

ANDERSON GARCIA

**ESTRUTURA E FUNÇÃO DA PROTEÍNA YacG de *Klebsiella pneumoniae* e
SEUS DERIVADOS PEPTÍDICOS.**

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto

Araraquara- SP

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

G216e Garcia, Anderson
Estrutura e função da proteína YacG de *Klebsiella pneumoniae* e seus derivados peptídicos / Anderson Garcia. – Araraquara : [s.n], 2015
141 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Reinaldo Marchetto

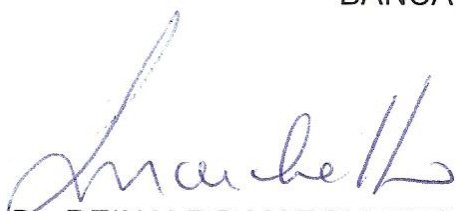
1. Inibidores enzimáticos. 2. Metaloproteínas.
3. Peptídeos - síntese. 4. Proteínas recombinantes.
5. Agentes antibacterianos. I. Título.

ANDERSON GARCIA

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Araraquara, 26 de fevereiro de 2015.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. REINALDO MARCHETTO
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



Prof. Dr. SAULO SANTESSO GARRIDO
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



Prof. Dr. FLÁVIO HENRIQUE DA SILVA
Universidade Federal de São Carlos / UFSCAR / São Carlos



Prof. Dr. CLOVIS RYUICHI NAKAIE
Universidade Federal de São Paulo / UNIFESP / São Paulo



Prof^a. Dr^a. HÉRIDA REGINA NUNES SALGADO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP / Araraquara

DADOS CURRICULARES

Nome: Anderson Garcia

Nome em citações bibliográficas: GARCIA, A.

Filiação: Maria Rosely Garcia Quintino

Local e Data de nascimento: 22/10/1983, Ourinhos-SP

Estado civil: solteiro

Endereço: Rua Francisco Pires 151, Vila Margarida, Ourinhos -SP

CEP: 19907-400

Telefone: (14) 3302-6400 ramal 6475 / (16)98109-1078

E-mail: grc_bioquim@hotmail.com

Resumo das qualificações: Mestre em Biotecnologia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Unesp, na área de síntese de peptídeos com ênfase em peptídeos antimicrobianos , Especialista em Bioquímica Aplicada pela Universidade Estadual De Londrina UEL (2007), Licenciado em Ciências Biológicas pelas Faculdades Integradas de Ourinhos FIO.

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2008 - 2010

Mestrado em Biotecnologia

Universidade Estadual Paulista - Júlio de Mesquita Filho, Unesp, Instituto de Química de Araraquara.

Título: Peptídeos derivados da proteína bacteriana YacG: Síntese e estudos de estrutura-função.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto.

Bolsista Capes - Coordenação de Aperfeiçoamento
de Pessoal de Nível Superior

2007 - 2007

Especialista em Bioquímica Aplicada

Universidade Estadual de Londrina – UEL

Título: Produção de L-asparaginase por *Zymomonas mobilis* CP4, na fermentação de garapa.

Orientador: João Batista Buzato

2003 - 2005

Licenciatura em Ciências Biológicas

Faculdades Integradas de Ourinhos

Título: Generalidades sobre o câncer e sua incidência
na população de Ipaussu.

Orientador: Dalva Regina do Amaral Teixeira

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

Professor Universitário

Faculdades Integradas de Ourinhos FIO

De 02/02/2015 até o momento.

TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS

GARCIA, A., ZOTTIS, A., ABREU, E. M., MARCHETTO, R. New DNA gyrase Inhibitor based on YacG protein Structure. In: 5th European Conference on Chemistry for Life Sciences, 2013, Barcelona. ECCLS 2013 Abstracts Book. Barcelona: Barceló Events, 2013. v.1. p.171-171;

ROCHA, C. A., GARCIA, A., SANCHEZ, P. R. S., ABREU, E. M., MARCHETTO, R. New Peptide Inhibitors of Bacterial Topoisomerases In: XLII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2013, Foz do iguaçu. XLII SBBq Abstracts. 2013.

GARCIA, A., ROSSI, D., BARBOSA, L. C. B., DELFINO, D. B., GARRIDO, S. S., MARCHETTO, R., VALENTINI, S. R. Klebsiella pneumoniae YacG is a specific inhibitor of DNA gyrase In: XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2012, Foz do Iguaçu. XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, 2012.

BARBOSA, L. C. B., GARCIA, A., DELFINO, D. B., MARCHETTO, R. Peptides from E. coli ParE as Inhibitors of Topoisomerases: Screening and Characterization of Protein-protein Interactions In: XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2012, Foz do Iguaçu. XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq. 2012.

DELFINO, D. B., BARBOSA, L. C. B., GARCIA, A., GARRIDO, S. S., MARCHETTO, R. Design and Synthesis of a New Peptide Inhibitor of Topoisomerase IV In: XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2012, Foz do Iguaçu. XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq. 2012.

GARCIA, A., LARISSA, BARBOSA, L. C. B., DELFINO, D. B., GARRIDO, S. S., MARCHETTO, R. Synthetic Peptides from YacG Protein as New Antimicrobials Agents In: XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2011, Foz do Iguaçu. XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq. , 2011.

DELFINO, D. B., BARBOSA, L. C. B., GARCIA, A., LARISSA, GARRIDO, S. S., MARCHETTO, R. Nanoemulsion as Promoter of Permeability for Peptide Inhibitor of Bacterial Topoisomerases In: XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq,, 2011, Foz do Iguaçu. XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq., , 2011.

ARTIGOS PUBLICADOS

BARBOSA, L. C. B., GARCIA, A., GARRIDO, S. S., DELFINO, D. B., SANTOS, L. N., MARCHETTO, R. Design and Synthesis of Peptides from Bacterial ParE Toxin as Inhibitors of Topoisomerases. European Journal of Medicinal Chemistry. v.54, p.591 - 596, 2012.

BARBOSA, L. C. B.; GARRIDO, S. S.; GARCIA, A.; DELFINO, D. B.; MARCHETTO, R. Function inferences from a molecular structural model of bacterial ParE toxin. Bioinformatics , v. 4(10), p. 438-440, 2010.

BARBOSA, L. C. B.; GARRIDO, S. S.; GARCIA, A.; DELFINO, D. B.; GONCALVES, R. D.; MARCHETTO, R. Easy Bioinformatics Analysis (EBiAn): a package for manipulating and analyzing of short biological sequences. Bioinformatics , v. 5(2), p. 43-45, 2010.

OUTROS

GARRIDO, S. S., GARCIA, A., MARCHETTO, R. Participação em banca de MÁRCIO FALCI PENNISI. SÍNTESE E APLICAÇÕES DE INIBIDORES PEPTÍDICOS DE TOPOISOMERASES ASSOCIADOS A SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS, 2012 (Farmácia e Bioquímica) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Avaliador da primeira fase do XXV Congresso de Iniciação Científica da UNESP 2013.

IDIOMAS

1. Inglês: Básico

A minha esposa Ariane

Aos meus filhos Augusto e Arthur (que ainda está por vir)

A minha mãe, padrasto e irmão

A minha avó (em memória)

A todos que me deram forças nesta longa caminhada

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Reinaldo Marchetto por ter aceito mais este desafio, pela sua contribuição e convivência ao longo deste período;

À minha colaboradora, Dra. Danuza Rossi, ao qual teve um papel de extrema importância no desenvolvimento deste trabalho

Ao Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli, por sua contribuição nas condutas de laboratório, instruções na operação de equipamentos, por não medir esforços em ajudar sempre que possível e pela boa convivência;

Ao Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido, pela sua contribuição através de discussões e compartilhar idéias, sempre com o intuito de sempre melhorar o trabalho e pela amizade adquirida;

Aos colegas de grupo, Camila, Ana Caires, Rute, Edson (Araketu), Aderson e Edson (Crusca), pela boa convivência e amizade;

Aos demais colegas de laboratório, Mateus, Norival, Nata, Júlia, Esteban, Isabelle, Aline e Paulo, pela boa convivência;

A todos os funcionários da seção de pós-graduação e técnicos do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química;

Ao meu grande amigo e compadre Darbi, pelos bons e maus momentos compartilhados, por sempre permanecer ao nosso lado sempre nos ajudando e pela sua amizade ao qual tenho muito apreço, apesar do mesmo só conhecer gente estranha;

Ao amigo Luiz Carlos, pelos bons momentos de descontração, por sua contribuição na idéia e ajuda em algumas etapas do desenvolvimento deste trabalho;

Ao amigo de infância, Lucas Ribeiro Jarduli pelos sonhos compartilhados ao qual muitos destes tem sido alcançados e muitos ainda estão por se concretizar;

Ao Cnpq pela bolsa concedida;

E por fim, a minha família, Ariane e Augusto, por sempre estarem ao meu lado me incentivando a seguir em frente e por compartilharem os bons e maus momentos enfrentados no desenvolvimento deste trabalho.

“Um espírito nobre engrandece o menor dos homens”

Jebediah Obadiah Springfield

(personagem da série “Os Simpsons”)

RESUMO

YacG é uma pequena proteína membro da família dos zinc-fingers, descoberta em *E. coli*. Sua função biológica está ligada a inibição da atividade de DNA girase e ao metabolismo do stress em procariotos. YacG atua na inibição da atividade de DNA girase por um mecanismo bipartido, a região do domínio *zinc-finger* atua impedindo a ligação do DNA à subunidade B e a região c-terminal liga-se a subunidade A. Embora a literatura cite YacG como sendo um inibidor de DNA girase, nada foi observado a respeito da atividade de inibição de YacG de *E.coli* e de outras linhagens de micro-organismos frente a outras DNA topoisomerasas e não foi realizado nenhum trabalho envolvendo fragmentos peptídicos desta proteína, e tampouco ensaios de inibição do crescimento celular por estes. Sendo assim YacG de *Klebsiella pneumoniae* foi obtida por expressão heteróloga e uma série de peptídeos derivados desta foram sintetizados pelo método de fase sólida. Os peptídeos sintéticos foram projetados de forma a manter a região *zinc-finger* nativa (YacGAG1), substituídos os resíduos de cisteína por serina (YacGAG4), alanina (YacGAG5), histidina (YacGAG6 e YacGAG8) e também sintetizada a sua região c-terminal (YacGAG7). Os ensaios de inibição da atividade de DNA girase pelos peptídeos sintéticos e proteína, mostraram que YacG, YacGAG4, YacGAG5 e YacGAG7 conseguem inibir a atividade desta enzima, ao contrario do fragmento nativo YacGAG1. Por outro lado YacGAG1 conseguiu inibir a atividade de Topoisomerase II α humana juntamente com os demais peptídeos YacGAG4, YacGAG5 e YacGAG7 e proteína YacG. Os ensaios aqui apresentados corroboram com os dados apresentados na literatura onde a região c-terminal por si só é capaz de inibir a atividade de DNA girase. Os ensaios de anisotropia de fluorescência demonstraram que a interação dos peptídicos sintéticos com DNA girase se dá pela interação destes com a subunidade GyrA desta enzima. Além de inibir a atividade de DNA girase e Topoisomerase II α humana em estudos *in vitro*, os peptídeos sintéticos apresentaram ação bacteriostática contra bactérias do tipo gram-negativa e positiva. Análises utilizando ferramentas de Bioinformática utilizando a estrutura de YacG e GyrB disponíveis em bancos de dados revelam a importância dos resíduos I47, R46 e W40 de YacG na interação com GyrB. Sendo assim, os resultados aqui apresentados permitem concluir que os peptídeos sintéticos de YacG são um bom ponto de partida para o desenvolvimento de novos biofármacos e podem ter sua atividade melhorada, uma vez que neste trabalho foram descritos os resíduos de aminoácidos importantes na interação entre estas duas proteínas.

PALAVRAS CHAVE: YacG, *zinc-fingers*, DNA girase, topoisomerase II α humana, GyrA.

ABSTRACT

YacG belongs to zinc-finger's protein family discovered in *E. coli*. Its biological function is connected to the catalytic inhibition of DNA gyrase and stress metabolism in prokaryotes. This protein inhibits DNA gyrase (gyrase) through a bipartite mechanism where the zinc-finger domain prevents the DNA ligation to the B subunit (GyrB) and the C-terminal bindings to the A subunit (GyrA). Although it is classified as a gyrase inhibitor neither the inhibition activity of YacG from *E. coli* and other microorganisms against other DNA topoisomerases nor the biological activity of fragments in cellular assays has been evaluated until present. In this study, YacG from *Klebsiella pneumoniae* was obtained by heterologous expression and derivative peptides from this protein were synthesized by the solid-phase method. The synthetic peptides were designed to keep the native region of zinc-finger (YacGAG1), to substitute cysteines to serines (YacGAG4), to alanine (YacGAG5), to histidine (YacGAG6 and YacGAG8) and also having only the C-terminal region (YacGAG7). The inhibition assays of gyrase by the peptides and the native protein revealed that YacG, YacGAG4, YacGAG4 e YacGAG7 inhibited this enzyme and the human topoisomerase II α (htopoll α). However, the same was not observed for the native fragment YacGAG1, which inhibited only the htopoll α . The results are in agreement with literature showing that solely the C-terminal region is able to inhibit the gyrase. The assays of fluorescence anisotropy indicated that these synthetic peptides interact with GyrA. Besides inhibiting the gyrase and the htopoll α , these peptides also revealed bacteriostatic activity against gram-negative and gram-positive bacteria. A computational study by applying a molecular dynamics protocol highlighted the importance of residues I47, R46 and W40 from YacG in the process of molecular recognition and interaction with GyrB. The results strongly suggested that these synthetic peptides from YacG are good starting points to develop new biodrugs. Also, their biological activity can be improved based on the findings described here.

KEYWORDS: YacG, zinc-fingers, DNA-gyrase, human topoisomerase II α , GyrA, GyrB.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Microscopia de força atômica do plasmídeo pBR322 relaxado (A) e superenovelado negativamente (B); Micrografia eletrônica do plasmídeo pBP86 entrelaçado (C) e emaranhado (D).....28
- Figura 2.** Tipos de topoisomerases e sua afinidade pela fita de DNA. As Topoisomerases do tipo I clivam somente uma das fitas do DNA e relaxam o superenovelamento pela passagem da outra fita através do DNA clivado (Tipo IA), ou por um mecanismo vertente giratória (Tipo IB). As enzimas do tipo II clivam o DNA duplex e relaxam o superenovelamento pela passagem da dupla fita não clivada pelo segmento clivado e posterior religação..29
- Figura 3.** Estrutura e mecanismo de ação das Topoisomerases tipo IIA. (a) Representação da estrutura dos domínios primários de topoisomerases tipo IIA de eucariotos e de bactérias; (b) Estrutura do domínio ATPásico, ligação do DNA e regiões de clivagem em topoisomerase II de *S. cerevisiae* e DNA girase de *E. coli* (inserção); (c) Mecanismo de ação das topoisomerases tipo IIA pelo mecanismo de duas aberturas (two gates).....31
- Figura 4.** Representação esquemática da estrutura dos domínios da DNA girase de *Escherichia. coli*.34
- Figura 5.** Estrutura molecular dos antimicrobianos quinolônicos (A) e cumarínicos (B).36
- Figura 6.** Estrutura primária de topoisomerase II α humana (A) e estrutura tridimensional ligada ao DNA, resolvida por cristalografia de raio X37
- Figura 7.** (A) Estrutura primária de YacG de *E. coli*. (B) Alinhamento de YacG de *Escherichia coli* ((gi 7466984) com outras sete proteínas bacterianas hipotéticas conservadas. Gi11354705 (*Vibrio cholerae*, group O1 strain N16961), gi1074553 (*Haemophilus influenzae*, strain RD KW20), gi15601954 (*Pasteurella multocida*), gi11348207 (*Pseudomonas aeruginosa*, strain PAO1), gi11353003 (*Neisseria meningitidis*, group B strain MD58), gi11352982 (*Neisseria meningitidis*, group A strain Z2491), gi16126579 (*Caulobacter crescentus* CB15).....39
- Figura 8.** Diagrama de fitas representativo da estrutura de YacG de *E.coli*.40
- Figura 9.** Estrutura primária de DNA girase e YacG e organização dos domínios. (WHD domínio da hélice alada), (CTD domínio c-terminal), (GHKL girase, Hsp90, DnaK e MutL), (TOPRIM topoisomerase/primase), (C Resíduos de cisteína do domínio zinc-finger).....42
- Figura 10.** Estrutura do complexo YacG/GyrBA. Um dos protômeros de DNA girase está colorido em cinza e o outro está colorido conforme indicado anteriormente na Figura 9. YacG está ilustrada com colorações transparentes preta e laranja43

Figura 11. Visualização progressiva de uma resina, a partir de uma unidade macroscópica e as cadeias poliméricas que a compõem até a fórmula molecular de um determinado polímero (a) e principais resinas PS/DVB disponíveis comercialmente, mostrando os diversos linkers (b).	46
Figura 12. Protetores usuais para função α -amina na metodologia da fase sólida ..	48
Figura 13. Handles empregados na síntese de peptídeos-ácido em fase sólida.....	50
Figura 14. Protetores permanentes do grupo α -carboxílico de peptídeos-amida	51
Figura 15. Mecanismo de formação de ligação peptídica por carbodiimidas	52
Figura 16. Esquema da reação envolvida durante o teste de ninidrina.	56
Figura 17. Esquema ilustrativo da SPFS, utilizando a estratégia Fmoc	54
Figura 18. Esquema representativo dos passos utilizados durante a síntese. 1: Acondicionamento inicial da resina com os solventes a serem utilizados durante toda a síntese. 2: Ciclo de desproteção e acoplamento empregado no alongamento da cadeia peptídica até o término da síntese.....	66
Figura 19. Representação da luz circularmente polarizada à direita e à esquerda incidente (A) e transmitida após interagir com uma molécula dicroica (B)..	74
Figura 20. a) Diagrama da ligação peptídica mostrando a orientação da transição $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$; b) Espectros típicos de CD mostrando o perfil característico de α -hélice, folha- β e estrutura desordenada.....	75
Figura 21. Purificação do produto resultante da amplificação do gene <i>yacG</i> , e pET28a após tratamento de ambos com enzimas de restrição. A) Esquema ilustrativo da estratégia de clonagem para obtenção do gene <i>yacG</i> no vetor pET28a utilizando as enzimas em destaque, <i>Bam</i> HI e <i>Eco</i> RI. B) Eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando o resultado da purificação do clone do gene <i>yacG</i> e vetor de clonagem. Nas colunas 2 e 3 estão representados, respectivamente, o clone e o vetor, digeridos com <i>Bam</i> HI e <i>Eco</i> RI. A banda de aproximadamente 200pb, corresponde ao clone do gene <i>yacG</i> . A coluna 1 corresponde ao padrão de massa molecular (1 Kb Plus DNA ladder – Invitrogen).....	81
Figura 22. Avaliação da clonagem e seleção do clone positivo por eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando o resultado da clonagem. Nas canaletas 2 e 3 estão representados, respectivamente, o vetor de clonagem pET28a e o clone 3 de <i>yacG</i> (em evidência), digeridos com <i>Bam</i> HI e <i>Eco</i> RI. A banda de aproximadamente 200pb, corresponde ao clone do gene <i>yacG</i> . A canaleta 1 corresponde ao padrão de massa molecular (1 Kb Plus DNA ladder – Invitrogen).	82
Figura 23. Alinhamento comparativo entre a sequência de nucleotídeos do gene <i>yacG</i> de <i>Klebsiella pneumoniae</i> e o clone 3 obtido.	83
Figura 24. Perfis da purificação da proteína YacG recombinante por expressão heteróloga em <i>E. coli</i> BL21 Rosetta (DE3). À esquerda é mostrado o perfil cromatográfico gerado durante a purificação por cromatografia de afinidade em um	

sistema Akta Prime (Amersham). À direita mostra-se o SDS-PAGE das frações de interesse e o padrão de peso molecular 10 kDa (Fermentas).....	84
Figura 25. Confirmação da identidade de YacG de <i>Klebsiella pneumoniae</i> por Western blot. Coluna 1 – Marcador de peso molecular Pre-stained Protein Ladder da BenchMark™. Coluna 2 – Proteína YacG	85
Figura 26. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo YacGAG1, antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa Kromasil C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å), com um gradiente linear de 20 a 50% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.....	88
Figura 27. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo YacGAG4, antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa Kromasil C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å), com um gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.....	88
Figura 28. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo YacGAG5, antes (A) e após (B) a purificação. Coluna de fase reversa Kromasil C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å), com um gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.....	89
Figura 29. Perfil cromatográfico obtidos em escala analítica para o peptídeo YacGAG6, antes da purificação. Coluna de fase reversa Kromasil C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å), com um gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.	89
Figura 30. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo YacGAG7, antes (A) e após (B) a purificação. Coluna de fase reversa Kromasil C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å), com um gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.....	90
Figura 31. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo YacGAG8, antes (A) e após (B) a purificação. Coluna de fase reversa Kromasil C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å), com um gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.....	90
Figura 32. Curva Padrão de Acetil-L-cisteína para determinação de grupos SH livre empregando o teste de Ellman´s.....	93
Figura 33. Espectros de absorção no UV-visível (300 a 500 nm) de Cobalto (II) coordenado com YacGAG1 com 0, 0,1, 0,2, 0,4 e 1,2 eq de Co ⁺² . A inserção mostra a dependência da banda de transferência de cargas Co(II) → S a 360 nm, com o aumento da quantidade de Co ⁺² adicionado.	95

Figura 34. Espectros de absorção no visível (550 a 800 nm) de Cobalto (II) coordenado com YacGAG1 com 0, 0,1, 0,5 e 1,2 eq de Co^{+2} . A inserção mostra a dependência da banda de transição d-d a 690 nm com o aumento da quantidade de Co^{+2} adicionado.....	96
Figura 35. Espectros de absorção no UV-visível de Cobalto (II) coordenado com YacGAG6 com 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1 eq de Co^{+2} . A inserção mostra a dependência da banda de transferência de cargas $\text{Co(II)} \rightarrow \text{S}$ a 360 nm, com o aumento da quantidade de Co^{+2} adicionado.	97
Figura 36. Espectros de absorção no UV-visível de Cobalto (II) coordenado com YacGAG6 com 0, 0,2, 0,4, 0,8 e 1 eq de Co^{+2} . As inserções mostram as bandas de transição d-d a 660 nm com o aumento da quantidade de Co^{+2} adicionado.....	97
Figura 37. Espectro de dicroísmo circular dos análogos peptídicos de YacG 50 $\mu\text{M.L}^{-1}$ em H_2O deionizada/TFE 60%. Valor da concentração de TFE definido por análise de ensaios anteriores, uma vez observado que a quantidade máxima utilizada para indução da formação de estruturas secundárias é 60%, sendo assim optou-se por não realizar titulação..	99
Figura 38. Ensaio da concentração mínima inibitória (CMI) da atividade de DNA girase pela proteína YacG de <i>Klebsiella pneumoniae</i> . (-) plasmídeo pBR322 relaxado; (+) plasmídeo pBR322 relaxado + 1U de DNA girase; os números em cada aplicação no gel representam a concentração de YacG em $\mu\text{mol.L}^{-1}$, presente na solução contendo plasmídeo pBR322 relaxado + 1U de DNA girase..	100
Figura 39. Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de inibição da DNA girase por YacG de <i>Klebsiella pneumoniae</i> . (-) plasmídeo pBR322 relaxado, (+) plasmídeo pBR322 relaxado + 1U de DNA girase; os números em cada coluna representam a concentração de YacG em $\mu\text{mol.L}^{-1}$, presente na solução contendo plasmídeo pBR322 relaxado + 1U de DNA girase..	101
Figura 40. Ensaio de inibição da atividade de DNA girase pelo análogo peptídico YacGAG1 a 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. (A) Gel de agarose e (B) Densitometria óptica do gel. (-) plasmídeo pBR322 relaxado, (+) plasmídeo pBR322 relaxado + 1U de DNA girase; Linha 1: plasmídeo pBR322 relaxado + 1U de DNA girase + YacGAG1 complexado com o Zn^{+2} . Linha 2: plasmídeo pBR322 relaxado + 1U de DNA girase + YacGAG1 sem Zn^{+2}	103
Figura 41. Ensaio de inibição da atividade de DNA girase pelos análogos peptídicos de YacG. (-) plasmídeo pBR322 relaxado, (+) plasmídeo pBR322 relaxado + 1U de DNA girase; (Linhas 1, 2, 3, 4 e 5) plasmídeo pBR322 relaxado + 1U de DNA girase + YacGAG4, YacGAG5, YacGAG6, YacGAG7 e YacGAG8, respectivamente, em concentração de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ cada.....	104
Figura 42. Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de inibição da DNA girase pelos análogos peptídicos de YacG. (-) plasmídeo pBR322 relaxado, (+) plasmídeo pBR322 relaxado + 1U de DNA girase; (Linhas 1, 2, 3, 4, 5 e 6) plasmídeo pBR322 relaxado + 1U de DNA girase + YacGAG4, YacGAG5,	

YacGAG6, YacGAG7 e YacGAG8, em concentração de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ respectivamente..... 105

Figura 43. Ensaio da concentração mínima inibitória (CMI) da atividade de DNA girase pelo análogo peptídico YacGAG7. (-) plasmídeo pBR322 relaxado, (+) plasmídeo pBR322 relaxado + 1U de DNA girase; os números em cada aplicação no gel representam a concentração de YacGAG7 em $\mu\text{mol.L}^{-1}$, presente na solução contendo plasmídeo pBR322 relaxado + 1U de DNA girase..... 106

Figura 44. Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de inibição da DNA girase pelo análogo peptídico YacGAG7. (-) plasmídeo pBR322 relaxado, (+) plasmídeo pBR322 relaxado + 1U de DNA girase; (Linhas 1, 2, 3 e 4) plasmídeo pBR322 relaxado + 1U de DNA girase + YacGAG7 em concentrações de 100, 75, 50 e 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ respectivamente. 107

Figura 45. Ensaio da concentração mínima inibitória (CMI) da atividade de Topoisomerase II α Humana pela proteína YacG de *Klebsiella pneumoniae*. (-) plasmídeo pBR322 superenovelado, (+) plasmídeo pBR322 superenovelado + 1U de topoisomerase II Humana, os números em cada aplicação no gel representam a concentração de YacG em $\mu\text{mol.L}^{-1}$, presente na solução contendo plasmídeo pBR322 superenovelado + 1U de topoisomerase II Humana. 108

Figura 46. Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de inibição de Topoisomerase II α Humana pela proteína YacG de *Klebsiella pneumoniae*. (-) plasmídeo pBR322 superenovelado, (+) plasmídeo pBR322 superenovelado + 1U de topoisomerase II Humana; (Linhas 1, 2, 3, 4, 5 e 6) plasmídeo pBR322 superenovelado + 1U de topoisomerase II Humana + YacG em concentrações de 100, 75, 50, 25,10 e 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ respectivamente.. 109

Figura 47. Ensaio de inibição da atividade de Topoisomerase II α Humana pelo fragmento peptídico YacGAG1. (A) gel de agarose e (B) Densitometria do gel. (-) plasmídeo pBR322 superenovelado, (+) plasmídeo pBR322 superenovelado + 1U de topoisomerase II Humana; Linha 1: plasmídeo pBR322 superenovelado + 1U de topoisomerase II Humana + YacGAG1 sem Zn^{+2} ; Linha 2: plasmídeo pBR322 superenovelado + 1U de topoisomerase II Humana + YacGAG1 complexado com Zn^{+2} a concentração de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ 110

Figura 48. Ensaio da concentração mínima inibitória (CMI) da atividade de Topoisomerase II α Humana pelos análogos peptídicos YacG. (-) plasmídeo pBR322 superenovelado, (+) plasmídeo pBR322 superenovelado + 1U de topoisomerase II Humana; (Linhas 1, 2, 3, 4 e 5) plasmídeo pBR322 superenovelado + 1U de topoisomerase II Humana + YacGAG4, YacGAG5, YacGAG7 e YacGAG8 a concentração de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente..... 111

Figura 49. Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de inibição de Topoisomerase II α Humana pelos análogos peptídicos YacG. (-) plasmídeo pBR322 superenovelado, (+) plasmídeo pBR322 superenovelado + 1U de topoisomerase II Humana, (Linhas 1, 2, 3, 4 e 5) plasmídeo pBR322 superenovelado

+ 1U de topoisomerase II Humana + YacGAG4, YacGAG5, YacGAG7 e YacGAG8 a concentração de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente.....	111
Figura 50. Ensaio da concentração mínima inibitória (CMI) da atividade de Topoisomerase II α Humana pelo análogo peptídico YacGAG7. (-) plasmídeo pBR322 superenovelado, (+) plasmídeo pBR322 superenovelado + 1U de topoisomerase II Humana, os números em cada aplicação no gel representam a concentração de YacGAG7 em $\mu\text{mol.L}^{-1}$, presente na solução contendo plasmídeo pBR322 superenovelado + 1U de topoisomerase II Humana.	112
Figura 51. Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de CMI de Topoisomerase II α Humana pelo análogo peptídico YacGAG7. (-) plasmídeo pBR322 superenovelado, (+) plasmídeo pBR322 superenovelado + 1U de topoisomerase II Humana, (Linhas 1, 2, 3 e 4) plasmídeo pBR322 superenovelado + 1U de topoisomerase II Humana + YacGAG7 em concentrações de 100, 75, 50 e 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ respectivamente	113
Figura 52. Análise da formação de complexos de YacG com GyrA e GyrB por anisotropia de fluorescência. Uma amostra de 500 nmol.L^{-1} de YacG marcada com FITC foi titulada com GyrA e GyrB e a anisotropia de fluorescência medida ($\lambda_{\text{exc}}= 495 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}}= 515 \text{ nm}$).	116
Figura 53. Análise da formação de complexos de YacGAG1 com GyrA e GyrB por anisotropia de fluorescência. Uma amostra de 500 nmol.L^{-1} de YacGAG1 marcada com FITC foi titulada com GyrA e GyrB e a anisotropia de fluorescência medida ($\lambda_{\text{exc}}= 495 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}}= 515 \text{ nm}$).....	117
Figura 54. Análise da formação de complexos de YacGAG4 com GyrA e GyrB por anisotropia de fluorescência. Uma amostra de 500 nmol.L^{-1} de YacGAG4 marcada com FITC foi titulada com GyrA e GyrB e a anisotropia de fluorescência medida ($\lambda_{\text{exc}}= 495 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}}= 515 \text{ nm}$).....	118
Figura 55. Análise da formação de complexos de YacGAG5 com GyrA e GyrB por anisotropia de fluorescência. Uma amostra de 500 nmol.L^{-1} de YacGAG5 marcada com FITC foi titulada com GyrA e GyrB e a anisotropia de fluorescência medida ($\lambda_{\text{exc}}= 495 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}}= 515 \text{ nm}$).....	119
Figura 56. Ensaio de susceptibilidade bacteriana em meio líquido com os peptídeos YacGAG4, YacGAG5 e YacGAG7 incubados a 5 horas (100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). (Negativo): Caldo Mueller Hinton; (Positivo + cipro): Caldo Mueller Hinton + inóculo de bactérias + ciprofloxacino (5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$); (YacGAG4, YacGAG5 e YacGAG7): Caldo Mueller Hinton + inóculo de bactérias + os respectivos peptídeos. Volume final 100 μL , leitura a 625 nm.....	121
Figura 57. Porcentagem de inibição do crescimento bacteriano pelos análogos peptídicos com 5 horas de incubação.	122
Figura 58. Ensaio de susceptibilidade bacteriana em meio líquido com os peptídeos YacGAG4, YacGAG5 e YacGAG7 incubados a 16 horas (100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). (Negativo): Caldo Mueller Hinton; (Positivo + cipro): Caldo Mueller Hinton + inóculo de bactérias	

+ ciprofloxacino ($5 \mu\text{mol.L}^{-1}$); (YacGAG4, YacGAG5 e YacGAG7): Caldo Mueller Hinton + inóculo de bactérias + os respectivos peptídeos. Volume final $100 \mu\text{L}$, leitura a 625 nm 123

Figura 59. Porcentagem de inibição do crescimento bacteriano pelos análogos peptídicos com 16 horas de incubação..... 124

Figura 60. Diferença de variação da energia livre de interação, obtida através da simulação de dinâmica molecular aplicando-se o protocolo de alanine scanning, a partir do complexo formado pela proteína YacG com a subunidade GyrB de *E. coli*. Apenas os resíduos envolvidos na interação e, portanto, localizados na interface do complexo, são analisados. Quanto maior mais positivo o valor, maior é a contribuição do resíduo no processo de interação molecular. Os resultados são agrupados em clusters (grupos) de conformações estruturais que apresentam um $\text{RMSD} \leq 0,2 \text{ \AA}$ 126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do gene <i>yacG</i>	60
Tabela 2. Protocolo de amplificação do gene <i>yacG</i>	61
Tabela 3. Ciclos e condições da PCR para amplificação do gene <i>yacG</i>	61
Tabela 4. Vetor de clonagem e enzimas de restrição utilizadas..	62
Tabela 5. Protocolo de ligação inserto/vetor	62
Tabela 6. Relação dos microrganismos utilizados nos ensaios	76
Tabela 7. Meios de cultura utilizados	77
Tabela 8. Sequência primária dos peptídeos sintetizados	87
Tabela 9. Relação das massas dos peptídeos purificados	91
Tabela 10. Resultado das análises de espectrometria de massas...	92
Tabela 11. Teor de grupos tióis nos fragmentos peptídicos sintetizados	93
Tabela 12. Frações escolhidas dos peptídeos marcados com FITC..	116

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. Aminoácidos

Ala (A)	-	alanina
Arg (R)	-	Arginina
Asn (N)	-	Asparagina
Asp (D)	-	ácido aspártico
Cys (C)	-	Cisteína
Gln (Q)	-	glutamina
Glu (E)	-	ácido glutâmico
Gly (G)	-	Glicina
His (H)	-	Histidina
Ile (I)	-	Isoleucina
Leu (L)	-	Leucina
Lys (K)	-	Lisina
Met (M)	-	Metionina
Phe (F)	-	Fenilalanina
Pro (P)	-	Prolina
Ser (S)	-	Serina
Thr (T)	-	Treonina
Trp (W)	-	Triptofano
Tyr (Y)	-	Tirosina
Val (V)	-	Valina

2. Outras

ACN	-	Acetonitrila
Boc	-	<i>t</i> -Butiloxicarbonila
DCM	-	diclorometano
DIC	-	Diisopropilcarbodiimida
DIEA	-	N- diisopropiletilamina

DMF	-	N,N – Dimetilformamida
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
DTNB	-	Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
DTT	-	1,4 Dithiothreitol
Girase	-	DNA-girase
EDT	-	1, 2-etanoditol
EDTA	-	ácido etilenodiaminotetracético
Fmoc	-	9- Fluorenilmetiloxicarbonila
GFP	-	Proteína verde fluorescente
HOBt	-	1-Hidroxibenzotriazol
HPLC	-	cromatografia líquida de alta eficiência
LC-MS	-	cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas
MPLC	-	cromatografia líquida de média eficiência
NMP	-	N-metilpirrolidona
Pmc	-	2,2,5,7,8-pentametil-cromano-6-sulfonila
RP-HPLC	-	cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
SPFS	-	síntese de peptídeos em fase sólida
STEB	-	carregador de DNA – (sacarose, tris, EDTA e azul de bromofenol)
TBE	-	tampão para eletroforese tris/boro/EDTA
tBu	-	terc-butila
TFA	-	ácido trifluoroacético
TFE	-	Trifluoroetanol
TIS	-	Triisopropilsilano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	26
1.1 DNA Topoisomerases	27
1.1.1 Topoisomerases do tipo I.....	29
1.1.2 Topoisomerases do tipo II.....	30
1.1.3. DNA girase (E.C 5.99.1.3)	33
1.1.4. Topoisomerase II α humana	35
1.2. A proteína YacG.....	38
1.3. Síntese química de peptídeos	44
2. OBJETIVOS	55
3. MATERIAIS	56
3.1. Reagentes, solventes e linhagens celulares utilizadas na clonagem e expressão	56
3.2. Reagentes e solventes, utilizados na síntese, purificação e caracterização dos análogos e fragmentos peptídicos	57
3.3. Reagentes e solventes, utilizados nos ensaios de inibição enzimática	58
4. MÉTODOS	59
4.1. Clonagem do gene yacG de <i>Klebsiella pneumoniae</i> e expressão heteróloga da proteína YacG	59
4.1.1. Extração do DNA genômico de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	59
4.1.2. Amplificação por PCR e clonagem do cDNA	60
4.1.3. Clonagem do gene yacG em em vetor de expressão	61
4.1.4. Transformação em células de <i>E. coli</i>	62
4.1.5. Sequenciamento do DNA	63
4.1.5.1. Reação	63
4.1.5.2. Precipitação	63
4.1.6. Produção e purificação das proteínas recombinantes	64
4.1.7. Análise de YacG recombinante por Western blot	64
4.2. Síntese dos fragmentos e análogos peptídicos de YacG.....	65
4.3. Reação de redução e prevenção de formação de pontes dissulfeto	67
4.4. Purificação do fragmento e análogos peptídicos.....	67
4.5. Espectrometria de massas.....	68
4.6. Determinação de grupos sulfidrila livres nas amostras peptídicas	69

4.7. Titulação com Co^{2+}	69
4.8. Marcação de YacG, YacGAG1, YacGAG4 e YacGAG5 com FITC.....	70
4.9. Ensaio de inibição da atividade de DNA girase.....	71
4.10. Ensaio de inibição da atividade de Topoisomerase II Humana.....	72
4.11. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)	72
4.12. Dicroísmo circular	73
4.13. Ensaio de susceptibilidade bacteriana em meio líquido utilizando o método de micro-diluição em caldo.....	76
4.13.1. Preparo das soluções padrão de peptídeos	77
4.13.2. Preparo do inóculo e ajuste	77
4.13.3. Inóculo da suspensão normatizada nas placas de 96 poços.....	78
4.14. Estudos de Bioinformática	79
4.14.1. Modelagem Molecular	79
4.14.2. Dinâmica Molecular	79
4.14.3. Estudo de Interação Dinâmica do Complexo.....	80
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
5.1. Amplificação por PCR e clonagem	81
5.2. Sequenciamento do DNA.....	83
5.3. Produção e purificação das proteínas recombinantes	84
5.4. Western blot.....	84
5.5. Design racional dos fragmentos peptídicos de YacG	86
5.6. Purificação e caracterização dos análogos peptídicos.....	87
5.7. Espectrometria de massas.....	91
5.8. Determinação de grupos sulfidríla livre	92
5.9. Titulação dos fragmentos peptídicos com íon Cobalto.....	94
5.10. Dicroísmo circular	98
5.11. Inibição da atividade de DNA girase	99
5.12. Inibição da atividade de Topoisomerase II α humana	107
5.13. Estudos de interação por Anisotropia de Fluorescência	114
5.14. Avaliação da ação bacteriostática dos análogos peptídicos de YacG por ensaio de susceptibilidade bacteriana em meio líquido	120
5.15. Estudos de Modelagem e Dinâmica Molecular	125
6. CONCLUSÕES	127
7. PERSPECTIVAS.....	130

8. REFERENCIAS.....	132
---------------------	-----

1. INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos antibióticos tem sido considerada uma ameaça à saúde dos seres humanos e vêm atingindo índices cada vez mais elevados. Por mais de cinco décadas o problema de como conter a resistência aos antimicrobianos tem preocupado as autoridades políticas e membros da comunidade acadêmica, o que não é surpreendente uma vez que a resistência aos antimicrobianos tornou-se um problema de saúde pública de ordem mundial (HARBATH & SAMORE, 2005).

Pontos de vista pessimistas sobre as poucas chances de sucesso no bloqueio do desenvolvimento da resistência aos antimicrobianos têm sido constantemente relatados (LIVERMORE, 2004). Uma situação fundamental é que os antimicrobianos são recursos não-renováveis, ou seja, quando se tornam ineficazes, tendem a ser descartados. A duração do seu efeito benéfico e disponibilidade parece limitado, em nível biológico, uma restrição não observada em terapias para outras condições de doença.

Estratégias e tentativas de combater a resistência, bem como os fatores que a desencadeia, têm sido discutidas até então. Os fatores que levam a resistência microbiana são numerosos e diversos. O diagnóstico incorreto tanto clínico quanto laboratorial é um dos principais. A falta de métodos precisos nestes diagnósticos, conseqüentemente leva à prescrição inadequada e ao abuso no uso de antimicrobianos, elevando assim a pressão seletiva aplicada e o aumento de micro-organismos resistentes, resultando em dificuldades no tratamento das infecções (FISCHER et al., 2004; NUERMBERGER & BISHAI, 2004).

Dentre os outros fatores associados à resistência está o aumento no número de pacientes imunocomprometidos e a suscetibilidade de pessoas idosas a adquirirem infecções microbianas. Somam-se a estes, novos tratamentos e tecnologias que podem criar novas doenças infecciosas e eliminar outras existentes, a exemplo da quimioterapia utilizada no tratamento do câncer ao qual leva a novos tipos de hospedeiros suscetíveis e a novas doenças infecciosas, estimulando indiretamente a disseminação de organismos resistentes dentro de hospitais. Juntamente com esta disseminação, práticas ruins de controle de infecção aplicadas nestes ambientes contribuem ainda mais para tal efeito. A transferência de pacientes

infectados entre hospitais e outras localidades, agravam ainda mais este quadro, pois estes pacientes podem hospedar organismos resistentes ao qual poderão ser disseminados. (HARBATH & SAMORE, 2005).

Diante de tal problema, é necessário a busca de meios alternativos na tentativa de diminuir a taxa de resistência. Em um primeiro momento, deve-se cessar o uso de antimicrobianos em pacientes que não apresentam infecção bacteriana e promover campanhas de conscientização sobre o uso dos mesmos. Paralelamente, deve-se promover a busca por novas tecnologias de controle de infecção e o desenvolvimento de novos compostos que possam atuar como novos fármacos, especialmente aqueles que sejam capazes de lidar com as estratégias de adaptação dos microrganismos (CHASTRE et al., 2003), (COUTURIER et al., 1998, LOHNER & STAUDEGGER, 2001).

As perspectivas para o desenvolvimento de novos fármacos com ação antibacteriana incluem aquelas que se baseiam na ação das proteínas naturais, produzidas por microrganismos, tais como Gyrl (NAKANISHI et al., 1998), Murl (SENGUPTA et al., 2006), MccB17 (HEDDLE et al., 2001), CcdB (COUTURIER et al., 1998), ParE (JIANG et al., 2002) e YacG (SENGUPTA e NAGAJARA, 2008), que atuam como inibidores das DNA topoisomerasas, enzimas responsáveis pela manutenção da topologia do DNA bacteriano, portanto um alvo potencial para a ação de novos fármacos.

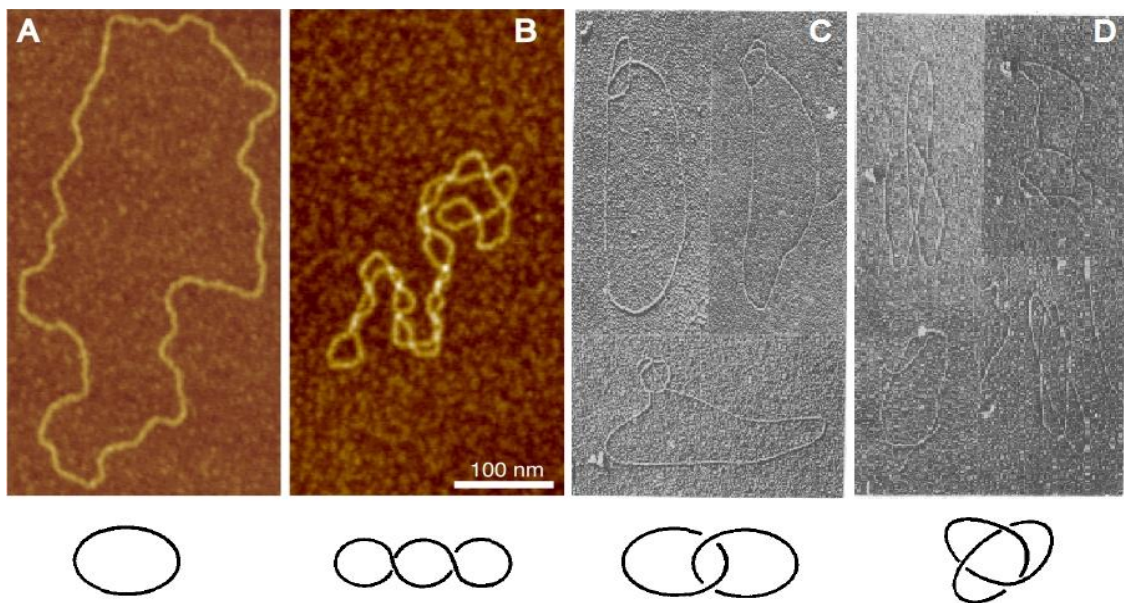
1.1. DNA Topoisomerases

A estrutura em dupla hélice do DNA é indispensável para a estabilidade e o armazenamento da informação genética. O acesso à informação genética contida nestas fitas, necessita de sua separação e também da alteração em seus níveis de enovelamento (LIU & WANG, 1987; SCHOEFFLER & BERGER, 2008). Os estados topológicos do DNA podem representar sérios desafios para a célula, interferindo na expressão gênica, duplicação e segregação do cromossomo, mas ao mesmo tempo as células dependem do superenovelamento e do relaxamento do DNA como meio de compactar o genoma e acessar origens de replicação e regiões promotoras (HOLMES & COZZARELLI, 2000).

O DNA por si, não tem a capacidade de se converter ou inter-converter em suas diversas formas topológicas (Figura 1). Para resolver estes estados topológicos e permitir o acesso à informação genética, torna-se necessária a ação de enzimas específicas que auxiliam a célula na manutenção do estado topológico de seu DNA. São as DNA Topoisomerases.

As DNA topoisomerases são enzimas envolvidas no metabolismo do DNA, no qual controlam o seu estado topológico, introduzindo ou relaxando o superenovelamento positivo ou negativo, fazendo ou desfazendo o emaranhado e entrelaçando ou desentrelaçando dois DNA circulares (BERGER, 1998).

Figura 1. Microscopia de força atômica do plasmídeo pBR322 relaxado (A) e superenovelado negativamente (B); Micrografia eletrônica do plasmídeo pBP86 entrelaçado (C) e emaranhado (D).

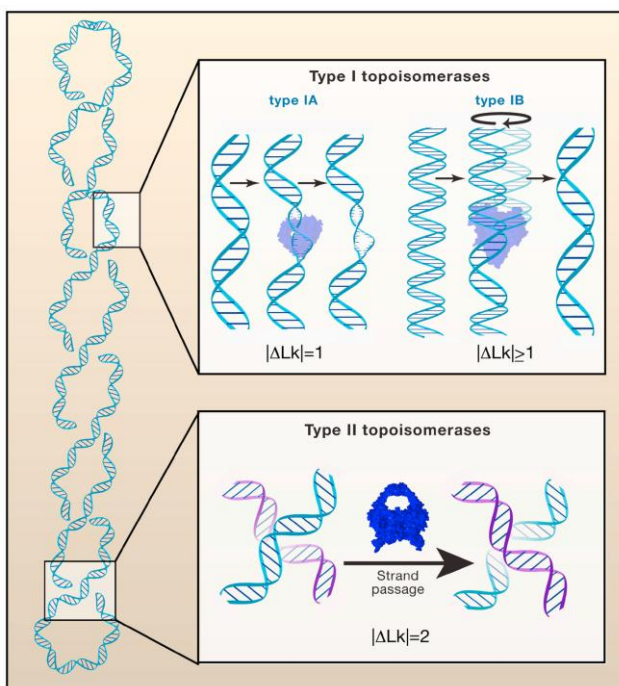


Fonte: WITZ, & STASIAK, 2010; MIZUUCHI et al., 1980 (modificado)

Para promover estas mudanças, as topoisomerases necessitam introduzir uma quebra na(s) fita(s) do DNA e assim rearranjá-las e religa-la(s) novamente. O mecanismo de quebra e/ou clivagem é comum a todas as topoisomerases, que clivam uma ou ambas as fitas do DNA (de acordo com o tipo, Figura 2) através da quebra transiente e da ligação fosfo-tirosina enzima/DNA, passando a fita ou dupla

fita não clivada através do seguimento clivado e posterior religação (TSE et al., 1980; WORLAND & WANG, 1989). Para que o processo ocorra, algumas topoisomerases, necessitam de ATP e íons metálicos como co-fatores.

Figura 2. Tipos de topoisomerases e sua afinidade pela fita de DNA. As Topoisomerases do tipo I clivam somente uma das fitas do DNA e relaxam o superenovelamento pela passagem da outra fita através do DNA clivado (Tipo IA), ou por um mecanismo vertente giratória (Tipo IB). As enzimas do tipo II clivam o DNA duplex e relaxam o superenovelamento pela passagem da dupla fita não clivada pelo segmento clivado e posterior religação.



Fonte: KOSTER, 2010.

Desta forma, as DNA topoisomerases podem ser classificadas em duas classes: as do tipo I e as do tipo II. Estas duas classes podem ainda conter subgrupos específicos.

1.1.1. Topoisomerases do Tipo I

As enzimas do tipo I, são aquelas que clivam somente uma fita do DNA durante o processo de catálise e são responsáveis por facilitar o relaxamento do DNA superenovelado positivamente ou negativamente, bem como emaranhar e desemaranhar o DNA. Elas são subdivididas em três subfamílias: IA, IB e IC.

A subfamília IA inclui a topoisomerase I e III bacteriana e de *archeas*, topoisomerase III eucariótica e ainda a não caracterizada topoisomerase IA de *Mimivirus* (WANG, 1971; SRIVENUGOPAL et al., 1984; WALLIS et al., 1989; SLESAREV et al., 1993; RAOULT et al., 2004). Estas enzimas criam uma ligação 5-fosfotirosil, formando uma ponte enzima/fita única com o DNA, permitindo assim a passagem de uma única ou dupla fita através da abertura gerada (DEPEW et al., 1978; LIU & WANG, 1979; TSE et al., 1980; BROWN & COZZARELLI, 1981). Este mecanismo de passagem das fitas possibilita desfazer o emaranhado e desentrelaçar os DNAs contendo regiões de única fita, bem como o relaxamento negativo.

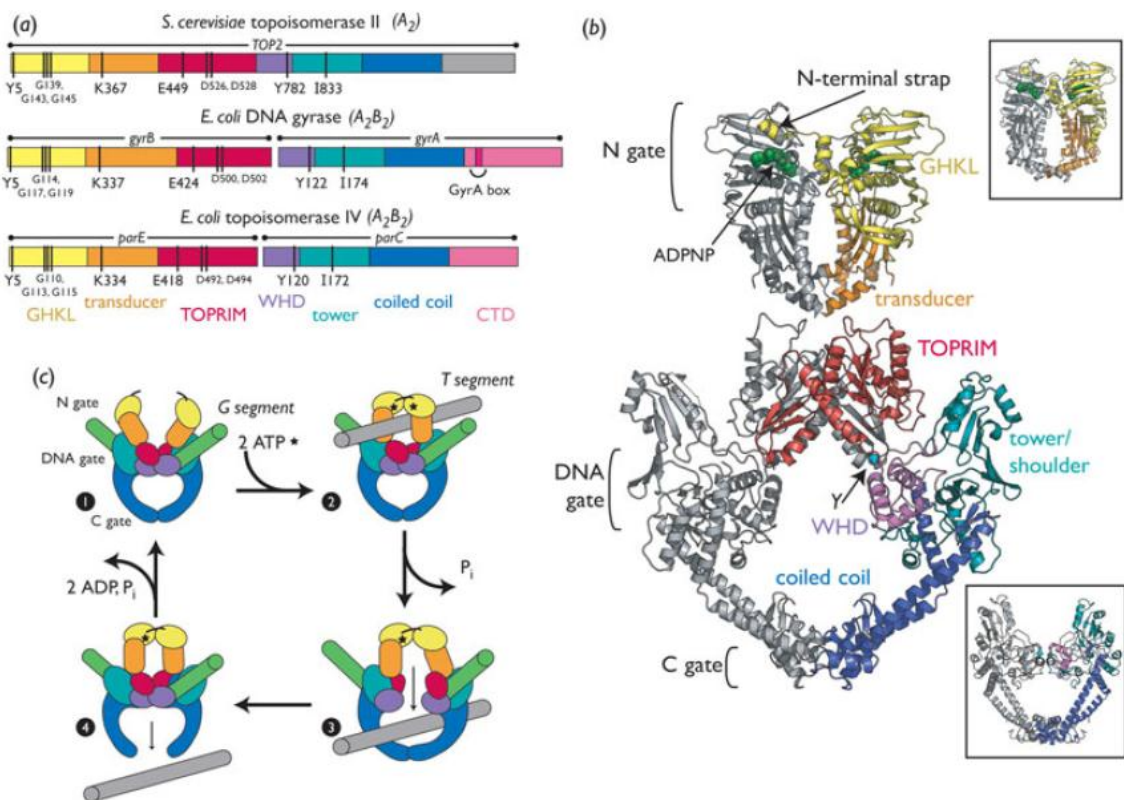
As topoisomerases da subfamília IB, incluem: topoisomerase I eucariótica, topoisomerase I de *poxvírus* e seus homólogos encontrados em certas bactérias (KROGH & SHUMAN, 2002) e *Mimivirus* (BENARROCH et al., 2006). Elas formam uma ligação 3' – fosfotirosil, independente de íons metálicos com uma das fitas do DNA (CHAMPOUX, 1981), para facilitar o relaxamento do superenovelamento positivo e negativo do DNA (KOSTER et al., 2005). A subfamília IC compreende somente a Topoisomerase V, encontrada exclusivamente em alguns gêneros de arqueobactérias (SLESAREV et al., 1993; GADELLE et al., 2003). Muito ainda permanece desconhecido a respeito da topoisomerase V, mas parece ter funcionalidades similares às topoisomerase do tipo IB, na qual a enzima cliva a extremidade 3' da fita e não exige co-fatores para a atividade de relaxamento do DNA (SLESAREV et al., 1993; TANEJA et al., 2007). Acredita-se que ambas as subfamílias IB e IC usam o mecanismo controlado de rotação para o relaxamento do DNA (SLESAREV et al., 1993; TANEJA et al., 2007).

1.1.2. Topoisomerases do Tipo II

Topoisomerases do tipo II são aquelas que clivam ambas as fitas do DNA durante a catálise. Esta reação requer o acoplamento e a hidrólise do ATP. Elas clivam um segmento dupla fita e transportam o segundo segmento não clivado através da abertura do primeiro segmento e o religam novamente (conforme ilustrado na Figura 3). Durante a clivagem, um par de tirosinas, ataca um dos

segmentos da dupla fita e torna-se covalentemente ligado ao DNA através da ligação 5'- fosfotirosina (BERGER, 1998).

Figura 3. Estrutura e mecanismo de ação das Topoisomerases tipo IIA. (a) Representação da estrutura dos domínios primários de topoisomerases tipo IIA de eucariotos e de bactérias; (b) Estrutura do domínio ATPásico, ligação do DNA e regiões de clivagem em topoisomerase II de *S. cerevisiae* e DNA girase de *E. coli* (inserção); (c) Mecanismo de ação das topoisomerases tipo IIA pelo mecanismo de duas aberturas (two gates).



Fonte: SCHOEFFLER, 2008.

As topoisomerases do tipo II são subclassificadas em duas famílias, IIA e IIB. A família IIA inclui a topo II eucariótica (BALDI, et al. 1980), topo II viral e de bacteriófago (LIU, et al. 1979), girase bacteriana e archea (GELLERT et al., 1976) e topo IV bacteriana (KATO et al., 1990).

Enquanto as topoisomerases do tipo IIA são amplamente encontradas na natureza, as do tipo IIB limitam-se apenas a archeobactérias, plantas e certas algas. Esta família de topoisomerases inclui somente a topo VI, ao qual tem perfil de

atividade semelhante a topo II, mas tem evolução distinta (BERGERAT et al., 1997; GADELLE et al., 2003).

A holoenzima ativa do tipo IIA pode tomar formas distintas, sendo elas encontradas como homodímero (topo II eucariótica e viral), heterotetrâmero A_2B_2 (DNA girase e topo IV) ou até heterohexâmero $A_2B_2C_2$ (topo II do bacteriófago T4). Apesar destas diferenças, as topo IIA são sempre simétricas. A formação de sua estrutura quaternária, resulta na formação de no mínimo três principais interfaces de subunidades, ou aberturas, ao qual isola duas cavidades separadas na mesma enzima (Figura 3b). A abertura N (denominada N ou ATP gate) é formada por dois elementos: uma volta de ligação e hidrólise do ATP e um domínio adjacente chamado de transdutor (WIGLEY et al., 1991; CLASSEN et al., 2003; CORBETT & BERGER, 2003; BELLON et al., 2004). A região ATPásica é membro da superfamília GHKL, assim chamada por estar presente em todas as topoisomerases tipo II, Chaperona Hsp90 e a enzima de reparo de incompatibilidade de DNA MutL (DUTTA & INOUE, 2000). O domínio transdutor contém uma rara conexão α/β esquerda cruzada (WIGLEY et al., 1991) que, acredita-se transmitir sinais da abertura N (N-gate) para a abertura central onde o DNA é ligado e clivado (DNA gate) (BJERGBAEK et al., 2000; CORBETT & BERGER, 2003). O DNA gate é formado por um domínio de ligação de um metal divalente, denominado TOPRIM e um domínio WHD (MCKAY & STEITZ, 1981; HARRISON & AGGARWAL, 1990; BERGER et al., 1996; ARAVIND et al., 1998; GAJIWALA & BURLEY, 2000). Em enzimas do tipo IIA bacterianas e *archeas*, estes dobramentos ou domínios são encontrados em subunidades separadas, enquanto que na topoisomerase II eucariótica eles encontram-se em uma única cadeia polipeptídica. O domínio ou volta WHD abriga o sítio catalítico de tirosina e auxilia a dobra TOPRIM na clivagem do DNA, gerando um corte 5' na dupla fita (MORRISON & COZZARELLI, 1979; LIU et al., 1983; SANDER & HSIEH, 1983). Adjacente ao WHD está uma dobra α/β denominada “shoulder” ou “tower” (MORAIS CABRAL, et al. 1997) ao qual também participa da ligação do metal (DONG & BERGER, 2007). A partir do “shoulder”, estende-se um elemento em espiral espiralada (coiled-coil) tapado na sua extremidade distal com um pequeno domínio globular, ao qual forma uma terceira interface de dimerização, a abertura C (C-gate). Esta interface é bem conservada e serve como interface dimérica primária da proteína (BERGER et al., 1996; MORAIS

CABRAL et al., 1997; FASS et al., 1999; CORBETT et al., 2005; DAO-THI et al., 2005).

Estas aberturas (N e C-gate) regulam a passagem da dupla fita do DNA por um mecanismo geral de duas aberturas (two-gates), proposto no início dos anos 80. (MIZUUCHI et al., 1980; WANG & KIRKEGAARD, 1981).

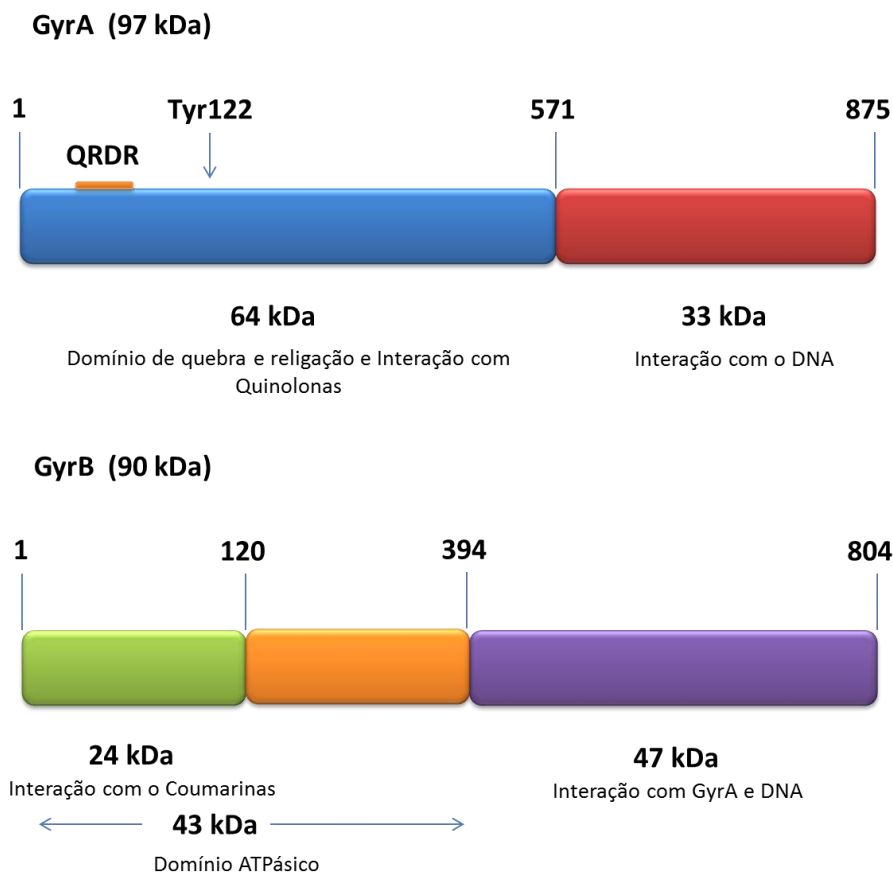
Contudo, estudos envolvendo a estrutura das topoisomerases tipo II revelam a existência de mais do que duas aberturas físicas (gates), no entanto, acredita-se que elas operam por um mecanismo de duas aberturas (gates) (Figura 3c). Primeiro, a enzima se liga a um segmento dupla fita de DNA, denominado segmento G, que então será clivado (ROCA & WANG, 1992). A ligação ocorre no DNA gate, no domínio então chamado “quebra e religação” ou na região A da enzima (DONG & BERGER, 2007). Depois a enzima se associa com um segundo segmento de DNA, o segmento T. A associação da enzima com o ATP induz a dimerização dos motivos GHKL (WIGLEY, et al. 1991) fechando abertura N (N-gate) envolta do segmento T (ROCA & WANG, 1992). A hidrólise de uma molécula de ATP a ADP e a liberação do fosfato resultante desencadeia uma mudança conformacional ligada à abertura do DNA-gate (HARKINS & LINDSLEY, 1998), o qual ocorre pela separação dos WHDs através da flexão dos braços em espiral espiralada (BERGER et al., 1996). O segmento é então impulsionado a passar pela abertura e o segmento G é religado e liberado, após o segmento T escapar pela abertura transitória da abertura C (C-gate) (ROCA & WANG, 1994). A hidrólise da segunda molécula de ATP e a liberação de todos os produtos de hidrólise, resulta na abertura do N-gate (WIGLEY et al., 1991), deixando a enzima pronta para começar novamente outro ciclo de quebra e ligação.

1.1.3. DNA girase (E.C 5.99.1.3)

A DNA girase é uma enzima exclusiva de procariontes descoberta por GELLERT e colaboradores em 1976 em *Escherichia coli*. É uma enzima da classe de topoisomerases tipo II, ao qual possui a capacidade única de introduzir super-hélices negativas no DNA, usando energia livre liberada pela hidrólise do ATP (REECE & MAXWELL, 1991), tornando-se assim distinta das outras topoisomerases.

Em termos estruturais, a DNA girase é composta por duas subunidades proteicas, GyrA e GyrB (Figura 4), as quais são reunidas em um heterotetrâmero tipo A₂B₂ que é a sua forma ativa (WIGLEY et al., 1995; MAXWELL, 1993).

Figura 4. Representação esquemática da estrutura dos domínios da DNA girase de *Escherichia. coli*.



Fonte: HEDDLE, 2000, modificada.

A subunidade GyrA tem uma massa molecular de 97 kDa, e é constituída por dois fragmentos, sendo um domínio amino-terminal de 64 kDa responsável pela quebra e união das fitas do DNA e por interação com quinolonas e outro, carboxi-terminal, de 33 kDa responsável pela interação da proteína com o DNA. O domínio amino-terminal compreende os resíduos 1 a 571 da proteína, onde está o resíduo de

tirosina 122, envolvido no ataque covalente da subunidade GyrA com a molécula de DNA, atuando na quebra e união da dupla fita (MAXWELL, 1993).

A subunidade GyrB tem massa molecular de 90 kDa, e contém um domínio amino-terminal (43 kDa), o qual inclui o sítio de ligação do ATP, bem como um domínio carboxi-terminal (47 kDa), envolvido na interação com GyrA e o DNA (WIGLEY, et al., 1991; ALI, et al., 1993). O domínio amino-terminal inclui dois subdomínios (uma parte N-terminal de 24 kDa e uma parte C-terminal de 19 kDa). O sítio de ligação do ATP está localizado no primeiro subdomínio (ALI, et al., 1993).

Devido às reações catalisadas e a natureza indispensável de DNA girase para as células bacterianas e a ausência aparente de atividade em eucariotos faz da DNA girase um alvo ideal para a ação de diversos tipos de fármacos. Realmente, um grande número de agentes antibacterianos, girase-específicos têm sido descritos nos últimos anos, muitos deles classificados basicamente em dois grupos, o das quinolonas e o das cumarinas (Figura 5).

O uso de antimicrobianos quinolônicos ou cumarínicos contra infecções bacterianas tem se mostrado muito eficaz, embora nos últimos anos o número de organismos resistentes a estas classes tem emergido, devido a mutações encontradas na DNA girase, como forma de barrar a ação destes antimicrobianos (EVERETT & PIDDOCK, 1998).

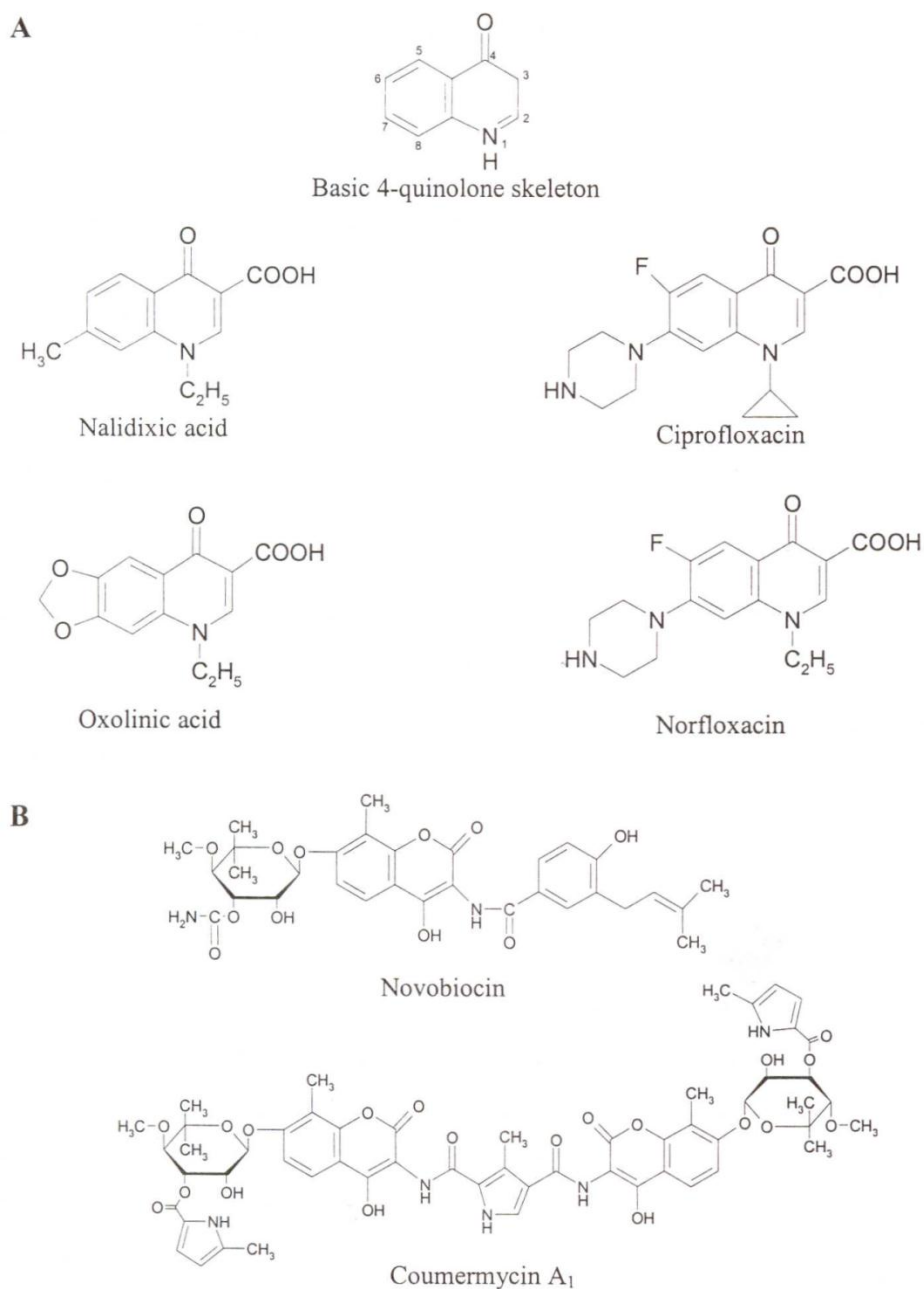
Embora a maioria dos compostos conhecidos cujo alvo seja a DNA girase, pertença à classe das quinolonas e cumarinas, existe um número crescente de inibidores desta enzima que não estão classificados nestes dois grupos, especialmente proteínas de origem bacteriana, tais como as toxinas CcdB e ParE e a proteína YacG de *E. coli*.

1.1.4. Topoisomerase II α humana

Em humanos, topoisomerasas do tipo IIA, expressam dois parálogos ou isoformas, denominadas topoisomerase II α (TOP2A) e topoisomerase II β (TOP2B). Estas enzimas compartilham 68% de identidade entre si, sendo que suas porções catalíticas compartilham até aproximadamente 78% de identidade. Além de

compartilhar certo grau de identidade entre si, elas ainda compartilham semelhança (40% de identidade) em sua sequência primária de aminoácidos com topoisomerase II de *Saccharomyces cerevisiae* (WENDORFF et al., 2012; HIGGINS, 2012).

Figura 5. Estrutura molecular dos antimicrobianos quinolônicos (A) e cumarínicos (B).

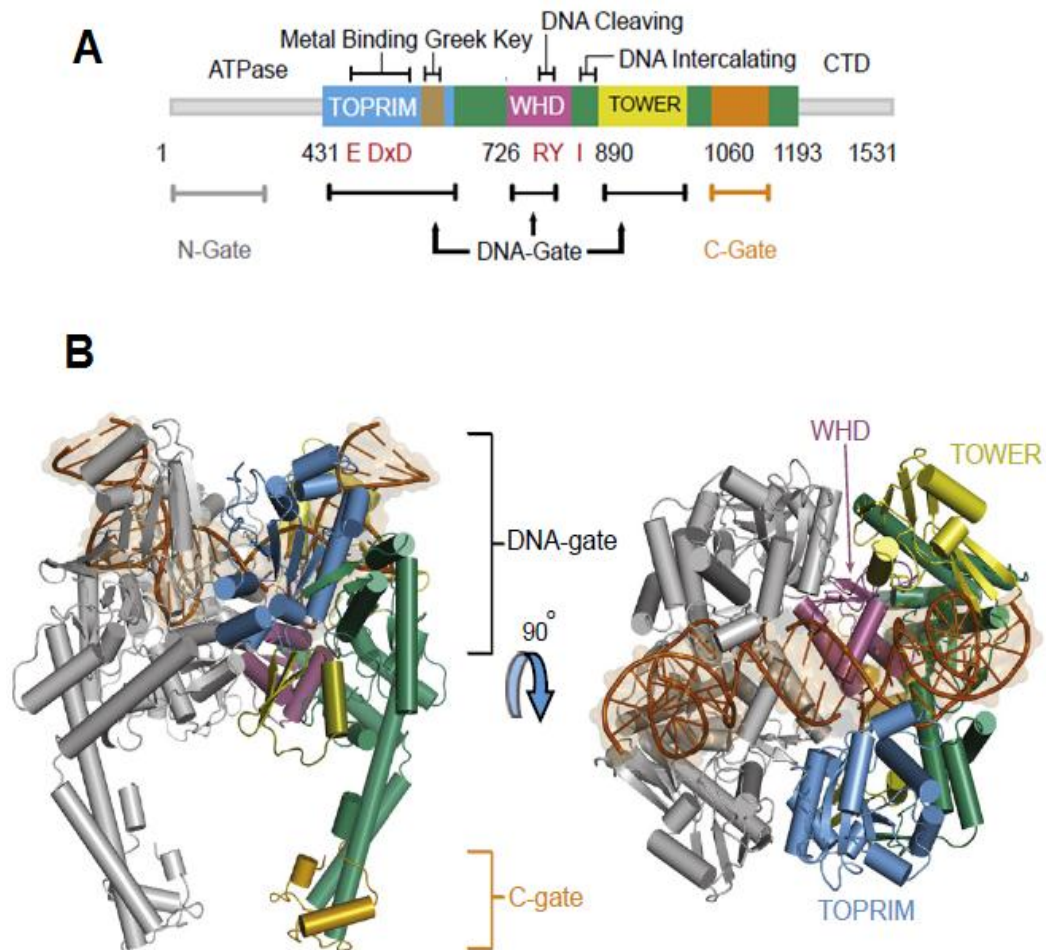


Fonte: HEDDLE et al., 2000.

Estas enzimas são responsáveis por remover o superenovelamento positivo e negativo, emaranhar e desemaranhar e entrelaçar e desentrelaçar o DNA, embora cada uma das isoformas tenha ação em determinado momento do ciclo celular (WENDORFF et al., 2012; HIGGINS, 2012).

TOP2A é composta por dois homodímeros e assim como as demais topoisomerases tipo II, os domínios específicos e as funções que estes desempenham são semelhantes ou iguais (Figura 6).

Figura 6. Estrutura primária de topoisomerase II α humana (A) e estrutura tridimensional ligada ao DNA, resolvida por cristalografia de raio X.



Fonte: WENDORFF, 2012

TOP2A e TOP2B têm diferentes padrões de expressão em ratos, com TOP2A sendo expressa em tecidos em proliferação e TOP2B expressa de forma mais sistemática. A expressão de ambas as isoformas são dependentes do ciclo celular, os níveis destas duas enzimas são altos durante a divisão celular, mas TOP2B predomina em células que não estão no ciclo de replicação e pós mitose celular. Em geral TOP2A tem seu papel central centrado na segregação cromossômica e replicação celular, entretanto TOP2B parece estar primariamente mais envolvida na regulação da transcrição (WENDORFF et al., 2012; HIGGINS, 2012).

Devido a sua importância na proliferação celular, a expressão de TOP2A tem sido usada como marcador de células cancerígenas. Ambas as topoisomerases II humanas tem se tornado alvos altamente efetivos de drogas anticancerígenas como epipodophyllotoxinas, entretanto em alguns pacientes esses agentes também aumentam a probabilidade de doenças malignas relacionadas à terapêutica, tal como leucemia mielóide aguda. Vários estudos sugerem que estes cânceres secundários podem estar ligados à ação indesejada destas drogas em TOP2B, aumentando a possibilidade que os inibidores específicos de TOP2A podem ser úteis para melhorar os resultados terapêuticos (WENDORFF et al., 2012; HIGGINS, 2012).

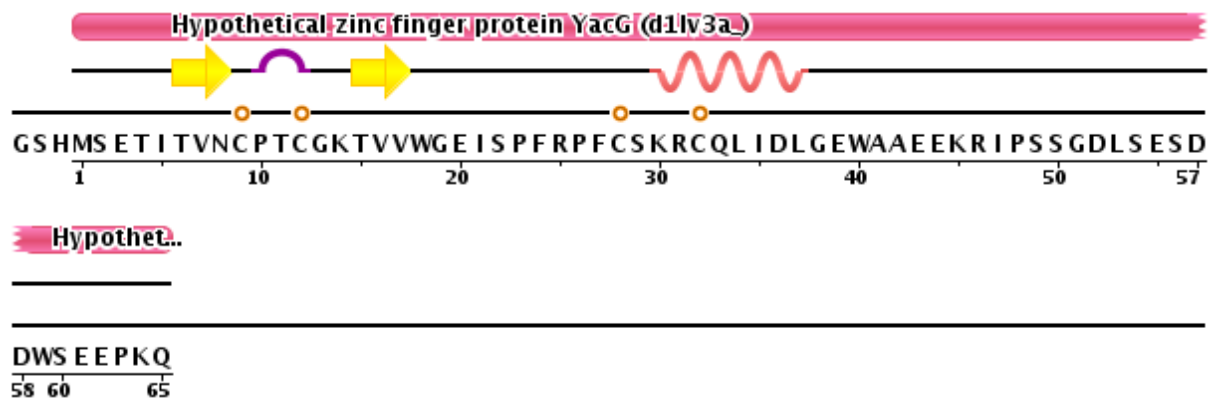
1.2. A proteína YacG

YacG é uma pequena proteína ligada ao zinco, codificada pelo gene *yacG*, em diversas linhagens de bactérias. YacG de *Escherichia coli* é constituída de 65 resíduos de aminoácidos (7,3 kDa), os quais são altamente conservados entre os diferentes gêneros e espécies de bactérias ao qual os homólogos de YacG se encontram presentes (Figura 7).

Estudos estruturais, realizados por Ressonância Magnética Nuclear (RAMELOT et. al., 2002), revelaram que a YacG de *E. coli* consiste de uma α -hélice (resíduos 30 – 37) conectada a duas estruturas β (resíduos 6 – 9 e 14 – 17) por um loop de 12 resíduos de aminoácidos. Coordenado por quatro cisteínas localizadas entre as duas estruturas β , imediatamente antes (Cys-9 e Cys-12) e na parte N-terminal da α -hélice (Cys-28 e Cys-32), encontra-se um íon zinco (Figura 8).

Figura 7. (A) Estrutura primária de YacG de *E. coli*. (B) Alinhamento de YacG de *Escherichia coli* (gi 7466984) com outras sete proteínas bacterianas hipotéticas conservadas. Gi11354705 (*Vibrio cholerae*, group O1 strain N16961), gi1074553 (*Haemophilus influenzae*, strain RD KW20), gi15601954 (*Pasteurella multocida*), gi11348207 (*Pseudomonas aeruginosa*, strain PAO1), gi11353003 (*Neisseria meningitidis*, group B strain MD58), gi11352982 (*Neisseria meningitidis*, group A strain Z2491), gi16126579 (*Caulobacter crescentus* CB15).

A

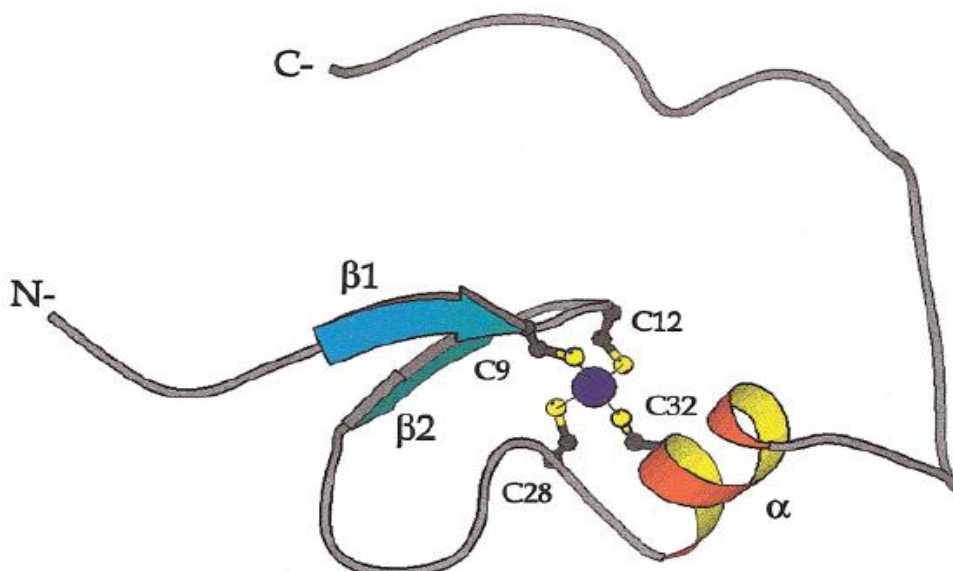


B

	β1	β2	α	
gi 7466984	-----MSETIT-VNCPTCGKTVVWGEISPFRPFCSKRCQLIDLGWAAEEKRIP-SS			50
gi 11354705	-----MTKKLTIVKCPRCGTDVEWGEQSPHRPFCSKQCQMIIDFGWAAEBEKAIP-GA			51
gi 1074553	-----MPDEMIEVPCPICQKSVPINESTFRPFCSKRCQLIDLGWAAEBEKAIPSDT			52
gi 15601954	MRNEKFMTDDIFSVPCPICQKQVEWSDKSPFRPFCSKRCQLIDLGWAAEBEKAIPCES			58
gi 11348207	-----MSQPLT-VECPICGAPVEWKS DNKYRPFCSDRCKLIDLGWAAEBEHAIP---			48
gi 11353003	---MTESRQTRLQVKCPTCQTAVVWKPENAFRPFCSQRCKLIDLGWADGKYTVS--G			53
gi 11352982	---MAESRQTRLQVKCPTCQTAVVWEPENAFRPFCSQRCKLIDLGWADGKYTVS--G			53
gi 16126579	-----MSAKCPICAKEV----DSAFRPFCSKRCADVDLQRWLSGRYVVA--G			41
gi 7466984	GDLSESDDWSEEPKQ---			65
gi 11354705	PDMSDS DGWSE DQY---			65
gi 1074553	ADFAMDPNVSDENSIK--			68
gi 15601954	ADFAMN-DEQEDWRAH--			73
gi 11348207	GDTLEDDIFSA DLPPREH			66
gi 11353003	QTESLPEISEPDMAYR--			69
gi 11352982	QTESLPEISEPDMAYR--			69
gi 16126579	GDDDEENPPSQDINRE--			57

Fonte: (A) Protein Data Bank PDB; (B) Ramelot et al., 2002.

Figura 8. Diagrama de fitas representativo da estrutura de YacG de *E.coli*.



Fonte: Ramelot et al., 2002

Além de ser uma proteína constituída por uma mistura de estruturas secundárias, YacG têm a presença de um domínio estrutural encontrado em membros da família dos denominados *zinc-fingers*, que pode ser evidenciado no caso de YacG, pela presença de quatro resíduos de cisteína coordenando um íon zinco como visto anteriormente. Com base nos dados obtidos a partir da estrutura de YacG, uma pesquisa utilizando o DALI server (programa que compara estruturas de proteínas por alinhamento e distância de matrizes) não revelou qualquer similaridade estrutural entre YacG e outras proteínas. Entretanto, YacG apresenta similaridade com a porção N-terminal da proteína *zinc-finger* GATA-1 (fator de transcrição), além de outras de mesma natureza, caracterizadas pela presença de domínios estruturais que coordenam íons zinco através de seus resíduos de cisteína ou de histidina (RAMELOT et al., 2002).

Esta similaridade estrutural, levou Ramelot e colaboradores a sugerir que YacG poderia estar envolvida como fator de transcrição, através de interação proteína-proteína ou por interação com o DNA. Porém, como os resíduos

importantes para esta função em GATA-1 não são conservados em YacG, tornou-se difícil concluir a respeito de sua função primária.

Posteriormente, Sengupta e Nagajara (2008) descobriram que esta proteína, até então hipotética, fazia parte da rede interactoma da enzima bacteriana DNA girase e, em 2014, Vos e colaboradores sugeriram, através de dados obtidos por análises de Bioinformática das ORFs vizinhas a YacG, que esta proteína regula a atividade de DNA girase em resposta a sinais metabólicos ligado ao crescimento celular e stress. Análises filogenéticas indicaram que YacG está frequentemente associada a produção de coenzima A (CoA) ligando a proteína ao metabolismo e ao stress (VOS et al., 2014).

Diferentes experimentos mostraram que YacG é capaz de inibir todas as três atividades de catalíticas de DNA girase, tal como o superenovelamento negativo (ATP dependente), relaxamento e entrelaçamento e desentrelaçamento de dois DNA circulares (SENGUPTA & NAGAJARA, 2008)

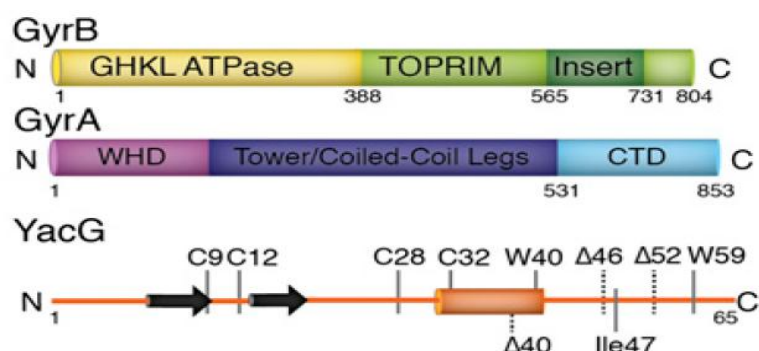
O mecanismo de ação pela qual YacG inibe as atividades catalíticas da DNA girase, foi determinado a partir de estudos de cristalografia de Raio X (VOS et al., 2014), onde a estrutura YacG-GyrBA (GyrBA é uma proteína de fusão GyrB•GyrA que não possui o domínio C-terminal auxiliar de GyrA – CTD, tampouco o domínio de ATPase de GyrB) foi cristalizada e analisada. A partir dos dados obtidos da análise do co-cristal, observou-se que YacG interage com DNA girase por se ligar as suas duas subunidades, GyrA e GyrB.

Em GyrB, YacG associa-se ao domínio TOPRIM (Topoisomerase/ Primase) na porção de face ao encaixe de ligação do DNA, utilizando somente a α -hélice e uma ligação de 10 aminoácidos que conecta esta hélice às duas folhas β deste domínio *zinc-finger*.

Esta associação induz a mudanças conformacionais na estrutura de GyrB, particularmente no interior de um loop no domínio TOPRIM (resíduos de 446-464) que está ligado a resistência a quinolonas (o chamado motivo “QRDR”, correspondente aos resíduos 426-464 em GyrB de *E.coli*). Este loop encontra-se desordenado em quase todas topoisomerases do tipo IIA, na ausência de DNA, mas se torna visível e ordenado, quando DNA está presente. A ordenação do loop

QRDR, provocada pela presença do DNA, encobre a bolsa ocupada pelo resíduo Trp40 de YacG, enquanto ela fica exposta quando o loop está desestruturado (Figura 9).

Figura 9. Estrutura primária de DNA girase e YacG e organização dos domínios. (WHD domínio da hélice alada), (CTD domínio c-terminal), (GHKL girase, Hsp90, DnaK e MutL), (TOPRIM topoisomerase/primase), (C Resíduos de cisteína do domínio *zinc-finger*).

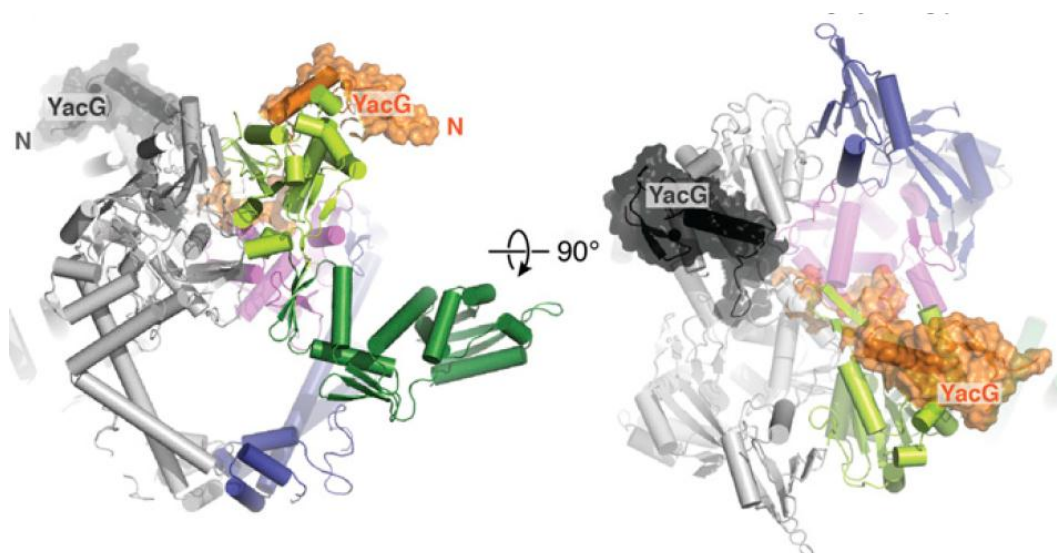


Fonte: VOS et al., 2014

Na estrutura do co-cristal YacG-GyrBA (Figura 10), o loop QRDR está ordenado, mas leva a uma conformação não vista anteriormente, projetando-se sobre o sítio ativo da DNA girase. Sendo assim a ligação de YacG seria estéricamente colidida com o substrato DNA, ou seja a remodelação do loop por YacG leva a obstrução do local de encaixe do DNA. A orientação de YacG na volta TOPRIM de GyrB, leva a ponta da cauda C-terminal de YacG em direção ao centro de clivagem do DNA em GyrA. Embora duas cópias do domínio *zinc finger* de YacG serem vistas associadas com cada dímero de GyrBA, somente a ponta da cauda C-terminal é visível em um dos protômeros de YacG de cada complexo. No caso da cauda mais ordenada, esta região liga-se assimetricamente a GyrA entre o eixo díade, que refere-se aos domínios de hélices alados (WHDs) de dois protômeros de GyrA, um com o outro. A conformação estendida e o deslocamento da cauda ordenada, impede que a cauda do seu dímero de YacG parceiro, ocupe o mesmo lugar. Surpreendentemente, a posição da cauda ordenada de YacG permite ao

resíduo Trp59 da proteína, aportar dentro da bolsa entre o WHDs de GyrA, que foi recentemente mostrado ser um sítio de ligação para uma pequena molécula inibidora de girase recém descoberta, a GSK299423 (BAX et al., 2010) sugerindo que esta droga está explorando o local de regulação natural. E esta cauda c-terminal por si só tem a capacidade de inibir a atividade de DNA girase. Na presença de ATP o domínio *zinc finger* de YacG deve também interferir com a dissociação do domínio ATPase, além de impedir a ligação do DNA.

Figura 10. Estrutura do complexo YacG/GyrBA. Um dos protômeros de DNA girase está colorido em cinza e o outro está colorido conforme indicado anteriormente na Figura 9. YacG está ilustrada com colorações transparentes preta e laranja.



Fonte: VOS et al., 2014

Estes dados relacionados ao modo de interação de YacG com a DNA girase, permite um entendimento mais profundo a respeito desta proteína, possibilitando assim explorar as regiões envolvidas no processo de interação, de modo a desenvolver moléculas e/ou análogos peptídicos utilizando a simplificação estrutural e modificação pontual de resíduos de aminoácidos com a finalidade de melhorar sua atividade ou obter novos inibidores derivados que venham a contribuir para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, mais potentes e menos

susceptíveis a resistência bacteriana, a exemplo do que vem sendo realizado com derivados das toxinas bacterianas CcdB (TROVATTI et al., 2008) e ParE. (BARBOSA et al., 2012).

Além disso, também é possível, explorar a atividade desta proteína, cuja sequência de aminoácidos está descrita na Figura 7A e de seus análogos derivados, descritos em Resultados (Tabela 8), contra outros tipos de topoisomerases, visto que até o momento não existem relatos quanto a atividade de YacG sobre as topoisomerases de eucariotos, a exemplo de Topoisomerase II α humana, enzima alvo de pesquisa e desenvolvimento de fármacos anticancerígenos.

Deste modo YacG torna-se um importante ponto de partida para o desenvolvimento de biofármacos que atuem com agentes antibacterianos e anticancerígenos, por atuarem em enzimas do tipo topoisomerases que pela sua importante função no metabolismo do DNA e indispensáveis para a viabilidade celular tornam-se alvos potenciais de diversos fármacos.

1.3. Síntese química de peptídeos

A síntese química de peptídeos poderia ser explicada, de maneira bastante simplificada, como a formação química e repetida de ligações amida com a finalidade de conectar funções amina e carboxílica de L- α -aminoácidos adjacentes. Mais precisamente é assim denominada porque utiliza um reagente químico para ativar o grupo carboxílico de um N^{α} -acil-aminoácido ou de um N^{α} -acil-fragmento peptídico (RCOOH, componente carboxílico, doador de acila ou agente acilante). Este componente ativado sofre o ataque nucleofílico do grupo α -amino de outro aminoácido ou fragmento peptídico C^{α} -bloqueados (H_2N-R_1 , componente amínico, receptor de acila ou agente nucleofílico) resultando na formação da ligação peptídica entre eles (RCONHR₁). Neste caso, os grupos funcionais reativos que não estão diretamente envolvidos na formação da ligação peptídica devem estar previamente protegidos ou bloqueados. Assim, a síntese torna-se mais controlada em relação à possível formação de subprodutos, (MACHADO et al., 2004).

Os métodos de síntese química de peptídeos se dividem em duas categorias: linear e convergente. A síntese linear se baseia no crescimento sequencial, aminoácido após aminoácido, da cadeia peptídica. Este crescimento se realiza, ao contrário do que ocorre nos ribossomos, desde a extremidade C-terminal para N-terminal, para evitar a perda de quiralidade do resíduo associado ao grupo carboxílico que se acopla. Na estratégia convergente, as unidades que participam não são aminoácidos protegidos, mas peptídeos igualmente protegidos (ALBERICIO et al., 1997) A etapa final de eliminação dos grupos protetores é comum a ambas estratégias.

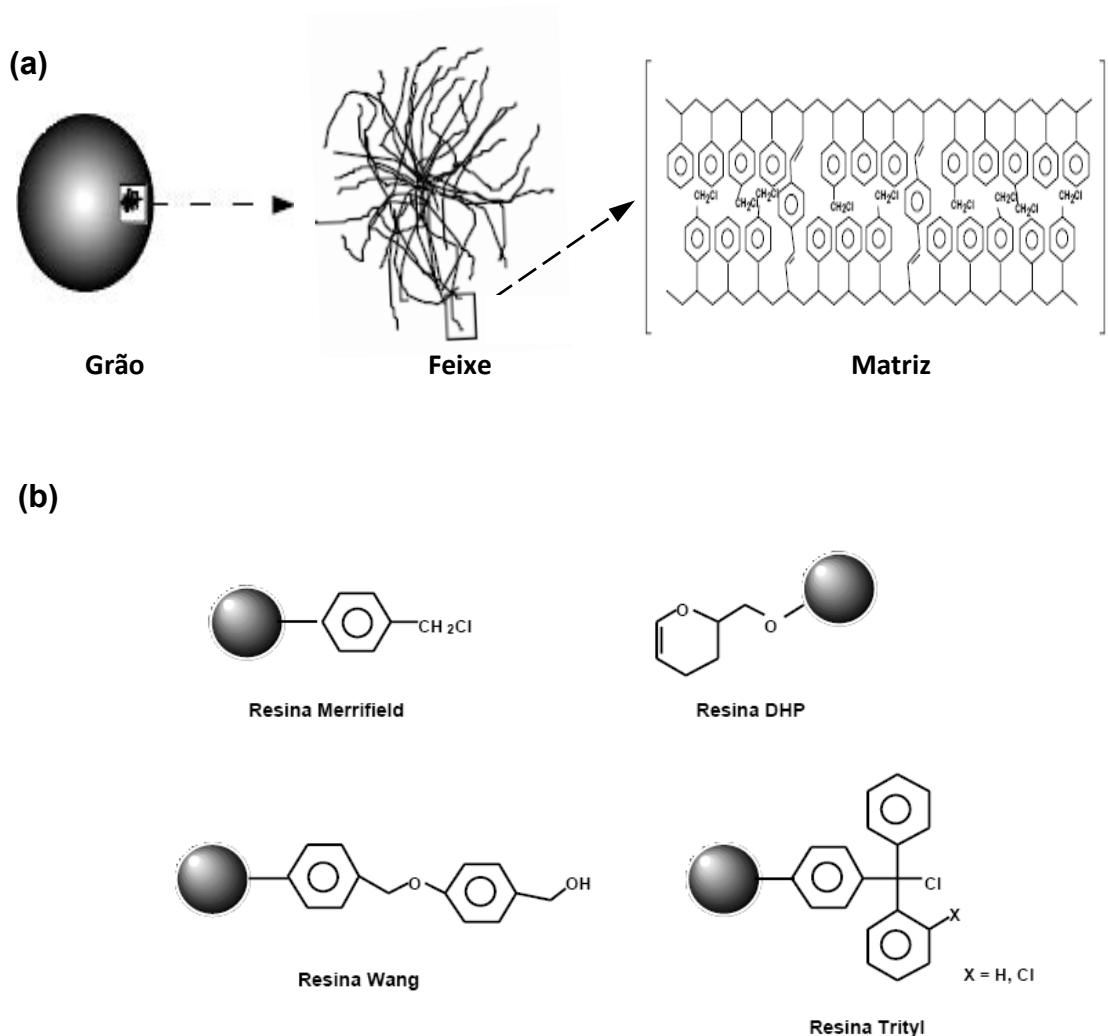
Nas duas categorias, a síntese pode ocorrer tanto em solução (síntese clássica) como na presença de um suporte polimérico (síntese de peptídeos em fase sólida - SPFS).

Classicamente e desde os trabalhos pioneiros de Fischer (FISCHER & FOURNEAU, 1901) e CURTIUS (1902), todo processo associado à síntese de um peptídeo ocorria em solução. Há mais de quatro décadas, uma inovadora metodologia para a síntese de peptídeos foi apresentada à comunidade científica por Bruce Merrifield. Tal metodologia veio revolucionar a síntese orgânica por suas características peculiares, uma vez que abandonou a tradicional rotina, própria da síntese em solução, e introduziu o uso de polímeros insolúveis como suporte. Este método, denominado síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS), que em princípio foi aplicado exclusivamente à estratégia seqüencial, tem como base o fato do grupo carboxílico C-terminal se encontrar unido covalentemente ao polímero e, portanto, o componente que contém esta extremidade é insolúvel nos solventes utilizados no processo de síntese (MERRIFIELD, 1963). Assim, o excesso de reagentes e uma grande maioria dos produtos secundários podem ser eliminados por simples filtração e lavagens do polímero que contém o peptídeo em crescimento. Este fato influencia favoravelmente para que se possam utilizar grandes excessos de reagentes, conseguindo em muitas etapas, rendimentos elevados. As vantagens adicionais são que se minimizam as perdas por manipulação e que todo processo sintético pode ser automatizado.

Genericamente, pode-se descrever um suporte sólido como sendo uma estrutura complexa, a qual é formada por polímeros retilíneos compostos por

unidades monoméricas constantes, formando uma espécie de rede. Os feixes desta são interligados transversalmente através de um monômero bi-funcional (ligações cruzadas, *cross-linking*) formando, na maioria delas, uma esfera (*grão*), de tamanho padronizado (Figura 11a). Em intervalos mais ou menos regulares surgem estruturas químicas diferenciadas (ligantes, *linkers*), constituídas por moléculas contendo diferentes grupos funcionais (Figura 11b).

Figura 11. Visualização progressiva de uma resina, a partir de uma unidade macroscópica e as cadeias poliméricas que a compõem até a fórmula molecular de um determinado polímero (a) e principais resinas PS/DVB disponíveis comercialmente, mostrando os diversos *linkers* (b).



Fonte: MARCHETTO, 2006.

Os suportes que conduzem aos melhores resultados para a síntese de peptídeos estão muito longe de serem estáticos e as reações químicas em fase sólida não ocorrem exclusivamente na superfície do suporte. Pelo contrário, as reações ocorrem preferencialmente naqueles filamentos do polímero que são móveis, se encontram bem solvatados e são acessíveis aos reagentes químicos (MARCHETTO et al.,1992). Os suportes que reúnem estas características permitem que as reações químicas ocorram com velocidades muito próximas, embora não iguais, às que ocorrem em solução.

Desde os trabalhos iniciais de Merrifield, o suporte mais utilizado é um polímero microporoso de estireno (PS), que contém 1% de *p*-divinilbenzeno (DVB) como *cross-linker* (Figura 11a). Enquanto os grãos de poliestireno secos apresentam um diâmetro de aproximadamente 50 µm, na presença dos solventes ou sistemas de solventes mais comuns utilizados na síntese de peptídeos, costumam aumentar de 2 a 6 vezes o seu volume inicial (MARCHETTO et al., 1992). Desta forma é possível conseguir que todos os ligantes, que estão no interior da rede polimérica fiquem expostos e, portanto acessíveis aos diferentes solventes e reagentes utilizados na síntese.

A metodologia da fase sólida em sua estratégia seqüencial é atualmente a mais utilizada para a síntese de peptídeos que contém até 60 resíduos de aminoácidos. Para a síntese de seqüências maiores, costuma-se empregar a estratégia convergente. Nesta estratégia, o que se faz é a união de dois fragmentos de peptídeos de tamanhos variados, seja totalmente em fase sólida ou em solução, ou mediante uma combinação de ambas: síntese dos peptídeos protegidos em fase sólida, e posterior acoplamento dos mesmos em solução.

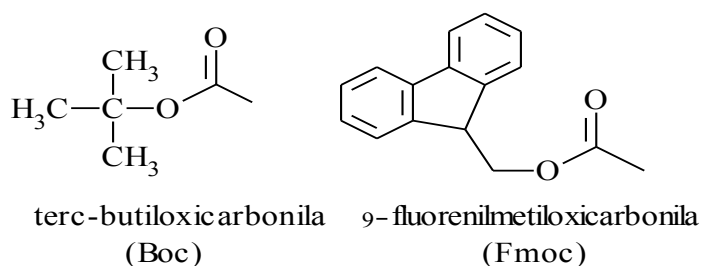
Como já citado, a formação controlada de qualquer ligação peptídica requer que todos os grupos funcionais presentes nas moléculas, exceto os dois que vão participar da formação da ligação, estejam protegidos. Uma vez formada a ligação e antes da incorporação do seguinte aminoácido ou peptídeo, deve-se eliminar o protetor do grupo funcional que irá permitir o crescimento da cadeia peptídica. Por último e ao final do processo sintético, os protetores de todos os grupos funcionais devem ser eliminados. Assim, pode-se concluir que o esquema de proteção é crucial para concluir com êxito a síntese de um peptídeo.

Para o processo de síntese sequencial existem dois tipos diferentes de protetores. Por um lado, está aquele tipo que mascara o grupo funcional que irá participar da nova ligação peptídica e, portanto, deve ser eliminado a cada ciclo sintético, denominado “protetor temporário”. Como normalmente a síntese é executada na direção C → N, este tipo de protetor é aquele que normalmente protege a função amina. Por outro, estão os “protetores permanentes”, que são os que devem permanecer estáveis durante todo processo sintético e que são eliminados no final do mesmo. São os protetores das cadeias laterais reativas dos aminoácidos trifuncionais.

A natureza química do grupo protetor da função α -amina marca, de certa forma a estratégia de síntese, uma vez que os protetores permanentes devem ser estáveis às condições utilizadas para eliminar repetidas vezes o protetor temporário. Por sua vez, os protetores permanentes devem ser eliminados eficazmente na última etapa.

As duas principais estratégias da síntese de peptídeos em fase sólida são a Boc/Bzl e Fmoc/tBu, que se baseiam na proteção temporária do grupamento α -amínico dos aminoácidos com um dos dois protetores *tert*-Butiloxicarbonila (ANDERSON & MCGREGOR, 1957) e 9-Fluorenil-metiloxicarbonila (CARPINO & HAN, 1972), respectivamente, os quais se diferenciam, principalmente, quanto à labilidade ácido-base (Figura 12).

Figura 12. Protetores usuais para função α -amina na metodologia da fase sólida



Fonte: MARCHETTO, 2006.

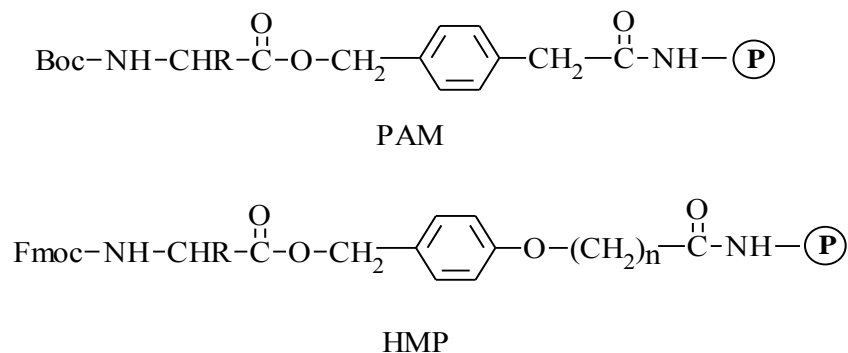
O grupamento protetor *t*-Boc é eliminado mediante acidólise com ácidos de força moderada (TFA 30% em DCM), o que implica na utilização de protetores permanentes estáveis nestas condições. Protetores tipo benzila (Bzl) são bastante utilizados para esta função, os quais requerem para sua eliminação, o emprego de ácidos fortes como o ácido fluorídrico. Neste caso, em seguida ao tratamento ácido, deve-se realizar uma neutralização (normalmente com DIEA 5% em DCM) para que a função amina fique em sua forma desprotonada. O grupamento Fmoc é eliminado com bases de força moderada (geralmente piperidina 20% em DMF), permitindo a utilização de protetores baseados no grupo *terc*-butila (tBu), lábeis ao ácido trifluoroacético.

Os aminoácidos trifuncionais necessitam de proteção para suas cadeias laterais por serem também reativas, enquanto para os demais, a decisão de tê-las protegidas depende da estratégia a ser empregada e do tamanho do peptídeo a ser sintetizado.

Na metodologia da fase sólida, o protetor α -carboxílico resulta da união da cadeia peptídica ao suporte polimérico. Para o caso de peptídeos-ácidos, esta união é feita mediante uma ligação éster, enquanto que para peptídeos-amida a união é feita através de uma ligação amida. Um aspecto importante nesta metodologia é como promover esta primeira união, sobretudo para o caso de peptídeos-ácidos, uma vez que a formação de um éster costuma ser mais problemática que a de uma amida. A maneira ótima de realizar esta união é empregando um espaçador (*handle*), que é definido como um composto bifuncional que serve para unir uma cadeia peptídica em crescimento ao suporte polimérico. No caso de síntese de peptídeos-ácidos, o *handle* deve carregar incorporado, o primeiro aminoácido da seqüência, devidamente protegido.

Sem dúvida nenhuma, os protetores permanentes mais comuns para este tipo de peptídeos são os do tipo benzila: *p*-alquilbenzila (na PAM) (MITCHELL et al., 1976) para a estratégia Boc/Bzl e *p*-alcoxibenizila (no HMP) (ALBERICIO & BARANY, 1985) para a estratégia Fmoc/*t*Bu. Ambos levam incorporado o primeiro aminoácido protegido (Figura 13).

Figura 13. *Handles* empregados na síntese de peptídeos-ácido em fase sólida



Fonte: Elaborado pelo Autor

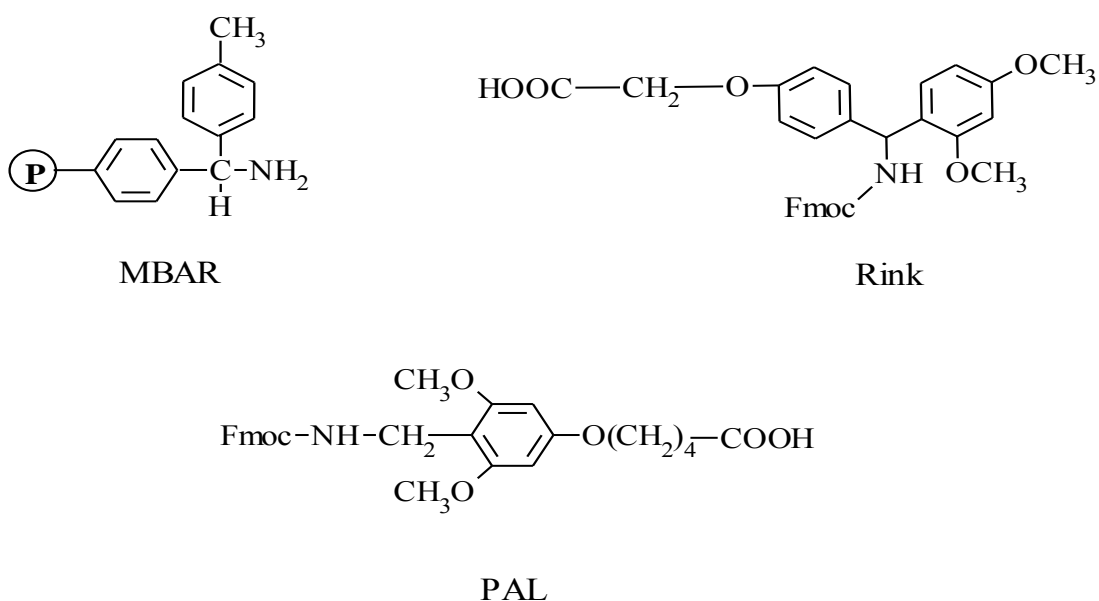
Nestes denominados *handles*, a formação da ligação éster ocorre normalmente através de uma substituição nucleofílica por parte do carboxilato do aminoácido sobre o correspondente bromobenzil derivado. Quando o aminoácido C-terminal é Cys ou His este método não funciona e recorre-se a uma esterificação com o correspondente álcool em condições muito suaves, geralmente com pyOAP (KATES et al., 1996) para evitar a racemização destes dois aminoácidos.

As amidas são mais estáveis que os ésteres frente à acidólise, portanto as posições benzílicas devem estar estabilizadas por outros anéis aromáticos e/ou grupos doadores de elétrons. Assim, para a estratégia Boc/Bzl utiliza-se a resina benzidrilamina (BAR) ou *p*-metilbenzidrilamina (MBAR) (PIETTA & MARSHALL, 1970). Na estratégia Fmoc/*t*-Bu emprega-se principalmente, os *handles* ácido 4-(2'-4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacético (Rink) e o ácido 5-(4-Fmoc-aminometil-3,5-dimetoxi)-fenoxivalérico (PAL) (ALBERICIO et al., 1990), ligados geralmente a uma MBAR (Figura 14).

Durante uma síntese, para que ocorra a formação da ligação peptídica entre os aminoácidos adjacentes, é necessário que o componente eletrófilo (C- carbonílico do ácido) esteja ativado. Esta ativação do ácido carboxílico, que é a base da formação da ligação peptídica, tem sido uma das etapas da síntese de peptídeos que mais evoluiu nos últimos anos, justamente pelo interesse em obter bons

rendimentos na formação da ligação peptídica, mantendo a integridade da cadeia em crescimento, em particular do centro estereogênico em α do grupo carboxílico ativado. Desta forma, ele pode sofrer ataque pelo grupo amina do aminoácido que permanece ligado à resina e, assim, formar a ligação amida.

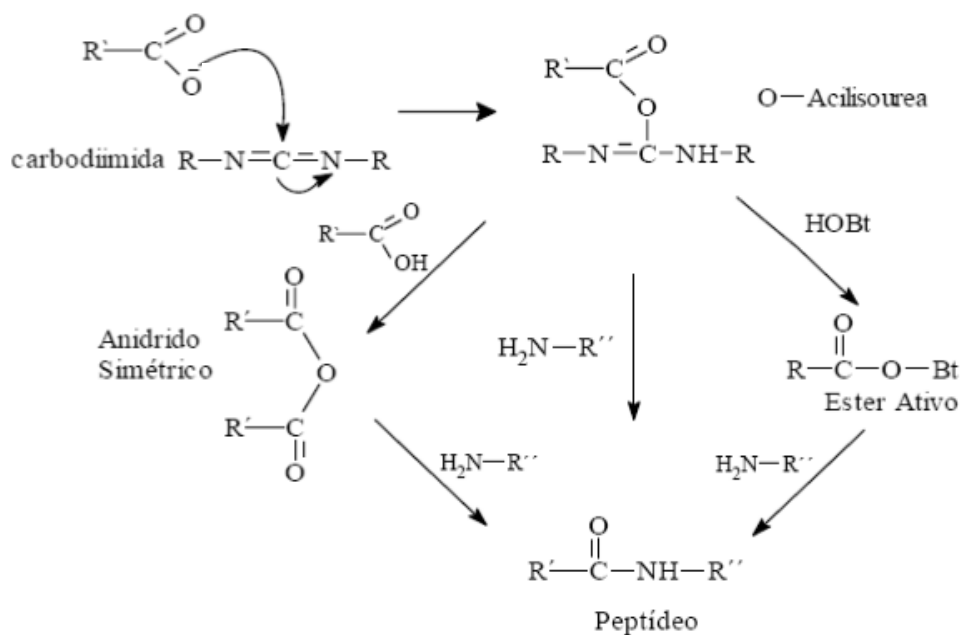
Figura 14. Protetores permanentes do grupo α -carboxílico de peptídeos-amida



Fonte: Elaborado pelo Autor

Os chamados reagentes de acoplamento ou de condensação têm a função de reagir com o grupo carboxílico livre de um aminoácido e gerar espécies reativas. As carbodiimidas são os reagentes de acoplamento mais utilizados, seja em fase sólida ou em solução (SHEEHAN & HESS, 1955). O mecanismo envolve a formação da O-acilisourea, que sofre aminólise por parte da amina, para produzir a ligação amida. Se for empregado um segundo equivalente de ácido carboxílico, será formado o anidrido simétrico. Do mesmo modo, na presença de hidroxilaminas (p.ex. Hidroxibenzotriazol – HOBt ou 7-aza-1-hidroxibenzotriazol - HOAt), será obtido um éster ativo. Qualquer uma das três espécies reativas, O-acilisourea, anidrido simétrico ou éster ativo, são bons agentes acilantes (Figura 15).

Figura 15. Mecanismo de formação de ligação peptídica por carbodiimidas.



Fonte: STEWART & YOUNG, 1984 – modificado

Sais de acilfosfônio também têm sido amplamente utilizados como reagentes de acoplamento (CASTRO et al., 1975; COSTE et al., 1990; COSTE & CAMPAGNE, 1995). Os primeiros destes reagentes descritos [hexafluorofosfatos de (benzotriazol-1-il-oxi)-tris(dimetilamino)-fosfônio (BOP) e de (benzotriazol-1-il-oxi)-tris(pirrolidino)fosfônio (pyBOP)] levam incorporados na molécula, um equivalente de benzotriazol, portanto a espécie acilante final é o éster de benzotriazol.

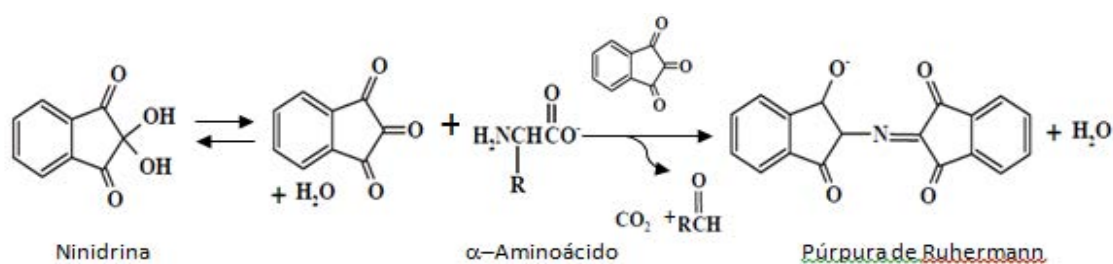
Os derivados de HOAt destes sais de fosfônio (AOP e pyOAP) também foram preparados e são melhores agentes acilantes que BOP e pyBOP (CARPINO, 1993; CARPINO et al., 1994). Dentre eles, os derivados de pirrolidina (PyBOP e pyOAP) são os mais recomendados pois são mais reativos e não formam produtos secundários tóxicos, como a hexametilfosforotriamida, formada quando se utiliza BOP ou AOP.

Outros agentes de condensação, análogos aos sais de fosfônio, contendo um átomo de carbono em substituição ao átomo de fósforo, foram desenvolvidos por DOURTOGLOU e colaboradores (1978). A estrutura proposta, baseada nos

análogos de fosfônio, foi a de um sal de urônio [Hexafluorofosfatos de N-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (HBTU) e do O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (HATU)]. Também foi preparado o correspondente tetrafluorborato destes derivados de urônio (TBTU e TATU). Dentre estes últimos reagentes, o HATU tem demonstrado ser o mais eficiente em termos de rendimento e o que provoca menos racemização (CARPINO et al., 1995). HATU assim como o pyOAP é muito indicado para a síntese em fase sólida, de bibliotecas peptídicas mediante o método baseado na utilização de uma mistura de aminoácidos (KATES et al., 1996).

O processo de acoplamento dos aminoácidos é monitorado através de um teste qualitativo, o qual detecta grupos amins livres. Nesse teste (KAISER et al., 1970), a ninidrina reage com amins primarias levando a formação de um produto de coloração violeta (Figura 16). Desta forma, após acoplamento de aminoácidos à cadeia polipeptídica, o teste deve apresentar coloração amarela, indicando a ausência de amins primárias livres, uma vez que o grupamento amina do aminoácido que está sendo acoplado apresenta-se protegido. Por outro lado, após a desproteção do grupamento amina, o teste deve apresentar coloração violeta.

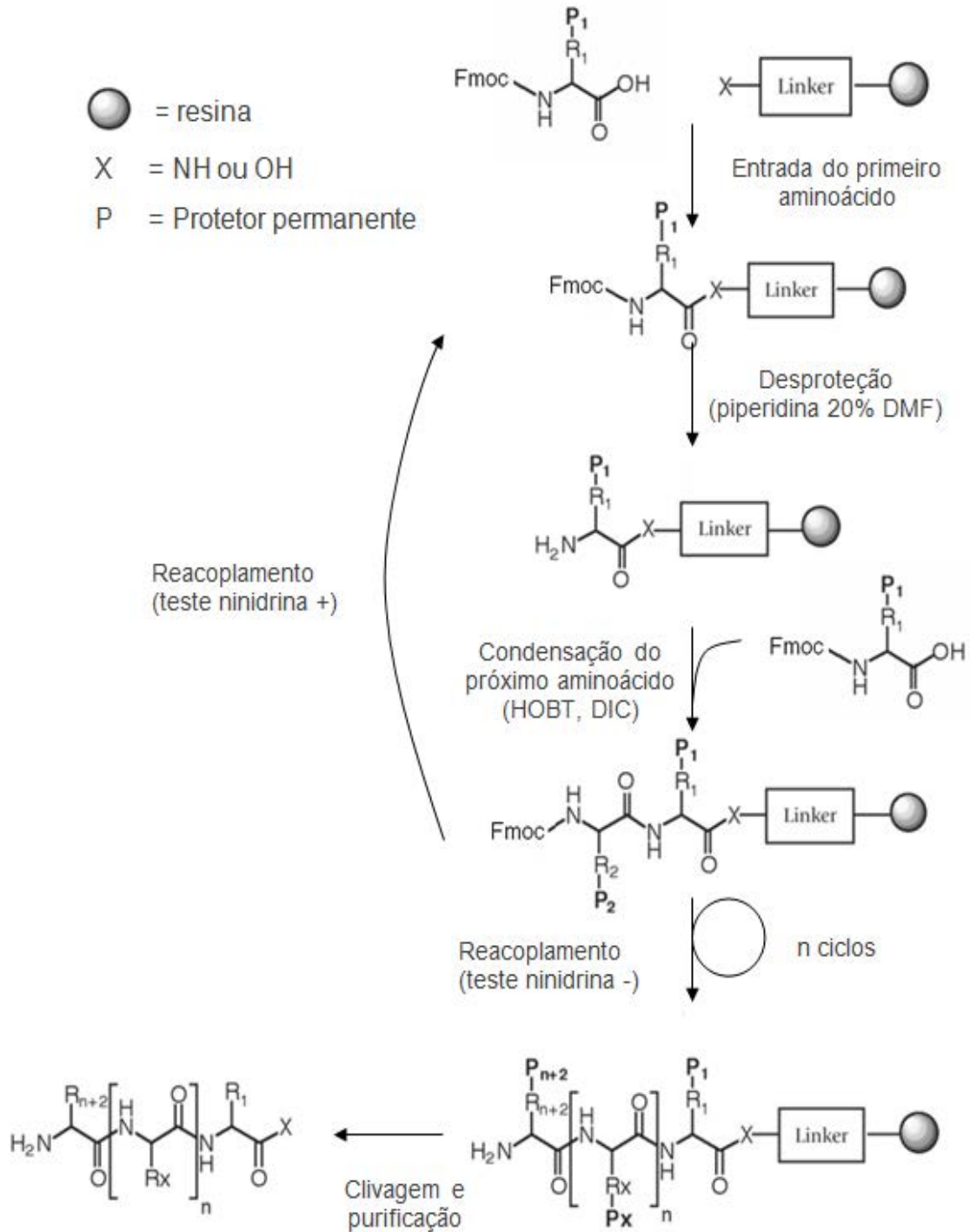
Figura 16. Esquema da reação envolvida durante o teste de ninidrina



Fonte: CAIRES, 2014

Um esquema geral da síntese de peptídeos em fase sólida utilizando a estratégia Fmoc, está representado na Figura 17.

Figura 17. Esquema ilustrativo da SPFS, utilizando a estratégia Fmoc.



Fonte: AMBLARD, 2005

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi obter a proteína YacG a partir da bactéria gram-negativa *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 e peptídeos derivados a fim de se avaliar e comparar sua atividade frente a inibição da DNA girase e topoisomerase II α humana.

Desta maneira pretendeu-se:

1. Obter a proteína YacG de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 por expressão heteróloga;
2. Projetar análogos peptídicos de YacG e sintetizá-los pelo método de fase sólida, a fim de estudar as diferentes regiões da proteína, bem como substituir os resíduos de cisteína por serina, histidina e alanina, e avaliar o papel desempenhado por estes novos análogos no processo de inibição e interação com as diferentes DNA topoisomerasas;
3. Comparar a atividade da proteína nativa com os análogos sintetizados;
4. Desenvolver estudos de relação estrutura-função dos análogos, bem como da proteína nativa;
5. Estudar a capacidade de inibição de crescimento microbiano (células procarióticas);
6. Propor uma nova classe de inibidores de DNA girase a partir de YacG.

3. MATERIAIS

3.1. Reagentes, solventes e linhagens celulares utilizadas na clonagem e expressão.

Micro-organismos

- Células de *E.coli* DH5alpha ultracompetente (Invitrogen);
- Células de *E.coli* BL21 Rosetta (DE3) (Invitrogen);
- *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* ATCC 10031, adquirida da coleção do Laboratório de microrganismos de referência da FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – Rio de Janeiro, Brasil.

Enzimas

- Proteinase K 20mg/mL (QIAGEN);
- Enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI (New England Biolabs);
- T4 DNA ligase (Sigma D2886);
- Pfx DNA polimerase (Invitrogen);
- Fosfatase alcalina (Sigma).

Plasmídeo, demais reagentes e materiais

- 1,4 Dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich®);
- Canamicina (Sigma-Aldrich®);
- Clorofórmio(Synth);
- Dodecil sulfato de sódio SDS 10% (Sigma-Aldrich®);
- DNTPs (Invitrogen);
- Etanol absoluto;
- Etanol 70%;
- EDTA 125 mol.L⁻¹ (Sigma-Aldrich®);

- Fenol (Sigma-Aldrich®);
- Formamida Hi-Di®
- Glicerol;
- Glicina;
- HEPES (Sigma-Aldrich®);
- IPTG 0,1mmol.L⁻¹ (Sigma-Aldrich®);
- Imidazol (Sigma-Aldrich®);
- Kit Big Dye Terminator (Life technologies);
- Kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN);
- Membrana de diálise SpectraPor Membrane MWCO 6-8 kDa;
- Metanol;
- NaCl;
- Oligonucleotídeos Foward e Reverse;
- Soroalbumina bovina (New England Biolabs);
- Tris (Sigma-Aldrich®);
- Tween-20;
- Vetor pET28a (Novagen);

3.2. Reagentes e solventes, utilizados na síntese, purificação e caracterização dos análogos e fragmentos peptídicos.

- Resina (suporte polimérico): Fmoc-L-Gly Wang Resin, com grau de substituição inicial de 0,55 mmol/g da marca Novabiochem®.
- Resina (suporte polimérico): Fmoc-L-Gln(trt) Wang Resin, com grau de substituição inicial de 0,59 mmol/g da marca Novabiochem®.
- Aminoácidos protegidos: todos os L- α -aminoácidos utilizados neste trabalho apresentavam a extremidade amino-terminal protegida com o grupo base-lábil Fmoc e grupos t-butílicos ou derivados para a proteção das cadeias laterais dos aminoácidos trifuncionais. Esses aminoácidos foram adquiridos da Novabiochem® ou da Advanced Chem Tech®.

- Os agentes de condensação utilizados na síntese dos diferentes análogos, 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) e N,N'-Diisopropilcarbodiimida (DIC), foram adquiridos da Novabiochem® e Fluka®, respectivamente.
- Como reagente de desproteção do grupo Fmoc, foi utilizada uma solução 20% (v/v) de piperidina, da marca Merck®, em DMF.
- O reagente utilizado para a clivagem ácida final foi o ácido trifluoracético (TFA), adquirido da Fluka®.
- Etanoditiol (EDT) e triisopropilsilano (TIS), substâncias responsáveis pela captura de espécies responsáveis por alquilação eletrofílica e liberadas no meio reacional durante o processo de clivagem ácida, foram adquiridos ou da Sigma® e ou da Acros®.
- Os eluentes cromatográficos utilizados foram acetonitrila (ACN) da marca Tedia® ou J.T.Baker® e água ultrapura, obtida através de um sistema de filtração Barnstead, equipado com cartuchos para retenção de sais e de compostos orgânicos.
- Demais reagentes e solventes como ácido acético glacial, anidrido acético, diclorometano (DCM), diisopropiletilamina (DIEA), dimetilformamida (DMF), hexafluoroisopropanol e N-metilpirrolidona (NMP), foram adquiridos da Merck®, Aldrich®, Mallinckrodt®, Baker® e Fluka®.
- Tris(hydroximetil)aminometano adquirido da SERVA Electrophoresis GmbH
- Ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) adquirido da Aldrich Chemistry;
- N-acetil-L-cisteína, adquirida da Sigma;
- 1,4 Dithiothreitol (DTT): Amersham Biosciences;
- FITC adquirida da Sigma-Aldrich®.

3.3. Reagentes e solventes, utilizados nos ensaios de inibição enzimática.

As enzimas DNA girase, Topoisomerase II humana, e as proteínas GyrA e GyrB, produzidas heterologamente em bactérias, foram adquiridas comercialmente da *Inspirallis Ltda* (<http://www.inspirallis.com>) e fornecidas com os seguintes tampões:

DNA girase:

Tampão de diluição: Tris.HCl 50 mmol.L⁻¹; KCl 100 mmol.L⁻¹; Ditioneitol 2 mmol.L⁻¹; EDTA 1 mmol.L⁻¹; glicerol 50% (m/v); pH = 7,5

Tampão de ensaio (concentrado 5x): Tris.HCl 35 mmol.L⁻¹; KCl 24 mmol.L⁻¹; MgCl₂ 4 mmol.L⁻¹; Ditioneitol, 2 mmol.L⁻¹; Espermidina 1,8 mmol.L⁻¹; ATP 1 mmol.L⁻¹; glicerol 6,5% (m/v); Albumina 0,1 µg /mL; pH = 7,5.

Topoisomerase II humana

Tampão de diluição: Tris.HCl 50 mmol.L⁻¹; KCl 100 mmol.L⁻¹; Ditioneitol 1 mmol.L⁻¹; EDTA 0,5 mmol.L⁻¹; glicerol 50% (m/v); Albumina 50 µg/mL pH = 7,5

Tampão de ensaio (concentrado 5x): Tris.HCl 50 mmol.L⁻¹; NaCl 125 mmol.L⁻¹; MgCl₂, 10 mmol.L⁻¹; Ditioneitol, 5 mmol.L⁻¹; Albumina 100 µg /mL; pH = 7,5.

4. MÉTODOS

4.1. Clonagem do gene *yacG* de *Klebsiella pneumoniae* e expressão heteróloga da proteína YacG

A manutenção e cultivo das células de *Escherichia coli*, a composição dos meios de cultura e as técnicas básicas utilizadas neste trabalho seguiram os procedimentos padrões descritos por YEE et al., 2001.

4.1.1. Extração do DNA genômico de *Klebsiella pneumoniae*

Para a extração do DNA genômico, as células de *Klebsiella pneumoniae* foram inoculadas em meio LB em um volume de 3 mL, overnight, à temperatura de 30°C, para proliferação celular.

Após o período de proliferação, foram retirados 2 mL do meio de crescimento, centrifugando-o a 16.000xg por 1 minuto a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o pellet celular (precipitado de células) resultante foi ressuspenso em 500 µL de tampão TAS (500 µL Tris-HCl 1 mol.L⁻¹ pH 8,0; 1,0 mL EDTA 0,5

mol.L⁻¹; 1,5 mL NaCl 1 mol.L⁻¹; 7 mL água), seguido de nova centrifugação nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi então descartado e ao centrifugado adicionados 4 µL de proteinase K (20 mg/mL) e 50 µL de SDS 10% (solução final = 1% SDS e 150 µg de proteinase K), seguido de incubação por 1 hora a 50°C. Para obtenção do DNA livre das proteínas do meio, empregou-se o método fenol/clorofórmio, adicionando à amostra, 500 µL v/v de desta solução, seguido de centrifugação a 12.000xg por 3 minutos. O material obtido foi submetido à diálise em tampão TE, overnight sob agitação, em membranas de diálise SpectraPor Membrane MWCO 6-8 kDa.

4.1.2. Amplificação por PCR e clonagem do cDNA

O gene *yacG* foi amplificado pela técnica de PCR (Reação em cadeia da polimerase) empregando o DNA genômico de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 como molde e os oligonucleotídeos iniciadores previamente desenhados (Tabela 1) com base no mesmo gene em questão.

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do gene *yacG*.

Gene	Oligonucleotídeos (5' → 3')	Tamanho do inserto
<i>yacG</i>	Forward CGGGATCCATGTCAGAAGAGACTATCG	~200 pb
	Reverse GGAATTCAGGGTTGCTGCTCGCTC	

*Sítio de restrição de *Bam*HI *Sítio de restrição de *Eco*RI

A reação foi seguida em um termociclador Mastercycler gradiente (Eppendorf), seguindo o protocolo de amplificação descrito na Tabela 2 e nas condições descritas na Tabela 3.

Tabela 2. Protocolo de amplificação do gene *yacG*.

Reagentes	Quantidade
Tampão de Pfx (10X)	1 X
Pfx DNA polimerase	5 U
dNTP's (100 mmol.L ⁻¹)	200 µmol.L ⁻¹
Oligonucleotídeo Foward	1 µmol.L ⁻¹
Oligonucleotídeo Reverse	1 µmol.L ⁻¹
DNA gênomico	20 ng

Tabela 3: Ciclos e condições da PCR para amplificação do gene *yacG*.

Ciclos	Temperatura	Tempo
1	96°C	2'
30	96°C	30''
	55°C	30''
	68°C	2'
	68°C	5'

4.1.3. Clonagem do gene *yacG* em em vetor de expressão

O produto resultante da amplificação, bem como o vetor de clonagem foi submetido à digestão com enzimas de restrição (Tabela 4), seguindo as condições recomendadas pelo fabricante.

Tabela 4. Vetor de clonagem e enzimas de restrição utilizadas.

Gene	Sítios de clonagem	Vetor de clonagem	Marcador de seleção
<i>yacG</i>	<i>Bam</i> HI / <i>Eco</i> RI	pET28a	Canamicina

Os produtos obtidos das digestões do material amplificado e vetor de clonagem, foram submetidos à purificação por eletroforese em gel de agarose 0,8% e purificados utilizando o Kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN). Após a purificação, foi preparada a reação de ligação em um volume de 10 µL em tampão apropriado, com um excesso de 10 vezes de inserto em relação ao vetor juntamente com 2 U de T4 DNA ligase e incubados a 16°C por 16 horas, segundo o protocolo descrito na Tabela 5.

Tabela 5. Protocolo de ligação inserto/vetor.

Reagentes	Ligação	Controle negativo
Inserto	13 µL	6,5 µL
Vetor	4 µL	2 µL
Tampão enzima	1X	1X
T4 DNA ligase 10X	2 U	1 U

4.1.4. Transformação em células de *E. coli*.

A transformação de células de *E. coli* DH5alpha ultracompetente foi realizada através da adição de 50-250 ng de DNA plasmidial ou 10 µL do produto da reação de ligação em um tubo de micro centrífuga contendo 100 µL de células competentes recém descongeladas. Os tubos foram mantidos em banho de gelo por 30 minutos e, então, em banho-maria a 42°C por 2 minutos. A seguir, 1 mL de meio LB líquido

foi adicionado ao tubo e incubado por 1 hora a 37°C. As células foram coletadas e ressuspensas em 200 µL de meio LB e plaqueadas em meio LB sólido contendo o antibiótico requerido para seleção de transformantes. As placas foram incubadas a 37°C por 12 a 16 horas. Os clones positivos contendo os insertos na orientação correta foram obtidos após análises de restrição e sequenciamento de DNA.

4.1.5. Sequenciamento do DNA

4.1.5.1. Reação

A reação de sequenciamento foi realizada num volume final de 20 µL com oligonucleotídeos adequados (T7 Promoter Primer + T7 Terminator Primer) e o Kit Big Dye Terminator (Applied Biosystem). As reações de extensão foram realizadas utilizando um termociclador seguindo as condições: 1 ciclo – 96°C; 25 ciclos – 96°C por 10 segundos. Ta (temperatura de hibridização) dos oligonucleotídeos por 5 segundos, 60°C por 4 minutos; 1 ciclo – 60°C por 5 minutos.

4.1.5.2. Precipitação

O DNA foi precipitado pela adição de 5 µL de EDTA 125 mol.L⁻¹ e 60 µL de etanol absoluto em cada amostra, as quais ficaram cobertas com papel alumínio para isolamento da luz. Incubaram-se as amostras por 15 minutos a temperatura ambiente e centrifugou-se a 3.000xg por 30 minutos a 4°C. Em seguida, foi descartado o sobrenadante e ressuspensão o precipitado em 60 µL de etanol 70%. Centrifugou-se novamente, descartou-se o sobrenadante e, após a secagem do DNA, ressuspendeu-se as amostras em 10 µL de formamida Hi-Di[®]. As amostras foram desnaturadas a 96°C por 5 minutos e incubadas no gelo por 2 minutos. Em seguida foram aplicadas em placa de 96 poços e colocadas no Sequenciador ABI Prism 3130 (Applied Biosystems).

4.1.6. Produção e purificação das proteínas recombinantes

Células de *E. coli* BL21 Rosetta (DE3) competentes foram transformadas separadamente com 1 µg de cada uma das construções plasmidiais obtidas e posteriormente plaqueadas em meio LB contendo canamicina (30 µg/ml). Colônias isoladas de cada transformação foram analisadas para a produção da proteína recombinante em pequena escala (50mL de cultura). Um clone apresentando alta produção da proteína recombinante foi utilizado nos procedimentos de produção em maior escala. Para a expressão em maior escala, as células foram crescidas em 2 L de meio LB contendo canamicina (30 µg/ml) a 37°C até densidade óptica de 0,7, medida a 600 nm (espectrofotômetro Beckman modelo DU640), e foram induzidas pela adição de IPTG a uma concentração final de 0,1 mmol.L⁻¹ por 4h a 18°C (temperatura escolhida após triagem para escolha da melhor temperatura para expressão). As células foram coletadas por centrifugação a 3.000xg por 10 min, ressuspensas em tampão de homogeneização (50 mmol.L⁻¹ de Tris.HCl, pH 8,0, 500 mmol.L⁻¹ de NaCl, 30 mmol.L⁻¹ de imidazol) e lisadas em sonicador Vibra Cell (Sonics). O lisado foi centrifugado a 13.000xg por 30 min e o sobrenadante filtrado em filtro 0,45 µm e submetido a cromatografia de afinidade em coluna HiTrap (Amersham) com auxílio de um sistema de Purificação de proteínas Akta Prime (Amersham). A eluição da proteína a partir da coluna ocorreu com um gradiente linear de 10 a 500 mmol.L⁻¹ de imidazol preparado no mesmo tampão de homogeneização. As frações com maior quantidade e pureza da proteína recombinante foram concentradas utilizando o concentrador Amicon 3kDa (Millipore) e transferidas para frascos apropriados a uma concentração final de 4,1 mg.mL⁻¹ em tampão 20 mmol.L⁻¹ HEPES pH 7,4, 100 mmol.L⁻¹ KCl, 2 mmol.L⁻¹ DTT, 10% glicerol, foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a temperatura de -80°C.

4.1.7. Análise de YacG recombinante por Western blot

A análise de Western blot foi realizada para a confirmação da produção de YacG recombinante. Inicialmente a proteína foi fracionada por eletroforese em gel SDS-PAGE e em seguida transferida para uma membrana de nitrocelulose em tampão Tris, 20 mmol.L⁻¹, pH 8,0, glicina 150 mmol.L⁻¹ e metanol 20% a 100V, durante 1 hora utilizando o sistema TransBlot (Bio-Rad). Após a transferência, a

membrana foi bloqueada com uma solução de 5% de leite em pó desnatado em TBST (Tris, 20 mmol.L⁻¹ pH 7,5; NaCl 0,5 mol.L⁻¹; Tween-20 0,05%). A membrana foi lavada uma vez com tampão TBST por cinco minutos à temperatura ambiente e incubada com o anticorpo monoclonal de coelho anti-His conjugado com fosfatase alcalina (Sigma), na diluição de 1:10.000, em TBST contendo 5% de leite, durante 1 hora. Posteriormente, a membrana foi lavada com TBST três vezes (cinco minutos cada) à temperatura ambiente e revelada com tampão de revelação (NaHCO₃ 100 mmol.L⁻¹, MgCl₂ 1 mmol.L⁻¹, substratos para fosfatase alcalina NBT e BCIP).

4.2. Síntese dos fragmentos e análogos peptídicos de YacG

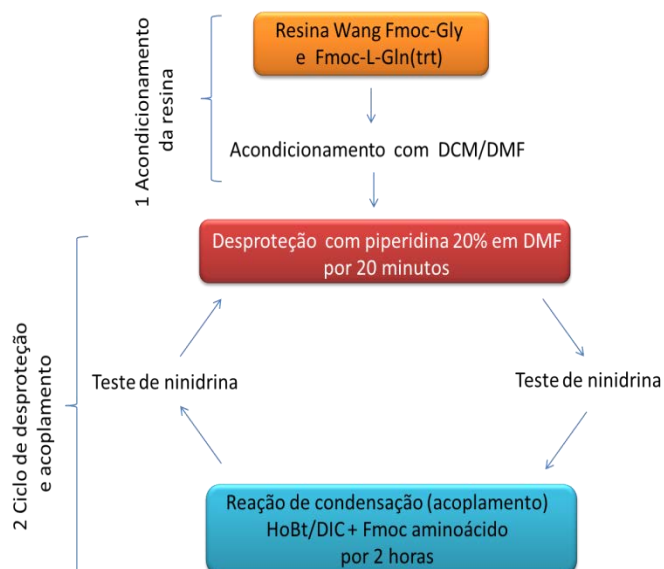
Os fragmentos e análogos peptídicos projetados com o intuito de investigar a região de YacG responsável pela interação com DNA girase, foram sintetizados pelo método de fase sólida (STEWART & YOUNG, 1984; LLOYD-WILLIAMS et al., 1997; AMBLARD et al., 2005), de acordo com o protocolo que emprega o grupamento base-lábil 9-fluorenilmetiloxycarbonila (Fmoc) como protetor dos α-amino grupos de todos aminoácidos, e t-butila (t-Bu) e derivados para a proteção das cadeias laterais dos aminoácidos trifuncionais.

Para o início da síntese, uma massa de 500 mg de resina foi devidamente pesada e transferida para seringas de 10 ou 20 mL, contendo uma placa filtrante, a qual permite somente a passagem de solvente durante os processos de lavagem. A resina utilizada para a síntese dos peptídeos YacGAG1, 4, 5, 6 e 8 foi uma Fmoc-Gly-Wang Resin (0,55 mmol/g) e para YacGAG7, uma Fmoc-L-Gln(trt) Wang Resin (0,59 mmol/g). Após o acondicionamento inicial da resina em DCM/DMF, a desproteção do grupo α-amino do primeiro resíduo de aminoácido, ancorado à resina, foi realizado empregando uma solução de piperidina ou N-metil-piperidina 20% (v/v) em DMF por 20 minutos, com posterior lavagem com DMF e DCM. Na etapa de acoplamento de cada aminoácido, foi utilizado um excesso molar de 3 equivalentes para o Fmoc-aminoácido e 3 equivalentes para os agentes de condensação Diisopropilcarbodiimida (DIC) e 1-Hidroxibenzotriazol (HOBt), em DCM:DMF (1:1), por 2 horas, seguindo o ciclo de desproteção e acoplamento (Figura 18) até o término da síntese. A eficiência das etapas de entrada de cada

aminoácido foi monitorada pelo teste de ninidrina (KAISER et al., 1970) e, quando positivo (condensação e/ou acoplamento incompleto), o processo foi repetido com 50% da quantidade inicial dos reagentes.

Ao término da síntese, o último resíduo de aminoácido teve seu grupo α -amino desprotegido e a resina foi lavada com MeOH e deixada sob bomba de vácuo por um período de aproximadamente 8 horas para secagem. Passado o período de secagem, foi aferida a massa final resultante das peptidil-resinas e aproximadamente 200 mg de cada, foi separada e acondicionada em tubos de centrífuga para o processo de clivagem.

Figura 18. Esquema representativo dos passos utilizados durante a síntese. **1:** Acondicionamento inicial da resina com os solventes a serem utilizados durante toda a síntese. **2:** Ciclo de desproteção e acoplamento empregado no alongamento da cadeia peptídica até o término da síntese.



Fonte: O próprio autor.

A clivagem dos peptídeos das respectivas resinas e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais, foi efetuada pelo tratamento com uma

solução de clivagem contendo TFA (94,5%), água deionizada (2,5%), EDT (2,5%) e TIS (0,5%), a temperatura ambiente por 2 horas. Os peptídeos resultantes do processo de clivagem foram precipitados, lavados com éter dietílico gelado e centrifugados (seis vezes) e dissolvidos em solução aquosa de acetonitrila 10% e liofilizados.

4.3. Reação de redução e prevenção de formação de pontes dissulfeto.

Depois de liofilizados, os análogos peptídicos contendo cisteína em sua estrutura primária foram então transferidos para frascos apropriados e incubados com um excesso molar de DTT (8 vezes) a 55°C por 2 horas em tampão Tris.HCl 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2. Passado o período de incubação, sob atmosfera de nitrogênio, reduziu-se o pH do meio a 2,0, seguindo para um novo processo de liofilização. Este procedimento teve como objetivo quebrar e/ou evitar a formação de pontes dissulfeto que podem ocorrer inter ou intra-cadeias devido a presença dos resíduos de cisteína.

Para realização dos ensaios, o excesso molar de DTT foi eliminado durante o processo de purificação dos fragmentos sintetizados, empregando cromatografia líquida em fase reversa.

4.4. Purificação do fragmento e análogos peptídicos

Aproximadamente 1 mg de cada peptídeo liofilizado foi dissolvido em 1 mL de solvente A e submetido a análise qualitativa por HPLC em um cromatógrafo Shimadzu LC-10A/C-47A , sob as seguintes condições:

- solventes: A: Água deionizada contendo 0,045% de TFA;
B: Acetonitrila contendo 0,036% de TFA;
- gradiente: linear, de 5 a 95% de B em 30 minutos;
- fluxo: 1,0 mL/minuto;

- comprimento de onda do detector: 220 nm;
- coluna: fase reversa C18, Kromasil (250 x 4,6 mm); 5 µm; 300Å;

A partir dos resultados de tempo de retenção e porcentagem de solvente obtidos nestas análises foram definidas as condições relativas à concentração de solvente para purificação dos peptídeos em escala semipreparativa

Para a purificação, uma massa de aproximadamente 50 mg de peptídeo, foi dissolvida em solvente A ou água deionizada e a solução resultante foi filtrada em filtro de 0,45 µm e submetida a purificação em um cromatógrafo Shimadzu LC-20AT/SPD-20A/CBM-20A no modo preparativo sob as seguintes condições:

- solventes: A: Água deionizada contendo 0,045% de TFA;
B: Acetonitrila contendo 0,036% de TFA;
- gradiente: linear, de 20 a 50% de B em 90 minutos;
- fluxo: 1,0 mL/minuto;
- comprimento de onda do detector: 220 nm;
- coluna: fase reversa C18, Phenomenex® (250 x 10 mm); 10µm; 300Å;

As frações coletadas foram analisadas nas mesmas condições utilizadas para análise qualitativa do peptídeo bruto. Aquelas que correspondem ao material de interesse foram juntadas em frasco de vidro de aproximadamente 30 mL, congeladas em nitrogênio líquido, liofilizadas e submetidas novamente a análise qualitativa para confirmar sua pureza.

4.5. Espectrometria de massas

As análises por espectrometria de massas (ESI-MS) foram realizadas por injeção direta em um espectrômetro Bruker Amazon SL utilizando amostras dos fragmentos peptídicos puros, dissolvidos em acetonitrila ou metanol, a concentração de 1 mg/mL.

4.6. Determinação de grupos sulfidrila livres nas amostras peptídicas

A quantidade de sulfidrila livres nas amostras de peptídeos foi determinada pelo teste de Ellman's (BULAJ et al., 1998) que emprega o ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzoico) (DTNB), como reagente.

Inicialmente uma solução estoque de DTNB 2 mmol.L^{-1} foi preparada em acetato de sódio 50 mmol.L^{-1} e armazenada em refrigerador.

Para determinação dos grupos sulfidrila livres foi construída uma curva de calibração empregando N-acetil-L-cisteína em tampão Tris.HCl 10 mmol.L^{-1} , pH 7,2, partindo-se de uma concentração de $10 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ até $50 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Uma alíquota de $10 \text{ } \mu\text{L}$ de cada uma das soluções de N-acetil-L-cisteína foi adicionada a $990 \text{ } \mu\text{L}$ de uma solução de DTNB ($50 \text{ } \mu\text{L}$ da solução estoque de DTNB, $100 \text{ } \mu\text{L}$ de tampão Tris.HCl 1 mol.L^{-1} , pH 8,0 e $840 \text{ } \mu\text{L}$ de água deionizada) e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente.

Em seguida as amostras foram transferidas para cubetas de quartzo, para leituras de absorbância a 412 nm em um espectrofotômetro Shimadzu UV 1601PC, utilizando como branco uma solução em que a amostra era omitida.

Para os ensaios de cada uma das amostras peptídicas empregou-se o mesmo procedimento, utilizando $10 \text{ } \mu\text{L}$ de uma solução contendo um dos peptídeos, de modo que a concentração final resultasse em $3,5 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$.

4.7. Titulação com Co^{2+}

A coordenação dos análogos peptídicos por íons zinco foi realizada conforme descrito por Frankel e colaboradores (1987), através de titulação por complexação, utilizando o íon cobalto como uma sonda espectroscópica e monitorando alterações no espectro de absorção no ultravioleta a fim de avaliar a estruturação e o comportamento dos mesmos, na presença deste metal. Este procedimento foi possível pelo fato de que a coordenação de íons Cobalto aos grupos sulfidrila livre, resulta em absorção a 310 nm e outros comprimentos de onda.

A titulação foi realizada adicionando-se alíquotas de uma solução de Cobalto (II) 1 g/L (concentração final entre 5 e 70 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) em uma solução contendo um dos fragmentos peptídicos (50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) até se observar a mudança no espectro e atingir a estequiometria desejada.

As amostras peptídicas foram preparadas em tampão Tris.HCl 10 mmol.L^{-1} , pH 7,2. Destas amostras, foi retirada uma alíquota e diluída em 1,5 mL com o mesmo tampão de preparo, para se obter uma concentração final de 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para assim realizar a titulação com o íon cobalto.

O branco utilizado foi tampão Tris.HCl 10 mmol.L^{-1} , pH 7,2, o mesmo utilizado na preparação das amostras.

Os espectros de absorção foram traçados na faixa de 300 a 800 nm, utilizando cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico.

4.8. Marcação de YacG, YacGAG1, YacGAG4 e YacGAG5 com FITC

A marcação dos peptídeos YacGAG1, 4 e 5 e a proteína YacG foram realizados segundo o protocolo Sigma Aldrich, incubando-se 1 mL da solução estoque de peptídeo ou proteína (2 mg/mL^{-1}) com 50 μL da solução estoque (1 mg/mL^{-1}) de isotiocianato de fluoresceína (FITC), a temperatura de 5°C, overnight. Após a reação de conjugação, o excesso de FITC foi removido utilizando uma coluna Hitrap desalting (GE Healthcare) previamente equilibrada com o tampão de reação. A marcação das amostras foi confirmada por espectrofotometria de absorção (a 280 e 495nm) seguindo a seguinte equação:

$$\text{Molar F/P} = \frac{A_{495} \times C}{A_{280} - [(0,35 \times A_{495})]}$$

$$\text{onde: } C = \frac{\text{MW} \times E^{0,1\%}}{389 \times 195}$$

C : valor da constante de um peptídeo ou proteína;

MW: massa molecular dos peptídeos ou proteína;

389: massa molecular do FITC;

195: é a absorção $E^{0.1\%}$ do FITC ligado a 490nm em pH =13;

$(0,35 \times A_{495})$ é o fator de correção devido a absorbância do FITC a 280nm;

$E^{0.1\%}$ é a absorção a 280nm do peptídeo ou proteína a 1 mg/mL.

Segundo o protocolo do fornecedor, as frações onde se encontra o produto marcado resulta em uma razão Molar F/P entre 0,3 e 1,0.

4.9. Ensaio de inibição da atividade de DNA girase

Para realização deste ensaio foi adquirido da empresa Inspiralis®, o Kit de superenovelamento do DNA, contendo a enzima DNA girase, plasmídeo pBR322 relaxado e os tampões apropriados.

Os ensaios de inibição do superenovelamento do DNA relaxado foram realizados da seguinte maneira:

- Para os controles, incubou-se 0,5 μg de plasmídeo pBR322 relaxado na ausência (negativo) e na presença (positivo) de 1 unidade (U) de DNA girase em um volume de reação de 30 μL a 37°C por 1 hora em tampão de ensaio (35 mmol.L^{-1} Tris.HCl pH 7,5, 24 mmol.L^{-1} KCl, 4 mmol.L^{-1} MgCl_2 , 2 mmol.L^{-1} dithiothreitol, 1,8 mmol.L^{-1} espermidina, 1 mmol.L^{-1} ATP, 6.5% w/v glicerol e 0,1 mg/mL^{-1} de albumina).
- Os potenciais inibidores peptídicos foram incubados com 0,5 μg de plasmídeo pBR322 relaxado, na presença de 1 unidade (U) de DNA girase no mesmo volume de reação e condição apresentada nos controles, juntamente com o tampão de ensaio desta enzima.

As reações foram interrompidas pela adição de 3 μL de uma solução de SDS 2% e posterior incubação por 2 minutos a 65°C. Logo após foram adicionados 15 μL de STEB (20% sacarose, 0,05 mmol.L^{-1} Tris-HCl pH 7,5, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ azul de bromofenol, 0,05 mol.L^{-1} EDTA) e 60 μL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e centrifugado. Em seguida as amostras foram submetidas à análise por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris 89 mmol.L^{-1} / ácido bórico 89 mmol.L^{-1} / EDTA 2 mmol.L^{-1} , pH 8,2), submetidas à tensão constante de 60 mV, à temperatura ambiente, por 3 horas. Ao término da corrida, o gel foi corado durante 15 minutos com solução de brometo de etídio 1 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ em tampão TBE (GELLERT et al., 1976). O gel foi analisado em transiluminador de luz ultravioleta e documentado em fotodocumentador Alpha Imager®EP da Alpha Innotech.

4.10. Ensaio de inibição da atividade de Topoisomerase II α Humana

Assim como no ensaio de inibição da atividade de DNA girase, para a realização deste ensaio foi adquirido da empresa Inspiralis®, o Kit de relaxamento do DNA, contendo a enzima Topoisomerase II α , plasmídeo pBR322 superenovelado e os tampões apropriados.

Os ensaios de inibição do relaxamento do DNA superenovelado pela ação da Topoisomerase II α Humana foram realizados utilizando a mesma metodologia descrita para DNA girase, substituindo somente o plasmídeo pBR322 relaxado por pBR322 superenovelado e DNA girase por Topoisomerase II α Humana, além de utilizar o tampão de ensaio próprio da enzima (50 mmol.L^{-1} Tris.HCl pH 7,5, 125 mmol.L^{-1} NaCl, 10 mmol.L^{-1} MgCl_2 , 5 mmol.L^{-1} dithiothreitol e 100 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ de albumina).

4.11. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

A partir dos resultados obtidos nos ensaios de inibição da atividade das enzimas, foi possível fazer uma triagem dos peptídeos inibidores e assim testar sua concentração mínima inibitória.

A CMI foi realizada utilizando as mesmas metodologias apresentadas para DNA girase e Topoisomerase II α Humana, desta vez variando a concentração molar através de diluições seriadas dos peptídeos inibidores e da proteína até a concentração onde estes não mais interferem na atividade destas enzimas.

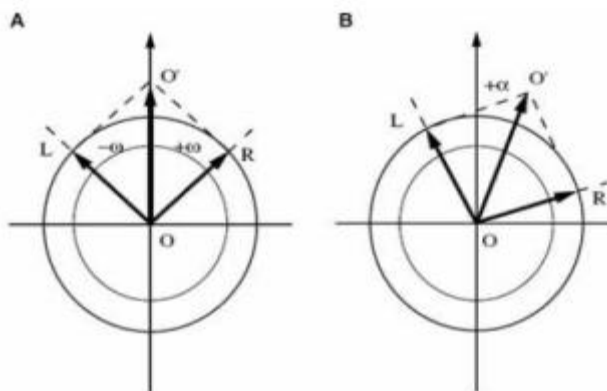
4.12. Dicroísmo circular

A espectroscopia de dicroísmo circular (CD) é um poderoso método em biologia estrutural usado desde 1960 para examinar estruturas secundárias de proteínas e peptídeos em solução (WHITMORE & WALLACE, 2007). O fenômeno de dicroísmo circular está relacionado à absorção diferenciada da luz circularmente polarizada para direita ou para a esquerda.

A técnica de dicroísmo circular se baseia no desvio da luz circularmente polarizada incidente em compostos quirais (CAMPANA et al., 2001). A luz circularmente polarizada é gerada quando a fonte de luz oscila em duas direções perpendiculares entre si, com amplitudes iguais, mas com uma diferença de fase ($\pi/2$). Com isso, a trajetória do vetor resultante de propagação de luz é helicoidal. Devido a isso, a onda resultante será circularmente polarizada à direita ou à esquerda, conforme a diferença de fase for $+\pi/2$ ou $-\pi/2$ (CAMPBELL, 1984).

Para uma molécula quiral apresentando o fenômeno de dicroísmo circular, o componente circularmente polarizado à direita é absorvido em diferente intensidade em relação ao polarizado à esquerda. Assim, a combinação das duas ondas transmitidas resulta em uma luz elipticamente polarizada como exemplificado na Figura 19 (PURDIE, 2007).

Figura 19. Representação da luz circularmente polarizada à direita e à esquerda incidente (A) e transmitida após interagir com uma molécula dicroica (B).



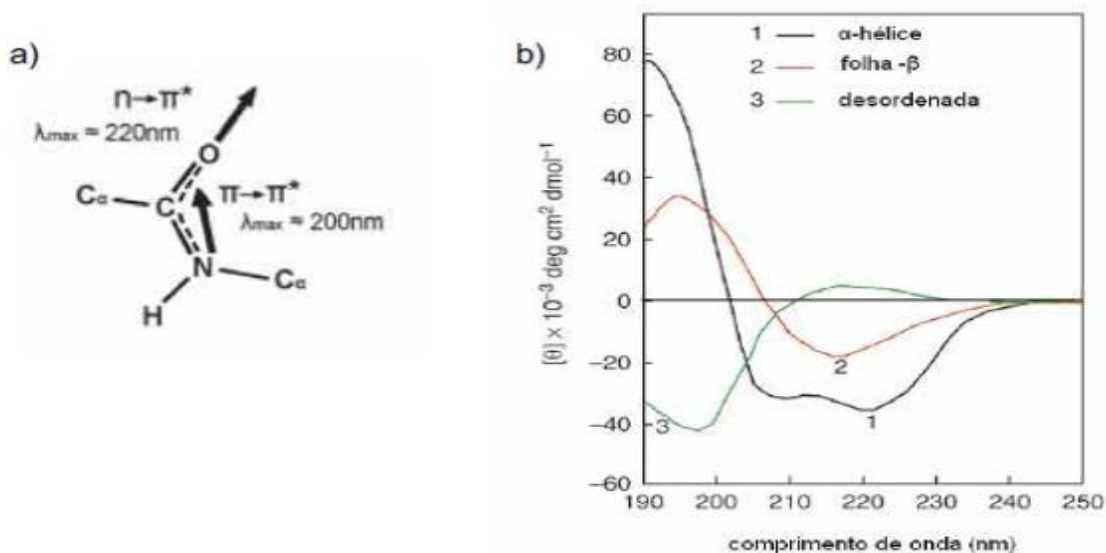
Fonte: PURDIE (2007).

Em peptídeos e proteínas existem duas ligações cuja rotação é permitida: C Σ -NH, cujo ângulo de rotação é Φ e CO- Σ -NH, cujo ângulo de rotação é Ψ . Os ângulos específicos Φ e Ψ são os responsáveis pelo espectro de CD característico das estruturas secundárias, α -hélice, folha- β e estrutura randômica. O cromóforo amida apresenta uma banda centrada próxima a 220 nm e outra com energia de transição menor, centrada em 190 nm.

Em uma proteína ou peptídeo enovelado, o arranjo tridimensional dos cromóforos afeta a estrutura eletrônica e, em consequência, o seu espectro. Para as proteínas com estrutura aleatória, as interações de longa distância são mínimas e o espectro é composto por duas bandas características, sendo uma banda negativa, centrada em 195 nm e outra positiva, centrada em 212 nm.

A estrutura β apresenta uma banda negativa centrada em 218 nm e outra banda positiva centrada em 196 nm. O espectro de uma α -hélice possui essas mesmas bandas. No entanto, ele é mais complexo, pois nele a transição $\pi \rightarrow \pi^*$ é desdobrada em $\pi \rightarrow \pi^*$ perpendicular, centrada em 191 nm, e $\pi \rightarrow \pi^*$ paralela centrada em 208 nm. A transição $n \rightarrow \pi^*$ é deslocada para menor energia, centrada em 222 nm (Figura 20). Assim, de acordo com a conformação estrutural adquirida pelas proteínas é possível caracterizar a estrutura secundária destas macromoléculas devido ao perfil espectral de CD particular destes arranjos (WHITMORE & WALLACE, 2007)

Figura 20. a) Diagrama da ligação peptídica mostrando a orientação da transição $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$; b) Espectros típicos de CD mostrando o perfil característico de α -hélice, folha- β e estrutura desordenada.



Fonte: WHITMORE & WALLACE (2007).

As análises de dicroísmo circular foram realizadas utilizando um espectropolarímetro JASCO J-815. Utilizou-se uma concentração de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de cada peptídeo em um volume final de $300 \mu\text{L}$. Os espectros de CD foram coletados com o tempo de resposta de 16 segundos e velocidade de aquisição de 20 nm/min , em 8 varreduras de 190 a 250 nm em água deionizada/TFE 60% em temperatura ambiente, em uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 mm, com aproximadamente $300 \mu\text{L}$ de volume. Foi realizado um branco para cada medida, o qual apresentou sinal desprezível, sendo subtraído mesmo assim de todas as curvas.

4.13. Ensaio de susceptibilidade bacteriana em meio líquido utilizando o método de micro-diluição em caldo

Os ensaios de susceptibilidade bacteriana em meio líquido foram feitos de acordo com as normas descritas no NCCLS/CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) e Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 que determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos" emitido pela ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Todos procedimentos e manipulação de microrganismos foram realizados em cabine de fluxo laminar BIO SEG 09 marca VECO e os materiais utilizados foram todos esterilizados em autoclave.

As cepas de bactérias utilizadas neste trabalho foram adquiridas do Laboratório de Microrganismos de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro (Tabela 6).

Tabela 6. Relação dos microrganismos utilizados nos ensaios.

MICROORGANISMO	COLEÇÃO
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 10031
<i>Escherichia coli</i> (EHEC)	00171 CDC EDL-933
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 14458
<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC 13813

Os meios utilizados para crescimento, ensaio de micro diluição em caldo e preservação (meio criogênico) estão descritos na Tabela 7 e foram preparados de acordo com as instruções do fabricante.

Tabela 7. Meios de cultura utilizados

MEIO	COMPOSIÇÃO	MARCA
Sólido	Ágar Muller Hinton	BIOLOG
Caldo	Caldo Muller Hinton	BIOLOG
Preservação	Caldo Muller Hinton + 20% glicerol	BIOLOG

4.13.1. Preparo das soluções padrão de peptídeos

As amostras peptídicas avaliadas neste ensaio, foram inicialmente preparadas e/ou diluídas em caldo Mueller Hinton a concentração final de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em um volume de 1 mL e armazenados em tubos de micro centrífuga. O controle negativo contendo o antibiótico ciprofloxacino foi preparado da mesma maneira, mas na concentração final de $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Preparadas as soluções padrão, estas então foram distribuídas em placas esterilizadas de 96 poços, sendo pipetado em cada poço um volume final de 100 μL para as amostras peptídicas, controle negativo e controle positivo.

As placas então preparadas foram mantidas em refrigerador e/ou congelador até o inóculo das cepas bacterianas.

4.13.2. Preparo do inóculo e ajuste

Para realização deste ensaio, o inóculo bacteriano foi feito através dos meios de preservação mantidos em 20% glicerol a temperatura de -80°C . Uma pequena alíquota destes foi retirada com a ajuda de uma alça de platina e semeada em placas de petri contendo meio ágar Mueller Hinton e então incubadas a 35°C overnight, para crescimento.

Passado o período de crescimento, transferiu-se 5 colônias isoladas de cada cepa bacteriana crescida na placa, para tubos de ensaio contendo 5 mL de meio

caldo Mueller Hinton e novamente incubou-se a 35°C overnight, sob agitação a 200 rpm.

Passado este período, foi retirada uma amostra de 1 mL de cada tudo contendo as cepas e aferida sua absorbância em 625 nm e acertadas de acordo com o padrão de turbidez McFarland 0,5 que obtém uma absorbância entre 0,08 e 0,10 neste comprimento de onda, resultando em uma suspensão contendo aproximadamente entre 1×10^8 UFC/mL.

Acertada então a suspensão bacteriana, esta foi então diluída 1:10 com solução salina 0,9%, resultando em uma diluição de 10^7 UFC/mL, de modo que esta suspensão, quando inoculada aos 100 µL de meio contido na placa, resulte em uma concentração final de bactérias de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL (ou 5×10^4 UFC/poço, no método de micro diluição).

4.13.3. Inoculo da suspensão normatizada nas placas de 96 poços

Após a normatização das suspensões bacterianas de acordo com o padrão McFarland 0,5, foram então inoculados 0,5 µL destas suspensões nas placas de 96 poços previamente preparadas com as soluções peptídicas e seus respectivos controles com o auxílio de micropipetas estéreis. Terminado o processo de inoculação as placas foram incubadas a 35°C e realizadas leituras em um intervalo de 5 horas e 16 horas em um leitor de microplacas EPOCH da BIOTEK em comprimento de onda de 625 nm e interpretados os resultados.

A porcentagem de inibição do crescimento bacteriano por cada uma das amostras peptídicas foi determinada através da análise comparativa destas com os controles empregados.

4.14. Estudos de Bioinformática.

4.14.1. Modelagem Molecular

A estrutura cristalográfica PDB ID 4TMA(1) foi utilizada para reconstrução do complexo GyrB-YacG, utilizando o servidor KoBaMIN (VOS, 2014). As cadeias laterais de resíduos incompletos são reconstruídas e logo após é aplicado um protocolo de correção estereoquímica e minimização estrutural de modo a produzir o menor RMSD (root mean square deviation) entre o complexo reconstruído e aquele original. Esta etapa é de fundamental importância para um estudo detalhado, via dinâmica molecular, do modo de interação que determina o reconhecimento molecular do inibidor peptídico pelo sítio de interação da GyrB.

4.14.2. Dinâmica Molecular

Após reconstrução estrutural, o complexo YacG-GyrB foi submetido a um estudo de simulação de dinâmica molecular, empregando um protocolo de arrefecimento simulado (*simulated annealing*) (KARPLUS & McCAMMON, 2002), com o pacote computacional GROMACS, versão 4.5.6 (PRONK, 2013). As condições, padronizadas através de estudos anteriores, foram: campo de força OPLS/AA (JORGENSEN, 1996), modelo de água tipo SPCE (*single point charge extended*), que acrescenta uma correção à função de energia potencial ao modelo comumente utilizado SPC, resultando em melhor densidade e constante de difusão; a distância média do complexo à parede da caixa de simulação foi mantida em 10 Å, e as interações de Lennard-Jones e de Coulomb foram utilizadas para descrever os termos de repulsão e dispersão com redução do número de interações (*cutoff*) através do método PME (*Particle Mesh Ewald*) (ESSMANN, 1995); o raio de corte para a distância de van der Waals (VDW) foi de 1,2 nm e o algoritmo LINCS (HESS, 1997) foi utilizado para restringir o comprimento das ligações. As etapas conduzidas foram: i) construção da caixa cúbica de simulação; ii) minimização do sistema formado por água, íons NaCl na concentração de 0,15 mmol.L⁻¹ (concentração similar ao de líquidos biológicos) e pelo complexo GyrB-YacG, utilizando algoritmo

steepest descent com mil passos de minimização; iii) estabilização do sistema a volume e temperatura constantes, através uma etapa de equilíbrio, utilizando o protocolo *ensemble NVT*, mantendo-se a restrição do complexo peptídeo-proteína, para estabilizar as moléculas de água e íons em torno do complexo, durante 500 ps; iv) simulação empregando o protocolo *ensemble NPT* (mols, pressão e temperatura constantes), durante um tempo de 1000 ps, para equilibrar o sistema a pressão e temperatura constantes; v) simulação de dinâmica molecular, durante 10 ns, aplicando-se o protocolo de arrefecimento simulado (*simulated annealing*), com a variação da temperatura de 300 a 350 K durante 5 ns e de 350 a 300 K durante os 5 ns restantes, com amostragem das conformações a cada 10 ps.

4.14.3. Estudo de Interação Dinâmica do Complexo

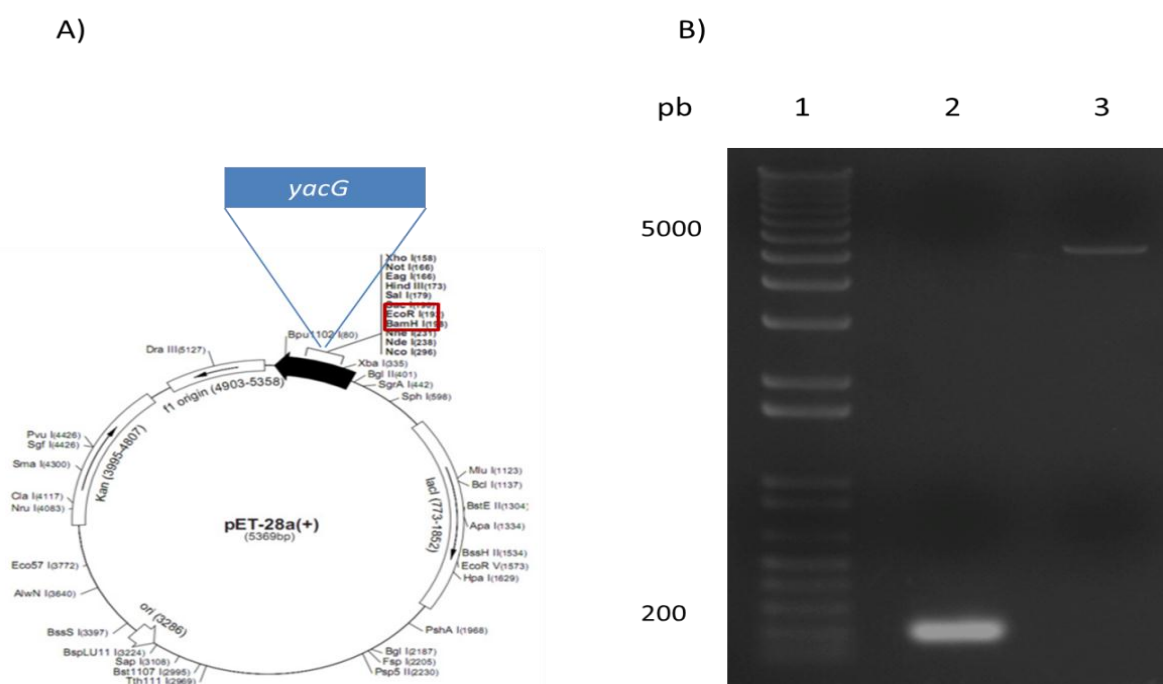
Para avaliar como os resíduos localizados na interface do complexo GyrB-YacG influenciam, em termos energéticos, no processo de interação, foi conduzido um estudo de variação estrutural a partir da trajetória do complexo obtida durante a simulação. Através de uma análise sistemática, utilizando o software Chimera (PETTERSEN, 2004), conjuntos de estruturas semelhantes foram agrupadas, de acordo com o RMSD (*root mean square deviation*), utilizando um *cutoff* de 0,2 Å, possibilitando selecionar sistematicamente as estruturas representativas de quatro grupos principais. Estes ocorreram com mais frequência e, portanto, foram utilizados para estudos posteriores de avaliação da energia livre de interação, através do servidor DrugScorePPI. (KRUGER, 2010).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Amplificação por PCR e clonagem.

A partir do DNA genômico extraído de *K. pneumoniae*, foi possível fazer a amplificação do gene *yacG* utilizando-se da técnica de PCR, empregando os oligonucleotídeos iniciadores previamente desenhados como descrito em Métodos. Ao término da reação, os produtos resultantes da amplificação e o vetor de clonagem pET28a foram tratados com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI e submetidos ao processo de purificação por eletroforese (Figura 21). Em seguida, foi realizada a ligação do inserto ao plasmídeo.

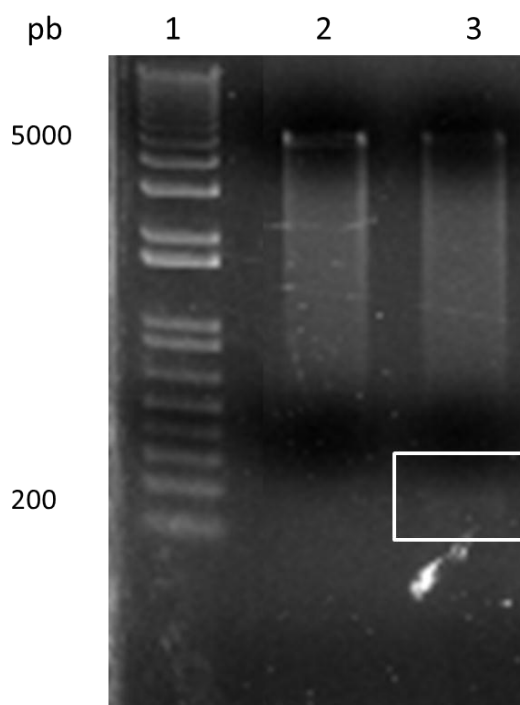
Figura 21. Purificação do produto resultante da amplificação do gene *yacG*, e pET28a após tratamento de ambos com enzimas de restrição. A) Esquema ilustrativo da estratégia de clonagem para obtenção do gene *yacG* no vetor pET28a utilizando as enzimas em destaque, *Bam*HI e *Eco*RI. B) Eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando o resultado da purificação do clone do gene *yacG* e vetor de clonagem. Nas colunas 2 e 3 estão representados, respectivamente, o clone e o vetor, digeridos com *Bam*HI e *Eco*RI. A banda de aproximadamente 200pb, corresponde ao clone do gene *yacG*. A coluna 1 corresponde ao padrão de massa molecular (1 Kb Plus DNA ladder – Invitrogen).



Fonte: Elaborado pelo autor

Após a purificação e ligação do inserto no vetor, esta construção plasmidial então denominada pET28a-YacG, foi então incubada com células de *E. coli DH5alpha* ultracompetentes, em meio LB com antibiótico requerido para seleção. Os clones positivos e com inserto na orientação correta foram selecionados como observado na Figura 22.

Figura 22. Avaliação da clonagem e seleção do clone positivo por eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando o resultado da clonagem. Nas canaletas 2 e 3 estão representados, respectivamente, o vetor de clonagem pET28a e o clone 3 de *yacG* (em evidência), digeridos com *Bam*HI e *Eco*RI. A banda de aproximadamente 200pb, corresponde ao clone do gene *yacG*. A canaleta 1 corresponde ao padrão de massa molecular (1 Kb Plus DNA ladder – Invitrogen).



Fonte: Elaborado pelo autor

De acordo com a Figura 22 é possível observar que o clone positivo, contém a construção plasmidial pET28a-YacG, uma vez que no gel, nota-se a presença do plasmídeo pET28a e também do inserto (*yacG*) evidenciando assim o sucesso na transformação e seleção dos clones.

5.2. Sequenciamento do DNA

Para o sequenciamento, os clones positivos passaram por análises de restrição e foram novamente amplificados e preparados para o sequenciamento como descrito em Métodos.

A Figura 23 mostra o alinhamento comparativo do gene *yacG* de *K. pneumoniae* e clone *yacG* obtido. Como pode se observar, no resultado obtido do sequenciamento do clone *yacG*, a sequência de nucleotídeos é compatível com a sequência do mesmo gene em *K. pneumoniae*, evidenciando que as técnicas empregadas desde a extração do gene até o processo final de clonagem foram bem sucedidos.

Figura 23. Alinhamento comparativo entre a sequência de nucleotídeos do gene *yacG* de *Klebsiella pneumoniae* e o clone 3 obtido.

```

YacG      -----ATGTCAGAAGAGACTATCGTCAACTGCCCGACCTGCCGGCAAACCTGTGGTGTGG 54
clone3    GGATCCATGTCAGAAGAGACTATCGTCAACTGCCCGACCTGCCGGCAAACCTGTGGTGTGG 60
          *****

YacG      GCGGAGCAGAGTCCGTTTCGTCCGTTCTGTAGCAAGCGCTGCCAACTGATCGATCTGGGA 114
clone3    GCGGAGCAGAGTCCGTTTCGTCCGTTCTGTAGCAAGCGCTGCCAACTGATCGATCTGGGA 120
          *****

YacG      GAATGGGCTGCGGAAGAGAAGCGCATCCCCAGCGGGGGATCTCTCCGATAGCGATGAC 174
clone3    GAATGGGCTGCGGAAGAGAAGCGCATCCCCAGCGGGGGATCTCTCCGATAGCGATGAC 180
          *****

YacG      TGGAGCGAGCAGCAACCCTGA-- 195
clone3    TGGAGCGAGCAGCAACCCTGAGA 203
          *****

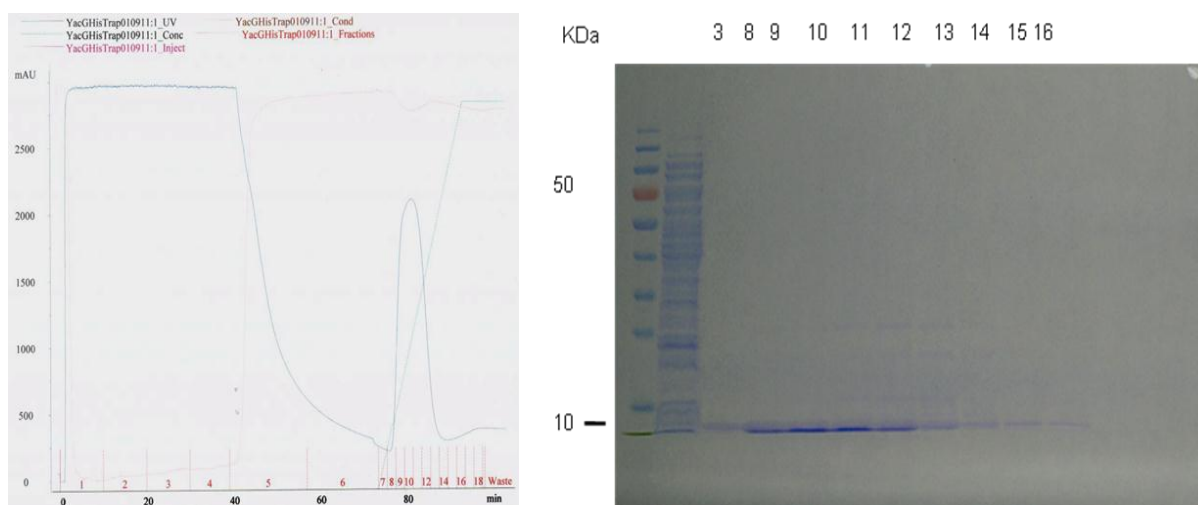
```

Fonte: Elaborada pelo autor

5.3. Produção e purificação das proteínas recombinantes

Para produção da proteína recombinante, células de *E. coli* BL21 Rosetta (DE3) foram transformadas com as construções plasmidiais e assim definido as melhores condições de expressão, primeiramente em pequena escala e posteriormente em escala de 2 L de meio LB e induzidas pela adição de IPTG. Após o crescimento, as células foram lisadas e submetidas à purificação por cromatografia de afinidade como descrito em Métodos e as frações com alto grau de pureza foram reunidas (Figura 24), dialisadas e concentradas em tampão apropriado.

Figura 24. Perfis da purificação da proteína YacG recombinante por expressão heteróloga em *E. coli* BL21 Rosetta (DE3). À esquerda é mostrado o perfil cromatográfico gerado durante a purificação por cromatografia de afinidade em um sistema Akta Prime (Amersham). À direita mostra-se o SDS-PAGE das frações de interesse e o padrão de peso molecular 10 kDa (Fermentas).



Fonte: Elaborada pelo autor

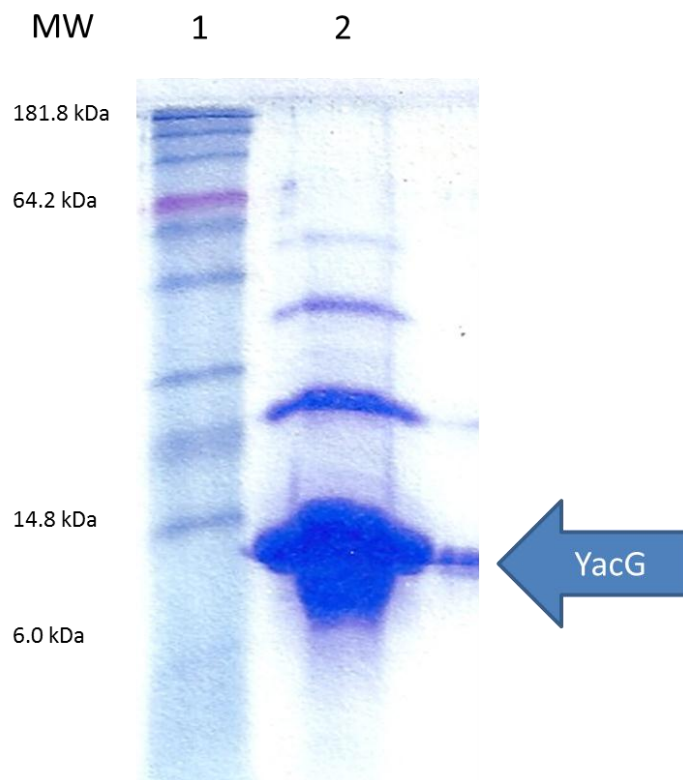
5.4. Western blot

Após a purificação e concentração da proteína YacG, foi realizado o ensaio de western blot com a finalidade de identificar e confirmar sua identidade através da

interação com o anticorpo anti-His, uma vez que YacG permaneceu com a tag de histidina após a purificação.

A Figura 25 confirma a identidade de YacG pois é possível observar que esta proteína foi detectada pelo anticorpo neste ensaio.

Figura 25. Confirmação da identidade de YacG de *Klebsiella pneumoniae* por Western blot. Coluna 1 – Marcador de peso molecular Pre-stained Protein Ladder da BenchMark™. Coluna 2 – Proteína YacG.



Fonte: Elaborada pelo autor

De acordo com as análises aqui apresentadas, é possível concluir que os procedimentos utilizados para clonagem, expressão e purificação desta proteína foram bem sucedidos, uma vez que foi possível obter YacG recombinante sem nenhum problema de toxicidade ou dificuldade de expressão.

5.5. Design racional dos fragmentos peptídicos de YacG.

Com base nos dados estruturais de YacG obtidos através do banco de dados **Protein Data Bank PDB** (Figura 7A), bem como na estrutura proposta por RAMELOT et al., (2002), iniciou-se um estudo referente as possíveis regiões da proteína no qual poderia estar relacionado com a interação com a DNA girase. Como YacG tem um domínio *zinc-finger*, este foi considerado no design dos análogos peptídeos, devido sua importância em diferentes processos celulares que envolvem interação com o DNA, RNA e proteínas, bem como na atividade inibitória sobre a DNA girase, recentemente proposta à YacG. Deste modo, na síntese correspondente ao domínio *zinc-finger* considerou-se a região entre os resíduos Thr-6 a Gly-38, englobando assim, os quatro resíduos de cisteína, envolvidos na coordenação com o zinco (Figura 7A).

Para avaliar a importância desses resíduos, alternativamente substituiu-se estes, por resíduos de serina, alanina e histidina (Tabela 8). A serina foi escolhida, por possuir estrutura molecular semelhante à cisteína, diferenciando-se apenas pela presença de um átomo de oxigênio no lugar de um de átomo de enxofre. A escolha da alanina deu-se pelo fato desta diferenciar da cisteína, pela ausência do grupo sulfidril e também pelo fato de possuírem hidrofobicidade semelhantes. Já a histidina foi escolhida por também possuir capacidade de coordenação com íons metálicos e também por estar presente em outras classes de proteínas *zinc-fingers*. As substituições, supostamente podem resultar em modificações estruturais no domínio *zinc-finger* de YacG, seja pela redução da hidrofobicidade dos aminoácidos da região de coordenação [Escala Kyte-Doolittle (KYTE & DOOLITTLE, 1982): Cys: 2,50; Ala: 1,80; Ser: -0,80; His: -3.20] e/ou pelo aumento no número de interações do tipo ligações de hidrogênio, o que poderá resultar em diminuição da capacidade de coordenação do zinco e conseqüentemente na interação da molécula com a enzima.

Além da síntese do domínio *zinc-finger* e suas modificações pontuais, outra porção da molécula também foi escolhida para síntese de outro peptídeo, uma região compreendida entre os resíduos Gly-38 a Gln-65 na qual apresenta uma estrutura randômica e que também está envolvida na interação com a DNA girase.

Tabela 8: Sequência primária dos peptídeos sintetizados.

Peptídeo	Sequência de aminoácidos	*MM g/mol
YacGAG1	⁶ TVN C PT C GKTVVWGEISPFRRPF C SKR C QLIDLG ³⁸	3.656,34
YacGAG4	⁶ TVN S PT S GKTVVWGEISPFRRPF S SKR S QLIDLG ³⁸	3.592,07
YacGAG5	⁶ TVN A PT A GKTVVWGEISPFRRPF A SKR A QLIDLG ³⁸	3.528,08
YacGAG6	⁶ TVN H PT H GKTVVWGEISPFRRPF C SKR C QLIDLG ³⁸	3.724,33
YacGAG7	³⁸ GEWAAEEKRIPSSGDLSESDDWSEEPKQ ⁶⁵	3.163,27
YacGAG8	⁶ TVN H PT H GKTVVWGEISPFRRPF H SKR H QLIDLG ³⁸	3.792,32

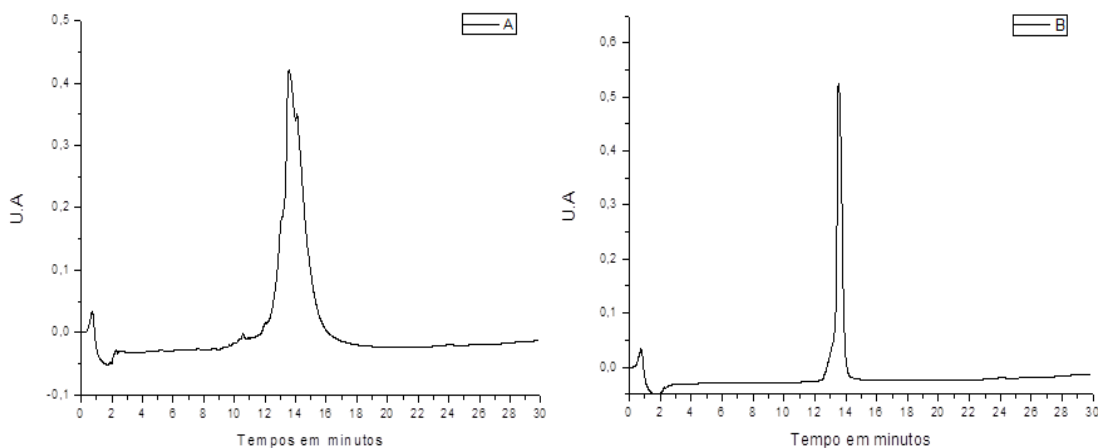
* valor teórico calculado

5.6. Purificação e caracterização dos análogos peptídicos

Uma pequena fração de cada peptídeo bruto liofilizado (aproximadamente 1mg) foi dissolvida em 1 mL de água ultrapura, filtrada e submetida à análise qualitativa em HPLC, sob condições analíticas (Métodos). A partir dos resultados de tempo de retenção e porcentagem de solvente obtidos nestas análises foram definidas as condições relativas à concentração de solvente para purificação dos peptídeos em escala semi-preparativa, empregando HPLC.

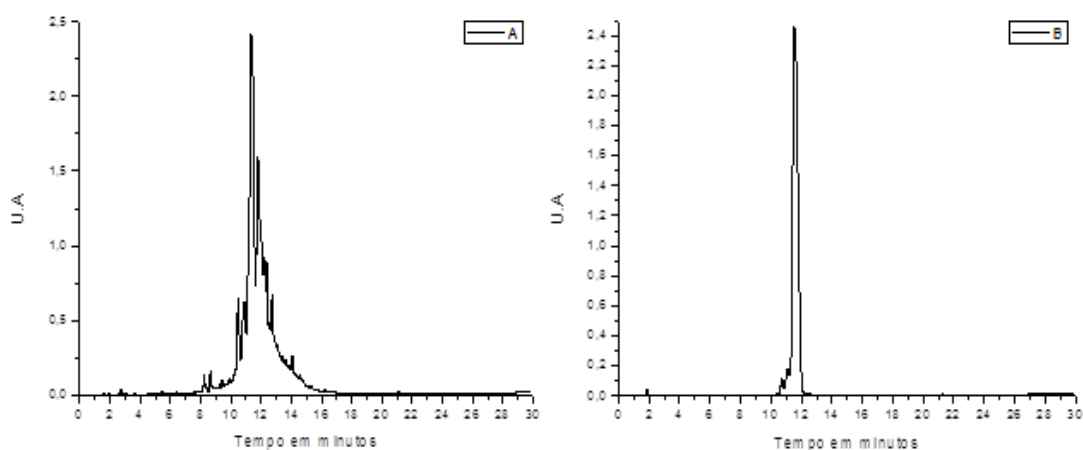
Os perfis cromatográficos dos peptídeos obtidos após purificação estão representados nas Figuras 26 a 31, juntamente com aqueles obtidos antes da purificação, para efeitos comparativos.

Figura 26. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo YacGAG1, antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa Kromasil C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å), com um gradiente linear de 20 a 50% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.



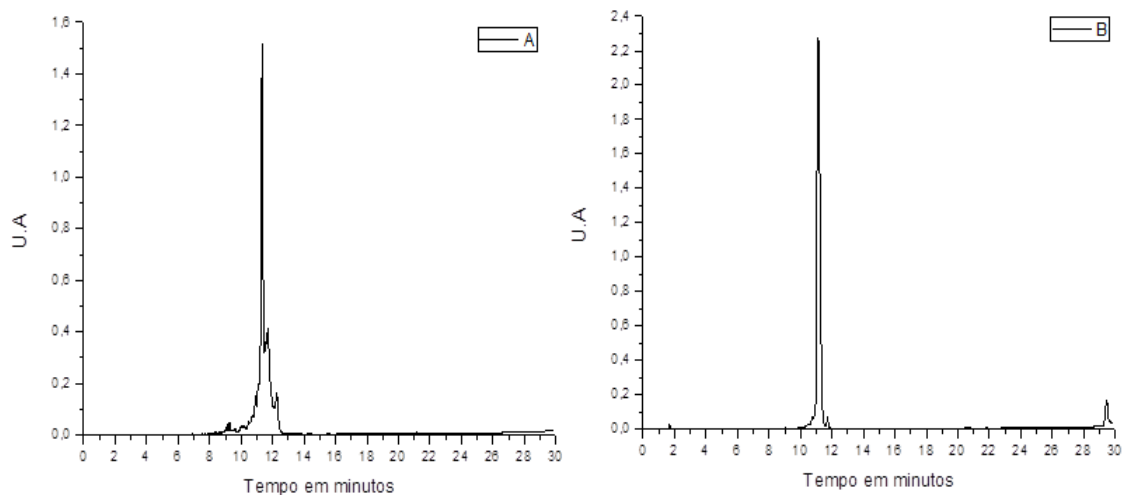
Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 27. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo YacGAG4, antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa Kromasil C₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å), com um gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.



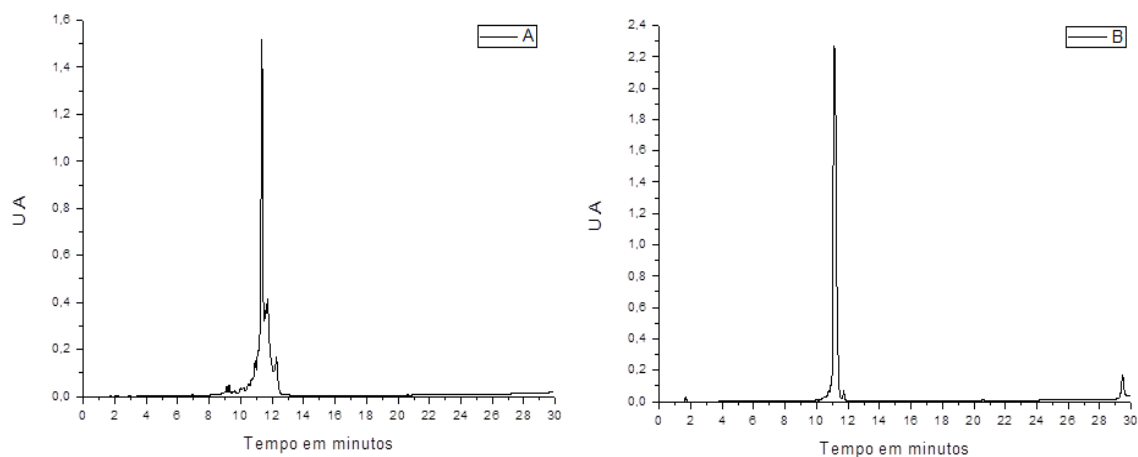
Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 28. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo YacGAG5, antes (A) e após (B) a purificação. Coluna de fase reversa Kromasil C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m; 300 Å), com um gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.



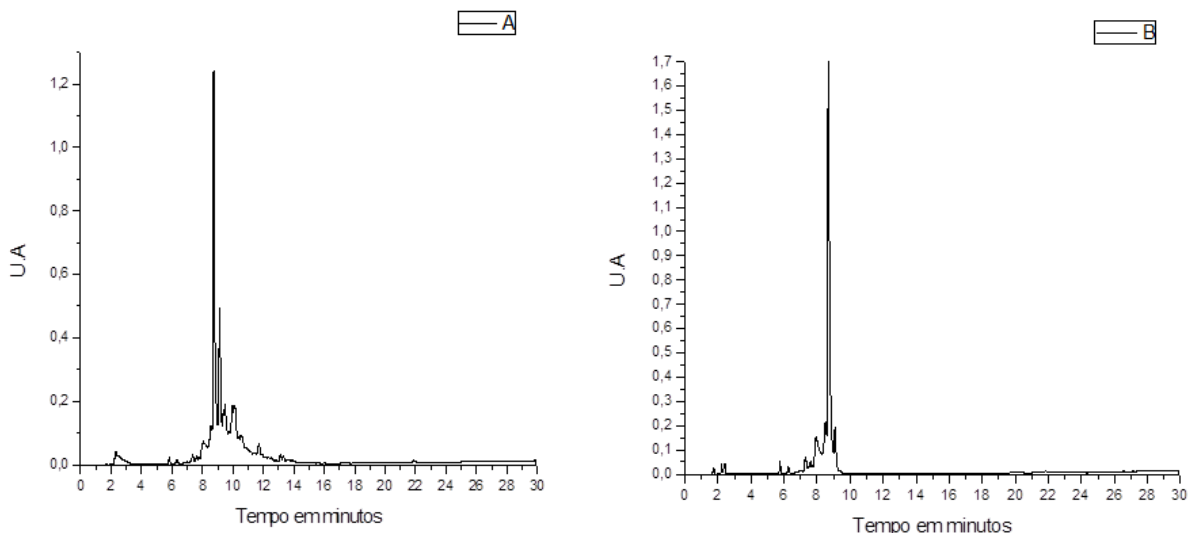
Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 29. Perfil cromatográfico obtidos em escala analítica para o peptídeo YacGAG6, antes da purificação. Coluna de fase reversa Kromasil C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m; 300 Å), com um gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.



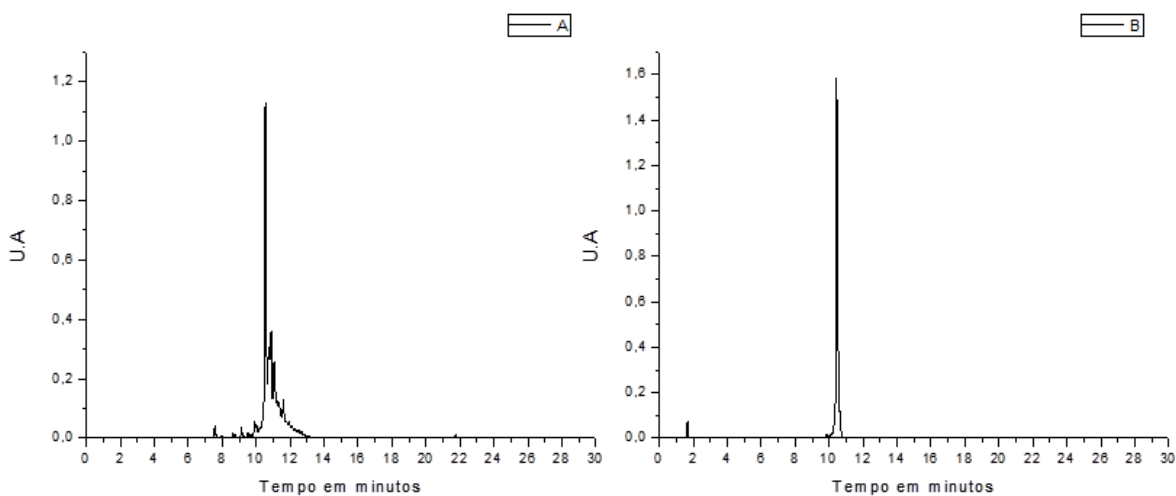
Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 30. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo YacGAG7, antes (A) e após (B) a purificação. Coluna de fase reversa Kromasil C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m; 300 Å), com um gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.



Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 31. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo YacGAG8, antes (A) e após (B) a purificação. Coluna de fase reversa Kromasil C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m; 300 Å), com um gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.



Fonte: Elaborada pelo autor

Os perfis cromatográficos dos peptídeos puros apresentam um único pico em relação aos cromatogramas observados a partir da análise do extrato bruto. O parâmetro tempo de retenção dos peptídeos purificados foi mantido em relação ao pico correspondente no extrato bruto. O rendimento da purificação de cada análogo foi calculado através de uma relação com a massa do peptídeo em seu estado bruto (antes da purificação). O rendimento da purificação e as purezas relativas dos diferentes peptídeos estão representados na Tabela 9.

Tabela 9: Relação das massas dos peptídeos purificados

Peptídeo	Massa peptídeo bruto (mg)	Massa pós purificação (mg)	Rendimento da purificação (%)	Pureza relativa (%)
YacGAG1	60	7	11,6	96
YacGAG4	60	9,2	15,3	97
YacGAG5	60	8,4	14	97
YacGAG6	60	5,2	8,6	96,3
YacGAG7	60	9	15	95,6
YacGAG8	60	6	10	98

De acordo com a tabela apresentada, é possível observar que o rendimento da purificação varia entre 8,6 e 15,3%, podendo ser considerado um rendimento consideravelmente satisfatório.

5.7. Espectrometria de massas

A caracterização dos peptídeos sintetizados foi realizada através de espectrometria de massas por um sistema LC/MS BRUKER Amazon SL. Os valores de massa molecular obtidos no modo electrospray positivo [ES m/z: (M + H)⁺], estão

apresentados na Tabela 10. Os resultados foram coincidentes com o teórico esperado, confirmando a identidade das sequências peptídicas sintetizadas.

Tabela 10. Resultado das análises de espectrometria de massas

Peptídeo	Massa molecular (g/mol)	ES m/z (g/mol)
YacGAG1	3.643,31	3644
YacGAG4	3592,07	3592
YacGAG5	3528,08	3528
YacGAG6	3724,33	3724
YacGAG7	3163.27	3163
YacGAG8	3792.32	3792

O conjunto de resultados de espectrometria de massas permite concluir que os procedimentos utilizados para síntese e purificação, foram bem sucedidos o que levaram à obtenção das sequencias desejadas.

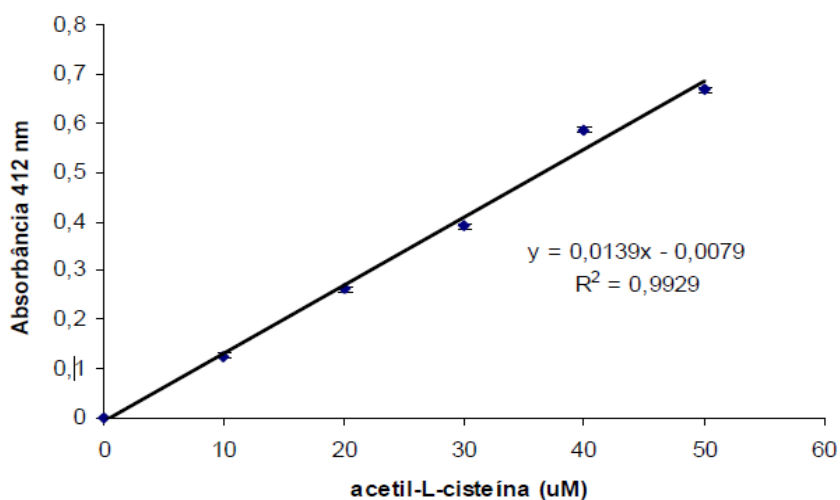
5.8. Determinação de grupos sulfidril livre

O zinco, íon característico das denominadas proteínas *zinc-fingers* participa, no caso da YacG, juntamente com quatro resíduos de cisteína (Cys-9, Cys-12, Cys-28 e Cys-32), de um sitio de ligação tetraédrico. Neste caso, é condição para esta disposição, que os grupos tióis, da cadeia lateral dos resíduos de cisteína estejam na sua forma reduzida. Desta forma, para que os fragmentos peptídicos sintetizados possam simular adequadamente o ambiente de ligação, assim como na proteína nativa, é importante quantificar estes grupos em cada uma das sequências sintetizadas.

Assim, para quantificá-los, empregou-se o teste de Ellman's (BULAJ, et al., 1998) que emprega o ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB), como reagente, seguindo o procedimento descrito em Métodos.

A Curva padrão empregando Acetil-L-cisteína, está representada na Figura 32, cujo coeficiente de extinção molar obtido a partir da mesma foi $13.900 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. A análise de grupos SH livres foi feita para as oito sequências peptídicas, sendo que os valores obtidos e representados na Tabela 11 mostram que os peptídeos contendo cisteína apresentam grupos SH originalmente na forma reduzida, o que permite a utilização direta dos mesmos nos estudos de complexação com íons metálicos.

Figura 32. Curva Padrão de Acetil-L-cisteína para determinação de grupos SH livre empregando o teste de Ellman's.



Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 11: Teor de grupos tióis nos fragmentos peptídicos sintetizados.

PEPTÍDEO *	A (412nm)	SH LIVRES ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
YacGAG1	0,187	13,4
YacGAG6	0,105	7,5

*YacGAG4, YacgAG5, YacGAG7 e YacGAG8 apresentaram $A_{412\text{nm}} = 0,0$

5.9. Titulação dos fragmentos peptídicos com íon Cobalto

Sondas espectroscópicas desempenham um papel de extrema importância na caracterização de macromoléculas biológicas (SHI et al., 1993). Uma boa sonda deve combinar razoável sensibilidade com variabilidade das propriedades espectroscópicas, para que possa ser observada em baixas concentrações e para que a sonda possa fornecer informações sobre propriedades estruturais e/ou dinâmicas do sítio de ligação da mesma. Para a sondagem do sítio de ligação do íon zinco (II) em proteínas, o íon cobalto (II) é muito utilizado (GRAY, 1980), pois complexos de cobalto têm espectros de absorção característicos e a substituição por este metal tem sido usada em muitos estudos com metaloproteínas.

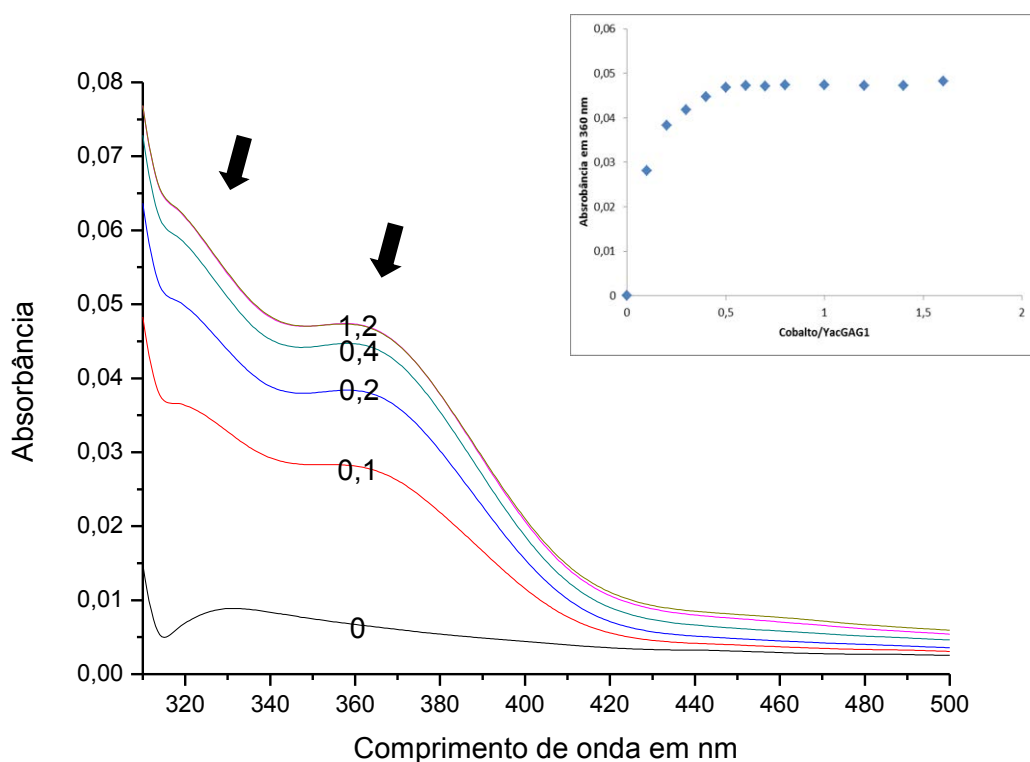
A energia absoluta e a intensidade das bandas de absorção oferecem informações sobre os tipos de ligantes em torno do íon metálico e sua geometria. A absorção da luz é acompanhada pelo rearranjo dos elétrons nos orbitais do metal e dos ligantes envolvidos, o que reflete nos valores do coeficiente de extinção. O coeficiente de extinção das transições de campo ligante na região do visível depende do número de coordenação deste metal. Para complexos octaédricos, como aqueles formados por Cobalto (II) em solução aquosa, os coeficientes de extinção situam-se entre 5 e 10 $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ enquanto que para sítios tetraédricos, como nos domínios zinc-fingers, os coeficientes de extinção são aproximadamente 100 vezes superiores (SHI et al., 1993).

Desta forma, mudanças observadas nos espectros no UV-visível dos peptídeos derivados de YacG, após adição do íon Cobalto (II), foram utilizadas para investigar a natureza e a geometria do complexo peptídeo-metal (a configuração eletrônica do íon zinco (II) impossibilita este tipo de análise para este metal).

As bandas de transferência de cargas $Co(II) \rightarrow S$ observadas a 320 e 360 nm (Figura 33) nos espectros UV-visível, para a titulação de YacGAG1 com uma solução de Cobalto (II), sugerem a ligação de cisteinato (FRANKEL et al., 1987). No visível, bandas de alta intensidade, descritas para transições *d-d* a 620, 690 e 750 nm mostram que o modo de coordenação sugerido é tetraédrico (SHI et al., 1993). O número de bandas, atribuídas a três transições *d-d* direcionam para uma esfera de

coordenação tipo Cys4 (HUHEEY, 1993). A coloração levemente azulada da solução final corrobora a hipótese de um sítio de coordenação tetraédrico.

Figura 33. Espectros de absorção no UV-visível (300 a 500 nm) de Cobalto (II) coordenado com YacGAG1 com 0, 0,1, 0,2, 0,4 e 1,2 eq de Co^{+2} . A inserção mostra a dependência da banda de transferência de cargas $\text{Co(II)} \rightarrow \text{S}$ a 360 nm, com o aumento da quantidade de Co^{+2} adicionado.

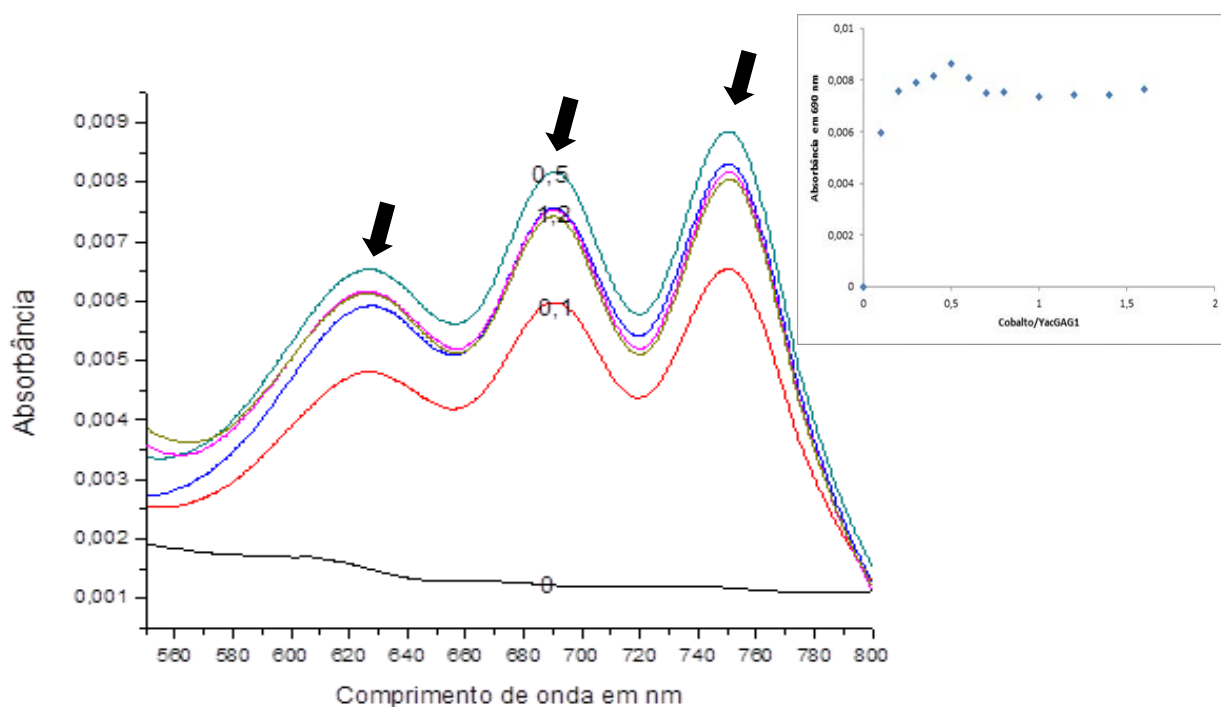


Fonte: Elaborada pelo autor

Como o íon Cobalto (II) é adicionado para uma solução $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de YacGAG1, as bandas de transferência de cargas $\text{Co(II)} \rightarrow \text{S}$ em 320 e 360 nm, bem como as bandas de altas intensidades, das transições *d-d* do íon Co(II) , são crescentes, até a estabilização, que depende da estequiometria do complexo formado e conseqüentemente do número de grupos sulfidrilas coordenadas ao íon metálico (Figuras 33 e 34). Ao acompanhar o aumento de absorbância em qualquer um destes comprimentos de onda (por exemplo, a 360 nm na Figura 33 - inserção), as mudanças espectrais metal-induzidas saturam com quantidades abaixo das

equimolares do íon Co(II) e peptídeo, evidenciando a formação de um complexo na proporção 2:1 de YacGAG1 e Cobalto (II).

Figura 34. Espectros de absorção no visível (550 a 800 nm) de Cobalto (II) coordenado com YacGAG1 com 0, 0,1, 0,5 e 1,2 eq de Co^{+2} . A inserção mostra a dependência da banda de transição $d-d$ a 690 nm com o aumento da quantidade de Co^{+2} adicionado.

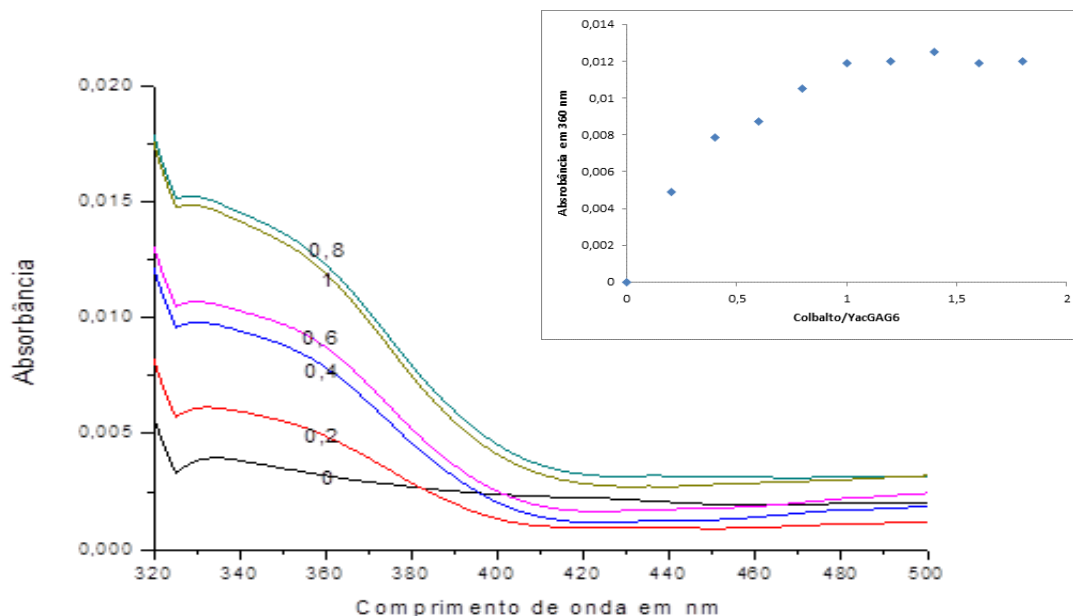


Fonte: Elaborada pelo autor

As mudanças espectrais durante a titulação do peptídeo YacGAG6 (Figuras 35 e 36), resultou em saturação perto de 1 equivalente, resultando em uma provável formação de complexo 1:1 de YacGAG6 e Cobalto (II).

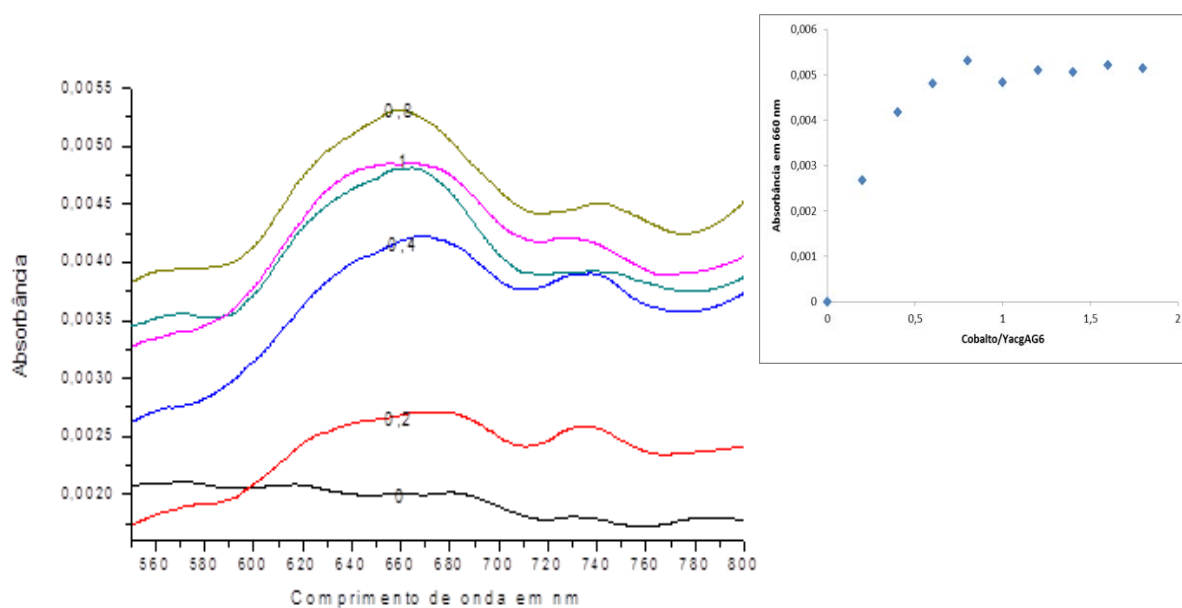
Para YacGAG4, YacGAG5 e YacGAG8, não foram observadas bandas características de transferência de cargas $\text{Co(II)} \rightarrow \text{S}$, tampouco aquelas de altas intensidades atribuídas às transições $d-d$, de acordo portanto com a ausência de grupos tióis livres, nestes peptídeos, resultado da substituição de todos resíduos de cisteína por serina, alanina e histidina, respectivamente. Por representar um segmento diferente da região *zinc-finger*, YacGAG7 não foi titulado com Co^{+2} .

Figura 35. Espectros de absorção no UV-visível de Cobalto (II) coordenado com YacGAG6 com 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1 eq de Co^{+2} . A inserção mostra a dependência da banda de transferência de cargas $\text{Co(II)} \rightarrow \text{S}$ a 360 nm, com o aumento da quantidade de Co^{+2} adicionado.



Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 36. Espectros de absorção no UV-visível de Cobalto (II) coordenado com YacGAG6 com 0, 0,2, 0,4, 0,8 e 1 eq de Co^{+2} . As inserções mostram as bandas de transição $d-d$ a 660 nm com o aumento da quantidade de Co^{+2} adicionado.



Fonte: Elaborada pelo autor

5.10. Dicroísmo circular

YacG de *E. coli* é uma pequena proteína com uma estrutura primária constituída por 65 resíduos de aminoácidos e tem como estruturas secundárias uma α -hélice (resíduos 30 – 37) conectada a duas estruturas β (resíduos 6 – 9 e 14 – 17) por um loop de 12 resíduos de aminoácidos (RAMELOT et al., 2002). Além destas estruturas secundárias, a proteína está coordenada a um íon zinco através de quatro resíduos de cisteína localizadas entre as duas estruturas β , (Cys-9 e Cys-12) e na parte N-terminal da α -hélice (Cys-28 e Cys-32).

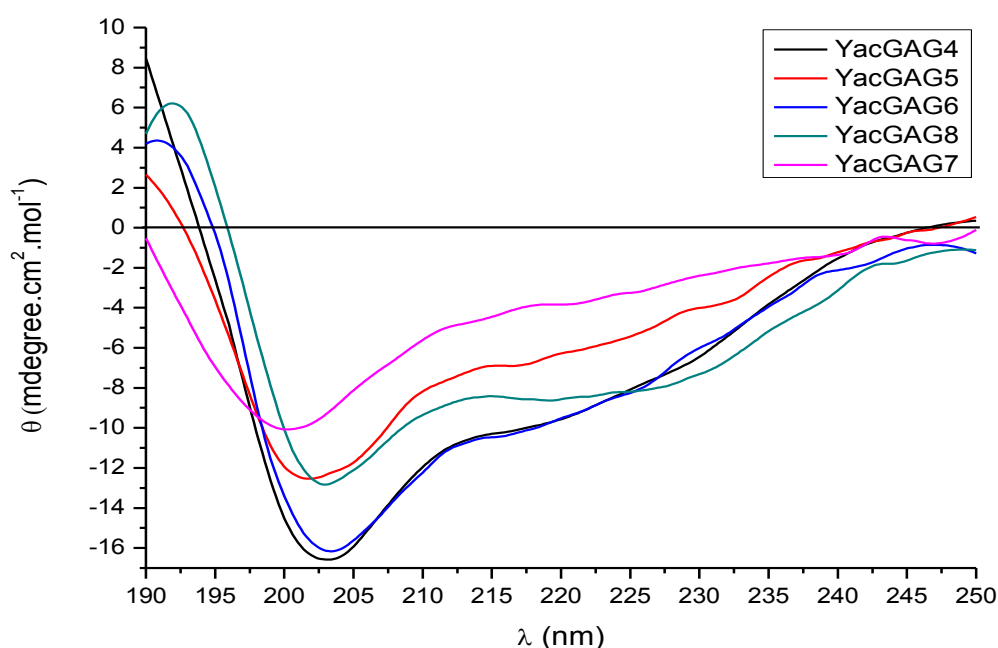
Desde modo o objetivo do ensaio de dicroísmo circular foi identificar as estruturas secundárias presentes nos peptídeos derivados e correlaciona-las com aquelas da proteína nativa, já identificadas por RMN.

As análises foram realizadas conforme descrito na metodologia. Utilizou-se como referência os espectros representados na Figura 20 (Métodos), que mostra as diferentes formas dos espectros de CD, referentes às diferentes estruturas secundárias de proteínas. Na referida figura, a curva (1) representa o espectro característico de estrutura tipo α -hélice, apresentando duas bandas negativas, uma em torno de 208 nm e outra em torno de 222 nm e, uma banda positiva em torno de 198 nm. A curva (2) representa o espectro característico de estrutura tipo folha- β e apresenta uma banda positiva em torno de 196 nm e outra negativa em torno de 218 nm. Já a curva (3) representa o espectro característico de estrutura desordenada, apresentando uma banda negativa com mínimo em torno de 198 nm.

De acordo com os perfis observados nos gráficos de dicroísmo circular (Figura 37) nota-se que os peptídeos derivados de YacG não tem estrutura secundária definida, ou se apresentam como mistura de α -hélice e folha β . Observa-se que os peptídeos YacGAG4, YacgAG5, YacGAG6 e YacGAG8 apresentam um pico máximo positivo em 192 nm e outro pico máximo negativo em 204 nm característicos de α -hélice, contudo apresentam também pico negativo em 218 nm que caracteriza folha β . Com base nestes resultados, observa-se que os peptídeos mantêm uma tendência a assumirem uma estrutura desordenada, embora apresentem picos característicos de estruturas secundárias, mas quando

comparados com YacGAG7 que mantém estrutura desordenada, os demais peptídeos apresentam quase, senão, igual comportamento estrutural.

Figura 37. Espectro de dicroísmo circular dos análogos peptídicos de YacG 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em H_2O deionizada/TFE 60%. Valor da concentração de TFE definido por análise de ensaios anteriores, uma vez observado que a quantidade máxima utilizada para indução da formação de estruturas secundárias é 60%, sendo assim optou-se por não realizar titulação.



Fonte: Elaborada pelo autor

5.11. Inibição da atividade de DNA girase

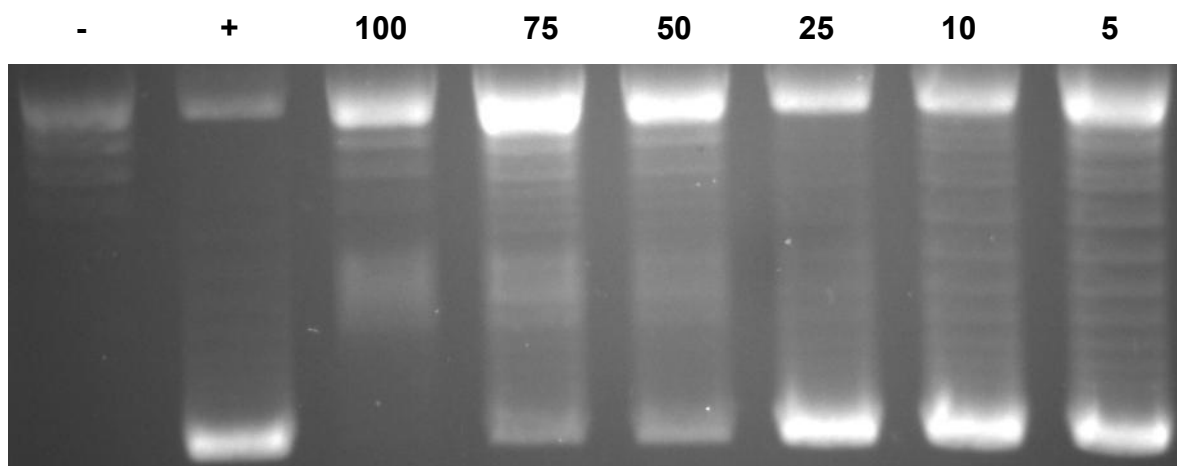
A enzima DNA girase atua introduzindo super-hélices negativas no DNA plasmidial que se encontra na forma relaxada. Diante disto foi possível analisar a ação ou inibição desta, observando os resultados dos géis de agarose obtidos após ensaio de inibição de atividade.

Conforme descrito por Sengupta e Nagajara (2008), YacG de *E. coli* está envolvida na rede interactoma de DNA girase e atua inibindo o superrenovelamento

negativo do DNA, bem como outras atividades desta enzima. Deste modo, o presente ensaio tende a investigar a inibição da atividade de DNA girase por YacG de *Klebsiella pneumoniae* e seus respectivos análogos e fragmentos peptídicos sintéticos.

A Figura 38 mostra o resultado da inibição da DNA girase pela YacG de *Klebsiella pneumoniae*. De acordo com esta figura é possível concluir que YacG tem efeito inibitório sob a ação desta enzima, inativando-a até concentração entre 50 e 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Figura 38. Ensaio da concentração mínima inibitória (CMI) da atividade de DNA girase pela proteína YacG de *Klebsiella pneumoniae*. (-) plasmídeo pBR322 relaxado; (+) plasmídeo pBR322 relaxado + 1U de DNA girase; os números em cada aplicação no gel representam a concentração de YacG em $\mu\text{mol.L}^{-1}$, presente na solução contendo plasmídeo pBR322 relaxado + 1U de DNA girase.



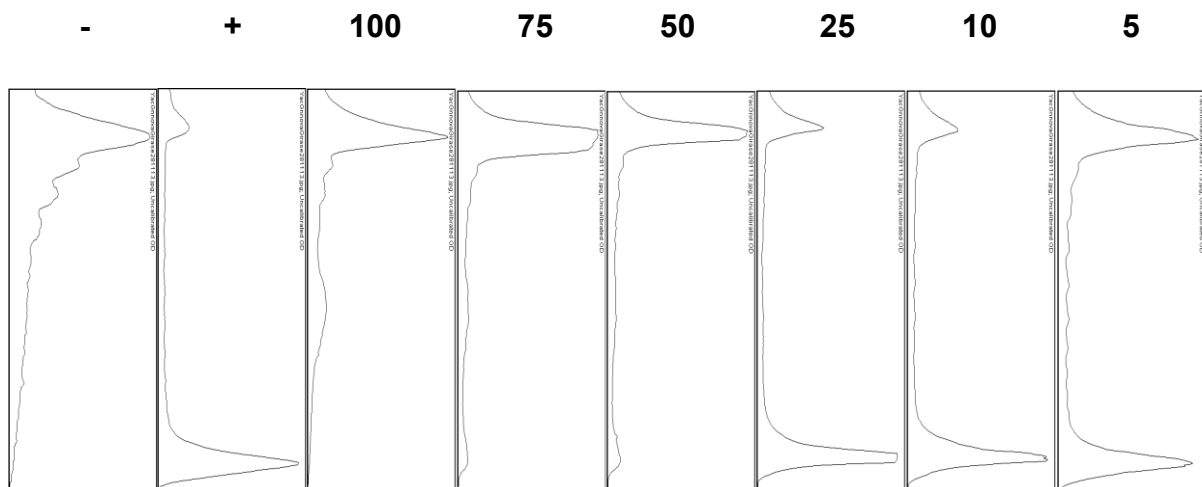
Fonte: Elaborada pelo autor

Para melhor observar e quantificar a atividade de inibição da DNA girase apresentada nos ensaios de eletroforese em gel de agarose, foi feita a densitometria do gel utilizando o software ImageJ (Figura 39). Trata-se de um programa de código

aberto, disponível na Internet. O ImageJ faz a densitometria das bandas obtidas, contando cada microponto de tonalidade escura na foto. Deste modo, traça-se uma relação entre a densidade óptica da banda da sequência-alvo e a densidade óptica da banda controle.

O Programa gera uma curva, cujos picos representam as regiões de maior densidade óptica e, portanto as regiões que apresentam bandas.

Figura 39. Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de inibição da DNA girase por YacG de *Klebsiella pneumoniae*. (-) plasmídeo pBR322 relaxado, (+) plasmídeo pBR322 relaxado + 1U de DNA girase; os números em cada coluna representam a concentração de YacG em $\mu\text{mol.L}^{-1}$, presente na solução contendo plasmídeo pBR322 relaxado + 1U de DNA girase.



Fonte: Elaborada pelo autor

Os dados apresentados na análise de densidade óptica mostram os picos referentes às diferentes bandas apresentadas no gel de eletroforese (Figura 39). O pico do DNA relaxado é representado na parte superior do gráfico enquanto o pico correspondente ao DNA superenovelado encontra-se na parte inferior como

representado nos gráficos (-) e (+) respectivamente. Com os gráficos de densitometria é possível observar com maior precisão a intensidade das bandas e quantificá-las. Estes dados vem confirmar que YacG interfere na atividade de DNA girase até a concentração de 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, onde pode-se observar claramente que 100% do DNA encontra-se em sua forma relaxada, ao contrário dos gráficos representando 25, 10 e 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Embora comprovada a inibição da DNA girase pela YacG de *Klebsiella pneumoniae*, sua capacidade de inibição é bem menor que a de seu análogo encontrado primeiramente em *E.coli*. Segundo Sengupta e Nagajara (2008), YacG de *E. coli* inibe a atividade de DNA girase a uma concentração de 0,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, ou seja 500 vezes mais ativa que o seu análogo de *K. pneumoniae*. Esta diferença, pode estar relacionada com as condições de análise utilizadas por estes autores, ou até mesmo pela presença do tag de histidina utilizada no processo de purificação da proteína e mantido na estrutura primária da proteína purificada, alterando a estruturação da mesma em solução e, conseqüentemente na sua atividade inibitória.

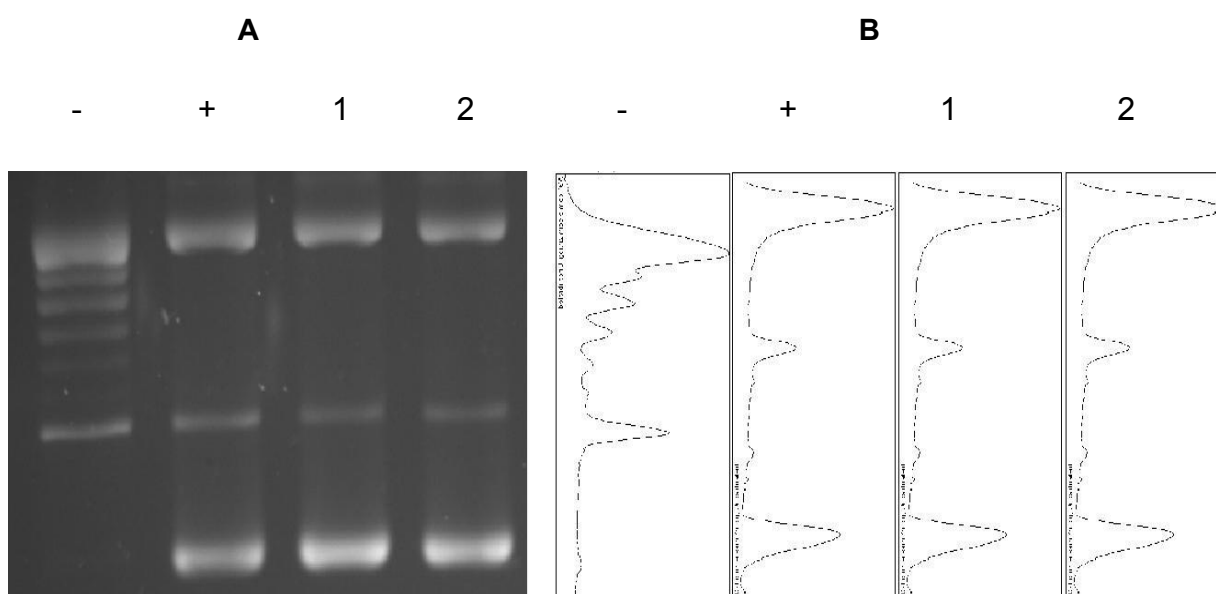
Em relação aos peptídicos sintéticos, inicialmente foi realizada uma triagem utilizando todos os análogos e fragmentos projetados e sintetizados, à concentração de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, a fim de identificar quais exibem potencial de inibição da atividade da DNA girase e avaliar a importância do domínio *zinc finger* no processo, uma vez que este domínio pode interagir com a GyrB e ocluir o local de ligação do DNA, inibindo assim a ação da enzima (VOS et al., 2014).

No caso do fragmento peptídico YacGAG1 optou-se por realizar o ensaio de triagem separado dos demais peptídeos, uma vez que uma possível atividade deste peptídeo é dependente da coordenação do íon Zn^{+2} .

Como pode ser observado (Figura 40), YacGAG1, na presença ou ausência do íon zinco não apresentou ação inibitória da atividade de DNA girase. Este é um dado bastante curioso, uma vez que este domínio é responsável, pela interação com a subunidade B de DNA girase e atua ocluindo o principal sítio de ligação do DNA (VOS et al., 2014). Neste caso é possível, que este domínio isolado, na forma de YacGAG1, não seja suficiente para inibir a DNA girase, uma vez que a interação de YacG nativa e a DNA girase ocorre por um mecanismo bi-partido, onde o domínio

zinc-finger atua formando um complexo com GyrB, ao mesmo tempo que a região C-terminal desta proteína interage com GyrA (VOS et al., 2014).

Figura 40. Ensaio de inibição da atividade de DNA girase pelo análogo peptídico YacGAG1 a $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$. (A) Gel de agarose e (B) Densitometria óptica do gel. (-) plasmídeo pBR322 relaxado, (+) plasmídeo pBR322 relaxado + 1U de DNA girase; Coluna 1: plasmídeo pBR322 relaxado + 1U de DNA girase + YacGAG1 complexado com o Zn^{+2} . Coluna 2: plasmídeo pBR322 relaxado + 1U de DNA girase + YacGAG1 sem Zn^{+2} .

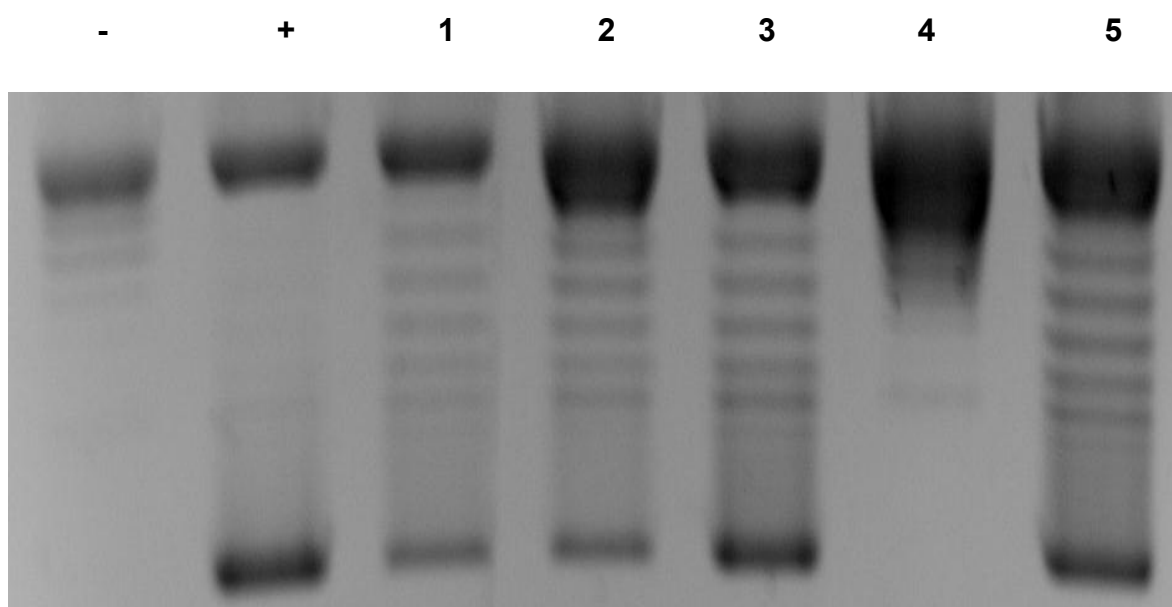


Fonte: Elaborada pelo autor

Por outro lado, a Figura 41 mostra que alguns análogos peptídicos de YacG exercem atividade de inibição de DNA girase, especificamente YacGAG4, YacGAG5 e YacGAG7, este último com plena atividade de inibição, na qual se observa que 100% do DNA encontra-se na forma relaxada. É possível observar também que YacGAG6 e YacGAG8 interferem muito pouco na atividade desta enzima, pois observa-se que a maior parte do DNA encontra-se na forma superenovelada. É possível que, em concentrações superiores a $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, YacGAG6 e YacGAG8 consigam inibir completamente a ação de DNA girase, o que, neste caso, optou-se

em não considerar esta hipótese, pois inibidores que atuam em concentrações desta grandeza não são considerados ideais.

Figura 41. Ensaio de inibição da atividade de DNA girase pelos análogos peptídicos de YacG. (-) plasmídeo pBR322 relaxado, (+) plasmídeo pBR322 relaxado + 1U de DNA girase; (Colunas 1, 2, 3, 4 e 5) plasmídeo pBR322 relaxado + 1U de DNA girase + YacGAG4, YacGAG5, YacGAG6, YacGAG7 e YacGAG8, respectivamente, em concentração de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ cada.



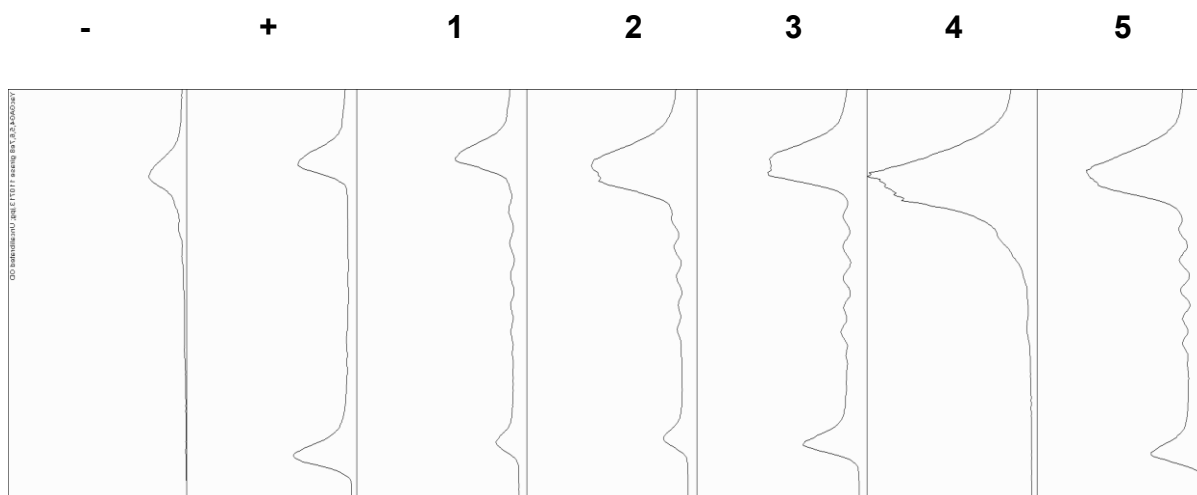
Fonte: Elaborada pelo autor

Os resultados obtidos neste ensaio estão de acordo com aqueles obtidos por VOS e colaboradores (2014), que atribuem a capacidade inibitória de YacG, em grande parte, à sua região C-terminal.

A Figura 42 mostra a densitometria do gel e os respectivos picos referentes ao DNA relaxado e superenovelado obtidos na triagem dos análogos peptídicos de YacG. É possível observar que realmente YacGAG4, YacGAG5 e YacGAG7 interferem na atividade de DNA girase, fato que pode ser evidenciado pela maior

concentração de DNA relaxado em relação ao superenovelado, salvo YacGAG7 que inibe por completo a ação desta enzima.

Figura 42. Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de inibição da DNA girase pelos análogos peptídicos de YacG. (-) plasmídeo pBR322 relaxado, (+) plasmídeo pBR322 relaxado + 1U de DNA girase; (Colunas 1, 2, 3, 4, 5 e 6) plasmídeo pBR322 relaxado + 1U de DNA girase + YacGAG4, YacGAG5, YacGAG6, YacGAG7 e YacGAG8, em concentração de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ respectivamente.

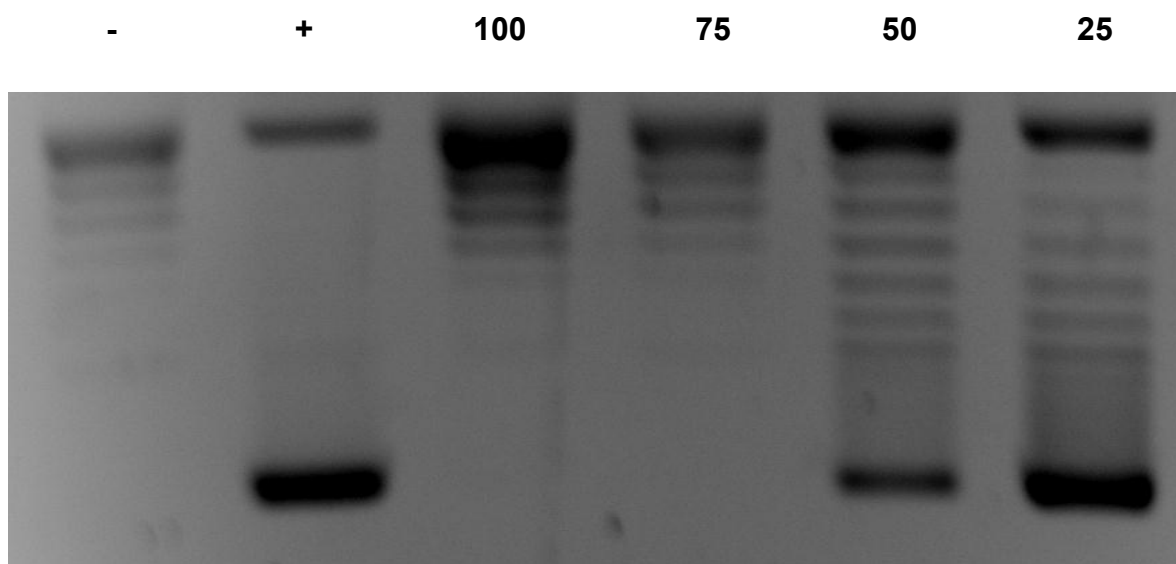


Fonte: Elaborada pelo autor

A partir dos dados obtidos na triagem dos análogos peptídicos de YacG com potencial ação inibitória sob DNA girase, foi possível realizar o ensaio de concentração mínima inibitória.

O ensaio de CMI foi realizado com os análogos YacGAG4, YacGAG5 e YacGAG7, sendo que somente YacGAG7 teve ação inibitória frente a DNA girase em concentrações menores que $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ como mostrado na Figura 43.

Figura 43. Ensaio da concentração mínima inibitória (CMI) da atividade de DNA girase pelo análogo peptídico YacGAG7. (-) plasmídeo pBR322 relaxado, (+) plasmídeo pBR322 relaxado + 1U de DNA girase; os números em cada aplicação no gel representam a concentração de YacGAG7 em $\mu\text{mol.L}^{-1}$, presente na solução contendo plasmídeo pBR322 relaxado + 1U de DNA girase.



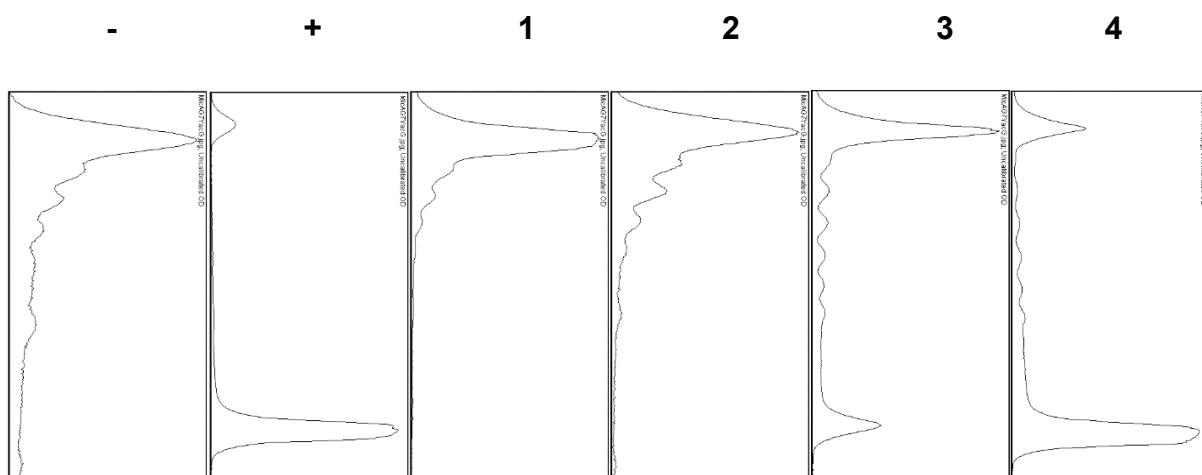
Fonte: Elaborada pelo autor

De acordo com a Figura 43, YacGAG7 inibe por completo a ação de DNA girase até a concentração de $75 \mu\text{mol.L}^{-1}$, como observado nas linhas 1 e 2 da Figura 44. É possível observar também que na concentração de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ YacGAG7 ainda apresenta atividade de inibição, pois mais de 75% do DNA encontra-se na forma relaxada. Em concentrações abaixo de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ YacGAG7 não apresenta qualquer atividade de inibição desta enzima.

De uma maneira geral, os peptídeos que apresentaram melhor atividade inibitória, mesmo que em concentrações elevadas, foram aqueles que não permitem a coordenação do íon zinco. De fato, YacGAG4 e YacGAG5, cujos resíduos de cisteína foram substituídos por serina ou alanina, respectivamente, foram os que apresentaram maior inibição, excetuando YacGAG7 cuja sequência primária representa a extremidade C-terminal da proteína, ao qual já teve sua ação inibitória comprovada anteriormente.

É bem provável que, na ausência de Zn^{+2} , as cadeias peptídicas possam adotar conformações menos rígidas em solução, favorecendo o acesso da região responsável pela atividade inibitória ao sítio de ligação na DNA girase, quando comparadas com YacGAG1, YacGAG6 e YacGAG8, que efetivamente podem coordenar íons zinco, presentes na solução tampão, utilizando os resíduos de cisteína e histidina.

Figura 44. Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de inibição da DNA girase pelo análogo peptídico YacGAG7. (-) plasmídeo pBR322 relaxado, (+) plasmídeo pBR322 relaxado + 1U de DNA girase; (Colunas 1, 2, 3 e 4) plasmídeo pBR322 relaxado + 1U de DNA girase + YacGAG7 em concentrações de 100, 75, 50 e 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ respectivamente.



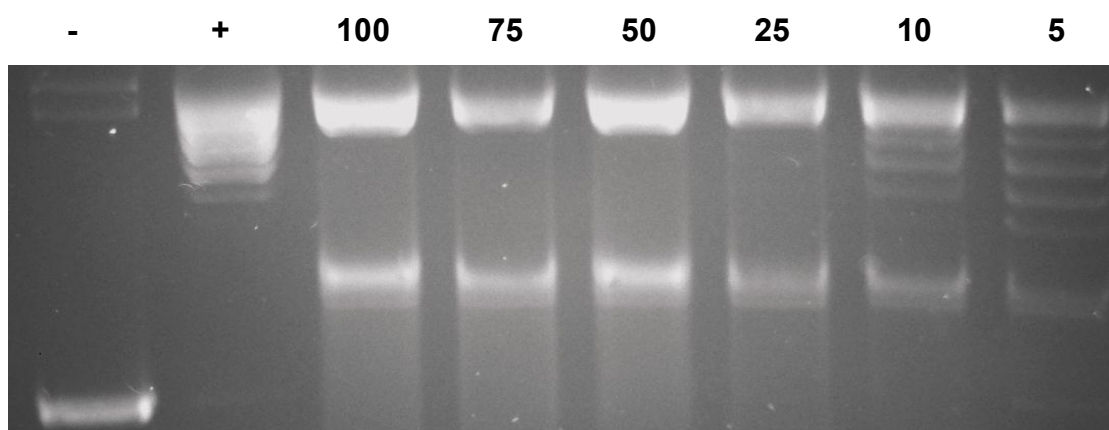
Fonte: Elaborada pelo autor

5.12. Inibição da atividade de Topoisomerase II α humana

A bibliografia disponível, que relaciona a atividade de YacG, restringe-se à enzima DNA girase. Assim sendo, decidiu-se por estender os ensaios de inibição desta proteína para a Topoisomerase II α humana.

Topoisomerase II α humana atua relaxando o superenovelado positivo ou negativo do DNA genômico. Assim como nos ensaios empregados para avaliar ação e/ou inibição de DNA girase é possível utilizar esta mesma metodologia para avaliar sua ação, como mostrado na Figura 45.

Figura 45. Ensaio da concentração mínima inibitória (CMI) da atividade de Topoisomerase II α Humana pela proteína YacG de *Klebsiella pneumoniae*. (-) plasmídeo pBR322 superenovelado, (+) plasmídeo pBR322 superenovelado + 1U de topoisomerase II Humana, os números em cada aplicação no gel representam a concentração de YacG em $\mu\text{mol.L}^{-1}$, presente na solução contendo plasmídeo pBR322 superenovelado + 1U de topoisomerase II Humana.

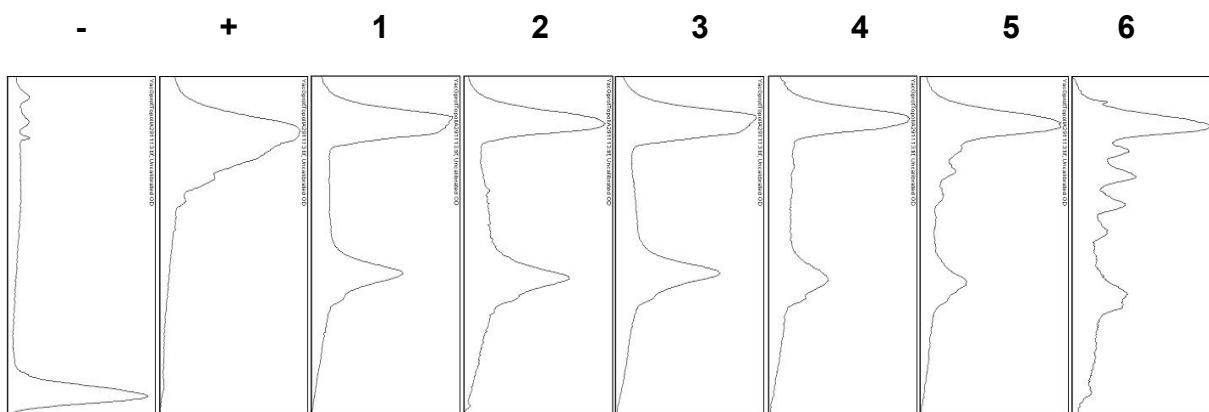


Fonte: Elaborada pelo autor

Os resultados obtidos do ensaio de inibição da ação de Topoisomerase II α humana por YacG, permite concluir que esta pequena proteína, também exerce efeito na atividade desta enzima. Como pode ser observado, a enzima foi incapaz de relaxar o DNA superenovelado na presença de YacG, em concentrações relativamente baixas, porém resultando em uma molécula de DNA em estados topológicos intermediários (topoisômeros).

Nos gráficos gerados a partir da densitometria do gel (Figura 46) é possível observar os topoisômeros, representados como picos em posição intermediárias, entre aqueles que representam o DNA superenovelado (-) e relaxado (+) que se encontram nas extremidades de cada faixa densitométrica. É possível concluir também que YacG tem efeito inibitório sobre Topo II α humana até a concentração de $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Figura 46. Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de inibição de Topoisomerase II α Humana pela proteína YacG de *Klebsiella pneumoniae*. (-) plasmídeo pBR322 superenovelado, (+) plasmídeo pBR322 superenovelado + 1U de topoisomerase II Humana; (Colunas 1, 2, 3, 4, 5 e 6) plasmídeo pBR322 superenovelado + 1U de topoisomerase II Humana + YacG em concentrações de 100, 75, 50, 25,10 e 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ respectivamente.



Fonte: Elaborada pelo autor

A ação de YacG sobre a Topoisomerase II α humana, embora seu mecanismo de ação não tenha sido definido, desperta curiosidade. Assim, pode-se especular que YacG venha a interagir com esta enzima pelos mesmos mecanismos envolvidos no processo de interação que a DNA girase, embora a Topoisomerase II α humana em sua forma ativa seja um homodímero, diferentemente da DNA girase que é um heterotetrâmero. Contudo estas enzimas compartilham os mesmos domínios de ligação do ATP e DNA, bem como o domínio de clivagem e religação das fitas, diferindo apenas em sua composição de aminoácidos, o que leva a pensar que os mecanismos de ação estejam relacionados, embora necessite de estudos mais aprofundados para se concluir a esse respeito.

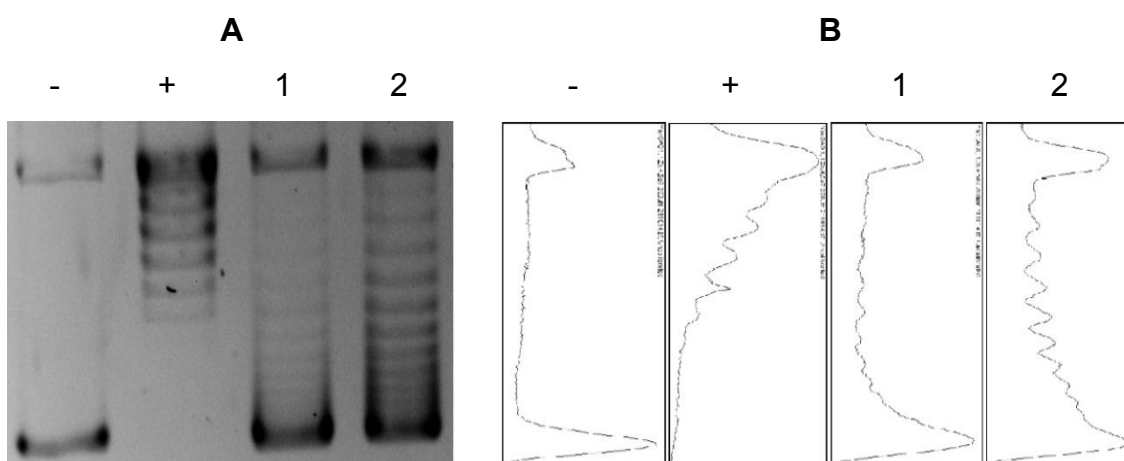
O ensaio de inibição da atividade de Topoisomerase II α humana foi também realizado com os análogos peptídicos de YacG a concentração de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, a fim de fazer a triagem dos peptídeos com potencial ação contra esta enzima, e assim realizar o ensaio de CMI.

Assim como no ensaio realizado com DNA girase, aqui também optou-se por fazer o ensaio com o fragmento peptídico YacGAG1 separado dos demais devido a sua coordenação metálica.

Inicialmente foi realizado o ensaio a concentração de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$. A análise do gel revelou a formação de vários estados topológicos intermediários, deixando assim a dúvida com relação a ação de YacGAG1 (dados não mostrados). Com isso resolveu-se aumentar a concentração do peptídeo para $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ afim de se obter dados mais confiáveis e discutíveis.

Ao contrário do que foi evidenciado para DNA girase, o peptídeo YacGAG1 tanto na presença, quanto na ausência de Zn^{+2} , apresentou inibição da atividade de Topoisomerase II α humana a concentração de $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$, o que pode ser evidenciado pela permanência da banda do DNA superenovelado nas colunas 1 e 2 (Figura 47).

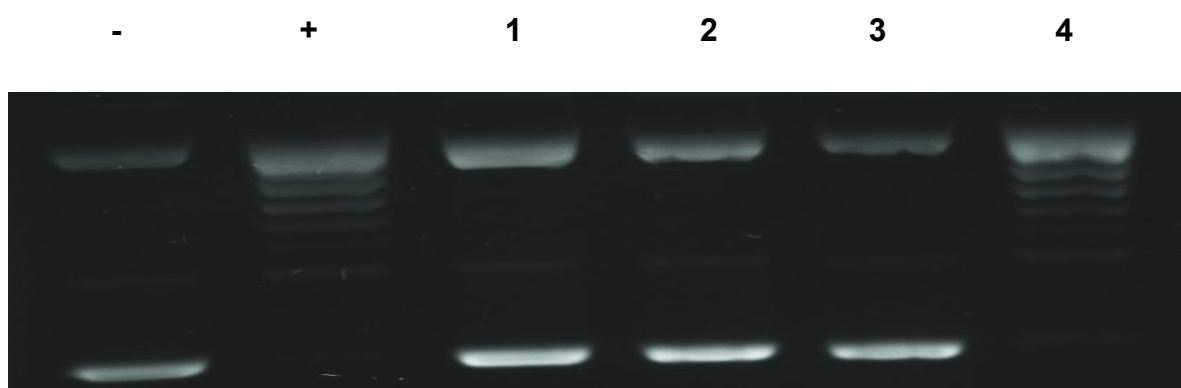
Figura 47. Ensaio de inibição da atividade de Topoisomerase II α Humana pelo fragmento peptídico YacGAG1. (A) gel de agarose e (B) Densitometria do gel. (-) plasmídeo pBR322 superenovelado, (+) plasmídeo pBR322 superenovelado + 1U de topoisomerase II Humana; Coluna 1: plasmídeo pBR322 superenovelado + 1U de topoisomerase II Humana + YacGAG1 sem Zn^{+2} ; Coluna 2: plasmídeo pBR322 superenovelado + 1U de topoisomerase II Humana + YacGAG1 complexado com Zn^{+2} a concentração de $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$.



Fonte: Elaborada pelo autor

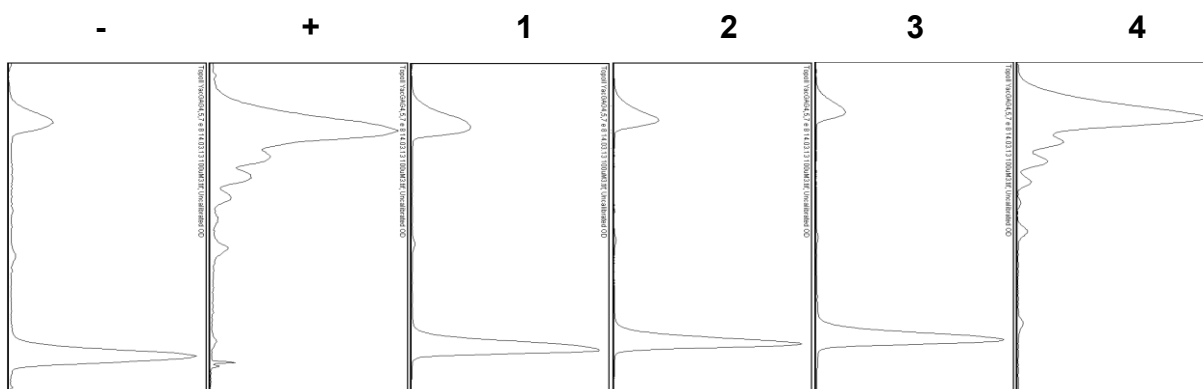
Os peptídeos YacGAG4, YacGAG5 e YacGAG7 também demonstraram capacidade de inibir a atividade desta enzima a concentração de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, porém YacGAG8 não, como pode ser observado nas Figuras 48 e 49.

Figura 48. Ensaio da concentração mínima inibitória (CMI) da atividade de Topoisomerase II α Humana pelos análogos peptídicos YacG. (-) plasmídeo pBR322 superenovelado, (+) plasmídeo pBR322 superenovelado + 1U de topoisomerase II Humana; (Colunas 1, 2, 3, 4 e 5) plasmídeo pBR322 superenovelado + 1U de topoisomerase II Humana + YacGAG4, YacGAG5, YacGAG7 e YacGAG8 a concentração de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente.



Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 49. Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de inibição de Topoisomerase II α Humana pelos análogos peptídicos YacG. (-) plasmídeo pBR322 superenovelado, (+) plasmídeo pBR322 superenovelado + 1U de topoisomerase II Humana, (Linhas 1, 2, 3, 4 e 5) plasmídeo pBR322 superenovelado + 1U de topoisomerase II Humana + YacGAG4, YacGAG5, YacGAG7 e YacGAG8 a concentração de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente.

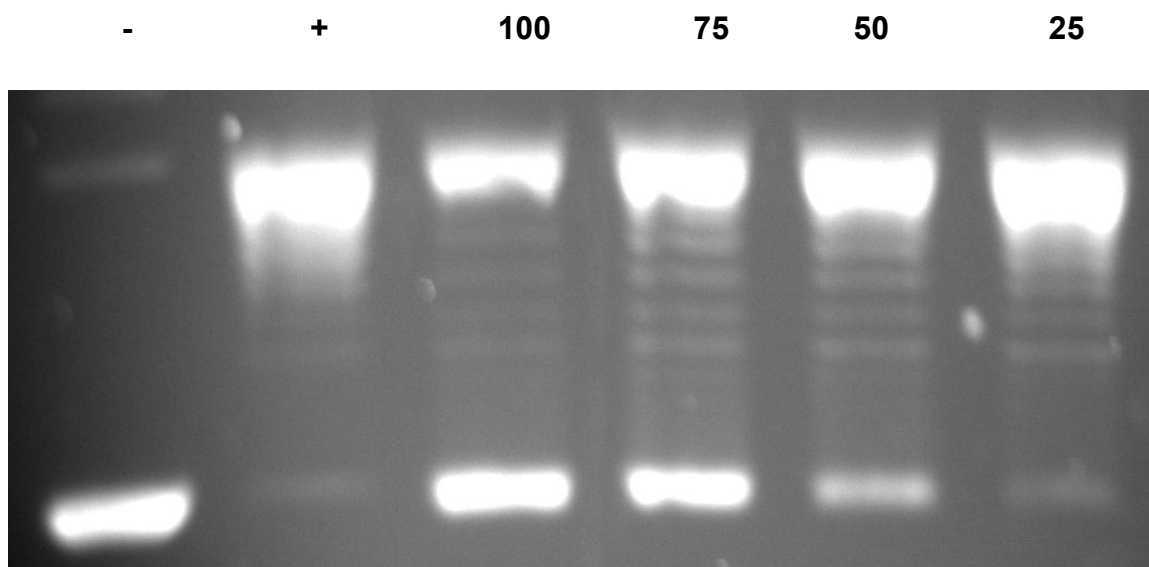


Fonte: Elaborada pelo autor

A partir desta triagem inicial, foi possível identificar os peptídeos com ação inibitória sobre a atividade da Topoisomerase II α humana e assim realizar ensaios de CMI, utilizando diluição seriada.

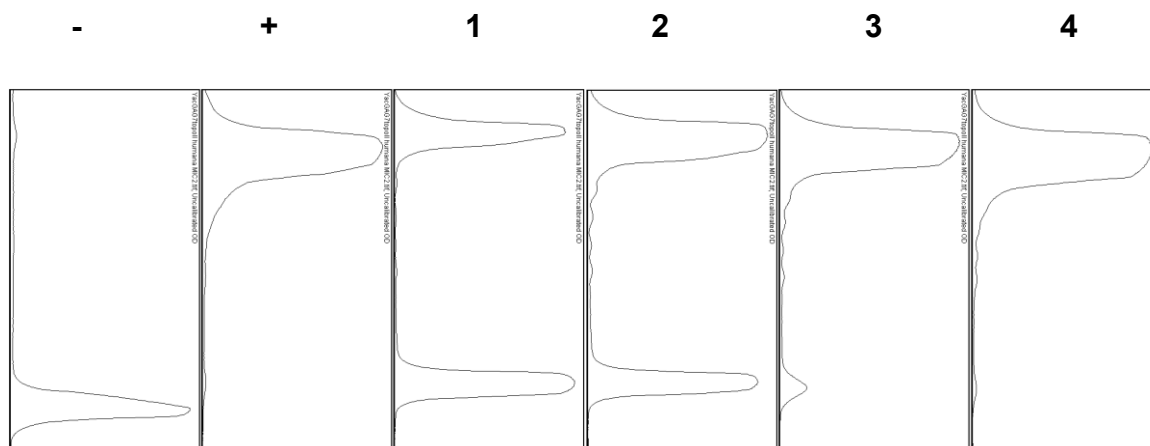
Os peptídeos YacGAG1, YacGAG4 e YacGAG5 não apresentaram atividade de inibição em concentrações abaixo de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Por outro lado, ensaios de CMI para YacGAG7 frente a Topoisomerase II α humana (Figuras 50 e 51), mostram que este análogo peptídico exibe atividade de inibição total desta enzima até a concentração de 75 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Também é possível observar inibição parcial em concentrações inferiores.

Figura 50. Ensaio da concentração mínima inibitória (CMI) da atividade de Topoisomerase II α Humana pelo análogo peptídico YacGAG7. (-) plasmídeo pBR322 superenovelado, (+) plasmídeo pBR322 superenovelado + 1U de topoisomerase II Humana, os números em cada aplicação no gel representam a concentração de YacGAG7 em $\mu\text{mol. L}^{-1}$, presente na solução contendo plasmídeo pBR322 superenovelado + 1U de topoisomerase II Humana.



Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 51. Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de CMI de Topoisomerase II α Humana pelo análogo peptídico YacGAG7. (-) plasmídeo pBR322 superenovelado, (+) plasmídeo pBR322 superenovelado + 1U de topoisomerase II Humana, (Colunas 1, 2, 3 e 4) plasmídeo pBR322 superenovelado + 1U de topoisomerase II Humana + YacGAG7 em concentrações de 100, 75, 50 e 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ respectivamente.



Fonte: Elaborada pelo autor

No planejamento, do peptídeo YacGAG7 foi adotada, na simplificação estrutural, a exclusão das estruturas secundárias presentes na proteína, com a proposta de avaliar a importância do segmento C-terminal, desestruturado, na atividade inibitória do YacG, ao contrário da proposta dos demais peptídeos, de se avaliar as estruturas secundárias características do grupo *Treble clef finger* dos *zinc-finger*.

Comparativamente à YacG, YacGAG7 apresentou o mesmo comportamento de perda de atividade inibitória sobre ambas as enzimas. Para a DNA girase, a perda de atividade resultante do procedimento de simplificação estrutural, foi menos evidente (1,5 vezes) se comparada à enzima Humana (10 vezes), permitindo concluir que YacG atua por mecanismos distintos no processo de inibição destas enzimas.

A ação de YacG, bem como a de seus análogos peptídicos sobre a atividade da Topoisomerase II α humana, complementam os resultados obtidos por SENGUPTA e NAGAJARA (2008) e VOS e colaboradores (2014). Estes autores citam que YacG atua como um inibidor específico de DNA girase, o que não é

verdade, uma vez que os resultados ora apresentados são bem conclusivos em relação à inibição da Topoisomerase II α Humana. YacG e seus peptídeos derivados, não só inibiram a atividade de Topoisomerase II α Humana, como o fizeram com maior eficiência, quando comparado à DNA girase.

5.13. Estudos de interação por Anisotropia de Fluorescência

Conforme já descrito detalhadamente, a DNA girase é formada por quatro subunidades proteicas, sendo duas GyrA e duas GyrB. A forma ativa da enzima consiste, portanto em um heterotetrâmero A₂B₂ (MAXWELL, 1993).

Estudos mostram que a proteína YacG é um inibidor da DNA girase (VOS et al., 2014), atuando diretamente na subunidade GyrB da enzima. Nesse contexto, utilizando a proteína YacG como modelo para a obtenção dos peptídeos em estudo, buscou-se investigar qual a subunidade envolvida na interação, tanto da proteína YacG, como dos peptídeos que apresentaram inibição da atividade da DNA girase nos ensaios de eletroforese.

Uma abordagem para avaliar esta interação é a observação de fluorescência extrínseca por anisotropia de fluorescência. Esta técnica envolve a marcação de proteínas de interesse com um fluoróforo repórter e o monitoramento da polarização da fluorescência das proteínas marcadas em solução.

O fluoróforo presente na proteína possui vetores de absorção e emissão alinhados em direções específicas relativas a suas estruturas moleculares. Desta forma, quando um fluoróforo é excitado com luz plano-polarizada, a emissão resultante também é plano-polarizada, porém não necessariamente na mesma direção da excitação. Para uma molécula fluorescente em solução e, conseqüentemente, em rotação difusiva livre, a luz emitida pode adotar todas as direções de polarização possíveis, já que as moléculas estarão orientadas de forma aleatória e dinâmica. Esta amostra quando excitada com uma luz polarizada em uma determinada direção, e a polarização da luz fluorescente total sendo medida, obter-se-ia a média de um enorme número de orientações dinâmicas, ou seja, uma luz com baixo grau de anisotropia, porém tais variações podem indicar interação de uma molécula marcada com um ligante de interesse.

Há fenômenos que podem afetar o nível de anisotropia de fluorescência de um fluoróforo, um deles está relacionado com o tamanho efetivo da molécula marcada, já que a anisotropia desta é tanto menor quanto mais rápida é a velocidade de rotação da molécula, porque esta velocidade é diretamente proporcional à quantidade de orientações que o fluoróforo adota durante o tempo de medida. Como resultado o grau de anisotropia emitido pelo fluoróforo é inversamente proporcional a sua velocidade de rotação e diretamente proporcional ao seu tamanho molecular, já que moléculas maiores possuem rotações mais lentas. Este princípio possibilita monitorar a formação de complexos entre moléculas marcadas e ligantes potenciais, pois o complexo resultante terá dimensões moleculares maiores e conseqüentemente uma rotação mais lenta e uma emissão mais anisotrópica, comparada à molécula marcada livre. O segundo fenômeno envolve a mobilidade local do fluoróforo, em uma escala temporal muito menor ao efeito anterior. A interação da molécula marcada com o ligante de interesse pode alterar a mobilidade local do fluoróforo com conseqüências para a anisotropia de emissão deste, de forma análoga ao efeito descrito acima. Conseqüentemente, ambos os fenômenos irão contribuir para o nível de anisotropia de fluorescência da molécula marcada.

Para maximizar a observação da anisotropia de fluorescência, ao se analisar a interação entre duas proteínas, pode-se marcar com o fluoróforo a proteína de tamanho menor, pois assim, ao formar-se o complexo, a redução de sua velocidade de rotação será maior que no caso inverso. Neste caso, escolheu-se a proteína YacG e os peptídeos derivados como moléculas para marcação, já que a massa molecular destes, é bem menor que a massa molecular de qualquer uma das subunidades da enzima DNA girase.

Na marcação de YacG e respectivos peptídeos foi utilizado FITC, seguindo as condições do fornecedor, no qual a marcação completa resulta da razão molar entre fluoróforo/peptídeo dada pela equação descrita em Métodos. Tal razão deve estar entre 0,3 e 1, sendo que valores menores resultam em perda de sinal e valores acima resulta em elevados desvios na leitura de fluorescência. Sendo assim para os ensaios de anisotropia de fluorescência escolheu-se as frações com razão molar dentro destes valores (Tabela 12).

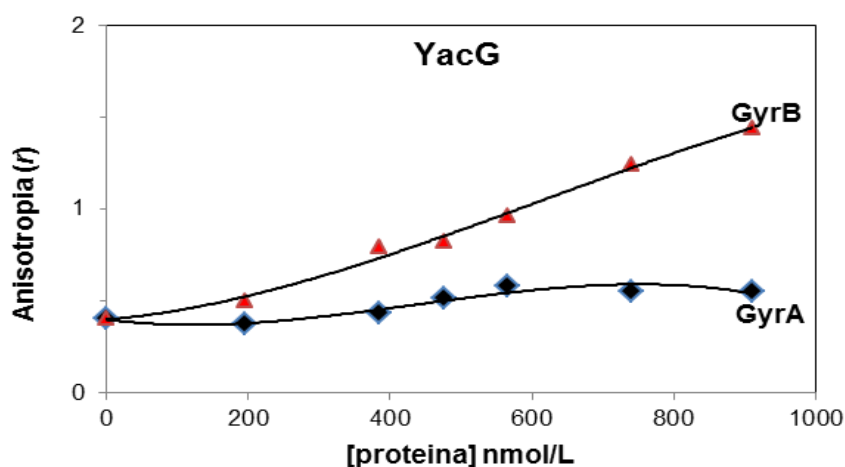
Tabela 12. Frações escolhidas dos peptídeos marcados com FITC.

Proteína/Peptídeo	Fração	Razão molar F/P
YacG	3	0,87
YacGAG1	4	0,31
YacGAG4	3	0,35
YacGAG5	1	0,49

Uma vez confirmada a derivatização dos peptídeos o ensaio de anisotropia de fluorescência pôde ser realizado. Inicialmente, 500 nmol.L⁻¹ de YacG marcada foi misturado a quantidades crescentes de GyrA ou GyrB (em nmol.L⁻¹) e a anisotropia de fluorescência medida ($\lambda_{exc} = 495$ nm e $\lambda_{emis} = 515$ nm)

A Figura 52 mostra que houve um aumento da anisotropia quando YacG foi titulada com quantidades crescentes de GyrB. Em relação a GyrA, a anisotropia permaneceu praticamente constante. Isso evidencia a ligação de YacG à GyrB, resultado que corrobora os resultados obtidos por SENGUPTA e NAGAJARA (2008).

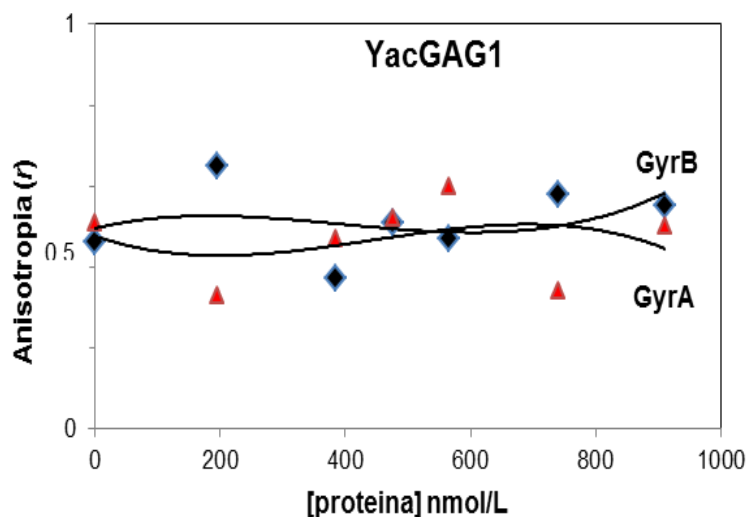
Figura 52. Análise da formação de complexos de YacG com GyrA e GyrB por anisotropia de fluorescência. Uma amostra de 500 nmol.L⁻¹ de YacG marcada com FITC foi titulada com GyrA e GyrB e a anisotropia de fluorescência medida ($\lambda_{exc} = 495$ nm e $\lambda_{em} = 515$ nm).



Fonte: Elaborada pelo autor

Por outro lado, o peptídeo YacGAG1 (que compreende a região zinc-finger de YacG) não demonstrou nenhuma interação com nenhuma das subunidades da DNA girase, como pode ser observado pela constância nos valores de anisotropia, com o aumento da concentração das subunidades GyrA e GyrB (Figura 53). De certa forma, este resultado contradiz dados recentes que comprovam a participação do domínio *zinc finger* de YacG (mantido em YacGAG1) no processo de interação com a subunidade B da DNA girase (VOS et al., 2014). Provavelmente, a simplificação estrutural relativa ao *design* do peptídeo, resultou em uma estrutura mais rígida, devido à ausência da região C-terminal, reconhecidamente desestruturada e flexível de YacG. Com isso, este peptídeo não foi capaz de interagir com a enzima, independentemente da subunidade, e conseqüentemente não inibindo-a, como demonstrado nos ensaios de inibição de atividade da DNA girase.

Figura 53. Análise da formação de complexos de YacGAG1 com GyrA e GyrB por anisotropia de fluorescência. Uma amostra de 500 nmol.L⁻¹ de YacGAG1 marcada com FITC foi titulada com GyrA e GyrB e a anisotropia de fluorescência medida ($\lambda_{exc}= 495$ nm e $\lambda_{em}= 515$ nm).



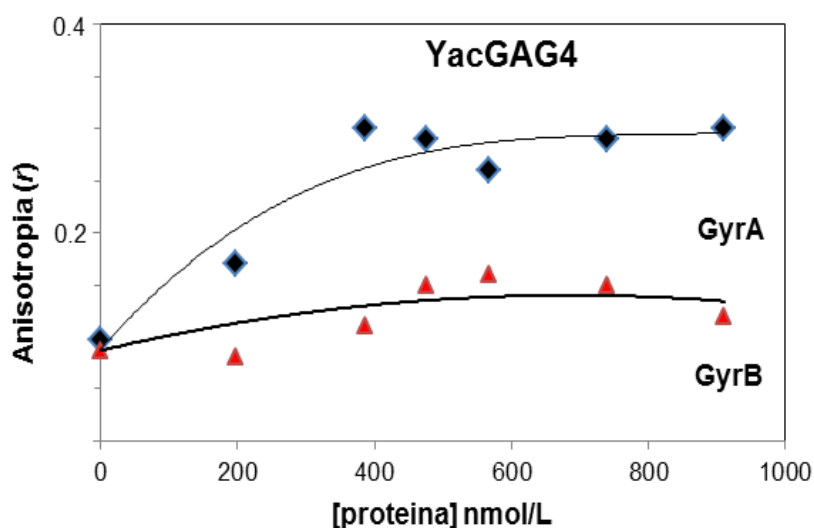
Fonte: Elaborada pelo autor

Curiosamente, o peptídeo YacGAG4, incapaz de coordenar ao íon zinco, por ter os resíduos de cisteína substituídos por serina, apresentou interação com a

subunidade GyrA de DNA girase (Figura 54). Mesmo com a mudança pontual nos resíduos de cisteína, esperava-se que, perdesse a capacidade de interagir com a enzima ou ao menos mantivesse a capacidade de interagir com a subunidade GyrB, tal como a proteína nativa.

Com a substituição dos resíduos de cisteína, a capacidade de coordenação ao zinco foi perdida e o domínio *zinc finger* desfeito na molécula de YacGAG4. Além disso, os resíduos de serina inseridos em substituição à cisteína, tornou o peptídeo mais hidrofílico, com menor rigidez estrutural, o que deve ter promovido sua interação com GyrA.

Figura 54. Análise da formação de complexos de YacGAG4 com GyrA e GyrB por anisotropia de fluorescência. Uma amostra de 500 nmol.L⁻¹ de YacGAG4 marcada com FITC foi titulada com GyrA e GyrB e a anisotropia de fluorescência medida (λ_{exc} = 495 nm e λ_{em} = 515 nm).



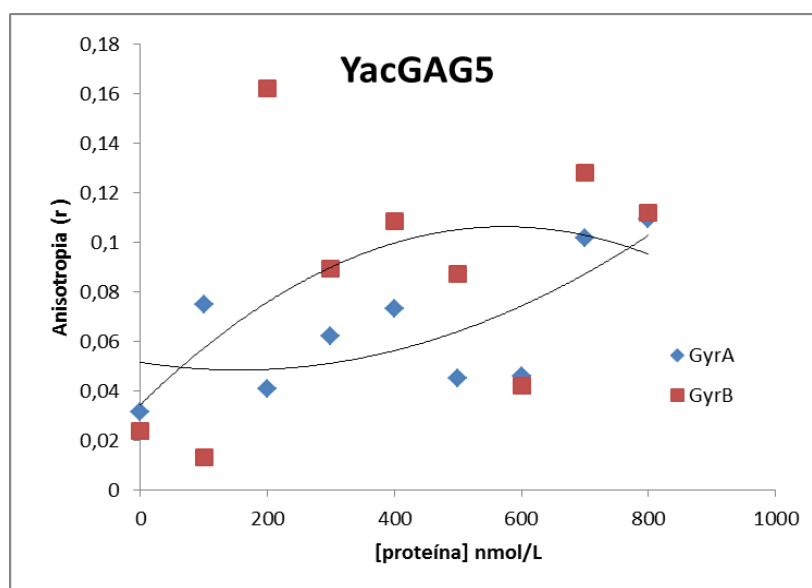
Fonte: Elaborada pelo autor

Esta interação, corrobora os resultados obtidos nos estudos de inibição da atividade da DNA girase. YacGAG4 foi capaz de inibir a atividade da DNA girase, a uma concentração de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, resultado não observado para YacGAG1. Em

YacGAG4, o domínio *zinc finger* foi desfeito, o que deve ter favorecido as interações com a subunidade GyrA, resultando em inibição da atividade da DNA girase (Figuras 41 e 42).

No caso do peptídeo YacGAG5, os dados resultantes da anisotropia, diferentemente daqueles obtidos para YacG, YacGAG1 e YacGAG4, mostraram grandes variações durante a titulação com GyrA ou GyrB (Figura 55). Porém, uma linha de tendência polinomial reflete variações crescentes para ambas subunidades, indicando interações tanto com GyrA quanto com GyrB.

Figura 55. Análise da formação de complexos de YacGAG5 com GyrA e GyrB por anisotropia de fluorescência. Uma amostra de 500 nmol.L⁻¹ de YacGAG5 marcada com FITC foi titulada com GyrA e GyrB e a anisotropia de fluorescência medida (λ_{exc} = 495 nm e λ_{em} = 515 nm).



Fonte: Elaborada pelo autor

YacGAG5, assim como o peptídeo YacGAG4, foi desenhado, considerando a substituição dos quatro resíduos de cisteína. Diferentemente de YacGAG4, os

resíduos de cisteína, foram substituídos por alanina, um aminoácido mais hidrofóbico que a serina, mas que igualmente desfaz o domínio *zinc finger*. Esta diferença de hidrofobicidade, comparativamente a YacGAG4, fez de YacGAG5, um peptídeo com capacidade de interação com ambas proteínas GyrA e GyrB, o que resultou em inibição da atividade da DNA girase (Figuras 41 e 42).

Os ensaios de anisotropia de fluorescência não foram estendidos para os peptídeos YacGAG6 e YacGAG8, pois estes não inibiram a atividade da DNA girase. Um eventual estudo de anisotropia, poderia resultar em um comportamento semelhante àquele obtido para YacGAG1, pois ambos, apesar de terem substituídos parcial ou totalmente os resíduos de cisteína, o tiveram por resíduos de histidina, reconhecidamente capaz de coordenar íons zinco e consequentemente preservar o domínio *zinc finger* que, aparentemente é responsável pela falta de atividade inibitória, por incapacidade de interação com qualquer que seja a subunidade da enzima.

5.14. Avaliação da ação bacteriostática dos análogos peptídicos de YacG por ensaio de susceptibilidade bacteriana em meio líquido.

Para uma avaliação da ação bacteriostática dos análogos peptídicos de YacG, utilizou-se o método de micro diluição em caldo como descrito em Métodos. Para isso, amostras dos peptídeos, a $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ foi incubada com bactérias do tipo gram-negativa e positiva em uma placa de 96 poços contendo caldo Mueller Hinton em incubadora e realizou-se leituras a 625 nm no período de 5 e 16 horas afim de fazer uma triagem inicial para posteriormente aqueles que apresentarem atividade serem submetidos aos ensaios de CMI.

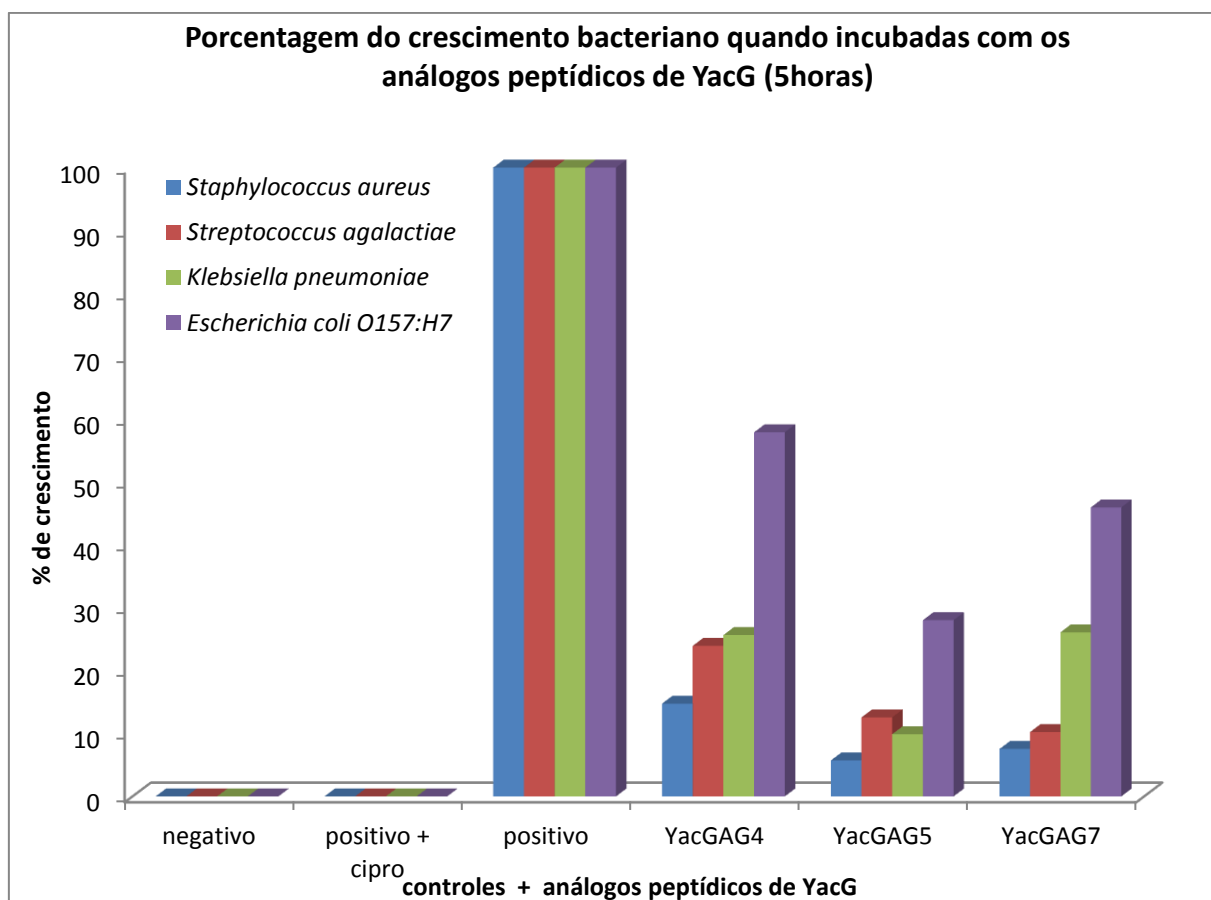
A Figura 56 mostra a porcentagem de crescimento bacteriano durante um período de incubação de 5 horas com os respectivos peptídeos ensaiados.

É possível observar que no período de incubação, os peptídeos YacGAG4, YacGAG5 e YacGAG7, reduziram ou retardaram de modo considerável o crescimento bacteriano, ao qual não ultrapassam de 30% quando comparado ao controle de crescimento positivo, exceto no caso de YacGAG4 e YacGAG7 onde

para a bactéria gram-negativa *E. coli* O157:H7 (EHEC) o crescimento foi de aproximadamente 60 e 45% respectivamente, mas ainda sendo um resultado considerável.

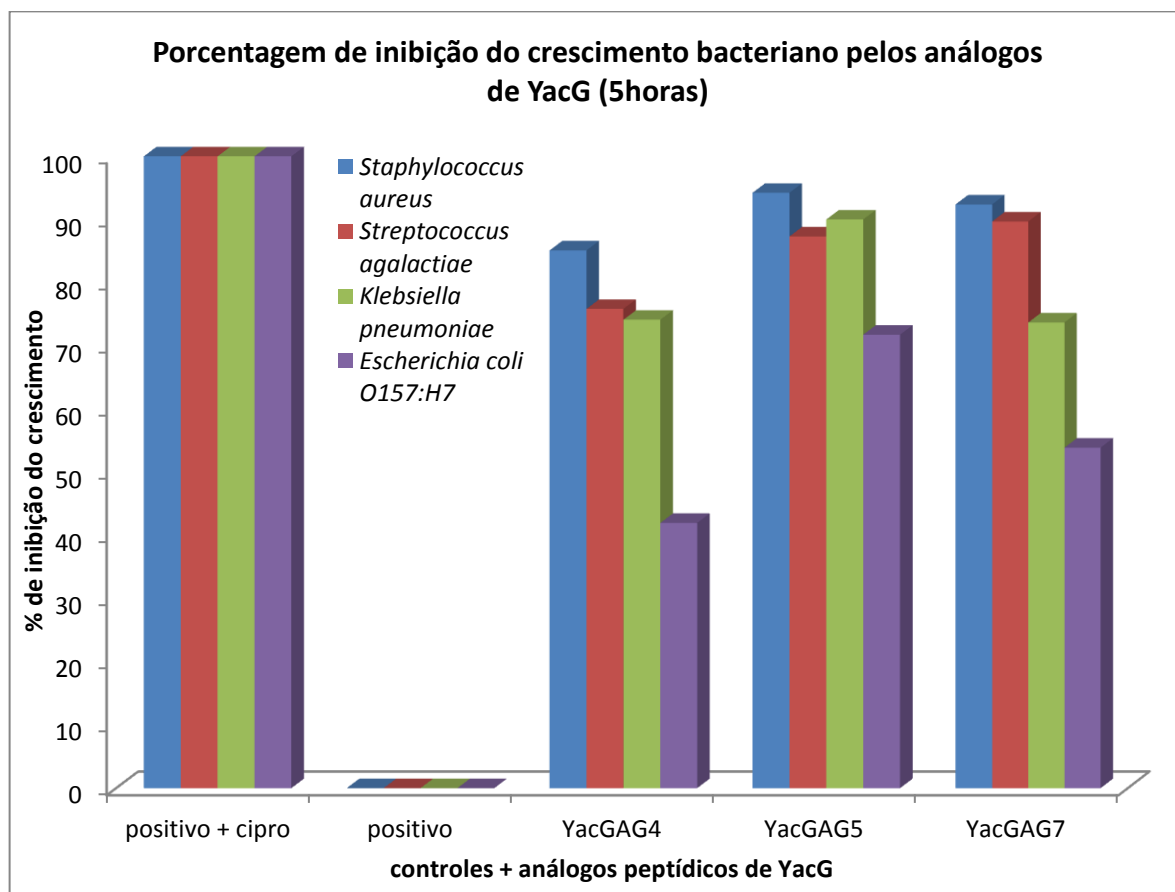
Para uma melhor visualização, os dados representados na Figura 56, foi também plotado em um gráfico da porcentagem de inibição do crescimento (Figura 57).

Figura 56. Ensaio de susceptibilidade bacteriana em meio líquido com os peptídeos YacGAG4, YacGAG5 e YacGAG7 incubados a 5 horas ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$). (Negativo): Caldo Mueller Hinton; (Positivo + cipro): Caldo Mueller Hinton + inóculo de bactérias + ciprofloxacino ($5 \mu\text{mol.L}^{-1}$); (YacGAG4, YacGAG5 e YacGAG7): Caldo Mueller Hinton + inóculo de bactérias + os respectivos peptídeos. Volume final $100 \mu\text{L}$, leitura a 625 nm .



Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 57. Porcentagem de inibição do crescimento bacteriano pelos análogos peptídicos com 5 horas de incubação.

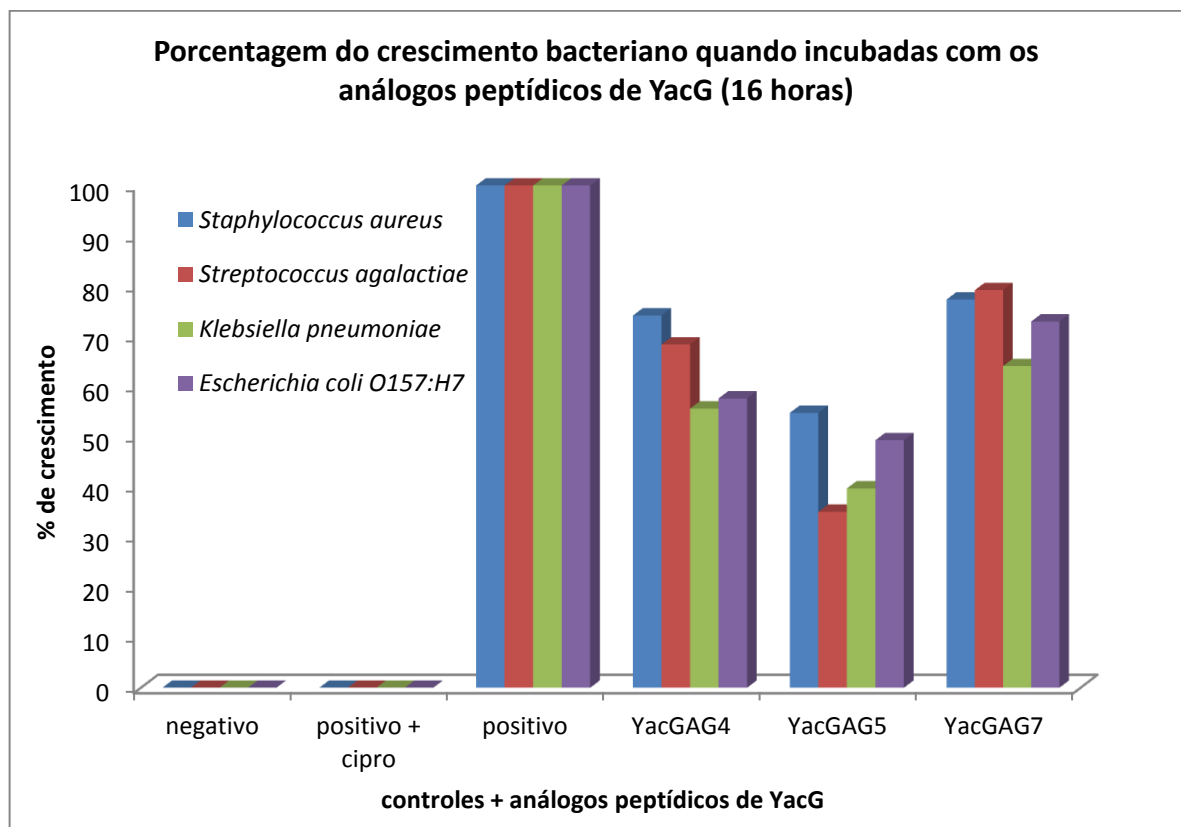


Fonte: Elaborada pelo autor

Aqui é possível observar claramente que os peptídeos utilizados neste ensaio, inibem o crescimento bacteriano de forma muito considerável, sendo que todos conseguem inibir mais de 70% do crescimento, exceto para *E. coli* O157:H7 (EHEC) como citado anteriormente. O peptídeo que obteve maior sucesso em inibir o crescimento bacteriano foi YacGAG5 que além de conseguir inibir mais de 70% do crescimento de todos os microrganismos, obteve a maior atividade contra *Staphylococcus aureus*, no qual inibiu mais de 90% de seu crescimento.

Para o período de 16 horas de incubação, os resultados mostram que os microrganismos apresentaram um crescimento acima dos 50% na escala de porcentagem, exceto *Streptococcus agalactiae* e *Klebsiella pneumoniae* na presença de YacGAG5 (Figura 58). Diante disto é possível notar que o período de incubação mais longo proporcionou aos microrganismos dobrar, ou até triplicar seu crescimento, quando comparado com o período de 5 horas, a exemplo de *Staphylococcus aureus* que apresentou anteriormente um crescimento entre 10 a 20% na escala e quando se submeteu a um tempo maior de incubação conseguiu triplicar seu crescimento, chegando a quase 80% na escala.

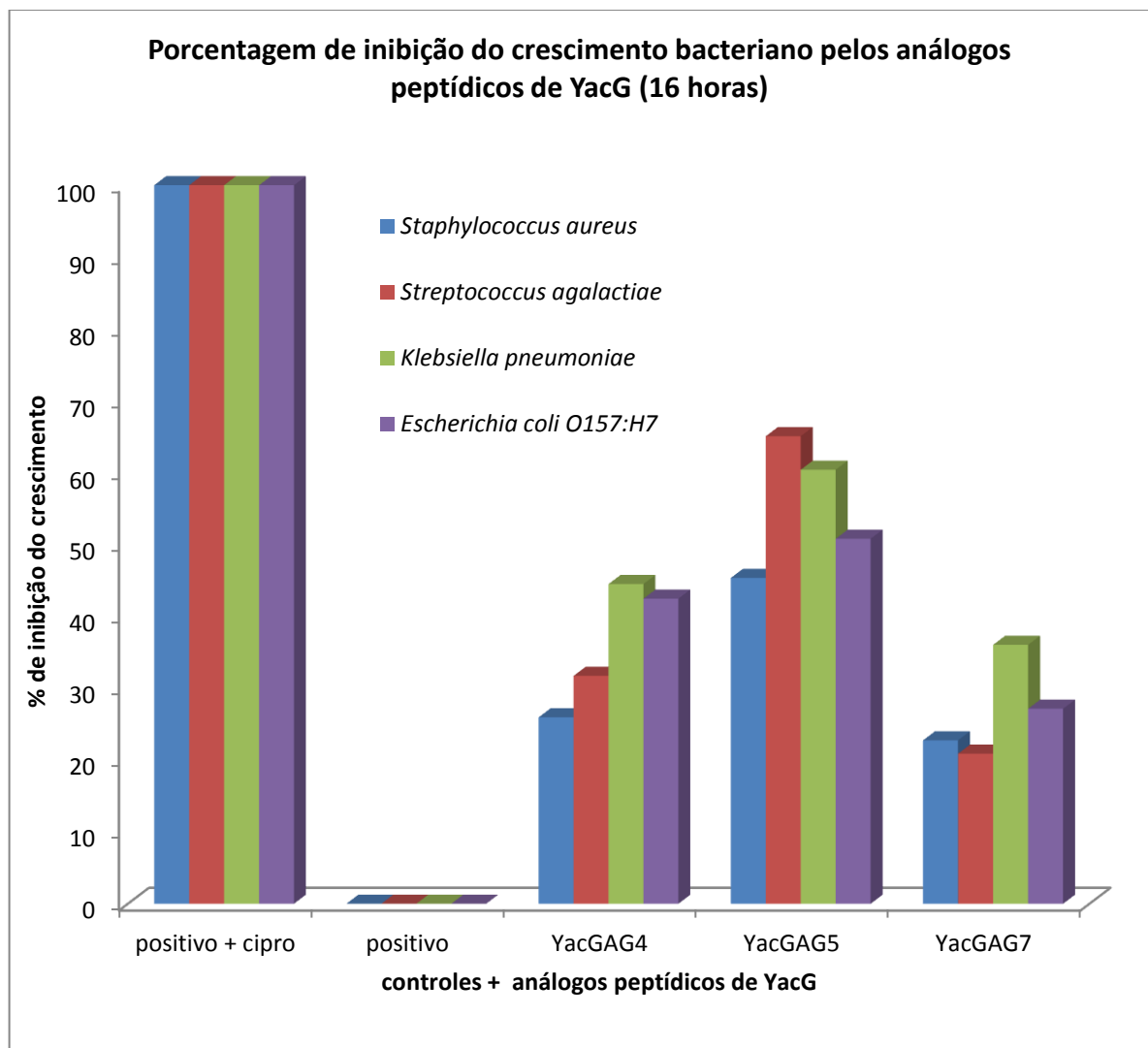
Figura 58. Ensaio de susceptibilidade bacteriana em meio líquido com os peptídeos YacGAG4, YacGAG5 e YacGAG7 incubados a 16 horas ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$). (Negativo): Caldo Mueller Hinton; (Positivo + cipro): Caldo Mueller Hinton + inóculo de bactérias + ciprofloxacino ($5 \mu\text{mol.L}^{-1}$); (YacGAG4, YacGAG5 e YacGAG7): Caldo Mueller Hinton + inóculo de bactérias + os respectivos peptídeos. Volume final $100 \mu\text{L}$, leitura a 625 nm .



Fonte: Elaborada pelo autor

A inibição do crescimento pelos pelo análogos peptídicos de YacG como observado na Figura 59 varia aproximadamente de 30 a 70% na escala. YacGAG5, assim como na leitura realizada a 5 horas de incubação, obtém a maior porcentagem de inibição do crescimento, seguido de YacGAG4 e YacGAG7 que dentre estes teve a menor influencia na inibição do crescimento quando comparado aos demais.

Figura 59. Porcentagem de inibição do crescimento bacteriano pelos análogos peptídicos com 16 horas de incubação.



Fonte: Elaborada pelo autor

5.15. Estudos de Modelagem e Dinâmica Molecular

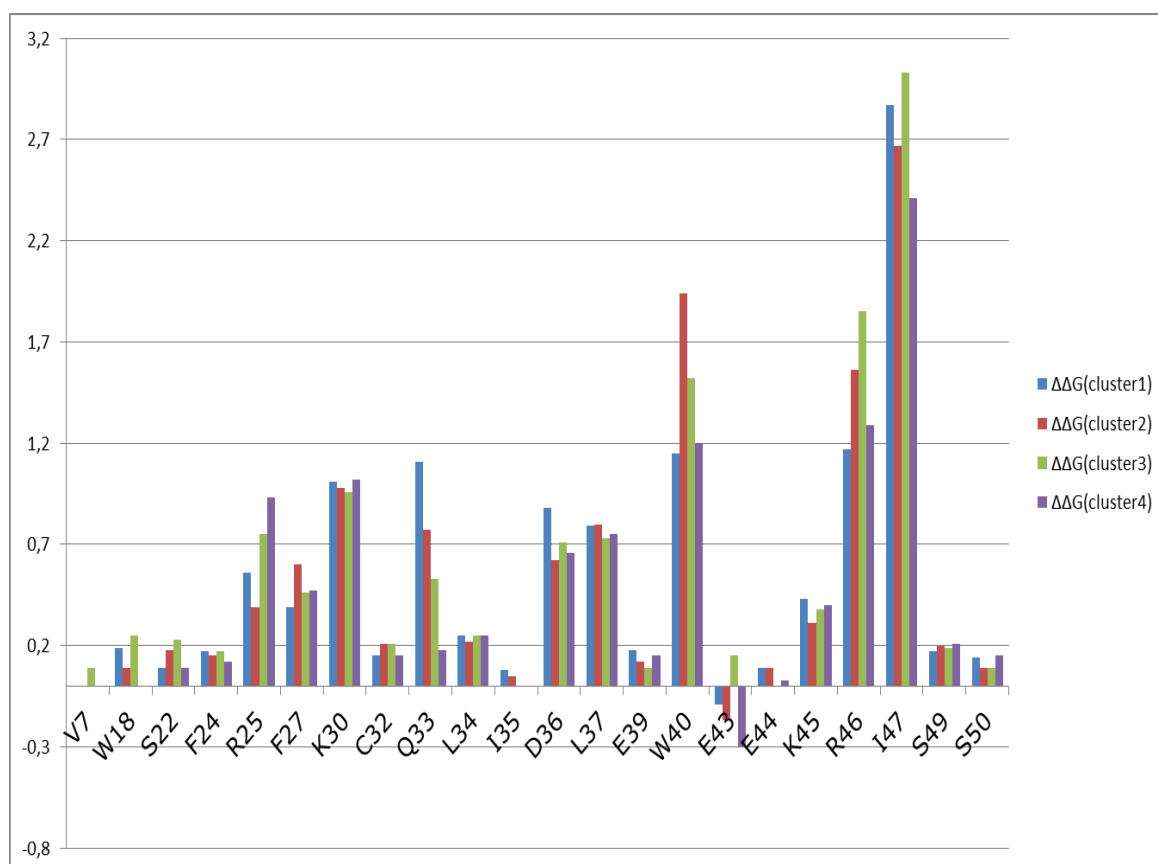
A estrutura cristalográfica de código PDB ID 4TMA apresenta ausência de diversos resíduos e átomos. Desta forma, é estritamente necessária a reconstrução das sequências para um posterior estudo de interação dinâmica. Após a realização desta etapa, foi realizado procedimento de simulação de dinâmica molecular, envolvendo a variação de temperatura do sistema. A temperatura, neste caso, exerce um efeito de aumento da mobilidade dos resíduos e das moléculas de água e íons presentes no sistema, introduzindo uma desestabilização do complexo, porém, sem o seu rompimento. Assim, pode-se obter um modelo representativo das interações entre os resíduos posicionados na interface do complexo e, além disso, o mesmo pode ser utilizado como um padrão comparativo para avaliar os resíduos e respectivas posições que contribuem de forma mais significativa para a formação e manutenção do complexo GyrB-YacG. Por outro lado, enquanto a fase inicial de incremento de temperatura aumenta a energia cinética das moléculas, promovendo a desestabilização do complexo, a segunda etapa, de diminuição, permite restabelecer interações mais efetivas à medida que a energia cinética do sistema decresce. Interações que são menos significativas apresentarão uma menor tendência a serem refeitas e, portanto, apresentam pouca probabilidade de permanecerem ao longo do processo de simulação. Além disso, esta abordagem tende a forçar a saída do complexo de um estado de mínimo energético local e alcançar um estado final mais próximo de um mínimo global, resultando em um modelo mais criterioso para avaliação das interações.

Como salientado no item Métodos, a análise da trajetória obtida a partir do estudo de simulação permitiu identificar quatro grupos (clusters) mais representativos, cuja variação entre as estruturas do complexo dentro de cada grupo apresenta uma variação de RMSD de até 0,2 Å. Posteriormente, foram selecionados quatro complexos, um representativo para cada cluster identificado, e submetidos a um estudo para avaliar a contribuição, em termos energéticos, de cada resíduo, na manutenção do complexo respectivo, através do servidor DrugScore PPI.

Verifica-se, a partir destes resultados (Figura 60), que o resíduo Ile47 é o que contribui de forma mais significativa no processo de interação, seguido pelos

resíduos Arg46 e Trp40, enquanto Glu33 apresenta bem pouca contribuição ou mesmo pode contribuir negativamente para a afinidade. Este tipo de avaliação torna-se muito útil para planejar novas sequências. Mediante a mutação *in silico* e novas simulações, é possível planejar de forma mais racional novas sequências mais promissoras para inibir a GyrB de *E. coli*.

Figura 60. Diferença de variação da energia livre de interação, obtida através da simulação de dinâmica molecular aplicando-se o protocolo de alanine scanning, a partir do complexo formado pela proteína YacG com a subunidade GyrB de *E. coli*. Apenas os resíduos envolvidos na interação e, portanto, localizados na interface do complexo, são analisados. Quanto maior mais positivo o valor, maior é a contribuição do resíduo no processo de interação molecular. Os resultados são agrupados em clusters (grupos) de conformações estruturais que apresentam um RMSD \leq a 0,2 Ångstrons.



Fonte: Elaborada pelo autor

6. CONCLUSÕES

- Os métodos utilizados para clonagem e expressão de YacG recombinante, assim como os métodos utilizados para a síntese de seus análogos peptídicos foram eficazes, não apresentando grandes dificuldades na obtenção dos produtos finais
- A titulação com íons Co^{+2} é um procedimento adequado para o estudo de coordenação de íons Zn^{+2} , uma vez que este íon apresenta muitas das propriedades desejáveis de uma sonda espectroscópica.
- O íon Zn^{+2} em YacG deve coordenar com quatro grupos SH pelo modo tetraédrico, como demonstra o número de bandas do espectro UV-visível, atribuídas a três transições *d-d* que caracteriza uma esfera de coordenação tipo Cys₄.
- YacG de *K. pneumoniae* não apresentou níveis de inibição da atividade de DNA girase comparáveis a proteína de *E. coli*. Esta diferença de atividade pode estar relacionada com a tag de histina que permaneceu na proteína, conduzindo a mesma a uma estruturação diferente e conseqüentemente redução de atividade.
- YacG não é um inibidor específico da DNA girase, pois atua com grande eficiência na inibição da Topoisomerase II α humana.
- A inibição da Topoisomerase II α humana pela YacG ($5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) foi 10 vezes mais eficiente comparada a DNA girase ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$), uma contradição ao fato de que drogas antibacterianas inibem topoisomerasas de procariotos em concentrações entre 100 e 1000 vezes menor que no caso de enzimas de eucariotos, os alvos preferenciais das drogas anticâncer.
- Os análogos e fragmentos peptídicos projetados a partir da estrutura primária de YacG, se mostraram eficazes na inibição tanto da atividade de DNA girase, quanto Topoisomerase II α humana.

- O domínio contendo os sítios de ligação de Zn^{+2} na proteína YacG, por si só, não está relacionado com o processo de inibição da atividade da DNA girase.
- Diferentemente da proteína YacG, o processo de inibição da atividade da DNA girase pelo peptídeos YacGAG4 ocorre pela interação com a subunidade GyrA da enzima.
- O domínio *zinc finger* foi desfeito em YacGAG4 e YacGAG5 o que favoreceu as interações com as subunidades da DNA girase, e conseqüentemente a inibição da atividade enzimática.
- Da mesma forma que a proteína YacG, os peptídeos YacGAG4, YacGAG5 e YacGAG7, demonstraram inibição da atividade de Topoisomerase II α humana porém a níveis comparáveis a DNA girase.
- O peptídeo YacGAG7, estruturalmente desordenado, aparentemente é o melhor inibidor para ambas enzimas DNA Girase e Topoisomerase II α humana (50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ cada).
- YacGAG7, formado pela região C-terminal de YacG (G38-Q65), contém os resíduos I47, R46 e W40, aminoácidos que contribuem de forma mais significativa para o processo de interação com a DNA Girase, segundo os estudos de Bioinformática.
- Os análogos peptídicos de YacG, exibem atividade bacteriostática, podendo inibir o crescimento de microrganismos procariotos tanto os gram-negativos, quanto os gram-positivos, podendo estes ser utilizados como agentes antimicrobianos.
- Os resultados descritos, sugerem uma nova classe de inibidores de DNA girase, com interação com a subunidade GyrA da enzima.
- Os peptídeos derivados de YacG são um bom ponto de partida para uma compreensão mais aprofundada do mecanismo de inibição da atividade da DNA girase por YacG, bem como no desenvolvimento de novos inibidores peptídicos de DNA girase e Topoisomerase II α humana, com potencial para

serem utilizados como agentes antimicrobianos e antitumorais, respectivamente.

7. PERSPECTIVAS

Diante dos resultados aqui apresentados, surgem perspectivas para a continuação do mesmo e investigação de do mecanismo de ação de tais peptídeos sintéticos de YacG. Sendo assim desenvolvendo novos trabalhos com vista à:

- Investigar a ação dos peptídeos sintéticos e YacG contra a atividade de outras DNA topoisomerasas;
- Investigar o potencial anti-cancerígeno dos peptídeos sintéticos de YacG;
- Desenvolver mecanismos para elucidar a ação bacteriostática dos mesmos;
- Sugerir novos peptídeos baseados nas análises de Bioinformática.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2013. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

ALBERICIO, F.; BARANY, G. Improved approach for anchoring Na-9 fluorenylmethoxycarbonylamino acids as p-alkoxybenzyl esters in solid-phase peptide synthesis. **International Journal Peptide Protein Reserach**, v. 26, p. 92-97, 1985.

ALBERICIO, F.; LLOYD-WILLIAMS, P.; GIRALT, E. Convergent solid-phase peptide synthesis. **Methods in Enzymology**, v. 289, p. 313-336, 1997.

ALBERICIO, F.; KNEIB-CORDONIER, N.; BIANCALANA, S.; GERA, L.; MASADA, R. I.; HUDSON, D.; BARANY, G. Preparation and application of the 5-(4-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)aminomethyl-3,5-dimethoxyphenoxy)-valeric acid (PAL) handle for the solid-phase synthesis of C-terminal peptide amides under mild conditions. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 55, p. 3730-3743, 1990.

ALI, J. A.; JACKSON, A. P.; HOWELLS, A. J.; MAXWELL, A. The 43-kilodalton N-terminal fragment of the DNA gyrase B protein hydrolyzes ATP and binds coumarin drugs. **Biochemistry**, v. 32, p. 2717-2724, 1993.

AMBLARD, A.; FEHRENTZ, J.; MARTINEZ, J.; SUBRA, G. Fundamentals of modern peptide synthesis. In: HOW, J. (Ed.). **Peptide synthesis and applications**. Totowa: Humana Press, 2005. Chap. 1, p. 3-24. (Methods in molecular biology, v. 298)

ANDERSON, G. W.; MCGREGOR, A. C. t-Butyloxycarbonylamino acids and their use in peptide synthesis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 79, p. 6180-6183, 1957.

ARAVIND, L.; LEIPE, D. D.; KOONIN, E. V. Toprim—a conserved catalytic domain in type IA and II topoisomerases, DnaG-type primases, OLD family nucleases and RecR proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 26, p. 4205-4213, 1998.

BALDI, M. I.; BENEDETTI, P.; MATTOCCIA, E.; TOCCINIVALENTINI, G. P. In vitro catenation and decatenation of DNA and a novel eukaryotic ATP dependent topoisomerase. **Cell**, v. 20, p. 461-467, 1980.

BARBOSA, L. C. B. **Peptídeos derivados da toxina bacteriana ParE: síntese, estrutura e ação inibitória sobre a atividade de topoisomerases**. 2012. 90 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

BAX, B. D.; CHAN, P. F.; EGGLESTON, D. S.; FOSBERRY, A.; GENTRY, D. R.; GIORDANO, I.; HANN, M. M.; HENNESSY, A.; HIBBS, M.; HUANG, J.; JONES, E.; JONES, J.; BROWN, K. K.; LEWIS, C. J.; MAY, E. W.; SAUNDERS, M. R.; SINGH, O.; SPITZFADEN, C. E.; SHEN, C.; SHILLINGS, A.; THEOBALD, A. J.; WOHLKONIG, A.; PEARSON, N. D.; GWYNN, M. N. Type IIA topoisomerase inhibition by a new class of antibacterial agents. **Nature**, v. 466, p. 935-940, 2010.

BELLON, S.; PARSONS, J. D.; WEI, Y.; HAYAKAWA, K.; SWENSON, L. L.; CHARIFSON, P. S.; LIPPKE, J. A.; ALDAPE, R.; GROSS, C. H. Crystal structures of *Escherichia coli* topoisomerase IV ParE subunit (24 and 43 kilodaltons): a single residue dictates differences in novobiocin potency against topoisomerase IV and DNA gyrase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 1856-1864, 2004.

BENARROCH, D.; CLAVERIE, J. M.; RAOULT, D.; SHUMAN, S. Characterization of mimivirus DNA topoisomerase IB suggests horizontal gene transfer between eukaryal viruses and bacteria. **Journal of Virology**, v. 80, p. 314-321, 2006.

BERGER, J. M. Review: structure of DNA topoisomerases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1400, p. 3-18, 1998.

BERGER, J. M.; GAMBLIN, S. J.; HARRISON, S. C.; WANG, J. C. Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. **Nature**, v. 379, p. 225-232, 1996.

BERGERAT, A.; DE MASSY, B.; GADELLE, D.; VAROUTAS, P. C.; NICOLAS, A.; FORTERRE, P. An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. **Nature**, v. 386, p. 414-417, 1997.

BJERGBAEEK, L.; KINGMA, P.; NIELSEN, I. S.; WANG, Y.; WESTERGAARD, O.; OSHEROFF, N.; ANDERSEN, A. H. Communication between the ATPase and cleavage/religation domains of human topoisomerase II alpha. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 13041-13048, 2000.

BROWN, P. O.; COZZARELLI, N. R. Catenation and knotting of duplex DNA by type I topoisomerases: a mechanistic parallel with type 2 topoisomerases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, p. 843-847, 1981.

BULAJ, G.; KORTEEMME, T.; GOLDENBERG, D. P. Ionization-reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides. **Biochemistry**, v. 37, p. 8965-8972, 1998.

CAIRES, A. C. **Síntese, estrutura e atividade de peptídeos derivados de ParD, o antídoto do módulo toxina-antitoxina ParDE**. 2014. 113 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

CAMPANA, P. T.; MORAES, D. I.; MOREIRA, A. C. O. M.; BELTRAMINI, L. M. Unfolding and refolding studies of frutalin, a tetrameric D-galactose binding lectin. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, p. 5647-5652, 2001.

CAMPBELL, I. D.; DWEK, R. A. **Biological spectroscopy**. London: Benjamin Cummings, 1984.

CARPINO, L. A. Oxidative reactions of hydrazides. IV. Elimination of nitrogen from 1,1-disubstituted-2-arenesulfonylhydrazides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 79, p. 4427-4431, 1957.

CARPINO, L. A. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, p. 4397-4398, 1993.

CARPINO, L. A.; HAN, G. A. The 9-fluorenylmethyloxycarbonyl amino-protecting group. **The journal of Organic Chemistry**, v. 37, p. 3404-3409, 1972.

CARPINO, L. A.; EL-FAHAN, A.; ALBERICIO, F. Efficiency in peptide coupling: 1-hydroxy-7-azabenzotriazole vs 3,4-dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3 benzotriazine **The Journal of Organic Chemistry**, v. 60, p. 3561-3564, 1995.

CARPINO, L. A.; EL-FAHAN, A.; MINOR, C. A.; ALBERICIO, F. Advantageous applications of azabenzotriazole (triazolopyridine)-based coupling reagents to solid-phase peptide synthesis. **Journal of the Chemical Society: Chemical Communications**, n. 2, p. 201-203, 1994.

CASTRO, B.; DORMOY, J. R.; EVIN, G.; SELVE, C. Reactifs du couplage peptidique IV. (1)-L'-Hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxytris diméthylammonium (BOP). **Tetrahedron Letters**, v. 16, p. 1219-1222, 1975.

CHAMPOUX, J. J. DNA is linked to the rat liver nicking-closing enzyme by a phosphodiester bond to tyrosine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, p. 4805-4809, 1981.

CHAN, W. C.; WHITE, P. B. **Fmoc solid phase: a practical approach**. Oxford: Oxford University Press, 2000. 346 p.

CHASTRE, J.; WOLFF, M.; FAGON, J. Y.; CHEVRET, S.; THOMAS, F.; WERMERT, D. Comparison of 8 vs 15 days of antibiotic therapy for ventilator associated pneumonia in adults: a randomized trial. **The Journal of the American Medical Association**, v. 290, p. 2588-2598, 2003.

CLASSEN, S.; OLLAND, S.; BERGER, J. M. Structure of the topoisomerase II ATPase region and its mechanism of inhibition by the chemotherapeutic agent ICRF-187. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, p. 10629-10634, 2003.

CORBETT, K. D.; BERGER, J. M. Structure of the topoisomerase VI B subunit: implications for type II topoisomerase mechanism and evolution. **EMBO Journal**, v. 22, p. 151-163, 2003.

CORBETT, K. D.; BERGER, J. M. Structural dissection of ATP turnover in the prototypical GHL ATPase TopoVI. **Structure**, v. 13, p. 873-882, 2005.

COSTE, J.; CAMPAGNE, J. M. A propôs de l'esterification de acides carboxyliques parle BOP ou le PyBOP. **Tetrahedron Letters**, v. 36, p. 4253-4256, 1995.

COSTE, J.; LE-NGUYEN, D.; CASTRO, B. PyBOP: a new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product. **Tetrahedron Letters**, v. 31, p. 205-208, 1990.

COUTURIER, M.; BAHASSI, E. M.; VAN MELDEREN, L. Bacterial death by DNA gyrase poisoning. **Trends in Microbiology**, v. 6, p. 269-275, 1998.

CURTIUS, T. Synthetische versuche mit hippurazid. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v. 35, p. 3226-3228, 1902.

DAO-THI, M. H.; VAN MELDEREN, L.; DE GENST, E.; AFIF, H.; BUTS, L.; WYNS, L.; LORIS, R. Molecular basis of gyrase poisoning by the addiction toxin CcdB. **Journal of Molecular Biology**, v. 348, p. 1091-1102, 2005.

DEPEW, R. E.; LIU, L. F.; WANG, J. C. Interaction between DNA and *Escherichia coli* protein omega. Formation of a complex between single stranded DNA and omega protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 253, p. 511-518, 1978.

DONG, K. C.; BERGER, J. M. Structural basis for gate-DNA recognition and bending by type IIA topoisomerases. **Nature**, v. 450, p. 1201-1205, 2007.

DOURTOGLOU, V.; ZIEGLER, J. C.; GROSS, B. L'-Hexafluorophosphate de obenzotriazolyl-N,N'-tetramethyluronium: um Reactif de couplage peptidique nouveau et efficace. **Tetrahedron Letters**, v. 19, p. 1269-1272, 1978.

DUTTA, R.; INOUYE, M. GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 25, p. 24-28, 2000.

DYNAN, W. S.; JENDRISAK, J. J.; HAGER, D. A.; BURGESS, R. R. Purification and characterization of wheat germ DNA topoisomerase I (nicking-closing enzyme). **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, p. 5860-5865, 1981.

ESSMANN, U.; PERERA, M. L.; BERKOWITZ, T.; DARDEN, H.; LEE, L. G.; PEDERSEN, A. A smooth particle mesh Ewald method. **The Journal of Chemical Physics**, v.103, p.8577-8593, 1995.

EVERETT, M. J.; PIDDOCK, L. J. V. Quinolone antibacterials 127. In: KUHIMANN, J.; DALHOFF, A.; ZEILER, H. (Ed.). **Handbook of experimental pharmacology**. Berlin: Springer, 1998. p. 259-296.

FASS, D.; BOGDEN, C. E.; BERGER, J. M. Quaternary changes in topoisomerase II may direct orthogonal movement of two DNA strands. **Nature Structural Biology**, v. 6, p. 322-326, 1999.

FISCHER, E.; FOURNEAU, E. Ueber einige derivate glykolls. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v. 34, p. 2868-2877, 1901.

FISCHER, J. E.; HARBARTH, S.; AGTHE, A. G.; BENN, A.; RINGER, S. A.; GOLDMANN, D. A. Quantifying uncertainty: physicians' estimates of infection in critically ill neonates and children. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p. 1383-1393, 2004.

FRANKEL, A. D.; BERG, J. M.; PABO, C. O. Metal-dependent folding of a single zinc finger from transcription factor IIIA. **Biochemistry**, v. 84, p. 4841-4845, 1987.

GADELLE, D.; FILEE, J.; BUHLER, C.; FORTERRE, P. Phylogenomics of type II DNA topoisomerases. **BioEssays**, v. 25, p. 232-242, 2003.

GAJIWALA, K. S.; BURLEY, S. K. Winged helix proteins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 10, p. 110-116, 2000.

GELLERT, M.; MIZUUCHI, K.; O'DEA, M. H.; NASH, H. A. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 73, p. 3872-3876, 1976.

GRAY H. B. Electronic absorption spectroscopy. **Advances in Inorganic Biochemistry**, v. 2, p. 1-25 1980.

HARBARTH, S.; SAMORE, M. H. Antimicrobial resistance determinants and future control. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p. 794-801, 2005.

HARKINS, T. T.; LEWIS, T. J.; LINDSLEY, J. E. Presteady-state analysis of ATP hydrolysis by *Saccharomyces cerevisiae* DNA topoisomerase II. 2. Kinetic mechanism for the sequential hydrolysis of two ATP. **Biochemistry**, v. 37, p. 7299-7312, 1998.

HARRISON, S. C.; AGGARWAL, A. K. DNA recognition by proteins with the helix–turn–helix motif. **Annual Review of Biochemistry**, v. 59, p. 933-969, 1990.

HEDDLE, J. G.; BLANCE, S. J.; ZAMBLE, D. B.; HOLLFELDER, F.; MILLER, D. A.; WENTZELL, L. M.; WALSH, C. T.; MAXWELL, A. The antibiotic microcin B17 is a DNA gyrase poison: characterisation of the mode of inhibition. **Journal of Molecular Biology**, v. 307, p. 1223-1234, 2001.

HEDDLE, J. G.; BARNARD, F. M.; WENTZELL, L. M.; MAXWELL, A. The interaction of drugs with DNA Gyrase: a model for the molecular basis of quinolone action. **Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids**, v. 19, p. 1249-1264, 2000.

HESS, B.; BEKKER, H. J. C.; BERENDSEN, J. G. E. M. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 18, p. 1463-1472, 1997.

HIGGINS, N. P. A human TOP2A core DNA binding X-ray structure reveals topoisomerase subunit dynamics and a potential mechanism for SUMO modulation of decatenation. **Journal of Molecular Biology**, v. 424, p. 105-108, 2012.

HOLMES, V. F.; COZZARELLI, N. R. Closing the ring: links between SMC proteins and chromosome partitioning, condensation, and supercoiling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 97, p. 1322-1324, 2000.

HUHEEY, J. E. **Inorganic chemistry**. 4th ed. New York: Harper and Row, 1993.

JIANG, Y.; POGLIANO, J.; HELINSKI, D. R.; KONIECZNY, I. ParE toxin encoded by the broad-host-range plasmid RK2 is an inhibitor of *Escherichia coli* gyrase. **Molecular Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 971-979, 2002.

JORGENSEN, W. L.; MAXWELL, D. S.; TIRADO-RIVES, J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, p. 11225-11236, 1996.

KAISER, E.; COLESCOT, R. L.; BOSSINGE, C. D.; COOK, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in solid-phase synthesis of peptides. **Analytical Biochemistry**, v. 34, p. 595-598, 1970.

KARPLUS, M.; McCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 9, p. 646-652, 2002.

KATES, S. A.; TRIOLO, S. A.; GRIFFIN, G. W.; HERMAN, L. W.; TARR, G.; SOLE, N. A.; DIEKMANN, E.; EL-FAHAM, A.; IONESCU, D.; ALBERICIO, F.; CARPINO, L. A. Advances in the use of onium-based coupling reagents: application for solid phase peptide synthesis and combinatorial libraries. In: EPTON, R. (Ed.). **Innovation and perspectives in solid phase synthesis and combinatorial libraries**. Birmingham: Mayflower Scientific, 1996. p. 41-50.

KATO, J.; NISHIMURA, Y.; IMAMURA, R.; NIKI, H.; HIRAGA, S.; SUZUKI, H. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. **Cell**, v. 63, p. 393-404, 1990.

KOSTER, D. A.; CROQUETTE, V.; DEKKER, C.; SHUMAN, S.; DEKKER, N. H. Friction and torque govern the relaxation of DNA supercoils by eukaryotic topoisomerase IB. **Nature**, v. 434, p. 671-674, 2005.

KOSTER, D. A.; CRUT, A.; SHUMAN, S.; BJORNSTI, M.; DEKKER, N. H. Cellular strategies for regulating DNA supercoiling: a single-molecule perspective. **Cell**, v. 142, p. 519-530, 2010.

KROGH, B. O.; SHUMAN, S. A poxvirus-like type IB topoisomerase family in bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 99, p. 1853-1858, 2002.

KRUGER, D. M.; GOHLKE, H. DrugScorePPI webserver: fast and accurate in silico alanine scanning for scoring protein-protein interactions. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. 480-486, 2010.

KYTE, J.; DOOLITTLE, R. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **Journal of Molecular Biology**, v. 157, p. 105-132, 1982.

LIU, L. F.; WANG, J. C. Interaction between DNA and *Escherichia coli* DNA topoisomerase I: formation of complexes between the protein and superhelical and nonsuperhelical duplex DNAs. **Journal of Biological Chemistry**, v. 254, p. 11082-11088, 1979.

LIU, L. F.; WANG, J. C. Supercoiling of the DNA template during transcription. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 84, p. 7024-7027, 1987.

LIU, L. F.; ROWE, T. C.; YANG, L.; TEWEY, K. M.; CHEN, G. L. Cleavage of DNA by mammalian DNA topoisomerase II. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, p. 15365-15370, 1983.

LIVERMORE, D. Can better prescribing turn the tide of resistance? **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 73-78, 2004.

LLOYD-WILLIAMS, P.; ALBERICIO, F.; GIRALT, E. **Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins**. Boca Raton: CRC, 1997.

LOHNER, K.; STAUDEGGER, E. Are we on the threshold of the post-antibiotic era? In: _____. **Development of novel antimicrobial agents: emerging strategies**. Wyomondham: Horizon Scientific, 2001. p. 1-15.

MACHADO, A.; LIRIA, C. W.; PROTI, P. B.; REMUZGO, C.; MIRANDA, M. T. M. Síntese química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 781-789, 2004.

MARCHETTO, R. **A química de peptídeos e o mecanismo de ação da DNA girase**. 2006. 94 f. Tese (Livre-Docência) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

MARCHETTO, R.; ETCHEGARAY, A.; NAKAIE, C. R. Kinetics of synthesis and swelling studies of highly substituted benzhydrylamine-resins: implications for peptide synthesis and perspectives for use as anion exchanger resin. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 3, p. 30-37, 1992.

MAXWELL, A. The interaction between coumarin drugs and DNA gyrase. **Molecular Microbiology**, v. 9, p. 681-686, 1993.

McKAY, D. B.; STEITZ, T. A. Structure of catabolite gene activator protein at 2.9 Å resolution suggests binding to left-handed B-DNA. **Nature**, v. 290, p. 744-749, 1981.

MERRIFIELD, R. B. Solid-phase peptide synthesis. I: the synthesis of a tetrapeptide **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, p. 2149-2154, 1963.

MITCHELL, A. R.; ERICKSON, B. W.; RYABTSEV, M. N.; HODGES, R. S.; MERRIFIELD, R. B. Tert-butyloxycarbonylaminoacyl-4-(oxymethyl) phenylacetamidomethyl-resin, a more acid-resistant support for solid-phase peptide synthesis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 98, p. 7357-7362, 1976.

MIZUUCHI, K.; FISHER, L. M.; O'DEA, M. H.; GELLERT, M. DNA gyrase action involves the introduction of transient double-strand breaks into DNA. **Biochemistry**, v. 77, p. 1847-1851, 1980.

MORAIS CABRAL, J. H.; JACKSON, A. P.; SMITH, C. V.; SHIKOTRA, N.; MAXWELL, A.; LIDDINGTON, R.C. Crystal structure of the breakage-reunion domain of DNA gyrase. **Nature**, v. 388, p. 903-906, 1997.

MORRISON, A.; COZZARELLI, N. R. Site-specific cleavage of DNA by *E. coli* DNA gyrase. **Cell**, v. 17, p. 903-906, 1979.

NAKANISHI, A.; OSHIDA, T.; MATSUSHITA, T.; IMAJOH-OHMI, S.; OHNUKI, T. Identification of DNA gyrase inhibitor (GyrI) in *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 1933-1938, 1998.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS.

Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para para bactéria de crescimento aeróbico: norma aprovada. 6. ed. Wayne, 2003. 81 p. M7-A6. Disponível em:

<<http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi.asp>>. Acesso em: 20 jan. 2015.

NUERMBERGER, E. L.; BISHAI, W. R. Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*: what does the future hold? **Clinical Infectious Diseases**, v. 38 p. 63-71, 2004.

PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, p. 1605-1612, 2004.

PIETTA, P. G.; MARSHALL, G. R. Amide protection and amide supports in solid-phase peptide synthesis. **Journal of the Chemical Society**, v. 11, p. 650-651, 1970.

PRONK, S.; PÁLL, R.; SCHULZ, P.; LARSSON, P.; BJELKMAR, R.; APOSTOLOV, M. R.; SHIRTS, J. C.; SMITH, P. M.; KASSON, D.; VAN DER SPOEL, B.; LINDAHL, E. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. **Bioinformatics**, v. 29, p. 845-854, 2013.

PURDIE, N. Chiroptical analytical methods. In: SWARBRICK, J.; BOYLAN, J. C. (Ed.). **Encyclopedia of pharmaceutical technology**. Pinehurst: PharmaceuTech, 2007. v. 1, p. 445-462.

RAMELOT, T. A.; CORT, J. R.; YEE, A. A.; SEMESI, A.; EDWARDS, A. M.; ARROWSMITH, C. H.; KENNEDY, M. A. NMR structure of the *Escherichia coli* protein YacG: a novel sequence motif in the zinc-finger family of proteins. **Proteins**, v. 49, n. 2, p. 289-293, 2002.

RAOULT, D.; AUDIC, S.; ROBERT, C.; ABERGEL, C.; RENESTO, P.; OGATA, H.; LA SCOLA, B.; SUZAN, M.; CLAVERIE, J. M. The 1-2-megabase genome sequence of Mimivirus. **Science**, v. 306, p. 1344-1350, 2004.

REECE, R. J.; MAXWELL, A. The C-terminal domain of the *Escherichia coli* DNA gyrase A subunit is a DNA-binding protein. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 1399-1405, 1991.

ROCA, J.; WANG, J. C. The capture of a DNA double helix by an ATP dependent protein clamp: a key state in DNA transport by type II DNA topoisomerases. **Cell**, v. 71, p. 833-840, 1992.

ROCA, J.; WANG, J. C. DNA transport by a type II DNA topoisomerase: evidence in favor of a two-gate mechanism. **Cell**, v. 77, p. 609-616, 1994.

SANDER, M.; HSIEH, T. Double strand DNA cleavage by type II DNA topoisomerase from *Drosophila melanogaster*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, p. 8421-8428, 1983.

SCHOEFFLER, A. J.; BERGER, J. M. DNA topoisomerases: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 41, p. 41-101, 2008.

SENGUPTA, S.; NAGARAJA, V. YacG from *Escherichia coli* is a specific endogenous inhibitor of DNA gyrase. **Nucleic Acids Research**, v. 36, p. 4310-4316, 2008.

SENGUPTA, S.; SHAH, M.; NAGARAJA, V. Glutamate racemase from *Mycobacterium tuberculosis* inhibits DNA gyrase by affecting its DNA-binding. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. 5567-5576, 2006.

SHEEHAN, J. C.; HESS, G. P. A new method of forming peptide bonds. **Journal of the American Chemical Society**, v. 77, p. 1067-1068, 1955.

SHI, Y.; BEGER, R. D.; BERG, J. M. Metal binding properties of single amino acid deletion mutants of zinc finger peptides: studies using cobalt(II) as a spectroscopic probe. **Journal of Biophysics**, v. 64, p. 749-753, 1993.

SLESAREV, A. I.; STETTER, K. O.; LAKE, J. A.; GELLERT, M.; KRAH, R.; KOZYAVKIN, S. A. DNA topoisomerase V is a relative of eukaryotic topoisomerase I from a hyperthermophilic prokaryote. **Nature**, v. 364, p. 735-737, 1993.

SRIVENUGOPAL, K. S.; LOCKSHON, D.; MORRIS, D. R. *Escherichia coli* DNA topoisomerase III: purification and characterization of a new type I enzyme. **Biochemistry**, v. 23, p. 1899-1906, 1984.

STEWART, J. M.; YOUNG, J. D. **Solid phase peptide synthesis**. 2nd ed. Rockford: Pierce Chemical, 1984.

TANEJA, B.; SCHNURR, B.; SLESAREV, A.; MARKO, J. F.; MONDRAGON, A. Topoisomerase V relaxes supercoiled DNA by a constrained swiveling mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 104, p. 14670-14675, 2007.

TROVATTI, E.; COTRIM, C. A.; GARRIDO, S. S.; BARROS, R. S.; MARCHETTO, R. Peptides based on CcdB protein as novel inhibitors of bacterial topoisomerases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 6161-6164, 2008.

TSE, Y. C.; KIRKEGAARD, K.; WANG, J. Covalent bonds between protein and DNA. Formation of phosphotyrosine linkage between certain DNA topoisomerases and DNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 255, p. 5560-5565, 1980.

VOS, S. M.; LYUBIMOV, A. Y.; HERSHEY, D. M.; SHOEFFLER, A. J.; SENGUPTA, S.; NAGAJARA, V.; BERGER, J. Direct control of type IIA topoisomerase activity by a chromosomally encoded regulatory protein. **Genes e Development**, v. 28, p. 1485-1497, 2014.

WALLIS, J. W.; CHREBET, G.; BRODSKY, G.; ROLFE, M.; ROTHSTEIN, R. A. Hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. **Cell**, v. 58, p. 409-419, 1989.

WANG, J. C. Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein omega. **Journal of Molecular Biology**, v. 55, p. 523-533, 1971.

WANG, J. C.; KIRKEGAARD, K. DNA topoisomerases. **Gene Amplification and Analysis**, v. 2, p. 455-473, 1981.

WENDORFF, T. J.; SCHMIDT, B. H.; HESLOP, P.; AUSTIN, C. A.; BERGER, J. M. The structure of DNA-bound human topoisomerase II alpha: conformational mechanisms for coordinating inter-subunit interactions with DNA cleavage. **Journal of Molecular Biology**, v. 424, p. 109-124, 2012.

WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. **Biopolymers**, v. 89, n. 5, p. 392-400, 2007.

WIGLEY, D. B. Structure and mechanism of DNA topoisomerases. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 24, p. 185-208, 1995.

WIGLEY, D. B.; DAVIES, G. J.; DODSON, E. J.; MAXWELL, A.; DODSON, G. Crystal structure of an N-terminal fragment of the DNA gyrase B protein. **Nature**, v. 351, p. 624-629, 1991.

WITZ, G.; STASIAK, A. DNA supercoiling and its role in DNA decatenation and unknotting. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. 2119-2133, 2010.

WORLAND, S. T.; WANG, J. C. Inducible overexpression, purification, and active site mapping of DNA topoisomerase II from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 4412-4416, 1989.

YEE, A.; CHANG, X.; PINEDA-LUCENA, A.; SEMESI, A.; LE, B.; RAMELOT, T.; LEE, G. M.; BHATTACHARYYA, S.; GUITIERREZ, P.; DENISOV, A.; LEE, C. H.; CORT, J. R.; KOZLOV, G.; LIAO, J.; FINAK, G.; CHEN, L.; WISHART, D.; LEE, W.; McINTOSH, L. P.; GEHRING, K.; KENNEDY, M. A.; EDWARDS, A. M.; ARROWSMITH, C. H. An NMR approach to structural proteomics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 99, p. 1825-1830, 2001.