

UNESP - UNIVESIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CÂMPUS ARARAQUARA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PEPTÍDEOS DERIVADOS DA TOXINA BACTERIANA ParE:  
SÍNTESE, ESTRUTURA E AÇÃO INIBITÓRIA SOBRE A  
ATIVIDADE DE TOPOISOMERASES

Luiz Carlos Bertucci Barbosa

INSTITUTO DE QUÍMICA  
ARARAQUARA - SÃO PAULO

2012

Luiz Carlos Bertucci Barbosa

PEPTÍDEOS DERIVADOS DA TOXINA BACTERIANA ParE:  
SÍNTESE, ESTRUTURA E AÇÃO INIBITÓRIA SOBRE A  
ATIVIDADE DE TOPOISOMERASES

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

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Barbosa, Luiz Carlos Bertucci

B238p Peptídeos derivados da toxina bacteriana ParE : síntese,  
estrutura e ação inibitória sobre a atividade de topoisomerases /

Luiz Carlos Bertucci Barbosa. – Araraquara : [s.n], 2012

90 p. : il.

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

1. Bioquímica. 2. Peptídeos. 3. Topoisomerases.
4. Toxinas. I. Título.

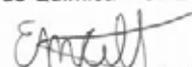
LUIZ CARLOS BERTUCCI BARBOSA

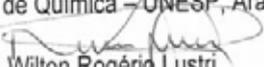
Tese apresentada ao Instituto de Química,  
Universidade Estadual Paulista, como parte  
dos requisitos para obtenção do título de  
Doutor em Biotecnologia.

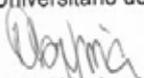
Araraquara, 15 de fevereiro de 2012

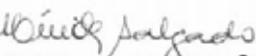
BANCA EXAMINADORA

  
Prof. Dr. Reinaldo Marchetto (Orientador)  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

  
Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

  
Prof. Dr. Wilton Rogério Lustr  
Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, Araraquara

  
Prof. Dr. Vani Xavier de Oliveira Junior  
Centro de Ciências Naturais e Humanas / UFABC / Santo André

  
Profª Drª Hérica Regina Nunes Salgado  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara

**Nome:** Luiz Carlos Bertucci Barbosa

**Nome em citações bibliográficas:** BARBOSA, L. C. B.

**Filiação:** Luiz Carlos de Freitas Barbosa

Maria Cristina Bertucci

**Local e data de nascimento:** 10/04/1982 , Araraquara-SP

**Estado civil:** solteiro

**Endereço:** Avenida Professor Virgílio A. Quintão, 252, Santa Angelina, Araraquara – SP

**CEP:** 14802-090

**Telefone:** (16) 33360737 / (16) 82088781

**E-mail:** luiz\_cbb@hotmail.com

**Resumo das qualificações:** Doutorando em Biotecnologia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP, na área de proteínas e peptídeos; Graduando em Computação (Sistemas de Informação) pelo Centro Universitário de Araraquara – UNIARA; Mestre em Bioquímica pela Universidade de São Paulo - USP, na área de Biologia Molecular; Licenciado em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP.

## **FORMAÇÃO ACADÊMICA**

### **2008 - 2012**

Doutorado em Biotecnologia.

Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP. Período sanduíche no Parc Cientific de Barcelona, Barcelona, Espanha (Orientador: Miquel Pons ).

Título: Peptídeos derivados da toxina bacteriana ParE: síntese, estrutura e ação inibitória sobre a atividade de topoisomerases.

Orientador: Reinaldo Marchetto.

Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq.

### **2005 - 2007**

Mestrado em Bioquímica.

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, FMRP- USP.

Título: Caracterização parcial dos sítios de fosforilação da enzima glicogênio sintase de *Neurospora crassa*.

Orientador: Hector Francisco Terenzi.

Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES.

### **2008 - 2012**

Graduação em Sistemas de Informação.

Centro Universitário de Araraquara, UNIARA.

### **2001 - 2004**

Graduação em Bacharel em Ciências Biológicas .

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Rio Claro.

Título: Filogenia molecular e variação no gene tRNA<sup>Leu</sup> (UUR) mitocondrial entre gêneros neotropicais de Termitinae (Termitidae: Isoptera).

Orientador: Vanderlei Geraldo Martins.

Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq.

### **2001 - 2004**

Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Rio Claro.

## **PRODUÇÃO CIENTÍFICA**

### **TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS**

- DELFINO, D.B.; BARBOSA, L. C. B.; GARCIA, A.; MENDES, L.S; GARRIDO, S.S.; MARCHETTO, R. Nanoemulsion as Promoter of Permeability for Peptide Inhibitor of Bacterial Topoisomerases. In: Congresso Brasileiro de Bioquímica e Biologia Molecular, 2011, Foz do Iguaçu.

- MENDES, L.S; GARCIA, A.; BARBOSA, L. C. B.; DELFINO, D. B.; GARRIDO, S. S.; MARCHETTO, R. Synthetic Peptides from YacG Protein as New Antimicrobials Agents. In: Congresso Brasileiro de Bioquímica e Biologia Molecular, 2011, Foz do Iguaçu.

- GARCIA, A. ; BARBOSA, L. C. B. ; DELFINO, D. B. ; GARRIDO, S. S. ; MARCHETTO, R. Topoisomerase Activity Inhibition by Peptides from YacG Protein. In: XXXIX Annual Meeting of Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2010, Foz do Iguaçu.

- GARRIDO, S. S. ; COTRIM, C.A. ; DELFINO, D. B. ; GARCIA, A. ; BARBOSA, L. C. B. ; MARCHETTO, R. CcdB toxin Peptides Derivatives and its Interactions with an Analogue of Bacterial CcdA Antitoxin.. In: 31st European Peptide Symposium, 2010, Copenhagen, 2010, Copenhagen. Peptides 2010: San Diego : Prompt Scientific Publishing, 2010. v. 1. p. 566-567.

- BARBOSA, L. C. B. ; GARRIDO, S. S. ; GARCIA, A. ; DELFINO, D. B. ; MARCHETTO, R. Peptides from ParE toxin as Potential Inhibitors of Bacterial Topoisomerases. In: XXXIX Annual Meeting of Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2010, Foz do Iguaçu.

- BARBOSA, L. C. B. ; DELFINO, D. B. ; GARRIDO, S. S. ; GARCIA, A. ; MARCHETTO, R. Bioinformatics and Structural Studies of the ParE toxin: a Model for Design of Bioactive Antibiotics. In: XXXIX Annual Meeting of Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2010, Foz do Iguaçu.

- GARRIDO, S. S.; DELFINO, D. B. ; GARCIA, A. ; BARBOSA, L. C. B. ; MARCHETTO, R. Initial Studies of Controlled Release Systems Applied in the Transport of Peptides Inhibitors of Bacterial Topoisomerases. In: XXXIX Annual Meeting of Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2010, Foz do Iguaçu.

- BARBOSA, L.C.B.; MARCHETTO, R. EBIAN: PACOTE DE PROGRAMAS EM JAVASCRIPT PARA ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA. IV CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIARA, 2009, Araraquara.

- BARBOSA, L. C. B.; BARROS, R. S.; GARRIDO, S. S.; GARCIA, A.; DELFINO, D. B.; MARCHETTO, R. EASY BIOINFORMATICS ANALISYS (EBIAN): DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS ONLINE PARA ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA. In: 5º Congresso Extensão Universitária da UNESP, 2009, Águas de Lindóia.

- BARBOSA, L. C. B. ; GARRIDO, S. S. ; GARCIA, A. ; DELFINO, D. B. ; MARCHETTO, R. Initial Studies of the Inhibition of Bacterial Topoisomerases Activity by Peptides Derived from ParE Toxin.. In: WorkShop IQ 2009, Araraquara.

- BARROS, R. S. ; BARBOSA, L. C. B. ; GARCIA, A. ; GARRIDO, S. S. ; MARCHETTO, R. Peptide Inhibitors of Bacterial Topoisomerases: Studies of Delivery into Bacterial Cell by Cell Penetrating Peptides. In: XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2009, Águas de Lindóia.

- DELFINO, D. B. ; GARRIDO, S. S. ; GARCIA, A. ; BARBOSA, L. C. B. ; MARCHETTO, R. Initial Studies of Controlled Release Systems Applied to New Topoisomerase Peptide Inhibitors Structurally Derived from Bacterial. In: Workshop IQ 2009, Araraquara.

- BARBOSA, L. C. B.; TEREZI, H.F.; BERTOLINI, M.C. Phosphorylation sites of the Neurospora crassa glycogen synthase. Influence of the cAMP signaling pathway in the phosphorylation. XXXVII Annual Meeting of SBBq, 2008, Águas de Lindóia.

#### ARTIGOS PUBLICADOS

- BARBOSA, L. C. B.; GARRIDO, S. S. ; DELFINO, D.B. ; GARCIA, A. ; MARCHETTO, R. Molecular Modeling, Design and Structural Studies of a new Class of peptide Inhibitors of bacterial Topoisomerases. Journal of Peptide Science (Print), v. 16, p. 173-174, 2010.

- 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

- FREITAS, F.Z. ; DE PAULA, R.M. ; BARBOSA, L. C. B. ; TEREZI, H.F. ; BERTOLINI, M.C. cAMP signaling pathway controls glycogen metabolism in *Neurospora crassa* by regulating the glycogen synthase gene expression and phosphorylation. *Fungal Genetics and Biology*, v. 47, p. 43-52, 2010.

#### PRÊMIOS RECEBIDOS

- SBBq Award, melhor poster, no XXXIX Annual Meeting of Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2010, Foz do Iguaçu.

- Menção Honrosa ao trabalho "EBIAN: PACOTE DE PROGRAMAS EM JAVA SCRIPT PARA ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA", apresentado no IV Congresso de Iniciação Científica da UNIARA, Centro Universitário de Araraquara (UNIARA), 2009, Araraquara.

#### IDIOMAS

1. Inglês: avançado.
2. Espanhol: fluente.
3. Catalão: básico.

Dedico este trabalho a meus pais,  
Maria Cristina e Luiz Carlos, pelo  
apoio em todos os momentos.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador professor Dr. Reinaldo Marchetto, pela oportunidade de realizar o presente trabalho, pela paciência, disposição e convivência durante esses anos.

Ao meu co-orientador na Espanha professor Miquel Pons pela ótima recepção em seu laboratório e pelos valiosos ensinamentos.

Aos meus pais, Maria Cristina e Luiz Carlos, minha irmã, Juliana, pelo apoio incondicional durante todos esses anos.

Aos companheiros de laboratório Anderson, Davi (Pardal), Saulo, Ronaldo (gandi), Camila Caliri, Larissa, Michelly, Lentilha, Esteban, Vanessa, Paulo, Igor, Ives e Laura pelos bons momentos e pela boa convivência.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, Fernando, Zilda, Ademir, Tarcísio, Luíza e Valdenir.

Aos demais funcionários do Instituto de Química.

Ao Instituto de Química de Araraquara

Ao Instituto de Recerca Biomédica (IRB) de Barcelona e ao Parc Científic de Barcelona

À Capes pela bolsa concedida durante meu estágio no exterior.

À FAPESP pelo financiamento do projeto.

Ao CNPq pela bolsa concedida no doutorado.

"A adversidade desperta em nós capacidades que,  
em circunstâncias favoráveis, teriam ficado adormecidas"

Horácio

## RESUMO

O sistema ParE-ParD é um sistema toxina-antitoxina bacteriano, sendo ParE a toxina e ParD a antitoxina. ParD é capaz de neutralizar a ação de ParE formando um complexo com o mesmo, o qual é eficaz na autorregulação do operon *parDE*. Estudos têm mostrado que a atividade tóxica de ParE ocorre inibindo a atividade da DNA girase, mas nenhum efeito desta proteína sobre a atividade da topoisomerase IV foi observado até hoje. Baseando-se na estrutura primária da toxina ParE de *Escherichia coli*, bem como nos escassos dados em relação a esta toxina, a meta deste trabalho foi a obtenção de peptídeos sintéticos baseados nesta proteína a fim de avaliar as sequências de aminoácidos responsáveis pela interação com as diferentes topoisomerasas bacterianas, além de tentar isolar uma sequência polipeptídica com potencial atividade inibitória sobre essas enzimas. Utilizando modelagem molecular por homologia, um modelo tridimensional para toxina ParE de *E. coli* foi obtido e validado. Com base nos dados estruturais inferidos a partir do modelo da estrutura tridimensional de ParE, 12 peptídeos foram racionalmente desenhados e sintetizados pela metodologia da fase sólida. Ensaio de inibição *in vitro* da atividade de superenovelamento de DNA pela girase e de relaxamento de DNA pela topoisomerase IV foram realizados e indicaram que os peptídeos ParE3 (ParE 80-100), ParE8 (ParE 61-105), ParE10 (ParE 61-87) e ParE12 (ParE 61-79) atuam como bons inibidores de ambas as enzimas. Ensaio de fluorescência intrínseca e anisotropia de fluorescência, empregando peptídeos sintéticos derivados de ParE, evidenciaram que o processo de inibição da atividade da DNA girase pela toxina ParE deve ocorrer por interação com a proteína GyrA da enzima. Foi iniciado neste trabalho os primeiros testes usando lipossomas como veículos carreadores para peptídeos bioativos derivados de ParE. Os peptídeos foram eficientemente encapsulados em lipossomas de fosfatidil colina de soja. Foi observado, embora reduzida, inibição de crescimento bacteriano quando os peptídeos encapsulados em lipossomas foram utilizados em ensaios biológicos com linhagem de *E. coli*. Por fim, fica evidente a possibilidade dos peptídeos derivados de ParE de constituírem uma classe importante de moléculas bioativas dentro deste emergente cenário que é o da terapia baseada em proteínas e peptídeos.

## ABSTRACT

The operon *parDE* encode a toxin-antitoxin system formed by ParE toxin and its antitoxin ParD. ParD is able to neutralize ParE action and is effective in autoregulation of the operon. Studies have shown that the toxic activity of the ParE occurs by inhibiting the activity of DNA gyrase, but no effect of this protein on the activity of topoisomerase IV has been observed yet. Based on the primary structure of the *Escherichia coli* ParE toxin, as well as the scarce data of this toxin, the aim of this work was to obtain synthetic peptides based on this protein in order to assess the amino acid sequences responsible for interaction with the bacterial topoisomerases, besides trying to isolate a polypeptide sequence with potential inhibitory activity against these enzymes. Using molecular homology modeling, a three-dimensional model for *E. coli* ParE toxin was obtained and validated. Based on structural data inferred from ParE three-dimensional model, 12 peptides were rationally designed and synthesized by solid-phase method. Tests of inhibition of the supercoiling reaction of the DNA gyrase and inhibition of DNA relaxation by topoisomerase IV were performed and indicated that the peptides ParE3 (ParE 80-100), ParE8 (ParE 61-105), ParE10 (ParE 61 -87) and ParE12 (ParE 61-79) act as good inhibitors of both enzymes. Intrinsic fluorescence and fluorescence anisotropy assays, using synthetic peptides derived from ParE showed that inhibition process of activity of the DNA gyrase by ParE toxin must occur by interaction with the GyrA protein. In this work was started the first tests using liposomes as carrier vehicles for bioactive peptides derived from ParE. The peptides were efficiently encapsulated in soybean phosphatidyl choline liposomes. It was observed, although reduced, inhibition of bacterial growth when peptides encapsulated in liposomes were used in bioassays with *E. coli* strain. Finally, it is clear the possibility of the peptides derived from ParE toxin to constitute an important class of bioactive molecules within this emerging scenario that is the therapy based on proteins and peptides. What remains is to study an effective strategy to optimize cell permeability of the peptides.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Diagramas esquemáticos das estruturas de GyrA e GyrB	5
<b>Figura 2</b>	Mecanismo de ação da DNA Girase	7
<b>Figura 3</b>	Outras funções realizadas pela DNA girase	8
<b>Figura 4</b>	Estrutura molecular de antimicrobianos quinolonas e coumarinas	9
<b>Figura 5</b>	Modelo para a regulação dos sistemas toxina-antitoxina	12
<b>Figura 6</b>	Representação geral da formação de uma ligação amida	14
<b>Figura 7</b>	Visualização progressiva de uma resina	16
<b>Figura 8</b>	Protetores usuais para função $\alpha$ -amina	18
<b>Figura 9</b>	Mecanismo de formação de ligação peptídica por carbodiimidas	20
<b>Figura 10</b>	Esquema da reação envolvida durante o teste de ninidrina	21
<b>Figura 11</b>	Representação esquemática dos vários tipos de lipossomas, mostrando a base da sua classificação em termos de tamanho, número de lamelas e sua posição relativa	24
<b>Figura 12</b>	Metodologia de preparação de lipossomas	25
<b>Figura 13</b>	Modelo da estrutura tridimensional da toxina ParE de <i>E. coli</i> e validação do modelo com PROCHECK	41
<b>Figura 14</b>	Validação do modelo com VERIFY3D.	42
<b>Figura 15</b>	Comparação entre a estrutura secundária predita com PSIPRED e após a modelagem molecular para a toxina ParE de <i>E. coli</i> .	43
<b>Figura 16</b>	Peptídeos racionalmente desenhados com base na região C-terminal da toxina ParE de <i>E. coli</i> .	45
<b>Figura 17</b>	Análise por CLAE dos peptídeos EcParE1 e EcParE2 antes e após a purificação	47
<b>Figura 18</b>	Análise por CLAE dos peptídeos EcParE3 e EcParE4 antes e após a purificação	48
<b>Figura 19</b>	Análise por CLAE dos peptídeos EcParE5 e EcParE6 antes e após a purificação	49

<b>Figura 20</b> Análise por CLAE dos peptídeos EcParE7 e EcParE8 antes e após a purificação	50
<b>Figura 21</b> Análise por CLAE dos peptídeos EcParE9 e EcParE10 antes e após a purificação	51
<b>Figura 22</b> Análise por CLAE dos peptídeos EcParE11 e EcParE12 antes e após a purificação	52
<b>Figura 23</b> Triagem inicial dos peptídeos derivados da toxina ParE de <i>E. coli</i> sobre a inibição da atividade da DNA girase	53
<b>Figura 24</b> Determinação da concentração mínima inibitória dos peptídeos EcParE3, EcParE8 e EcParE10 sobre atividade DNA girase	54
<b>Figura 25</b> Triagem inicial dos peptídeos derivados da toxina ParE de <i>E. coli</i> sobre a inibição da atividade da topo IV	55
<b>Figura 26</b> Determinação da concentração mínima inibitória dos peptídeos EcParE3, EcParE8 e EcParE10 sobre atividade da topo IV	56
<b>Figura 27</b> Análise da estrutura primária da região C-terminal de ParE	57
<b>Figura 28.</b> Espectro de emissão de fluorescência de das proteínas GyrA e GyrB na ausência e presença de quantidades variáveis de ParE3	60
<b>Figura 29.</b> Espectro de emissão de fluorescência de das proteínas GyrA e GyrB na ausência e presença de quantidades variáveis de ParE10	61
<b>Figura 30.</b> Confirmação da derivatização com FITC do peptídeo ParE3 por espectrofotometria de absorvância e por fluorescência	64
<b>Figura 31.</b> Confirmação da derivatização com FITC do peptídeo ParE10 por espectrofotometria de absorvância e por fluorescência	65
<b>Figura 32.</b> Análise da formação de complexos ParE3-GyrA e ParE3-GyrB por anisotropia de fluorescência	66
<b>Figura 33.</b> Análise da formação de complexos ParE10-GyrA e ParE10-GyrB por anisotropia de fluorescência	67
<b>Figura 34.</b> Inibição da atividade da topoisomerase II humana pelo peptídeo ParE12	68

<b>Figura 35.</b> Perfil obtido por cromatografia de exclusão molecular dos lipossomas com EcParE3 e EcParE8	70
<b>Figura 36.</b> Perfil obtido por cromatografia de exclusão molecular dos lipossomas com EcParE10 e EcParE12	71
<b>Figura 37.</b> Análise da encapsulação dos peptídeos EcParE3 e EcParE8 em lipossomas	73
<b>Figura 38.</b> Análise da encapsulação dos peptídeos EcParE10 e EcParE12 em lipossomas	74
<b>Figura 39.</b> Teste de sensibilidade microbiana dos peptídeos encapsulados	75
<b>Figura 40.</b> Representações esquemáticas de ciclótídeos	77

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Classificação das Topoisomerases	4
<b>Tabela 2</b>	Visão geral das superfamílias das toxinas bacterianas	14
<b>Tabela 3</b>	Composição do meio de cultura LB	37

## Índice de abreviaturas

### 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

AOP - Hexafluorofosfato de 7-aza-(1-H-benzotriazol-1-il-oxi)-tris-(dimetilamino)-fosfônio

Boc - *t*-Butiloxicarbonila

BOP - Hexafluorofosfato de (1-H-benzotriazol-1-il-oxi)-tris-(dimetilamino)-fosfônio

Bzl - Benzila

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

CLME - Cromatografia líquida de média eficiência

CPP - Peptídeos carreadores de proteínas

CCPP – Peptídeos circulares carreadores de proteínas  
DCM - Diclorometano  
DIC - Diisopropilcarbodiimida  
DIEA - N-Diisopropiletilamina  
DMF - N,N-Dimetilformamida  
DMSO – Dimetilsulfóxido  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
DO – Densidade ótica  
DTNB - Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)  
DTT - 1,4 Ditiotretol  
DVB – Divinil-benzeno  
ESI-Q – Electrospray quadrupolo  
Girase - DNA-girase  
GOV – Vesículas oligolamelares gigantes  
GUV - Vesículas unilamelares gigantes  
GyrA - Subunidade A da DNA girase  
GyrB - Subunidade B da DNA girase  
EDT - 1,2-etanoditiol  
EDTA - Ácido etilenodiaminotetraacético  
FITC – Isotiocianato de fluoresceína  
Fmoc - 9- Fluorenilmetiloxycarbonila  
HATU - Hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio  
HBTU - Hexafluorofosfato de 2-(1-H-Benzotriazol-1-il) – 1,1,3,3 - tetrametilurônio  
HOBt - N-Hidroxibenzotriazol  
HOAt - 7-aza-1-hidroxibenzotriazol  
LB - Meio de cultura “Luria-Bertani”  
LC-MS - Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas  
LOV - Vesículas Oligolamelares grandes  
LUV - Vesículas unilamelares grandes  
MIC – Mínima concentração inibitória  
MLV - Vesículas multilamelares  
MPLC - Cromatografia líquida de média eficiência  
MUV - Vesículas unilamelares médias  
MVL – Lipossomas multivesiculares

NMP - N-metilpirrolidona  
OLV - Vesículas oligolamelares  
parC - Subunidade parC da Topoisomerase IV  
ParD – Antitoxina ParD  
parE - Subunidade parE da Topoisomerase IV  
ParE – Toxina ParE  
Pmc - 2,2,5,7,8-pentametil-cromano-6-sulfonila  
PS - Poliestireno  
pyBOP - Hexafluorofosfato de (1-H-benzotriazol-1-il-oxi)-tris-(pirrolidino)fosfônio  
pyOAP - Hexafluorofosfato de 7-aza-(1-H-benzotriazol-1-il-oxi)-tris-(pirrolidino)-  
fosfônio  
RNA – Ácido ribonucleico  
RNAm – RNA mensageiro  
RP-HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa  
SOV – Vesícula oligolamelar pequena  
SPFS - Síntese de peptídeos em fase sólida  
STEB - Carregador de DNA - sacarose, tris, EDTA e azul de bromofenol  
SUV – Vesículas unilamelares pequenas  
TA - Sistema toxina-antitoxina  
TBE - Tampão para eletroforese tris/borato/EDTA  
TATU - Tetrafluorborato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio  
TBTU - Tetrafluorborato de 2-(1-H-Benzotriazol-1-il) – 1,1,3,3 - tetrametilurônio  
tBu - terc-butila  
TFA - Ácido trifluoroacético  
TFE - Trifluoroetanol  
TIS - Triisopropilsilano  
Topo IV - Topoisomerase IV  
TRIS - Tris(hidroximetil)metilamina

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Topoisomerasas: alvos estratégicos no desenvolvimento de fármacos	3
1.1.1.	DNA Girase	5
1.1.2.	Topoisomerase IV	10
1.2.	Sistema Toxina-Antitoxina: um sistema com perspectivas biotecnológicas	10
1.2.1.	Sistema Toxina-Antitoxina ParE	13
1.3.	Síntese química de peptídeos	13
1.4.	Lipossomas	21
2.	OBJETIVOS	26
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1.	Reagentes e solventes	29
3.2.	Material biológico	30
3.3.	Equipamentos	30
3.4.	Predição de estruturas secundárias e obtenção de seqüências e coordenadas atômicas de estruturas de proteínas	31
3.5.	Modelagem molecular por homologia	31
3.6.	Síntese de peptídeos	32
3.7.	Purificação e identificação dos peptídeos	32
3.8.	Ensaio de inibição da atividade da DNA girase	33
3.9.	Ensaio de inibição da atividade da Topoisomerase IV	34
3.10.	Ensaio de inibição da atividade da Topoisomerase II humana	34
3.11.	Marcação dos peptídeos ParE3 e ParE10 com FITC	35
3.12.	Espectroscopia de fluorescência	35
3.12.1	Fluorescência intrínseca	35
3.12.2	Fluorescência extrínseca	35
3.13.	Preparo de lipossomas e eficiência de encapsulação	36
3.14.	Teste de sensibilidade microbiana	37
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	38
4.1.	Modelagem molecular da toxina ParE de <i>E. coli</i>	39
4.2.	Predição de estrutura secundária da toxina ParE de <i>E. coli</i> com PSIPRED	42

4.3. Análise da estrutura da toxina ParE de <i>E. coli</i> e desenho racional de peptídeos	43
4.4. Síntese, purificação e identificação de peptídeos derivados da toxina ParE	46
4.5. Ensaio de inibição das atividades das enzimas girase e TOPO IV	53
4.6. Avaliação da interação dos peptídeos com a DNA girase	58
4.7 Encapsulamento dos peptídeos em lipossomas e ensaio microbiológico	63
5. CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS	82

# 1. INTRODUÇÃO

As infecções causadas por micro-organismos resistentes a antibióticos são uma ameaça à saúde dos seres vivos e vêm atingindo índices alarmantes. O surgimento de resistência a antimicrobianos é um exemplo clássico de evolução em resposta a uma forte pressão de seleção, muitas vezes relacionado ao uso intensivo ou inadequado desses compostos. O problema da resistência envolve questões relacionadas com a duração e intensidade do tratamento, causando graves problemas de saúde pública e vultosos prejuízos econômicos. O impacto da crescente resistência de micro-organismos a medicamentos têm motivado a pesquisa e o desenvolvimento de novas drogas cada vez mais potentes no combate às doenças infecciosas (LOHNER e STAUDEGGER, 2001). O uso de novas tecnologias para o desenvolvimento de drogas mais eficazes constitui uma estratégia promissora no campo da biotecnologia, possibilitando a iniciativa de prospecção de novas classes de moléculas naturais ou sintéticas (HEINEMANN et al., 2000).

No contexto dos micro-organismos, a busca por nutrientes e a superpopulação formada por diferentes espécies, conduz a várias estratégias para assegurar a sobrevivência e o seu domínio sobre as outras. Uma delas é a secreção de antibióticos para matar, ou inibir, o crescimento de outras espécies. A elucidação das estruturas desses antibióticos, além dos seus mecanismos de ação, ao longo desses anos, tem facilitado o desenvolvimento de novas drogas (LOHNER e STAUDEGGER, 2001).

Peptídeos antimicrobianos são conhecidos por participar em mecanismos de defesa e têm sido isolados a partir de vários organismos, incluindo bactérias, fungos, vertebrados, invertebrados e plantas (BOMAN, 1995; HANCOCK et al., 1995; HANCOCK, 1997; JACK et al., 1995). Estes peptídeos e seus análogos têm amplo espectro de atividades contra bactérias resistentes a antibióticos (HARA et al., 1996; MIYANOSHITA et al., 1996; YAMADA e NATORI, 1993; SKERLAVAJ et al., 1999; CUDIC et al., 2002; JASIR et al., 2003). A maioria dos peptídeos antibacterianos atua desestabilizando membranas celulares através de uma interação peptídeo-lipídio (BOMAN, 1995). O desenvolvimento de estratégias que permitam transportar peptídeos para o interior da célula pode propiciar o desenvolvimento de peptídeos bioativos cujos alvos são intracelulares. Desta forma, os peptídeos são recentemente uma nova classe potencial de agentes

antimicrobianos que podem complementar a ação de antibióticos usados atualmente.

### **1.1. Topoisomerases: alvos estratégicos no desenvolvimento de fármacos**

O combate a doenças por meio de fármacos requer a identificação de um alvo celular. Um grupo de enzimas que se tornou alvo efetivo para agentes terapêuticos são as topoisomerases. Estas enzimas estão presentes em todas as células (procariotas e eucariotas) e são essenciais à viabilidade celular (REECE e MAXWELL, 1991). A necessidade fundamental de topoisomerases deriva da estrutura de dupla hélice do DNA. Para a maioria dos processos que necessitam acessar as informações armazenadas no DNA, as duas fitas da hélice devem se separar de forma temporária, como na transcrição ou recombinação, ou permanentemente, como na replicação. Nestes eventos, assim como em outras situações, as topoisomerases se encarregam de resolver todos os impasses topológicos do DNA para manter o funcionamento e viabilidade celular (CHAMPOUX, 2001).

O imenso interesse em topoisomerases nos últimos anos decorre não apenas do reconhecimento de seu papel crucial na gestão da topologia do DNA, mas também da grande variedade de drogas topoisomerase-alvo que estão sendo identificadas, as quais atuam gerando lesões citotóxicas, aprisionando as enzimas em complexos covalentes com o DNA. Estes “venenos” de topoisomerases incluem tanto antimicrobianos quanto quimioterápicos antineoplásicos (CHAMPOUX, 2001).

Topoisomerases são divididas em diferentes subfamílias com base em seus mecanismos e semelhanças de sequência. Topoisomerases tipo I clivam e religam apenas uma das fitas do DNA, enquanto as topoisomerases do tipo II clivam e religam as duas fitas do DNA durante a catálise (TSE-DINH, 2009). Outras subdivisões são baseadas em considerações estruturais (CHAMPOUX, 2001). A Tabela 1 apresenta representantes das subfamílias das topoisomerases procariotas e eucariotas.

**Tabela 1. Classificação das Topoisomerases\***

Topoisomerase <sup>a</sup>	Tipo da subfamília	Estrutura da subunidade	Tamanho(s) (aa) <sup>b</sup>
DNA topoisomerase I de Eubactéria ( <i>E. coli</i> )	IA	Monômero	865
DNA topoisomerase III de Eubactéria ( <i>E. coli</i> )	IA	Monômero	653
DNA topoisomerase III de levedura ( <i>S. cerevisiae</i> )	IA	Monômero	656
DNA topoisomerase III <sup>®</sup> de mamífero (humana)	IA	Monômero	1001
DNA topoisomerase III <sup>-</sup> de mamífero (humana)	IA	Monômero	862
DNA topoisomerase I Eucariótica (humana)	IB	Monômero	765
DNA topoisomerase Poxvirus (vaccinia)	IB	Monômero	314
DNA gyrase de eubactéria ( <i>E. coli</i> )	IIA	A2B2 hetero-tetrâmero	GyrA, 875 GyrB, 804
DNA topoisomerase IV de eubactéria ( <i>E. coli</i> )	IIA	C2E2 hetero-tetrâmero	ParC, 752 ParE, 630
DNA topoisomerase II de levedura ( <i>S. cerevisiae</i> )	IIA	Homodímero	1428
DNA topoisomerase II de mamífero (humana)	IIA	Homodímero	1531
DNA topoisomerase VI de arqueobactéria ( <i>Sulfolobus shibatae</i> )	IIB	A2B2 hetero-tetrâmero	A, 389 B, 530

\* Tabela modificada de CHAMPOUX, 2001.

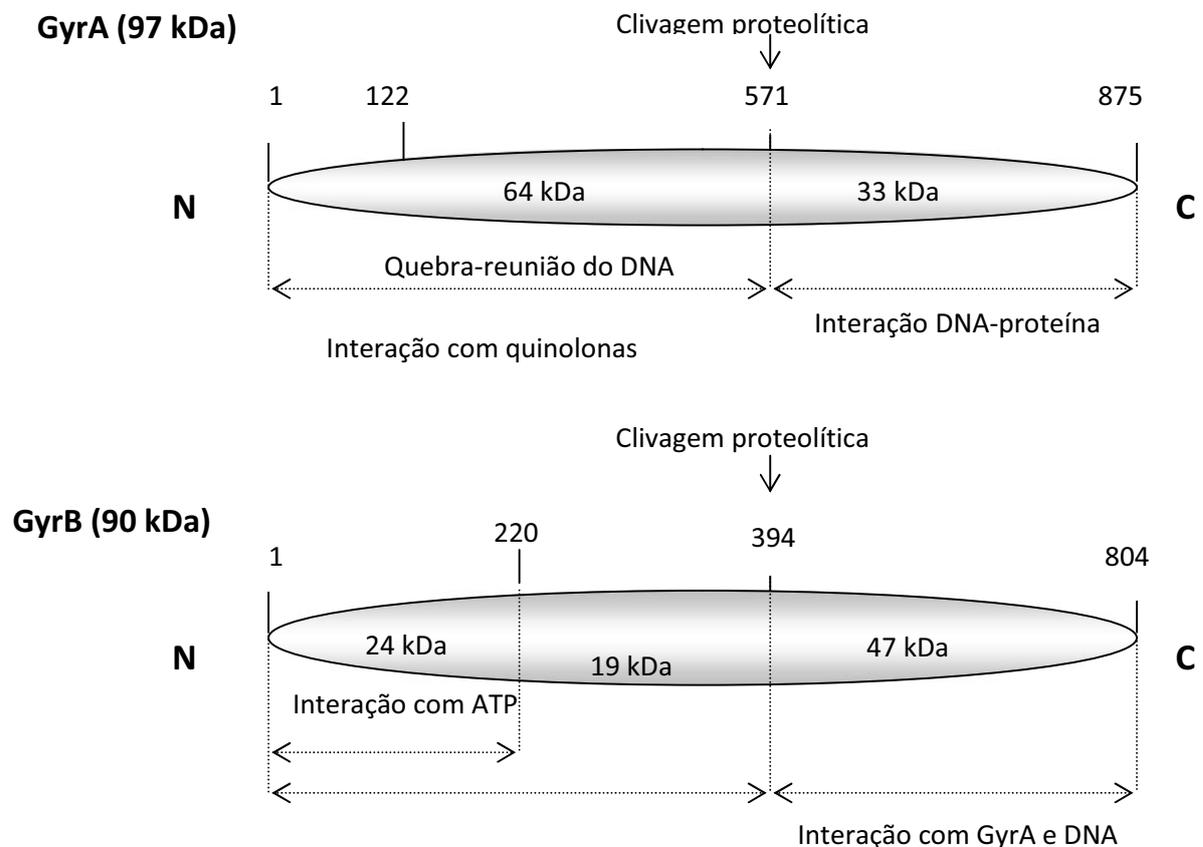
a Em parênteses aparecem as enzimas mais estudadas.

b Tamanho, em número de aminoácidos, baseado na enzima mais estudada.

### 1.1.1. DNA Girase

A enzima bacteriana DNA Girase descoberta por GELLERT e colaboradores em 1976, em *Escherichia coli*, é uma enzima da classe de Topoisomerases tipo II. Esta enzima é capaz de relaxar o superenovelamento negativo do DNA, facilitando deste modo os processos de replicação e transcrição. Além de relaxar o DNA superenovelado, a DNA girase possui a capacidade única de introduzir super-hélices negativas no DNA, usando energia livre liberada pela hidrólise do ATP (REECE & MAXWELL 1991). Esta última característica a torna distinta das outras topoisomerases.

No âmbito estrutural, a DNA girase é composta por duas subunidades proteicas GyrA e duas subunidades proteicas GyrB (Figura 1), codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB* respectivamente. Essas subunidades quando juntas formam um heterotetrâmero  $A_2B_2$  constituindo assim a sua forma ativa (WIGLEY, 1995; MAXWELL, 1993).



**Figura 1.** Diagramas esquemáticos das estruturas de GyrA e GyrB. Figura obtida de GARCIA, 2010.

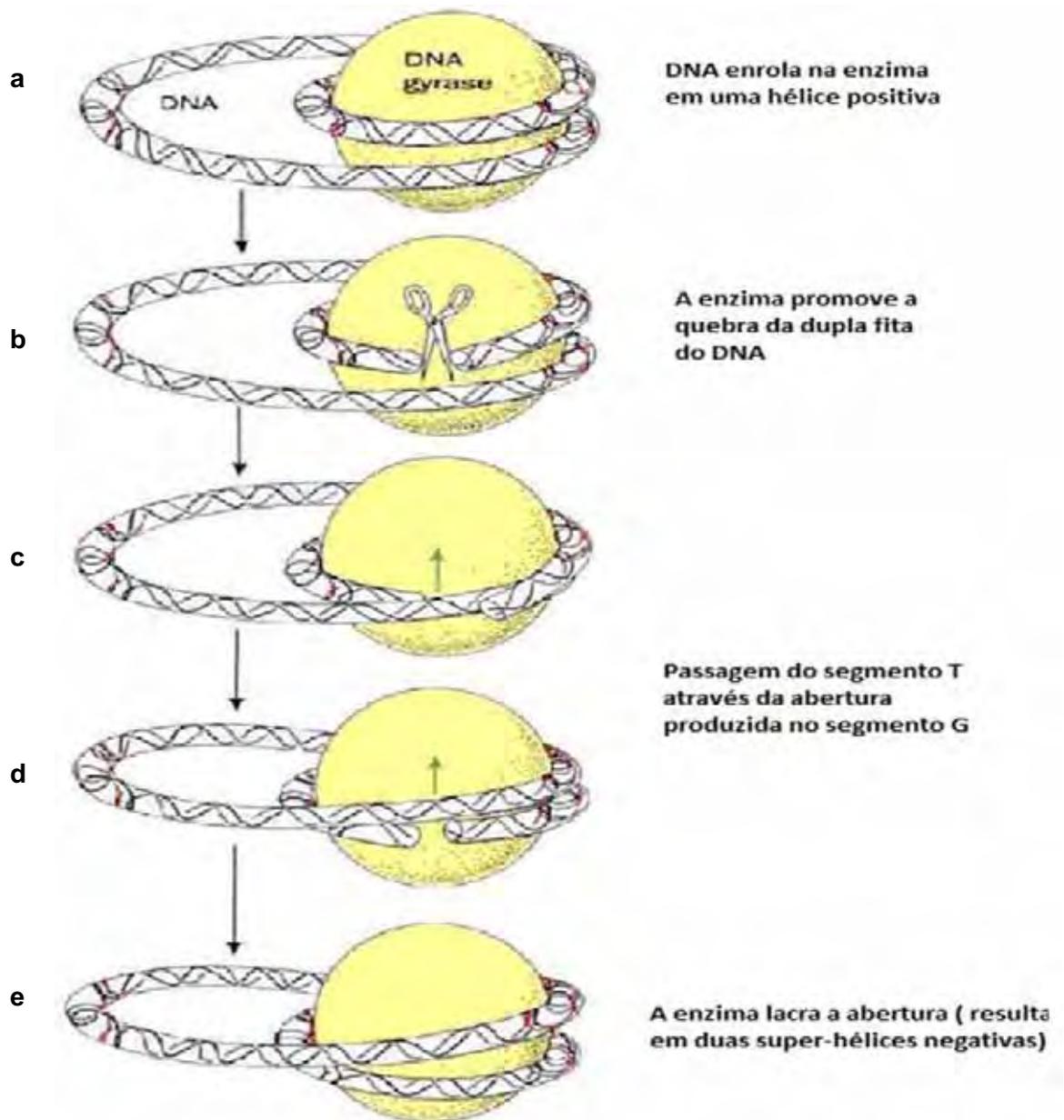
A subunidade GyrA tem uma massa molecular de 97 kDa, e é constituída por dois fragmentos, sendo um domínio amino-terminal de 64 kDa responsável pela quebra e união das fitas do DNA e por interação com quinolonas, e outro carboxi-terminal de 33 kDa responsável pela interação da proteína com o DNA. O domínio 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 B (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, 1995). 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).

Todas as reações catalisadas pelas topoisomerases envolvem a ligação da proteína ao DNA, clivagem do DNA, a passagem das fitas, religação da fita de DNA clivada, e em muitos casos a hidrólise do ATP. Embora a girase compartilhe do mecanismo geral das topoisomerases, ela também possui características mecánísticas especiais, as quais determinam sua habilidade em superenrolar negativamente o DNA. A reação de superenrolamento do DNA requer, além de ATP, um cátion bivalente, tal como o  $Mg^{2+}$ , e é estimulada pela presença de espermidina (GELLERT, *et al.*, 1976).

No superenovelamento, a girase age catalisando uma quebra transitória em uma molécula de DNA, a passagem de outro segmento da mesma molécula através dessa abertura e a posterior religação das fitas do DNA. Para que esse processo ocorra, inicialmente a DNA girase liga-se a um segmento de DNA, de aproximadamente 130 pb, envolvendo-o ao redor do tetrâmero e formando nele uma super-hélice positiva (Figura 2a). A seguir, ocorre a ligação de uma molécula de ATP à subunidade GyrB. A ligação do ATP produz então mudanças conformacionais na enzima, que sofre uma rotação. A GyrB captura um segmento do DNA denominado segmento T. Simultaneamente GyrA catalisa uma clivagem nas duas fitas de um outro segmento, denominado segmento G (Figura 2b). O complexo intermediário formado entre DNA e girase é denominado complexo clivável e nele o DNA

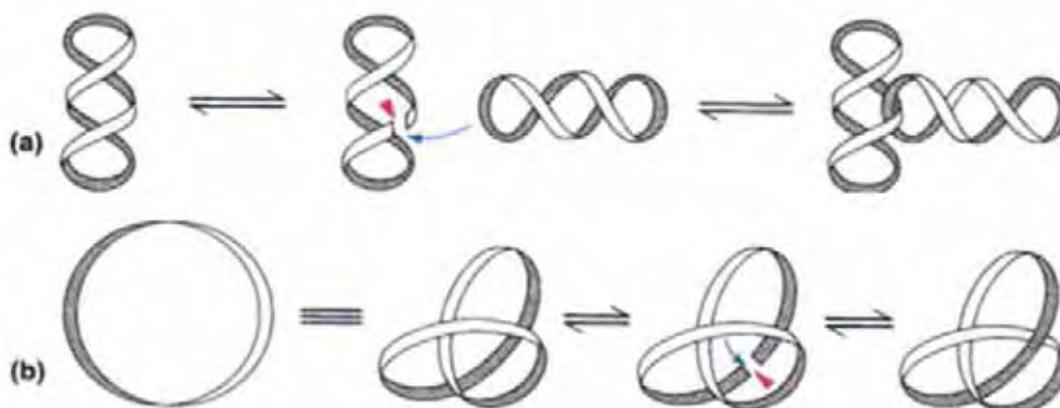
está covalentemente ligado à enzima por uma ligação entre a terminação 5' do DNA clivado e o resíduo de tirosina 122 da GyrA. O segmento T é transportado através da abertura produzida no segmento G (Figura 2c e 2d), que depois desta passagem tem suas fitas religadas (Figura 2e). O segmento T é então liberado da enzima por uma abertura transitória na GyrA. Com o religamento do DNA clivado, duas super-hélices negativas são introduzidas na molécula. O retorno da enzima à sua conformação original é promovido pela hidrólise da molécula de ATP (ROCA e WANG, 1992; SMITH e MAXWELL, 1998).



**Figura 2.** Mecanismo de ação da DNA Girase. Figura obtida de GARCIA, 2010.

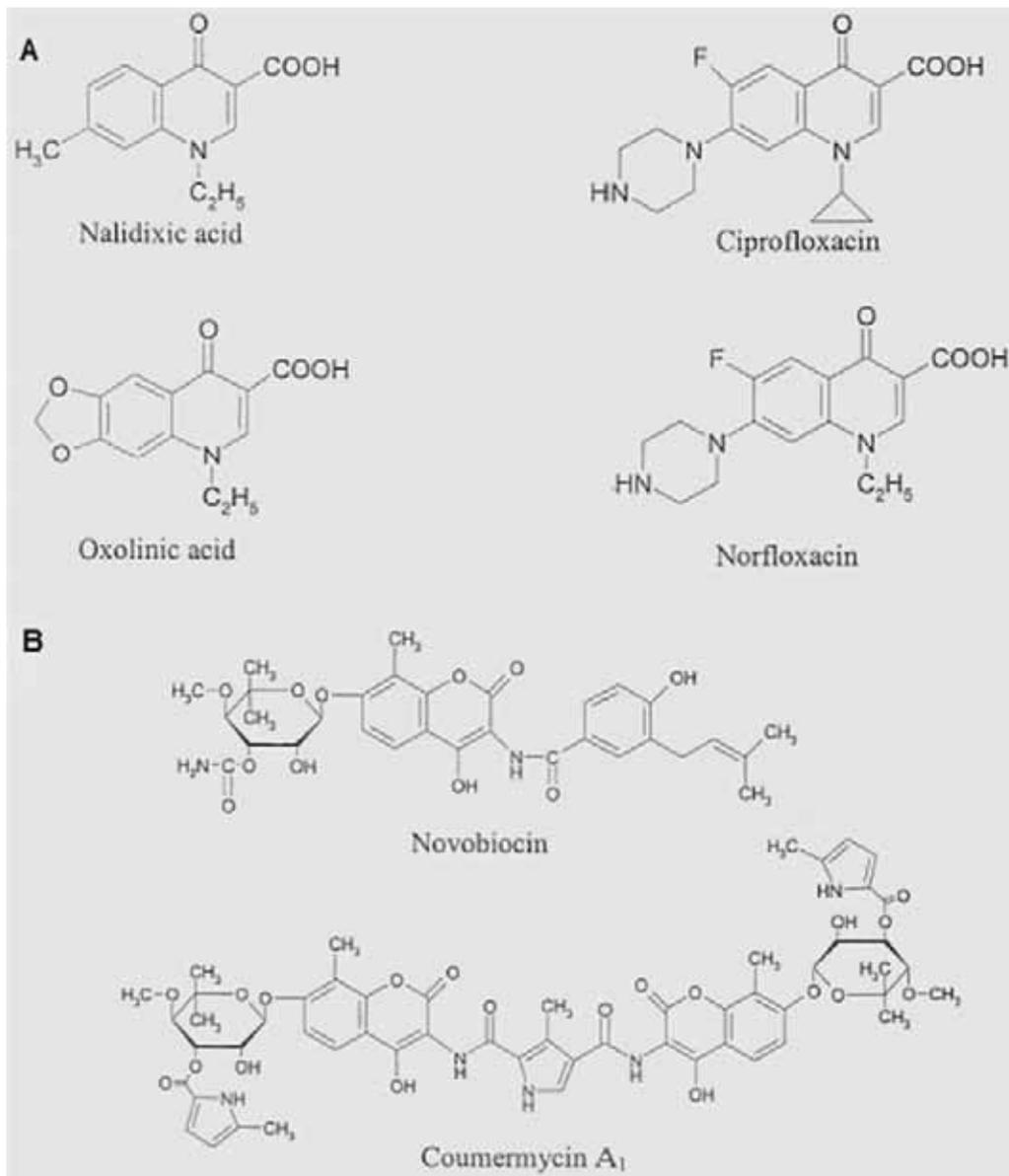
Na ausência de ATP, a girase relaxa o DNA superenrolado. A atividade de relaxamento da DNA girase é muito menos eficiente que a reação de superenrolamento, sendo requerida uma quantidade de aproximadamente 20 a 40 vezes maior de enzima, para uma taxa de reação comparável (HIGGINS, *et al.*, 1978).

Somada à habilidade única de catalisar a introdução de voltas helicoidais negativas no DNA circular e aliviar o superenrolamento do DNA, a DNA girase catalisa outras reações vitais ao metabolismo do DNA (Figura 3) tais como “catenation” ou “decatenation” (encadeamento ou desencadeamento) de dois DNA duplex cíclicos (MARIANS, 1987), além de desfazer o “knotted” (emaranhado) topológico de uma única molécula de DNA duplex circular (LIU, *et al.*, 1980).



**Figura 3.** Outras funções realizadas pela DNA girase: a) DNA *catenation* e *decatenation*; b) DNA *knotting* e *unknotting*. Figura obtida de GARCIA, 2010.

A natureza indispensável da DNA girase para as células bacterianas faz da mesma um alvo ideal para a ação de diversos tipos de fármacos. Realmente, um grande número de agentes antibacterianos girase-específicos têm sido descrito nos últimos anos, muitos deles classificados basicamente em dois grupos, o das quinolonas e o das cumarinas (Figura 4).



**Figura 4.** Estrutura molecular de antimicrobianos quinolonas (A) e coumarinas (B). Figura obtida de HEDDLE et al., 2000.

Embora o uso de antimicrobianos quinolônicos ou cumarínicos contra infecções bacterianas tem se mostrado muito eficaz, o número de organismos resistentes a estas classes tem emergido devido a mutações nos códons que codificam aminoácidos envolvidos na interação com estas drogas (EVERETT e PIDDOCK, 1998).

### **1.1.2. Topoisomerase IV**

Em 1990 KATO e colaboradores descobriram um homólogo da girase que foi chamado de topoisomerase IV. Similar a girase, a topoisomerase IV também é formada por quatro subunidades sendo duas parC e duas parE (KATO et al., 1990; KATO et al., 1992; PENG e MARIANS, 1993).

As topoisomerases IV são capazes de relaxar o superenovelamento do DNA, facilitando assim os processos de replicação e transcrição (KATO et al., 1990; KATO et al., 1992).

Tanto girase quanto topoisomerase IV clivam e religam as duas fitas do DNA durante a catálise, ou seja, são topoisomerases tipo II (TSE-DINH, 2009). No entanto, as enzimas diferem em uma maneira fundamental: DNA girase envolve o DNA em torno de si, enquanto topoisomerase IV não (PENG e MARIANS, 1995).

Além da semelhança estrutural e do mecanismo catalítico, DNA girase e topoisomerase IV tem também semelhanças em sua sensibilidade aos antibióticos como cumarinas e quinolonas. (PENG e MARIANS, 1993; KHODURSKY et al., 1995). Outros inibidores como microcina B17 (HEDDLE et al., 2001), CcdB (COUTURIER et al., 1998), YacG (SENGUPTA e NAGARAJA, 2008) e ParE (JIANG et al., 2002) foram identificados como inibidores da DNA girase, porém nenhuma evidência da atividade inibitória destas toxinas foram encontrados para a topoisomerase IV.

### **1.2. Sistema Toxina-Antitoxina: um sistema com perspectivas biotecnológicas**

Em contraste aos antibióticos secretados no ambiente, as toxinas bacterianas atuam atacando a célula a partir do seu interior. Quase toda bactéria contém certa quantidade de sistemas toxina-antitoxina (sistemas TA) os quais são entidades genéticas responsáveis pela regulação do crescimento e morte celular programada (GERDES et al., 2005; HAYES, 2003; YAMAGUCHI e INOUE, 2009). Os sistemas TA são classificados em três grupos (tipo I, II e III), com base na função da antitoxina.

No sistema tipo I (Figura 5a), a tradução do mRNA da toxina é regulado por um RNA *antisense* transcrito separadamente (GERDES e WAGNER, 2007).

No sistema tipo II (Figura 5b), a antitoxina e a toxina são codificadas por dois pequenos genes os quais geralmente compartilham certa quantidade de bases (VAN MELDEREN e SAAVEDRA DE BAST, 2009). Estes genes estão sob a influência de um mesmo promotor, ou seja, estão organizados em um operon. A antitoxina forma um complexo com a toxina o qual autorregula o promotor do operon. A antitoxina por si só pode também autorregular o sistema TA, porém mais fracamente do que o complexo TA (CHRISTENSEN-DALSGAARD et al., 2010; MARIANOVSKY et al., 2001; YAMAGUCHI et al., 2009). Sob condições de estresse, as antitoxinas são digeridas por proteases com o objetivo de deixar a toxina livre e, desta forma, controlar o crescimento (GERDES et al., 2005; YAMAGUCHI e INOUE, 2009).

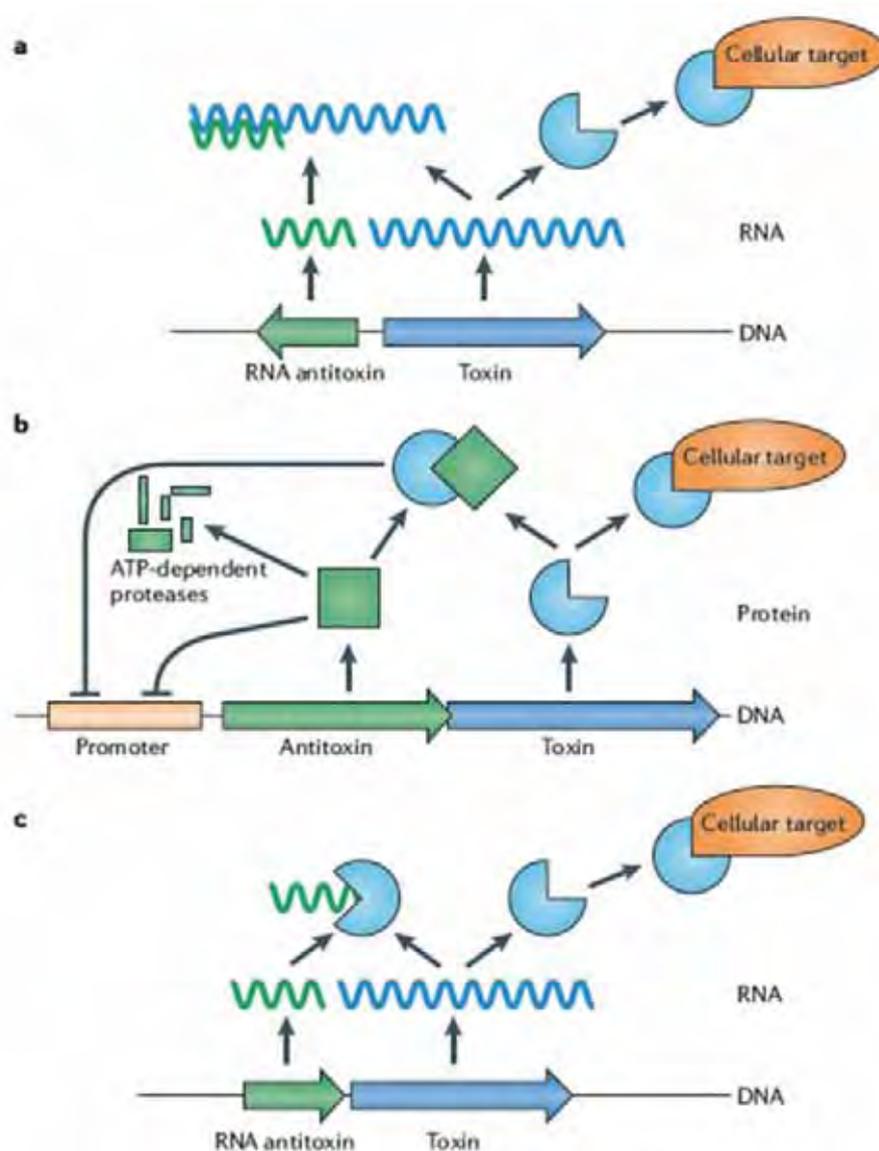
O sistema tipo III (Figura 5c), que foi recentemente identificado em *Pectobacterium atrosepticum*, a antitoxina (RNA-antitoxina) forma um complexo com a proteína toxina neutralizando sua toxicidade (FINERAN et al., 2009).

Os alvos celulares conhecidos das toxinas incluem a maquinaria de replicação de DNA (JAFFE et al., 1985; MIKI et al., 1992; ROBERTS et al., 1994), mRNA (YAMAGUCHI e INOUE, 2009), tRNA (GARCIA-CONTRERAS et al., 2008), ribossomos 30S (NEUBAUER et al., 2009) e 50S (ZHANG e INOUE, 2009; ZHANG et al., 2009; ZHANG e INOUE, 2011) e proteínas do citoesqueleto (TAN et al., 2011).

Os sistemas TA possuem importante função na fisiologia celular das bactérias. Sua indução tem sido verificada em várias condições de estresse como falta de certos aminoácidos, falta de glicose e em presença de antibióticos (YAMAGUCHI e INOUE, 2011). Esses sistemas também podem atuar matando seletivamente as células filhas que não receberam uma cópia do plasmídeo após o processo de divisão celular, mediando assim a herança estável do plasmídeo em bactérias (HAYES, 2003). Além disso, os sistemas TA possuem indícios de participação em outros eventos celulares como resposta SOS e formação de biofilme (YAMAGUCHI e INOUE, 2011).

A pesquisa sobre sistemas TA é uma área recente, porém já é evidente que ela pode abrir novas possibilidades na área biotecnológica. Por exemplo, a toxina bacteriana MazF mostrou ser tóxica a células de mamíferos (SHIMAZU

et al., 2007) e, desta forma, seu gene poderia ser usado em terapias gênicas contra o câncer e AIDS (CHONO et al., 2011). O desenvolvimento de antibióticos que inibem a formação dos complexos TA é outra área interessante e promissora (YAMAGUCHI e INOUYE, 2011).



**Figura 5. Modelo para a regulação dos sistemas toxina-antitoxina. a) Tipo I.** A antitoxina (uma RNA-antitoxina) se liga ao mRNA da toxina inibindo a tradução da mesma. **b) Tipo II.** A antitoxina e a toxina são sintetizadas a partir do mesmo promotor. A antitoxina forma um complexo com a toxina o qual autorregula o promotor do operon. Antitoxina por si só pode também autorregular o sistema TA, porém mais fracamente do que o complexo TA. **c) Tipo III.** A antitoxina (uma RNA-antitoxina) se liga à proteína toxina e inibe a toxicidade. Figura obtida de YAMAGUCHI e INOUYE, 2011.

### 1.2.1. Sistema Toxina-Antitoxina ParE

O sistema ParE-ParD é um sistema TA tipo II sendo ParE a toxina e ParD a antitoxina. ParD é capaz de neutralizar a ação ParE, formando um complexo com o mesmo, o qual é eficaz na autorregulação do operon *parDE* (JOHNSON et al., 1996).

As toxinas bacterianas podem ser subdivididas em cinco superfamílias chamadas MazF, RelE, Doc, HipA e  $\zeta$ , cada uma composta por famílias de genes distintos (FRANCUSKI e SAENGER, 2009). Outra superfamília foi proposta recentemente consistindo de um domínio N-terminal (Pilt-N) que ainda não foi estudado (ANANTHARAMAN e ARAVIND, 2003). A superfamília RelE inclui as famílias RelE, Yoeb, YafQ, Higb, ParE, Txe e YhaV (Tabela 2). As toxinas da superfamília RelE são caracterizadas por possuir atividade RNase e arquitetura semelhante às RNases genuínas (FRANCUSKI e SAENGER, 2009). Em contraste com a atividade RNase inibitória da tradução dos outros elementos que compõem a superfamília RelE, um estudo mostrou que a atividade citotóxica de ParE ocorre na replicação do DNA por interferir na ação da DNA girase (JIANG *et al*, 2002). Assim, apesar de uma origem comum e similaridade de seqüência significativa, esta toxina pode ter divergido no seu mecanismo de ação (ANANTHARAMAN e ARAVIND, 2003).

Para a toxina ParE, apenas uma estrutura cristalográfica está disponível até o momento e o mecanismo de citotoxicidade desta toxina permanece a ser determinado (DALTON e CROSSON, 2010).

### 1.3. Síntese química de peptídeos

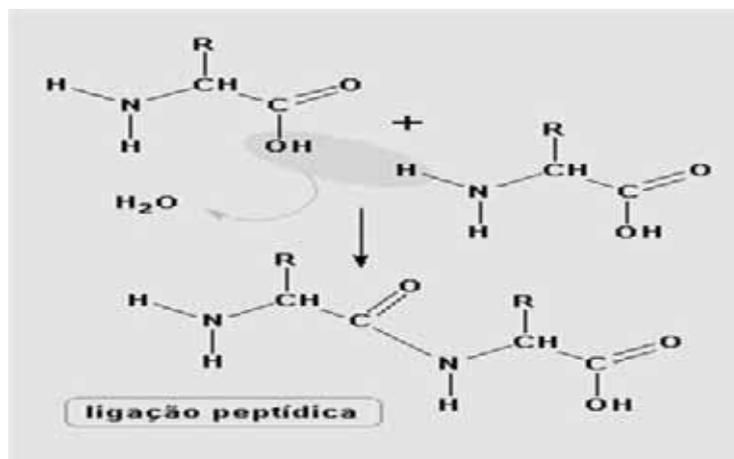
A síntese química de peptídeos poderia ser explicada, de maneira bastante simplificada, como a formação química e repetida de ligações amida com a finalidade de conectar funções amina e carboxílica de L- $\alpha$ -aminoácidos adjacentes (Figura 6). Mais precisamente é assim denominada porque utiliza um reagente químico para ativar o grupo carboxílico de um  $N^{\alpha}$ -acil-aminoácido ou de um  $N^{\alpha}$ -acil-fragmento peptídico (RCOOH, componente carboxílico, doador de acila ou agente acilante). Este componente ativado sofre o ataque

nucleofílico do grupo  $\alpha$ -amino de outro aminoácido ou fragmento peptídico  $C^\alpha$ -bloqueados ( $H_2N-R1$ , 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).

**Tabela 2. Visão geral das superfamílias de toxinas bacterianas\***

Toxina/ antitoxina	Superfamília da toxina						Superfamília da antitoxina			
	MazF	RelE	Doc	PIN	HipA	$\zeta$	AbrB	MetJ/Arc	YefM/Phd	HTH motif
CcdB/CcdA	+							+		
Kid/Kis	+						+			
MazF/MazE	+						+			
ChpBK/ChpBI	+						+			
RelE/RelB		+							+	
YxeB/YefM		+								+
YafQ/DinJ		+							+	
HigB/HigA		+								+
ParE/ParD		+							+	
YhaV/PriF		+					+			
Txe/Axe		+							+	
Doc/Phd			+							+
VapC/VapB				+			+			
HipA/HipB					+					+
$\zeta/\epsilon$ (to) <sup>e</sup>						+		+		

\* Tabela baseada em FRANCUSKI e SAENGER, 2009



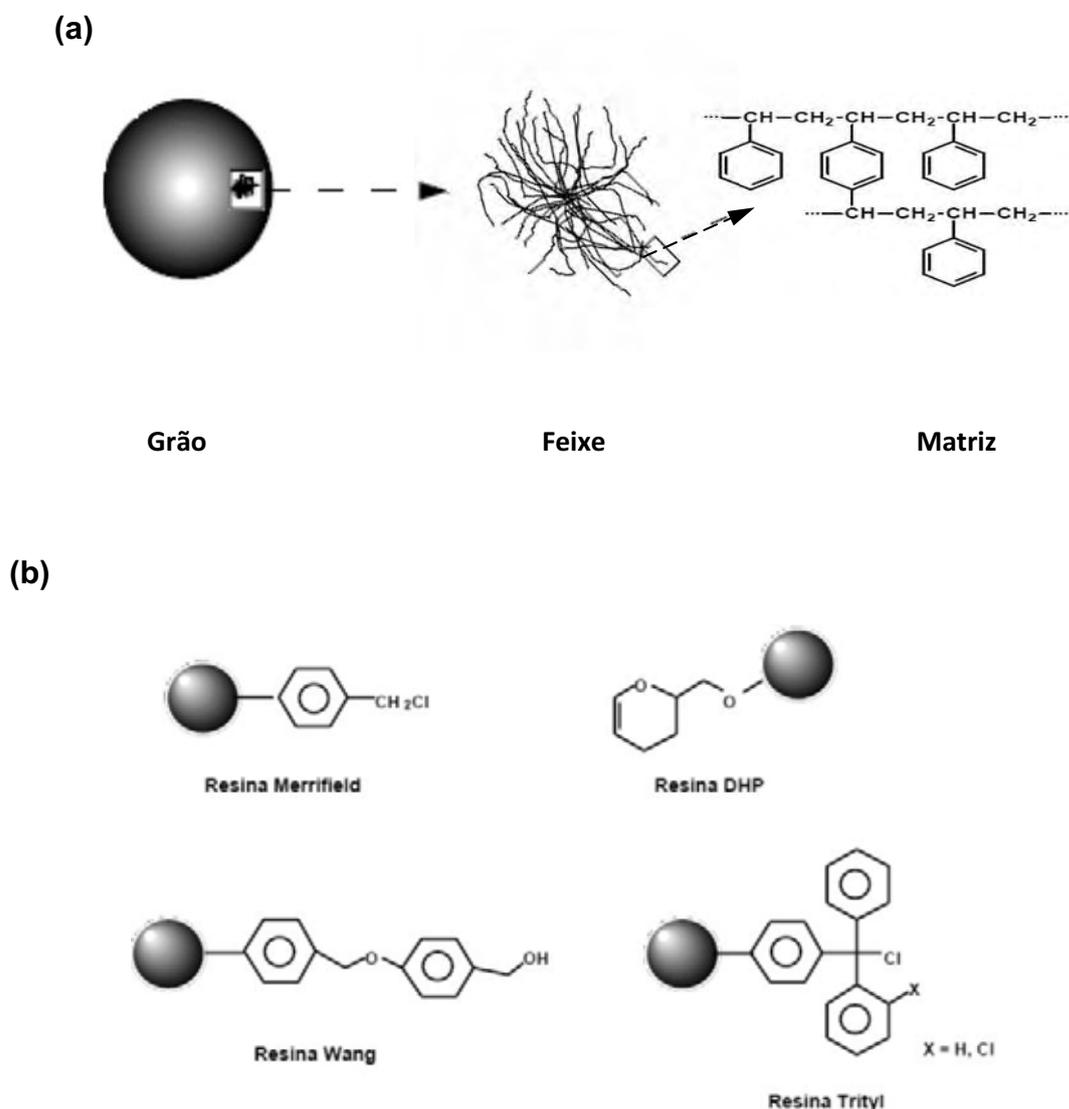
**Figura 6.** Representação geral da formação de uma ligação amida

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 e 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), 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 7a). Em intervalos mais ou menos regulares surgem estruturas químicas diferenciadas (ligantes, *linkers*), constituídas por moléculas contendo diferentes grupos funcionais (Figura 7b).

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.



**Figura 7.** 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). Figura obtida de GARCIA, 2010.

Desde os trabalhos iniciais de Merrifield (1963), o suporte mais utilizado é um polímero microporoso de estireno (PS), que contém 1% de *p*-divinilbenzeno (DVB) como *cross-linker* (Figura 7a). Enquanto os grãos de

poliestireno secos apresentam um diâmetro de aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ , 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 sequencial é atualmente a mais utilizada para a síntese de peptídeos que contém até 60 resíduos de aminoácidos. Para a síntese de sequências 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.

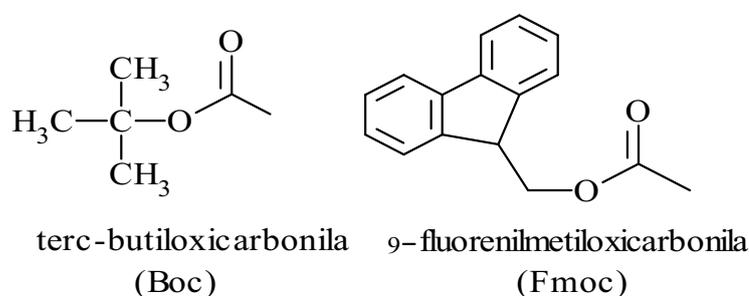
Como já citado, a formação controlada de qualquer ligação peptídica requer que todos os grupos funcionais presentes nas moléculas, exceto os dois que vão participar da formação da ligação, estejam protegidos. Uma vez formada a ligação e antes da incorporação do seguinte aminoácido ou peptídeo, deve-se 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  $\text{C} \rightarrow \text{N}$ , 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  $\alpha$ -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 somente 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  $\alpha$ -amínico dos aminoácidos com um dos dois protetores *tert*-Butiloxicarbonila (ANDERSON e MCGREGOR, 1957; CARPINO, 1957) e 9-Fluorenil-metiloxicarbonila (CARPINO e HAN, 1972), respectivamente, os quais se diferenciam, principalmente, quanto à labilidade ácido-base (Figura 8).



**Figura 8.** Protetores usuais para função  $\alpha$ -amina na metodologia da fase sólida

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 *tert*-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.

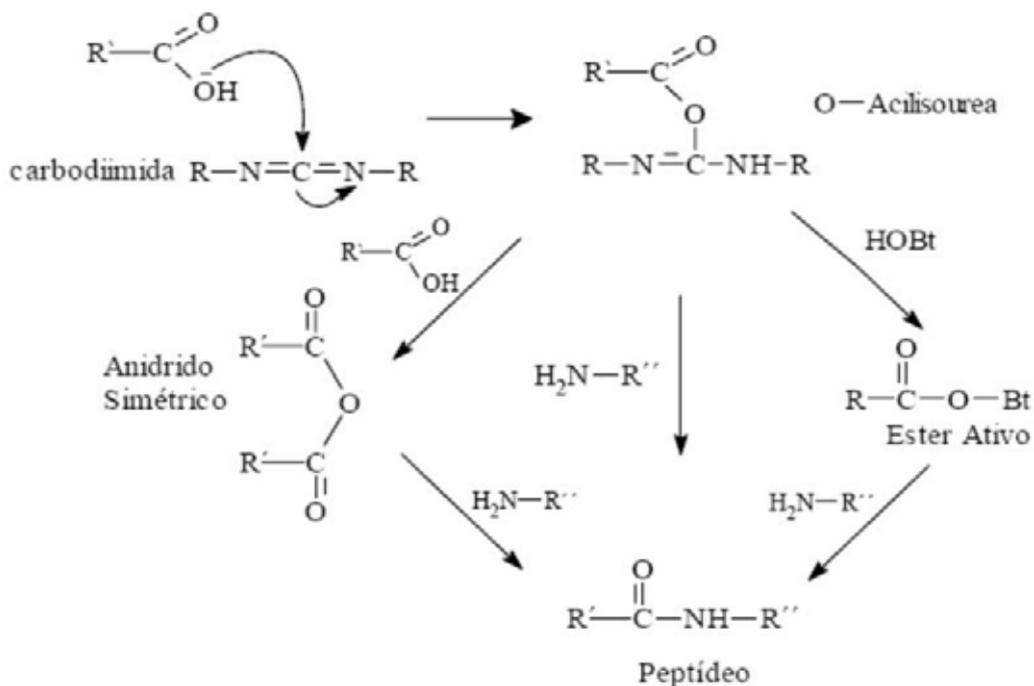
Durante uma síntese, para que ocorra a formação da ligação peptídica entre os aminoácidos adjacentes, é necessário que o componente eletrófilo (C carbonílico do ácido) esteja ativado, pois caso contrário seria formado um sal de amônio. Esta ativação do ácido carboxílico, que é a base da formação da ligação 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. Desta forma, ele pode sofrer ataque pelo grupo amina do aminoácido que permanece ligado à resina e, assim, formar a ligação amida.

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 9).

Sais de acilfosfonio também têm sido amplamente utilizados como reagentes de acoplamento (CASTRO *et al.*, 1975; COSTE *et al.*, 1990; COSTE e 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

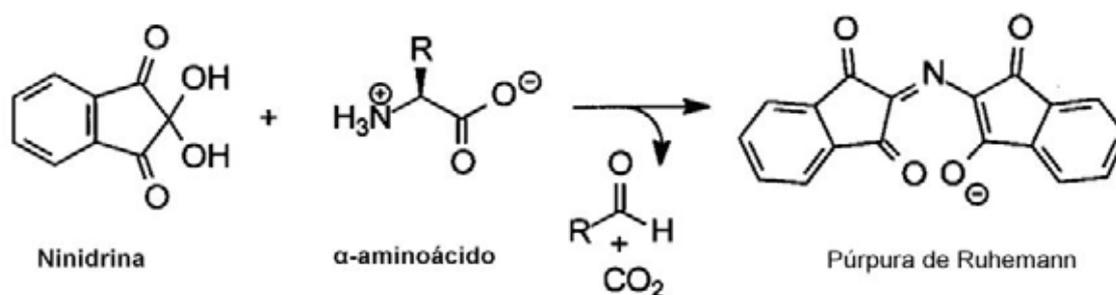
reativos e não formam produtos secundários tóxicos, como a hexametilfosforotriamida, formada quando se utiliza BOP ou AOP.



**Figura 9.** Mecanismo de formação de ligação peptídica por carbodiimidas. Figura obtida de GARCIA, 2010.

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 do teste de ninidrina (KAISER *et al.*, 1970). Este composto reage com aminas primárias levando à formação de um produto de coloração violeta. Desta forma, após acoplamento de aminoácidos à cadeia polipeptídica, o teste deve apresentar coloração amarela, indicando a ausência de aminas livres, pois o grupamento amina apresenta-se protegido e, após desproteção do grupamento amina, deve apresentar coloração violeta (Figura 10).



**Figura 10.** Esquema da reação envolvida durante o teste de ninidrina

#### 1.4. Lipossomas

A utilização da maioria dos compostos terapêuticos tem sido limitada pela impossibilidade de aumento da sua dosagem. A retenção ou degradação do agente terapêutico, baixa solubilidade e, em especial, os efeitos colaterais inerentes à sua utilização em concentrações elevadas, tornam muitas vezes difícil a utilização da dosagem necessária para que este cumpra a sua função. Este problema levou a um grande esforço no sentido de desenvolver um sistema capaz de transportar um composto terapêutico até um alvo específico (SANTOS e CASTANHO, 2002).

Nesse sentido, através de estudos de aplicação imediata, os lipossomas adquiriram uma larga aceitação, pois existem várias vantagens para sua utilização como transportadores. Uma delas é a facilidade de incorporação de um fármaco, independentemente da sua carga ou massa

molecular. Além disso, os sistemas de vesículas lipídicas encontram-se bem caracterizados em termos de estabilidade, toxicidade, estrutura, imunogenicidade e formas de administração *in vivo*, dispondo-se de um vasto leque de possibilidades na escolha do sistema mais adequado para cada fim (SANTOS e CASTANHO, 2002).

A prática comum de adotar solventes não aquosos durante a busca de novas substâncias com atividade biológica através da química combinatória e *screenings* tem resultado no surgimento de muitas novas entidades com baixa solubilidade em água e biodisponibilidade abaixo do limite terapêutico (NEW, 1990). No caso de formulações líquidas há várias tecnologias normalmente usadas para aumentar a solubilidade, incluindo ajuste de pH, força iônica, co-solventes, emulsões e agentes surfactantes. No entanto, a preparação de formulações contendo lipossomas é empregada como boa alternativa em termos de administração de fármacos e, principalmente, cosméticos, no que se refere a substâncias pouco solúveis (NEW, 1990).

Os lipossomas permitem que materiais solúveis e não solúveis em água sejam utilizados em uma mesma formulação. Os materiais solúveis são dissolvidos na fase aquosa na qual o fosfolípídeo será hidratado. Quando os lipossomas se formam, este material fica retido em seu centro aquoso interno. O material lipofílico adere à parede do lipossoma, bicamadas constituídas por fosfolípídeos que circundam o centro aquoso. Dessa forma as diversas substâncias são carregadas para dentro da estrutura desejada (NEW, 1990). Os lipossomas possuem uma vasta aplicação em cosmética por serem hábeis em transportar e liberar componentes ativos diretamente no sítio de aplicação do produto e por propiciarem a liberação controlada das substâncias ativas nos locais pretendidos. Isto se deve ao fato de a parede do lipossoma ser muito semelhante, fisiologicamente, ao material das membranas celulares. Quando um cosmético contendo lipossoma é aplicado na pele, este começa a fundir-se com a membrana celular, liberando sua carga de materiais ativos, de forma lenta e diretamente para dentro da célula (NEW, 1990). Os lipossomas são também utilizados para aumentar a estabilidade e evitar a precipitação de diversas substâncias, incluindo proteínas.

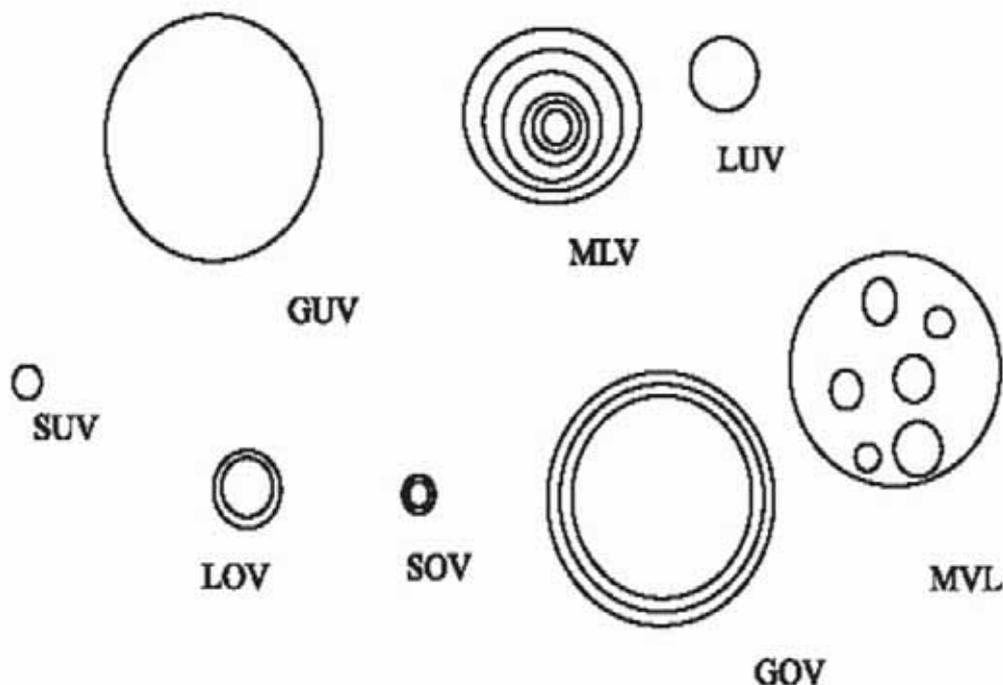
Os lipossomas podem ser definidos como associações coloidais de lipídeos anfipáticos, que se organizam espontaneamente em estruturas

fechadas tipo concha esférica. Podem ser preparados a partir de misturas lipídicas naturais ou a partir de lipídeos sintéticos, disponíveis comercialmente.

A nomenclatura adotada para os lipossomas é baseada no seu número de bicamadas lipídicas (lamelas) e tamanho (SZOKA e PAPAHADJOPOULOS, 1980). Assim, para os lipossomas de preparação mais imediata, ficou consagrado o nome de vesículas multilamelares ou MLV (*multilamellar vesicles*). Como o nome indica, estas vesículas são constituídas por várias bicamadas lipídicas, aproximadamente concêntricas, podendo o seu diâmetro variar entre 400 e 3500 nm (JULIANO, 1981).

Dentre os lipossomas, os mais utilizados são as vesículas unilamelares grandes ou LUV (*large unilamellar vesicles*), de diâmetro superior a 100 nm, bem como as vesículas unilamelares pequenas ou SUV (*small unilamellar vesicles*), com diâmetro entre 20 e 50 nm (LICHTENBERG e BARENHOLZ, 1988). Existem ainda as vesículas unilamelares gigantes ou GUV (*giant unilamellar vesicles*), com dimensões superiores a 1 µm, podendo chegar às dezenas de micrômetros, tamanho comparável ao de uma célula eucariótica e as vesículas unilamelares médias ou MUV (*medium-sized unilamellar vesicles*), com dimensões compreendidas entre os SUV e os LUV (LICHTENBERG e BARENHOLZ, 1988). De menor importância, mas também caracterizados, encontram-se os lipossomas multivesiculares ou MVL (*multivesicular liposomes*) e as vesículas oligolamelares ou OLV (*oligolamellar vesicles*) que, à semelhança das unilamelares, podem ser subdivididas em pequenas, grandes e gigantes (SOV, LOV e GOV) (SANTOS e CASTANHO, 2002). Na Figura 11 pode-se observar uma representação esquemática comparativa dos vários tipos de lipossoma.

A larga aceitação da utilização de lipossomas para os mais diversos fins criou a necessidade de desenvolver métodos preparativos eficientes, reprodutíveis e com a simplicidade possível, à escala laboratorial e industrial.

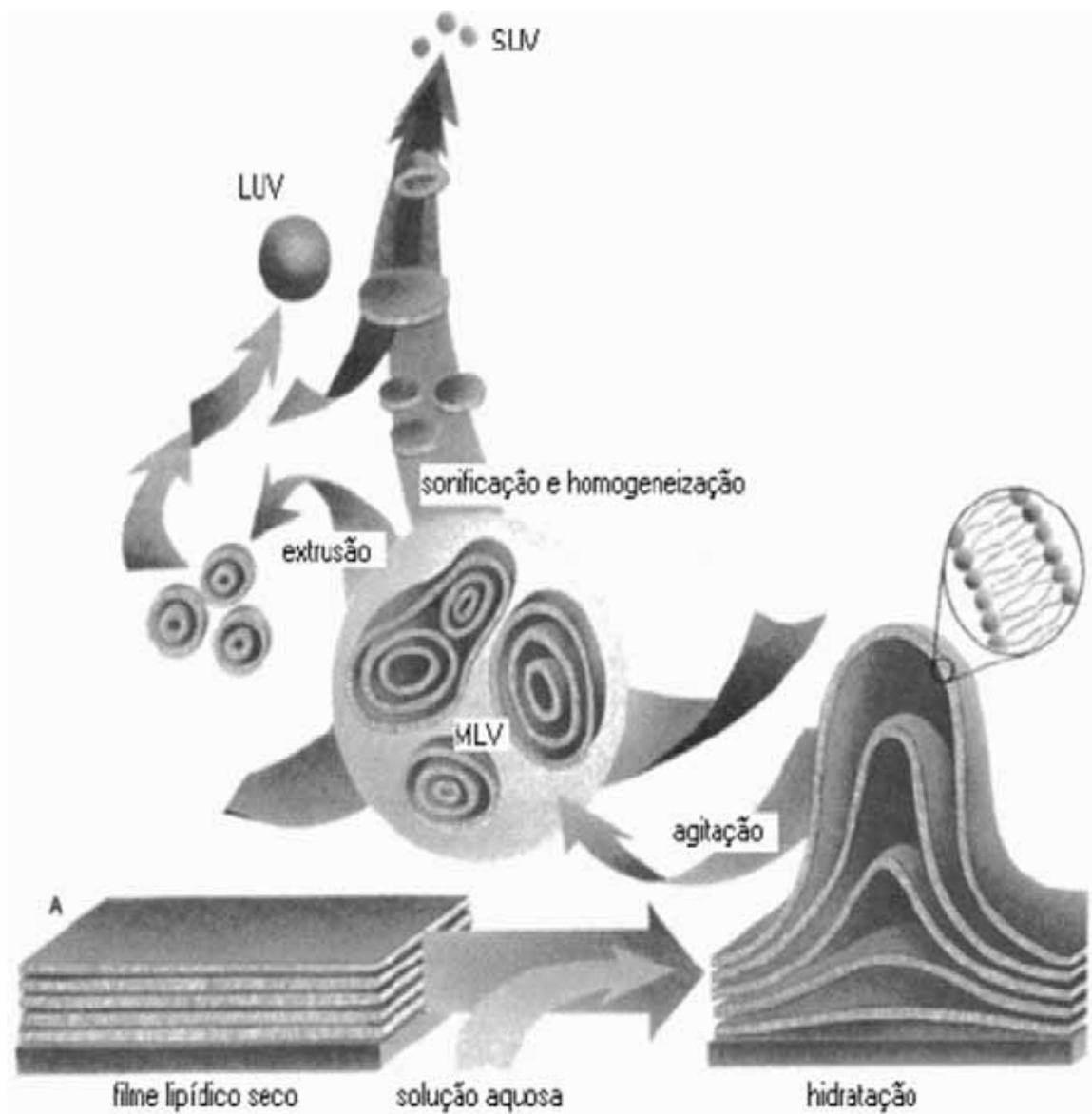


**Figura 11. Representação esquemática dos vários tipos de lipossomas, mostrando a base da sua classificação em termos de tamanho, número de lamelas e sua posição relativa.** Vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares pequenas (SUV), vesículas unilamelares grandes (LUV), vesículas unilamelares gigantes (GUV), lipossomas multivesiculares (MVL), vesículas oligolamelares pequenas (SOV), vesículas oligolamelares grandes (LOV) e vesículas oligolamelares gigantes (GOV). Cada linha representa uma bicamada lipídica (lamela). Figura baseada em SANTOS e CASTANHO, 2002.

O tipo de lipossoma é, essencialmente, condicionado pelo seu método de preparação. Assim, a composição química, número de camadas, distribuição de tamanhos, número de lamelas e o volume encapsulado influenciam consideravelmente a aplicação dos lipossomas. Um esquema geral de preparação de lipossomas é representado na Figura 12.

De um modo geral, a preparação de vesículas lipídicas é realizada através da dissolução da fase lipídica em um solvente orgânico, evaporando-se, em seguida, este solvente para formação de um fino filme lipídico. Posteriormente ocorre a hidratação do lipídeo com uma fase aquosa. Nesta

etapa tem-se a formação de vesículas multilamelares grandes. Na maioria dos sistemas, um processamento secundário, como extrusão ou sonicação é necessária para a obtenção de um produto final com tamanho de partículas menores e bem definidas (WOODLE e PAPAHADJOPOULOS,1989).



**Figura 12.** Metodologia de preparação de lipossomas tipo vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares pequenas (SUV) e vesículas unilamelares grandes (LUV). Figura modificada de AVANTI POLAR LIPIDS (<http://avantilipids.com/>).

## **2. Objetivos**

Baseando-se na estrutura primária da toxina ParE de *Escherichia coli*, bem como nos escassos dados em relação a esta toxina, a meta deste trabalho foi a obtenção de peptídeos sintéticos baseados nesta proteína a fim de avaliar as sequências de aminoácidos responsáveis pela interação com as diferentes topoisomerasas bacterianas. Além disso, foi também objetivo deste trabalho isolar a melhor sequência polipeptídica com potencial atividade inibitória sobre essas enzimas, a exemplo dos dados recentes obtidos por nosso laboratório com peptídeos sintéticos provenientes da toxina CcdB (TROVATTI et al., 2008).

De maneira mais específica, foram objetivos do trabalho:

1. Realizar análises de bioinformática para levantamento de dados estruturais sobre a toxina ParE;
2. Projetar e sintetizar peptídeos derivados da toxina bacteriana ParE;
3. Avaliar as diferentes sequências quanto à capacidade de interação e inibição da atividade da DNA girase e topoisomerase IV bacterianas;
4. Realizar estudos de atividade de inibição de crescimento microbiano por estes peptídeos e de mecanismos de transporte através da parede celular;
5. Estudar a interação dos peptídeos com as topoisomerasas;
6. Propor uma nova família de agentes antimicrobianos.

### **3. Materiais e Métodos**

### 3.1. Reagentes e solventes

Os reagentes utilizados durante a síntese, purificação e caracterização dos peptídicos estão relacionados abaixo:

- Resina (suporte polimérico) Rink amida AM, com grau de substituição inicial de 0,68 mmol/g da marca Novabiochem®.
- Resina (suporte polimérico) Fmoc-Ser (tBu) Wang, com grau de substituição inicial de 0,55 mmol/g da marca Novabiochem®.
- Aminoácidos protegidos: todos os L- $\alpha$ -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 da Sigma® 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 anidrido acético, diclorometano (DCM), diisopropiletilamina (DIEA) e dimetilformamida (DMF) foram obtidos a partir das empresas Merck®, Aldrich®, Mallinchrødt®, J.T.Baker® e Fluka®.

O isotiocianato de fluoresceína (FITC) para derivatização dos peptídeos foi adquirido do fabricante Sigma®.

A coluna Hitrap desalting para purificação dos peptídeos derivatizados foi adquirido junto a GE Healthcare.

Fosfatidilcolina de soja e a esterilamina foram adquiridas da Sigma®.

### 3.2. Material biológico

As enzimas recombinantes DNA girase, topoisomerase IV, topoisomerase II humana, GyrA e GyrB, produzidas heterologamente em bactérias, foram adquiridas comercialmente da *Inspiralis Ltda* (<http://www.inspiralis.com>).

A cepa bacteriana *Escherichia coli* K-100 utilizada no ensaio de susceptibilidade antimicrobiana foi adquirida junto ao Instituto Adolfo Lutz.

### 3.3. Equipamentos

- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em modo semi-preparativo: cromatógrafo Beckman System Gold, equipado com coluna de fase reversa C18, Delta Pak, Waters, 15 µm, 300 Å, de dimensão 300 x 19 mm. O equipamento é composto por duas bombas modelo 116 e detector UV/Visível, conectado a um registrador 112 da Amersham Biosciences.
- Sistema de Cromatografia líquida em modo analítico: Cromatógrafo Shimadzu LC-10A/C-47A equipado com três bombas LC 10AT, injetor automático SIL 10AF e detectores de UV SPD 10A e fluorescência RF 10A.
- Sistema de cromatografia líquida de média pressão (CLME): Composto por uma bomba Laballiance Series I, coletor de frações Foxy Jr. e um detector UV Konik, conectado a um registrador 112 da Amersham Biosciences.
- Espectrofotômetro UV-Visível Shimadzu UV 1601PC.
- Sistema de eletroforese GNA 100, equipado com fonte Pharmacia Biotech modelo EPS 301.
- O fotodocumentador Alpha Imager EP System da Alpha Innotech.
- Espectrofotômetro de microplacas Epoch™ da Biotek.
- Extrusores e filtros para preparo dos lipossomas foram adquiridos junto a Avanti Polar Lipids.
- Fluorímetro QuantaMaster™ da Photon Technology International (PTI).

### **3.4. Predição de estruturas secundárias e obtenção de seqüências e coordenadas atômicas de estruturas de proteínas**

A predição de estruturas secundárias foi realizada com o programa PSIPRED (<http://128.16.10.201/psipred/>). As estruturas primárias de proteínas foram obtidas a partir do *National Center for Biotechnology Information* - NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os arquivos com coordenadas atômicas das estruturas de proteínas foram obtidos a partir do servidor *Protein Data Bank* - PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

### **3.5. Modelagem molecular por homologia**

A seqüência da proteína ParE de *E. coli* foi obtida usando a seqüência do plasmídeo RK2 (JIANG et al., 2002) como consulta no programa PSI-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A seqüência obtida (GI 194437967) foi usada na busca de proteínas homólogas com estrutura tridimensional resolvida, usando o servidor Phyre (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre>). A partir desta busca, a seqüência com maior identidade foi escolhida e utilizada como modelo na modelagem por homologia. Um modelo 3-D foi construído adotando uma abordagem de modelagem comparativa por satisfação de restrições espaciais, utilizando o programa MODELLER9v7 (SALI e BLUNDELL, 1993, <http://salilab.org/modeller>). Minimização de energia por CHARMM (BROOKS et al., 1983) foi aplicado ao modelo resultante, utilizando o programa Swiss PdbViewer (<http://spdbv.vital-it.ch>). A estereoquímica e qualidade do modelo final foram avaliadas com os programas PROCHECK (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/~roman/ProCheck/procheck.html>) e Verify-3D ([http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify\\_3D](http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify_3D)). Buscas por semelhança estrutural foram realizadas no servidor DALI ([http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali\\_server](http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali_server)). Os modelos estruturais foram visualizados no programa PyMOL (<http://pymol.sourceforge.net>).

### **3.6. Síntese de peptídeos**

Os peptídeos foram sintetizados manualmente pelo método da fase sólida de acordo com o protocolo padrão que emprega o grupamento base-lábil 9-Fluorenil-metiloxicarbonila (Fmoc) como protetor dos  $\alpha$ -amino grupos, e derivados t-butílicos (t-Bu) para a proteção das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos trifuncionais. Os agentes de condensação usados foram o Diisopropilcarbodiimida (DIC) e 1-hidroxibenzotriazol (HOBt). Na etapa de acoplamento de cada aminoácido, foi empregado um excesso molar de 3 vezes em relação à quantidade de resina de partida, tanto para o Fmoc-aminoácido quanto para os agentes de condensação. A desproteção dos grupos  $\alpha$ -amínicos (remoção do grupo base lábil Fmoc), após a entrada de cada aminoácido, foi realizada empregando-se uma solução de piperidina 20% (v/v) em DMF. A eficiência das etapas de entrada de cada aminoácido foi monitorada pelo teste de ninidrina (KAISER et al., 1970) e, quando positivo, o processo foi repetido com 50% da quantidade inicial dos reagentes. A clivagem final dos peptídeos das respectivas resinas e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais, foi efetuada pelo tratamento das respectivas peptidil-resinas com uma solução de clivagem contendo TFA (94,0%), água deionizada (2,5%), EDT (2,5%) e TIS (1,0%), à temperatura ambiente por 2 horas. Os peptídeos, denominados brutos, foram precipitados e lavados com éter dietílico gelado e, em seguida, retidos em funil de placa porosa para serem eluídos em água e, posteriormente, liofilizados. Após este procedimento, uma fração da massa do extrato bruto de cada peptídeo liofilizado foi dissolvida em solvente A (água + TFA 0,04%), até a solubilização completa do material bruto. A solução resultante deste processo foi então submetida à análise qualitativa em CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), utilizando coluna de fase reversa e gradiente de acetonitrila (30 a 70%).

### **3.7. Purificação e identificação dos peptídeos**

Os peptídeos foram purificados por cromatografia líquida de baixa pressão em coluna de fase reversa, sob gradiente de acetonitrila (30 a 70%). As frações provenientes da cromatografia foram analisadas por CLAE. O

conteúdo dos tubos contendo o peptídeo foi unido e liofilizado. Posteriormente, uma amostra foi submetida novamente a uma análise por CLAE para confirmar sua pureza. A identidade química dos peptídeos foi confirmada por espectrometria de massas em um aparelho electro-spray quadrupolo (ESI-Q), em modo positivo, alocado no Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química de Araraquara.

### **3.8. Ensaios de inibição da atividade da DNA girase**

Os ensaios de inibição de superenovelamento do DNA (inibição da atividade da girase) foram realizados incubando-se 1 unidade (U) de girase, 0,5 µg de plasmídeo pBR322 relaxado e quantidades variadas de peptídeos (5 a 100 µM), em um volume de reação de aproximadamente 30 µL. A reação foi incubada a 37°C por 2h em tampão de ensaio 1X (descrito abaixo). A reação foi interrompida pela adição de 15µL de STEB (20% sacarose; 0,05 mol.L<sup>-1</sup> Tris, pH 7,5; 0,05 mol.L<sup>-1</sup> EDTA; 50 µg/ml azul de bromofenol) e 60µL da mistura clorofórmio : álcool isoamílico (24:1). Posteriormente as amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes das mesmas foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE (89 mmol.L<sup>-1</sup> Tris ; 89 mmol.L<sup>-1</sup> de ácido bórico; 2 mmol.L<sup>-1</sup> EDTA, pH 8,2). Após a corrida, o gel foi corado durante 30 min, com uma solução de brometo de etídio (1 mg / mL). O gel foi analisado em um fotodocumentador Alpha Imager EP System da Alpha Innotech

Tampão de diluição enzima: 50 mmol.L<sup>-1</sup> Tris.HCl (pH 7.5), 100 mmol.L<sup>-1</sup> KCl, 2 mmol.L<sup>-1</sup> DTT, 1 mmol.L<sup>-1</sup> EDTA, 50% glicerol (m/v).

Tampão de ensaio (concentrado 5X): 35 mmol.L<sup>-1</sup> Tris.HCl (pH 7.5), 24 mmol.L<sup>-1</sup> KCl, 4 mmol.L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 2 mmol.L<sup>-1</sup> DTT, 1,8 mmol.L<sup>-1</sup> espermidina, 1 mmol.L<sup>-1</sup> ATP, 6,5 % (m/v) glicerol, 0,1 mg/ml albumina.

### **3.9. Ensaios de inibição da atividade da Topoisomerase IV**

Os ensaios de inibição do relaxamento do DNA superenovelado (inibição da atividade da topoisomerase IV) foram realizados incubando-se 1 unidade (U) de topoisomerase IV com 0,5 µg de plasmídeo pBR322 superenovelado e quantidades variadas de peptídeos (5 a 100 µM), em um volume de reação de aproximadamente 30 µL. A reação foi incubada a 37°C por 2h em tampão de ensaio 1X (descrito abaixo). Em seguida as amostras foram tratadas e submetidas à análise de eletroforese em gel de agarose, como descrito no item anterior.

Tampão de diluição enzima: 40 mmol.L<sup>-1</sup> HEPES.KOH (pH 7,6), 100 mmol.L<sup>-1</sup> KCl, 1 mmol.L<sup>-1</sup> DTT, 1 mmol.L<sup>-1</sup> EDTA, 40% glicerol (v/v).

Tampão de ensaio (concentrado 5X): 40 mmol.L<sup>-1</sup> HEPES.KOH (pH 7,6), 100 mmol.L<sup>-1</sup> KCl, 10 mmol.L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol.L<sup>-1</sup> DTT, 1 mmol.L<sup>-1</sup> ATP, 50 µg/ml albumina.

### **3.10. Ensaios de inibição da atividade da Topoisomerase II humana**

Os ensaios de inibição do relaxamento do DNA superenovelado (inibição da atividade da topoisomerase II humana) foram realizados incubando-se 1 unidade (U) de topoisomerase II humana com 0,5 µg de plasmídeo pBR322 superenovelado e 100 µmol.L<sup>-1</sup> de peptídeo ParE12, em um volume de reação de aproximadamente 30 µL. A reação foi incubada a 37°C por 2h em tampão de ensaio 1X (descrito abaixo). Em seguida as amostras foram tratadas e submetidas à análise de eletroforese em gel de agarose, como descrito no item anterior de ensaio para DNA girase.

Tampão de diluição enzima: 50 mmol.L<sup>-1</sup> Tris.HCl (pH 7.5), 100 mmol.L<sup>-1</sup> NaCl, 1 mmol.L<sup>-1</sup> DTT, 0.5 mmol.L<sup>-1</sup> EDTA, 50 % glicerol (v/v), 50 µg/ml albumina.

Tampão de ensaio (concentrado 5X): 50 mmol.L<sup>-1</sup> Tris.HCl (pH7.5), 125 mmol.L<sup>-1</sup> NaCl, 10 mmol.L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 5 mmol.L<sup>-1</sup> DTT, 100 µg/ml albumina.

### **3.11. Marcação dos peptídeos ParE3 e ParE10 com FITC**

A derivatização dos peptídeos ParE3 e ParE10 foi feita incubando-se 0,2 mmol.L<sup>-1</sup> de peptídeo com 1 mmol.L<sup>-1</sup> de isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma) em tampão fosfato de sódio, pH 7,8, a 4 °C, *overnight*. Após a reação, o FITC livre foi removido utilizando-se uma coluna *Hitrap desalting* (GE Healthcare) equilibrada com o mesmo tampão usado durante a marcação. A marcação dos peptídeos foi confirmada por espectrofotometria de absorção e de fluorescência.

### **3.12. Espectroscopia de fluorescência**

#### **3.12.1 Fluorescência intrínseca**

A interação dos peptídeos ParE3 e ParE10 com a GyrA e GyrB foi inicialmente analisada por espectroscopia de fluorescência intrínseca, explorando-se a alteração na emissão de fluorescência dos resíduos de triptofano presentes nas subunidades da girase. Deste modo, quantidades crescentes (em nmol.L<sup>-1</sup>) de peptídeo, em tampão Tris.HCl 10 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,4), foram misturados a 200 nmol.L<sup>-1</sup> de GyrA ou GyrB, em tampão Tris.HCl 10 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,4) e um espectro de fluorescência foi obtido a 25°C, em um fluorímetro QuantaMaster™ da Photon Technology International (PTI) alocado no Parc Científic de Barcelona, Espanha. O comprimento de onda de excitação foi de 280 nm e a aquisição do espectro de emissão na faixa de 310 a 450 nm.

#### **3.12.2 Fluorescência extrínseca**

Um segundo modo utilizado para se investigar a ligação dos peptídeos com as subunidades GyrA e GyrB foi utilizando anisotropia de fluorescência (fluorescência com luz polarizada). Para isso, os peptídeos ParE3 e ParE10 foram derivatizados com FITC, como descrito no item 3.11. Nos ensaios de anisotropia de fluorescência, 250 nmol.L<sup>-1</sup> de peptídeo marcado foi misturado a quantidades crescentes de GyrA ou GyrB (em nmol.L<sup>-1</sup>). A anisotropia de fluorescência foi medida em fluorímetro QuantaMaster™ da Photon Technology

International (PTI), equipado com polarizadores, alocado no Parc Científic de Barcelona, Espanha. O comprimento de onda de excitação foi de 490 nm e de emissão a 515 nm.

### **3.13. Preparo de lipossomas e eficiência de encapsulação**

O procedimento utilizado para o preparo dos lipossomas foi baseado em métodos já descritos por BREUKINK e colaboradores (2000). Deste modo, 40 mg de fosfatidilcolina de soja e 0,5 mg de esterilamina foram solubilizadas em 1 mL de clorofórmio em um tubo de ensaio de tamanho adequado. Em seguida o solvente foi evaporado lentamente, sob fluxo de nitrogênio, para possibilitar a formação de um fino filme lipídico nas paredes do tubo. Posteriormente, o solvente residual foi eliminado sob vácuo por aproximadamente 18 horas. Em seguida, foi adicionado ao tubo, 1 mL de solução tampão Tris-HCl, 10 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0, contendo 100 µmol.L<sup>-1</sup> do peptídeo com atividade biológica comprovada pelos ensaios de inibição enzimática. Em seguida, foram feitas agitações vigorosas utilizando agitador do tipo Vortex, obtendo-se desta forma uma suspensão de vesículas multilamelares grandes (MLV). Para a sua conversão em vesículas unilamelares grandes (LUV), as MLV foram submetidas à extrusão (30 ciclos), utilizando extrusor equipado com filtro de policarbonato com poros de diâmetro 200 nm.

Os lipossomas foram submetidos à cromatografia de exclusão molecular, em coluna Sephadex G50, para separação de possíveis peptídeos não encapsulados e as frações que abrangem o pico dos lipossomas foram unidas. Metade do volume foi destinada ao uso em ensaios microbiológicos e o restante liofilizado.

Aproximadamente 2 mg do material liofilizado foi dissolvido em 1 mL de metanol e as soluções finais foram analisadas em espectrofotômetro, aplicando varredura de comprimento de onda de 150 a 400 nm. O resultado foi comparado com a mesma leitura aplicada a uma amostra de mesma concentração de lipossoma vazio, preparado com o mesmo procedimento, porém com ausência de peptídeos na solução tampão.

### 3.14. Teste de sensibilidade microbiana

Para a realização de ensaios de inibição de crescimento bacteriano da linhagem de *Escherichia coli* K-100, foi realizado inicialmente um inóculo a partir de um estoque celular em um tubo contendo 5 mL de meio LB (Tabela 3) estéril. Esta pré-cultura foi incubada *overnight* a 37°C, sob agitação a 200 rpm. Após o período, a densidade óptica (D.O.) da cultura foi medida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 595 nm. A D.O. foi, então, corrigida através de diluição com meio de cultura LB estéril até atingir o padrão McFarland (que contém aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC/mL). Esta cultura com a D.O. corrigida foi utilizada no teste antimicrobiano.

Para os testes com peptídeos não encapsulados, 100 µL de cultura bacteriana foi misturada com certo volume de uma solução concentrada (2 mg/mL) de cada um dos peptídeos, em microplacas estéreis, de modo que a concentração final dos peptídeos ficasse a  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . O volume final foi, então, acertado para 200 µL. A microplaca foi incubada durante 18 horas em estufa a 37 °C. O crescimento bacteriano foi medido através de um leitor de microplacas Epoch, a 595 nm.

Para peptídeos encapsulados, 40 µL da solução dos mesmos, foi misturada, em microplacas estéreis, a 100 µL de cultura bacteriana e o volume final foi acertado para 200 µL com meio de cultura estéril. A microplaca foi incubada durante 18 horas em estufa a 37 °C. O crescimento bacteriano foi medido através de um leitor de microplacas Epoch, a 595 nm.

A porcentagem de inibição do crescimento bacteriano de cada uma das diferentes amostras foi determinada através de análise comparativa com amostras controles presentes na mesma placa.

**Tabela 3.** Composição do meio de cultura LB.

Triptona	1%
Extrato de levedura	0,5%
NaCl	1%

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

#### 4.1. Modelagem molecular da toxina ParE de *E. coli*

Para o desenho racional de peptídeos derivados de uma proteína são necessários dados estruturais para que se possa focar em determinadas regiões que compreendem resíduos que se sabe ou infere-se que sejam responsáveis pelas interações durante a atividade da mesma. Em relação à toxina ParE, nenhum dado estrutural estava disponível até o início deste trabalho. Desta forma, foi necessário obter alguma fonte de informações estruturais. Uma das abordagens para obtenção de tais informações foi fazer a modelagem da toxina. Este método permite a obtenção de modelos da estrutura tridimensional de proteínas a partir de sua estrutura primária.

Modelagem por homologia (ou modelagem comparativa) é geralmente o método de escolha quando há uma clara relação de homologia entre a sequência de uma proteína-alvo e, pelo menos, uma estrutura conhecida. Esta técnica computacional é baseada na suposição de que as estruturas terciárias de duas proteínas serão semelhantes se suas sequências estão relacionadas. Há duas abordagens principais para a modelagem por homologia: 1) modelagem comparativa baseada em fragmento e 2) modelagem comparativa baseada em restrições espaciais. Na modelagem baseada em restrições espaciais, é gerado um conjunto de restrições que são aplicadas à proteína a ser modelada. O cálculo destas restrições é baseado em análises estatísticas entre estruturas de proteínas homólogas. Estas restrições limitam, por exemplo, a distância entre dois resíduos no modelo, sendo esta restrição baseada na distância entre dois resíduos equivalentes na estrutura molde.

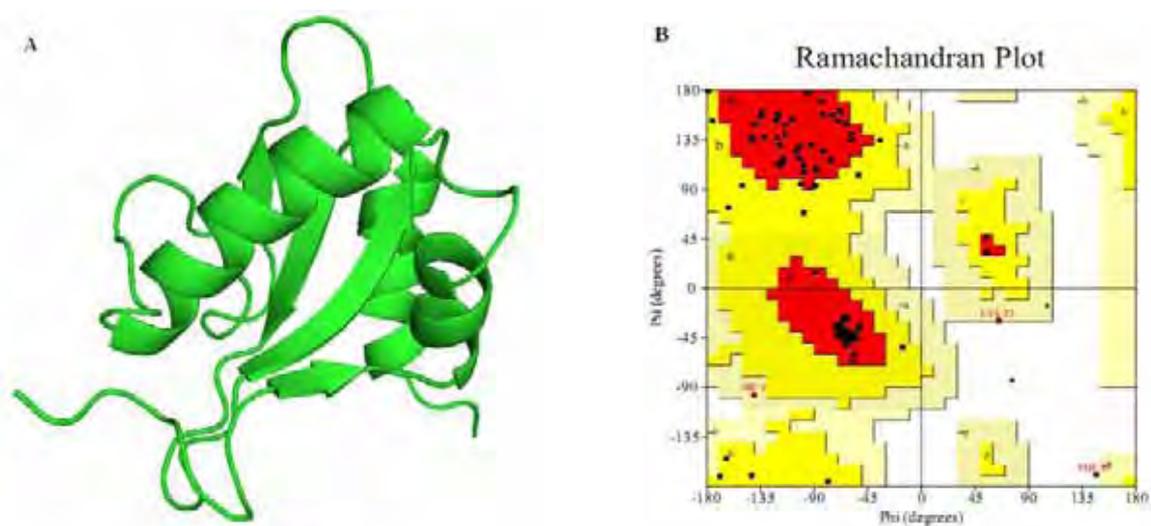
Na modelagem da toxina ParE foi escolhida a abordagem por restrição espacial. Para isso foi utilizado o programa MODELLER, o qual é um dos softwares mais utilizado atualmente para a modelagem estrutural de proteínas por homologia. Este programa utiliza estruturas-molde para construir modelos tridimensionais da sequência alvo. O ponto de partida do MODELLER é um alinhamento entre a sequência alvo e a(s) sequência(s) molde(s) com estrutura tridimensional conhecida. Para isso, a sequência da toxina ParE de *E. coli* (gi 194437967) foi obtida a partir do GenBank e usada na busca de proteínas homólogas com estrutura tridimensional resolvida, usando o servidor Phyre. A partir dessa busca, proteínas das famílias RelE e YoeB foram selecionadas.

Por ter maior identidade, a sequência da proteína RelE de *E. coli* (pdb id 3KHA) foi escolhida e utilizada como modelo. O alinhamento, utilizando o programa ClustalW, entre as toxinas ParE de *E. coli* (alvo) e RelE de *E. coli* (molde), bem como o arquivo PDB com as coordenadas atômicas do molde RelE, foram submetidos ao MODELLER, o qual gerou o arquivo com as coordenadas atômicas do modelo resultante.

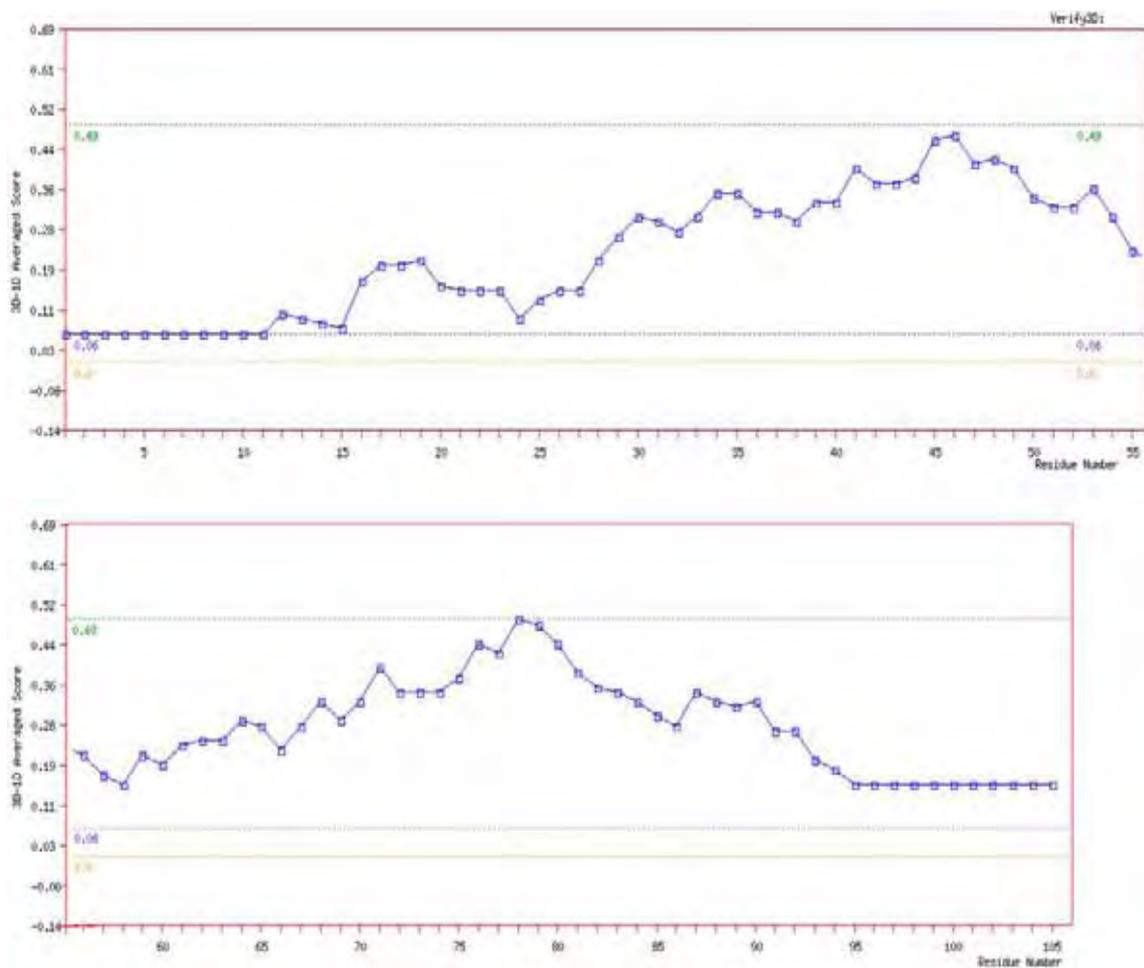
Após a construção do modelo, é necessário identificar possíveis erros relacionados à escolha das estruturas de referência e ao alinhamento entre sequência alvo e molde. Caso o modelo seja caracterizado de má qualidade, todo processo de modelagem deve ser revisto. Desta forma, foram utilizados os programas VERIFY3D e PROCHECK para validar o modelo gerado. O primeiro programa avalia os ambientes químicos de cada resíduo atribuindo scores com referência a uma matriz construída a partir de uma análise estatística envolvendo estruturas de proteínas armazenadas no PDB. O segundo programa avalia diversos parâmetros estereoquímicos de importância fundamental, como comprimentos de ligações, os ângulos planos, a planaridade dos anéis de cadeias laterais e os ângulos torcionais da cadeia principal, gerando o gráfico de Ramachandran que define os resíduos que se encontram nas regiões energeticamente mais favoráveis e desfavoráveis. Os modelos iniciais não tiveram boa qualidade. Assim, o alinhamento foi manualmente modificado em alguns pontos para proporcionar melhor adequação das regiões de estrutura secundária do modelo em relação ao molde. O alinhamento modificado foi usado para construir um novo modelo. Ao modelo final foi aplicado o algoritmo CHARMM de minimização de energia, com o uso do programa Swiss-PdbViewer. O modelo final é mostrado na Figura 13A. O gráfico de Ramachandran gerado da análise com o software PROCHECK mostrou 96,8% dos resíduos nas regiões mais favoráveis e favoráveis (Figura 13B). A análise usando o programa VERIFY3D mostrou 100% dos scores com valores positivos (Figura 14). Assim, os testes de validação realizados com os programas VERIFY3D e PROCHECK indicam que o modelo final gerado possui boa qualidade.

O arquivo contendo as coordenadas atômicas do modelo foi submetido ao servidor DALI, o qual permite buscas por semelhança estrutural comparando a estrutura estudada com estruturas de proteínas conhecidas e

depositadas no servidor do Protein Data Bank (PDB). Nesta análise, RelE de *E. coli* ( $Z$  score = 17,9), toxina mutante (R81A/R83A) RelE de *E. coli* ( $Z$  score = 15,3), toxina RelE de *Mycobacterium tuberculosis* ( $Z$  score = 9,8), toxina YoeB de *E. coli* ( $Z$  score = 9,6) e a toxina RelE de *Pyrococcus horikoshii* ( $Z$  score = 9,2) foram identificados como os de melhor score. Conforme relatado para outros membros da superfamília RelE, o modelo proposto também mostrou semelhanças estruturais, porém com valores de  $Z$  score pequenos, com ribonucleases microbianas como colicina-E5 de *E. coli* ( $Z$  score = 3,7), RNase SA3 de *Streptomyces aureofaciens* ( $Z$  score = 3.6) e RNase SA de *Streptomyces aureofaciens* ( $Z$  score = 3.4).



**Figura 13. (A) Modelo da estrutura tridimensional da toxina ParE de *E. coli*.** Um modelo 3-D foi construído a partir da estrutura primária da toxina ParE de *E. coli* (105 aminoácidos) adotando uma abordagem de modelagem comparativa por satisfação de restrições espaciais utilizando o programa MODELLER e coordenadas atômicas da toxina RelE de *E. coli* como molde. **(B) Validação do modelo com PROCHECK.** O modelo foi analisado com o software de validação PROCHECK. As estatísticas do gráfico de Ramachandran geradas desta análise são: 77 (81,9%) de resíduos na região mais favorável (em vermelho); 14 (14,9%) de resíduos na região favorável (em amarelo); 2 (2,1%) de resíduos na região pouco favorável (em bege); 1 (1,1%) de resíduos na região desfavorável (em branco). Figura extraída de BARBOSA *et al.* 2010.



**Figura 14. Validação do modelo com VERIFY3D.** O modelo foi analisado com o software de validação VERIFY3D. Todos os scores resultantes são positivos e dentro da faixa de 0,06 a 0,49.

#### 4.2. Predição de estrutura secundária da toxina ParE de *E. coli* com PSIPRED

Uma segunda opção para gerar informações estruturais da toxina ParE de *E. coli* foi realizar a predição de estruturas secundárias a partir da estrutura primária da mesma. Para isso foi utilizado o servidor PSIPRED. O resultado da análise mostrou o mesmo conteúdo de estruturas secundárias que o modelo tridimensional gerado por modelagem molecular por homologia. Além disso, os

aminoácidos que constituem cada estrutura secundária são, em boa parte, os mesmos relacionados no modelo gerado por modelagem. Portanto essa análise corrobora com a estruturação secundária  $\beta$ - $\alpha$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$  e também com os aminoácidos provavelmente envolvidos nesta estruturação. A Figura 15 faz uma comparação entre a estrutura secundária predita com PSIPRED e a estrutura predita após a modelagem molecular.



**Figura 15. Comparação entre a estrutura secundária predita com PSIPRED e após a modelagem molecular para a toxina ParE de *E. coli*.** Na figura, e (em azul) representa folha  $\beta$  e h (em vermelho)  $\alpha$ -hélice.

### 4.3. Análise da estrutura da toxina ParE de *E. coli* e desenho racional de peptídeos

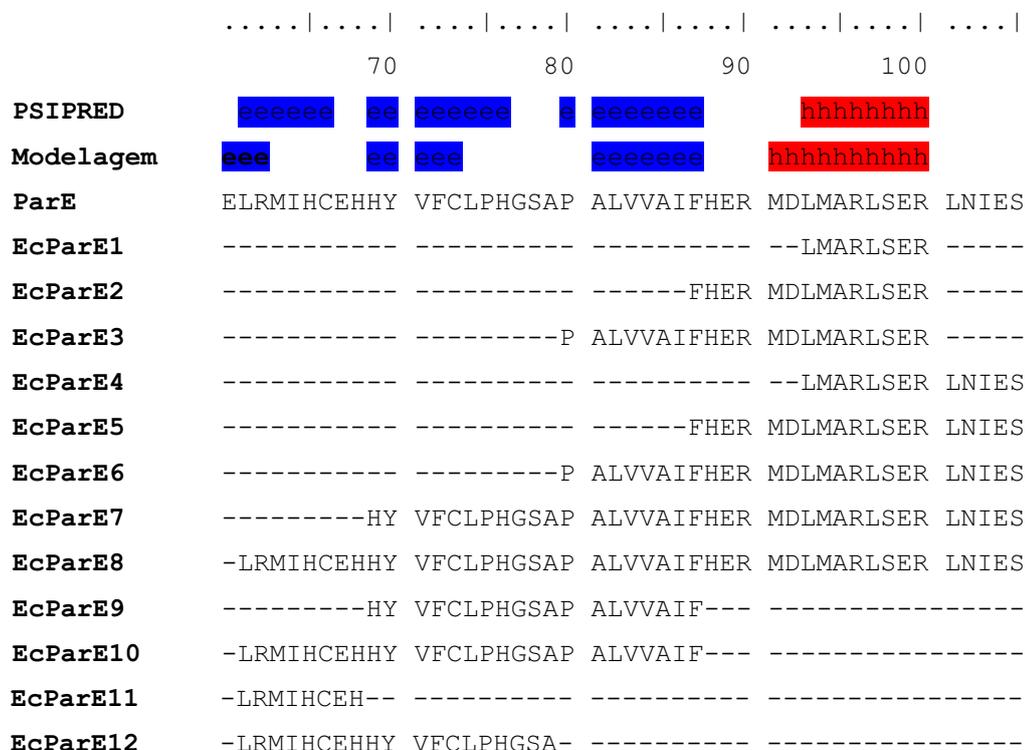
Com as abordagens de bioinformática para levantamento de dados estruturais a partir da estrutura primária de ParE, o estudo detalhado dos escassos trabalhos sobre essa toxina e ampla revisão bibliográfica sobre as demais toxinas da mesma superfamília que ParE está incluso, principalmente as famílias RelE e Yoeb que são as mais estudadas na superfamília, o desenho racional de peptídeos a partir da estrutura primária de ParE tornou-se

uma tarefa com maiores chances de acerto. De todas estas informações pode-se concluir que a toxina ParE de *E. coli* apresenta estrutura tridimensional muito semelhante a estrutura geral da superfamília RelE, caracterizada por um cerne de 4 ou 5 folhas  $\beta$  paralelas uma a outra, exceto a primeira e a última que são anti-paralelas entre si. As folhas  $\beta$  são flanqueadas, em um lado, por duas  $\alpha$ -hélices N-terminal e, por outro lado, pela  $\alpha$  hélice C-terminal a qual junto com a alça que conecta as folhas  $\beta 1$  e  $\beta 2$  (ou  $\alpha 2$  e  $\beta 2$ ) forma uma fenda profunda que correspondente ao sítio ativo para atividade RNase característica da grande maioria das toxinas estudadas até o momento nesta superfamília.

Apesar de o modelo gerado por modelagem comparativa possuir uma região com estrutura semelhante à fenda catalítica C-terminal característica da superfamília, nenhum trabalho, até o momento, mostrou alguma atividade nucleásica de toxinas da família ParE e apenas um trabalho, com abordagem *in vitro*, mostrou que o alvo intracelular desta toxina é a DNA girase (JIANG et al., 2002). Desta forma, apesar de uma origem comum e considerável similaridade, ParE pode ter divergido evolutivamente, culminando em uma atividade citotóxica particular. Situação semelhante ocorre com a toxina CcdB. Dentro de sua superfamília, CcdB é a única toxina cuja atividade citotóxica é a inibição da DNA girase, sendo que todas as outras famílias de toxinas já estudadas atuam na inibição da tradução clivando RNA mensageiro no ribossomo.

Considerando a toxina ParE como um inibidor da replicação, algumas evidências indicam que a região C-terminal desta toxina é também a região de maior probabilidade de ser a envolvida na interação com a DNA girase. As toxinas estudadas até o momento, tanto as com atividade de clivagem de RNA como a CcdB com inibição sobre a DNA girase, possuem a região C-terminal como a responsável pela atividade citotóxica. A recente elucidação da primeira e única estrutura cristalográfica de ParE (DALTON e CROSSON, 2010), de *Caulobacter crescentus*, mostra que a antitoxina ParD bloqueia a região C-terminal da toxina ParE. Além disso, um trabalho, também recente, produziu diferentes proteínas ParE recombinantes truncadas na região C-terminal e estas tiveram sua atividade citotóxica muito reduzida ou extinta (FIEBIG et al., 2010).

Assim sendo, a região C-terminal de ParE de *E. coli* foi usada como molde para o desenho de peptídeos a partir desta toxina. Os peptídeos foram desenhados de modo a incluir ou excluir estruturas secundárias previstas para a região, bem como a região terminal “LNIES” que foi observada ser muito variável após análise de alinhamento múltiplo com sequências ParE de diferentes espécies bacterianas. Os primeiros peptídeos desenhados para teste de atividade são mostrados na Figura 16.



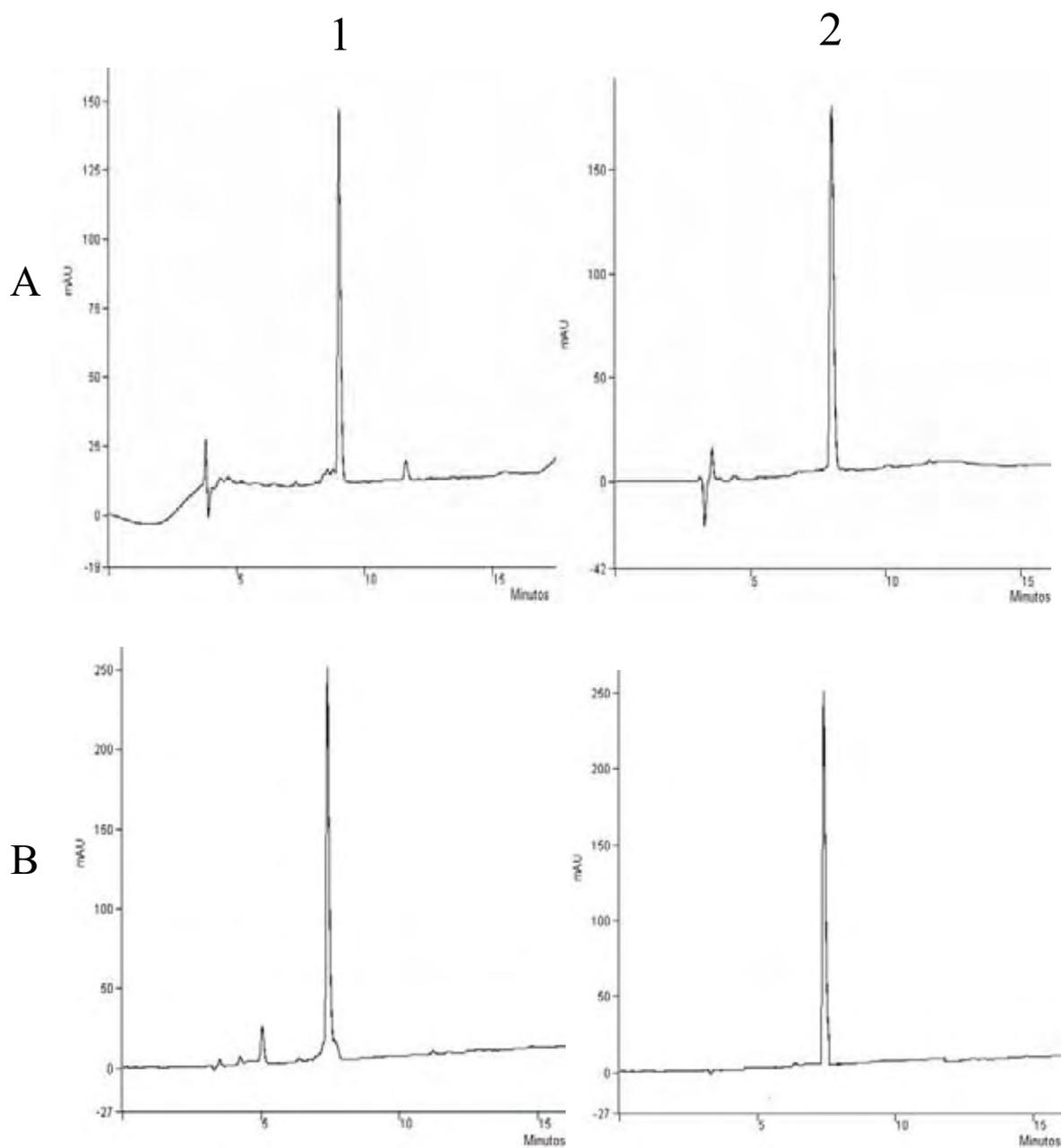
**Figura 16. Peptídeos racionalmente desenhados com base na região C-terminal da toxina ParE de *E. coli*.** Na figura, e (em azul) representa folha  $\beta$  e h (em vermelho)  $\alpha$ -hélice.

#### **4.4. Síntese, purificação e identificação de peptídeos derivados da toxina ParE**

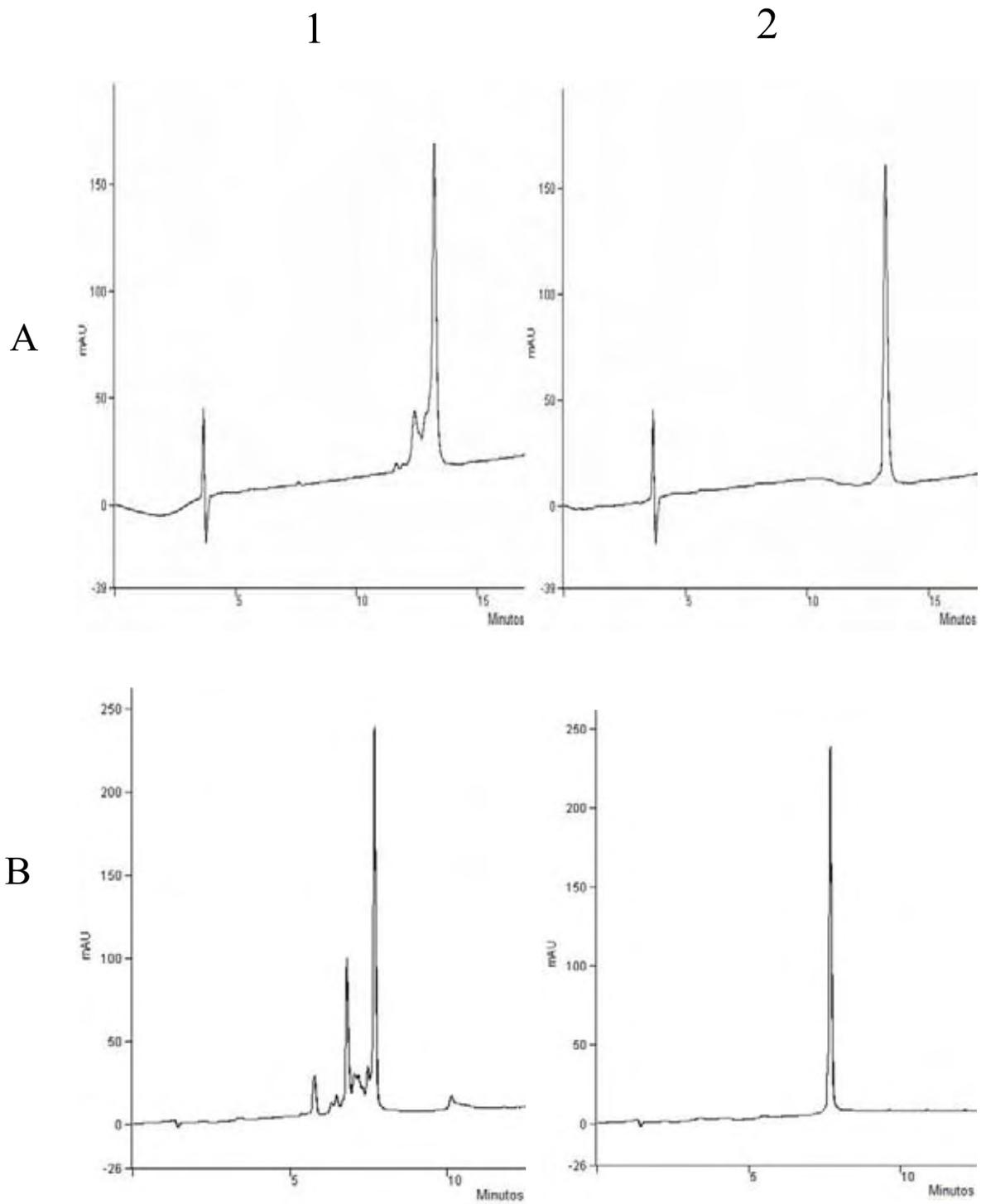
Uma vez desenhada a estrutura primária dos peptídeos, os mesmos foram sintetizados manualmente pela metodologia da fase sólida (AMBLARD et al., 2005) de acordo com o protocolo padrão que emprega o grupamento base-lável Fmoc como protetor dos  $\alpha$ -amino grupos, e derivados t-butílicos (t-Bu) para a proteção das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos trifuncionais.

O procedimento de síntese seguiu as etapas descritas em Materiais e Métodos. As sequências dos peptídeos sintetizados, bem como a respectiva estrutura secundária que os mesmos abrangem, são mostradas na Figura 16. Para os peptídeos EcParE1, EcParE2, EcParE3, EcParE9 e EcParE10, EcParE11 e EcParE12 foi utilizado a resina Rink amida, a qual resulta em peptídeos com um grupamento amida na extremidade C-terminal após a clivagem final. Isso foi necessário para mimetizar a ligação peptídica nesta região, pois nestes peptídeos o resíduo da extremidade C-terminal corresponde a um resíduo interno da sequência da toxina. Para os peptídeos EcParE4, EcParE5, EcParE6, EcParE7 e EcParE8 como o resíduo terminal corresponde ao resíduo C-terminal da toxina, foi utilizado a resina Fmoc-Ser (tBu) Wang. Em todos os peptídeos a região N-terminal foi acetilada com anidrido acético após o término da síntese. Isso foi necessário também para mimetizar a ligação peptídica na região, já que em todos os peptídeos o resíduo da extremidade N-terminal corresponde a um resíduo interno na sequência da toxina. Para uma pequena fração dos peptídeos EcParE3 e EcParE10, não foi feita acetilação. Isso foi necessário para permitir a derivatização da região N-terminal com o fluoróforo FITC para a análise por anisotropia de fluorescência. Uma vez sintetizados, clivados da resina e liofilizados, os peptídeos foram submetidos à purificação por cromatografia líquida de baixa pressão em coluna de fase reversa, sob gradiente de acetonitrila. As frações provenientes da cromatografia foram analisadas por CLAE em modo analítico. Os conteúdos dos tubos que abrangiam o peptídeo foram unidos e liofilizados. Posteriormente, uma amostra foi submetida novamente à análise em CLAE para confirmar sua pureza. As Figuras 17 a 22 mostram os perfis cromatográficos por CLAE dos peptídeos antes (peptídeos brutos) e após a

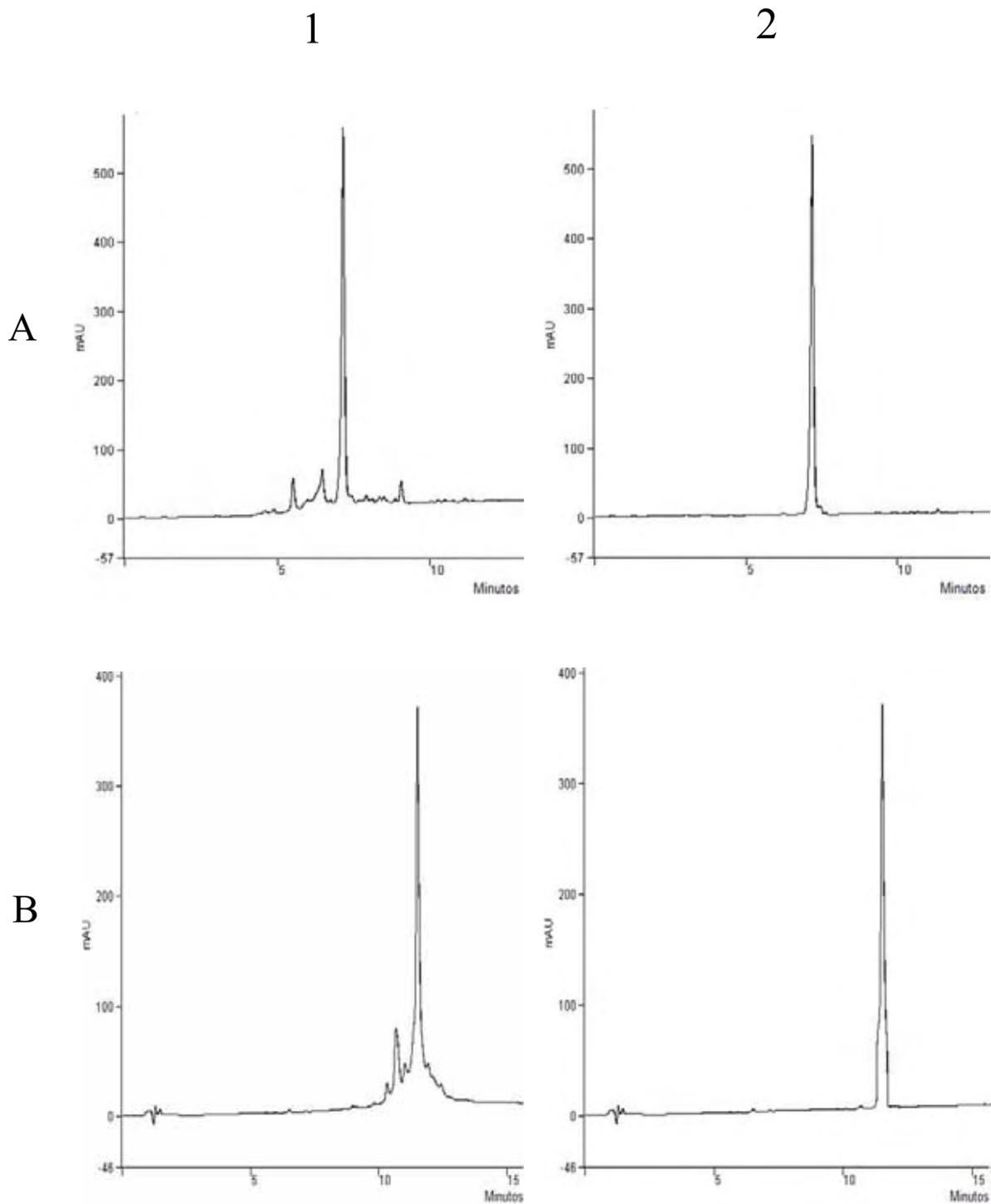
purificação (peptídeos puros). A identidade química destes peptídeos foi confirmada por espectrometria de massas em electro-spray quadrupolo (ESI-Q), em modo positivo.



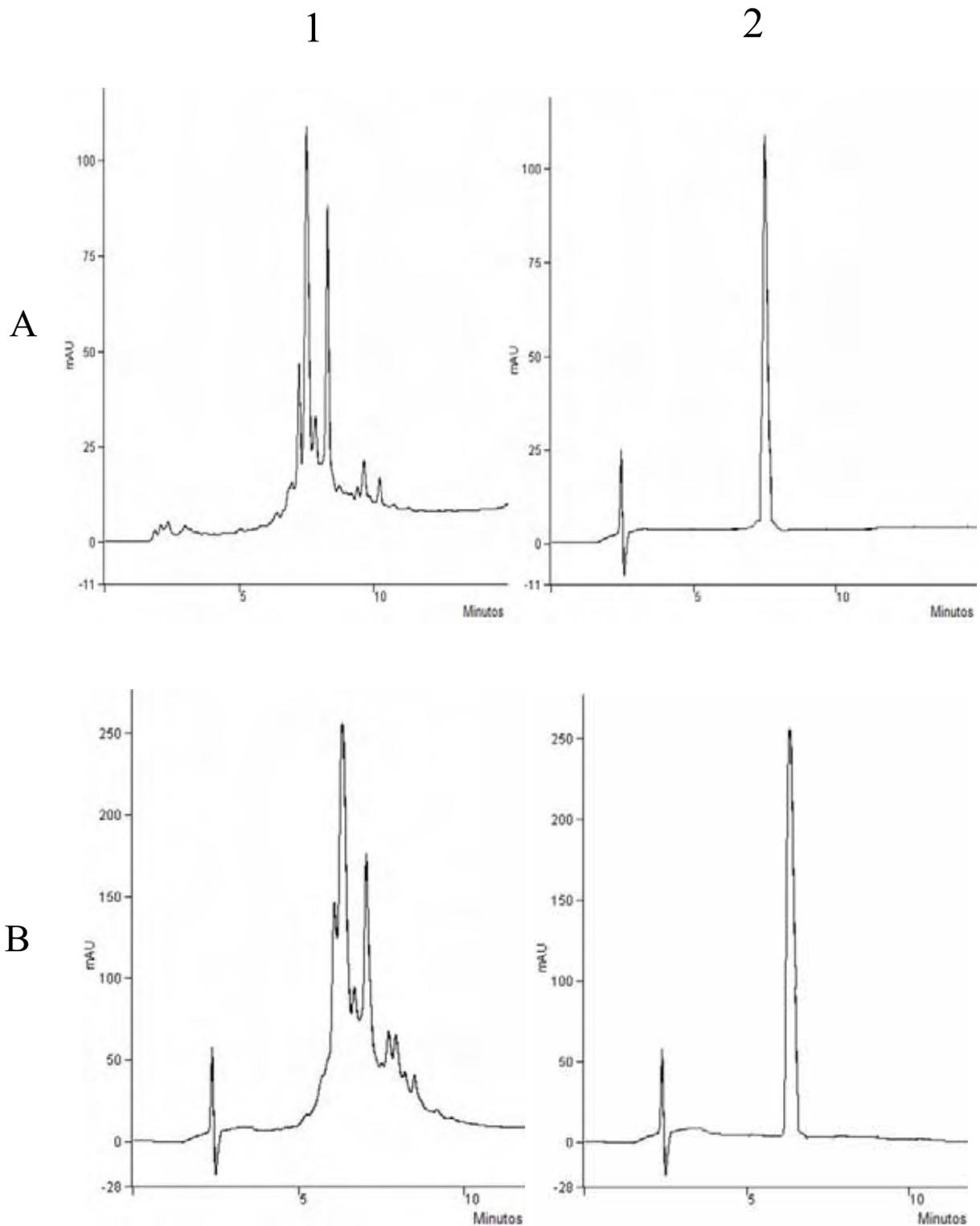
**Figura 17.** Análise por CLAE dos peptídeos EcParE1 (A) e EcParE2 (B) antes (1) e após a purificação (2).



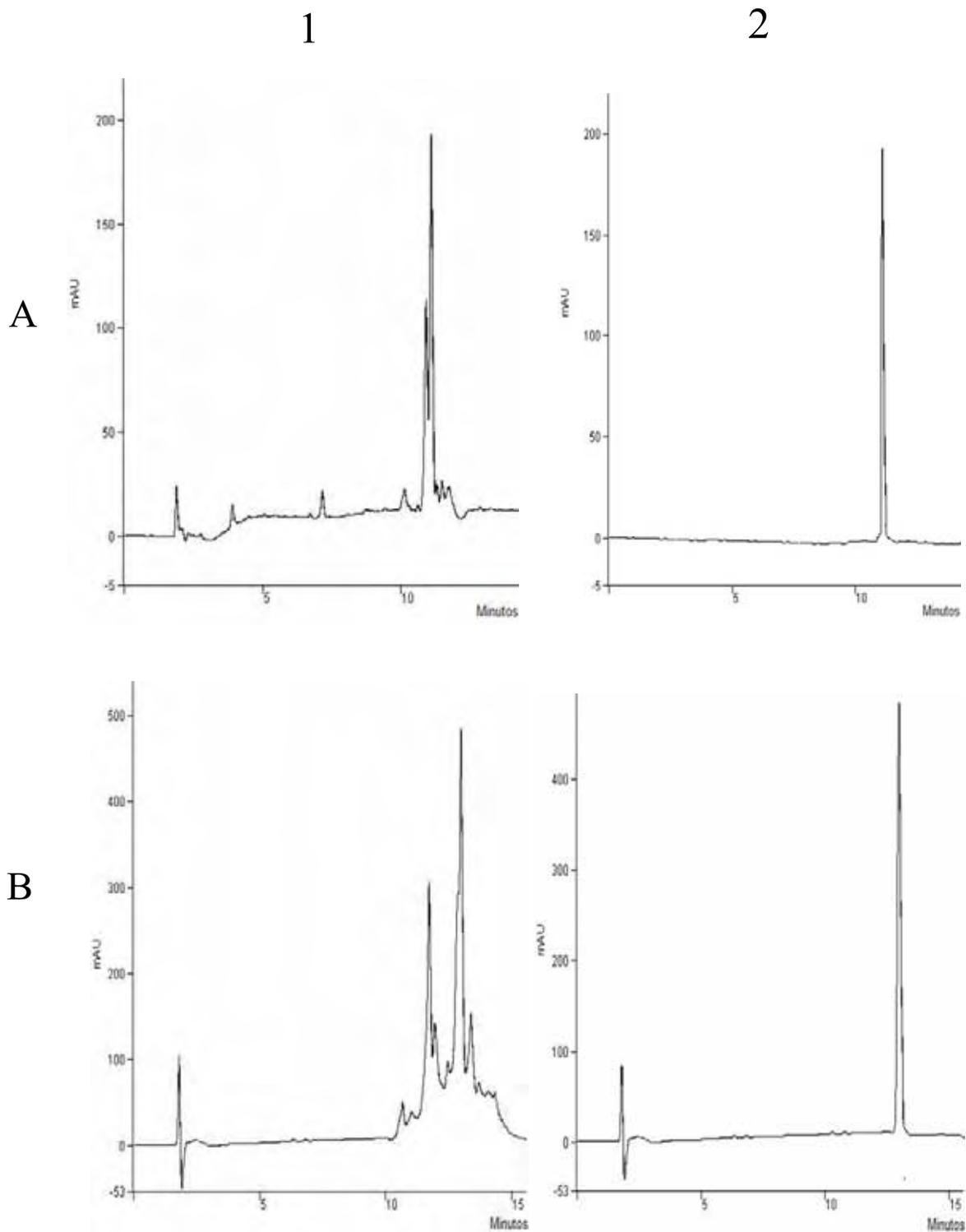
**Figura 18.** Análise por CLAE dos peptídeos EcParE3 (A) e EcParE4 (B) antes (1) e após a purificação (2).



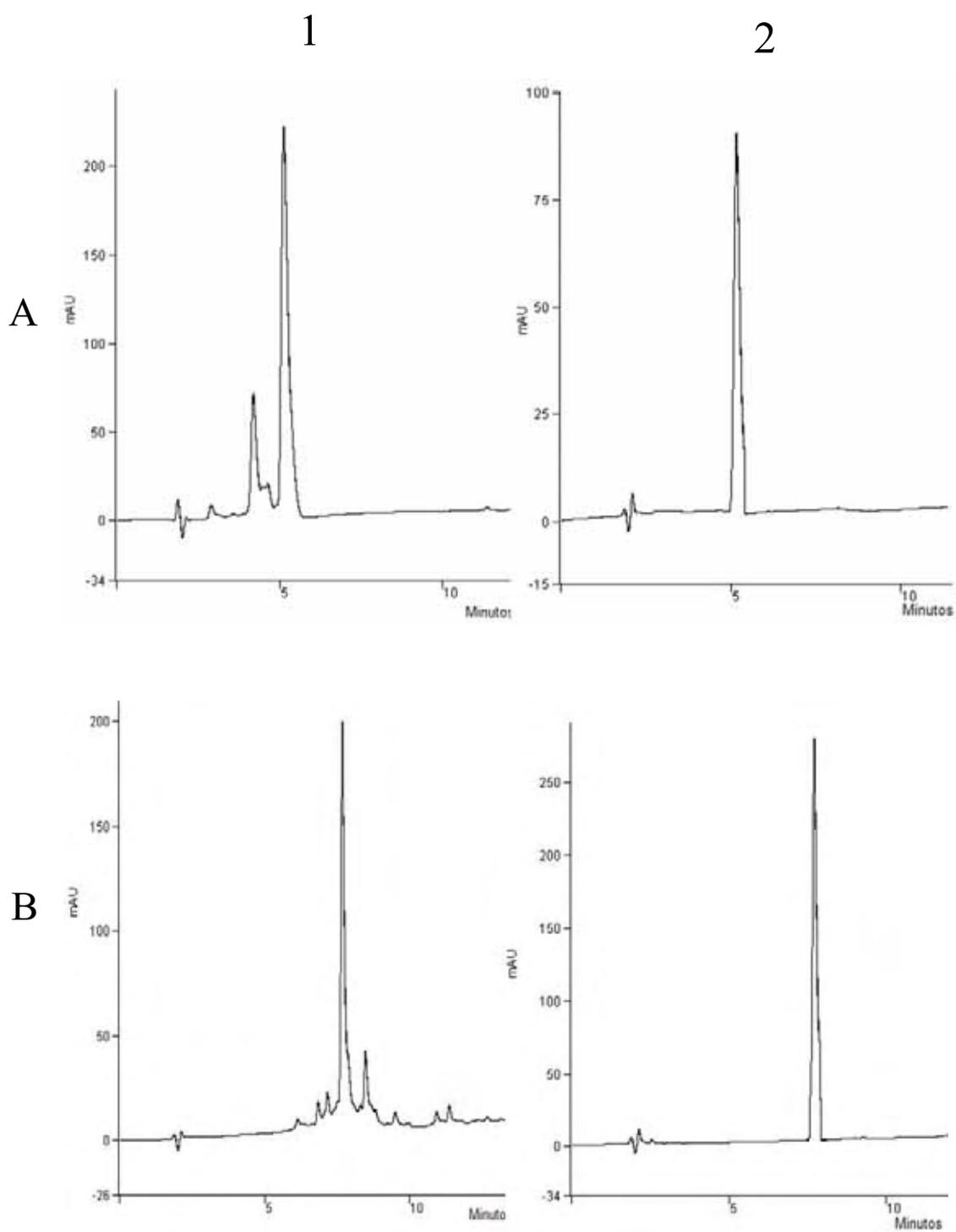
**Figura 19.** Análise por CLAE dos peptídeos EcParE5 (A) e EcParE6 (B) antes (1) e após a purificação (2).



**Figura 20.** Análise por CLAE dos peptídeos EcParE7 (A) e EcParE8 (B) antes (1) e após a purificação (2).



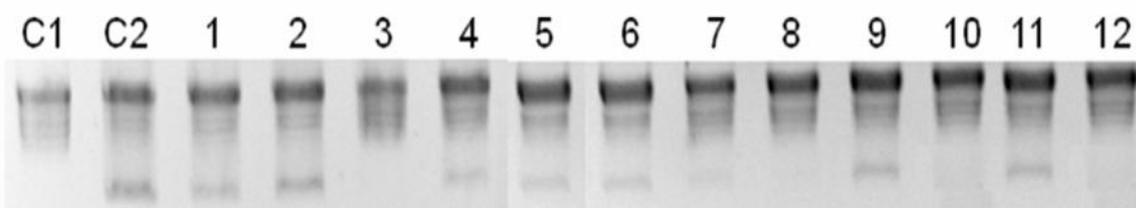
**Figura 21.** Análise por CLAE dos peptídeos EcParE9 (A) e EcParE10 (B) antes (1) e após a purificação (2).



**Figura 22.** Análise por CLAE dos peptídeos EcParE11 (A) e EcParE12 (B) antes (1) e após a purificação (2).

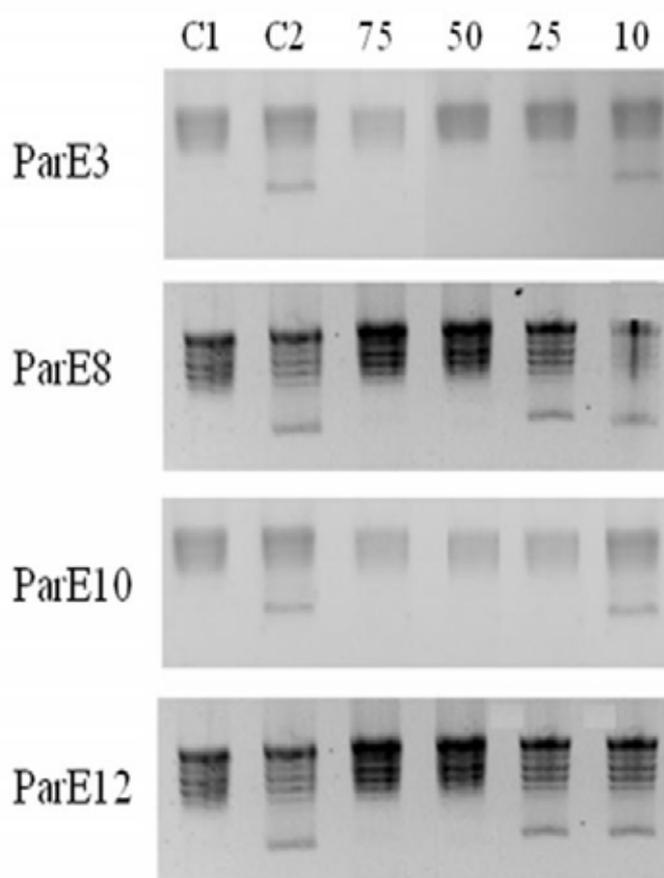
#### 4.5. Ensaio de inibição das atividades das enzimas girase e TOPO IV

Para verificar a ação inibitória dos peptídeos na atividade de topoisomerasas, os mesmos foram testados inicialmente quanto a suas capacidades inibitórias sobre a ação da DNA girase. A DNA girase promove o superenovelamento negativo em um DNA circular fechado gerando uma molécula que migra mais rapidamente, em relação ao DNA relaxado fechado, quando submetida à eletroforese em gel de agarose. Assim, a reação de superenovelamento da DNA girase foi realizada na presença de cada um dos peptídeos e submetida à eletroforese em gel de agarose. A Figura 23 mostra a triagem inicial dos peptídeos inibidores. Os peptídeos EcParE3 (ParE 80-100), EcParE8 (ParE 61-105), EcParE10 (ParE 61-87) e ParE12 (ParE 61-79) foram capazes de inibir completamente a atividade da DNA girase a concentração de  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ .



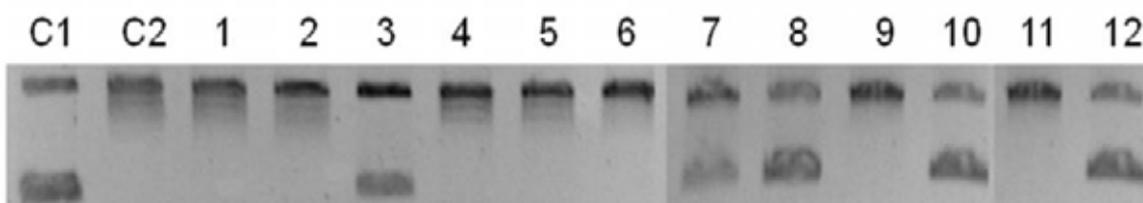
**Figura 23. Triagem inicial dos peptídeos derivados da toxina ParE de *E. coli* sobre a inibição da atividade da DNA girase.** A DNA girase (1U) foi incubada com  $0,5 \mu\text{g}$  de plasmídeo pBR322 relaxado e  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de peptídeo inibidor a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 2h. Posteriormente, a mistura foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1%. **C1:** controle negativo (ausência de peptídeo e DNA girase); **C2:** controle positivo (ausência somente do peptídeo); **1 a 12:** presença dos peptídeos EcParE1 até EcParE12, respectivamente.

Posteriormente, os peptídeos com atividade inibitória foram selecionados para o ensaio de concentração mínima inibitória (MIC). Neste ensaio, a concentração de peptídeo inibidor é variada para se determinar a concentração inibitória mínima. Pela Figura 24 observa-se que os peptídeos EcParE3, EcParE8, EcParE10 e EcParE12 foram capazes de inibir a atividade DNA girase a 25, 50, 25 e 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , respectivamente.



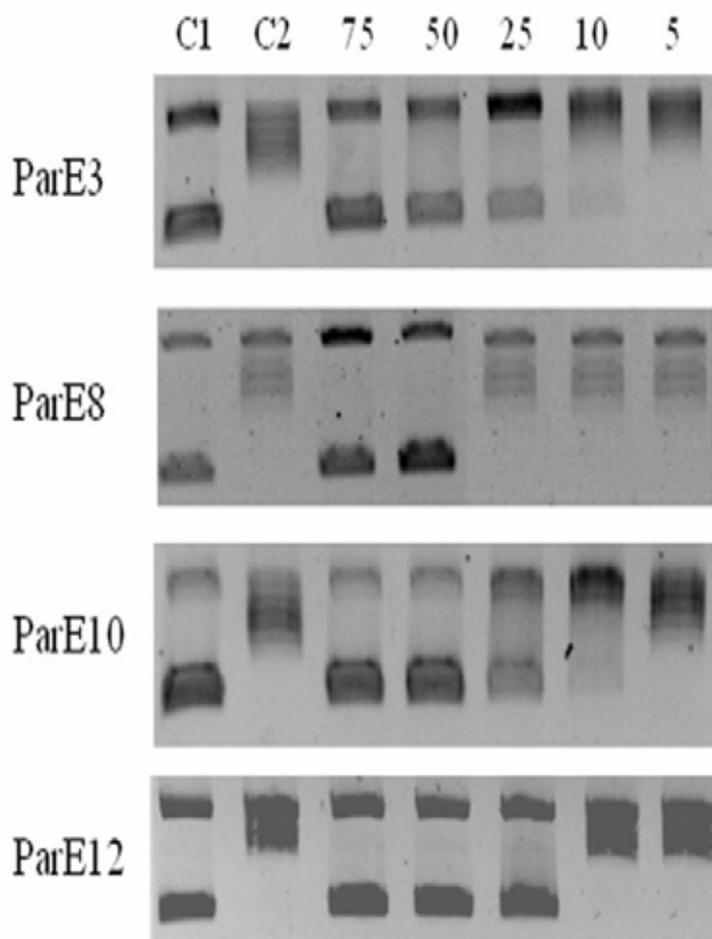
**Figura 24. Determinação da concentração mínima inibitória dos peptídeos EcParE3, EcParE8, EcParE10 e EcParE12 sobre atividade DNA girase.** A DNA girase (1U) foi incubada com 0,5  $\mu\text{g}$  de plasmídeo pBR322 relaxado e concentrações variadas do peptídeo inibidor a 37 °C por 2h. Posteriormente, a mistura foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1%. **C1**: controle negativo (ausência de peptídeo e DNA girase); **C2**: controle positivo (ausência somente do peptídeo); Os números descritos em cada aplicação no gel, representam a concentração de cada um dos peptídeos em  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .

Usando a toxina CcdB, uma proteína muito bem estudada e que também inibe a DNA girase, como modelo para desenhar peptídeos inibidores, nosso grupo mostrou que além de inibir a DNA girase alguns peptídeos derivados desta toxina também inibiram a atividade da Topo IV (Trovatti et al., 2008). Assim, testou-se os peptídeos obtidos também em relação à capacidade de inibição da atividade da Topo IV. A Topo IV é uma topoisomerase bacteriana do tipo II que possui estrutura e mecanismo catalítico semelhante a DNA girase. A referida enzima tem a habilidade de relaxar positiva ou negativamente moléculas de DNA superenovelados, gerando uma molécula que migra mais lentamente, quando comparada com o DNA superenovelado fechado, depois de submetidos à eletroforese em gel de agarose. Assim, foi utilizada uma abordagem semelhante à seleção de peptídeos inibidores para a DNA girase. A reação de relaxamento catalisada pela Topo IV foi realizada na presença de cada um dos peptídeos e submetidos à eletroforese em gel de agarose. A Figura 25 mostra a triagem inicial dos peptídeos inibidores. Como para a DNA girase, os peptídeos EcParE3, EcParE8, EcParE10 e EcParE12 também foram capazes de inibir completamente a atividade da Topo IV a  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Além disso, o peptídeo EcParE7 também mostrou inibição total da atividade da enzima. Posteriormente, esses peptídeos foram selecionados para o ensaio de concentração mínima inibitória.



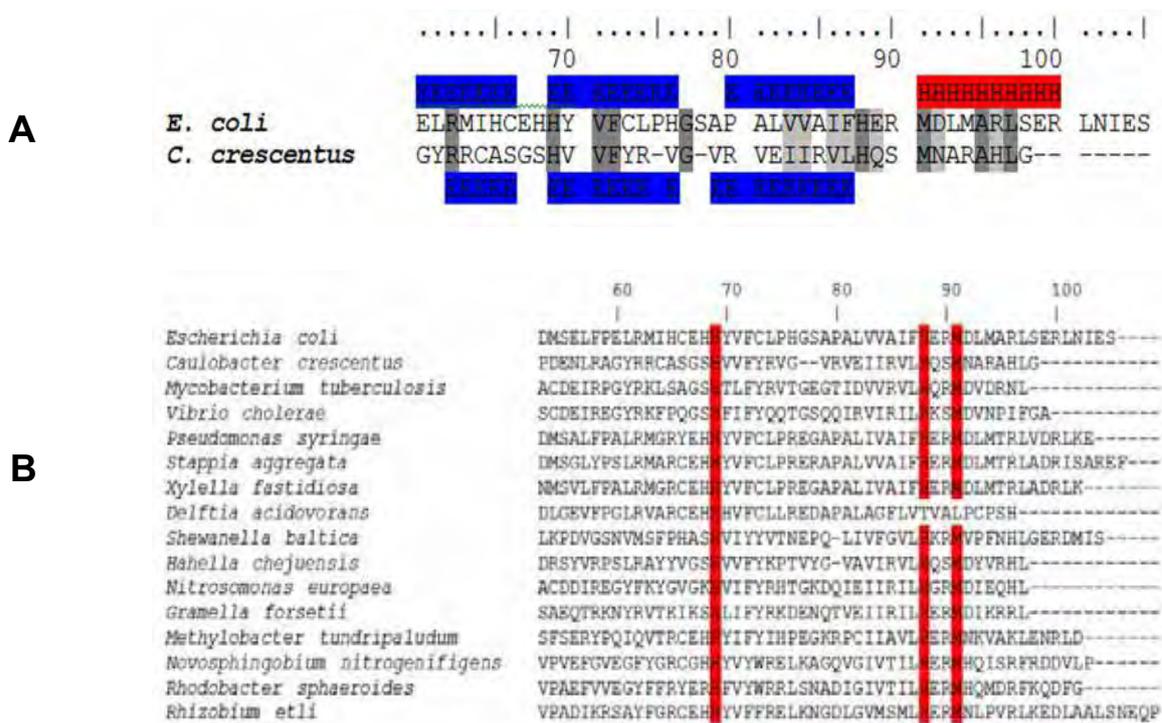
**Figura 25. Triagem inicial dos peptídeos derivados da toxina ParE de *E. coli* sobre a inibição da atividade da topoisomerase IV.** A Topo IV (1U) foi incubada com  $0,5 \mu\text{g}$  de plasmídeo pBR322 superenovelado e  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de peptídeo inibidor a  $37^\circ\text{C}$  por 2h. Posteriormente, a mistura foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1%. **C1:** controle negativo (ausência de peptídeo e topoisomerase IV); **C2:** controle positivo (ausência somente do peptídeo); **1 a 12:** presença dos peptídeos EcParE1 até EcParE12, respectivamente.

O peptídeo ParE7 não mostrou inibição em concentrações inferiores a  $75 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e portanto a sua utilização foi descartada. Como pode ser observado na Figura 26, os peptídeos ParE3, ParE8, ParE10 e EcParE12 foram capazes de inibir a atividade da Topo IV a 25, 50, 25 e  $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , respectivamente.



**Figura 26. Determinação da concentração mínima inibitória dos peptídeos EcParE3, EcParE8, EcParE10 e EcParE12 sobre atividade da topo IV.** A Topo IV (1U) foi incubada com  $0,5 \mu\text{g}$  de plasmídeo pBR322 superenovelado e concentrações variadas do peptídeo inibidor a  $37^\circ\text{C}$  por 2h. Posteriormente, a mistura foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1%. **C1**: controle negativo (ausência de peptídeo e topo IV); **C2**: controle positivo (ausência somente do peptídeo); Os números nos poços representam a concentração do peptídeo em  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .

A atividade inibitória dos peptídeos ParE10 e ParE12, cujas seqüências peptídicas não cobrem relativamente a região correspondente aos últimos 10 aminoácidos (Figura 27A), indicada como a mais importante para toxicidade em *C. crescentus* (FIEBIG *et al.*, 2010), a única toxina ParE parcialmente caracterizada até o momento, sugere que pode haver uma região adicional na toxina bacteriana ParE que também pode participar da interação com DNA girase. A análise de alinhamento múltiplo da região C-terminal de várias toxinas bacterianas ParE (Figura 27B), mostra dois aminoácidos altamente conservados (H88 e M91), na região que cobre o peptídeo ParE3, e um aminoácido (H69) altamente conservado, na região que cobre os peptídeos ParE10 e ParE12. Estes aminoácidos podem, talvez, exercer funções importantes na interação dos peptídeos e da toxina selvagem ParE com a DNA girase.



**Figura 27. Análise da estrutura primária da região C-terminal de ParE.**

**A.** Comparação estrutural das seqüências C-terminal de *E. coli* e *C. crescentus*. **B.** Análise de alinhamento múltiplo da região C-terminal de várias toxinas bacterianas ParE. Em vermelho estão salientados os aminoácidos altamente conservados entre as espécies.

#### 4.6. Avaliação da interação dos peptídeos com a DNA girase.

Como descrito detalhadamente na seção Introdução, a DNA girase é composta por duas subunidades protéicas GyrA e duas subunidades protéicas GyrB (Figura 1). Essas subunidades em conjunto formam um heterotetrâmero  $A_2B_2$  que constitui a forma ativa da enzima (WIGLEY, 1995; MAXWELL, 1993). Os peptídeos derivados de ParE, poderiam, portanto, estar interagindo exclusivamente com uma das subunidades GyrA ou GyrB, ou ainda, concomitantemente com ambas, resultando assim, na inibição de atividade observada.

Na tentativa de investigar a interação dos peptídeos inibidores, e a subunidade envolvida no processo, proteínas GyrA e GyrB foram adquiridas separadamente e a técnica de espectrofotometria de fluorescência aplicada nos estudos.

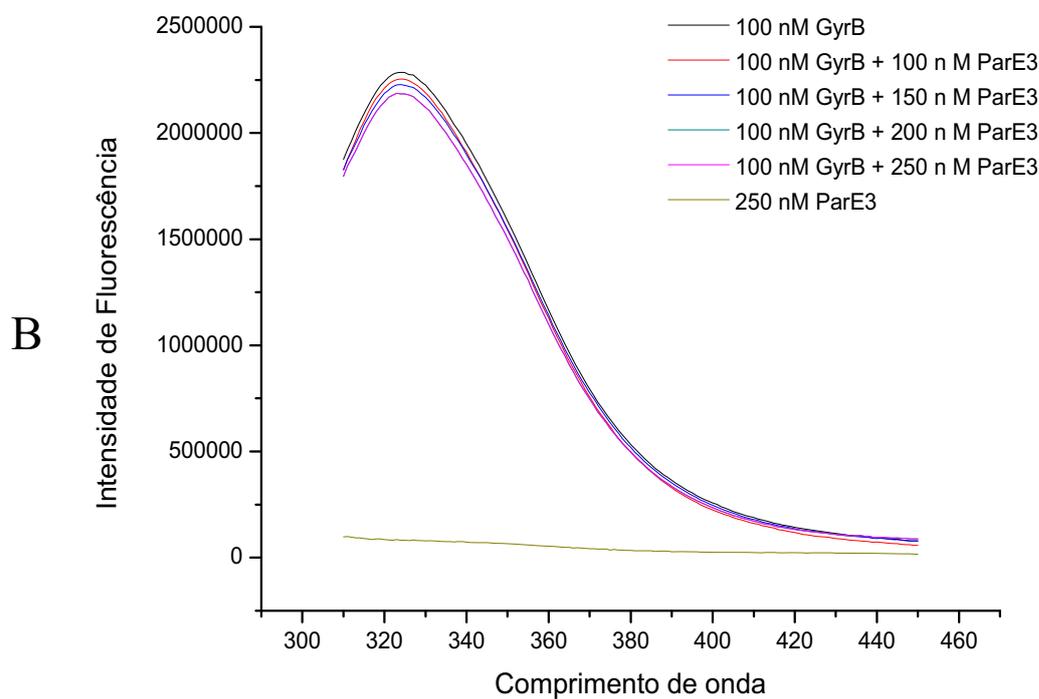
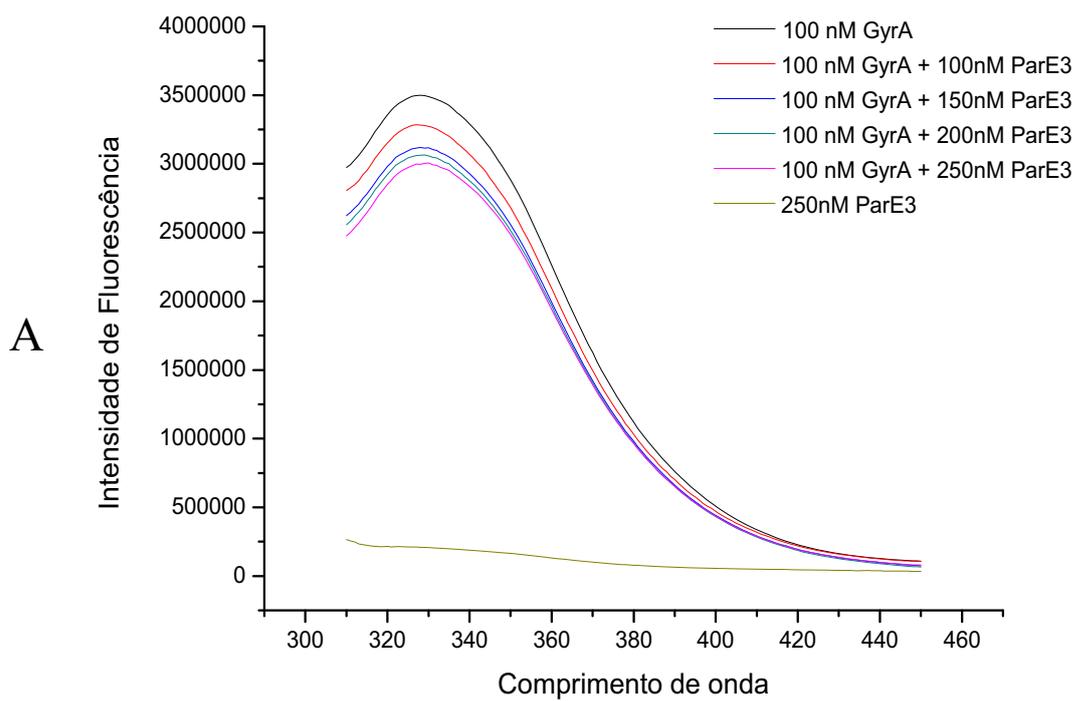
A fluorescência intrínseca das proteínas resulta da emissão fluorescente dos resíduos que contêm anéis aromáticos, que são o triptofano, a tirosina e a fenilalanina. Destes três aminoácidos, o triptofano é o que apresenta maior rendimento quântico, sendo geralmente o resíduo que domina o espectro de emissão de proteínas. A emissão de fluorescência por tirosinas pode ser absorvida (*quenched*) por resíduos de triptofanos vizinhos. Dependendo do caso, a tirosina também pode apresentar uma contribuição espectral significativa, porém isso geralmente acontece quando a proteína contém um grande número de tirosinas e quase nenhum resíduo de triptofano.

Os experimentos de fluorescência intrínseca são capazes de prover informação sobre o ambiente químico dos resíduos aromáticos de uma proteína. O grupo indol do triptofano é bastante sensível às mudanças de polaridade do ambiente químico em que se encontra inserido. Em consequência, o máximo de emissão fluorescente do triptofano depende fortemente da polaridade do meio. Este máximo pode variar de 320 nm, quando o resíduo se encontra em um meio hidrofóbico, até comprimentos de onda de 355 nm, quando o resíduo está em contato com um ambiente mais polar. A intensidade de emissão fluorescente dos resíduos aromáticos também pode fornecer informações importantes sobre a estrutura protéica. Alterações na intensidade de fluorescência de uma proteína, sujeita a alguma perturbação,

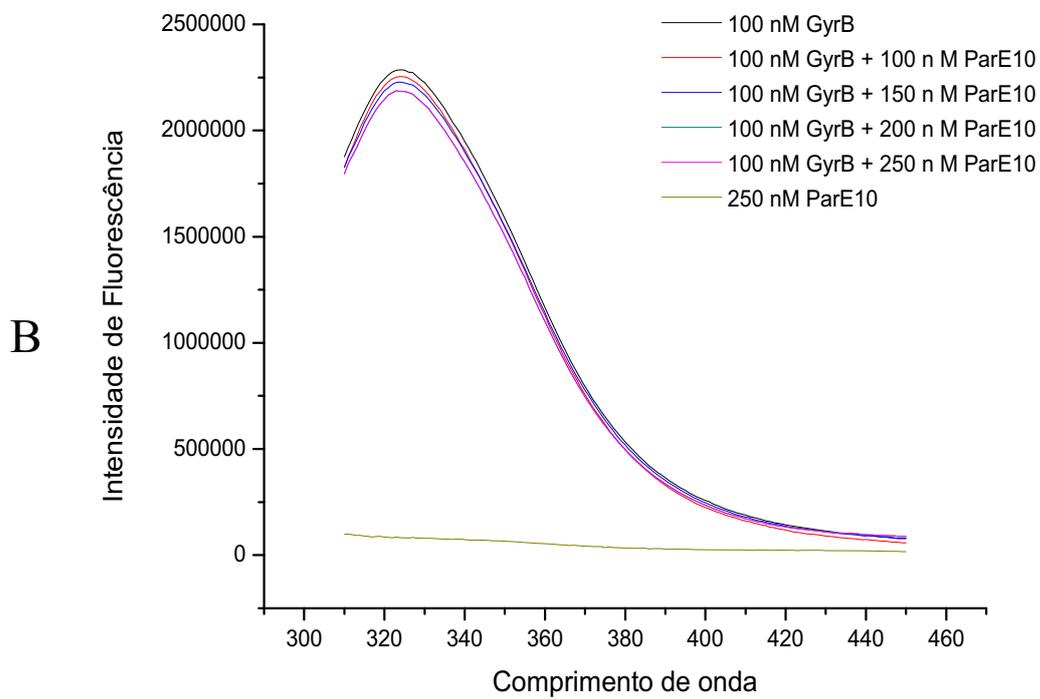
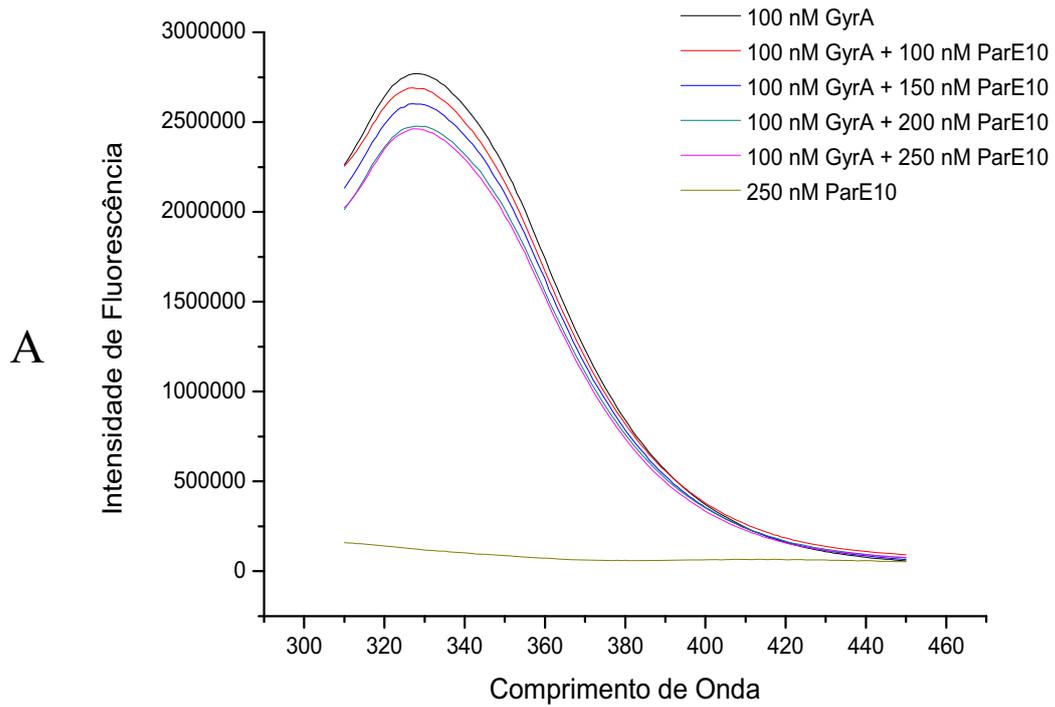
indicam transições conformacionais locais, devido às variações na região que acomoda os resíduos de aminoácidos fluorescentes, como consequência das interações que eles mantêm, sejam com outros resíduos de aminoácidos ou com as moléculas de solvente. Dependendo das suas características, tais mudanças nas interações podem resultar em uma diminuição ou um aumento de intensidade de emissão fluorescente dos resíduos aromáticos.

Baseado no fato que as subunidade GyrA e GyrB possuem 3 e 6 (ou 6 e 12, nos dímeros) triptofanos, respectivamente, foi possível usar a técnica de fluorescência intrínseca para avaliar a interação dos peptídeos com a enzima. Outro fato a favor da técnica é que os peptídeos não possuem resíduos de triptofano e, assim, toda variação de intensidade de fluorescência de resíduos de triptofano em um ensaio peptídeo-subunidade pode ser atribuída a subunidades da enzima. Desta forma,  $100 \text{ nmol.L}^{-1}$  de GyrA ou GyrB foi misturada a quantidades crescentes (em  $\text{nmol.L}^{-1}$ ) dos peptídeos ParE3 ou ParE10 e a emissão de fluorescência do sistema foi avaliada. O comprimento de onda de excitação foi fixado em 280 nm e a aquisição do espectro de emissão na faixa de 310 a 450 nm. Como é possível observar nas Figuras 28 e 29, a intensidade de emissão de fluorescência teve um decaimento gradual quando a subunidade GyrA excitada na presença de quantidades crescentes de um dos peptídeos ParE3 ou ParE10. Nos ensaios com a subunidade GyrB, entretanto, praticamente nenhuma variação de intensidade de fluorescência foi observada. Assim, os peptídeos aparentemente, no caso da enzima ativa, interagem preferencialmente com a subunidade GyrA.

Uma segunda abordagem para avaliar a interação dos peptídeos com a DNA girase foi a exploração do sistema observando a 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. Os fluoróforos possuem vetores de absorção e emissão alinhados em direções específicas relativas a suas estruturas moleculares. Estes dois vetores determinam o eixo preferencial da polarização da luz absorvida e emitida, respectivamente. Desta forma, quando um fluoróforo é excitado com luz plano-polarizada, a emissão resultante também é plano-polarizada, porém não necessariamente na mesma



**Figura 28.** Espectro de emissão de fluorescência de das proteínas GyrA (A) e GyrB (B) na ausência e presença de quantidades variáveis de ParE3



**Figura 29.** Espectro de emissão de fluorescência de das proteínas GyrA (A) e GyrB (B) na ausência e presença de quantidades variáveis de ParE10.

direção da excitação. Se a molécula fluorescente se encontra em solução e, em consequência, em rotação difusiva livre, a luz emitida pode adotar todas as direções de polarização possíveis, já que as moléculas estarão orientadas aleatoriamente e dinamicamente. Consequentemente, apesar de se excitar a amostra com polarização anisotrópica (com luz polarizada numa determinada orientação), um observador medindo a polarização da luz fluorescente total iria obter a média de um enorme número de orientações dinâmicas, ou seja, uma luz com um baixo grau de anisotropia. Porém, variações da anisotropia de fluorescência podem indicar a interação da molécula marcada com um ligante de interesse. Dois fenômenos vão afetar o nível de anisotropia de fluorescência do fluoróforo. O primeiro está relacionado ao 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 da luz emitida 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 pode ser utilizado para monitorar a formação de complexos moleculares entre moléculas marcadas com um fluoróforo e ligantes potenciais, porque, ao formar-se a ligação, o complexo resultante terá um tamanho molecular maior, uma rotação mais lenta e uma emissão mais anisotrópica. 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 consequências para a anisotropia de emissão deste, de forma análoga ao efeito descrito acima. Consequentemente, ambos os fenômenos irão contribuir para o nível de anisotropia de fluorescência da molécula marcada.

Para maximizar a observação da anisotropia de fluorescência, ao analisar a interação de duas proteínas, podem-se marcar com o fluoróforo a proteína de menor tamanho, pois assim, ao formar-se o complexo, a redução de sua velocidade de rotação será maior que no caso inverso. Neste caso, a

molécula escolhida para a marcação foi o peptídeo, já que sua massa molecular é bem menor que qualquer uma das duas subunidades da girase.

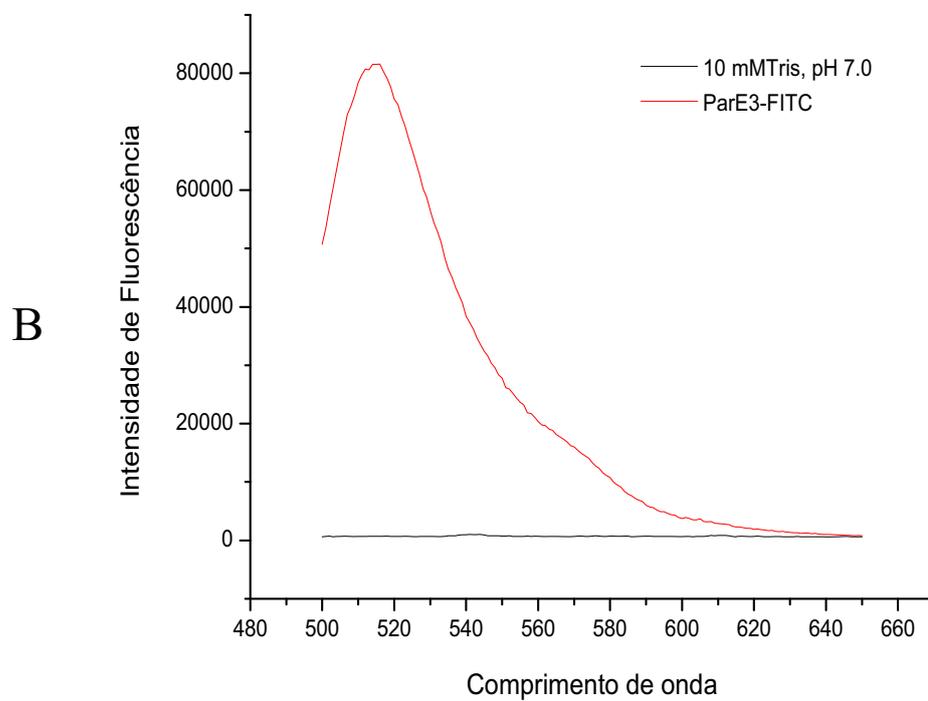
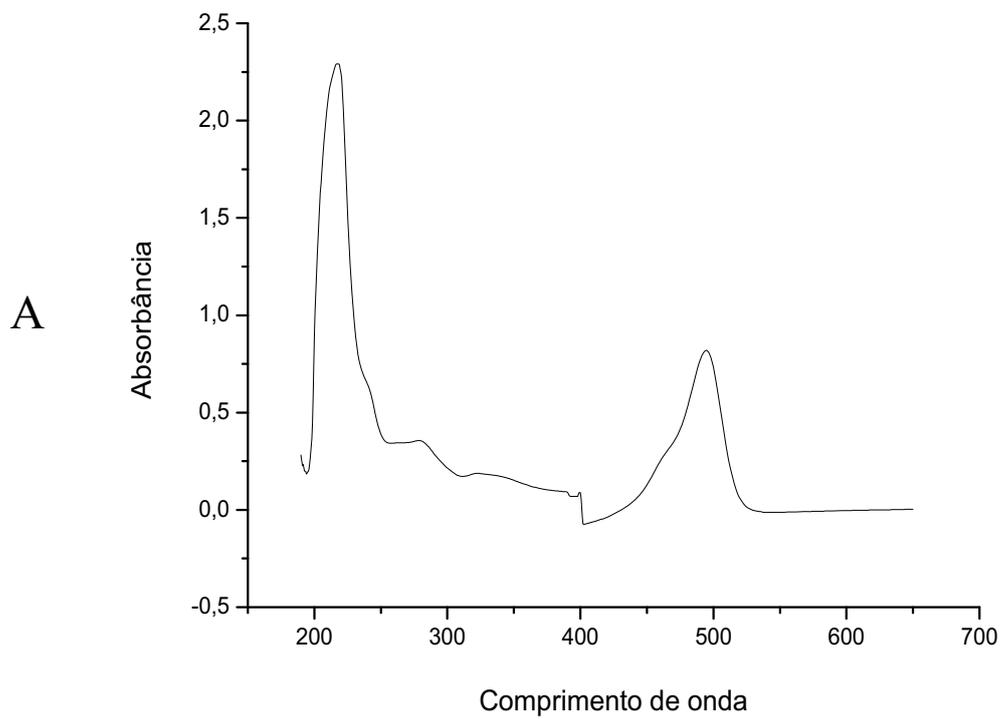
Os peptídeos ParE3 e ParE10 foram, então, derivatizados com o fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC). Após a reação, o FITC livre foi removido por cromatografia de exclusão molecular utilizando-se uma coluna Hitrap desalting (GE Healthcare). A marcação dos peptídeos foi confirmada por espectrofotometria de absorvância e por fluorescência. As Figuras 30 e 31 mostram que os peptídeos foram derivatizados corretamente já que o ensaio de absorção mostra picos a 220nm e 490nm que são os comprimentos de onda de absorção da ligação peptídica e do FITC, respectivamente. Além disso, o ensaio de fluorescência também mostrou que a derivatização ocorreu, pois as amostras derivatizadas apresentaram emissão de fluorescência a 515 nm, referente a molécula do FITC, após serem excitadas a 490nm.

Uma vez confirmada a derivatização dos peptídeos o ensaio de anisotropia de fluorescência pôde ser realizado. Desta forma, 200 nmol.L<sup>-1</sup> de peptídeo marcado foi misturado a quantidades crescentes de GyrA ou GyrB (em nmol.L<sup>-1</sup>) e a anisotropia de fluorescência foi medida. O comprimento de onda de excitação foi de 490nm e a aquisição a 515nm.

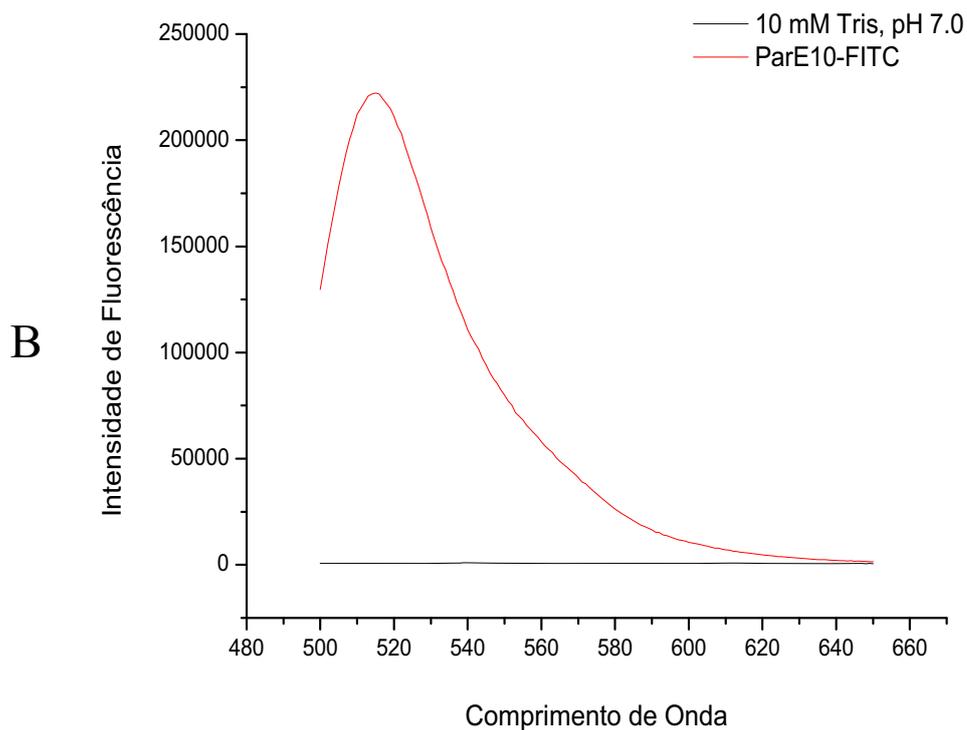
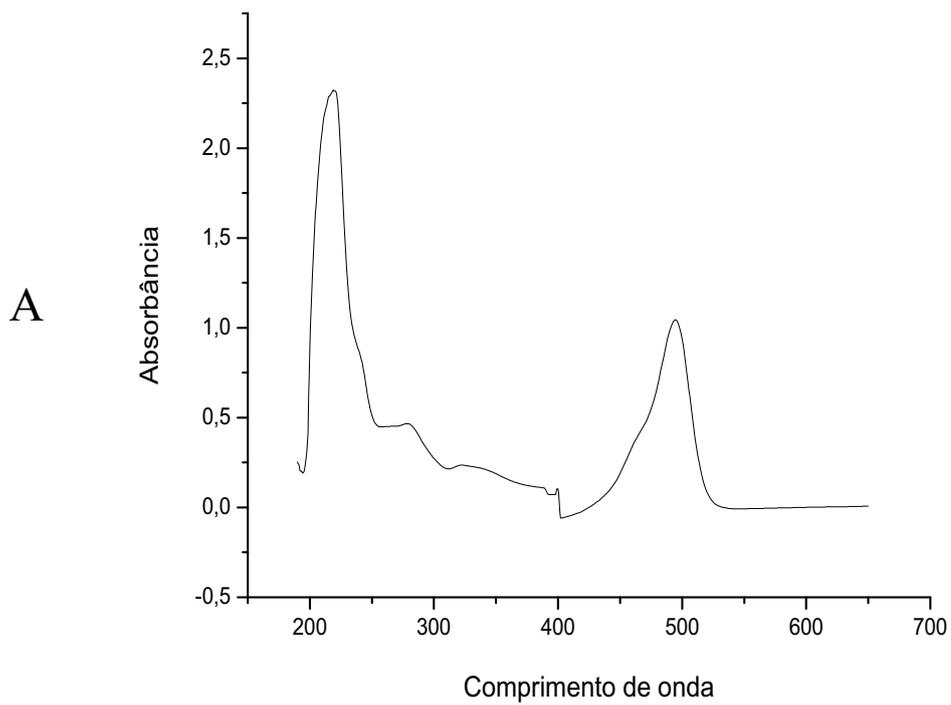
As Figuras 32 e 33 mostram que houve um aumento da anisotropia quando os peptídeos foram colocados em contato com quantidades crescentes de GyrA. Em relação a GyrB, a anisotropia permaneceu praticamente constante. Isso evidencia a ligação dos peptídeos à GyrA, resultado que corrobora os resultados obtidos na análise por fluorescência intrínseca.

#### **4.7 Encapsulamento dos peptídeos em lipossomas e ensaio microbiológico**

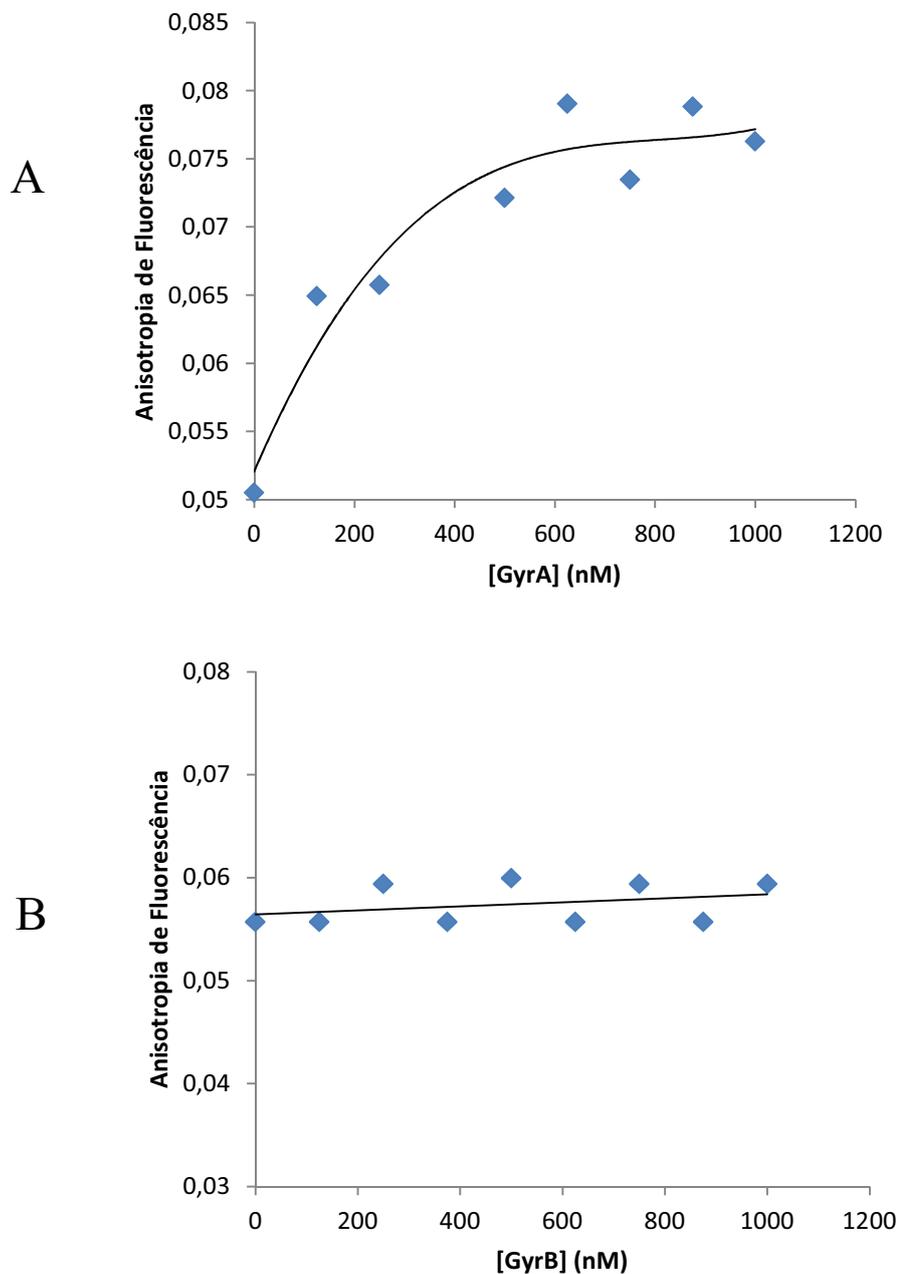
Lipossomas têm sido usados como carreadores de vários compostos com efeito terapêutico, mostrando-se uma poderosa ferramenta para aumento da atividade dos compostos, liberação controlada, aumento de solubilidade, direcionamento ao alvo e redução de toxicidade (SANTOS e CASTANHO, 2002). Além disso, os lipossomas são promissores como veículos para dispensar drogas, uma vez que são absorvidos por muitas células por meio de fusão com a membrana plasmática.



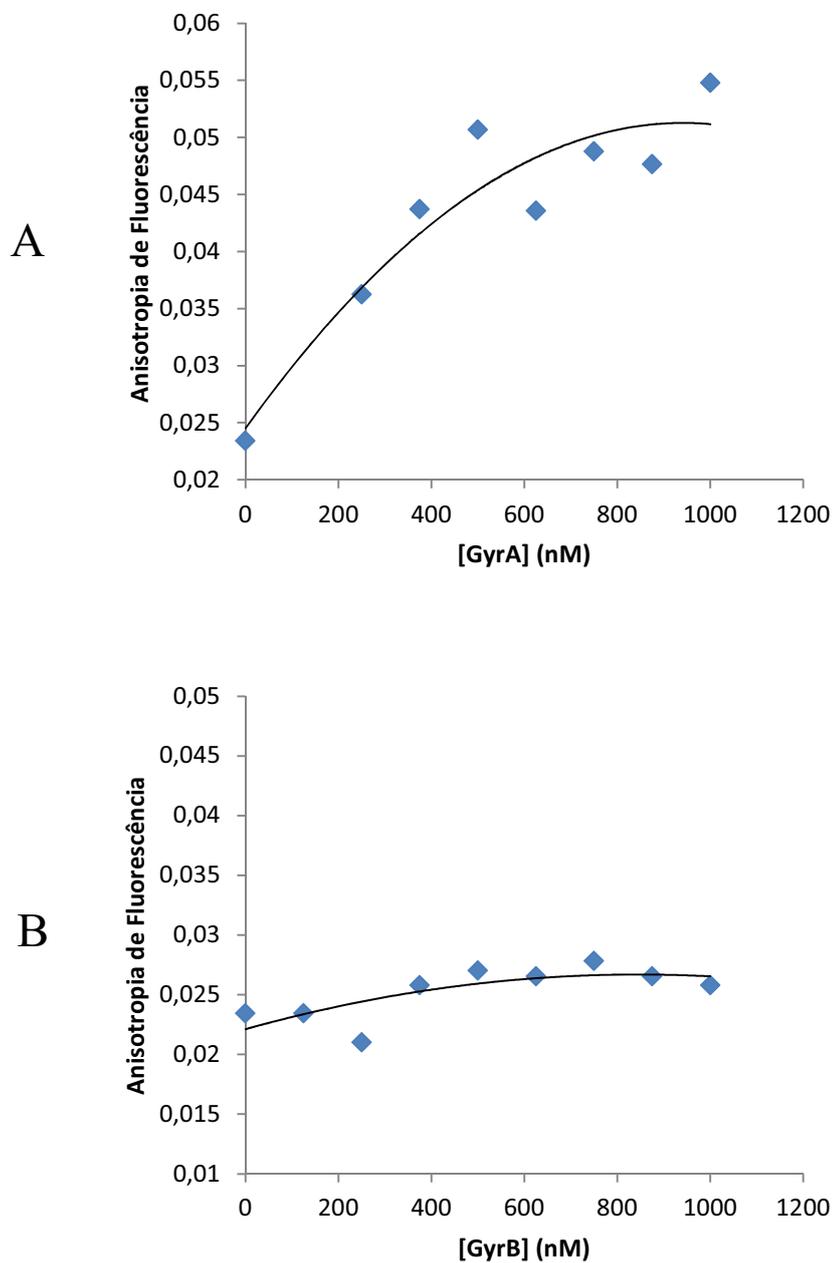
**Figura 30.** Confirmação da derivatização com FITC do peptídeo ParE3 por espectrofotometria de absorvância (**A**) e por fluorescência (**B**). Na análise por fluorescência a amostra foi excitada a 490nm.



**Figura 31.** Confirmação da derivatização com FITC do peptídeo ParE10 por espectrofotometria de absorvância (**A**) e por fluorescência (**B**). Na análise por fluorescência a amostra foi excitada a 490nm.

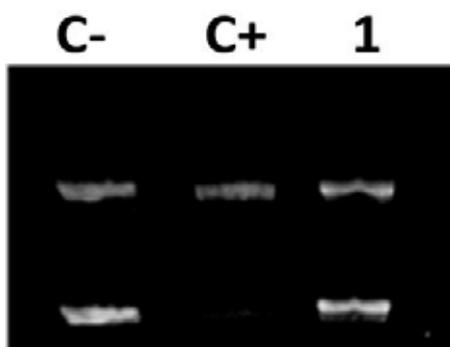


**Figura 32. Análise da formação de complexos ParE3-GyrA e ParE3-GyrB por anisotropia de fluorescência.** Uma amostra de  $200 \text{ nmol.L}^{-1}$  de ParE3 marcada com FITC foi titulada com GyrA e GyrB e a anisotropia de fluorescência do sistema foi medido ( $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$ ).



**Figura 33. Análise da formação de complexos ParE10-GyrA e ParE10-GyrB por anisotropia de fluorescência.** Uma amostra de  $200 \text{ nmol.L}^{-1}$  de ParE10 marcada com FITC foi titulada com GyrA e GyrB e a anisotropia de fluorescência do sistema foi medido ( $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$ ).

A ideia de se trabalhar com lipossomas surgiu a partir de dois fatores principais. O primeiro refere-se a problemas de insolubilidade dos peptídeos. Os peptídeos com boa atividade inibitória sobre as topoisomerases foram selecionados para a realização dos primeiros testes de inibição de crescimento bacteriano utilizando linhagem de *E. coli*. Entretanto, os mesmos quando colocados diretamente no meio de cultura precipitaram, inviabilizando o teste. O segundo fator refere-se à possibilidade de uso dos peptídeos como moléculas ativas para tratamento de câncer. Recentemente, em trabalho conjunto com uma estudante de iniciação científica, foi realizado o primeiro teste de inibição da topoisomerase II humana, uma das principais enzimas alvo em trabalhos de busca de moléculas para tratamento de câncer. Em um ensaio similar ao das topoisomerases bacterianas, a atividade da topoisomerase II humana foi inibida na presença do peptídeo ParE12 (Figura 34).



**Figura 34. Inibição da atividade da topoisomerase II humana pelo peptídeo ParE12.** A topoisomerase II humana (1U) foi incubada com 0,5  $\mu\text{g}$  de plasmídeo pBR322 superenovelado e 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de peptídeo ParE12 a 37 °C por 2h. Posteriormente, a mistura foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1%. **C-**: controle negativo (ausência de peptídeo e topoisomerase II humana); **C+**: controle positivo (ausência somente do peptídeo); **1**: presença e 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  do peptídeo EcParE12.

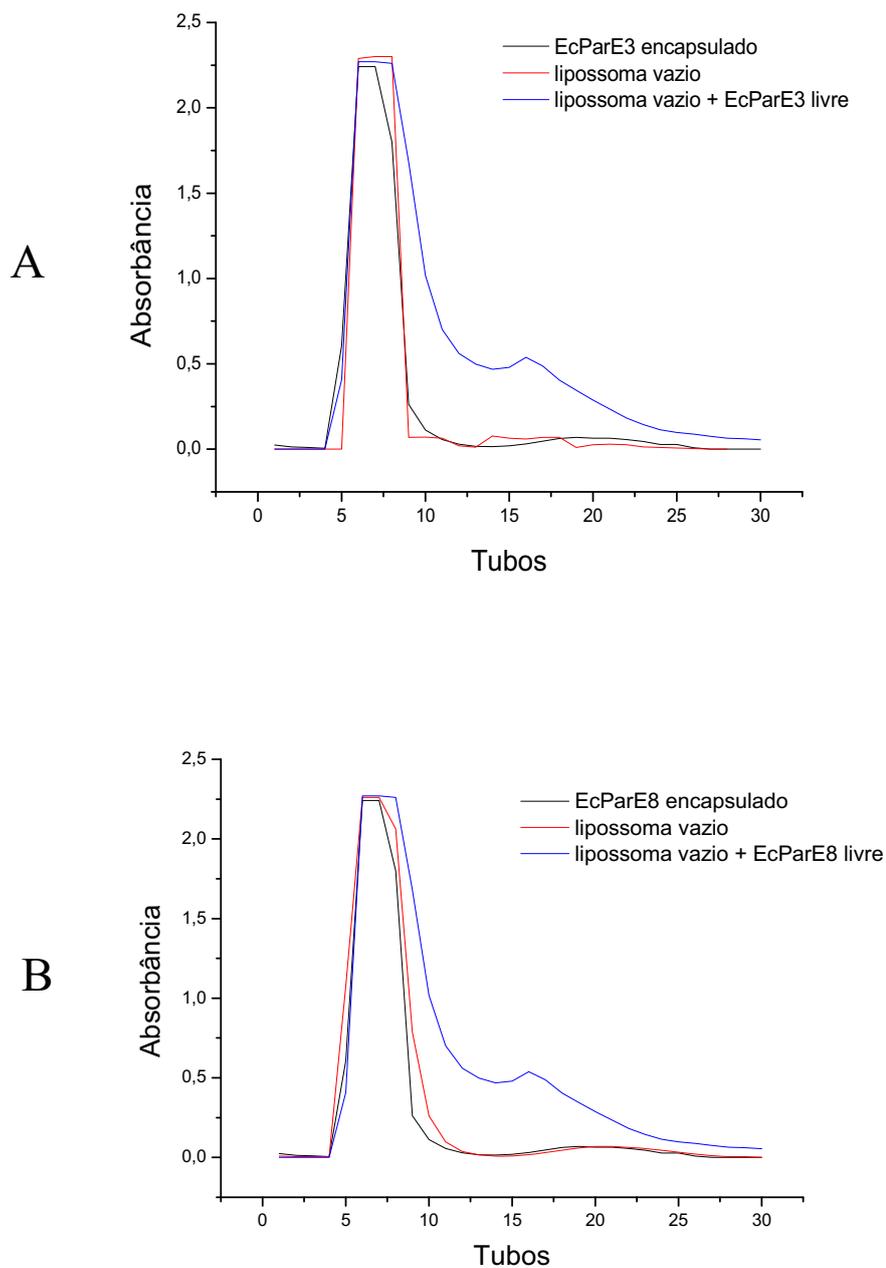
Assim, neste último contexto, verificar a possibilidade de encapsulamento dos peptídeos em lipossomas também é interessante devido à sua capacidade de dispensar drogas por meio de fusão com a membrana plasmática de eucariotos. Além disso, a possibilidade de variação na composição de lipossomas pode resultar em um melhor direcionamento da molécula inibidora ao tecido canceroso.

Desta forma, foi iniciado neste trabalho os primeiros testes usando lipossomas como veículos carreadores para peptídeos bioativos derivados de ParE. Como detalhado em Materiais e Métodos, os peptídeos foram encapsulados em lipossomas de fosfatidil colina de soja. O diâmetro das vesículas foi uniformizado por meio da extrusão dos lipossomas em filtros de 200 nm. O produto final foi submetido à cromatografia de exclusão molecular para separação dos lipossomas formados das moléculas peptídicas não encapsuladas.

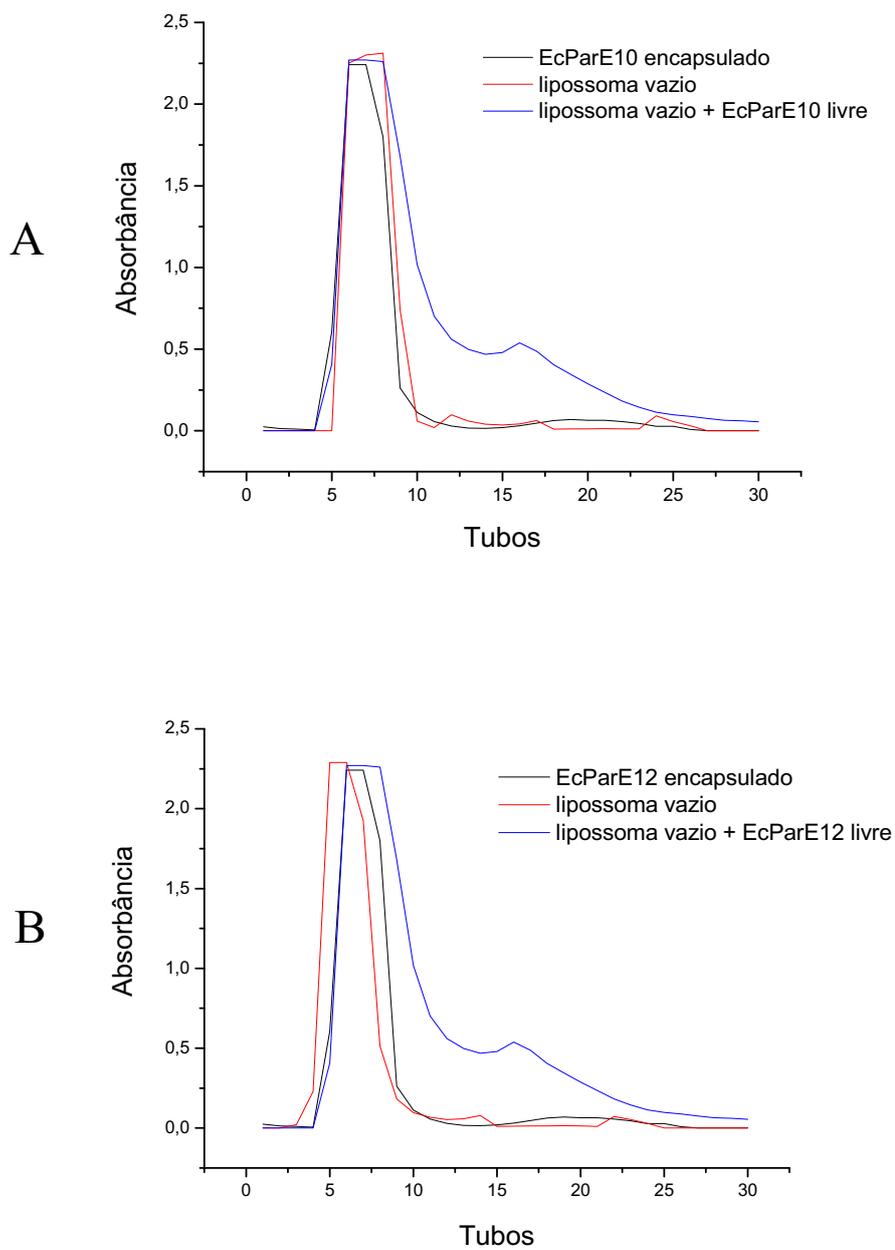
Paralelamente, cromatografias de exclusão molecular de lipossomas vazios e também de uma mistura de lipossomas vazios com  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de peptídeos livres, foram realizadas para um mapeamento dos picos representativos das frações dos lipossomas e de peptídeos livres no perfil cromatográfico.

As Figuras 35 e 36 mostram os perfis cromatográficos, com leituras de absorbância das frações a 220 nm, de amostras com peptídeos encapsulados em relação aos perfis das amostras de lipossomas vazios e de lipossomas vazios com peptídeos livres. Como pode-se observar, os perfis que representam o encapsulamento dos peptídeos não mostraram nenhum pico na região em que os peptídeos livres são eluídos, indicando boa qualidade de encapsulamento.

Posteriormente, as frações que abrangem o pico do peptídeo encapsulado para cada caso foram unidas e metade do volume foi liofilizado, sendo a outra parte utilizada em ensaios microbiológicos. O mesmo foi feito para os lipossomas vazios.



**Figura 35. Perfil obtido por cromatografia de exclusão molecular dos lipossomas com EcParE3 e EcParE8.** Amostras (500  $\mu$ L) de EcParE3 (**A**) e EcParE8 (**B**) encapsulados foram purificados por cromatografia de exclusão molecular. As frações coletadas foram lidas a 220 nm em espectrofotômetro.



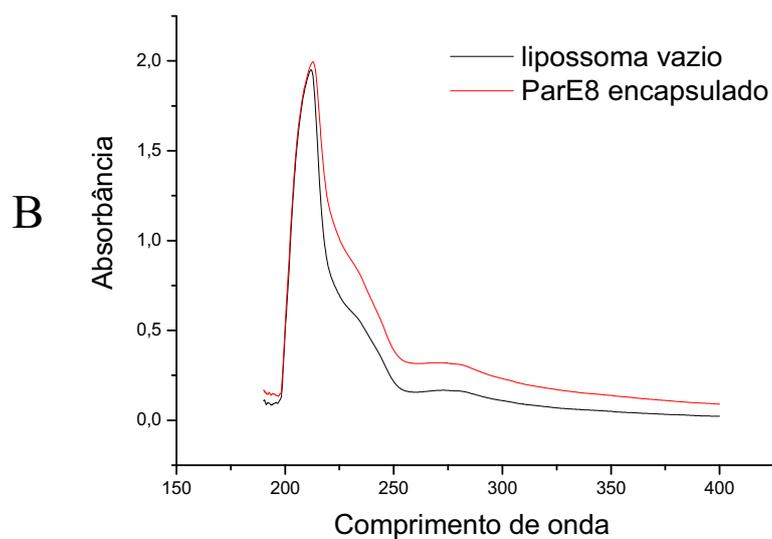
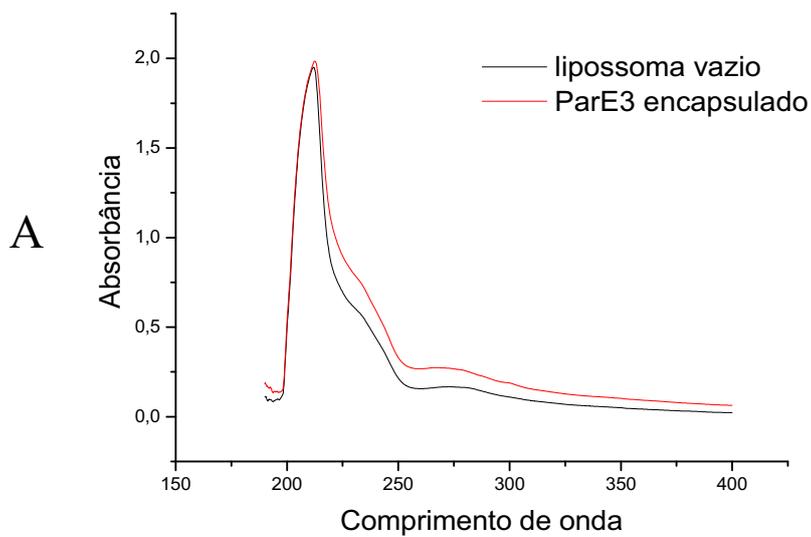
**Figura 36. Perfil obtido por cromatografia de exclusão molecular dos lipossomas com EcParE10 e EcParE12. Amostras (500  $\mu$ L) de EcParE10 (A) e EcParE12 (B) encapsulados foram purificados por cromatografia de exclusão molecular. As frações coletadas foram lidas a 220 nm em espectrofotômetro.**

Para se comprovar a encapsulação, 2 mg de cada uma das amostras liofilizadas foram dissolvidas em 1mL de metanol e as soluções finais foram analisadas em espectrofotômetro, aplicando varredura de comprimento de onda de 150 a 400 nm. O metanol promove o rompimento das vesículas dos lipossomas e, conseqüentemente, a amostra que possui peptídeos no interior das vesículas deve apresentar uma alteração no perfil do espectro de absorbância quando comparado a amostras de lipossomas vazios em metanol, devido à absorção adicional dos peptídeos livres. Este fato observado nas Figuras 37 e 38, onde são comparadas as varreduras espectrofotométricas das amostras dos peptídeos encapsulados e de lipossomas vazios, ambos em metanol.

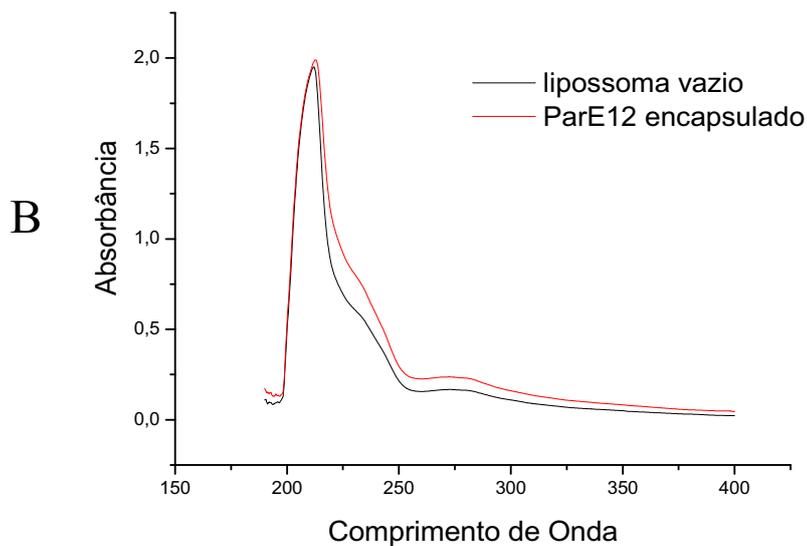
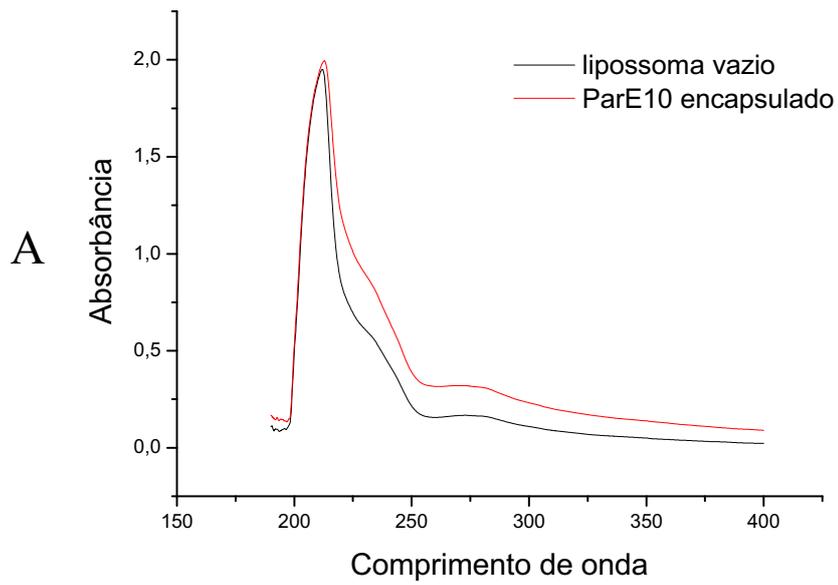
A análise da encapsulação de peptídeos por absorção, como pôde ser observado, fica um pouco dificultada pelo fato de o comprimento de onda máximo de absorção do lipídeo (por volta de 210 nm) ser muito próxima do comprimento de onda de absorção da ligação peptídica (em torno de 220 nm). Se os peptídeos tivessem resíduos de triptofano, um pico adicional de absorção, e distante do pico de absorção do lipídeo, poderia ser visualizado, além de ser possível a análise por fluorescência intrínseca.

Para ensaios futuros de teste de encapsulação em lipossomas de peptídeos derivados de ParE, uma maneira de melhorar a análise seria derivatizar os peptídeos previamente à encapsulação com um fluoróforo, como isotiocianato de fluoresceína ou carboxifluoresceína. Desta forma, no espectro de absorção ter-se-ia um pico de absorção adicional, e distante do pico de absorção do lipídeo, referente ao fluoróforo. Além disso, a encapsulação poderia ser analisada em ensaios de fluorescência extrínseca, explorando a emissão do fluoróforo agora unido covalentemente ao peptídeo.

Uma vez observada a possibilidade da encapsulação de peptídeos derivados de ParE em lipossomas, realizou-se os primeiros testes de inibição de crescimento bacteriano. Bactérias da linhagem de *E. coli* K-100 foram colocadas para crescer, em microplacas, na presença de cada um dos peptídeos encapsulados. A absorbância da cultura a 595 nm, ao final de 18h de crescimento, foi medida com auxílio de um leitor de microplacas.

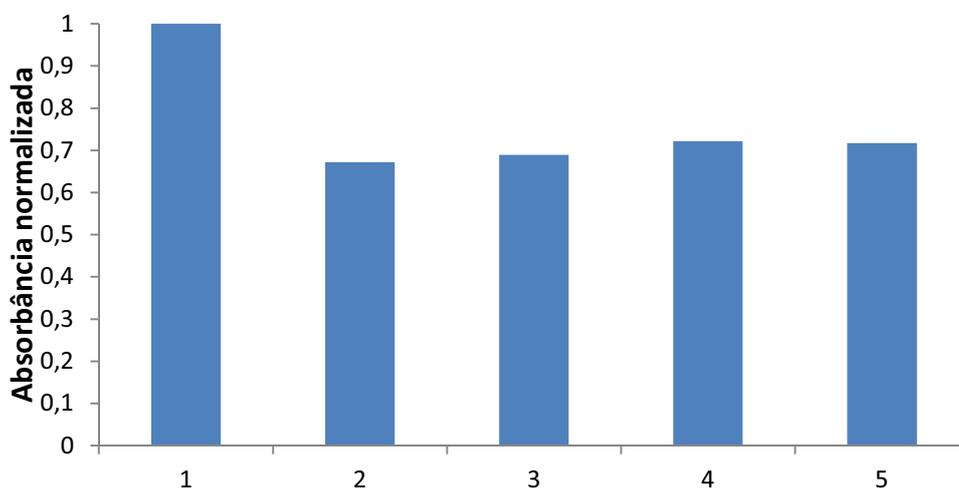


**Figura 37. Análise da encapsulação dos peptídeos EcParE3 e EcParE8 em lipossomas.** Foi realizado uma varredura espectrofotométrica das amostras de EcParE3 (**A**) e EcParE8 (**B**) encapsulados e de lipossomas vazios, todos em metanol.



**Figura 38. Análise da encapsulação dos peptídeos EcParE10 e EcParE12 em lipossomas.** Foi realizado uma varredura espectrofotométrica das amostras de EcParE10 (**A**) e EcParE12 (**B**) encapsulados e de lipossomas vazios, todos em metanol.

De acordo com a Figura 39, uma pequena inibição no crescimento das bactérias foi observada nas culturas que tinham a presença dos peptídeos encapsulados. Neste contexto, algumas inferências podem ser realizadas quanto à reduzida inibição de crescimento observada. Primeiro, é possível que a concentração de peptídeo esteja abaixo do necessário. Neste caso, o ideal seria trabalhar com o máximo de encapsulação de moléculas peptídicas por micela. Para isso, ensaios futuros serão necessários para se observar qual seria esta concentração ideal no momento do preparo dos lipossomas, para uma quantidade fixa de lipídeo, para que se saturem as micelas e, assim, se purifique lipossomas com máximo de encapsulação por micela. Um segundo quesito importante é que, diferentemente de células eucarióticas, a presença da parede celular em células procarióticas pode prejudicar eventos de fusão de membranas, processo extremamente favorável ao transporte de drogas quando se trabalha com moléculas relativamente grandes. Desta forma, trabalhos adicionais sobre a eficiência de encapsulação são necessários. Além disso, estudos sobre o transporte dos peptídeos para o interior das células devem ser iniciados, afim de melhor avaliar a viabilidade do uso de lipossomas para este fim, principalmente quando o alvo são células procarióticas.

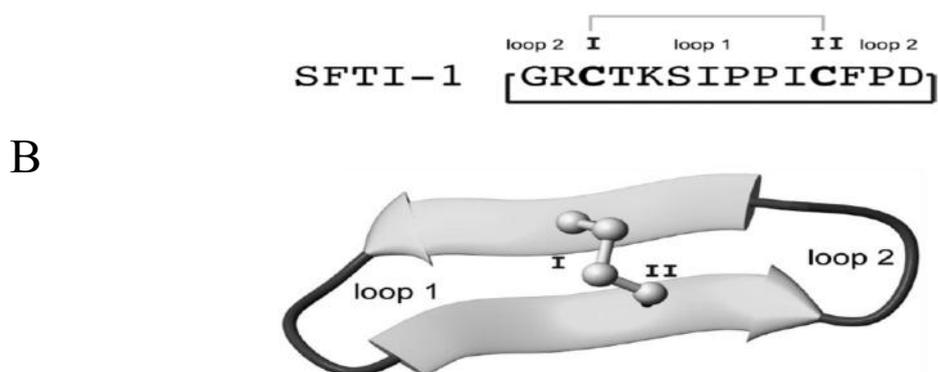
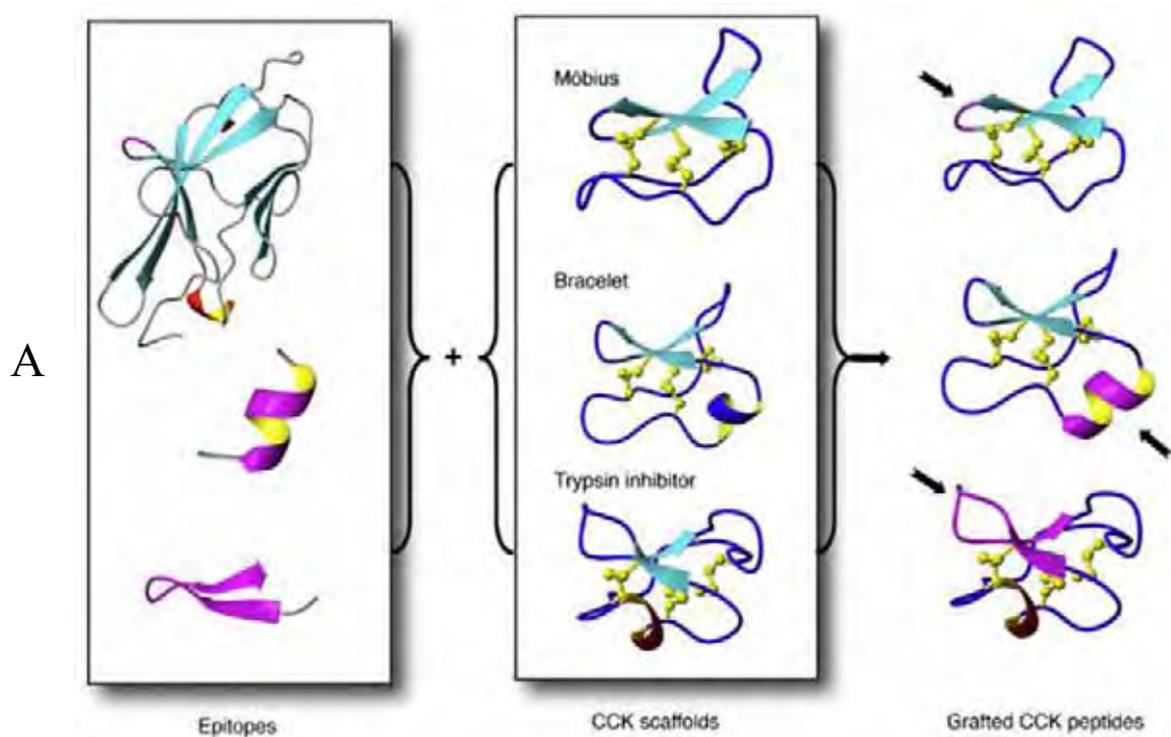


**Figura 39. Teste de sensibilidade microbiana dos peptídeos encapsulados.** Bactérias da linhagem de *E. coli* foram colocadas para crescer em microplacas, na presença de cada um dos peptídeos encapsulados. A absorbância a 595 nm, após 18h de crescimento, foi medida com auxílio de um leitor de microplacas. **1** – lipossoma vazio. **2 a 5** – ParE3, ParE8, ParE10 e ParE12 encapsulados, respectivamente .

Ainda no âmbito de permeabilidade celular, outras estratégias podem ser testadas futuramente para aumentar a permeabilidade celular dos peptídeos bioativos, como é o caso da adição de sequências CPPs (*cell penetrating peptides*). Estudos a partir de proteínas que foram observadas ter a propriedade de atravessar membrana, como é o caso da proteína Tat de HIV (FRANKEL e PABO, 1988; GREEN e LOEWENSTEIN, 1988), culminaram no descobrimento de uma sequência de aminoácidos de 10 a 16 resíduos que seria responsável pela permeabilidade da proteína. A partir disso, vários estudos empíricos e por bioinformática levaram a publicação de várias sequências que poderiam atuar como moléculas carreadoras (VIVÈS et al., 2008). Estas moléculas passaram a ser chamadas genericamente de *Cell Penetrating Peptides* (CPPs). Entretanto, tem sido documentado que estratégias empregando CPPs apresentam perda de especificidade em ensaios *in vivo* (VIVÈS et al., 2008). Além disso, peptídeos lineares são mais vulneráveis no interior do corpo, sendo facilmente degradados por proteases.

Recentemente, foram publicados trabalhos mostrando a capacidade de ciclotídeos (ou miniproteínas) de atravessar membrana plasmática (GREENWOOD et al., 2007). Desta forma, estas moléculas são a mais nova promessa como moléculas suporte (*molecular scaffold*) em processos de permeabilidade celular (JAGADISH e CAMARERO, 2010; DALY et al., 2009). A este novo grupo de moléculas carreadoras foi cunhado o termo CCPPs (*Cyclic Cell Penetrating Peptides*). Os ciclotídeos possuem as vantagens de serem extremamente estáveis devido a estrutura rígida mantida por pontes dissulfeto e são muito mais resistentes a proteases que peptídeos lineares. Além disso, os ciclotídeos possuem alta plasticidade, ou seja, são muito resistentes a alterações estruturais, desde que conservadas as pontes dissulfeto (JAGADISH e CAMARERO, 2010; DALY et al., 2009).

A Figura 40A ilustra aplicações, ainda hipotéticas, desta nova abordagem, utilizando os ciclotídeos como *frameworks*. Recentemente (CASCALES et al., 2011) também foi documentado a capacidade de um peptídeo cíclico (SFTI-1, Figura 40B), de estrutura diferente e bem menor que um ciclotídeo, de atravessar membrana.



**Figura 40. Representações esquemáticas de ciclóides.** (A) Representação esquemática de substituições moleculares por epítomos, em três ciclóides diferentes. Figura obtida de DALY et al., 2009. (B) Representação da seqüência e da estrutura do peptídeo SFTI-1. Figura obtida de CASCALES et al., 2011.

Diante de todo o exposto, fica clara a possibilidade dos peptídeos derivados de ParE de constituírem uma classe importante de moléculas bioativas dentro deste emergente cenário que é o da terapia baseada em proteínas e peptídeos. O que resta é estudar uma estratégia eficaz (uso de lipossomas, CPPs, CCPPs ou reengenharia das moléculas) para otimizar a permeabilidade celular dos mesmos, seja em células procarióticas para confecção de antimicrobianos, ou para células eucarióticas no sentido de elucidação de novas moléculas anticâncer.

## **5. Conclusões**

- Utilizando modelagem molecular por homologia, um modelo tridimensional para toxina ParE de *E. coli* foi obtido e validado. Predições de estrutura secundária corroboraram o envolvimento dos aminoácidos envolvidos na formação das estruturas secundárias inferidas na modelagem;
- Tomando como base dados estruturais inferidos a partir do modelo da estrutura tridimensional de ParE, 12 peptídeos foram racionalmente desenhados e sintetizados. Os processos de purificação e caracterização ocorreram sem maiores problemas, exceto pelo fato de a maioria dos peptídeos apresentarem baixa solubilidade em água.
- Os ensaios de inibição da atividade de superenovelamento da DNA girase e de inibição da atividade de relaxamento da topoisomerase IV, indicaram que os peptídeos ParE3 (ParE 80-100), ParE8 (ParE 61-105), ParE10 (ParE 61-87) e ParE12 (ParE 61-79) atuam como bons inibidores de ambas enzimas.
- Os resultados obtidos focando a região C-terminal de ParE na obtenção de peptídeos sintéticos, confirmam o envolvimento desta porção da proteína no processo de interação com a DNA girase. Estes dados somados a análise de alinhamento múltiplo de seqüências primárias de ParE de várias espécies de bactérias permite propor três aminoácidos que podem ser cruciais na interação ParE – DNA girase: H88, M91 e H69.
- Estudos iniciais de inibição da topoisomerase II humana sugerem a possibilidade dos peptídeos derivados de ParE também poderem ser utilizados no desenvolvimento de novas moléculas anticâncer.
- Ensaios de fluorescência intrínseca e anisotropia de fluorescência, empregando peptídeos sintéticos derivados de ParE, evidenciaram que o processo de inibição da atividade da DNA girase pela toxina ParE deve ocorrer por interação com a subunidade GyrA da enzima.

- Estudos iniciais mostraram que é possível promover a encapsulação dos peptídeos derivados de ParE em lipossomas de fosfatidil colina de soja.
- Testes de crescimento bacteriano, utilizando linhagem de *E. coli*, na presença de peptídeos derivados de ParE encapsulados em lipossomas, mostraram, embora reduzida, inibição de crescimento das bactérias.
- Os primeiros experimentos de encapsulação de peptídeos e de crescimento microbiano mostraram a necessidade de testes futuros sobre eficiência de encapsulação dos peptídeos, além da necessidade de um estudo mais detalhado da permeabilidade da membrana aos peptídeos livres ou encapsulados em lipossomas.
- Ainda no âmbito da permeabilidade celular, tanto para células eucarióticas quanto procarióticas, necessita-se testar outras estratégias disponíveis na literatura para maximizar a permeabilidade de membrana dos peptídeos derivados de ParE, como é o caso da adição de sequências CPPs, inserção em ciclotídeos ou mesmo a reengenharia das moléculas.

## **REFERÊNCIAS**

ALBERICIO, F.; BARANY, G. Improved approach for anchoring N $\alpha$ -9 fluorenylmethyloxycarbonylamino acids as p-alkoxybenzyl esters in solid-phase peptide synthesis. **Int. J. Pept. Protein Res.**, v. 26, p. 92-97, 1985.

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. **J. Org. Chem.**, 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, n. 10, p. 2717-2724, 1993.

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

ANANTHARAMAN, V.; ARAVIND, L. New connections in the prokaryotic toxin-antitoxin network: relationship with the eukaryotic nonsense-mediated RNA decay system. **Genome Biol.**, v. 4, n. 12, p. R81, 2003.

ANDERSON, G. W.; MCGREGOR, A. C. t-Butyloxycarbonylamino acids and their use in peptide synthesis. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 79, p. 6180-6183, 1957.

BARBOSA, L. C.; GARRIDO, S. S.; GARCIA, A.; DELFINO, D. B.; MARCHETTO, R. Function inferences from a molecular structural model of bacterial ParE toxin. **Bioinformatics**, v. 4, n. 10, p. 438-40, 2010.

BOMAN, H. G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 13, p. 61-92, 1995.

BREUKINK, E.; GANZ, P.; KRUIJFF, B.; SEELIG, J. Binding of Nisin Z to bilayer vesicles as determined with isothermal titration calorimetry. **Biochemistry**, v. 39, p. 10247-10254, 2000.

BROOKS, B. R.; BRUCCOLERI, R. E.; OLAFSON, B. D.; STATES, D. J.; SWAMINATHAN, S.; KARPLUS, M. CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. **J. Comp. Chem.**, v. 4, n.2, p. 187-217, 1983.

CARPINO, L. A. Oxidative reactions of hydrazides. IV. Elimination of nitrogen from 1,1-disubstituted-2-arenesulfonylhydrazides. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 79, p. 4427-4431, 1957.

CARPINO, L. A. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 115, p. 4397-4398, 1993.

CARPINO, L. A.; HAN, G. A. The 9-fluorenylmethyloxycarbonyl amino-protecting group. **J. Org. Chem.**, 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. **J. Org. Chem.**, 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 solidphase peptide synthesis. **J. Chem. Soc. Chem. Commun.**, n. 2, p. 201-203, 1994.

CASCALES, L.; HENRIQUES, S. T.; KERR, M. C.; HUANG, Y. H.; SWEET, M. J.; DALY, N. L.; CRAIK, D. J. Identification and characterization of a new family of cell-penetrating peptides: cyclic cell-penetrating peptides. **J. Biol. Chem.**, v. 286, n. 42, p. 36932-3643, 2011.

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

CHAMPOUX, J. J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 70, p. 369-413, 2001.

CHONO, H.; MATSUMOTO, K.; TSUDA, H.; SAITO, N.; LEE, K.; KIM, S.; SHIBATA, H.; AGEYAMA, N.; TERAOKA, K.; YASUTOMI, Y.; MINENO, J.; KIM, S.; INOUE, M.; KATO, I. Acquisition of HIV-1 resistance in T lymphocytes using an ACA-specific E. coli mRNA interferase. **Hum. Gene Ther.**, v. 22, p. 35-43, 2011.

CHRISTENSEN-DALSGAARD, M.; JORGENSEN, M. G.; GERDES, K. Three new RelE-homologous mRNA interferases of Escherichia coli differentially induced by environmental stresses. **Mol. Microbiol.**, v. 75, p. 333-348, 2010.

COSTE, J.; CAMPAGNE, J. M. A propos de l'esterification de acides carboxyliques par le BOP ou le PyBOP. **Tetrahedron Lett.**, 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 Lett.**, v. 31, p. 205-208, 1990.

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

CUDIC, M.; CONDIE, B. A.; WEINER, D. J.; LYSENKO, E. S.; XIANG, Z.Q.; INSUG, O.; BULET, P.; OTVOS, L. Jr. Development of novel antibacterial peptides that kill resistant isolates. **Peptides**, v. 23, p. 2071-2083, 2002.

CURTIUS, T. Synthetische versuche mit hippurazid. **Ber. Dtsch. Chem. Ges.**, v. 35, p. 3226-3228, 1902.

DALTON, K. M.; CROSSON, S. A conserved mode of protein recognition and binding in a ParD-ParE toxin-antitoxin complex. **Biochemistry**, v. 49, p. 2205-2215, 2010.

DALY, N. L.; ROSENGREN, K. J.; CRAIK, D. J. Discovery, structure and biological activities of cyclotides. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, v. 61, n. 11, p. 918-930, 2009.

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

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.

FIEBIG, A.; CASTRO ROJAS, C. M.; SIEGAL-GASKINS, D.; CROSSON, S. Interaction specificity, toxicity and regulation of a paralogous set of ParE/RelE-family toxin-antitoxin systems. **Mol. Microbiol.**, v. 77, n. 1, p. 236-51, 2010.

FINERAN, P. C.; BLOWER, T. R.; FOULDS, I. J.; HUMPHREYS, D. P.; LILLEY, K. S.; SALMOND, G. P. The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 106, p. 894-899, 2009.

FISCHER, E.; FOURNEAU, E. Ueber einige derivate glykolls. **Ber. Dtsch. Chem. Ges.**, v. 34, p. 2868-2877, 1901.

FRANCUSKI, D.; SAENGER, W. J. Crystal structure of the antitoxin-toxin protein complex RelB-RelE from *Methanococcus jannaschii*. **Mol. Biol.**, v. 393, n. 4, p. 898-908, 2009.

FRANKEL, A. D.; PABO, C. O. Cellular uptake of the Tat protein from human immunodeficiency virus. **Cell**, v. 55, p. 1189-1193, 1988.

GARCIA, A. **Peptídeos derivados da proteína bacteriana YacG: síntese e estudos de estrutura-função**. 2010. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

GARCIA-CONTRERAS, R.; ZHANG, X. S.; KIM, Y.; WOOD, T. K. Protein translation and cell death: the role of rare tRNAs in biofilm formation and in activating dormant phage killer genes. **PLoS ONE**, v. 3, p. e2394, 2008.

GELLERT, M.; MIZUUCHI, K.; O'DEA, M. H.; NASH, H. A. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 73, p. 3872-3876, 1976.

GERDES, K.; WAGNER, E. G. RNA antitoxins. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 10, p. 117-124, 2007.

GERDES, K.; CHRISTENSEN, S. K.; LOBNER-OLESEN, A. Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. **Nature Rev. Microbiol.**, v. 3, p. 371-382, 2005.

GREEN, M.; LOEWENSTEIN, P. M. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. **Cell**, v. 55, p. 1179-1188, 1988.

GREENWOOD, K. P.; DALY, N. L.; BROWN, D. L.; STOW, J. L.; CRAIK, D. J. The cyclic cystine knot miniprotein MCoTI-II is internalized into cells by macropinocytosis. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 39, n. 12, p. 2252-2264, 2007.

HANCOCK, R.E.W. Peptide antibiotic. **Lancet**, v. 349, p. 418-422, 1997.

HANCOCK, R. E. W.; FALLA, T.; BROWN, M. Cationic bactericidal peptides. **Adv. Microb. Physiol.**, v. 37, p. 135-175, 1995.

HARA, S.; ASAOKA, A.; YAMAKAWA, M. Effect of moricin, a novel antibacterial peptide of *Bombyxmori* (Lepidoptera bombycidae) on the growth of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Appl. Entomol. Zool.**, v. 31, p. 465-466, 1996.

HAYES, F. Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. **Science**, v. 301, p. 1496-1499, 2003.

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 Nucleic Acids**, v. 19, n. 8, p. 1249-64, 2000.

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. **J. Mol. Biol.**, v. 307, p. 1223-1234, 2001.

HEINEMANN, J. A.; ANKENBAUER, R. G.; AMÁBILE-CUEVAS, C. F. Do antibiotics maintain antibiotic resistance? **Drug Discov. Today**, v. 5, p.195-204, 2000.

HIGGINS, N. P.; PEEBLES, C. L.; SUGINO, A.; COZZARELLI, N. R. Purification of subunits of *Escherichia coli* DNA gyrase and reconstitution of enzymatic activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 75, p. 1773-1777, 1978.

JACK, R. W.; TAGG, J. R.; RAY, B. Bacteriocin of gram-positive bacteria. **Microbiol. Rev.**, v. 59, p. 171-200, 1995.

JAFFE, A.; OGURA, T.; HIRAGA, S. Effects of the ccd function of the F plasmid on bacterial growth. **J. Bacteriol.**, v. 163, p. 841-849, 1985.

JAGADISH, K.; CAMARERO, J. A. Cyclotides, a promising molecular scaffold for peptide-based therapeutics. **Biopolymers**, v. 94, n. 5, p. 611-616, 2010.

JASIR, A.; KASPRZYKOWSKI, F.; KASPRZYKOWSKA, R.; LINDSTROM, V.; SCHALEN, C.; GRUBB, A. New antimicrobial cystatin C-based peptide active against gram-positive bacteria pathogens, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multiresistant coagulase-negative staphylococci. **APMIS**, v. 111, p. 1004-1010, 2003.

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. **Mol. Microbiol.**, v. 44, p. 971, 2002.

JOHNSON, E. P.; STROM, A. R.; HELINSKI, D. R. Plasmid RK2 toxin protein ParE: purification and interaction with the ParD antitoxin protein. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 1420-1429, 1996.

JULIANO, R. L. Liposomes as a drug delivery system. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 2, p. 39-42, 1981.

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

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. I.; SUZUKI, H.; IKEDA, H. Purification and characterization of DNA topoisomerase IV in *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 25676-25684, 1992.

KATO, J. I.; 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.

KHODURSKY, A. B.; ZECHIEDRICH, E. L.; COZZARELLI, N. R. Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 92, p. 11801-11805, 1995.

LICHTENBERG, D.; BARENHOLZ, Y. Liposomes: preparation, characterization, and preservation. **Methods Biochem. Anal.**, v. 33, p. 337-462, 1988.

LIU, L. F.; LIU, C. C.; ALBERTS, B. M. Type II DNA topoisomerases? Enzymes that can unknot topologically knotted DNA molecule via a reversible double-strand break. **Cell**, v. 19, p. 697-707, 1980.

LOHNER, K.; STAUDEGGER, E. **Development of novel antimicrobial agents**: emerging strategies. Wymondham: Horizon Scientific Press, 2001.

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

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. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 3, p. 30-37, 1992.

MARIANOVSKY, I.; AIZENMAN, E.; ENGELBERG-KULKA, H.; GLASER, G. The regulation of the Escherichia coli mazEF promoter involves an unusual alternating palindrome. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 5975-5984, 2001.

MARIANS, K. J. DNA gyrase-catalysed decatenation of multiply linked DNA dimers. **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 10362-10368, 1987.

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

MERRIFIELD, R. B. Solid-phase peptide synthesis. I: the synthesis of a tetrapeptide. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 85, p. 2149-2154, 1963.

MIKI, T.; PARK, J. A.; NAGAO, K.; MURAYAMA, N.; HORIUCHI, T. Control of segregation of chromosomal DNA by sex factor F in Escherichia coli. Mutants of DNA gyrase subunit A suppress letD (ccdB) product growth inhibition. **J. Mol. Biol.**, v. 225, p. 39-52, 1992.

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. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 98, p. 7357-7362, 1976.

MIYANOSHITA, A.; HARA, S.; SUGIYAMA, M.; ASAOKA, A.; TANIAI, K.; YUKUHIRO, F.; YAMAKAWA, M. Isolation and characterization of new member of insect defensin family from a beetle, *Allomyrina dichotoma*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 220, p. 526-531, 1996.

NEUBAUER, C.; GAO, Y. G.; ANADERSEN, K. R.; DUNHAM, C. M.; KELLEY, A. C.; HENTSCHEL, J.; GERDES, K.; RAMAKRISHNAN, V.; BRODERSEN, D. E. The structural basis for mRNA recognition and cleavage by the ribosome-dependent endonuclease RelE. **Cell**, v. 139, p. 1084-1095, 2009.

NEW, R. R. C. **Liposomes**: a practical approach. Oxford: Oxford University Press, 1990. 320 p.

PENG, H.; MARIANS, K. J. Escherichia coli topoisomerase IV: purification, characterization, subunit structure, and subunit interactions. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 24481-24490, 1993.

- PENG, H.; MARIANS, K. J. The interaction of *Escherichia coli* topoisomerase IV with DNA. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 25286-25290, 1995.
- PIETTA, P. G.; MARSHALL, G. R. Amide protection and amide supports in solid-phase peptide synthesis. **J. Chem. Soc. Chem.**, v. 11, p. 650-651, 1970.
- REECE, R.; MAXWELL, A. DNA gyrase: structure and function. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v. 26, p. 335-375, 1991.
- ROBERTS, R. C.; STROM, A. R.; HELINSKI, D. R. The parDE operon of the broad-host-range plasmid RK2 specifies growth inhibition associated with plasmid loss. **J. Mol. Biol.**, v. 237, p. 35-51, 1994.
- ROCA, J.; WANG, J. C. The capture of a DNA double helix by an ATP-dependent protein clamp: a key step in DNA transport by topo I DNA topoisomerases. **Cell**, v. 71, p. 833-840, 1992.
- SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **J. Mol. Biol.**, v. 234, n. 3, p. 779-815, 1993.
- SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. R. B. Lipossomas: a bala mágica acertou? **Quim. Nova**, v. 25, p. 1181-1185, 2002.
- SENGUPTA, S.; NAGARAJA, V. YacG from *Escherichia coli* is a specific endogenous inhibitor of DNA gyrase. **Nucleic Acids Res.**, v. 36, p. 4310-4316, 2008.
- SHEEHAN, J. C.; HESS, G. P. A new method of forming peptide bonds. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 77, p. 1067-1068, 1955.
- SHIMAZU, T.; DEGENHARDT, K.; NUR-E-KAMAL, A.; ZHANG, J.; YOSHIDA, T.; ZHANG, Y.; MATHEW, R.; WHITE, E.; INOUE, M. NBK/BIK antagonizes MCL-1 and BCL-XL and activates BAK-mediated apoptosis in response to protein synthesis inhibition. **Genes Dev.**, v. 21, p. 929-941, 2007.
- SKERLAVAJ, B.; BENINCASA, M.; RISSO, A.; ZANETTI, M.; GENNARO, R. SMAP-29: a potent antibacterial and antifungal peptide from sheep leukocytes. **FEBS Lett.**, v. 463, p. 58-62, 1999.
- SMITH, C. V.; MAXWELL, A. Identification of a residue involved in transition-state stabilization in the ATPase reaction of DNA gyrase. **Biochemistry**, v. 37, p. 9658-9667, 1998.
- SZOKA J. R. F.; PAPAHAADJOPOULOS, D. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). **Annu. Ver. Biophys. Bioeng.**, v. 9, p. 467-508, 1980.
- TAN, Q.; AWANO, N.; INOUE, M. YeeV is an *Escherichia coli* toxin that inhibits cell division by targeting the cytoskeleton proteins, FtsZ and MreB. **Mol. Microbiol.**, v. 79, p. 109-118, 2011.

- TROVATTI, E.; COTRIM, C. A.; GARRIDO, S. S.; BARROS, R. S.; MARCHETTO, R. Peptides based on CcdB protein as novel inhibitors of bacterial topoisomerases. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 18, p. 6161-6164, 2008.
- TSE-DINH, Y. C. Bacterial topoisomerase I as a target for discovery of antibacterial compounds. **Nucleic Acids Res.**, v. 37, n. 3, p. 731-737, 2009.
- VAN MELDEREN, L.; SAAVEDRA DE BAST, M. Bacterial toxin–antitoxin systems: more than selfish entities? **PLoS Genet.**, v. 5, p. e1000437, 2009.
- VIVÈS, E.; SCHMIDT, J.; PÈLEGRIN, A. Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1786, n. 2, p. 126-138, 2008.
- WIGLEY, D. B. Structure and mechanism of DNA gyrase. In BUJNICKI, J. M. (Ed.). **Nucleic acids and molecular biology**. New York: Springer-Verlag, 1995. p. 165-176.
- WOODLE, M. C.; PAPAHAADJOPOULOS, D. Liposome preparation and size characterization. **Methods Enzymol.**, v. 171, p. 193-217, 1989.
- YAMADA, K.; NATORI, S. Purification, sequence and antibacterial activity of two novel sapecin homologues from sacrophaga embryonic cells: similarity of sapecin B to charybdotoxin. **Biochem. J.**, v. 291, p. 275-279, 1993.
- YAMAGUCHI, Y.; INOUE, M. mRNA interferases, sequence-specific endoribonucleases from the toxin–antitoxin systems. **Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.**, v. 85, p. 467–500, 2009.
- YAMAGUCHI, Y.; INOUE, M. Regulation of growth and death in *Escherichia coli* by toxin–antitoxin systems. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 9, n. 11, p. 779-790, 2011.
- YAMAGUCHI, Y.; PARK, J. H.; INOUE, M. MqsR, a crucial regulator for quorum sensing and biofilm formation, is a GCU-specific mRNA interferase in *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, v. 284, p. 28746-28753, 2009.
- ZHANG, Y.; INOUE, M. The inhibitory mechanism of protein synthesis by YoeB, an *Escherichia coli* toxin. **J. Biol. Chem.**, v. 284, p. 6627-6638, 2009.
- ZHANG, Y.; INOUE, M. RatA (YfjG), an *Escherichia coli* toxin, inhibits 70S ribosome association to block translation. **Mol. Microbiol.**, v. 79, p. 1418-1429, 2011.
- ZHANG, Y.; YAMAGUCHI, Y.; INOUE, M. Characterization of YafO, an *Escherichia coli* toxin. **J. Biol. Chem.**, v. 284, p. 25522-25531, 2009.