi superexpressado através da utilização de lactose em hospedeiro *E.coli* BL21DE3 por um período de 5 horas a 30°C. O extrato bruto apresentou uma superexpressão consistente e procedeu-se com a purificação da proteína. Estratégia de duas etapas foi utilizada para a purificação, onde o lisado inicial foi submetido a uma coluna de afinidade carregada com níquel, levando-se em consideração a presença da cauda de histidina adicionada à porção N-terminal da proteína. Posteriormente, a alíquota contendo a proteína de interesse foi submetida à etapa de polimento utilizando uma coluna de troca iônica. Por se tratar de uma proteína envolvida em formação do cofator [Fe-S], o qual é suscetível à ação de oxigênio, todas as etapas do processo foram realizadas em ambiente anaeróbio. Proteínas contendo o peso molecular esperados

foram verificadas (Figura 17), e identificadas por processos de espectrometria de massa.

Procedimentos para confecção de linhagens mutantes pontuais foram realizados através de reação de PCR com primers contendo a mutação desejada, utilizando-se o vetor pET::*sufU* como DNA molde, e com posterior digestão do DNA com enzima *DpnI*. Dessa maneira, obteve-se os clones SufU mutantes para os resíduos de cisteína 41 (SufU^{Cys41ΔAla}), ácido aspártico 43 (SufU^{Asp43ΔAla}) e cisteína 128 (SufU^{Cys128ΔAla}). O mesmo processo de purificação descrito anteriormente foi utilizado para a purificação dos mutantes. Após os procedimentos de purificação, frações contendo SufU, SufU^{Cys41ΔAla} e SufU^{Cys128ΔAla} não apresentaram características fenotípicas relevantes; por outro lado, SufU^{Asp43ΔAla} apresentou uma coloração esverdeada, que gradualmente desaparece quando exposto à condições ambientes de oxigênio. Tais frações poderiam indicar a presença do cofator extremamente lábil em todas as amostras exceto no mutante de ácido aspártico. De fato, tal evento já foi verificado em outros experimentos, onde a modificação de ácido aspártico por alanina nesse resíduo conservado de aspártico 39 em IscU de *E. coli* (que corresponderia a Cys⁴¹ em *E. faecalis*) leva o cofator a perder a característica transiente na proteína, ou seja, perde a capacidade de ser liberado, protegendo o cofator de durante processo de purificação, mantendo a coloração verificada.

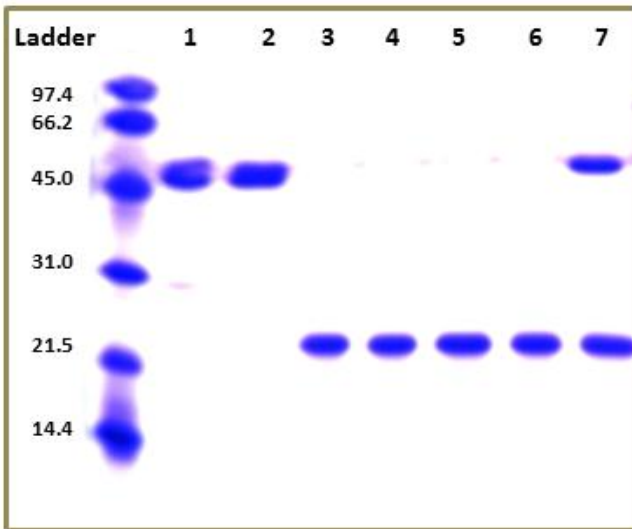
A.**B.**

Figura 17: Frações purificadas de SufS, SufU e complexos SufSU. (A) Frações purificadas de *Enterococcus faecalis* SufS (1), SufS^{Cys365ΔAla} (2), SufU (3), SufU^{Cys41ΔAla} (4), SufU^{Asp43ΔAla} (5), SufU^{Cys128ΔAla} (6) e complexo SufSU (7) em gel 12% SDS-PAGE (*Mr standards: phosphorylase B*, 97.4 kDa; *bovine serum albumine* 66.2 kDa; *ovoalbumin*, 45 kDa; *carbonic anhydrase*, 31.0 kDa; *soybean trypsin inhibitor*, 21.5 kDa; *lysozyme* 14.4 kDa); (B) frações 2.0 mg/ml de cisteína desulfurases SufS, SufS^{Cys365ΔAla} e SufSU utilizadas para ensaios enzimáticos.

Para a verificação da capacidade de formação do cofator [Fe-S] de SufU e caracterização de tal proteína como possível representante de proteína arcabouço no sistema *sufCDSUB*, foram realizados experimentos de reconstituição *in vitro* do cofator [Fe-S]. Espectros UV/Vis verificados após a incubação de 30 minutos da proteína com a desulfurase, o elemento Fe e L-cisteína identificou a presença de um cofator [Fe-S] característico do tipo [4Fe-4S] (Figuras 18). Da mesma forma, a reconstituição do cofator foi possível em todos os mutantes testados, verificando-se a presença de [4Fe-4S] em SufU^{Cys41ΔAla}, SufU^{Asp43ΔAla} e SufU^{Cys128ΔAla} apresentando o pico de absorvância característico a uma densidade ótica (DO) de 410nm. Estes resultados caracterizam a capacidade de formação do cofator por parte de SufU, identificando-a como possível proteína arcabouço envolvida no sistema *sufCDSUB* de *E. faecalis*.

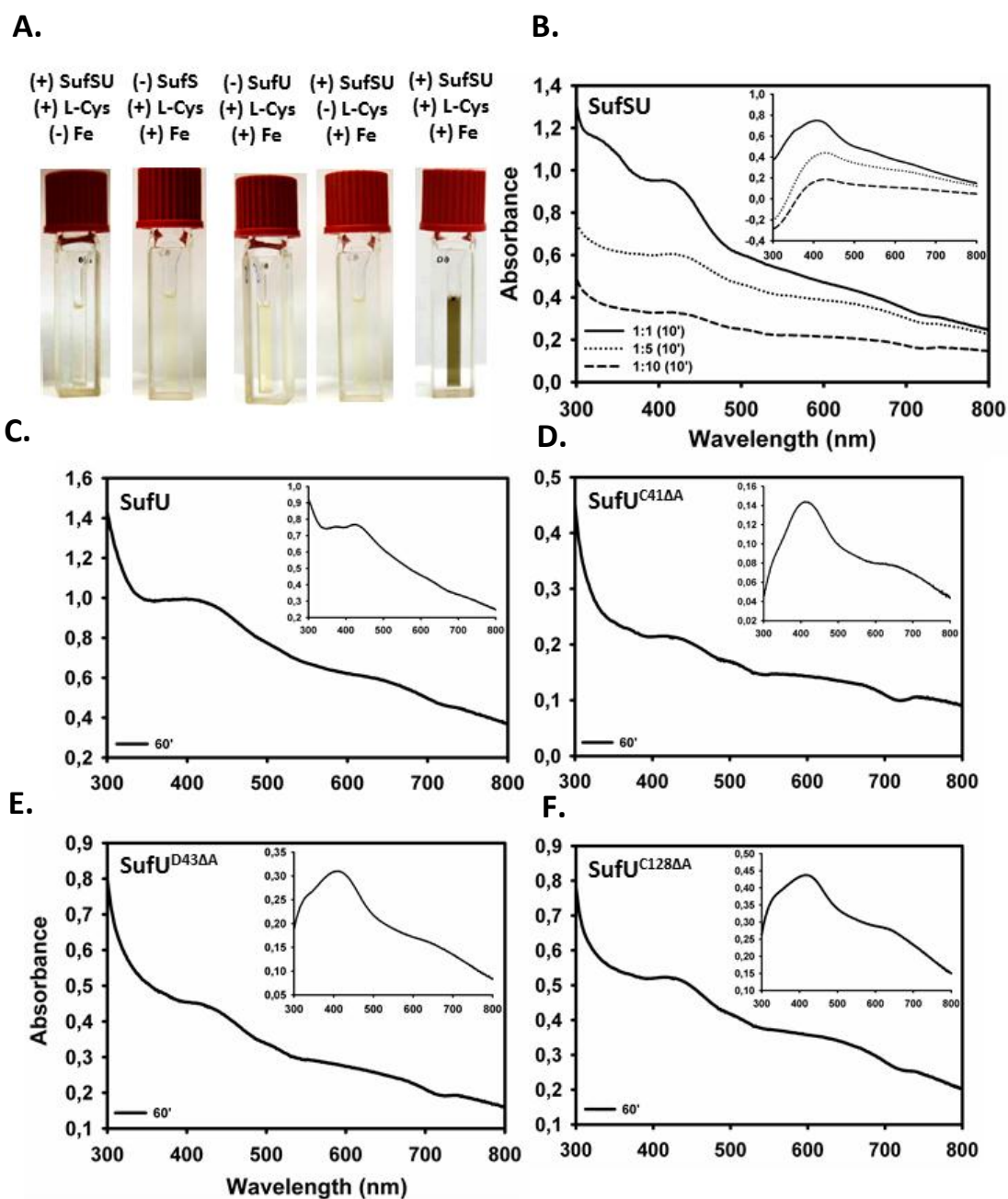


Figura 18: Reconstituição de cofator [Fe-S] em SufU e SufSU. (A) Reações controle para experimento de reconstituição de cofatores [Fe-S], compreendendo reações em falta de elemento ferro, cisteína desulfurase, proteína arcabouço ou L-cisteína. (B) Reconstituição de [4Fe-4S] verificada após incubação de SufSU, (C) SufU, (D) SufU^{Cys41ΔAla}, (E) SufU^{Asp43ΔAla} e (F) SufU^{Cys128ΔAla}. (B) Reconstituição de [4Fe-4S] verificada após 10 minutos de incubação de complexo equimolar SufSU. Subtrações da linha de base e verificação de pico característico de cofator do tipo [4Fe-4S] são apresentadas nos gráficos internos.

5.4.1.1 Análises estruturais de SufU

5.4.1.1.1 Modelagem Molecular

A caracterização da estrutura de SufU presente em *E faecalis* foi realizada através de procedimentos de modelagem molecular, utilizando como molde uma estrutura cristalográfica previamente descrita de *Streptococcus pyogenes* (PDB ID 1su0), a qual apresenta uma identidade de estrutura primária de 43% com SufU. A qualidade do modelo obtido foi verificada através de ferramentas como Procheck, PSIPRED e VERIFY3D. O modelo final obtido previamente para experimentos de dinâmica molecular manteve a característica terciária da molécula, sem eventos de desenovelamento da proteína. SufU apresenta uma caracterização terciária que inclui 4 α -hélices, I a IV, compreendendo os resíduos de aminoácidos de 8–19, 66–77, 84–97, e 105–141, respectivamente, e três folhas beta antiparalelas A a C, compreendendo os resíduos 33–37, 42–49, e 57–63 (Figura 19). Hélices III e VI formam um motivo *coiled-coil*, e ambas as hélices estão ligadas à folha β onde hélice III está orientada paralelamente à folha C. A hélice IV está orientada de forma antiparalela a hélice III. As hélices I, II, e V estão na vizinhança de III, que está inclusa no *core* protéico. A estrutura do sítio ativo de SufU apresenta todos os 3 resíduos conservados de cisteína e o resíduo conservado de ácido aspártico que permitem a formação transiente do cofator [Fe-S] para posterior entrega à proteína alvo. A união de duas subunidades dessa proteína para a formação de homodímero, com a posterior redução de dois cofatores $[2\text{Fe-}2\text{S}]^{2+}$ presentes um em cada dímero e a formação de um cofator [4Fe-4S] é possível, como verificado para IscU. Além disso, SufU parece seguir a mesma linha de raciocínio utilizada para IscU, não somente quanto ao *folding* da proteína, mas também em relação à flexibilidade de seu sítio ativo, que tende a apresentar maiores alterações estruturais visto que permite a formação e/ou redução do cofator, bem como a alteração dos estados oligoméricos de monômero/homodímero da proteína.

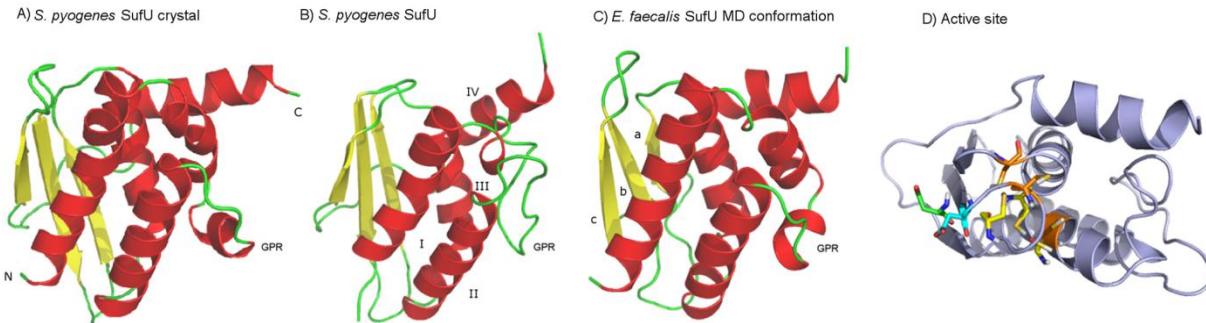


Figura 19: Representação estrutural de SufU. (A) estrutura cristalográfica de SufU molde (*Streptococcus pyogenes* – PDB ID 1su0); (B) SufU após 50 ns de trajetória; (C) Modelo SufU de *Enterococcus faecalis* após 50 ns de trajetória. (D) Sítio ativo apresentando resíduos conservados possivelmente envolvidos em orientação de cofactor [Fe-S] (resíduos de cisteína apresentados em laranja, e resíduos de aspártico apresentados em verde).

Estruturas cristalográficas podem reter conformações não-biológicas devido a forças do ambiente cristalográfico (JARDON-VALADEZ *et al.*, 2008; SOMPORNPISTUT *et al.*, 2008). Procedimentos de modelagem molecular podem, da mesma maneira, manter tais eventos conformacionais, comprometendo análises estruturais mais aprofundadas. Uma estratégia potencial para evitar estes eventos corresponde à complementação de informações obtidas a partir do cristal ao submeter tal estrutura a simulações com componentes de solvente biológico, através de experimentos de simulação de dinâmica molecular. Assim, o modelo SufU obtido a partir de experimentos de modelagem molecular foi submetido à dinâmica molecular visando tanto o refinamento do modelo quanto a análise de flexibilidade em regiões importantes da proteína.

5.4.1.1.2 Dinâmica Molecular

Resultados obtidos a partir da dinâmica molecular após uma trajetória de 50 nano-segundos (ns) possibilitaram a verificação de modificações consistentes na estrutura tridimensional tanto do molde utilizado (*S. pyogenes* SufU) quanto do modelo (*E. faecalis* SufU). Mudanças puderam ser observadas em todas as 4 α -hélices,

relacionadas a resíduos 4–14, 62–74, 80–92, 118–133 (I a IV, respectivamente) e com relação a folhas β (28–32, 37–44, 48–56 - A a C, respectivamente). Tal modificação similar tanto para o molde como para o modelo era de se esperar, visto que tanto *E. faecalis* como *S. pyogenes* são bactérias Gram-positivas membros de gênero *Firmicutes*, portanto filogeneticamente relacionadas. A verificação de eventos de modificação estrutural através de desnaturação, desenovelamento ou ainda de identificação de regiões de alta flexibilidade durante a trajetória pode ser controlada através do acompanhamento do RMSD (*root mean square deviation*), que permite um cálculo de quanto a estrutura final da trajetória está se distanciando da estrutura inicialmente submetida ao experimento de dinâmica molecular.

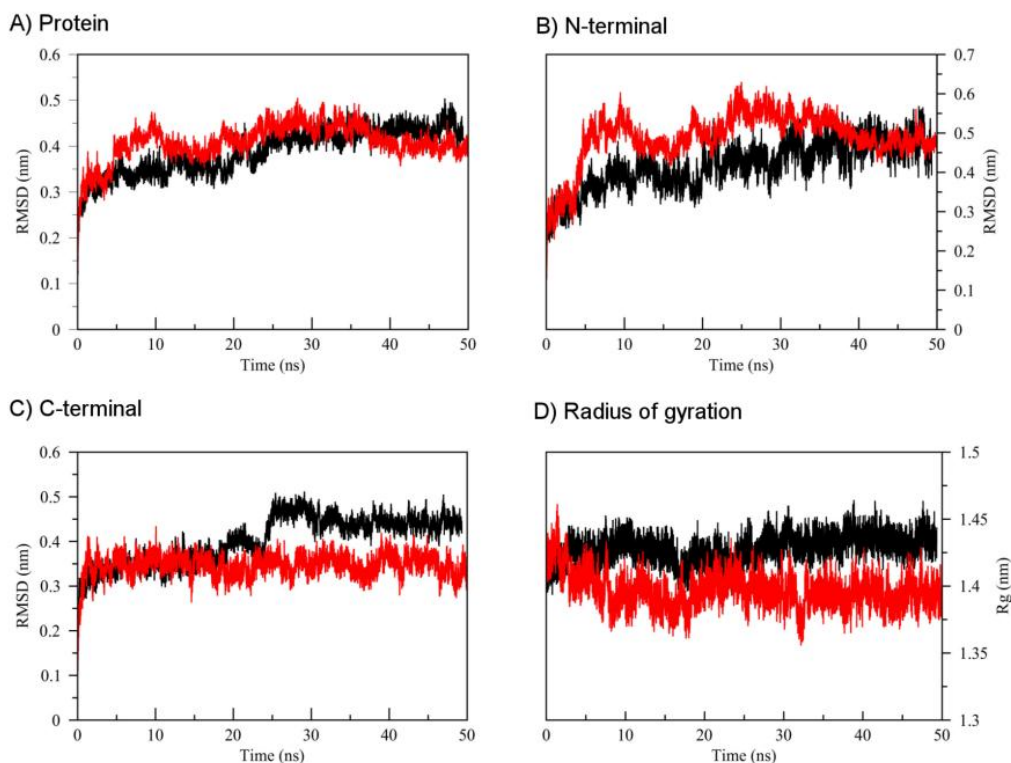


Figura 20: Análise de RMSD de SufU. Proteína completa (A), porções N-terminal (B) e C-terminal (C), e raio de giro da proteína (D). A estrutura do molde cristalográfico está apresentada em preto, e o modelo final (50ns) de *Enterococcus faecalis* apresentado em vermelho.

Para SufU, tanto o modelo como molde apresentaram comportamentos parecidos, chegando a um RMSD de 0.45 nm (Figura 20). Visto que toda modificação do valor de RMSD que ultrapasse 0.3 nm já pode ser considerado modificação estrutural relevante, tal valor identificou modificação estrutural devido a aumento de flexibilidade relacionada às porções N-terminal (resíduos 1 to 38) e C-terminal (resíduos 95 to 136), que quando verificados isoladamente adquiriram valores até 0.6 nm de desvio da estrutura inicial. O grau de modificação conformacional verificado aponta não somente para estabilização e refinamento da proteína de ambiente cristalográfico, mas também indica um padrão diferenciado de enovelamento e/ou flexibilidade relativo à alça de 19 aminoácidos presentes unicamente em bactérias Gram-positivas (denominada alça GPR) e que se mostrou responsável por um aumento de aproximadamente 0.1 nm no RMSD C-terminal de *E. faecalis* após 20 ns de trajetória. Apesar de os dados relativos à RMSD apresentarem uma perspectiva global de modificações conformacionais da estrutura, esta ferramenta não apresenta resolução a nível de resíduos da proteína. Dessa maneira, para a verificação de informações mais detalhadas relacionadas a resíduos específicos da proteína, utilizou-se a flutuação estrutural em função do tempo de trajetória e do número do resíduo em questão, denominado RMSF (*root mean square fluctuation*) (VERLI & GUIMARAES, 2005). Esta análise permitiu a confirmação da alta flexibilidade, bem como do papel de cada um dos elementos N-terminal e alça GPR na flexibilidade de SufU (Figura 21). Altas regiões de flexibilidade puderam ser observadas nas regiões GPR e em áreas relacionadas aos sítios ativos de SufU, especialmente em locais como resíduos Cys⁴¹, Asp⁴³ e Cys⁶⁶, bem como em regiões relacionadas a resíduos 20 a 25 e 40 a 45. Apesar dos resíduos de aminoácidos nessas regiões não estarem envolvidos em formação do cofator, tais áreas estão nas redondezas desses locais, e modificações estabelecidas nessas regiões podem ser de essencial importância para a atividade bioquímica da proteína.

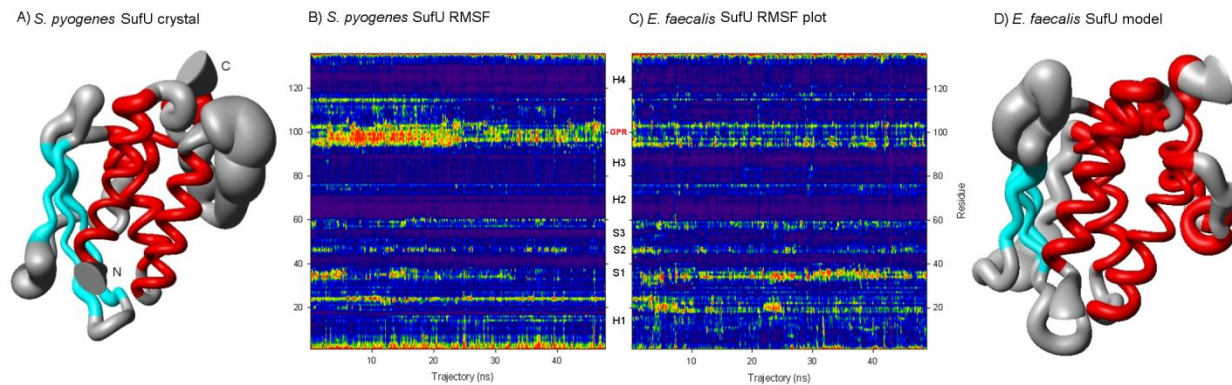


Figura 21: Análise de RMSF de SufU. Análise de flexibilidade da proteína através de gráficos tipo *sausage plot* para (A) molde *Streptococcus pyogenes* SufU e (D) modelo *Enterococcus faecalis* SufU. A espessura das regiões estão diretamente relacionadas à flexibilidade da proteína nesta determinada porção. Análise de RMSF em função de resíduo e tempo de trajetória para (B) molde *Streptococcus pyogenes* e (C) *Enterococcus faecalis* SufU. A escala utilizada garante identificação de regiões de alta (vermelho) ou baixa (azul) flexibilidade.

5.4.1.1.3 Comparação estrutural: IscU e SufU

A análise de várias estruturas protéicas de IscU e SufU como *Mus musculus* (PDB ID 1wfz), *Haemophilus influenzae* (PDB ID1r9p) e *Bacillus subtilis* (PDB ID 2azh) permitiu a verificação de diferenças entre tais estruturas, ligadas principalmente ao padrão desenovelado de porção N-terminal de IscU (tanto em *M. musculus* como *H. influenzae*), em comparação ao padrão enovelado de α -hélice verificado em porção N-terminal de bactérias Gram-positivas como *B. subtilis* SufU (resolvida por NMR) e *S. pyogenes* SufU (cristalografia). Experimentos de DM evidenciaram dados interessantes relativos à diferença das estruturas terciárias de IscU e SufU. Tais experimentos foram realizados através de modelagem molecular utilizando estrutura primária de *H. influenzae* IscU sobre dados cristalográficos de *S. pyogenes* SufU com o intuito de analisar modificações estruturais relativas principalmente à porção N-terminal.

Os gráficos de trajetória apresentam altos valores de RMSD ligados a regiões perto de sítio ativo (Cys³⁴, Asp³⁶, Cys⁶⁰ e Cys¹⁰³, nesse caso), e para a porção N-terminal (onde atingiu picos de 0.7 nm) e C-terminal (atingindo até 1.5 nm); o valor total

de RMSD foi 0.6 nm. Conjuntamente, dados de RMSD, RMSF e raio de giro apresentaram valores relacionados à *unfolding* de estrutura terciária do modelo; portanto, a trajetória foi realizada somente até o ponto de 20 ns. Gráficos de RMSF apresentaram drásticas transformações na estrutura secundária. Como descrito anteriormente, esperava-se que a porção N-terminal do modelo procedesse a um desenovelamento, uma vez que a estrutura primária de IscU foi adicionada a um modelo cristalográfico que apresentava tal parte enovelada, SufU. De fato, o processo de desenovelamento de N-terminal ocorreu e chegou-se a uma estrutura similar à verificada na estrutura NMR nativa de IscU. Porém, além disso, um processo relevante de *unfolding* foi verificado na porção C-terminal, verificando altos valores de RMSD para o *backbone* e cadeias laterais, chegando a 0.7 nm, e corroborando o fato do consecutivo *unfolding* verificado durante a trajetória. Altos valores de RMSF foram verificados para as porções terminais assim como para regiões perto do sítio ativo; esta característica confirma o fato de esta parte da proteína ser conservada com relação à SufU. De fato, a porção C-terminal, que apresentou maior alteração relacionada ao desenovelamento, corresponde à região menos conservada entre as duas proteínas. No entanto, verificou-se uma grande similaridade quando na comparação de gráficos de RMSF entre *E. faecalis* e modelo de IscU correspondendo a áreas do sítio ativo, áreas vizinhas e áreas correspondentes a regiões contendo sítios LPPVK ou GPR, todas essas áreas importantes para a formação do cofator e entrega do mesmo a proteínas alvo.

5.4.1.1.4 A região Gram-positiva de 19 aminoácidos

Através de análises de estrutura primária e de avaliações de trajetórias de dinâmica molecular verificou-se uma região específica de 19 aminoácidos entre a segunda e terceira cisteínas conservadas, presentes somente em proteínas do tipo SufU ligadas à formação dos cofatores [Fe-S] em bactérias Gram-positivas. Esta região está localizada entre as hélices III e IV, com estrutura similar a um *loop*, o que pode

indicar um domínio de ligação *helix-turn-helix*. No entanto, tal região não apresenta alta homologia relacionada aos resíduos de aminoácidos, o que pode vir a apresentar diferenciadas estruturas em modelos tridimensionais, de acordo com as cadeias laterais dos aminoácidos em questão. O *loop* acima mencionado apresenta-se exposto ao solvente com perda progressiva de estrutura secundária mantendo somente características de *turn*, podendo estabilizar hélices, dependendo do aminoácido em questão. Essas estruturas foram verificadas em ambas as simulações realizadas para SufU (molde e modelo). *Sausage plots* foram construídos tomando por base todas as estruturas obtidas durante os 50 ns de trajetória, e permitiram identificar um alto grau de flexibilidade neste *loop*, uma vez que a flexibilidade pode ser identificada de acordo com a espessura do elemento em questão.

Portanto, considerando a similaridade estrutural de IscU e SufU, experimentos de modelagem molecular e dinâmica molecular permitiram demonstrar alto grau de flexibilidade nas regiões de sítio ativo, vizinhança de tais sítios, e regiões LPPVK de IscU e GPR de SufU. GPR constitui uma região de 19 aminoácidos topologicamente em mesma posição de LPPVK, que apresenta aproximadamente 7 resíduos conservados e é encontrada especificamente em proteínas envolvidas em formação dos cofatores [Fe-S] em bactérias Gram-positivas. Esta região apresenta-se acessível ao solvente e pode formar estrutura secundária com formação de motivo *helix-turn-helix* entre hélices III e IV, o que caracteriza tal região como possível região de interação da proteína com outras moléculas. Além disso, evidencia a ideia de que deve haver algum outro fator, ainda não caracterizado, específico de filo *Firmicutes* e organismos contendo esse tipo de maquinaria *sufCDSUB* e envolvido em interações com outros elementos do operon para entrega do cofator, ativação de desulfurase ou outra função, ainda a ser descrita.

5.4.1.2 Cisteína Desulfurase SufS e o Complexo SufSU

Microrganismos representantes de *Proteobacteria*, como *E. coli* apresentam ambos os sistemas *ISC* e *SUF* e, dessa maneira, produzem as cisteínas desulfurases IscS (desulfurase tipo I) e SufS (desulfurase tipo II) com seu ativador SufE. *E. faecalis* e *Firmicutes*, por sua vez, apresentam apenas SufS, e não apresentam SufE apesar de, como colocado anteriormente, SufU apresentar grande semelhança estrutural com SufE. Tal semelhança estrutural coloca a questão da possibilidade de SufU atuar como ativador de SufS em *E. faecalis*, ou se simplesmente SufS não necessitaria ativador. Dessa maneira, SufS foi recombinantemente produzida e sua atividade bioquímica verificada, bem como a avaliada a possível atuação de SufU como ativador da desulfurase.

A clonagem inicial em vetor de clonagem pCR-Blunt foi realizada com amplicon de tamanho correto de 1236 pb observado anteriormente. SufS apresenta sítios de restrição para as enzimas *NdeI* e *BamHI*, mesmos sítios utilizados em *primers* para a reação de PCR. Portanto, anteriormente ao processo de subclonagem, realizou-se procedimento de mutação pontual de sítio de restrição de *NdeI* promovendo uma mutação silenciosa (sítio 206) e mantendo o aminoácido histidina no local. Procedimentos de análise de restrição utilizando *NdeI* e seqüenciamento da região em questão confirmaram a mutação na região. Da mesma maneira, visto a presença de sítios de *BamHI*, utilizou-se a enzima *HindIII* para experimentos de subclonagem, juntamente com *NdeI*. A subclonagem ocorreu em vetores pET23a(+) (com intuito de superexpressão, produção recombinante e purificação) e pDB1568. Para a produção recombinante de SufS, o clone pET::*SufS* foi superexpressado através da utilização de lactose em hospedeiro *E.coli* BL21DE3 por um período de 5 horas a 30°C. Extrato bruto apresentou uma superexpressão consistente. No entanto, a proteína não se apresentou de maneira solúvel; portanto, estratégia de modificação de temperatura de superexpressão foi utilizada, obedecendo a uma curva de temperatura de 18°C, 25°C, 37°C e 42°C, porém não suscitou modificações no estado de solubilidade da proteína. Mudanças no hospedeiro também foram realizadas, utilizando-se os hospedeiros *E.coli*

BI21DE3 Codon(+), *E.coli* BI21DE3 pLysS e *E.coli* C41DE3, porém nenhum desses apresentou modificação na solubilidade da proteína. Da mesma maneira, o vetor pDB::*SufS* foi submetido à mesma triagem descrita acima, porém tal vetor também não apresentou dados diferenciados quanto à solubilidade.

Dessa forma, realizou-se a clonagem de ambos os genes *sufSU* conjuntamente para verificar uma possível atuação de SufU na solubilidade de SufS. O procedimento de clonagem obedeceu ao mesmo protocolo descrito acima, incluindo a confecção de um mutante pontual silencioso em *sufS*. O vetor pDB::*SufSU* resultante foi submetido ao protocolo de curva de temperatura para superexpressão. Como verificado anteriormente, em todas as situações resultados aceitáveis de superexpressão foram observados, porém a única temperatura onde se verificou a proteína solúvel correspondeu a 42°C. Da mesma maneira, pela primeira vez foi possível verificar a coloração amarelada característica de superexpressão de proteína contendo PLP (Figura 17B). Dessa maneira, adicionou-se uma cauda de histidina à porção N-terminal de *sufS* do vetor pDB::*SufSU*. Todos os clones foram confirmados por seqüenciamento de DNA das porções *forward* e *reverse*. O procedimento de purificação do complexo seguiu a estratégia descrita anteriormente: o lisado inicial foi submetido a uma coluna de afinidade carregada com níquel; posteriormente, a alíquota contendo a proteína de interesse foi submetida à etapa de polimento utilizando uma coluna de troca iônica. Utilizando tal estratégia, obtiveos a purificação do complexo SufSU em alta concentração, apesar de certo excesso de SufS ser verificado, possivelmente devido à presença da cauda de histidina na porção N-terminal de SufS. A afinidade entre as duas proteínas mostrou-se extremamente alta, exigindo altas concentrações de imidazol (1.0 M) para a eluição do complexo. A reconstituição do cofator em SufSU foi possível seguindo a metodologia descrita anteriormente, verificando-se a presença de [4Fe-4S], apresentando o pico de absorbância característico a uma DO de 410nm (Figura 18B).

A metodologia descrita acima foi repetida para a purificação do complexo SufSU contendo mutações nos sítios ativos de SufU. O processo de mutação modificou drasticamente a afinidade do complexo, o que pôde ser verificado pela purificação de

concentrações residuais de SufU nos mutantes SufSU^{Asp43Ala}, SufSU^{Cys41Ala}, SufSU^{Cys66Ala} e SufSU^{Cys128Ala}. Dessa maneira, a proteína SufS pura foi obtida a partir de alíquotas desses mutantes, após processo de polimento em coluna de troca iônica, eluindo primeiramente SufU, seguido de SufS e, ao final, do complexo sufSU; o mesmo passo foi utilizado para remoção de excesso de SufS do complexo SufSU. Proteínas contendo o peso molecular esperados foram verificadas, e identificadas por processos de espectrometria de massa. O mutante SufS^{CysΔ365Ala} foi obtido a partir da construção do vetor duplo-mutante pDB::*SufS*^{CysΔ365AlaUAspΔ43} através dos procedimentos de mutação pontual descritos anteriormente, cuja superexpressão e purificação seguiram os mesmos passos descritos acima.

Após o processo de purificação tanto de frações contendo somente SufS, como do complexo SufSU, verificou-se a coloração amarelada clássica e característica de enzimas contendo PLP como cofator. Como verificado anteriormente, a superexpressão de vetores contendo somente SufS apresentaram expressão significativa da proteína, porém sem a coloração amarelada, verificada somente quando co-expressas SufSU. Este fato poderia indicar que SufU exerceria função em coordenação e/ou estabilização de PLP no complexo SufSU. Interessantemente, o complexo expresso conjuntamente permite purificação de frações puras de SufS de coloração amarelada, sugerindo então o envolvimento de SufU na orientação do PLP em SufS, ou ainda na aquisição do PLP. Análises espectroscópicas UV/Vis foram realizadas tanto para confirmação da presença de PLP na enzima, como para a caracterização de atividade bioquímica das proteínas. Tal caracterização envolveu a quantificação de absorvância no espectro UV/Vis antes e após a adição de L-cisteína. Mudanças no espectro associadas à reação de transpersulfuração mediada por cisteína desulfurase foram verificadas e caracterizadas para as amostras SufS, SufS^{CysΔ365Ala} e SufSU (Figura 22). A conversão de L-cisteína para L-alanina com a liberação de enxofre elementar envolvendo a reação posterior do ataque nucleofílico pelo ânion tiolato do resíduo Cys³²⁵ (*E. coli*) de SufS no enxofre da L-cisteína substrato caracteriza a atividade biológica de cisteína desulfurases. Picos de absorção em regiões de 340nm e 420nm caracterizam a parte inicial da reação de trans-sulfuração e formação dos intermediários de reação *Cys-aldimine* e *Cys-ketamine*. Como verificado

nos gráficos, todas as amostras submetidas apresentaram tal evento após a adição de L-cisteína, caracterizando tratar-se de enzima biologicamente ativa.

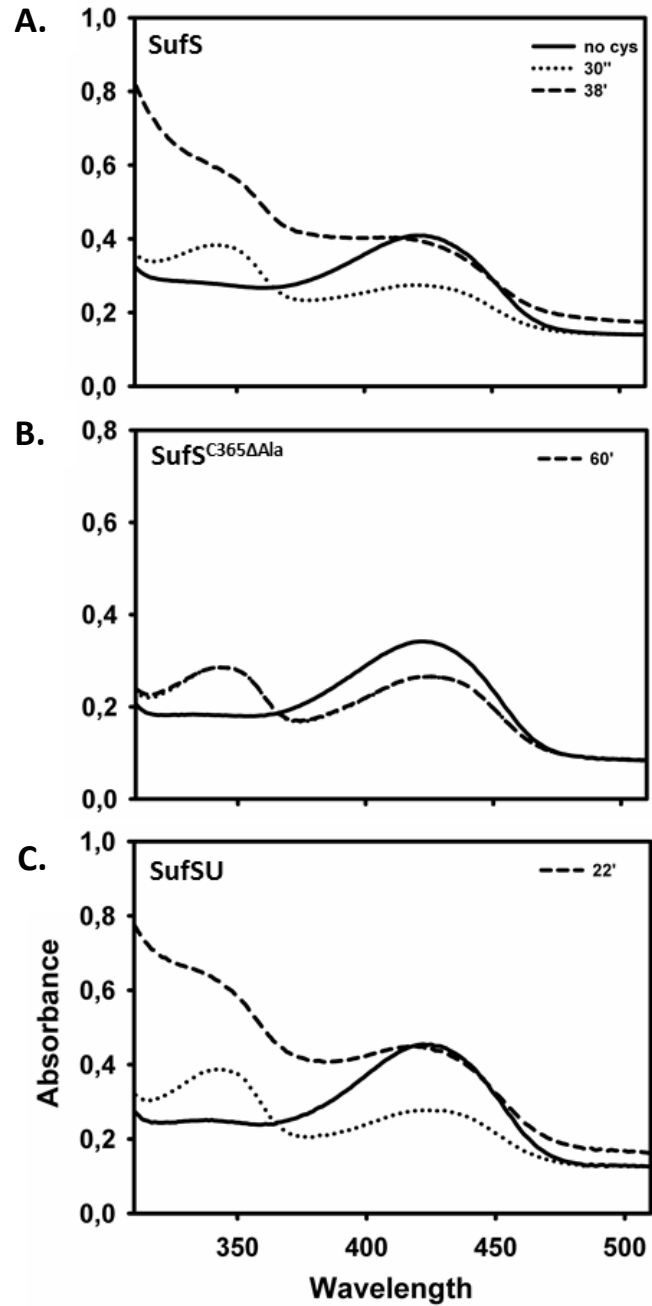


Figure 22: Características espectroscópicas associadas ao processo de desulfuração de L-cisteína catalizada por cisteína desulfurases. Espectros de absorção UV/Vis de 100.0 μM (A) SufS, (B) SufS^{Cys365ΔAla} e (C) SufSU após purificação, imediatamente após a adição de 500.0 μM L-cisteína (linha tracejada) e após recuperar pico inicial de 420 nm (linha pontilhada).

De acordo com a formação de enxofre elementar pela enzima e das mudanças na concentração relativa de intermediários enquanto a reação procede para retornar ao equilíbrio, deve-se observar um relaxamento na curva dos espectros, especialmente no pico de 420nm, e este relaxamento é relacionado diretamente à atividade da enzima. Analisando este pico de absorvância, verifica-se que o complexo SufSU demorou menos tempo para atingir o relaxamento na curva de 420nm em comparação a SufS, o que sugere que a ligação de SufU a SufS pode, de fato, aumentar a atividade catalítica da cisteína desulfurase, acelerando um ou mais passos na reação. Para a validação desta correlação, experimentos de relaxamento da curva de 420 nm foram realizados em concentrações equimolares de L-cisteína (100.0 µM) e sítio ativo, quantidades essas capazes de mimetizar a concentração *in vivo* de L-cisteína (KESSLER, 2006). Nessa condição, SufSU demorou 12 minutos para adquirir a absorvância original, enquanto SufS necessitou em torno de 20 minutos para atingir tal ponto. As curvas de relaxamento apresentaram uma *optical silent lag time* entre as modificações óticas descrita anteriormente, e o início do relaxamento ótico em 420 nm foi diminuído pela presença de SufU. Isto poderia indicar que SufU estaria acelerando um ou mais passos que precedem a formação de *Alanine-PLP-Aldimine*. Tais passos poderiam envolver o ataque nucleofílico do tiolato do resíduo de Cys³⁶⁵ (*E. faecalis*) de SufS no grupamento tiol do intermediário cisteína-PLP, formação de *persulfide* e protonação do intermediário *Alanine-PLP-Ketamine* para a formação de *PLP-Aldimine*. O fenótipo do mutante SufS^{Cys365ΔAla} foi confirmado, uma vez que a reação não procedeu como o verificado nos experimentos anteriores, mantendo o equilíbrio descrito. Este resultado é esperado, uma vez que a reação é finalizada no momento em que o ataque nucleofílico iria ocorrer e necessitaria a atuação do resíduo conservado de cisteína. Tais resultados garantem a caracterização de SufS como a cisteína desulfurase de *E. faecalis* ao mesmo tempo que abre a possibilidade de SufU estar envolvido na ativação dessa enzima.

Para a verificação da possibilidade de SufU atuar como ativador de SufS, ensaios cinéticos específicos de atividade de cisteína desulfurase foram realizados. A atividade da enzima foi verificada através da dosagem de *sulfide* liberado na presença de L-cisteína e DTT após 60 minutos de reação através da metodologia de formação de

azul de metileno (Figura 23). Dados prévios utilizando a mesma metodologia para dosagem de *sulfide* formado por outras cisteínas desulfurases descreveram os seguintes resultados: *A. vinelandii* IscS (89.4 nmol S min⁻¹ mg⁻¹) (ZHENG *et al.*, 1993), *H. pylori* NifS (9.96 nmol S min⁻¹ mg⁻¹) (OLSON *et al.*, 2000), *A. thaliana* AtNFS1 (12.0 nmol S min⁻¹ mg⁻¹)(FRAZZON *et al.*, 2007), e na presença de SufE (3.0 nmol S min⁻¹ mg⁻¹) (XU & MOLLER, 2006). De acordo com o esperado, não se verificou liberação de *sulfide* na amostra contendo SufS^{Cys365ΔAla}. SufS (4.0 nmol S min⁻¹ mg⁻¹) e apo-SufSU (6.0 nmol S min⁻¹ mg⁻¹) apresentaram diferenças estatisticamente relevantes em relação ao *sulfide* formado, e apo-SufSU apresentou diferenças significativas quando comparada a todas as as outras amostras testadas. Por outro lado, holo-SufSU (148.68 nmol S min⁻¹ mg⁻¹) apresentou uma taxa aproximadamente 37 vezes e 25 vezes aumentada de atividade desulfurásica *in vitro* quando comparada a SufS e apo-SufSU, respectivamente. Esses dados corroboram a idéia de que SufU tanto em sua forma apo como na forma holo atuaria como ativador de cisteína desulfurase em *E. faecalis*. No entanto, a caracterização de holo-SufU como ativadora é de difícil interpretação, uma vez que a dosagem verificada excedeu a linearidade do método utilizado após os primeiros 5 minutos de incubação. SufSU^{Asp43ΔAla} (4.6 nmol S min⁻¹ mg⁻¹) também resultou em diferença significativa com relação à quantidade de *sulfide* formado em comparação a SufS e a outros mutantes, o que corrobora o fato de o resíduo de ácido aspártico estar relacionado a processos de ancoramento do cofator, e provavelmente não apresenta função alguma como sítio no processo de formação/liberação *sulfide* para o sistema. Por outro lado, diferenças significativas verificadas para SufSU^{Cys41ΔAla} (3.6 nmol S min⁻¹ mg⁻¹) e SufU^{Cys128ΔAla} (3.7 nmol S min⁻¹ mg⁻¹) sugeririam a participação dos resíduos 41 e/ou128 como possíveis sítios para transferência de *sulfide* entre SufS e SufU durante a reação de transpersulfuração. Portanto, com o intuito de verificar especificamente qual resíduo de cisteína estaria envolvido em tal processo, experimentos de espectrometria de massas foram realizados, e demonstrou a presença de *persulfide* em ambos os resíduos de Cys³⁶⁵ de SufS e Cys¹²⁸ de SufU, sem nenhuma alteração significativa em massa do resíduo Cys⁴¹, o que indicaria uma possível transferência de *sulfane* de SufS para SufU envolvendo especificamente os resíduos de cisteína 365 (SufS) e128 (SufU).

A modelagem molecular da cisteína desulfurase foi realizada utilizando como molde SufS de *Synechocystis* (PDB ID 1t3i), e apresentou uma estrutura globular externa protegendo as regiões envolvidas em liberação de *sulfide*, resíduo catalítico conservado de cisteína e um bolsão interno envolvido no englobamento do cofator PLP dessa proteína (Figura 24).

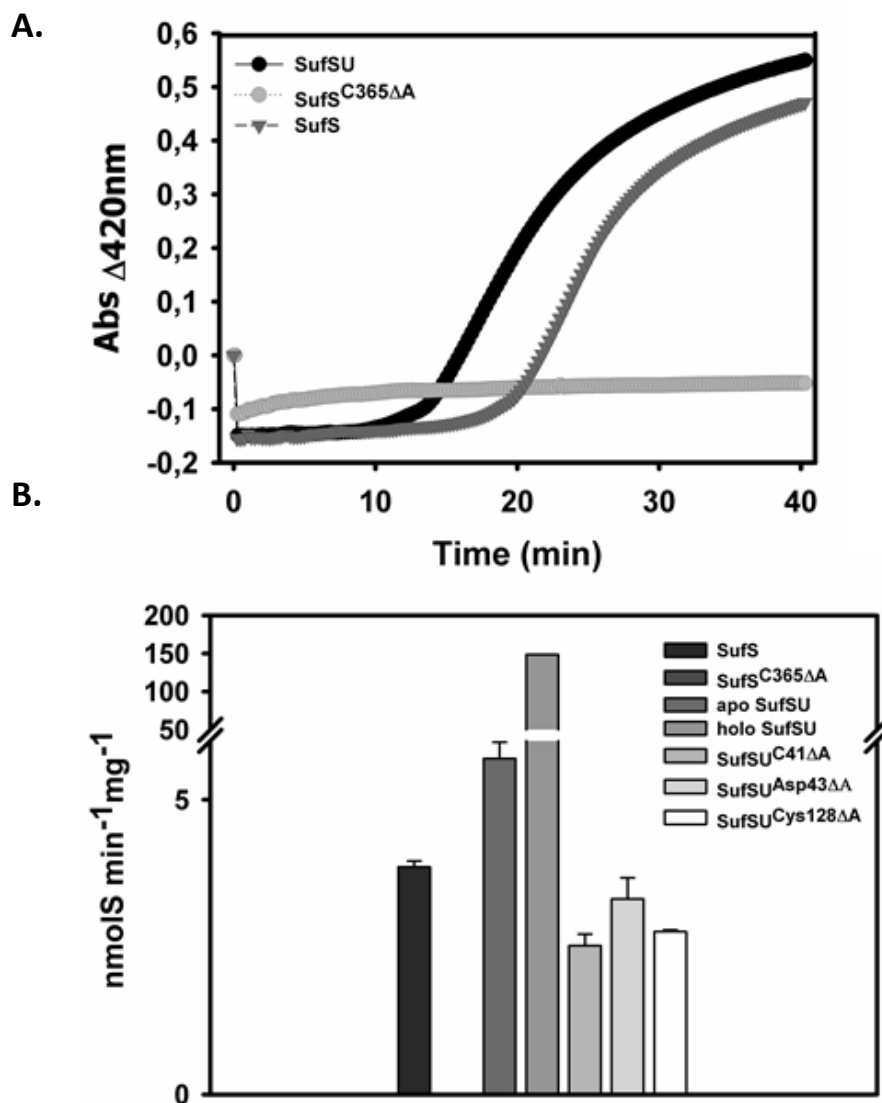


Figura 23: Gráficos de atividade desulfurase de SufS e ativador de desulfurase SufU. (A) Relaxamento tempo-dependente de $\Delta\text{Abs}_{420\text{nm}}$ para SufS (triângulos), SufS^{Cys365ΔAla} (círculos cinzas) e complexo SufSU (círculos pretos) após adição de 100.0 μM L-cisteína; (B) Atividade específica de cisteína desulfurases, apresentando média e desvio padrão dos dados verificados. Dados estatisticamente significantes ($p < 0.05$) foram considerados.

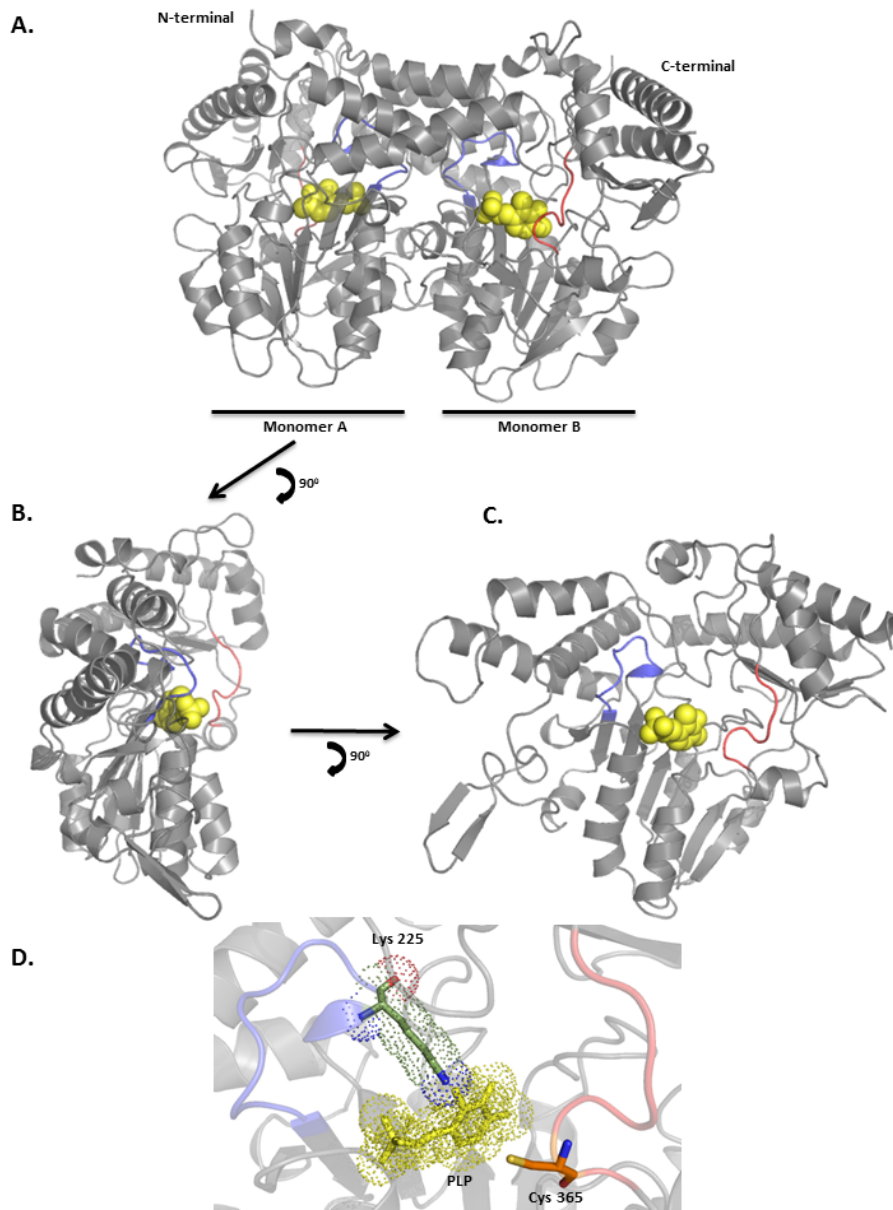


Figura 24: Representação estrutural de SufS. Modelagem molecular da cisteína desulfurase SufS de *Enterococcus faecalis*, utilizando como molde a estrutura cristalográfica de *Synechocystis spp.* PCC 6803 (PDB ID 1T3i). (A) Estrutura dimérica de SufS contendo duas moléculas de piridoxal-fosfato - PLP (amarelo) por monômero. (B) e (C) Estruturas monoméricas de SufS, apresentando os *loops* contendo a sequência característica de cisteína dessulfurase do grupo II – RXGHHCA (vermelho) em torno do sítio ativo conservado de cisteína na posição 365 (Cys 365); em azul, o domínio conservado HKXXXPXGXG contém o resíduo catalítico conservado de lisina da posição 225 (Lys 225), responsável pela ligação ao cofactor PLP. (D) Sítio catalítico de SufS, apresentando os resíduos conservados Lys 225, ligado ao PLP, e Cys 365.

5.4.1.3 SufC

A clonagem inicial foi realizada em vetor de clonagem pCR-Blunt, posteriormente subclonado em pET23a(+) e pDB1568. Para a produção proteína recombinante SufC, o clone pET::*sufC* foi superexpressado através da utilização de lactose em hospedeiro *E.coli* BL21DE3 por um período de 5 horas a 30°C. O extrato bruto apresentou uma superexpressão consistente e procedeu-se com a purificação da proteína. A purificação de SufC procedeu de acordo com gradiente inicial de precipitação com sulfato de amônio, até a concentração 60%, o que possibilitou eliminação uma série de contaminantes. O processo de purificação proseguiu com a utilização de coluna de troca iônica com posterior utilização de gel filtração. A coluna de gel filtração permitiu o isolamento de grande parte de contaminantes (Figura 25), eluindo em volume aproximado de 33.8 mL. Para a confirmação de atividade bioquímica da proteína purificada, realizou-se ensaio enzimático de atividade de clivagem de ATP, atividade previamente caracterizada para o homólogo de *E. coli*. Identificou-se uma atividade ATPase baixa ($0.0027 \mu\text{molPi min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) em comparação à verificada em *E. coli* ($0.5 \mu\text{molPi min}^{-1} \text{mg}^{-1}$), embora tal ensaio tenha sido realizado com verde malaquita para a identificação de fosfato liberado, metodologia menos específica do que a utilizada neste trabalho.

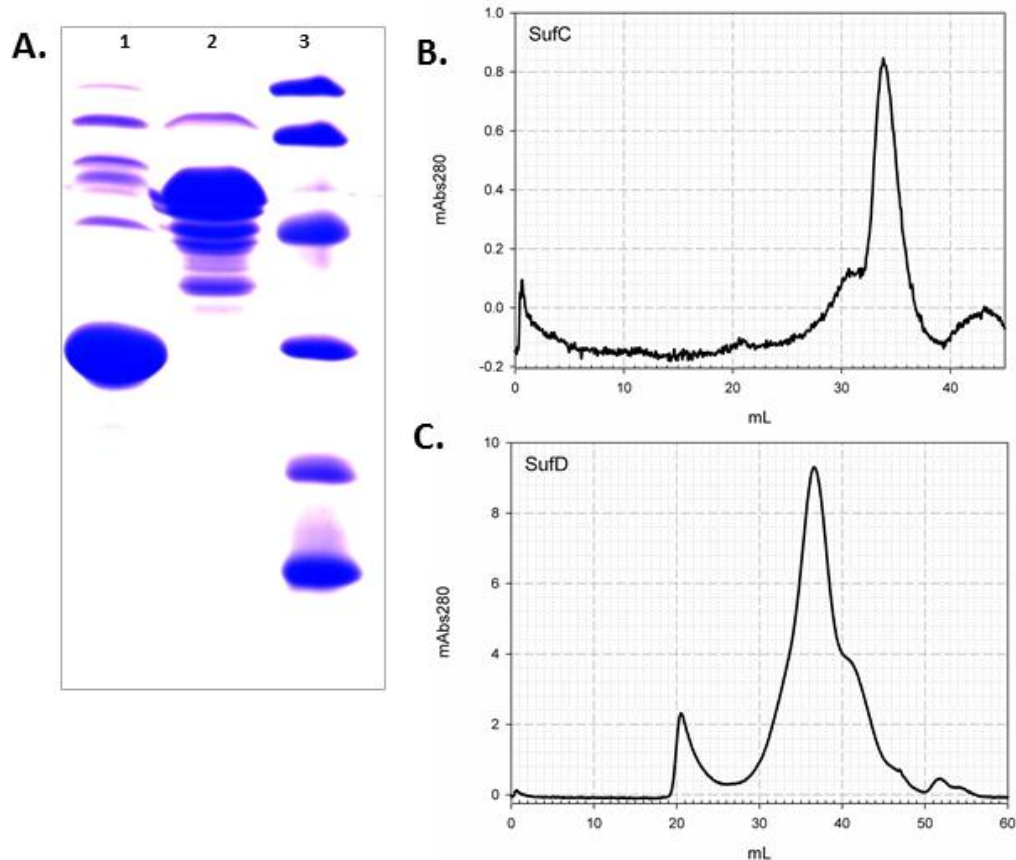


Figura 25: Frações purificadas de SufC e SufD. (A) Frações purificadas de *Enterococcus faecalis* SufC (1) e SufD (2) após coluna de troca iônica. Cromatogramas de SufC (B) e SufD (D) após coluna de gel filtração.

A verificação de estrutura tridimensional de SufC de *E. coli* através de procedimentos de modelagem molecular e refinamento por dinâmica molecular a partir de cristal de SufC de *E. coli* (PDB ID 2d3w) permitiu a verificação de alto RMSD, principalmente devido aos resíduos laterais da proteína, e regiões de alta flexibilidade em resíduos permeando a posição de aminoácido 150, região esta que inclui o resíduo Glu 171 essencial para atividade ATPase. Dessa forma, a trajetória de 50 ns de dinâmica molecular realizada com o cristal não verificou nenhuma modificação mais acentuada de estrutura secundária. A modelagem molecular de SufC de *E. faecalis* foi realizada utilizando esse mesmo cristal como molde, também apresentando poucas modificações de estrutura secundária e as mesmas características de RMSD e RMSF descritas anteriormente. Apesar da flexibilidade verificada para Glu 171, este se

encontra no interior da proteína, sem acesso ao solvente, em ambos os modelos estudados, confirmando dados descritos anteriormente para SufC de *E.coli*, onde outras proteínas (como SufB) aumentariam sua atividade catalítica pela interação entre os peptídeos e exposição do sítio catalítico (Figura 26). A composição globular similar entre as proteínas SufC de *E. coli* e *E. faecalis* corrobora a possível necessidade de SufC estar envolvida em interações com outras proteínas para aumento da fraca atividade ATPase verificada anteriormente.

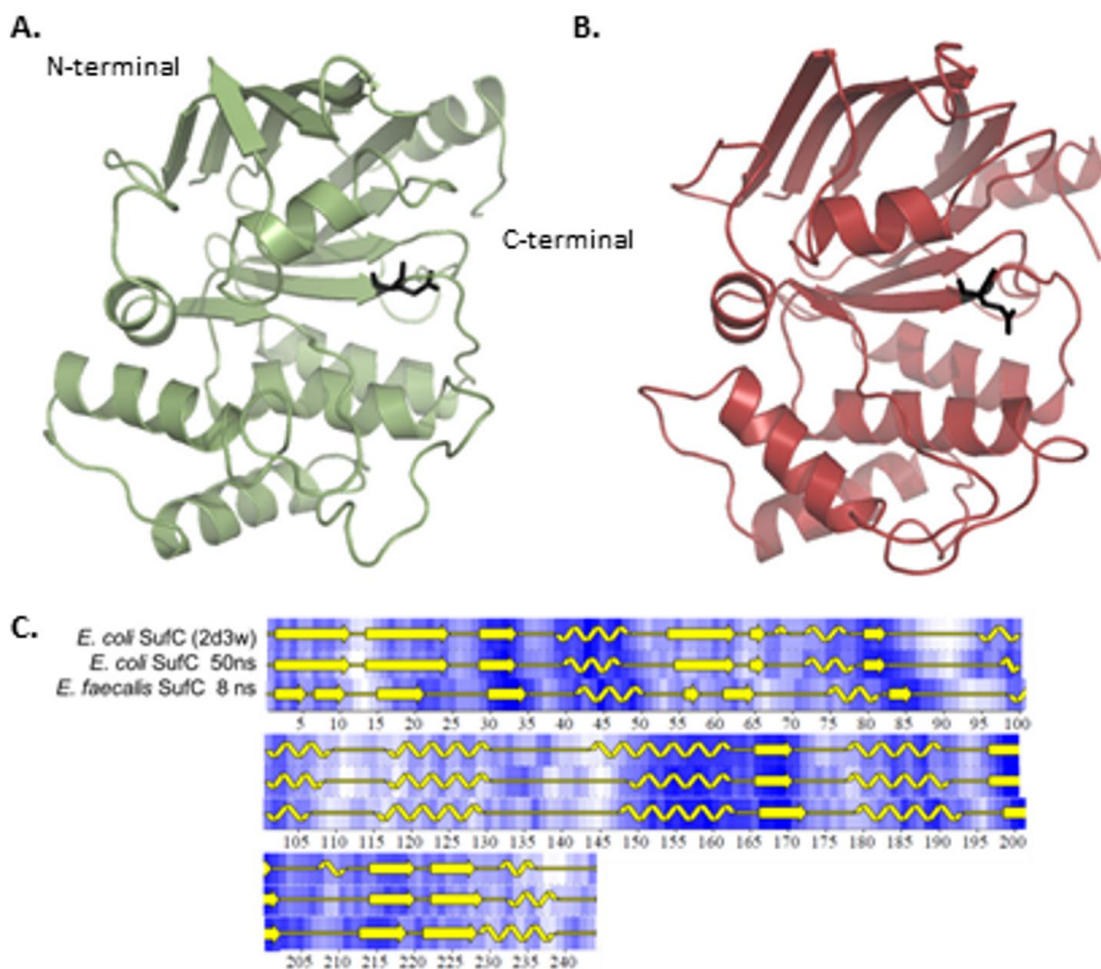


Figura 26: Representação e análise estrutural de SufC. (A) Molde SufC de *Escherichia coli* (PDB ID 2d3w) após 50 ns de trajetória e (B) modelo SufC de *Enterococcus faecalis*; sítio ativo Glu 171 está apresentado em preto; (C) manutenção de estrutura secundária de SufC; (D) dados de RMSD para proteína completa (preto), cadeias laterais de aminoácidos (cinza) e esqueleto de carbono α (marrom); (E) RMSF para resíduos específicos de SufC.

5.4.1.4 SufB

A clonagem inicial de *sufB* foi realizada em vetor de clonagem pCR-Blunt, e posteriormente subclonado em pET23a(+) e pDB1568. No entanto, apesar dos dois plasmídeos com gene *sufB* clonado sob condições diferenciadas de controle de expressão, o fato de SufB apresentar-se em ambos os casos como proteína em corpos de inclusão dificultou seu processo de purificação. Protocolos diferenciados como curva de temperatura para superexpressão, mudança de hospedeiro e desnaturação com uréia foram utilizados, porém sem sucesso, apesar de termos conseguido expressá-la. A expressão de SufB foi possível utilizando vetor sob controle de lactose, através de método alternativo de autoindução *overnight*. Apesar do sucesso na expressão, a utilização de cauda histidina não foi suficiente para conseguir-se a purificação desejável.

Por outro lado, a análise estrutural de tal proteína ofereceu dados interessantes. Pelo fato de ainda não haver dados estruturais depositados em bancos de dados para SufB, foi realizada a metodologia de modelagem molecular para ambas as proteínas SufB de *E. coli* e *E. faecalis*. Interessantemente, o melhor molde verificado para tal processo corresponde ao mesmo molde utilizado para SufD (ver adiante), o que mais uma vez caracteriza a similaridade entre as duas proteínas. Tal molde corresponde ao complexo SufCD cristalizado a partir de purificação de linhagem *E. coli* (PDB ID 2zu0) (Figura 27). A modelagem verificada para SufB compreende boa parte da proteína, incluindo os resíduos de cisteína de porção N-terminal, envolvidos na orientação do cofator [4Fe-4S]. Por outro lado, a metodologia de modelagem molecular nos apresenta mais uma vez a dissimilaridade de SufB de *E. faecalis* quando comparada à de *E. coli*, principalmente em porção N-terminal, uma vez que tal molde, apesar de ser o mais indicado, não apresenta similaridade nessa parte de SufB de *E. faecalis*, fornecendo portanto um modelo focado na parte C-terminal exclusivamente, onde pode-se verificar um dos dois únicos resíduos Cys dessa proteína.

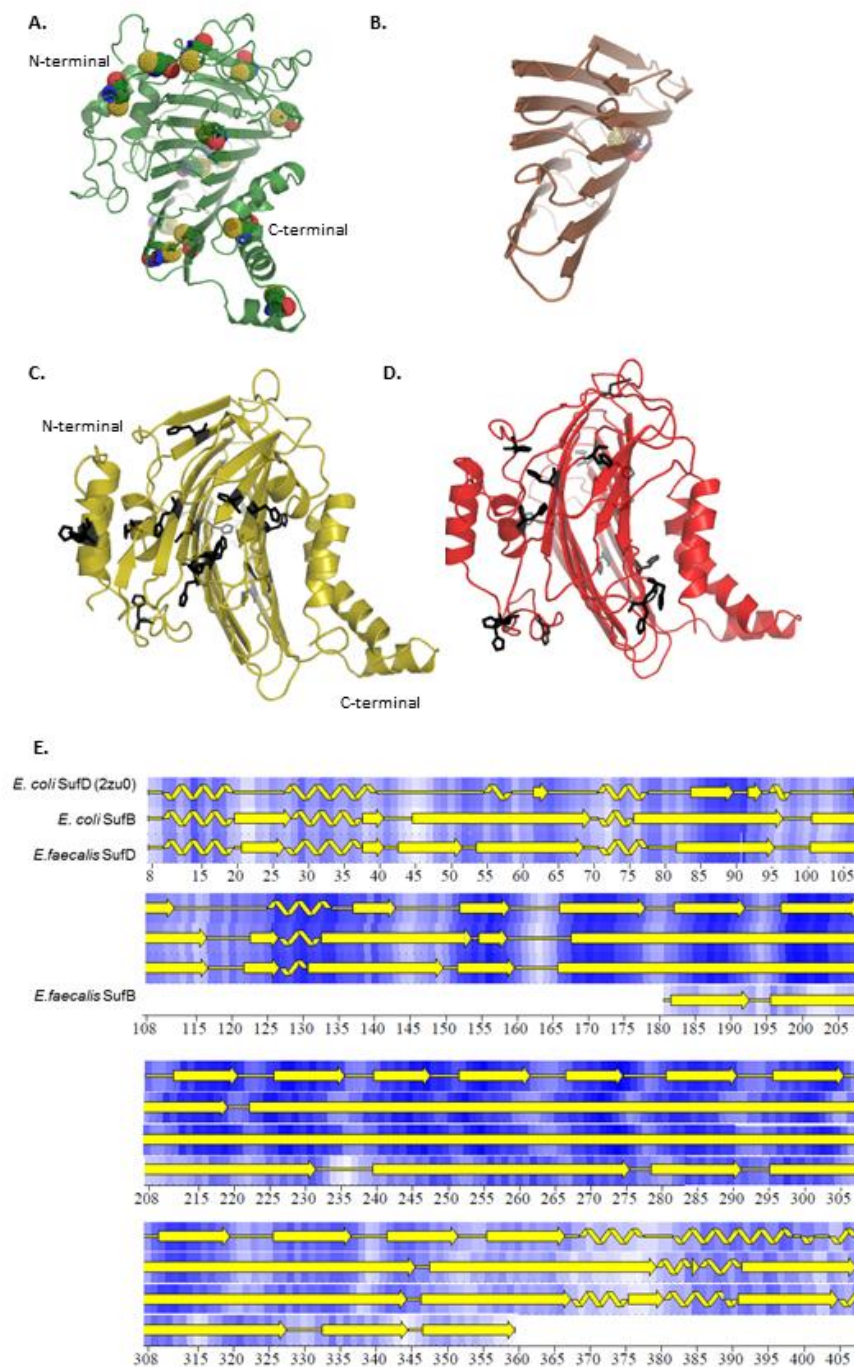


Figura 27: Representação e análise estrutural de SufB e SufD. Modelos SufB para *Escherichia coli* (A) e *Enterococcus faecalis* (B) apresentando sítios de cisteína presentes em cada uma das proteínas. Modelos SufD para *Escherichia coli* (C) e *Enterococcus faecalis* (D) apresentando sítios de histidina presentes em cada uma das proteínas. (E) análise de modificações de estrutura secundária de acordo com dado cristalográfico de *Escherichia coli* SufCD (PDB ID 2zu0).

5.4.1.5 SufD

A clonagem inicial de *sufD* foi realizada em vetor de clonagem pCR-Blunt, posteriormente subclonado em pET23a(+) e pDB1568. Para a produção proteína recombinante SufD, o clone pET::*sufD* foi superexpressado através da utilização de lactose em hospedeiro *E.coli* BL21DE3 por um período de 5 horas a 30°C. O extrato bruto apresentou uma superexpressão consistente, apesar de insolúvel. SufD apresentou-se em corpos de inclusão em todas as metodologias utilizadas (modificação de temperatura de expressão, hospedeiro e vetor de expressão), e optou-se portanto em solubilização inicial em Uréia 8.0 M, seguida de diluição e diálise. Após esse processo de desnaturação, a renaturação de parte do material foi realizada e o material aplicado em coluna de troca iônica com posterior utilização de gel filtração (Figura 25). A coluna de gel filtração permitiu o isolamento de grande parte de contaminantes eluindo como oligômero em volume aproximado de 21.0 mL. A análise estrutural dessa proteína apresenta dados interessantes envolvidos na alta similaridade estrutural entre *E. coli* e *E. faecalis*, embora a similaridade de estrutura primária baseie-se principalmente na porção C-terminal da proteína. No entanto, ambas apresentam alto número de resíduos de histidina (17 em *E. coli* e 16 em *E. faecalis*) (Figura 27) que podem estar envolvidos em aquisição de ferro para a formação do cofator, segundo estudos recentes verificados em *E. coli*.

6. CONCLUSÃO

O trabalho aqui apresentado caracterizou a maquinaria de formação e associação dos cofatores [Fe-S] em *E. faecalis*. O microrganismo apresenta um *loci* de genes codificando possíveis proteínas representantes do sistema *SUF*, contendo os genes *sufCDSUB*.

A caracterização *in silico* da maquinaria *sufCDSUB* como um operon foi realizada através de ferramentas de bioinformática e bioquimicamente por experimentos de RT-qPCR sob condições normais de crescimento. A análise da região promotora do operon apresentou regiões *cis*-atuantes similares à ORE I de *E. coli* (para atuação de Fur), OREIII (atuação de OxyR), IHF (região de torção de DNA) e ORE II, embora nenhum gene ortólogo a IscR no genoma de *E. faecalis* tenha sido identificado. Experimentos de RT-qPCR foram realizados sob condições de estresses oxidativo e de depleção de ferro com o intuito de analisar o comportamento do operon *SUF* e genes relacionados. Sob condições de estresse por limitação de ferro, existe um aumento da transcrição de genes envolvidos na formação dos cofatores [Fe-S], além do aumento da produção de *fur*, indicando sua possível ação de maneira diferenciada em OREI-like no controle da expressão do operon *sufCDSUB*. Sob condições de estresse oxidativo, o operon também apresentou uma maior expressão relativa, sugerindo que este está sob o controle do elemento *cis*-atuante de OxyR. Ainda, a necessidade de uma proteína acessória para ligação de OxyR corrobora a idéia de que deve haver outro elemento envolvido na indução desse sistema (*IscR-like*) atuando em OREII.

A proteína arcabouço para a formação do cofator corresponde à SufU. Este ortólogo de IscU apresenta alto grau de homologia com a porção N-terminal de NifU de *A. vinelandii*, preservando resíduos importantes como os três resíduos conservados de Cys e o resíduo de Asp; por outro lado, não apresenta o motivo LPPVK, mas se observa nesta proteína uma sequência de 19 aminoácidos extras (GPR), na mesma região protéica, que correspondem a uma característica específica de proteínas homólogas a SufU presentes unicamente em microrganismos Gram-positivos. A

produção recombinante de SufU, bem como de seus mutantes SufU^{Cys41ΔAla}, SufU^{Asp43ΔAla} e SufU^{Cys128ΔAla} apresentou os produtos de peso molecular esperados (17.0 kDa) os quais foram confirmados por espectrometria de massa. A caracterização bioquímica da proteína arcabouço foi verificada pela reconstituição *in vitro* de um cofator característico do tipo [4Fe-4S] identificado pelos espectros UV/Vis. A caracterização estrutural de SufU apresentou *folding* terciário incluindo 4 α-hélices e três folhas β antiparalelas, com um valor de RMSD diferenciado de enovelamento e/ou flexibilidade relativo à região GPR e sítios ativos, confirmado pela análise de RMSF. GPR se apresenta acessível ao solvente e pode formar estrutura secundária com formação de motivo *helix-turn-helix* entre as hélices III e IV, o que caracterizaria esta região como uma região de interação da proteína com outras moléculas.

A cisteína desulfurase SufS de *E. faecalis* apresenta o sítio catalítico de cisteína conservado na posição 364, bem como o motivo RXGHHCA nesta região, características de desulfurases do tipo II. A produção recombinante de SufS, bem como de seu mutante SufS^{CysΔ365Ala} foi possível somente pela co-expressão de SufU, e apresentou produtos de peso molecular esperados (46.0 kDa), que foram confirmados por espectrometria de massas. Da mesma maneira, os complexos SufSU, SufSU^{Asp43Ala}, SufSU^{Cys41Ala}, SufSU^{Cys66Ala} e SufSU^{Cys128Ala} foram produzidos recombinantemente e identificados através de espectrometria de massas. A caracterização bioquímica da atividade desulfurase de SufS foi verificada pela conversão de L-cisteína para L-alanina com a liberação de enxofre elementar. Picos de absorção em regiões de 340 nm e 420 nm em espectros UV/Vis característico da reação foram observados; mesmo mecanismo foi verificado no fenótipo do mutante SufS^{Cys365ΔAla}, caracterizando assim o resíduo Cys³⁶⁵ como sendo o sítio ativo de SufS em *E. faecalis*. A proteína SufU foi caracterizada como ativador de SufS, tanto na forma apo-SufSU como holo-SufSU, de acordo com as atividades específicas de desulfurase obtidas, onde o complexo SufSU apresentou diferenças significativas quando comparada a todas as as outras amostras testadas. Experimentos de espectrometria de massas indicaram uma possível transferência de *sulfane* de SufS para SufU envolvendo especificamente os resíduos de Cys³⁶⁵ (SufS) e Cys¹²⁸ (SufU), onde a proteína SufU de *E. faecalis* mimetizaria as ações de SufE de *E.coli*.

O ortólogo de SufB determinado em *E. faecalis* apresenta apenas a região C-terminal similar à *E. coli*. Além disso, o fato de SufB se apresentar constantemente como proteína em corpos de inclusão dificultou seu processo de purificação durante este trabalho, o que impossibilitou uma caracterização das possíveis funções deste elemento no sistema *SUF*. SufC corresponde à proteína de maior similaridade com seu cognato presente em *E. coli*, apresentando alto índice de conservação tanto na estrutura primária como na terciária. A produção recombinante de SufC apresentou produto de peso molecular esperado (29.0 kDa), confirmado por espectrometria de massas. O ensaio de clivagem de ATP para confirmação de atividade bioquímica apresentou a atividade ATPase esperada. Provavelmente esta enzima necessita de alguma proteína acessória para ser ativada, assim esta poderia exercer função similar à verificada em *Proteobacteria*, onde a formação do complexo SufBC₂D auxilia a formação e entrega do cofator [Fe-S]. SufD se apresentou em corpos de inclusão quando superexpressa recombinantemente, portanto sua produção foi possível através da utilização de técnica de desenovelamento em solução de uréia, e apresentou produto de peso molecular esperado (48.0 kDa), confirmado por espectrometria de massas. Esta proteína apresenta alta similaridade estrutural com SufD de *E. coli*, principalmente na porção C-terminal da proteína, por apresentar um alto número de resíduos de histidina esta poderia estar envolvida no processo de aquisição de ferro para a formação do cofator.

Experimentos de complementação gênica foram realizados com o intuito de demonstrar a possibilidade de complementação entre o sistema *ISC* de *A. vinelandii* por parte de sistema *SUF* de *E. faecalis* mediante experimentos de recombinação homóloga. No entanto, a inativação de qualquer que seja o elemento *ISC* em linhagens de *A. vinelandii* é letal para o microrganismo, e esta deleção não foi complementada por elementos do sistema *SUF* de *E. faecalis*. Para a verificação da possibilidade de complementação do sistema *ISC* de *E. coli*, procedimentos *in vivo* foram realizados se utilizando linhagens de *E. coli* mutantes $\Delta iscS$ e, da mesma maneira, o sistema *SUF* de *E. faecalis* não foi capaz de realizar a complementação *in vivo* do sistema *ISC*, caracterizando a diferenciação entre os componentes dos sistemas analisados. Para as análises de complementação do sistema *SUF*, experimentos de recombinação

homóloga e transdução genética foram realizados para obtenção de linhagens de *E. coli* duplo mutante para elementos *iscS* e *sufS*. A única linhagem viável resultante dos experimentos corresponde a *E. coli* Δ *sufABCDSE* Δ *iscS::kan* complementada com pSufCDSUB, apresentando resistência a canamicina, tetraciclina, ampicilina e capaz de crescer em meio mínimo M9 complementado com arabinose após 48 horas de incubação. Por outro lado, não se observou complementação por parte de elementos únicos SufS e SufSU a linhagens SufS e/ou SufSE mutantes, o que garantiria a importância de interações proteína-proteína e formação de complexos por parte de outros elementos do sistema com o intuito final da formação do cofator [Fe-S] e maturação de proteínas alvo.

Finalmente, o trabalho aqui apresentado apresentou uma série de dados inovadores relativos à caracterização da maquinaria de formação de cofatores [Fe-S] no microrganismo *Enterococcus faecalis*. Estes dados fornecem a oportunidade de estudos ainda mais aprofundados quanto às particularidades e caracterizações de cada um dos elementos desse sistema, para uma completa compreensão bioquímica da formação de cofatores [Fe-S] em *Firmicutes*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F. M. *et al.* Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* , v. 37, n. 2, p. 127-137, 2000.

ABDEL-GHANY, S. E. *et al.* Iron-sulfur cluster biogenesis in chloroplasts: involvement of the scaffold protein CplscA. *Plant Physiology* , v. 138, n. 1, p. 161-172, 2005.

AGAR, J. N. *et al.* IscU as a scaffold for iron-sulfur cluster biosynthesis: sequential assembly of 2Fe-2S and 4Fe-4S clusters in IscU. *Biochemistry* , v. 39, n. 27, p. 7856-7862, 2000.

ALAM, M. S.; AGRAWAL, P. Matrix-assisted refolding and redox properties of WhiB3/Rv3416 of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Protein Expression and Purification* , v. 61, n. 1, p. 83-91, 2008.

ALAM, M. S. *et al.* Molecular function of WhiB4/Rv3681c of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: a 4Fe-4S cluster co-ordinating protein disulphide reductase. *Molecular Microbiology* , v. 63, n. 5, p. 1414-1431, 2007.

ALI, V. *et al.* An intestinal parasitic protist, *Entamoeba histolytica*, possesses a non-redundant nitrogen fixation-like system for iron-sulfur cluster assembly under anaerobic conditions. *Journal of Biological Chemistry* , v. 279, n. 16, p. 16863-16874, 2004.

AMANN, K. *et al.* Accumulation of photosystem 1, a member of a novel gene family, is required for accumulation of 4Fe-4S cluster-containing chloroplast complexes and antenna proteins. *Plant Cell* , v. 16, n. 11, p. 3084-3097, 2004.

ANDRADE, R. V. *et al.* Cell organisation, sulphur metabolism and ion transport-related genes are differentially expressed in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium and yeast cells. *Bmc Genomics* , v. 7, 2006.

ANGELINI, S. *et al.* NfuA, a new factor required for maturing Fe/S proteins in *Escherichia coli* under oxidative stress and iron starvation conditions. *Journal of Biological Chemistry* , v. 283, n. 20, p. 14084-14091, 2008.

AYALA-CASTRO, C. *et al.* Fe-S cluster assembly pathways in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* , v. 72, n. 1, p. 110+, 2008.

BABA, T. *et al.* Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology* , v. 2, 2006.

BALK, J.; LILL, R. The cell's cookbook for iron-sulfur clusters: recipes for fool's gold? *Chembiochem* , v. 5, n. 8, p. 1044-1049, 2004.

BALK, J.; LOBREAUX, S. Biogenesis of iron-sulfur proteins in plants. *Trends in Plant Science* , v. 10, n. 7, p. 324-331, 2005.

BANDYOPADHYAY, S. *et al.* A proposed role for the *Azotobacter vinelandii* NfuA protein as an intermediate iron-sulfur cluster carrier. *Journal of Biological Chemistry* , v. 283, n. 20, p. 14092-14099, 2008.

BARTOLINI, E. *et al.* Role of FNR and FNR-regulated, sugar fermentation genes in *Neisseria meningitidis* infection. *Molecular Microbiology* , v. 60, n. 4, p. 963-972, 2006.

BEINERT, H. *et al.* Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* , v. 277, n. 5326, p. 653-659, 1997.

BEINERT, H. *et al.* Aconitase as iron-sulfur protein, enzyme, and iron-regulatory protein. *Chemical Reviews* , v. 96, n. 7, p. 2335-2373, 1996.

BEINERT, H.; KILEY, P. J. Fe-S proteins in sensing and regulatory functions. *Current Opinion in Chemical Biology* , v. 3, n. 2, p. 152-157, 1999.

BERENDSEN, H. J. C. *et al.* GROMACS – a message-passing parallel molecular-dynamics implementation. *Computer Physics Communications* , v. 91, n. 1-3, p. 43-56, 1995.

BIEDERBICK, A. *et al.* Role of human mitochondrial Nfs1 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis and iron regulation. *Molecular and Cellular Biology* , v. 26, n. 15, p. 5675-5687, 2006.

BIZZINI, A. *et al.* The *Enterococcus faecalis* superoxide dismutase is essential for its tolerance to vancomycin and penicillin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* , v. 64, n. 6, p. 1196-1202, 2009.

BONOMI, F. *et al.* Multiple turnover transfer of 2Fe2S clusters by the iron-sulfur cluster assembly scaffold proteins IscU and IscA. *Journal of Biological Chemistry* , v. 280, n. 33, p. 29513-29518, 2005.

BRIGLE, K. E. *et al.* Site-directed mutagenesis of the nitrogenase Mo-Fe protein of *Azotobacter vinelandii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , v. 84, n. 20, p. 7066-7069, 1987.

CALZOLAI, L. *et al.* Role of cluster-ligated aspartate in gating electron transfer in the four-iron ferredoxin from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Journal of the American Chemical Society* , v. 118, n. 10, p. 2513-2514, 1996.

CAMASCHELLA, C. *et al.* The human counterpart of zebrafish shiraz shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload. *Blood* , v. 110, p. 1353-1358, 2007.

CARROLL, K. S. *et al.* Investigation of the iron-sulfur cluster in *Mycobacterium tuberculosis* APS reductase: implications for substrate binding and catalysis. *Biochemistry* , v. 44, n. 44, p. 14647-14657, 2005.

CAVADINI, P. *et al.* RNA silencing of the mitochondrial ABCB7 transporter in HeLa cells causes an iron-deficient phenotype with mitochondrial iron overload. *Blood* , v. 109, n. 8, p. 3552-3559, 2007.

CHAI, Y. R. *et al.* A widely conserved gene cluster required for lactate utilization in *Bacillus subtilis* and its involvement in biofilm formation. *Journal of Bacteriology* , v. 191, n. 8, p. 2423-2430, 2009.

CHANDRAMOULI, K. *et al.* Formation and properties of 4Fe-4S clusters on the IscU scaffold protein. *Biochemistry* , v. 46, n. 23, p. 6804-6811, 2007.

CHEREPANOV, P. P.; WACKERNAGEL, W. Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* , v. 158, n. 1, p. 9-14., 1995.

CINTAS, L. M. *et al.* Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *Journal of Bacteriology* , v. 182, n. 23, p. 6806-6814, 2000.

CRETI, R. *et al.* Enterococcal colonization of the gastro-intestinal tract: role of biofilm and environmental oligosaccharides. *Bmc Microbiology* , v. 6, 2006.

CUPP-VICKERY, J. R. *et al.* Crystal structure of the molecular chaperone HscA substrate binding domain complexed with the IscU recognition peptide ELPPVKIHC. *Journal of Molecular Biology* , v. 342, n. 4, p. 1265-1278, 2004.

DAI, S. D. *et al.* Redox signaling in chloroplasts: cleavage of disulfides by an iron-sulfur cluster. *Science* , v. 287, n. 5453, p. 655-658, 2000.

DAM, P. *et al.* Operon prediction using both genome-specific and general genomic information. *Nucleic Acids Research* , v. 35, n. 1, p. 288-298, 2007.

DEHAL, P. S. *et al.* MicrobesOnline: an integrated portal for comparative and functional genomics. *Nucleic Acids Research* , v. 38, p. D396-D400, 2010.

DEMPLE, B. *et al.* *Escherichia coli* SoxR protein: sensor/transducer of oxidative stress and nitric oxide. *Protein Sensors and Reactive Oxygen Species, Pt B, Thiol Enzymes and Proteins* , v. 348, p. 355-364, 2002.

DESNOYERS, G. *et al.* Small RNA-induced differential degradation of the polycistronic mRNA iscRSUA. *Embo Journal* , v. 28, n. 11, p. 1551-1561, 2009.

DEVRIESE, L. A. *et al.* Identification of *Enterococcus* species isolated from foods of animal origin. *International Journal of Food Microbiology* , v. 26, n. 2, p. 187-197, 1995.

DJAMAN, O. *et al.* Repair of oxidized iron-sulfur clusters in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* , v. 279, n. 43, p. 44590-44599, 2004.

DONAHUE, J. L. *et al.* Purification and characterization of glpX-encoded fructose 1,6-bisphosphatase, a new enzyme of the glycerol 3-phosphate regulon of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* , v. 182, n. 19, p. 5624-5627, 2000.

DOS SANTOS, P. C. *et al.* Controlled expression of nif and isc iron-sulfur protein maturation components reveals target specificity and limited functional replacement between the two systems. *Journal of Bacteriology* , v. 189, n. 7, p. 2854-2862, 2007.

DOS SANTOS, P. C. *et al.* Iron-sulfur cluster assembly - NifU-directed activation of the nitrogenase Fe protein. *Journal of Biological Chemistry* , v. 279, n. 19, p. 19705-19711, 2004.

ECCLESTON, J. F. *et al.* The kinetic mechanism of the SufC ATPase - The cleavage step is accelerated by SufB. *Journal of Biological Chemistry* , v. 281, n. 13, p. 8371-8378, 2006.

EXPERT, D. *et al.* Siderophore-controlled iron assimilation in the enterobacterium *Erwinia chrysanthemi*: evidence for the involvement of bacterioferritin and the SUF iron sulfur cluster assembly machinery. *Journal of Biological Chemistry* , v. 283, n. 52, p. 36564-36572, 2008.

FLINT, D. H.; ALLEN, R. M. Iron-sulfur proteins with nonredox functions. *Chemical Reviews* , v. 96, n. 7, p. 2315-2334, 1996.

FONTECAVE, M. *et al.* Mechanisms of iron-sulfur cluster assembly: the SUF machinery (vol 10, pg 713, 2005). *Journal of Biological Inorganic Chemistry* , v. 11, n. 1, p. 128-128, 2006.

FRANZ, C. *et al.* Enterococci in foods - a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology* , v. 88, n. 2-3, p. 105-122, 2003.

FRZZON, J.; DEAN, D. R. Biosynthesis of the nitrogenase iron-molybdenum-cofactor from *Azotobacter vinelandii*. *Metal ions in biological systems*, v. 39, p. 163-186, 2002.

FRAZZON, A. P. G. *et al.* Functional analysis of *Arabidopsis* genes involved in mitochondrial iron-sulfur cluster assembly. *Plant Molecular Biology* , v. 64, n. 3, p. 225-240, 2007.

FU, W. G. *et al.* NifU gene-product from *Azotobacter vinelandii* is a homodimer that contains 2 identical 2FE-2S clusters. *Biochemistry* , v. 33, n. 45, p. 13455-13463, 1994.

FUJII, T. *et al.* Structure of a NifS homologue: X-ray structure analysis of CsdB, an *Escherichia coli* counterpart of mammalian selenocysteine lyase. *Biochemistry* , v. 39, n. 6, p. 1263-1273, 2000.

GELLING, C. *et al.* Mitochondrial Iba57p is required for Fe/S cluster formation on aconitase and activation of radical SAM enzymes. *Molecular and Cellular Biology* , v. 28, n. 5, p. 1851-1861, 2008.

GIARD, J. C. *et al.* Characterization of Ers, a PrfA-like regulator of *Enterococcus faecalis*. *Fems Immunology and Medical Microbiology* , v. 46, n. 3, p. 410-418, 2006.

GIEL, J. L. *et al.* IscR-dependent gene expression links iron-sulphur cluster assembly to the control of O₂-regulated genes in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* , v. 60, n. 4, p. 1058-1075, 2006.

GILMORE, M. S. *et al.* Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1 encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *Journal of Bacteriology* , v. 176, n. 23, p. 7335-7344, 1994.

GIRAFFA, G. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *Fems Microbiology Reviews* , v. 28, n. 2, p. 251-260, 2004.

HEDDERICH, R. *et al.* Isolation and characterization of polyferrodoxin from *Methanobacterium thermoautotrophicum*: the mvhb gene product of the methylviologen reducing hydrogenase operon. *Febs Letters* , v. 298, n. 1, p. 65-68, 1992.

HERTZ, G. Z.; STORMO, G. D. Identifying DNA and protein patterns with statistically significant alignments of multiple sequences. *Bioinformatics* , v. 15, n. 7-8, p. 563-577, 1999.

HJORTH, E. *et al.* Unique genetic compartmentalization of the SUF system in cryptophytes and characterization of a SufD mutant in *Arabidopsis thaliana*. *Febs Letters* , v. 579, n. 5, p. 1129-1135, 2005.

HUNSICKER-WANG, L. M. *et al.* High-resolution structure of the soluble, respiratory-type Rieske protein from *Thermus thermophilus*: analysis and comparison. *Biochemistry* , v. 42, n. 24, p. 7303-7317, 2003.

HUYCKE, M. M. *et al.* Multiple-drug resistant Enterococci: The nature of the problem and an agenda for the future. *Emerging Infectious Diseases* , v. 4, n. 2, p. 239-249, 1998.

HWANG, D. M. *et al.* A modular domain of NifU, a nitrogen fixation cluster protein, is highly conserved in evolution. *Journal of Molecular Evolution* , v. 43, n. 5, p. 536-540, 1996.

HWANG, P. M. *et al.* Ferredoxin reductase affects p53-dependent, 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells (vol 7, pg 1111, 2001). *Nature Medicine* , v. 7, n. 11, p. 1255-1255, 2001.

JACOB, A. E. *et al.* Self transferable plasmids determining hemolysin and bacteriocin of *Streptococcus faecalis var zymogenes*. *Journal of Bacteriology* , v. 121, n. 3, p. 863-872, 1975.

JACOBSON, M. R. *et al.* Physical and genetic map of the major nif gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology* , v. 171, n. 2, p. 1017-1027, 1989a.

JACOBSON, M. R. *et al.* Biochemical and genetic analysis of the *nifUSVWZM* cluster from *Azotobacter vinelandii*. *Molecular & General Genetics* , v. 219, n. 1-2, p. 49-57, 1989b.

JAKIMOWICZ, P. *et al.* Evidence that the *Streptomyces* developmental protein WhiD, a member of the WhiB family, binds a 4Fe-4S cluster. *Journal of Biological Chemistry* , v. 280, n. 9, p. 8309-8315, 2005.

JARDON-VALADEZ, E. *et al.* Modeling and molecular dynamics simulation of the human gonadotropin-releasing hormone receptor in a lipid bilayer. *Journal of Physical Chemistry B* , v. 112, n. 34, p. 10704-10713, 2008.

JARRETT, J. T. The generation of 5'-deoxyadenosyl radicals by adenosylmethionine-dependent radical enzymes. *Current Opinion in Chemical Biology* , v. 7, n. 2, p. 174-182, 2003.

JARRETT, J. T.. The novel structure and chemistry of iron-sulfur clusters in the adenosylmethionine-dependent radical enzyme biotin synthase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* , v. 433, n. 1, p. 312-321, 2005.

JOHNSON, D. C. *et al.* Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annual Review of Biochemistry* , v. 74, p. 247-281, 2005.

JOHNSON, D. C. *et al.* Controlled expression and functional analysis of iron-sulfur cluster biosynthetic components within *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology* , v. 188, n. 21, p. 7551-7561, 2006.

KATO, S. *et al.* Cys-328 of IscS and Cys-63 of IscU are the sites of disulfide bridge formation in a covalently bound IscS/IscU complex: Implications for the mechanism of iron-sulfur cluster assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , v. 99, n. 9, p. 5948-5952, 2002.

KAYSER, F. H. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *International Journal of Food Microbiology* , v. 88, n. 2-3, p. 255-262, 2003.

KESSLER, D. Enzymatic activation of sulfur for incorporation into biomolecules in prokaryotes. *Fems Microbiology Reviews* , v. 30, n. 6, p. 825-840, 2006.

KILEY, P. J.; BEINERT, H. The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* , v. 6, n. 2, p. 181-185, 2003.

KIM, S. H. *et al.* IscR modulates catalase A (KatA) activity, peroxide resistance, and full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of Microbiology and Biotechnology* , v. 19, n. 12, p. 1520-1526, 2009.

KOWALSKI, W. J. *et al.* *Enterococcus faecalis* adhesin, ace, mediates attachment to particulate dentin. *Journal of Endodontics* , v. 32, n. 7, p. 634-637, 2006.

LAMPIDIS, R. *et al.* The virulence regulator protein of *Listeria ivanovii* is highly homologous to prfA from *Listeria monocytogenes* and both belong to the CRP-FNR family of transcription regulators. *Molecular Microbiology* , v. 13, n. 1, p. 141-151, 1994.

LAUHON, C. T. Requirement for IscS in biosynthesis of all thionucleosides in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* , v. 184, n. 24, p. 6820-6829, 2002.

LAUHON, C. T.; KAMBAMPATI, R. The iscS gene in *Escherichia coli* is required for the biosynthesis of 4-thiouridine, thiamin, and NAD. *Journal of Biological Chemistry* , v. 275, n. 26, p. 20096-20103, 2000.

LAYER, G. *et al.* SufE transfers sulfur from SufS to SufB for iron-sulfur cluster assembly. *Journal of Biological Chemistry* , v. 282, n. 18, p. 13342-13350, 2007.

LEE, K. C. *et al.* Oxidant-responsive induction of the suf operon, encoding a Fe-S assembly system, through Fur and IscR in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* , v. 190, n. 24, p. 8244-8247, 2008.

LEON, S. *et al.* The AtNFS2 gene from *Arabidopsis thaliana* encodes a NifS-like plastidial cysteine desulphurase. *Biochemical Journal* , v. 366, p. 557-564, 2002.

LEON, S. *et al.* Iron-sulphur cluster assembly in plants: distinct NFU proteins in mitochondria and plastids from *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal* , v. 371, p. 823-830, 2003.

LI, W. *et al.* Identification of *Streptococcus suis* genes preferentially expressed under iron starvation by selective capture of transcribed sequences. *Fems Microbiology Letters* , v. 292, n. 1, p. 123-133, 2009.

LILL, R.; MUHLENHOFF, U. Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends in Biochemical Sciences* , v. 30, n. 3, p. 133-141, 2005.

LILL, R.; MUHLENHOFF, U. Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: Mechanisms, connected processes, and diseases. *Annual Review of Biochemistry* , v. 77, p. 669-700, 2008.

LIMA, C. D. Analysis of the *E.coli* NifS CsdB protein at 2.0 angstrom reveals the structural basis for perselenide and persulfide intermediate formation. *Journal of Molecular Biology* , v. 315, n. 5, p. 1199-1208, 2002.

LINK, T. A. The structures of Rieske and Rieske-type proteins. *Advances in Inorganic Chemistry, Vol 47* , v. 47, p. 83-157, 1999.

LIU, G. H. *et al.* High-quality homology models derived from NMR and X-ray structures of *E.coli* proteins YgdK and Suf E suggest that all members of the YgdK/Suf E protein family are enhancers of cysteine desulfurases. *Protein Science* , v. 14, n. 6, p. 1597-1608, 2005.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-DeltaDelta)Ct method. *Methods* , v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOISEAU, L. *et al.* Biogenesis of Fe-S cluster by the bacterial SUF system - SufS and SufE form a new type of cysteine desulfurase. *Journal of Biological Chemistry* , v. 278, n. 40, p. 38352-38359, 2003.

MALKIN, R.; RABINOWIJC. Reconstitution of clostridial ferredoxin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* , v. 23, n. 6, p. 822-&, 1966.

MARTIN, J. B.; DOTY, D. M. Determination of inorganic phosphate: modification of isobutyl-alcohol procedure. *Analytical Chemistry* , v. 21, n. 8, p. 965-967, 1949.

MIHARA, H. *et al.* The iscS gene is essential for the biosynthesis of 2-selenouridine in tRNA and the selenocysteine-containing formate dehydrogenase H. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , v. 99, n. 10, p. 6679-6683, 2002.

MILLER, M. *et al.* Utilization of microbial iron assimilation processes for the development of new antibiotics and inspiration for the design of new anticancer agents. *Biometals* , v. 22, n. 1, p. 61-75, 2009.

MOORE, C. M.; HELMANN, J. D. Metal ion homeostasis in *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology* , v. 8, n. 2, p. 188-195, 2005.

MORENO, M. R. F. *et al.* The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology* , v. 106, n. 1, p. 1-24, 2006.

MUELLER, E. G. Trafficking in persulfides: delivering sulfur in biosynthetic pathways. *Nature Chemical Biology* , v. 2, n. 4, p. 185-194, 2006.

MUHLENHOFF, U. *et al.* The iron-sulfur cluster proteins Isa1 and Isa2 are required for the function but not for the de novo synthesis of the Fe/S clusters of biotin synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* , v. 6, n. 3, p. 495-504, 2007.

MULHOLLAND, S. E. *et al.* Characterization of the fundamental protein ligand requirements of 4Fe-4S (2+/+) clusters with sixteen amino acid maquettes. *Journal of the American Chemical Society* , v. 120, n. 40, p. 10296-10302, 1998.

MURRAY, B. E. The life and time of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 3, n. 1, p. 46-65, 1990.

NACHIN, L. *et al.* SoxR-dependent response to oxidative stress and virulence of *Erwinia chrysanthemi*: the key role of SufC, an orphan ABC ATPase. *Molecular Microbiology* , v. 39, n. 4, p. 960-972, 2001.

NACHIN, L. *et al.* SufC: an unorthodox cytoplasmic ABC/ATPase required for Fe-S biogenesis under oxidative stress. *Embo Journal* , v. 22, n. 3, p. 427-437, 2003.

NETZ, D. J. A. *et al.* The Cfd1-Nbp35 complex acts as a scaffold for iron-sulfur protein assembly in the yeast cytosol. *Nature Chemical Biology* , v. 3, n. 5, p. 278-286, 2007.

NICHOLS, B. P. *et al.* Sequence analysis of Tn10 insertion sites in a collection of *Escherichia coli* strains used for genetic mapping and strain construction. *Journal of Bacteriology* , v. 180, n. 23, p. 6408-6411, 1998.

OKAMOTO, T. *et al.* Activation of human matrix metalloproteinases by various bacterial proteinases. *Journal of Biological Chemistry* , v. 272, n. 9, p. 6059-6066, 1997.

OLLAGNIER-DE-CHOUDENS, S. *et al.* Iron-sulfur cluster assembly - Characterization of IscA and evidence for a specific and functional complex with ferredoxin. *Journal of Biological Chemistry* , v. 276, n. 25, p. 22604-22607, 2001.

OLLAGNIER-DE-CHOUDENS, S. *et al.* SufA/IscA: reactivity studies of a class of scaffold proteins involved in Fe-S cluster assembly. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* , v. 9, n. 7, p. 828-838, 2004.

OLSON, J. W. *et al.* Characterization of the NifU and NifS Fe-S cluster formation proteins essential for viability in *Helicobacter pylori*. *Biochemistry* , v. 39, n. 51, p. 16213-16219, 2000.

OUTTEN, F. W. *et al.* A suf operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* , v. 52, n. 3, p. 861-872, 2004.

OUTTEN, F. W. *et al.* The SufE protein and the SufBCD complex enhance SufS cysteine desulfurase activity as part of a sulfur transfer pathway for Fe-S cluster assembly in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* , v. 278, n. 46, p. 45713-45719, 2003.

PANDOLFO, M.; PASTORE, A. The pathogenesis of Friedreich ataxia and the structure and function of frataxin. *Journal of Neurology* , v. 256, p. 9-17, 2009.

PATTERSON, J. E. *et al.* An analysis of 110 serious enterococcal infections: epidemiology, antibiotic susceptibility and outcome. *Medicine* , v. 74, n. 4, p. 191-200, 1995.

PETERS, J. W. *et al.* Redox-dependent structural changes in the nitrogenase P-cluster. *Biochemistry* , v. 36, n. 6, p. 1181-1187, 1997.

PIEPER, R. *et al.* Proteomic analysis of iron acquisition, metabolic and regulatory responses of *Yersinia pestis* to iron starvation. *Bmc Microbiology* , v. 10, 2010.

PORELLO, S. L. *et al.* A substrate recognition role for the 4Fe-4S (2+) cluster of the DNA repair glycosylase MutY. *Biochemistry* , v. 37, n. 18, p. 6465-6475, 1998.

PUCCIO, H.; KOENIG, M. Friedreich ataxia: a paradigm for mitochondrial diseases. *Current Opinion in Genetics & Development* , v. 12, n. 3, p. 272-277, 2002.

PY, B.; BARRAS, F. Building Fe-S proteins: bacterial strategies. *Nature Reviews Microbiology* , v. 8, n. 6, p. 436-446, 2010.

RAULFS, E. C. *et al.* In vivo iron-sulfur cluster formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , v. 105, n. 25, p. 8591-8596, 2008.

REES, D. C.; HOWARD, J. B. Nitrogenase: standing at the crossroads. *Current Opinion in Chemical Biology* , v. 4, n. 5, p. 559-566, 2000.

RIBOULET-BISSON, E. *et al.* Characterization of the Ers regulon of *Enterococcus faecalis*. *Infection and Immunity* , v. 76, n. 7, p. 3064-3074, 2008.

RINCON-ENRIQUEZ, G. *et al.* Biogenesis of Fe/S proteins and pathogenicity: IscR plays a key role in allowing *Erwinia chrysanthemi* to adapt to hostile conditions. *Molecular Microbiology* , v. 67, n. 6, p. 1257-1273, 2008.

ROTIG, A. *et al.* Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nature Genetics* , v. 17, n. 2, p. 215-217, 1997.

ROUAULT, T. A. The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nature Chemical Biology* , v. 2, n. 8, p. 406-414, 2006.

ROUAULT, T. A.; TONG, W. H. Iron-sulphur cluster biogenesis and mitochondrial iron homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* , v. 6, n. 4, p. 345-351, 2005.

RUBIO, L. M.; LUDDEN, P. W. Maturation of nitrogenase: a Biochemical puzzle. *Journal of Bacteriology*, v. 187, n. 2, p. 405-414, 2005.

RUBIO, L. M.; LUDDEN, P. W. Biosynthesis of the Iron-Molybdenum Cofactor of Nitrogenase. *Annual Reviews in Microbiology*, v. 62, p. 93-211, 2008.

RUNYEN-JANECKY, L. *et al.* Role and regulation of iron-sulfur cluster biosynthesis genes in *Shigella flexneri* virulence. *Infection and Immunity* , v. 76, n. 3, p. 1083-1092, 2008.

SAINI, A. *et al.* SufD and SufC ATPase Activity Are Required for Iron Acquisition during in Vivo Fe-S Cluster Formation on SufB. *Biochemistry* , v. 49, n. 43, p. 9402-12., 2010.

SALTER, M. G.; CONLON, H. E. Extraction of plant RNA. *Methods Mol Biol.* , v. 362, p. 309-14., 2007.

SAMUELSSON, A. *et al.* Clustering of enterococcal infections in a general intensive care unit. *Journal of Hospital Infection* , v. 54, n. 3, p. 188-195, 2003.

SARANTINOPOULOS, P. *et al.* Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. *International Journal of Food Microbiology* , v. 76, n. 1-2, p. 93-105, 2002.

SARTINGEN, S. *et al.* Aggregation substance increases adherence and internalization, but not translocation, of *Enterococcus faecalis* through different intestinal epithelial cells in vitro. *Infection and Immunity* , v. 68, n. 10, p. 6044-6047, 2000.

SAZANOV, L. A. Respiratory complex I: Mechanistic and structural insights provided by the crystal structure of the hydrophilic domain. *Biochemistry* , v. 46, n. 9, p. 2275-2288, 2007.

SAZANOV, L. A.; HINCHLIFFE, P. Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. *Science* , v. 311, n. 5766, p. 1430-1436, 2006.

SCHILKE, B. *et al.* Evolution of mitochondrial chaperones utilized in Fe-S cluster biogenesis. *Current Biology* , v. 16, n. 16, p. 1660-1665, 2006.

SCHWARTZ, C. J. *et al.* IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor, represses expression of *Escherichia coli* genes encoding Fe-S cluster assembly proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , v. 98, n. 26, p. 14895-14900, 2001.

SCHWENKERT, S. *et al.* Chloroplast HCF101 is a scaffold protein for 4Fe-4S cluster assembly. *Biochemical Journal* , v. 425, p. 207-214, 2010.

SELLERS, V. M. *et al.* Function of the 2Fe-2S cluster in mammalian ferrochelatase: A possible role as a nitric oxide sensor. *Biochemistry* , v. 35, n. 8, p. 2699-2704, 1996.

SENDRA, M. *et al.* The SUF iron-sulfur cluster biosynthetic machinery: Sulfur transfer from the SUFS-SUFE complex to SUFA. *Febs Letters* , v. 581, n. 7, p. 1362-1368, 2007.

SHANKAR, V. *et al.* Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. *Infection and Immunity* , v. 67, n. 1, p. 193-200, 1999.

SHEFTEL, A. *et al.* Iron-sulfur proteins in health and disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism* , v. 21, n. 5, p. 302-314, 2010.

SIEGEL, L. M. A direct microdetermination of sulfide. *Analytical Biochemistry* , v. 11, n. 1, p. 126-&, 1965.

SINGH, A. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 responds to O₂ and nitric oxide via its 4Fe-4S cluster and is essential for nutrient starvation survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , v. 104, n. 28, p. 11562-11567, 2007.

SMID, O. *et al.* Knock-downs of iron-sulfur cluster assembly proteins IscS and IscU down-regulate the active mitochondrion of procyclic *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biological Chemistry* , v. 281, n. 39, p. 28679-28686, 2006.

SOMERVILLE, G. A. *et al.* *Staphylococcus aureus* aconitase inactivation unexpectedly inhibits post-exponential-phase growth and enhances stationary-phase survival. *Infection and Immunity* , v. 70, n. 11, p. 6373-6382, 2002.

SOMPORNPISTUT, P. *et al.* Structural Refinement of Membrane Proteins by Restrained Molecular Dynamics and Solvent Accessibility Data. *Biophysical Journal* , v. 95, n. 11, p. 5349-5361, 2008.

SRINIVASAN, V. *et al.* Structure of the yeast WD40 domain protein Cia1, a component acting late in iron-sulfur protein biogenesis. *Structure* , v. 15, p. 1246-1257, 2007.

STEHLING, O. *et al.* Iron-sulfur protein maturation in human cells: evidence for a function of frataxin. *Human Molecular Genetics* , v. 13, n. 23, p. 3007-3015, 2004.

SUN, F. *et al.* Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell* , v. 121, n. 7, p. 1043-1057, 2005.

SWENSON, J. M. *et al.* Molecular characterization and multilaboratory evaluation of *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 for quality control of screening tests for vancomycin and high-level aminoglycoside resistance in enterococci. *Journal of Clinical Microbiology* , v. 33, n. 11, p. 3019-3021, 1995.

SZEMES, T. *et al.* On the origin of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms in *Enterococcus faecalis*. *Redox Report* , v. 15, n. 5, p. 202-206, 2010.

TAKAHASHI, Y.; TOKUMOTO, U. A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *Journal of Biological Chemistry* , v. 277, n. 32, p. 28380-28383, 2002.

TAPLEY, T. L. *et al.* Structural determinants of HscA peptide-binding specificity. *Biochemistry* , v. 45, n. 26, p. 8058-8066, 2006.

TENDOLKAR, P. M. *et al.* Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *Cellular and Molecular Life Sciences* , v. 60, n. 12, p. 2622-2636, 2003.

TENG, F. *et al.* Evidence that the enterococcal polysaccharide antigen gene (epa) cluster is widespread in *Enterococcus faecalis* and influences resistance to phagocytic killing of E-faecalis. *Infection and Immunity* , v. 70, n. 4, p. 2010-2015, 2002.

TOKUMOTO, U. *et al.* Network of protein-protein interactions among iron-sulfur cluster assembly proteins in *Escherichia coli*. *Journal of Biochemistry* , v. 131, n. 5, p. 713-719, 2002.

TOKUMOTO, U.; TAKAHASHI, Y. Genetic analysis of the isc operon in *Escherichia coli* involved in the biogenesis of cellular iron-sulfur protein. *Journal of Biochemistry* , v. 130, n. 1, p. 63-71, 2001.

UGULAVA, N. B. *et al.* Biotin synthase contains two distinct iron-sulfur cluster binding sites: Chemical and spectroelectrochemical analysis of iron-sulfur cluster interconversions. *Biochemistry* , v. 40, n. 28, p. 8343-8351, 2001.

VAN DER SPOEL, D. *et al.* GROMACS: fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry* , v. 26, n. 16, p. 1701-1718, 2005.

VEBO, H. C. *et al.* The transcriptome of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecalis* V583 reveals adaptive responses to growth in blood. *Plos One* , v. 4, n. 11, 2009.

VELAYUDHAN, J. *et al.* The role of ferritins in the physiology of *Salmonella enterica* sv. *Typhimurium*: a unique role for ferritin B in iron-sulphur cluster repair and virulence. *Molecular Microbiology* , v. 63, n. 5, p. 1495-1507, 2007.

VERLI, H.; GUIMARAES, J. A. Insights into the induced fit mechanism in antithrombin-heparin interaction using molecular dynamics simulations. *Journal of Molecular Graphics & Modelling* , v. 24, n. 3, p. 203-212, 2005.

VERNEUIL, N. *et al.* Identification of a new oxidative stress transcriptional regulator in *Enterococcus faecalis*. *Lait* , v. 84, n. 1-2, p. 69-76, 2004.

VERNEUIL, N. *et al.* Implication of hypR in the virulence and oxidative stress response of *Enterococcus faecalis*. *Fems Microbiology Letters* , v. 252, n. 1, p. 137-141, 2005a.

VERNEUIL, N. *et al.* Contribution of a PerR-like regulator to the oxidative-stress response and virulence of *Enterococcus faecalis*. *Microbiology-Sgm* , v. 151, p. 3997-4004, 2005b.

VICKERY, L. E.; CUPP-VICKERY, J. R. Molecular chaperones HscA/Ssq1 and HscB/Jac1 and their roles in iron-sulfur protein maturation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* , v. 42, n. 2, p. 95-111, 2007.

WACHTERSHAUSER, G. On the chemistry and evolution of the pioneer organism. *Chemistry & Biodiversity* , v. 4, n. 4, p. 584-602, 2007.

WACHTERSHAUSER, G.; HUBER, C. Debating evidence for the origin of life on Earth - Response. *Science* , v. 315, n. 5814, p. 938-939, 2007.

WALLANDER, M. L. *et al.* Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* , v. 1763, n. 7, p. 668-689, 2006.

WINGERT, R. A. *et al.* Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe-S clusters are required for vertebrate haem synthesis. *Nature* , v. 436, n. 7053, p. 1035-1039, 2005.

WOLLERS, S. *et al.* Iron-Sulfur (Fe-S) Cluster Assembly: the SufBCD complex is a new type of Fe-S scaffold with a flavin redox cofactor. *Journal of Biological Chemistry* , v. 285, n. 30, p. 23329-23339, 2010.

XU, X. M. *et al.* AtNAP1 represents an atypical SufB protein in *Arabidopsis* plastids. *Journal of Biological Chemistry* , v. 280, n. 8, p. 6648-6654, 2005.

XU, X. M.; MOLLER, S. G. AtNAP7 is a plastidic SufC-like ATP-binding cassette/ATPase essential for *Arabidopsis* embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , v. 101, n. 24, p. 9143-9148, 2004.

XU, X. M.; MOLLER, S. G. AtSufE is an essential activator of plastidic and mitochondrial desulfurases in *Arabidopsis*. *Embo Journal* , v. 25, n. 4, p. 900-909, 2006.

YAGI, Y.; CLEWELL, D. B. Recombinant deficient mutant of *Streptococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology* , v. 143, n. 2, p. 966-970, 1980.

YEO, W. S. *et al.* IscR acts as an activator in response to oxidative stress for the suf operon encoding Fe-S assembly proteins. *Molecular Microbiology* , v. 61, n. 1, p. 206-218, 2006.

ZHENG, L. M. *et al.* Assembly of iron-sulfur clusters - Identification of an iscSUA-hscBA-fdx gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Biological Chemistry* , v. 273, n. 21, p. 13264-13272, 1998.

ZHENG, L. M. *et al.* Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , v. 90, n. 7, p. 2754-2758, 1993.

8. ANEXOS

8.1 MANUSCRITO PUBLICADO:

Structural studies of the *Enterococcus faecalis* SufU [Fe-S] cluster protein

BMC Biochemistry v. 10, p. 3, 2009.

Gustavo P. Riboldi ¹, Hugo Verli ^{1,2}, Jeverson Frazzon ^{1,3§}

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

²Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

³Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

§Corresponding author

Email addresses:

GPR: riboldi@cbiot.ufrgs.br

HV: hverli@cbiot.ufrgs.br

JF: jeverson.frazzon@ufrgs.br

Abstract

Iron-sulfur clusters are ubiquitous and evolutionarily ancient inorganic prosthetic groups, the biosynthesis of which depends on complex protein machineries. Three distinct assembly systems involved in the maturation of cellular Fe-S proteins have been determined, designated the NIF, ISC and SUF systems. Although well described in several organisms, these machineries are poorly understood in Gram-positive bacteria. Within the *Firmicutes* phylum, the *Enterococcus* spp. genus have recently assumed importance in clinical microbiology being considered as emerging pathogens for humans, wherein *Enterococcus faecalis* represents the major species associated with nosocomial infections. The aim of this study was to carry out a phylogenetic analysis in *Enterococcus faecalis* V583 and a structural and conformational characterisation of its SufU protein. BLAST searches of the *Enterococcus* genome revealed a series of genes with sequence similarity to the *Escherichia coli* SUF machinery of [Fe-S] cluster biosynthesis, namely *sufB*, *sufC*, *sufD* and *SufS*. In addition, the *E. coli* IscU ortholog SufU was found to be the scaffold protein of *Enterococcus* spp., containing all features considered essential for its biological activity, including conserved amino acid residues involved in substrate and/or co-factor binding (Cys^{50, 76, 138} and Asp⁵²) and, phylogenetic analyses showed a close relationship with orthologues from other Gram-positive bacteria. Molecular dynamics for structural determinations and molecular modeling using *E. faecalis* SufU primary sequence protein over the PDB:1su0 crystallographic model from *Streptococcus pyogenes* were carried out with a subsequent 50 ns molecular dynamic trajectory. This presented a stable model, showing secondary structure modifications near the active site and conserved cysteine residues. Molecular modeling using *Haemophilus influenzae* IscU primary sequence over the PDB:1su0 crystal followed by a MD trajectory was performed to analyse differences in the C-terminus region of Gram-positive SufU and Gram-negative orthologous proteins, in which several modifications in secondary structure were observed. The data describe the identification of the SUF machinery for [Fe-S] cluster biosynthesis present in the *Firmicutes* genome, showing conserved *sufB*, *sufC*, *sufD* and *sufS* genes and the presence of the *sufU* gene coding for scaffold protein, instead

of *sufA*; neither *sufE* nor *sufR* are present. Primary sequences and structural analysis of the SufU protein demonstrated its structural-like pattern to the scaffold protein IscU nearby on the ISC machinery. *E. faecalis* SufU molecular modeling showed high flexibility over the active site regions, and demonstrated the existence of a specific region in *Firmicutes* denoting the Gram positive region (GPR), suggested as a possible candidate for interaction with other factors and/or regulators.

Background

Iron–sulfur [Fe–S] clusters are simple inorganic prosthetic groups that are widely distributed in nature and play essential roles in diverse biological processes such as electron transfer, redox and nonredox catalysis, gene regulation and as sensors within all living organisms [1,2,3,4]. The biosynthetic process by which defined proportions of iron and sulfur atoms are mobilised and combined to generate the various iron–sulfur prosthetic groups within polypeptide chains has been a matter of intensive research during the last 10 years. The cluster components iron (ferrous or ferric forms) and sulphide ions are unavailable in cytosolic solutions due to their toxicity, making it unlikely that [Fe–S] clusters are synthesised by apoproteins from free cytosolic iron and sulphide elements, even though this is a rather efficient process *in vitro* [5]. Therefore, the functions of the [Fe–S] cluster assembly machineries include the mobilisation of $\text{Fe}^{2+/3+}$ and S^{2-} elements from their storage sources, their association into an [Fe–S] bound form and its transport and transfer to the final molecular destinations. Despite the apparent diversity in the overall structure, reactivity, electronic properties and molecular environments of [Fe–S] clusters, previous data have demonstrated that [4Fe–4S] clusters, as well as clusters of even higher nuclearity, are chemically assembled by the reductive coupling of [2Fe–2S] units [6,7,8,9].

The machinery of [Fe–S] biogenesis is represented by at least three distinct, yet structurally and functionally related systems, designated NIF, ISC, and SUF. The NIF system, in addition to performing specialised functions in nitrogen fixation and subsequent maturation of the nitrogenase enzyme, is formed by structural and regulatory genes represented by around 20 genes [10,11]. The ISC system for iron–sulfur cluster assembly probably represents the housekeeping system for [Fe–S] protein maturation in most living cells and is comprised of *iscRSUA-hscBA-fdx* genes [12]. The SUF system performs its role in sulfur assimilation, is comprised of *sufABCDE* genes and occurs in numerous bacteria, in archaea, and in plant chloroplasts [13,14].

All three operons contain genes that encode proteins with similar biochemical activity [15]. Accordingly, NifU/IscU/SufU scaffold proteins have characteristic primary sequences, the NifU protein possessing the complete form with 312 amino acid

residues and 9 conserved cysteine residues. NifU contains three domains denoted the N-terminal domain (3 conserved cysteines), the central domain (4 conserved cysteines) and the C-terminal domain (2 conserved cysteines). In addition, the N-terminal domain of NifU corresponds to IscU (120 amino acids) and SufU (136 amino acids) proteins and appears to be involved in the formation and delivery of a transient [Fe-S] cluster [16]. A fourth conserved amino acid represented by an aspartic residue located immediately after the first conserved cysteine residue exhibits a critical role in the [Fe-S] cluster delivery: its substitution substantially stabilises the cluster, obstructing the donation of the cluster to the target protein [17].

In addition to the NifU/IscU/SufU scaffold proteins, the cysteine desulfurase NifS/IscS/SufS proteins appear to play essential roles in [Fe-S] cluster formation [18]. Such proteins possess an active cysteine residue (Cys³⁶⁵), involved in desulfuration of the pyridoxal-5'-phosphate (PLP) cofactor and thus in donating the sulfur element to the scaffold protein. Each NIF, ISC and SUF system has particular genes, such as the heat shock determinants (*hscAB*), the alternative scaffold protein IscA in the ISC machinery and the cysteine desulfurase enhancer SufE in the SUF system.

The SUF system has been linked to virulence in several microorganisms, as in *Mycobacterium tuberculosis*, whose *pps1* gene codes for an orthologous SufB protein. It has been established that Pps1 is a central element of the SUF system, playing an essential role in *M. tuberculosis* survival through its involvement in the bacterial resistance to iron limitation and oxidative stress [19]. In *Erwinia chrysanthemi*, which causes soft-rot disease in a great variety of plants, iron acquisition and resistance to oxidative stress greatly contribute to its virulence, as *sufA* and *sufC* mutants exhibit reduced ability to cause maceration of leaves, while a functional *sufC* gene is required for the bacteria to cause systemic invasion [20]. Altogether, these data point to the use of such a system as a possible molecular target for the development of bioactive compounds able to modulate several biological processes. This appears to be particularly important in Gram-positive bacteria, considering the high virulence associated with bacteria belonging to the *Firmicutes* phylum where only the SUF system is present. A particularly important genus belong from this phylum may be found in

Enterococcus spp., which comprises more than 20 species. Clinically, enterococci have been identified as second agents responsible by nosocomial infections wherein *Enterococcus faecalis* species accounting for 80–90% of clinical isolates. [21].

Several crystal and NMR structures of proteins involved in [Fe-S] cluster formation machinery have been described for numerous organisms, such as IscA [22], SufA [23], SufE [24], IscU [25] and SufU [26]. However, no structural information has been available related to proteins present in microorganisms belonging to the *Firmicutes* phyla. In this context, we report here the *in silico* molecular analysis of [Fe-S] cluster biosynthetic machinery in the *Firmicutes* *E. faecalis*, as well as molecular modeling data of the scaffold proteins SufU from *E. faecalis* and IscU from *S. pyogenes*. Overall, the analysis identified putative structural differences associated with Gram-negative (IscU protein) and Gram-positive (SufU proteins) bacteria, supporting structural and conformational differences in the participation of distinct machinery, which may ultimately be related to original and selective therapeutic strategies.

Results and Discussion

The [Fe-S] cluster assembly machinery in *E. faecalis* and its conservative pattern in Gram-positive bacteria.

Bioinformatics analysis of the *E. faecalis* V583 genome [27] demonstrated the presence of a gene locus coding for putative SUF proteins (Fig.1A). ORFs possibly related to [Fe-S] cluster biosynthetic machinery found in *E. faecalis* are denoted as: EF2390, harbouring 37% identity with SufB from *E. coli*; EF2391, encoding the putative scaffold NifU-like protein, homologous to IscU, the N-terminal module of NifU, which will be referred to in this work as SufU (according to Johnson *et al.*, 2005) [3]; EF2392, coding the cysteine desulfurase SufS protein, involved in donation of the sulfur molecule to the [Fe-S] cluster formation; EF3293 and EF2394 encoding SufD and SufC orthologue proteins, which presented 22% and 52% identity with the *E. coli* proteins, respectively. Once the phylogenetic analysis enabled the verification of high conservation and similarity for the *suf*BUSDC operon within *Firmicutes* phylum and, given *E. faecalis* clinical relevance, this work was performed having Gram-positive *E. faecalis* V583 strain as our model of study.

NifU/IscU/SufU is considered key proteins of their respective [Fe-S] cluster assembly machineries in bacteria. The IscU and SufU scaffold proteins show high homology with the N-terminal part of NifU, preserving the three conserved cysteines (Cys^{50, 76, 138}) and aspartic residues (Asp⁵²) (Fig.1B and C). These three cysteine residues are proposed to be involved in the coordination of [Fe-S] cluster assembly with one noncysteiny ligation, and the conserved aspartic residue exhibits a critical role in the [Fe-S] cluster formation, as its substitution substantially stabilizes the cluster, obstructing the donation of the cluster to the target protein. Moreover, IscU contains the conserved amino acid annotation LPPVK, which is related to the interaction with the heat-shock like proteins HscA and HscB, present only in such machinery [28]. *E. faecalis* SufU does not contain the LPPVK annotation, but does have an insertion of 19 amino acid residues between the second and third conserved cysteine residues. The annotation of these 19 amino acids was found to correspond to a specific signature for Gram-positive SufU-type proteins and is thought to replace the annotation present in

IscU, since it is localised in a related region. Furthermore, the same type of *suf* gene representations were identified in several other members of Gram-positive bacteria, such as microorganisms phylogenetically clustered within the *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* and *Listeria* genera, important microorganisms related to pathological processes, along with *Lactococcus* and *Lactobacillus* industrially relevant microorganisms (additional file 1). In the bacterial phyla, the Gram-positive forms make up the phylum *Firmicutes*, which includes many well-known genera such as *Bacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, and *Clostridium*. In fact, phylogenetic analyses of IscU and SufU protein sequences suggested that SufU and IscU proteins form well-defined clades (additional file 2).

Comparison between *suf* genes observed in *Proteobacteria* and *Firmicutes* demonstrated several differences. SufE, for example, is an important protein present in the *Proteobacteria* *suf* operon, but whose presence has not been demonstrated in Gram-positive genomes. This protein is able to drastically stimulate the cysteine desulfurase activity of SufS [29, 30]. Another protein present in the *E. coli* operon and absent in Gram-positive sequences is SufA, whose function is to accept the sulfur transferred from the SufS–SufE complex for transient [Fe–S] cluster formation. Furthermore, cyanobacteria were found to contain the *sufR* gene, which encodes a protein that functions as a transcriptional repressor of the *suf* regulon [31], but it was not found in the *Firmicutes* genomes. On the other hand, Gram-positive genomes contained SufU as a scaffold protein, which is unusual in the *Proteobacteria* *suf* locus. Finally, it can be assumed that four genes are present in both *Proteobacteria* and *Firmicutes* genomes, i.e., *sufB*, *sufC*, *sufD* and *sufS*. Interestingly, published data have always linked the SUF machinery for [Fe-S] cluster formation with cellular stress conditions, such as the presence of reactive oxygen species (ROS), NO stress and iron starvation [20]. But at what point is the SUF machinery that is involved in maturation of constitutive proteins related to other mechanisms in such microorganisms, since it seems to be the only protein factory present in *E. faecalis* as well as in other *Firmicutes* genomes? This is an intriguing and open question in this field, which needs biochemical and structural data for better comprehension.

All data described until now have demonstrated an unusual pattern of gene presentation, especially given the odd SUF-scaffold protein. Thus, we focused subsequent steps of the study on further analysing SufU structure and folding, with the aim of identifying important regions and comparing them to the patterns of [Fe-S] cluster-scaffold proteins determined in *Proteobacteria*.

The structure and molecular modeling of the *E. faecalis* SufU protein.

Firmicutes SufU proteins exhibits a tertiary fold that is composed of four α -helices, I to IV, which comprise amino acids residues 8–19, 66–77, 84–97, and 105–141, respectively, and a three-stranded anti-parallel β -sheet with strands A to C comprising, respectively, residues 33–37, 42–49, and 57–63 (Fig. 2). Helices III and VI form a “coiled-coil” motif, and both helices are attached to one side of the β -sheet with helix III being oriented parallel to strand C. Helix IV is oriented approximately anti-parallel to helix III. The remaining helices I, II, and V surround helix III, with helix III buried in the protein’s core [26]. The CATH protocol assigns SufU to the “a-b” “fold” class having a “two-layer sandwich” architecture, and as “SufE-like” in the class of a and b proteins in the SCOP classification [24].

In order to characterize the structure and conformation of the SufU key protein observed in *E. faecalis* comparative modeling was carried out [32] using the *S. pyogenes* (PDB:1SU0) [24]. SufU was employed as a template as due to its 43% of primary sequence similarity with the target. The quality of the so obtained model was checked through Procheck, PSIPRED and VERIFY3D. The *E. faecalis* SufU model maintained the tertiary fold as observed for *S. pyogenes*.

Although containing most of the genes related to the SUF system of *Proteobacteria*, Gram-positive bacteria also contained the scaffold protein with the active site conserved residues and tridimensional structure resembling IscU from the ISC system. Neither the primary composition nor the three-dimensional structure seen in the scaffold protein SufU matches SufA, the scaffold-function protein found in the *E. coli* SUF system, but it does match the *Proteobacteria* IscU structure [25]. The active site (Fig. 2D) contains all three conserved Cys and Asp residues that allow the formation of the transient [2Fe-2S] cluster for posterior delivery to target proteins, as

verified in SufU. The union of two subunits of this protein to form a homodimer, with the reduction of two $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ to form a $[4\text{Fe-4S}]$ cluster, is feasible [34]. Thus, SufU follows not only the IscU folding pattern but also has flexibility in the active site, which tends to be the region with the biggest structural alterations, and which enables the cluster formation, reduction, and monomer/homodimer alterations in the protein.

As already described, any sequence matching of the SufE primary structure was obtained in *E. faecalis* genome analysis. However, according to Liu *et al.* (2005) [26], although sharing <10% sequence identity, the similarity of the three-dimensional structure suggests that IscU/SufU and SufE are homologous desulfurase enhancers. Thus, SufU could be the molecule responsible for scaffold and desulfurase enhancer actions in Gram-positive SUF machinery. In *Proteobacteria*, this function is exerted by two different molecules, namely SufA and SufE.

As reported [34, 35], crystallographic structures may retain non-biological conformations as due to forces occurring in the crystal environment. By employing such structures in comparative modeling these conformational events associated with crystal packing may be transported to the model, potentially compromising the analysis of the obtained structures. One strategy capable to circumvent such effects, complementing the crystallographic information upon addition of solvent components and molecules flexibility, may be found in molecular dynamics (MD) simulations. Indeed, such strategy has already been employed with success to refine comparative models of proteins, allowing the observation of modifications on secondary structure elements of the interest protein towards the NMR observed structure [32, 36, 37]. So, the obtained model was further refined through MD simulations and, to trace possible crystal packing effects, the template *S. pyogenes* SufU was also simulated in the same conditions.

Molecular dynamics (MD) experiments with crystal data obtained from the *Firmicutes* *S. pyogenes* were performed in order to analyse the structural pattern of SufU under physiological conditions and remove possible crystal effects on the structure. MD results showed consistent changes in the secondary structure of *S. pyogenes* SufU after 50 ns of trajectory. Changes were verified both over the four α -helices, comprising residues 4–14, 62–74, 80–92, 118–133 (I to IV, respectively) and

over the three β -sheets, comprising residues 28–32, 37–44 and 48–56 (A to C, respectively). Both *E. faecalis* and *S. pyogenes* are *Firmicutes* members, and thus are phylogenetically closely related. Therefore, the SufU proteins from the two microorganisms are expected to be very similar.

SufU molecular dynamics data analysis

In order to monitor the progress of structural conformational changes in both SufU MD, and check flexibility indices and conformational changes, we evaluated the root mean square deviation (RMSD) of the simulated proteins. Considering the entire protein, both *S. pyogenes* and *E. faecalis* SufU molecules presented similar behaviors, achieving a plateau around 0.45 nm (Fig. 3A). Such increase in protein flexibility appears to be related to the N- (residues 1 to 38) and C-terminal (residues 95 to 136) portions, which may achieve a 0.6 nm deviation from initial conformations (Fig. 3B and 3C). While the degree of conformational modification in *S. pyogenes* SufU points to a role of the crystal environment in protein stabilization, it also indicates a different pattern of folding and/or flexibility around an insertion of 19 amino acids present only in Gram-positive bacteria, responsible for a ~ 0.1 nm increase in C-terminal RMSD for *E. faecalis* after 20 ns, approximately (Fig. 3C).

The influence of crystal environment on SufU conformation may be observed in the protein secondary structure content (Fig. 2). While the crystallographic structure shows an additional α -helix between helices III and IV, including residues 105-120, such structural element is not retained on MD simulations, unfolding together with the *S. pyogenes* GPR region (Fig. 2). On the other hand, the *E. faecalis* SufU do not only stabilize this helix, between residues 105 and 120, but also retain a GPR conformation close to that observed in *S. pyogenes* crystal structure. In fact, a series of crystal contacts is observed in such structure, interactions capable to retain the α -helical conformation in this sequence. Being such region conserved between the two proteins, it becomes evident the relevance of the whole protein three-dimensional organization in order to further stabilize and determine the conformational preference of this region.

While the data presented in RMSD plots gives a global perspective of the protein conformational modifications over the MD trajectory, it lacks resolution at a residue level. So, in order to gain further insights into the conformational behavior of the simulated proteins, we employed a strategy that describes the structural fluctuation of a protein structure as a function of both time and residue number [36, 37, 38]. Such root mean square fluctuation (RMSF) analysis confirmed the role of both N-terminal and GPR in SufU flexibility (Fig. 4B and 4C). These fluctuations may be observed in a sausage plot (Fig. 4A and 4D).

E. faecalis SufU showed alterations in the GPR, but in a lesser degree than in *S. pyogenes* SufU. Areas related to the active sites of SufU showed higher flexibility too, especially the ones related to residues Cys³⁵, Asp³⁷ and Cys⁶⁰, and areas between residues 20 to 25, and 40 to 45. Although the amino acid residues in these parts aren't involved in the active site for [Fe-S] cluster formation, these areas circumvent those residues, once flexibility required for cluster formation is related to the active site of the protein, and modifications established in these regions are essential for enzyme activity.

Comparison of Gram-negative IscU and Gram-positive SufU scaffold proteins

The structural differences between IscU/SufU proteins from Gram-positive and Gram-negative bacteria are not limited to the GPR region. Also, the N-terminal of such molecules presents differences in both size and sequence (Fig. 1), which is consequently related to the conformation of this sequence. In fact, the analysis of IscU and SufU structures from several organisms (presented in PDB), such as from *Mus musculus* (PDB:1WFZ), from *H. influenzae* (PDB:1R9P), and from *Bacillus subtilis* (PDB:2AZH) support the observation that the N-terminal portion of IscU (verified in both *M. musculus* and *H. influenzae*), is mostly unfolded in comparison to an α -helix in the N-terminal part of both Gram-positive *B. subtilis* SufU (resolved by NMR) and *S. pyogenes* SufU (resolved by crystallography). However, the structural basis for such difference in folding between the two classes of bacteria is not reported. So, we performed an *H. influenzae* IscU molecular modeling experiment using the crystallographic structure of *S. pyogenes* SufU as the template, further refined through MD simulations.

The MD of *H. influenzae* model, retaining a Gram-positive folding demonstrated an unstable conformation, with a progressive unfolding of both N- and C-terminal regions. Such conformational modification was also observed in the radius of gyration, indicating that the Gram-positive folding pattern is not stable in a Gram-negative sequence. Most important, it indicates that these two bacteria proteins indeed present distinct folding in accordance with the topology verified in NMR for IscU.

According to RMSF plots, proteins high flexibility similarities were observed in areas comprising mainly the active sites, the area circumventing them and regions which correspond to the GPR and LPPVK in Gram-negative bacteria.

As observed in the phylogenetic analysis, *Firmicutes* SufU protein and its orthologues in *Proteobacteria* (*Azotobacter vinelandii*), *Gamaproteobacteria* (*H.influenzae*) and *Eucaryota* (*M. musculus*) were clustered in well-defined separated groups. Unlike in the SUF system, the ISC system assembles several other factors which interact directly with the IscU scaffold protein. For example, Hsc66 (HscA) and Hsc20 (HscB) correspond to a specialised chaperone system that selectively binds the [Fe-S] cluster template protein IscU, in which HscA interacts with the LPPVK (residues 99–103) conserved signature [39], stimulating the rate of cluster transfer through an ATP-dependent process by more than 20-fold [40]. SufU does not contain this LPPVK region, which is in accordance with the absence of HscA and HscB genes from the Gram-positive operon.

As discussed above, the SufU crystal and molecular dynamic trajectory structural analysis enabled the identification of a region between the second and third residue of the conserved cysteines. This region is located between helices III and IV, with a loop pattern in the *S. pyogenes* SufU, indicating the possible helix-turn-helix motif. The same region is found in several Gram-positive microorganisms, always related to the scaffold protein for [Fe-S] clusters formation, and presenting the pattern of 19 amino acid residues, with the conserved signature xxFsxxxQGxExxxxLG. This region is apparently susceptible to induced folding upon interaction with target proteins, which MD is capable of refining. Since the conserved residues of this region do not include all of the nineteen residues, and as there are several differences between the non-conserved residues,

which could stabilise the helix, the differences in the secondary structure are understandable; nevertheless, conserved residues showed similar flexibility in both SufU RMSF plots.

Considering the structural similarity of both SufU and IscU proteins, molecular modeling of IscU, with posterior dynamics trajectories, enabled us to demonstrate high fluctuation data over the region near the conservative signature LPPVK, which is topologically situated in the same area as the 7 conservative residues in the region of nineteen residues that is only present in Gram-positive bacteria SufU. The GPR region presents itself inside proteins related to scaffold proteins for the [Fe-S] cluster. In addition, the fact that it is a helix-turn-helix domain located between helices III and IV categorises it as a possible protein interaction region. Furthermore, it is possible that GPR is present in SufU: there may be a new factor, not yet characterised, that is present in the *Firmicutes* phylum that could interact with the SufBCD complex and stimulate [Fe-S] cluster assembly and/or transfer to target proteins, given that ATPase activity has already been demonstrated in SufC and has already been characterised for HscA/HscB and IscU of Gram negative bacteria. This hypothesis is reasonable since GPR is located in the same position of the LPPVK conserved signature. To elucidate this further, we are carrying out more experiments to analyse the interaction between SufU and the SufU-mutant and GPR with SufS and/or SufBCD, and the capacity of the complex to assembly and/or release the [Fe-S] cluster cofactor.

Conclusions

The biological formation of iron–sulfur [FeS] clusters involves the presence of specific biosynthetic machineries and subsequent insertion into specific target proteins. Several [Fe-S] protein machineries have been described in bacteria, in which each (namely NIF, ISC or SUF) presenting specific characteristics. Until now, most of these studies have been performed with *E. coli* and other model bacteria and few studies have considered the [Fe-S] cluster machinery from *Firmicutes* phyla and the Gram-positive bacteria. As well, a small number of studies had been dedicated to the structural and conformational characterization of [Fe-S] cluster machinery individual elements in relation to its specific functions.

So, in order to contribute to fulfill this lack of information the current work demonstrate that SUF appears to be the only machinery involved in [Fe-S] cluster assembly and/or repair system both in enterococci and in other related genera inside the Gram-positive bacteria, whereas includes one ISC element (IscU orthologue) named SufU. The SUF orthologous proteins include SufC, SufD, SufS and SufB. Other genes from *E. coli* SUF machinery, such as SufR, SufE and SufA, were not observed in enterococci. Considering the importance of scaffold proteins in the [Fe-S] cluster biosynthetic machinery, the SufU component was further characterized by means of comparative modeling and molecular dynamics simulations in order to obtain further insights concerning the relation between its structure and conformation and biological function, employing as SufU model protein for *S. pyogenes* and for *E. faecalis* elements. Such analysis had pointed a high flexibility in residues in the active site and mainly adjacent structural elements (residues 20-40, 53-55, 58-60), as well as in a turn between residues 95-115, which is conserved in this type of protein and in *Firmicutes*.

The [Fe-S] cluster formation strategy raises a number of intriguing and still unanswered questions, especially regarding the mechanism of Fe and S mobilisation and assembly within the protein machineries, and also the possible specialisation of these machineries in terms of the type of cluster they can produce, and the control of the target protein transfer step, which probably involves protein–protein interactions. Further studies involving MD data would be attractive in order to both visualise possible

structural alterations and to attempt to copy, *in silico*, the biochemical data of the desulfuration process and sulfur delivery from the SufS to the SufU active site, through docking experiments and molecular dynamic refinement, taking into consideration the SufU high flexibility regions here described. In addition, biochemical data aimed at cloning, expression and purification of key SUF machinery proteins will corroborate descriptions of the [Fe-S] cluster biosynthetic pathway in *E. faecalis*, and elucidate this process in several other Gram-positive bacteria, as well as provide insights on its use as a possible molecular target for development of selective therapeutic strategies.

Methods

The *E. faecalis* V583 genome sequence used in this study is available at the Genbank website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>).

Sequence homology search:

Searches for protein orthologues in different genomes were performed using the genomic BLAST (tblastn) program at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) website (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) and the DOE JOINT Genome Institute (www.jgi.doe.gov). EBI-EMBL ClustalW (www.ebi.ac.uk/clustalw) allowed multiple alignment and analysis of consensus sequences and conserved residues (all proteins coded in the three main machineries of [Fe-S] cluster biosynthesis were screened and the conserved residues were analysed according to their primary sequence). All simulations were performed using the GROMACS simulation suite and GROMOS96 force field [41, 42]. The Swiss-PDB Viewer (<http://www.expasy.org/spdbv>) [43], DSSP [44], and PROCHECK programs were used in protein analyses, while PyMOL (<http://www.pymol.org>) [45] was used for molecule visualisation.

Molecular Modeling:

Comparative modeling using SwissModel was carried out on *E. faecalis* genomic sequence employing *S. pyogenes* SufU structure as template (PDB code 1SU0). Further refinement of *E. faecalis* model was performed by means of MD simulations (see further) [33].

MD simulations:

Each protein, in its monomeric states, was solvated in a dodecahedron box using periodic boundary conditions and the SPC water model [46]. Counter ions were added to neutralise the systems. The MD protocol was based on previous MD studies [38]. Briefly, each system was submitted to energy minimization using the Steepest Descents algorithm. Temperature and pressure were kept constant by coupling protein, ions, and solvent to external temperature and pressure baths, with coupling constants of $\tau = 0.1$ and 0.5 ps, respectively. The dielectric constant was treated as $\epsilon = 1$, and the reference temperature was adjusted to 310 K. The systems were slowly heated from 50

to 310 K, in steps of 5 ps, each one increasing the reference temperature by 50 K. The total time of SufU simulation was 50ns.

Abbreviations

MD, molecular dynamics; GPR, gram positive region.

Authors' contributions

GPR carried out the primary structure, molecular modeling and molecular dynamics simulations and analysis. HV participated in the design of the study and the bioinformatics analysis. JF conceived the study and participated in its design and coordination and helped draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - #420015/05-1, #472174/2007-0, #306397/2006-4 and #473769/2007-7) of the Brazil government and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) of the Brazil government. We are very grateful to Prof. Dennis R. Dean, PhD (Dept. Biochemistry – Virginia Tech) and Prof. João Setubal, PhD (Virginia Bioinformatics Institute) for intellectual collaborations.

References

1. Frazzon J, Fick JR, Dean DR: **Biosynthesis of iron-sulphur clusters is a complex and highly conserved process.** *Biochem. Soc. Trans.* 2002, 30(4): 680-685.
2. Frazzon J, Dean DR: **Formation of iron–sulfur clusters in bacteria: an emerging field in bioinorganic chemistry.** *Curr. Opin Cheml. Biol.* 2003, 7:166–173.
3. Johnson DC, Dean DR, Smith AD, Johnson MK: **Structure, Function and Formation of Biological Iron-Sulfur Clusters.** *Annu.Rev Biochem.* 2005, 74:247–81.
4. Lill R, Mühlenhoff U. **Maturation of Iron-Sulfur Proteins in *Eukaryotes*: Mechanisms, Connected Processes, and Diseases.** *Annu. Rev. Biochem.* 2008, 77: 669-700.
5. Malkin R, Rabinowitz JC: **The reconstitution of Clostridial ferredoxin.** *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1966, 23:822-827.
6. Hausinger RP, Eichorn GL, Marzilli LG, Eds.: *Mechanisms of Metallocenter Assembly.* New York: Wiley; 1996.
7. Beinert H, Kiley PJ: **Fe-S proteins in sensing and regulatory functions.** *Curr Opin Chem Biol.* 1999, 3(2):152-7.
8. Beinert H: **Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises.** *J. Biol. Inorg. Chem.* 2000, 5(1):2-15.
9. Kiley PJ, Beinert H: **The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria.** *Curr. Opin. Microbiol.* 2003, 6(2):181-5.
10. Jacobson MR, Brigle KE, Bennett L, Setterquist RA, Wilson MS, Cash VL, Beynon J, Newton WE, Dean D: **Physical and Genetic Map of the Major *nif***

- Gene Cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* Feb. 1989, 171(2): 1017-1027.**
11. Jacobson MR, Cash VL, Weiss MC, Laird NF, Newton WE, Dean DR: **Biochemical and genetic analysis of the *nifUSVWZM* cluster from *Azotobacter vinelandii*. *Mol. Gen. Genet.* 1989, 219: 49-57.**
 12. Zheng L, Cash VL, Flint DH, Dean DR: **Assembly of iron sulfur clusters: identification of an *iscSUA-hscBA-fdx* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.* 1998, 273: 13264-13272.**
 13. Fontecave M, Ollagnier de Choudens S, Barras F: **Mechanisms of iron–sulfur cluster assembly: the SUF machinery. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2005, 10: 713–721**
 14. Takahashi Y, Tokumoto U: **A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archea and plastids. *J. Biol. Chem.* 2002, 277: 28380-28383.**
 15. Mansy S, Cowan JA: **Iron-Sulfur Cluster Biosynthesis: Toward an Understanding of Cellular Machinery and Molecular Mechanism. *Acc. Chem. Res.* 2004, 37: 719-725.**
 16. Agar JN, Krebs C, Frazzon J, Huynh BH, Dean DR, Johnson MK: **IscU as a Scaffold for Iron-Sulfur Cluster Biosynthesis: Sequential Assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] Clusters in IscU. *Biochemistry* 2000, 39: 7856-7862.**
 17. Raulfs EC, O'Carroll IP, Dos Santos PC, Unciuleac MC, Dean DR: **In vivo iron-sulfur cluster formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105(25):8591-8596.**
 18. Zheng L, White RH, Cash VL, Jack RF, Dean DR: **Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90:2754–2758.**
 19. Huet G, Daffé M, Saves I. **Identification of the *Mycobacterium tuberculosis* SUF machinery as the exclusive mycobacterial system of [Fe-S] cluster**

- assembly: evidence for its implication in the pathogen's survival.** *J. Bacteriol.* 2005, 187(17):6137-6146.
20. Nachin L, Loiseau L, Expert D, Barras F: **SufC: an unorthodox cytoplasmic ABC/ATPase required for [Fe-S] biogenesis under oxidative stress.** *EMBO J.* 2003, 22:427–437.
21. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N: **Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century.** *Cell Mol. Life Sci.* 2003, 60: 2622–2636.
22. Cupp-Vickery JR, Silberg JJ, Dennis T, Vickery LE: **Crystal Structure of IscA, an Iron-sulfur Cluster Assembly Protein from *Escherichia coli*.** *J. Mol. Biol.* 2004, 338: 127–137.
23. Wada K, Hasegawa Y, Gong Z, Minami Y, Fukuyama K, Takahashi Y: **Crystal structure of *Escherichia coli* SufA involved in biosynthesis of iron-sulfur clusters: implications for a functional dimer.** *FEBS Lett.* 2005, 579(29):6543-6548.
24. Liu J, Oganessian N, Shin DH, Jancarik J, Yokota H, Kim R, Kim SH: **Structural Characterization of an Iron–Sulfur Cluster Assembly Protein IscU in a Zinc-Bound Form.** *Proteins* 2005, 59:875–881.
25. Ramelot TA, Cort JR, Goldsmith-Fischman S, Kornhaber GJ, Xiao R, Shastry R, Acton TB, Honig B, Montelione GT, Kennedy MA: **Solution NMR Structure of the Iron–Sulfur Cluster Assembly Protein U (IscU) with Zinc Bound at the Active Site.** *J. Mol. Biol.* 2004, 344: 567–583.
26. Liu G, Li Z, Chiang Y, Acton T, Montelione GT, Murray D, Szyperski T: **High-quality homology models derived from NMR and X-ray structures of *E. coli* proteins YgdK and Suf E suggest that all members of the YgdK/Suf E protein family are enhancers of cysteine desulfurases.** *Protein Sci.* 2005, 14(6):1597-1608.

27. Paulsen IT, Banerjee L, Myers GS, Nelson KE, Seshadri R, Read TD, Fouts DE, Eisen JA, Gill SR, Heidelberg JF, Tettelin H, Dodson RJ, Umayam L, Brinkac L, Beanan M, Daugherty S, DeBoy RT, Durkin S, Kolonay J, Madupu R, Nelson W, Vamathevan J, Tran B, Upton J, Hansen T, Shetty J, Khouri H, Utterback T, Radune D, Ketchum KA, Dougherty BA, Fraser CM: **Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*.** *Science* 2003, 299(5615):2071-2074.
28. Mansy SS, Wu G, Surerus KK, Cowan JA: **Iron-sulfur cluster biosynthesis: *Thermatoga maritima* IscU is a structured iron-sulfur cluster assembly protein.** *J. Biol. Chem.* 2002, 277:21397–21404.
29. Layer G, Gaddam SA, Ayala-Castro CN, Ollagnier-de Choudens S, Lascoux D, Fontecave M, Outten FW: **SufE transfers sulfur from SufS to SufB for iron-sulfur cluster assembly.** *J. Biol. Chem.* 2007, 282(18):13342-50.
30. Outten FW, Wood MJ, Munoz FM, Storz G: **The SufE protein and the SufBCD complex enhance SufS cysteine desulfurase activity as part of a sulfur transfer pathway for Fe-S cluster assembly in *Escherichia coli*.** *J. Biol. Chem.* 2003, 278(46):45713-45719.
31. Shen G, Balasubramanian R, Wang T, Wu Y, Hoffart LM, Krebs C, Bryant DA, Golbeck JH: **SufR coordinates two [4Fe-4S]^{2+,1+} clusters and functions as a transcriptional repressor of the *sufBCDS* operon and an autoregulator of *sufR* in cyanobacteria.** *J. Biol. Chem.* 2007 Nov 2;282(44):31909-31919.
32. Fan H, Mark AE: **Mimicking the action of folding chaperones in molecular dynamics simulations: Application to the refinement of homology-based protein structures.** *Protein Sci.* 2004, 13(4):992-9.
33. Chandramouli K, Unciuleac MC, Naik S, Dean DR, Huynh BH, Johnson MK: **Formation and properties of [4Fe-4S] clusters on the IscU scaffold protein.** *Biochemistry* 2007, 46(23):6804-6811.

34. Jardón-Valadez E, Ulloa-Aguirre A, Piñeiro A: **Modeling and Molecular Dynamics Simulation of the Human Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor in a Lipid Bilayer.** *J. Phys. Chem. B.* in press.
35. Sompornpisut P, Roux B, Perozo E: **Structural refinement of membrane proteins by restrained molecular dynamics and solvent accessibility data.** *Biophys J.* in press.
36. Verli H, Guimarães JA: **Insights into the induced fit mechanism in antithrombin-heparin interaction using molecular dynamics simulations.** *J. Mol. Graph. Model.* 2005, 24(3):203-12.
37. Terra RM, Guimarães JA, Verli H: **Structural and functional behavior of biologically active monomeric melittin.** *J. Mol. Graph. Model.* 2007, 25(6):767-772.
38. Verli H, Calazans A, Brindeiro R, Tanuri A, Guimarães JA: **Molecular dynamics analysis of HIV-1 matrix protein: Clarifying differences between crystallographic and solution structures.** *J. Mol. Graph. Model.* 2007, 26: 62–68.
39. Hoff KG, Ta DT, Tapley TL, Silberg JJ, Vickery LE: **Hsc66 substrate specificity is directed toward a discrete region of the [Fe-S] cluster template protein IscU.** *J. Biol. Chem.* 2002, 277: 27353–27359.
40. Chandramouli K, Johnson MK: **HscA and HscB Stimulate [2Fe-2S] Cluster Transfer from IscU to Apoferrredoxin in an ATP-Dependent Reaction.** *Biochemistry* 2006, 45: 11087-11095.
41. Berendsen HJC, van der Spoel D, van Drunen R: **GROMACS—a message-passing parallel molecular-dynamics implementation.** *Comput. Phys. Commun.* 1985, 91: 43–56.
42. van der Spoel D, Lindahl E, Hess B, van Buuren AR, Apol E, Meulenhoff PJ, Tieleman DP, Sijbers ALTM, Feenstra KA, van Drunen R, Berendsen HJC:

GROMACS User Manual Version 3.2, Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, The Netherlands, 2004.

43. Guex N, Peitsch MC: **Swiss-model and the Swiss-Pdb Viewer: and environment for comparative protein modeling.** *Electrophoresis* 1997, 18: 2714–2723.
44. Kabsch W, Sander C: **Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features.** *Biopolymers* 1983, 22: 2577–2637.
45. DeLano WL: **The PyMOL Molecular Graphics System**, DeLano Scientific, Sao Carlos, CA, USA, 2002.
46. Berendsen HJC, Postma JPM, DiNola A, Haak JR: **Molecular dynamics with coupling to an external bath.** *J. Chem. Phys.* 1984, 81: 3684–3690.

Figures

Figure 1 - The biosynthetic machinery for [Fe-S] cluster formation in Gram-positive bacteria.

(A) Comparison of the genetic organization of genes involved in the [Fe-S] cluster assembly. Genes having homologous sequences or similar functions between the two systems are color-coded: *E. coli* ISC and SUF machineries and conserved ORFs coding for putative SUF machinery in Gram-positive bacteria. (B) Neighbour-Joining phylogenetic analysis of protein sequences. (C) Comparison of sequences from members of the NifU/IscU/SufU orthologues. Cysteines are presented as yellow, aspartate as green, LPPVK of IscU in red, and the characteristic Gram-positive insertion in blue.

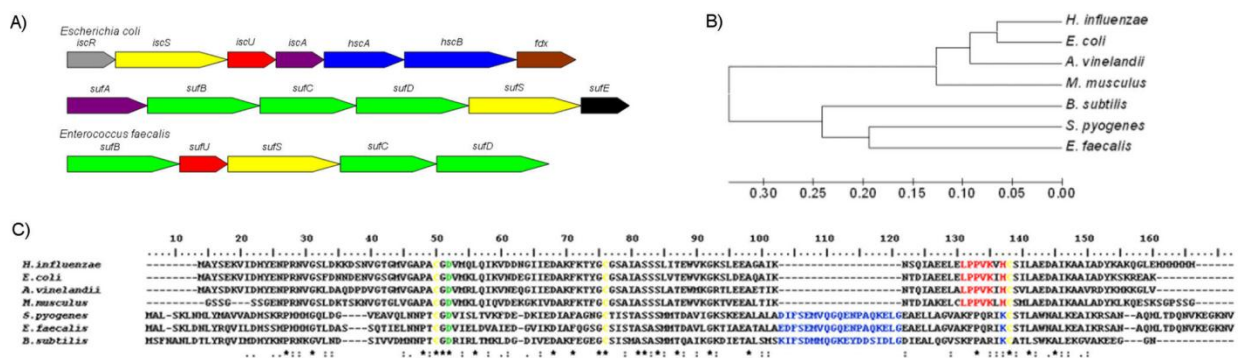


Figure 2 - Representation of crystallographic and MD conformations of SufU.

(A) Template *S. pyogenes* SufU crystal (PDB ID 1SU0); (B) SufU *S. pyogenes* conformation after 50 ns; (C) SufU *E. faecalis* model conformation after 50 ns. SufU structural characteristics are presented (helices I-IV and sheet a-c), as well as the characteristic Gram-positive region of 19 amino acids (GPR). (D) Active showing different conformations of active sites residues before and after MD trajectory: Cys residues are shaded in yellow and orange, and Asp in green and cyan blue for crystal and MD conformations, respectively.

(Corresponde Figura 19 do texto principal)

Figure 3 - Root Mean Square Deviation (RMSD) analysis.

Root Mean Square Deviation (RMSD) for the entire protein (A), N-terminal (B) and C-terminal (C) regions, and (D) radius of gyration (template SufU is presented in black and *E. faecalis* SufU in red).

(Corresponde Figura 20 do texto principal)

Figure 4 – Flexibility analysis.

Sausage plot for (A) template *S. pyogenes* SufU and (D) model *E. faecalis* SufU proteins. The thickness presented is directly related to the flexibility in the area. Loops are presented in gray, helices in red and strands in blue. Root Mean Square Fluctuation (RMSF) analysis, as a function of both residue number and time for (B) template *S. pyogenes* and (C) *E. faecalis* SufU proteins, presenting the four helices (H), the three strands (S), and the GPR region.

(Corresponde Figura 21 do texto principal)

9. CURRICULUM VITÆ RESUMIDO:

RIBOLDI, G. P.

I. DADOS PESSOAIS

Nome:

Gustavo Pelicioli Riboldi

Local e data de nascimento:

Porto Alegre, RS, Brasil, 11 de março de 1983.

Endereço profissional:

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS);
Centro de Biotecnologia (Cbiot);
Laboratório de Bioquímica de Microrganismos (LBM), sala 212;
Avenida Bento Gonçalves, 9500 – Agronomia;
CEP 90501-970
Porto Alegre, RS – Brasil.

Telefone profissional:

+55 51 33086072

E-mail:

gpriba@yahoo.com.br

II. FORMAÇÃO

Mestrado: (2005-2007)

Biologia Celular e Molecular

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM)

Cbiot – UFRGS

Título da dissertação: *“Perfil de resistência antimicrobiana e análise genotípica de Enterococcus spp. isolados de alimentos em Porto Alegre, RS”.*

Graduação: (2000-2004)

Farmácia Bioquímica

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)

Título da dissertação: *“Cafeína e antagonistas de receptores de adenosina como alvos terapêuticos para a doença de Parkinson”.*

III. ESTÁGIOS

*Virginia Polytechnic and State University
Fralin Biotechnology Center
Estados Unidos da América*

Supervisão:

Prof. Dr. Dennis R Dean

Período:

Set 2009 - Ago 2010

Atuação:

Bolsista do Programa de Estágio de Doutorando no Exterior (PDEE/CAPES).

*Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)
Setor de Patologia Clínica*

Supervisão:

Dra. Carmen Pilla

Período:

Jan 2003 – Jul 2003 (Estágio voluntário).

Atuação:

Laboratório de Bioquímica – análise de marcadores bioquímicos em amostras clínicas.

*Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCOMPA),
Laboratório Central.*

Supervisão:

Dr. César Voegeli

Período:

Jan 2004 – Jul 2004 (Estágio curricular)

Atuação:

Análise de amostras clínicas nos diferenciados setores do laboratório clínica: Laboratórios de Bioquímica, Uroanálise, Hematologia e Coagulação, Imunologia, Bacteriologia, Parasitologia.

*Laboratório de Pesquisa Bioquímica (PUCRS)
Laboratório de Enzimologia (Depto. Bioquímica, ICBS – UFRGS)*

Orientação:

Prof. Dra. Carla Denise Bonan

Período:

- Mar 2002 – Fev 2003 (Iniciação Científica - Voluntário);
- Mar 2003 – Dez 2003 (Bolsista do programa de Bolsas/Pesquisa para Alunos da PUCRS – BPA/PUCRS);
- Jan 2004 – Jul 2004 (Iniciação Científica - Voluntário).

Projetos de pesquisa:

- “Estudo da influência da via das ectonucleotidasas sobre a atividade locomotora”;
- “Efeito da habituação em campo aberto sobre as atividades ectonucleotidásicas em sinaptossomas de hipocampo, córtex entorrinal e córtex cingulado de ratos”.

IV. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL OU DIDÁTICA ANTERIOR

Farmacêutico Responsável Técnico (CRF/RS: I – 9457)

Local:

Drogaria Sempre Bem Ltda. – Matriz, Viamão, RS.
CNPJ: 03.173.250/0001-11

Período:

Ago 2005 – Fev 2005

Estágio de docência

Local:

Instituto de Ciências e Tecnologia dos Alimentos (ICTA) – UFRGS

Período:

Mar 2006 – Jul 2006

V. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

NES FD, **RIBOLDI GP**, FRAZZON APG, D'AZEVEDO PA, FRAZZON J.

Antimicrobial resistance and investigation of the molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* in dairy products. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* v. 43, p. 382-385, 2010.

RIBOLDI GP, VERLI H, FRAZZON J.

Structural studies of the *Enterococcus faecalis* SufU [Fe-S] cluster protein. *BMC Biochemistry* v. 10, p. 3, 2009.

RIBOLDI GP, FRAZZON J, D'AZEVEDO PA, FRAZZON APG.

Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus spp.* isolated from food in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* v. 40, p. 1-4, 2009.

RIBOLDI GP, DE MATTOS EP, FRAZZON APG, D'AZEVEDO PA, FRAZZON J.

Phenotypic and genotypic heterogeneity of *Enterococcus* species isolated from food in Southern Brazil. *Journal of Basic Microbiology*, v. 48, p. 31-37, 2008.

PEDRAZZA EL, **RIBOLDI GP**, PEREIRA GS, BONAN CD, IZQUIERDO I.

Habituation to an open field alters ecto-nucleotidase activities in rat hippocampal synaptosomes. *Neuroscience Letters*, v. 413, p. 21-24, 2007.

FERREIRA JAS, DE CASTRO AC, ROCHA MP, **RIBOLDI GP**, D'AZEVEDO PA.

Beta-lactamase production *Haemophilus spp.* and resistance to ampicillin in a general hospital in Porto Alegre city, RS, Brazil (2001-2005). *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 11, p. 50, 2007.

VI. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

RIBOLDI GP, OLIVEIRA JS, FRAZZON J, DEAN DR. The SufSU complex from *Enterococcus faecalis* V583. In: Iron Sulfur Enzymes - Gordon Research Conference, 2010, New London, Estados Unidos da América.

RIBOLDI GP, FRAZZON J. Expression analysis of the *sufCDSUB* genes of *Enterococcus faecalis* under oxidative and iron depletion stresses. In: International Conference in Iron Sulfur Cluster Biogenesis and Regulation, 2009, Athens, Estados Unidos da América.

RIBOLDI GP, VERLI H, FRAZZON, J. Structural studies of the *Enterococcus faecalis* V583 SufU [Fe-S] cluster scaffold protein. In: XXXVII Reunião Anual da SBBq, 2008, Águas de Lindóia, Brasil.

RIBOLDI GP, Verli H, FRAZZON J. Structural studies of the *Enterococcus faecalis* V583 SufU [Fe-S] cluster scaffold protein. In: 54 Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador, Brasil.

DE MATTOS EP, **RIBOLDI GP**, FRAZZON APG, FRAZZON J, BASSO LA. Análise do operon SUF de *Enterococcus faecalis*. In: 54 Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador, Brasil.

RIBOLDI GP, Verli H, FRAZZON J. Structural studies of the *Enterococcus faecalis* V583 SufU [Fe-S] cluster scaffold protein. In: X Reunião Anual do PPGBCM - CBiot/UFRGS, 2008, Porto Alegre, Brasil

RIBOLDI GP, FRAZZON APG, FRAZZON J. Identification of SUF machinery in *Enterococcus faecalis* V583 and presence of possible Fe/S proteins related to cytolysin through in silico analysis. In: 10 IUBMB & 36 Reunião anual da SBBq, 2007, Salvador, Brasil.

RIBOLDI GP, FRAZZON APG, FRAZZON J. Identification of the *Enterococcus faecalis* V583 SUF machinery *in silico*. In: Biogenesis of Iron Sulfur Proteins: Cluster. Assembly and Regulation, 2007, Grenoble, França.

RIBOLDI GP, FRAZZON APG, FRAZZON J. Identification of the *Enterococcus faecalis* V583 SUF machinery *in silico*. In: IX Reunião Anual do PPGBCM - CBiot/UFRGS, 2007, Porto Alegre, Brasil.

HERMES V, **RIBOLDI GP**, TONIOLO L, GANASSINI L, FRAZZON J, D'AZEVEDO PA. Identificação de espécies de *Enterococcus* isolados de alimentos deve seguir as provas fenotípicas convencionais? In: II Salão de Iniciação Científica do IPA, 2007, Porto Alegre, Brasil.

GANASSINI L, HERMES V, TONIOLO L, **RIBOLDI GP**, FRAZZON J, FRAZZON APG, D'AZEVEDO PA. Análise do perfil de proteínas totais (SDS-PAGE) na identificação de enterococos com atipias nas provas fenotípicas tradicionais. In: II Semana Científica da FFFCMPA, 2007, Porto Alegre, Brasil.

RIBOLDI GP. Isolation, characterization and antimicrobial resistance determination in *Enterococcus* spp from *in natura* food and dairy products in Southern Brazil. In: I Congreso Iberoamericano sobre Seguridad Alimentaria, 2006, Sevilla, Espanha.

RIBOLDI GP, FRAZZON APG, D'AZEVEDO PA, FRAZZON J. Molecular characterization of *Enterococcus* spp. isolated from *in natura* food and dairy products in southern Brazil through the polimerase chain reaction by random amplification of polymorphic DNA technique. In: Congresso Brasileiro de Genética, 2006, Foz do Iguaçu, Brasil.

RIBOLDI GP, FRAZZON APG, D'AZEVEDO PA, FRAZZON J. Desenvolvimento de método diagnóstico baseado na técnica de RAPD-PCR para diferenciar linhagens de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* resistentes a ampicilina. In: XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FESBE, 2006, Águas de Lindóia, Brasil.

DE MATTOS EP, **RIBOLDI GP**, FRAZZON J. Análise da rota de transmissão de *Enterococcus* spp. em infecções nosocomiais a partir de alimentos. In: XVIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2006, Porto Alegre, Brasil.

RIBOLDI GP, FRAZZON APG, D'AZEVEDO PA, FRAZZON J. Molecular characterization of *Enterococcus* spp. isolated from *in natura* food and dairy products in southern Brazil through the polimerase chain reaction by random amplification of polymorphic DNA technique. In: VIII Reunião Anual do PPGBCM - CBiot/UFRGS, 2006, Porto Alegre, Brasil.

RIBOLDI GP. Produção de beta-lactamase em *Haemophilus* spp. e resistência aos antimicrobianos em um hospital geral de Porto Alegre, RS (2001-2005). In: 39 Congresso Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial, 2005, São Paulo, Brasil.

RIBOLDI GP, FRAZZON APG, D'AZEVEDO PA, FRAZZON J. Caracterização molecular e avaliação da rota de transmissão de *Enterococcus* spp a partir de alimentos.. In: VII Reunião Anual do PPGBCM - CBiot/UFRGS, 2005, Porto Alegre, Brasil.

PEDRAZZA EL, SILVA RS, SARKIS JJF, IZQUIERDO I, **RIBOLDI GP**, PEREIRA GS, BONAN CD, BATTASTINI AMO. Memory consolidation in posterior cingulate cortex requires a different Task-dependent involvement of adenosine A1 receptors. In: XXXI

Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2003, Caxambu-MG, Brasil.

PEDRAZZA EL, **RIBOLDI GP**, BONAN CD, PEREIRA GS, BATTASTINI AMO, IZQUIERDO I, SARKIS JJF. Participação de ectonucleotidasas hipocampais na evocação de uma tarefa de aprendizado não-associativo em ratos. In: XVIII Reunião anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2003, Curitiba, Brasil.

PEDRAZZA EL, **RIBOLDI GP**, IZQUIERDO I, BONAN CD, BATTASTINI AMO, SARKIS JJF. Efeito da sessão de teste na atividade de ectonucleotidasas em hipocampo de ratos submetidos à tarefa de habituação em campo aberto. In: IV Salão de Iniciação científica da PUCRS, 2003, Porto Alegre, Brasil.

PEDRAZZA EL, BATTASTINI AMO, SARKIS JJF, PEREIRA GS, IZQUIERDO I, **RIBOLDI GP**, BONAN CD. Estudo da atividade das ectonucleotidasas hipocampais após a sessão de teste em ratos submetidos à tarefa de habituação ao campo aberto.. In: XV salão de iniciação científica da UFRGS, 2003, Porto Alegre, Brasil.

RIBOLDI GP, COGNATO GP, SILVA RS, BATTASTINI AMO, SARKIS JJF, LARA DR. Evidências para um efeito do MK-801 (Maleato de Dizolcipina) sobre a produção de adenosina a partir das vias das ectoucelotidasas. In: XV Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2003, Porto Alegre, Brasil.

RIBOLDI GP, SILVA RS, BRUNO AN, BATTASTINI AMO, LARA DR, SARKIS JJF. Ingesta materna de cafeína diminui a hidrólise de nucleotídeos em fatias de hipocampo de ratos neonatos. In: IV Salão de Iniciação Científica da PUCRS, 2003, Porto Alegre, Brasil.

RIBOLDI GP, PEDRAZZA EL, SARKIS JJF, BONAN CD. Efeito da sessão da atividade de ectonucleotidasas e hipocampo de ratos submetidos a tarefa de habituação em campo aberto. In: IV Salão de Iniciação Científica da PUCRS, 2003, Porto Alegre, Brasil.

PEDRAZZA EL, SARKIS JJF, IZQUIERDO I, **RIBOLDI GP**, BONAN CD, BATTASTINI AMO. Efeito da Habituação em campo aberto na atividade das ectonucleotidasas em hipocampo e córtex parietal de ratos. In: XIV salão de iniciação científica da UFRGS, 2002, Porto Alegre, Brasil.

PEDRAZZA EL, BATTASTINI AMO, **RIBOLDI GP**, IZQUIERDO I, SARKIS JJF, BONAN CD. Efeito da Habituação em campo aberto na atividade das ectonucleotidasas em hipocampo e córtex parietal de ratos.. In: IV Salão de Iniciação científica da PUCRS, 2002, Porto Alegre, Brasil.

PEDRAZZA EL, SARKIS JJF, IZQUIERDO I, **RIBOLDI GP**, BATTASTINI AMO, BONAN CD. Effect of habituation to an open field on ectonucleotidase activities in hippocampus and parietal córtex of rats. In: Effect of habituation to an open field on

ectonucleotidase activities in hippocampus and parietal cortex of rats. 2002, Caxambu, Brasil.

RIBOLDI GP, SILVA RS, Bruno AN, BATTASTINI AMO, SARKIS JJF, Lara DR. Efeito da cafeína sobre a hidrólise de nucleotídeos em sinaptossomas de hipocampo e estriado de ratos. In: XIV Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2002, Porto Alegre, Brasil.