

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PEPTÍDEOS DERIVADOS DA PROTEÍNA BACTERIANA YacG: SÍNTESE E
ESTUDOS DE ESTRUTURA-FUNÇÃO**

ANDERSON GARCIA

**INSTITUTO DE QUÍMICA
ARARAQUARA - SÃO PAULO**

2010

ANDERSON GARCIA

**PEPTÍDEOS DERIVADOS DA PROTEÍNA BACTERIANA YacG: SÍNTESE E
ESTUDOS DE ESTRUTURA-FUNÇÃO.**

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

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto

Araraquara- SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

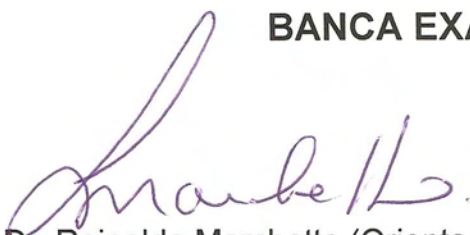
G216p	Garcia, Anderson Peptídeos derivados da proteína bacteriana YacG : síntese e estudos de estrutura-função / Anderson Garcia. – Araraquara : [s.n], 2010 85 f. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Reinaldo Marchetto Co-orientador: Saulo Santesso Garrido 1. Biotecnologia. 2. Síntese de peptídeos em fase sólida. 3. Zinc-fingers. 4. YacG . I. Título.
-------	--

ANDERSON GARCIA

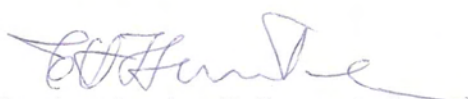
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 03 de dezembro de 2010.

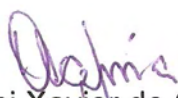
BANCA EXAMINADORA



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



Profª Drª Clarice Queico Fujimura Leite
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Vani Xavier de Oliveira Junior
Universidade Federal do ABC – UFABC, Santo André

Nome: Anderson Garcia

Nome em citações bibliográficas: GARCIA, A.

Filiação: Maria Rosely Garcia Quintino

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

Estado civil: solteiro

Endereço: Avenida Francisco Pestana 81 – Campos Ville – Araraquara - SP

CEP: 14800-733

Telefone: (16) 33354978 / (14)81176422

E_mail: grc_bioquim@hotmail.com

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

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2008 - 2010	Mestrado em Biotecnologia Universidade Estadual Paulista - Júlio de Mesquita Filho, Unesp, Instituto de Química de Araraquara. Título: Peptídeos derivados da proteína bacteriana YacG: Síntese e estudos de estrutura-função. Orientador: Profº Dr. Reinaldo Marchetto. Bolsista Capes - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
2007 - 2007	Especialista em Bioquímica Aplicada Universidade Estadual de Londrina – UEL Título: Produção de L-asparaginase por <i>Zymomonas mobilis</i> CP4, na fermentação de garapa. Orientador: João Batista Buzato

2003 - 2005

Licenciatura em Ciências – Habilitação plena em Biologia
Faculdades Integradas de Ourinhos

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

Orientador: Dalva Regina do Amaral Teixeira

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS

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. XXXIX Annual Meeting of Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2010.

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.

GARRIDO, S. S. ; DELFINO, D. B. ; GARCIA, A. ; BARBOSA, L. C. B. ; MARCHETTO, R. Molecular modeling, design and structural studies of a new class of peptide inhibitors of bacterial topoisomerases. In: 31st European Peptide Symposium, 2010, Copenhagen. Peptides 2010: San Diego: Prompt Scientific Publishing, 2010. v. 1. p. 482-483.

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. XXXIX Annual Meeting of Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2010.

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. XXXIX Annual Meeting of Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2010.

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. XXXIX Annual Meeting of Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2010.

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. 5º Congresso Extensão Universitária da UNESP, 2009.

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, 2009, Araraquara. WorkShop IQ 2009, 2009.

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. XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2009.

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, 2009, Araraquara. Workshop IQ 2009, 2009.

ARTIGOS PUBLICADOS

MARCHETTO, R. ; GARRIDO, S. S. ; DELFINO, D.B. ; GARCIA, A. ; BARBOSA, L. C. B. . 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. Bioinformation, 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. Bioinformation, v. 5(2), p. 43-45, 2010

PRÊMIOS RECEBIDOS

SBBq Award, XXXIX Annual Meeting of Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2010, Foz do Iguaçu.

IDIOMAS

1. Inglês: Básico

**A minha querida avó (em memória)
e a minha mãe, por cuidarem com muito
carinho da minha formação pessoal e intelectual.**

**A minha querida namorada Ariane,
por estar sempre ao meu lado e me
dar forças para prosseguir.**

AGRADECIMENTOS

A Deus , por sempre estar ao meu lado e me dar forças nos momentos de fraqueza;

Ao meu orientador Professor Dr. Reinaldo Marchetto, pela recepção e pela sua imensa contribuição na realização deste trabalho, sem o qual não teria conseguido. Agradeço também , pela paciência, disposição e por esse período de convivência.

Ao meu co-orientador Dr. Saulo Santesso Garrido, também pela sua contribuição, disposição e amizade adquirida ao longo deste período.

Ao professor Dr. Eduardo Maffud Cilli, por contribuir nas técnicas e conduta de laboratório, por partilhar conhecimentos adquiridos e por não medir esforços em prestar apoio sempre que necessário.

Aos companheiros de laboratório, Davi (Pardal), Luiz, Ronaldo (gandi) Sybele, Camila Caliri, Larissa, Michelly, Grazy, lentilha, Esteban, Vanessa, Paulo, Igor, Ives, Laura e Crusca, pelos bons momentos passados e pela boa convivência e pela contribuição neste trabalho.

Aos meus amigos e companheiros de república, Darbi, Gustavo, Emerson, Everton (Chapolin), Vinícius (Beraba), Roberto, Fabrício, também pelos bons momentos de descontração , boa convivência e amizade.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação, muito obrigado por tudo.

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

Aos funcionários do Instituto de Química.

À Capes pela bolsa concedida

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

ATÉ O FIM

Engenheiros do Hawaii

Não vim até aqui
Pra desistir agora
Entendo você
Se você quiser ir embora
Não vai ser a primeira vez
Nas últimas 24 horas
Mas eu não vim até aqui
Pra desistir agora
Minhas raízes estão no ar
Minha casa é qualquer lugar
Se depender de mim
Eu vou até o fim
Voando sem instrumentos
Ao sabor do vento
Se depender de mim
Eu vou até o fim
Eu não vim até aqui
Pra desistir agora
Entendo você
Se você quiser
Ir embora
Não vai ser a primeira vez
Em menos de 24 horas
A ilha não se curva
Noite adentro
Vida afora
Toda a vida
O dia inteiro
Não seria exagero
Se depender de mim
Eu vou até o fim
Cada célula
Todo fio de cabelo
Falando assim
Parece exagero
Mas se depender de mim
Eu vou até fim
Não vim até aqui pra desistir agora
Não vim até aqui pra desistir agora

RESUMO

YacG é uma pequena proteína (65 resíduos de aminoácidos) ligada ao zinco codificada pelo gene *yacG* de *Escherichia coli*. Seu papel fisiológico não está bem caracterizado, porém acredita-se que ela exerça ação inibitória sobre a atividade catalítica da DNA girase, enzima responsável por alterações no estado topológico do DNA bacteriano.

Com base nas informações da estrutura primária desta proteína, uma série constituída de oito seqüências peptídicas foram projetadas e sintetizadas pela metodologia da fase sólida, objetivando-se avaliar e melhor entender o efeito da coordenação do íon zinco no seu mecanismo de ação. As seqüências foram projetadas de maneira a resultar em uma substituição parcial ou integral dos resíduos de cisteína da seqüência nativa da YacG, por resíduos de serina, além da variação da carga efetiva da molécula, por amidação ou acetilação das extremidades C e N terminais, respectivamente.

Os peptídeos obtidos e purificados foram ensaiados quanto à estequiometria de coordenação empregando titulação com íon cobalto, bem como na capacidade inibitória frente à DNA girase, empregando eletroforese em gel de agarose. YacGAG4, inibiu a atividade de superenovelamento do DNA, catalisada pela girase, somente na ausência de íons zinco em concentrações inferiores a $120 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Os demais peptídeos não apresentaram capacidade inibitória, tanto na presença quanto na ausência de zinco. Ensaio de susceptibilidade bacteriana, empregando algumas espécies de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, confirmaram os resultados *in vitro*, com exceção das seqüências YacGAG1-AC e YacGAG2-AC que mostraram inibição no crescimento bacteriano, sem porém resultarem em atividade *in vitro*.

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que o domínio estrutural relacionado à coordenação do zinco, bem como a presença do próprio íon, não demonstram importância significativa na atividade de inibição da DNA girase. Neste caso, a atividade de inibição proposta recentemente, deve estar relacionada com qualquer outra região da molécula protéica, organizada estruturalmente quando o íon zinco encontra-se ligado ao seu sítio de ligação.

ABSTRACT

YacG is a small protein (65 amino acid residues) bounded to zinc and encoded by the *Escherichia coli* *yacG* gene. Its physiological role is not well characterized, but it is believed that YacG is an inhibitor of the catalytic activity of DNA gyrase, an enzyme responsible for changes in the topological state of bacterial DNA.

Based on information from the primary structure of this protein, a series of eight peptide sequences were designed and synthesized by solid phase methodology, aiming to evaluate and better understand the effect of zinc coordination of in their mechanism of action. The sequences were designed so as to result in a partial or full replacement of the cysteine residues of the native YacG sequence by serine residues and to change the effective charge of the molecule by amidation or acetylation of C and N terminal ends, respectively.

The obtained peptides were purified and tested by titration with cobalt ion (coordination stoichiometry), as well as by inhibitory effect against the DNA gyrase, using agarose gel electrophoresis. YacGAG4 inhibited DNA supercoiling activity catalyzed by gyrase only in the zinc ions absence at concentrations below of 120 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. The other peptides showed no inhibitory effect in both the presence and absence of zinc. Bacterial susceptibility tests, using some species of bacteria of the Enterobacteriaceae, confirmed *in vitro* results, with the exception of the sequences YacGAG1-AC and YacGAG2-AC that showed inhibition of bacterial growth, but no *in vitro* activity.

Based on these results, we conclude that the structural matters related to the coordination of zinc as well as the presence of this ion, showed no significant importance in the activity of DNA gyrase inhibition. In this case, the inhibition of activity recently proposed, should be linked to any other region of the protein molecule, structurally organized when the zinc ion is bound to its binding site.

Listas de Figuras

Figura 1	Diagramas esquemáticos das estruturas de GyrA e GyrB	22
Figura 2	Mecanismo de ação da DNA Girase	24
Figura 3	Outras reações catalisadas pela DNA girase: a) DNA <i>catenation</i> e <i>decatenation</i> ; b) DNA <i>knotting</i> e <i>unknotting</i> .	25
Figura 4	Estrutura molecular dos antimicrobianos quinolonas (A) e coumarina(B).	26
Figura 5	Diagrama de fitas representativa da estrutura da YacG.	28
Figura 6	Representação estrutural da dobra C2H2-like <i>fingers</i> .	30
Figura 7	Estrutura molecular dos domínios <i>Zinc ribbon</i> .	31
Figura 8	Representação geral da formação de uma ligação amida.	33
Figura 9	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 <i>linkers</i> (b).	34
Figura 10	Protetores usuais para função α -amina na metodologia da fase sólida.	36
Figura 11	<i>Handles</i> empregados na síntese de peptídeos-ácido em fase sólida	37
Figura 12	Protetores permanentes do grupo α -carboxílico de peptídeos-amida.	38
Figura 13	Mecanismo de formação de ligação peptídica por carbodiimidas.	39
Figura 14	Esquema da reação envolvida durante o teste de ninidrina.	40
Figura 15	Estrutura primária dos fragmentos de YacG sintetizados.	45
Figura 16	Esquema de síntese das seqüências YacGAG1, YacGAG2, YacGAG3 e YacGAG4, empregando a estratégia Fmoc/tbu.	54
Figura 17	Esquema de síntese das seqüências YacGAG1-AC, YacGAG2-AC, YacGAG3-AC e YacGAG4-AC, empregando a estratégia Fmoc/tbu.	56
Figura 18	Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo YacGAG1	57
Figura 19	Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo YacGAG2	57
Figura 20	Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo YacGAG3	58

Figura 21	Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo YacGAG4	58
Figura 22	Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo YacGAG1-AC	59
Figura 23	Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo YacGAG2-AC	59
Figura 24	Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo YacGAG3-AC	60
Figura 25	Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo YacGAG4-AC	60
Figura 26	Curva Padrão de Acetil-L-cisteína para determinação de grupos SH livres empregando o teste de Ellman's.	63
Figura 27	Espectros de absorção no UV-visível de Cobalto (II) coordenado com YacGAG1-AC com 0, 0,08, 0,25 e 0,66 eq de Co^{+2} .	65
Figura 28	Espectros de absorção no UV-visível de Cobalto (II) coordenado com YacGAG2-AC com 0, 0,08, 0,25 e 0,66 eq de Co^{+2} .	66
Figura 29	Espectros de absorção ótica de YacGAG1-AC com Co^{+2} .	68
Figura 30	Ensaio de inibição da atividade da DNA girase pelos peptídeos a 120 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.	69
Figura 31	Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de inibição da DNA girase pelos análogos peptídicos com a presença do íon zinco.	70
Figura 32	Ensaio de inibição da atividade da DNA girase pelos peptídeos a 120 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.	71
Figura 33	Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de inibição da DNA girase pelos análogos peptídicos na presença do íon zinco.	71
Figura 34	Ensaio de inibição da atividade da DNA girase pelos peptídeos a 120 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.	72
Figura 35	Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de inibição da DNA girase pelos análogos peptídicos sem a presença do íon zinco.	72
Figura 36	Ensaio de inibição da atividade da DNA girase pelos peptídeos a 120 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.	73
Figura 37	Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de inibição da DNA girase pelos análogos peptídicos sem a presença do íon zinco.	73
Figura 38	Teste de sensibilidade microbiana aos peptídeos sintetizados (120 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) na ausência de zinco.	75
Figura 39	Teste de sensibilidade microbiana aos peptídeos sintetizados (120 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) na presença de zinco.	76

Lista de Tabelas

Tabela I	composição do meio de cultura LB agar	51
Tabela II	Composição do meio de cultura LB	51
Tabela III	Protocolo sintético utilizando DIC/HOBt (estratégia Fmoc)/tBu)	53
Tabela IV	Relação das massas dos peptídeos purificados	61
Tabela V	Resultado das análises de espectrometria de massas	62
Tabela VI	Teor de grupos tióis nos fragmentos peptídicos sintetizados	63

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
Boc	-	<i>t</i> -Butiloxicarbonila
DCM	-	diclorometano
DIC	-	Diisopropilcarbodiimida
DIEA	-	N- diisopropiletilamina
DMF	-	N,N – Dimetilformamida

DMSO	-	Dimetilsulfóxido
DTNB	-	Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
DTT	-	- 1,4 Dithiothreitol
Girase	-	DNA-girase
EDT	-	1, 2-etanoditol
EDTA	-	ácido etilenodiaminotetraacético
Fmoc	-	9- Fluorenilmetiloxicarbonila
GFP	-	Proteína verde fluorescente
HOBt	-	N-Hidroxibenzotriazol
HPLC	-	cromatografia líquida de alta eficiência
LC-MS	-	cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas
MPLC	-	cromatografia líquida de média eficiência
NMP	-	N-metilpirrolidona
Pmc	-	2,2,5,7,8-pentametil-cromano-6-sulfonila
RP-HPLC	-	cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
SPFS	-	síntese de peptídeos em fase sólida
STEB	-	carregador de DNA - sacarose, tris, EDTA e azul de bromofenol
TA	-	sistema toxina-antitoxina
TBE	-	tampão para eletroforese tris/boro/EDTA
<i>t</i> Bu	-	terc-butila
TFA	-	ácido trifluoroacético
TFE	-	Trifluoroetanol
TIS	-	Triisopropilsilano

Sumário

1	INTRODUÇÃO	20
1.1.	DNA Girase	22
1.2.	A Proteína YacG	27
1.3.	<i>Zinc Fingers</i>	28
1.4.	Síntese química de peptídeos	32
2	OBJETIVOS	41
3	MATERIAIS	42
3.1	Reagentes e Solventes	42
3.2.	Material biológico	43
3.3.	Equipamentos	43
4	MÉTODOS	44
4.1.	Síntese, purificação e caracterização dos análogos peptídicos	44
4.1.1.	Síntese	44
4.1.2.	Reação de redução e prevenção de formação de pontes dissulfeto	46
4.1.3.	Cromatografia Líquida em Fase Reversa	46
4.1.4.	Análise de Aminoácidos	47
4.1.5	Espectrometria de massas (LC/ESI-MS)	48
4.2.	Determinação de grupos sulfidrilas livres nas amostras peptídicas	48
4.3.	Titulação com Co^{2+}	49
4.4.	Ensaio de competição com Zn^{2+}	50
4.5.	Ensaio de inibição da atividade da DNA girase	50
4.6.	Teste de sensibilidade microbiana	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52

5.1.	Planejamento e síntese dos fragmentos peptídicos	52
5.2.	Purificação e caracterização dos análogos peptídicos	55
5.3.	Determinação de grupos sulfidril livre	62
5.4.	Titulação dos fragmentos peptídicos com íon Cobalto	64
5.5.	Ensaio de competição entre Cobalto e Zinco	67
5.6.	Ensaio de inibição da DNA girase	68
5.7.	Ensaio de sensibilidade microbiana	74
6	CONCLUSÕES	78
	REFERÊNCIAS	80

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

podem hospedar organismos resistentes ao qual poderão ser disseminados. (HARBATH & SAMORE, 2005).

Diante de tal problema é necessário, a busca por alternativas na tentativa de diminuir a taxa de resistência, e um dos meios mais promissores é cessar o uso de antimicrobianos em pacientes que não apresentam infecção bacteriana, bem como campanhas de conscientização sobre o uso dos mesmos, além da busca por novas tecnologias de controle de infecção e desenvolvimento de novos compostos que possam atuar como novos fármacos a serem utilizados no combate a doenças infecciosas, especialmente aqueles que sejam capazes de lidar com as estratégias de adaptação dos micro-organismos (CHASTRE *et al*, 2003), (COUTURIER *et al.*, 1998, LOHNER & STAUDEGGER, 2001).

Para se desenvolver fármacos mais eficazes, é preciso a elucidação da estrutura molecular, ciclo bioquímico e mecanismo de ação destes micro-organismos. A partir destes conhecimentos torna-se mais fácil a busca de novos alvos moleculares, tais como enzimas e outros, que possam interagir com novos fármacos, a fim de cessar o crescimento e proliferação.

Peptídeos ou pequenas proteínas com atividade antimicrobiana são produzidos por plantas, animais (vertebrados e invertebrados) e microrganismos (fungos e bactérias), como uma estratégia de proteção e atualmente estão sendo utilizados como modelos para o desenho de novos fármacos com aplicações na área da saúde (TROVATTI *et al.*, 2008).

Algumas proteínas bacterianas com funções reconhecidas, incluindo GyrI (NAKANISHI *et al.*, 1998), Muri (SENGUPTA *et al.*, 2006), MccB17 (HEDDLE *et al.*, 2001) e CcdB (COUTURIER *et al.*, 1998), tem sido identificadas como sendo inibidores de DNA girase, enzima responsável pela manutenção da topologia do DNA bacteriano. Por outro lado, diversas proteínas microbianas, cujos respectivos genes já foram codificados, a exemplo da proteína YacG de *E. coli*, permanecem ainda com atribuições funcionais desconhecidas (MERLIN *et al.*, 2002).

Embora YacG não tenha uma função celular muito bem caracterizada, uma atividade inibitória sobre a DNA girase bacteriana foi recentemente atribuída a esta pequena proteína, por SENGUPTA e NAGAJARA (2008), o que motivou a execução do presente trabalho.

1.1. DNA Girase

A enzima bacteriana DNA Girase (E.C 5.99.1.3) descoberta por GELLERT e colaboradores em 1976, em *Escherichia coli*, é uma enzima da classe de Topoisomerases tipo II, as quais são essenciais para o crescimento celular e responsável pela manutenção da topologia do DNA. As topoisomerases são capazes de relaxar o superenovelamento negativo do DNA, facilitando assim os processos de replicação e tradução. 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). Capacidade esta que a torna distinta das outras topoisomerases.

Em termos moleculares DNA girase é composta por duas subunidades protéicas GyrA e GyrB (Figura 1) codificadas pelo gene *gyrA* e *gyrB* respectivamente. Essas duas subunidades quando juntas formam um heterotetrâmero A_2B_2 constituindo assim a sua forma ativa (WIGLEY, 1995; MAXWELL, 1993).

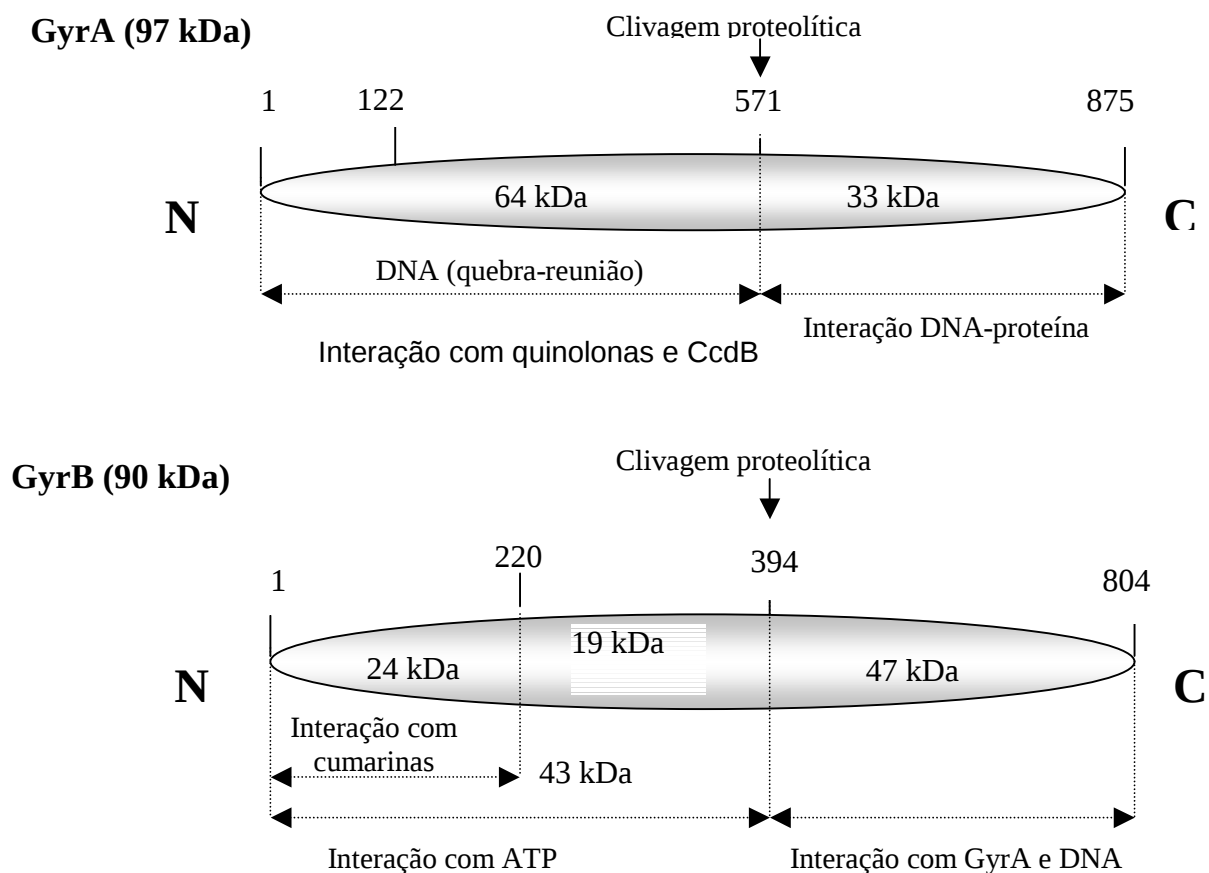


Figura 1. Diagramas esquemáticos das estruturas de GyrA e GyrB

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

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 superenrolamento, 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 bp, 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. O ATP produz então mudanças conformacionais na enzima, que sofre uma rotação. GyrB dimeriza e captura um segmento desse 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 & WANG, 1992; SMITH & MAXWELL, 1998).

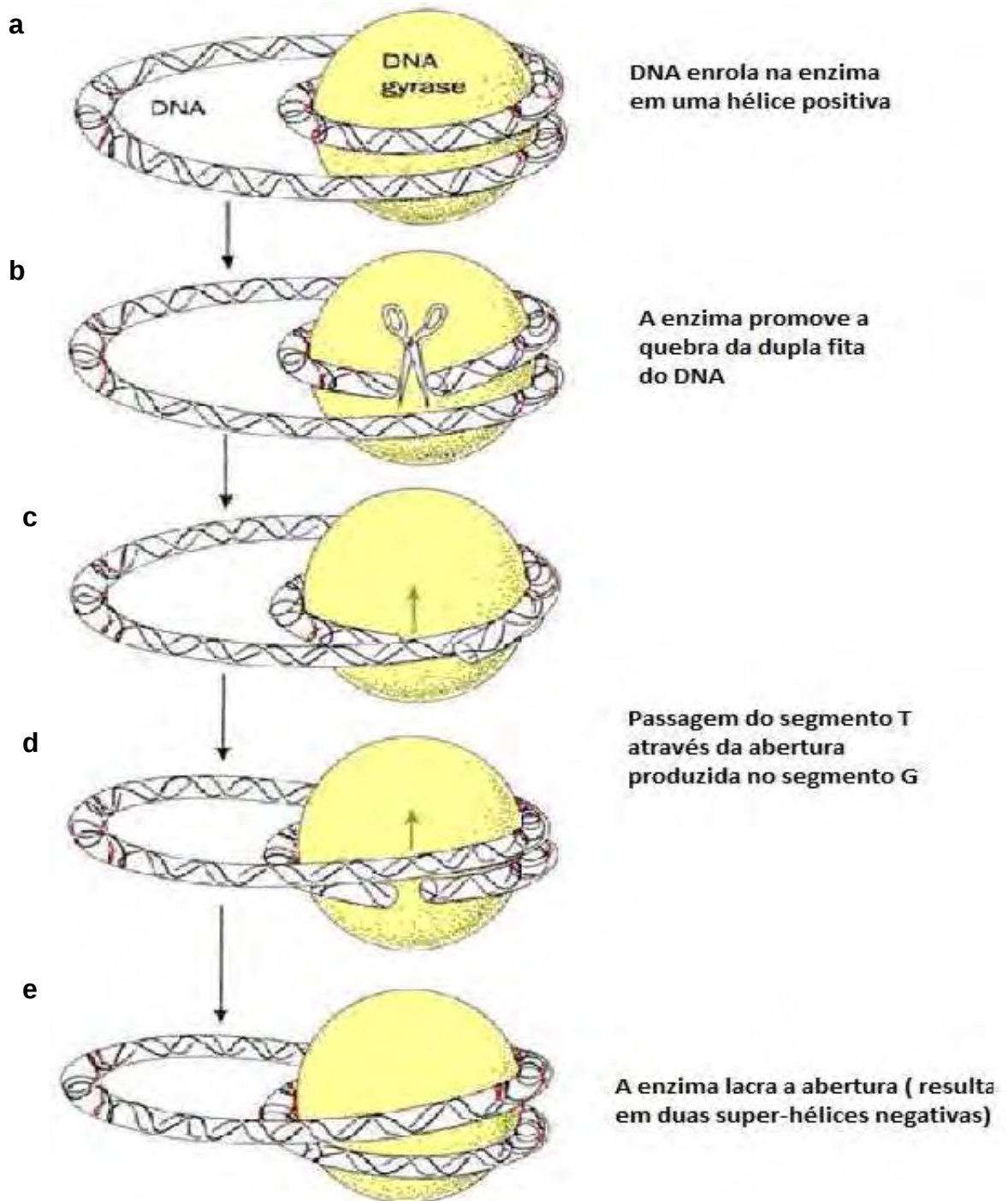


Figura 2. Mecanismo de ação da DNA Girase

(Fonte: Marchetto R., 2006)

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).

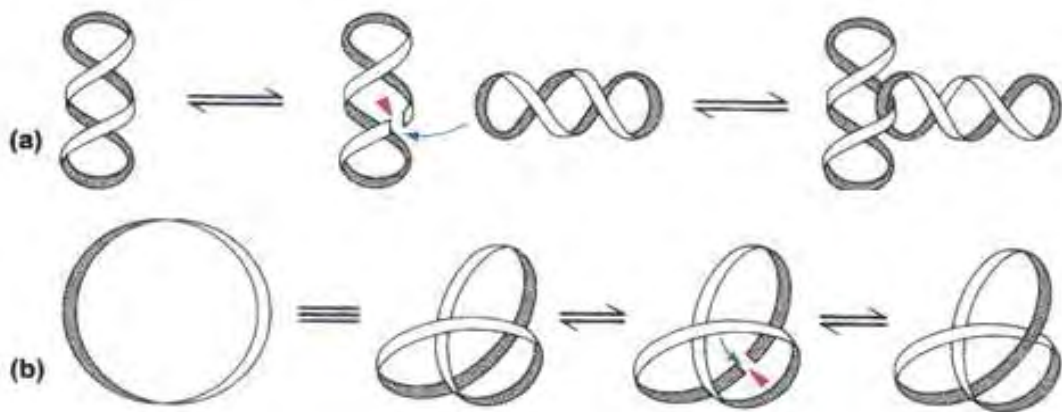


Figura 3. Outras reações catalisadas pela DNA girase: a) DNA *catenation* e *decatenation*; b) DNA *knotting* e *unknotting*.

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

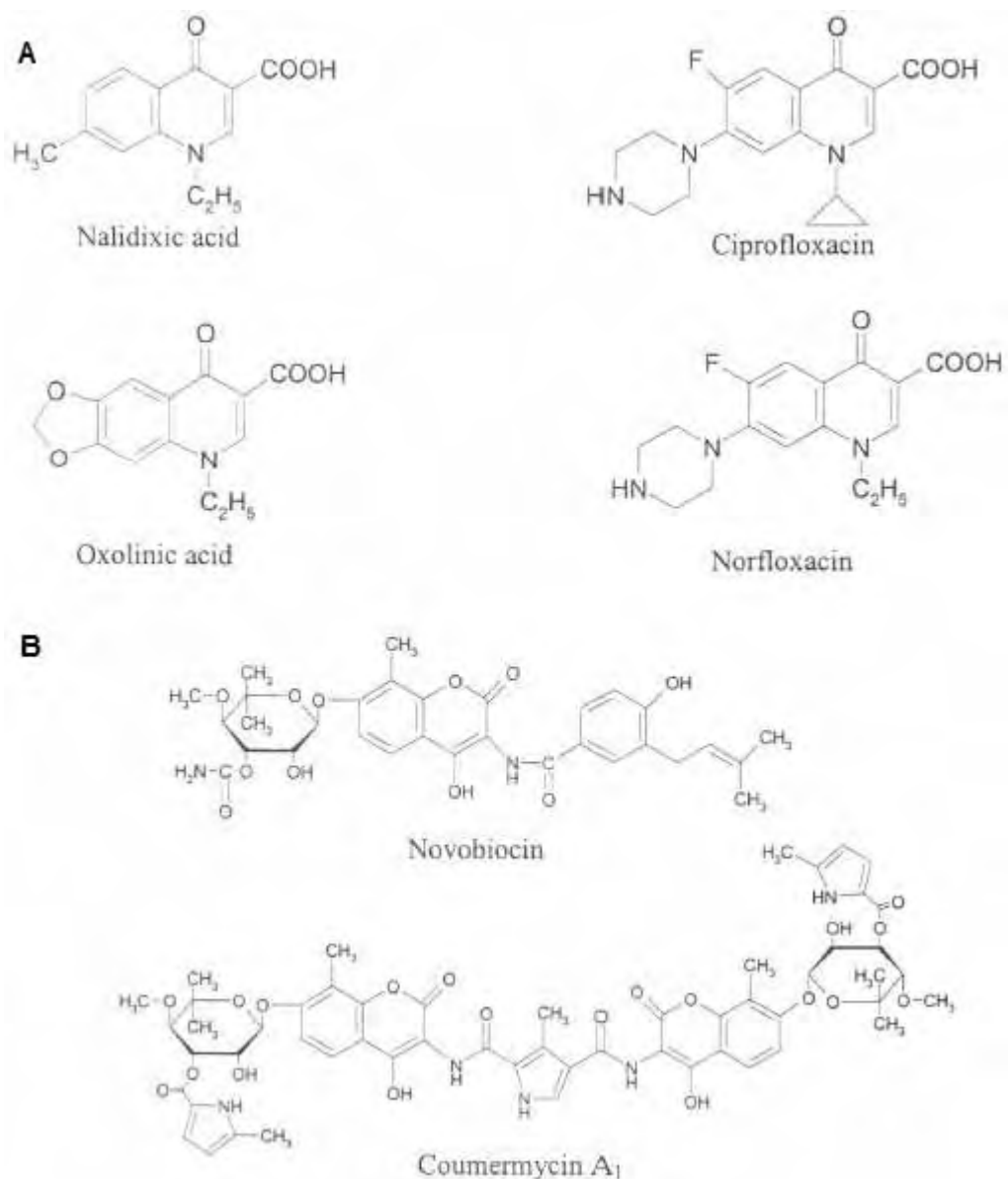


Figura 4. Estrutura molecular dos antimicrobianos quinolonas (A) e coumarina (B).

Fonte: HEDDLE *et al*, 2000

O uso de antimicrobianos quinolônicos ou coumarínicos contra infecções bacterianas tem se mostrado muito eficaz, embora nos últimos anos o número de organismos resistentes a estas classes tem emergido devido a mutações encontradas na DNA girase e Topoisomerase IV, como forma de barrar a ação destes antimicrobianos através da substituição dos aminoácidos envolvidos na interação com estas drogas (EVERETT & PIDDOCK, 1998).

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

1.2. A Proteína YacG

YacG é uma pequena proteína bacteriana constituída de 65 resíduos de aminoácidos (7,3 kDa), codificada pelo gene *yacG* de *Escherichia coli*. Foi descrito recentemente que YacG é um membro da rede interactoma da DNA girase (SENGUPTA & NAGAJARA, 2008), que inibe a ação da enzima ligando-se à subunidade GyrB, impedindo a formação do complexo enzima-DNA, prevenindo assim sua atividade. O mais importante é que ela protege a enzima contra os efeitos citotóxicos de outros inibidores da girase, como a ciprofloxacina, novobiocina, microcina B17 e CcdB. Como YacG e seus homólogos são encontrados apenas em proteobactérias, acredita-se que a ação da YacG parece ser uma estratégia de defesa desenvolvida por bactérias gram-negativas para lutar contra a segmentação da girase por agentes citotóxicos. GyrB, somente de organismos gram-negativos possui um segmento extra de 165 resíduos de aminoácidos, indispensáveis para a ligação do DNA. Experimentos bioquímicos com GyrB truncada, faltando este segmento extra revelaram a importância desse segmento para a interação com YacG (SENGUPTA, S., 2010). Topoisomerase IV de *E. coli* também é resistente à inibição mediada por YacG, provavelmente devido à ausência do segmento extra na subunidade ParE, já que o restante é muito semelhante a GyrB. Além disso, homólogos de YacG de outras proteobactérias (*Sinorhizobium meliloti* e *Haemophilus influenzae*, compartilham 35% e 63% de identidade com YacG de *E. coli*, respectivamente) também inibem a DNA girase de *E. coli*, em níveis comparáveis. YacG surge assim como um inibidor específico da DNA girase de proteobactérias. A ocorrência de ambos YacG e o segmento de girase extra somente em proteobactérias, sugerem co-evolução de parceiros que interagem neste tipo de bactéria.

Estudos estruturais, realizados pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RAMELOT *et al.*, 2002), revelaram que YacG consiste de uma única α -hélice (resíduos 30 – 37) conectada por um loop de 12 resíduos de aminoácidos com duas estruturas β (resíduos 6 – 9 e 14 – 17). Coordenado por quatro cisteínas localizadas entre as duas estruturas β , imediatamente antes (Cys-9 e Cys-12) e na parte N-terminal da α -hélice (Cys-28 e Cys-32), encontra-se um íon zinco (Figura 5).

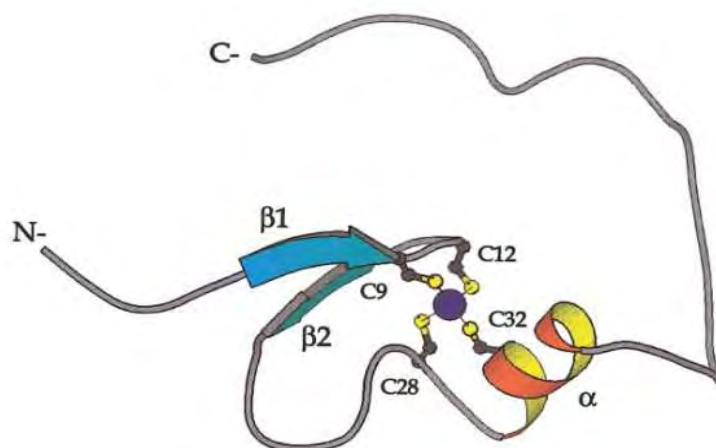


Figura 5. Diagrama de fitas representativa da estrutura da YacG.

(Fonte: RAMELOT *et al.*, 2002)

Com base nos dados obtidos a partir de sua estrutura, uma pesquisa utilizando DALI server (programa que compara estruturas de proteínas por alinhamento e distância de matrizes), não revelou qualquer similaridade estrutural da YacG com outras proteínas. Entretanto, YacG apresenta similaridade com a porção N-terminal da proteína *zinc-finger* GATA-1 (fator de transcrição), além de outras de mesma natureza, caracterizadas pela presença de domínios estruturais que coordenam íons zinco através de seus resíduos de cisteína ou de histidina (RAMELOT *et al.*, 2002).

1.3. Zinc Fingers

A estrutura de pequenos domínios proteicos é geralmente estabilizada pela formação de pontes dissulfeto ou pela interação com íons metálicos, sendo mais

comum, a interação com o zinco. A ligação deste metal aumenta a estabilidade térmica e conformacional destes pequenos domínios, mas não está diretamente envolvido na sua função. Entre tais domínios, indiscutivelmente o mais bem estudado é o denominado C2H2 *zinc finger*. Inicialmente usado para definir um domínio repetitivo de ligação do íon zinco com propriedades de ligação com o DNA no fator de transcrição IIIA em *Xenopus*, o termo “*zinc finger*” é agora usado para identificar qualquer domínio estabilizado por um íon zinco (KLUG & SCHWABE, 1995).

Estes domínios estão presentes em diversas proteínas e participa dos mais variados processos celulares, tais como replicação e reparo, transcrição, tradução, metabolismo, sinalização, proliferação celular e apoptose. Os *zinc fingers* são funcionalmente mais diversos que outros domínios maiores, pois interagem com uma diversidade de biomoléculas, e estão envolvidos nas ligações com ácidos nucleicos, interações com proteínas, ligação com lipídios e envolvidos como co-fatores em processos enzimáticos (KRISHNA *et al.*, 2003).

Os *zinc fingers* apareceram durante a evolução dos eucariotos, possivelmente como forma de regulação da homeostase intracelular de zinco. (BERG & SUN, 1996, CLARKE & BERG, 1998). Análise genômica mostra que a proporção de seqüências de *zinc fingers* codificadas aumenta com a complexidade do genoma e pode ser tão alta quanto 1% do genoma de mamíferos. (MACKAY & CROSSLEY, 1998).

Várias tentativas foram feitas para classificar os sítios de ligação de zinco nas proteínas, com base na geometria e no tipo de ligante que liga o zinco (ALBERTS *et al.*, 1998). Mais recentemente, as propriedades estruturais da vizinhança do sítio de ligação deste íon foi considerada neste tipo de classificação, de modo que cada estrutura *zinc finger* disponível, pode ser inserida em um dos oito grupos de dobras definidos de acordo com a estrutura molecular do domínio e do número de ligantes do íon zinco (KRISHNA *et al.*, 2003).

Três destes grupos, o C2H2-like *finger*, o *zinc ribbon* e o *Treble clef finger*, compreendem a maioria dos *zinc fingers*.

C2H2-like finger

Os domínios deste grupo são compostos de um β -hairpin seguido por uma α -hélice que formam unidades $\beta\beta\alpha$ de giro à esquerda. Dois ligantes de zinco localizados no final da β -hairpin e outros dois na região C-terminal da α -hélice contribui para formar

uma junção de zinco (Figura 6). Este grupo constitui-se de duas famílias: *C2H2 fingers* e *domínios IAP* (KRISHNA *et al.*, 2003).

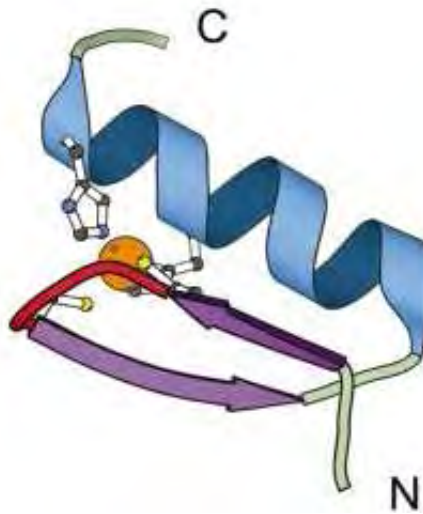


Figura 6. Representação estrutural da dobra *C2H2-like fingers*.

Fonte: KRISHNA *et al.*, 2003.

Os membros da família dos *C2H2 fingers* (*zinc fingers* clássicos) são representados pelo fator de transcrição IIIA, ao qual reconhece seqüências específicas de DNA. São tipicamente compostos por repetidas seqüências de aminoácidos, aproximadamente 28 a 30, incluindo dois resíduos conservados de cisteína e dois resíduos conservados de histidina. Outras combinações de Cys/His como resíduos quelantes de zinco são possíveis.

Os *domínios IAP* são os inibidores de apoptose. Estes contêm coordenando o íon zinco três resíduos de cisteína e um resíduo de histidina (CCHC). São encontrados regulando a morte celular programada pela inibição de caspases. O local de ligação do zinco em *IAP* é estruturalmente semelhante ao dos clássicos *C2H2 fingers* (KRISHNA *et al.*, 2003).

Zinc ribbon

Neste grupo os ligantes para o zinco são fornecidos através de duas juntas. O núcleo da estrutura é composto por duas β -hairpin formando dois sub-sítios de ligação do zinco estruturalmente semelhantes. Um desses hairpins é chamado de β -hairpin

primário (em roxo na Figura 7) e contém o sub-sítio de zinco N-terminal no clássico *zinc ribbon*, tal qual o fator de transcrição de alongamento SII (Figura 7). O outro β -hairpin (secundário – amarelo Figura 7) contém o sub-sítio de zinco C-terminal típico em *zinc ribbons* clássicos. Tipicamente, uma estrutura β forma ligações de hidrogênio com a β -hairpin secundária, de modo que a maioria dos domínios denominados *zinc ribbon* contém três folhas β antiparalelas em sua estrutura (KRISHNA *et al.*, 2003).

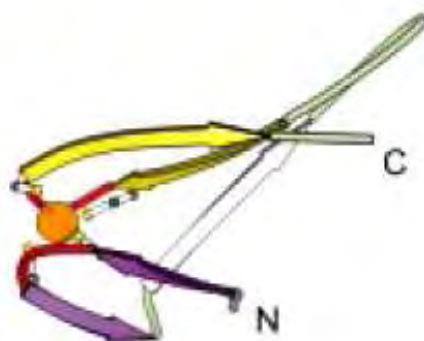


Figura 7. Estrutura molecular dos domínios *Zinc ribbon*.

Fonte: KRISHNA *et al.*, 2003.

Treble clef finger

Os membros deste grupo consistem estruturalmente de uma β -hairpin na porção N-terminal e uma α -hélice na porção C-terminal que contribuem com dois ligantes cada para a ligação do zinco. *Treble clef fingers* estão presentes em diversos grupos de proteínas que frequentemente não compartilham similaridade funcional com outras. São divididos em diversas famílias (10 no total), sendo que uma especialmente foi criada para inclusão da proteína YacG, já que dois de seus ligantes de zinco são oriundos de uma junção de estruturas β e os outros dois da primeira volta de uma pequena hélice (Figura 5).

Envolvidos em muitos processos celulares fundamentais, os diferentes grupos de *zinc-fingers* descritos interagem com outras moléculas biológicas tais como proteínas, DNA e RNA e lipídios. As interações do tipo proteína-DNA, envolvem os domínios dos grupos *C2H2-like* e *treble clef*. Estas interações são realizadas pela cadeia lateral dos resíduos de aminoácidos das α -hélices, que se ligam à molécula de DNA.

Os *zinc fingers* que interagem com RNA são encontrados entre os membros dos *treble clef finger* e *zinc ribbon*. As proteínas ribossomais contêm estes dois domínios, que interagem com a molécula de RNA. A α -hélice destes *zinc-fingers*, assim como na interação com DNA, são responsáveis pelo processo.

Interações do tipo proteína-proteína, muitas vezes requerem a dimerização dos *zinc-fingers*. Tanto as estruturas β quanto as α -hélices participam desta interação. Dentre os diversos grupos de *zinc-fingers*, os *treble clef fingers*, também são responsáveis por interagir com proteínas (KRISHNA *et al.*, 2003).

A proteína bacteriana YacG, que constitui este grupo, aparentemente exhibe este mecanismo de interação, onde o domínio *zinc finger* deve interagir com um segmento extra da subunidade GyrB da DNA girase bacteriana, dificultando a ligação desta subunidade com o DNA, inativando a atividade enzimática. Neste sentido, para comprovar esta hipótese e posteriormente somar dados que possibilitem o desenvolvimento de estruturas baseadas na molécula de YacG, com capacidade antimicrobiana e menor susceptibilidade à resistência bacteriana, fragmentos peptídicos contendo o domínio *zinc finger* da YacG, foram sintetizados quimicamente e avaliados quanto a importância na interação com DNA girase.

1.4. Síntese química de peptídeos

A síntese química de peptídeos poderia ser explicada, de maneira bastante simplificada, como a formação química e repetida de ligações amida com a finalidade de conectar funções amina e carboxílica de L- α -aminoácidos adjacentes (Figura 8). Mais precisamente é assim denominada porque utiliza um reagente químico para ativar o grupo carboxílico de um N^α -acil-aminoácido ou de um N^α -acil-fragmento peptídico (RCOOH, componente carboxílico, doador de acila ou agente acilante). Este componente ativado sofre o ataque nucleofílico do grupo α -amino de outro aminoácido ou fragmento peptídico C^α -bloqueados (H_2N-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).

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

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

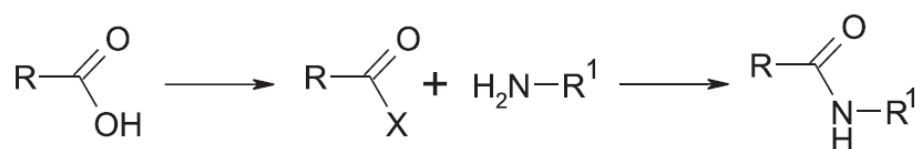
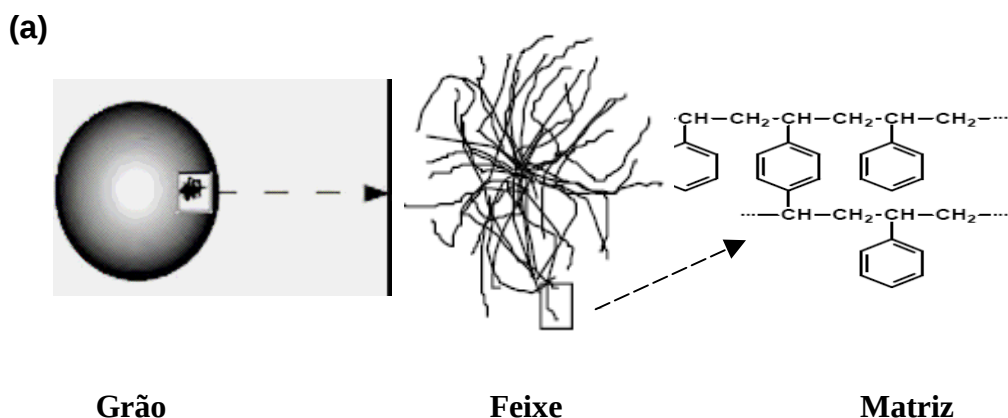


Figura 8. Representação geral da formação de uma ligação amida

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

etapas, rendimentos elevados. As vantagens adicionais são que se minimizam as perdas por manipulação e que todo processo sintético pode ser automatizado.

Genericamente, pode-se descrever um suporte sólido como sendo uma estrutura complexa, a qual é formada por polímeros retilíneos compostos por unidades monoméricas constantes, formando uma espécie de rede. Os feixes desta são interligados transversalmente através de um monômero bi-funcional (ligações cruzadas, *cross-linking*) formando, na maioria delas, uma esfera (*grão*), de tamanho padronizado (Figura 9a). Em intervalos mais ou menos regulares surgem estruturas químicas diferenciadas (ligantes, *linkers*), constituídas por moléculas contendo diferentes grupos funcionais (Figura 9b).



(b)

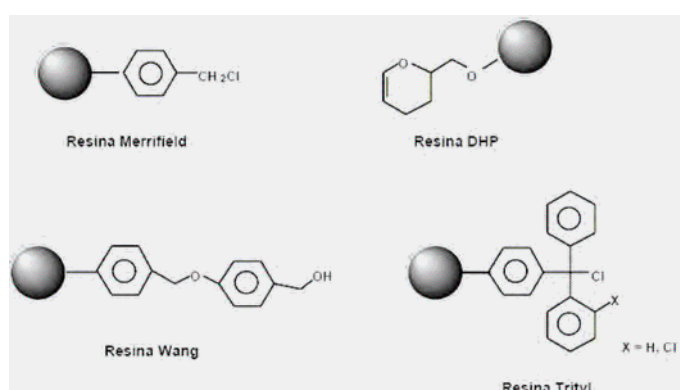


Figura 9. Visualização progressiva de uma resina, a partir de uma unidade macroscópica e as cadeias poliméricas que a compõem até a fórmula molecular de um determinado polímero (a) e principais resinas PS/DVB disponíveis comercialmente, mostrando os diversos *linkers* (b).

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

Desde os trabalhos iniciais de Merrifield, o suporte mais utilizado é um polímero microporoso de estireno (PS), que contém 1% de *p*-divinilbenzeno (DVB) como *cross-linker* (Figura 9a). Enquanto os grãos de poliestireno secos apresentam um diâmetro de aproximadamente 50 µm, na presença dos solventes ou sistemas de solventes mais comuns utilizados na síntese de peptídeos, costumam aumentar de 2 a 6 vezes o seu volume inicial (MARCHETTO *et al.*, 1992). Desta forma é possível conseguir que todos os ligantes, que estão no interior da rede polimérica fiquem expostos e, portanto acessíveis aos diferentes solventes e reagentes utilizados na síntese.

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

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

Para o processo de síntese seqüencial existem dois tipos diferentes de protetores. Por um lado, está aquele tipo que mascara o grupo funcional que irá participar da nova ligação peptídica e, portanto, deve ser eliminado a cada ciclo

sintético, denominado “protetor temporário”. Como normalmente a síntese é executada na direção $C \rightarrow N$, este tipo de protetor é aquele que normalmente protege a função amina. Por outro, estão os “protetores permanentes”, que são os que devem permanecer estáveis durante todo processo sintético e que são eliminados no final do mesmo. São os protetores das cadeias laterais reativas dos aminoácidos trifuncionais.

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

As duas principais estratégias da síntese de peptídeos em fase sólida são a Boc/Bzl e Fmoc/tBu, que se baseiam na proteção temporária do grupamento α -amínico dos aminoácidos com um dos dois protetores *terc*-Butiloxicarbonila (ANDERSON & MCGREGOR, 1957; CARPINO, 1957) e 9-Fluorenil-metiloxicarbonila (CARPINO & HAN, 1972), respectivamente, os quais se diferenciam, principalmente, quanto à labilidade ácido-base (Figura 10).

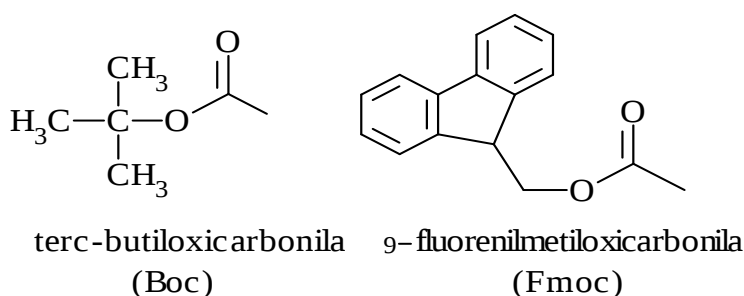


Figura 10. Protetores usuais para função α -amina na metodologia da fase sólida

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 *terc*-butila (tBu), lábeis ao ácido trifluoroacético.

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

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

Sem dúvida nenhuma, os protetores permanentes mais comuns para este tipo de peptídeos são os do tipo benzila: *p*-alquilbenzila (na PAM) (MITCHELL *et al.*, 1976) para a estratégia Boc/Bzl e *p*-alcoxibenzila (no HMP) (ALBERICIO & BARANY, 1985) para a estratégia Fmoc/tBu. Ambos levam incorporado o primeiro aminoácido protegido (Figura 11).

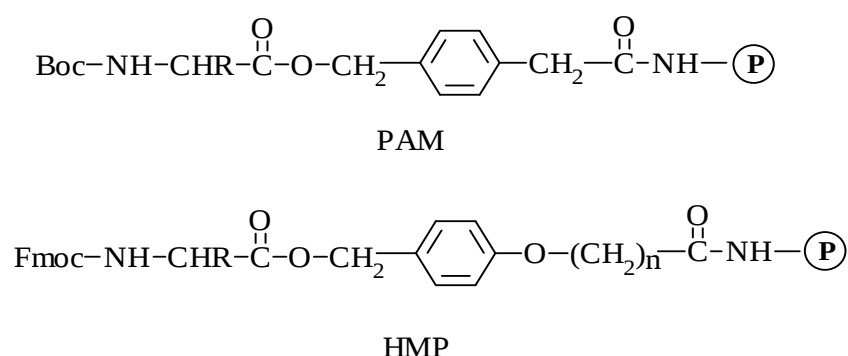


Figura 11. *Handles* empregados na síntese de peptídeos-ácido em fase sólida

Nestes denominados *handles*, a formação da ligação éster ocorre normalmente através de uma substituição nucleofílica por parte do carboxilato do aminoácido sobre o

correspondente bromobenzil derivado. Quando o aminoácido C-terminal é Cys ou His este método não funciona e recorre-se a uma esterificação com o correspondente álcool em condições muito suaves, geralmente com pyOAP (KATES *et al.*, 1996) para evitar a racemização destes dois aminoácidos.

As amidas são mais estáveis que os ésteres frente à acidólise, portanto as posições benzílicas devem estar estabilizadas por outros anéis aromáticos e/ou grupos doadores de elétrons. Assim, para a estratégia Boc/Bzl utiliza-se a resina benzidrilamina (BAR) ou *p*-metilbenzidrilamina (MBAR) (PIETTA & MARSHALL, 1970). Na estratégia Fmoc/*t*-Bu emprega-se principalmente, os *handles* ácido 4-(2'-4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacético (Rink) (RINK, 1987) e o ácido 5-(4-Fmoc-aminometil-3,5-dimetoxi)-fenoxivalérico (PAL) (ALBERICIO *et al.*, 1990), ligados geralmente a uma MBAR (Figura 12).

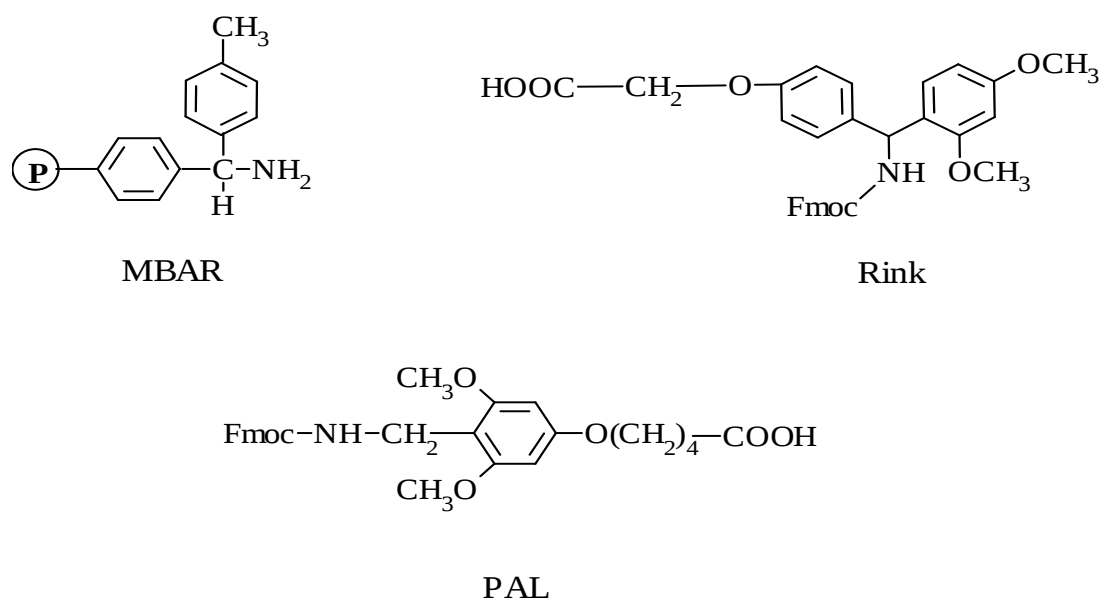


Figura 12. Protetores permanentes do grupo α -carboxílico de peptídeos-amida

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, em particular do centro

estereogênico em α do grupo carboxílico ativado. Desta forma, ele pode sofrer ataque pelo grupo amina do aminoácido que permanece ligado à resina e, assim, formar a ligação amida.

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 13).

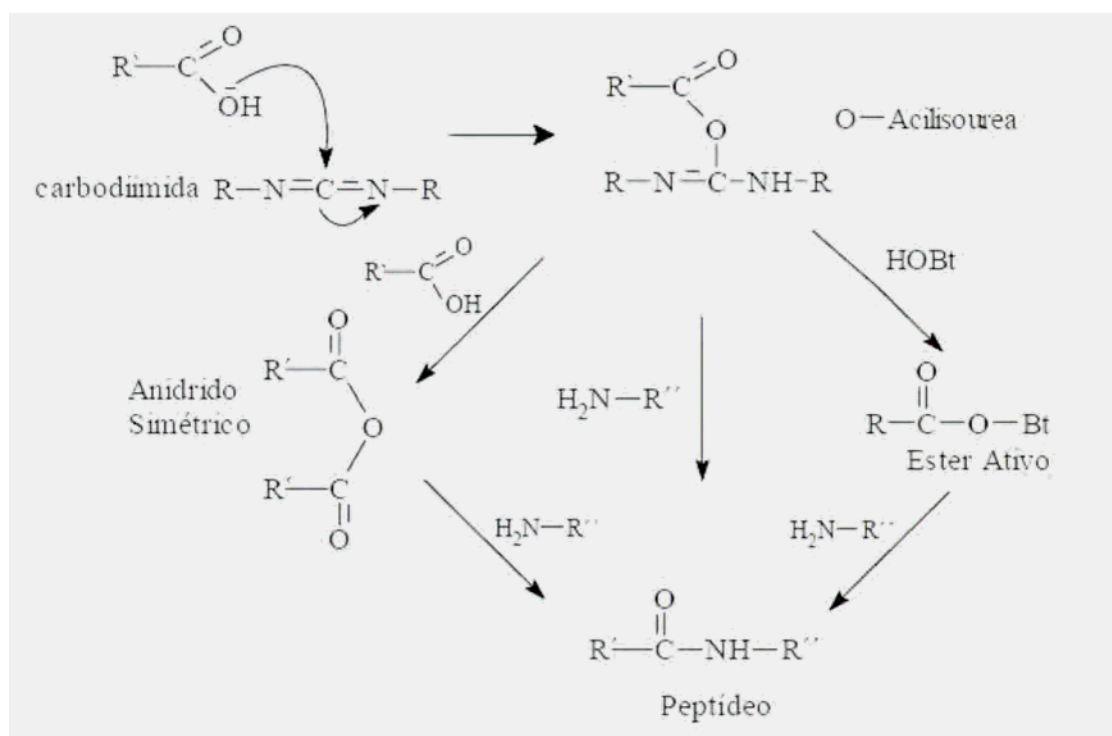


Figura 13. Mecanismo de formação de ligação peptídica por carbodiimidas

Sais de acilfosfonio também têm sido amplamente utilizados como reagentes de acoplamento (CASTRO *et al.*, 1975; COSTE *et al.*, 1990; COSTE & CAMPAGNE, 1995). Os primeiros destes reagentes descritos [hexafluorofosfatos de (benzotriazol -1-il-oxi)-tris(dimetilamino)-fosfônio (BOP) e de (benzotriazol-1-il-oxi)-tris-(pirrolidino)fosfônio

(pyBOP)] levam incorporados na molécula, um equivalente de benzotriazol, portanto a espécie acilante final é o éster de benzotriazol.

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

Outros agentes de condensação, análogos aos sais de fosfônio, contendo um átomo de carbono em substituição ao átomo de fósforo, foram desenvolvidos por DOURTOGLOU e colaboradores (1978). A estrutura proposta, baseada nos análogos de fosfônio, foi a de um sal de urônio [Hexafluorofosfatos de N-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (HBTU) e do O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (HATU)]. Também foi preparado o correspondente tetrafluorborato destes derivados de urônio (TBTU e TATU). Dentre estes últimos reagentes, o HATU tem demonstrado ser o mais eficiente em termos de rendimento e o que provoca menos racemização (CARPINO *et al.*, 1995). HATU assim como o pyOAP é muito indicado para a síntese em fase sólida, de bibliotecas peptídicas mediante o método baseado na utilização de uma mistura de aminoácidos (KATES *et al.*, 1996).

O processo de acoplamento dos aminoácidos é monitorado através 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 14).

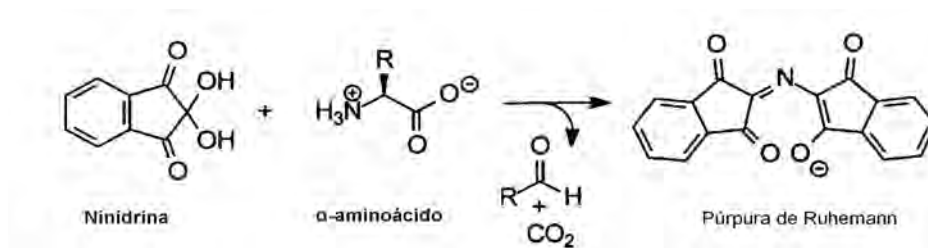


Figura 14. Esquema da reação envolvida durante o teste de ninidrina.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a importância dos resíduos de cisteína, bem como do íon zinco coordenado aos mesmos, na atividade inibitória de YacG sobre a DNA girase. De maneira específica objetivou-se:

1. Projetar e sintetizar análogos peptídicos da proteína bacteriana YacG, alterando os resíduos de Cisteína por Serina;
2. Avaliar o efeito da substituição dos resíduos de Cisteína na capacidade de coordenação do íon zinco;
3. Analisar a capacidade de interação e inibição destes novos análogos, frente à atividade da DNA girase, avaliando-se o efeito das alterações promovidas na estrutura de YacG;
4. Estudar a atividade de inibição de crescimento microbiano por estes análogos;
5. Buscar uma proposta de estrutura para novos agentes antimicrobianos;

3. MATERIAIS

3.1. Reagentes e solventes

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

- Resina (suporte polimérico): Rink amida AM Resina, com grau de substituição inicial de 0,68 mmol/g da marca Novabiochem®.
- Resina (suporte polimérico): Fmoc-Gly-Wang Resina, com grau de substituição inicial de 0,55 mmol/g da marca Novabiochem®.
- Aminoácidos protegidos: todos os L- α -aminoácidos utilizados neste trabalho apresentavam a extremidade amino-terminal protegida com o grupo base-lábil Fmoc e grupos t-butílicos ou derivados para a proteção das cadeias laterais dos aminoácidos trifuncionais. Esses aminoácidos foram adquiridos da Novabiochem® ou da Advanced Chem Tech®.
- Os agentes de condensação utilizados na síntese dos diferentes análogos, 1-Hidroxibenzotriazol (HOBt) e N,N'-Diisopropilcarbodiimida (DIC), foram adquiridos da Novabiochem® e Fluka®, respectivamente.
- Como reagente de desproteção do grupo Fmoc, foi utilizada uma solução 20% (v/v) de piperidina, da marca Merck®, em DMF.
- O reagente utilizado para a clivagem ácida final foi o ácido trifluoracético (TFA), adquirido da Fluka®.
- Etanoditiol (EDT) e triisopropilsilano (TIS), substâncias responsáveis pela captura de espécies responsáveis por alquilação eletrofílica e liberadas no meio reacional durante o processo de clivagem ácida, foram adquiridos da Sigma® ou da Acros®.
- 1,4 Dithiothreitol (DTT): Amershan Biosciences
- 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.
- Tris(hidroximetil)aminometano adquirido da SERVA Electrophoresis GmbH
- Ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) adquirido da Aldrich Chemistry;
- N-acetil – L-cisteína , adquirida da Sigma;

- Solução de Cobalto 1 g/mL.
- Demais reagentes e solventes como HCl, ácido acético glacial, anidrido acético, diclorometano (DCM), diisopropiletilamina (DIEA), dimetilformamida (DMF), hexafluoroisopropanol e N-metilpirrolidona (NMP) e demais sais, foram adquiridos da Merck®, Aldrich®, Mallinckrodt®, J.T.Baker® e Fluka®.

3.2. Material biológico

A enzima DNA girase, preparada a partir de linhagens superprodutoras, foram adquiridas comercialmente da *Inspiralis Ltda*, e foi fornecida com os seguintes tampões:

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

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

As cepas bacterianas utilizadas nos ensaios de susceptibilidade antimicrobiana foram:

Bactérias gram-positivas: *Streptococcus agalactiae*

Bactérias gram-negativas: *Escherichia coli* K-100, *Escherichia coli* O:157H, , *Salmonella* sp e *Klebsiella pneumoniae*.

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.
- Eletroforese: sistema de eletroforese GNA 100, equipado com fonte Pharmacia Biotech modelo EPS 301.
- Espectrofotômetro de microplacas EpochTM da Biotek.

4. MÉTODOS

4.1. Síntese, purificação e caracterização dos análogos peptídicos

4.1.1. Síntese

Os análogos peptídicos de YacG (Figura 15), foram sintetizados manualmente pelo método da fase sólida (STEWART & YOUNG, 1984; LLOYD-WILLIAMS *et al.*, 1997; AMBLARD *et al.*, 2005), de acordo com o protocolo padrão que emprega o grupamento base-lábil Fmoc como protetor dos α -amino grupos, e derivados t-butilicos (t-Bu) para a proteção das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos trifuncionais. A resina de partida foi uma Rink amida AM Resina, com substituição inicial 0,68 mmol/g, no caso das sequências contendo a extremidade C-terminal na forma de amida e Fmoc-Gly-Wang Resina, com grau de substituição inicial de 0,55 mmol/g, para as sequências com a extremidade C-terminal na forma de carboxilato. Diisopropilcarbodiimida e 1-hidroxibenzotriazol foram os agentes de condensação utilizados, em todos os casos. 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, inicialmente em DCM:DMF (1:1), por um período de 2 horas. A desproteção dos grupos

α -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 (condensação incompleta), o processo foi repetido com 50% da quantidade inicial dos reagentes. Ao final procedeu-se com a acetilação do grupo amino terminal, empregando 10 eq. de anidrido acético em DMF.

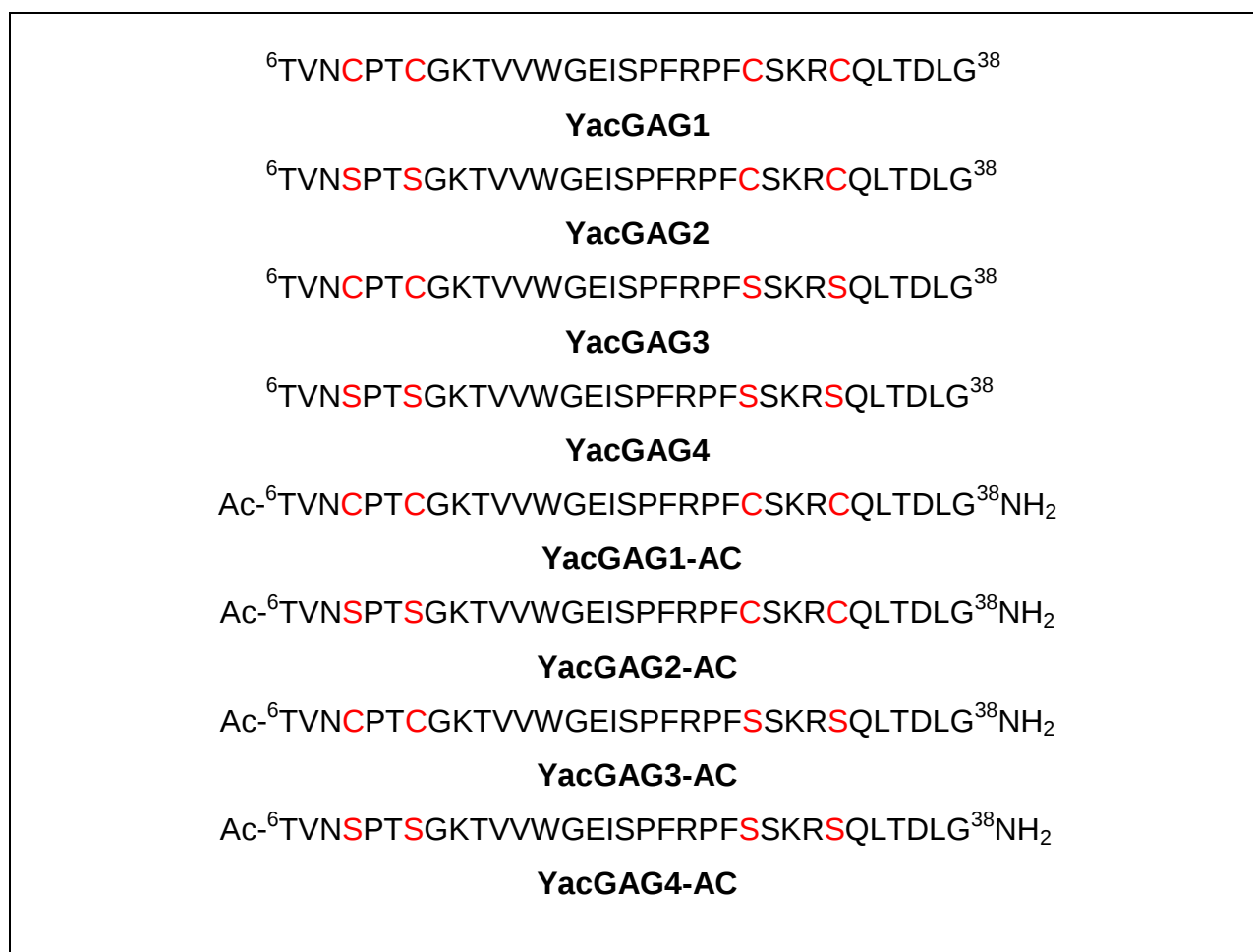


Figura 15. Estrutura primária dos fragmentos de YacG sintetizados.

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 (94,5%), água deionizada (2,5%), EDT (2,5%) e TIS (0,5%), a 25°C por 3 horas. Peptídeos, denominados brutos, foram precipitados e lavados com éter dietílico gelado e centrifugados (seis vezes). A

extração foi feita empregando-se uma solução aquosa de ácido acético 10% e em seguida os mesmos foram filtrados em placa porosa e colocados para liofilizar.

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

Depois de liofilizados, os análogos peptídicos foram então transferidos para frascos apropriados e incubados com um excesso molar de DTT (8 vezes) a 55°C por 2 horas em tampão Tris.HCl 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2. Passado o período de incubação, sob atmosfera de nitrogênio, baixou-se o pH do meio a 2,0, seguindo para um novo processo de liofilização. Este procedimento teve como objetivo quebrar e/ou evitar a formação de pontes dissulfeto que pode ocorrer inter ou intra-cadeias devido a presença de resíduos de cisteína que constituem a estrutura primária de seis dos oito fragmentos peptídicos sintetizados (Figura 15).

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

4.1.3. Cromatografia Líquida em Fase Reversa

4.1.3.1. Preparação das amostras

As amostras peptídicas foram solubilizadas em 5 mL de solvente A (Água contendo 0,045% de TFA), mantendo-se o pH em 2,0. Borbulhou-se em nitrogênio por 2 minutos sonicando-se e em seguida prosseguiu-se com o processo de purificação e análise conforme descrito abaixo:

4.1.3.2. Semi-preparativa

Todos os peptídeos foram purificados em escala semi-preparativa através de um sistema de Cromatografia Líquida de Média Eficiência (CLME), empregando as seguintes condições:

- coluna: fase reversa C₁₈, Nucleosil (250 x 25 mm); 15 µm; 300 Å;

- gradiente: convexo de 40 a 60% de componente orgânico (acetonitrila: água; 0,04% TFA);
- fluxo: 2,0 mL/minuto;
- comprimento de onda do detector: 220 nm;

4.1.3.3 Analítica

A cromatografia líquida de alta eficiência, em escala analítica, foi efetuada em um cromatógrafo Shimadzu LC-10A/C-47A. Os solventes utilizados foram todos de grau cromatográfico e a água empregada foi do tipo ultrapura.

No geral, as condições cromatográficas foram:

- coluna: fase reversa C₁₈, Kromasil (250 x 4,6 mm); 5 µm; 300 Å;
- solventes: A: Água contendo 0,045% de TFA;
B: Acetonitrila contendo 0,036% de TFA;
- gradiente: linear, de 20 a 50% de B em 15 minutos;
- fluxo: 1,0 mL/minuto;
- comprimento de onda do detector: 220 nm;

4.1.4. Análise de Aminoácidos

Os peptídeos foram previamente pesados (aproximadamente 1 mg) e hidrolisados em 1 mL de HCl 6 mol.L⁻¹ e 80 µL de Fenol 5% (v/v) em água, a 110°C por 72 horas em atmosfera de Nitrogênio, sob agitação. Após a hidrólise, o material foi concentrado a vácuo, dissolvido em tampão de diluição citrato de sódio 0,2 mol.L⁻¹, pH 2,2 e filtrado em unidade filtrante GV Millex da Millipore antes de ser injetado no aparelho.

As análises de aminoácidos foram efetuadas pelo método de funcionalização pós-coluna por orto-ftalaldeído (OPA) em analisador automático Shimadzu LC-10A/C-47A. O sistema é periodicamente calibrado com uma mistura padrão de aminoácidos, obtendo-se um valor para o tempo de eluição de cada aminoácido e o fator de conversão entre a área de cada pico e a concentração da amostra.

A relação molar dos aminoácidos foi estabelecida, considerando-se unitária a concentração do aminoácido mais próximo da média para todos os resíduos. O

conteúdo peptídico (CP) em porcentagem foi obtido relacionando-se o valor médio (em mmol) de todos os aminoácidos encontrados na análise em relação à quantidade de peptídeo hidrolisado.

4.1.5 Espectrometria de massas (LC/ESI-MS)

As análises por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC/ESI-MS) foram realizadas no Departamento de Biofísica da UNIFESP, utilizando amostras dos fragmentos peptídicos puros, dissolvidos em AcOH/H₂O 5% (v/v), na concentração de 1 mg/mL.

As condições experimentais utilizadas foram:

- Coluna: Waters Nova-Pak C₁₈ (150 x 2,1 mm), 60 Å, 3,5 µm;
- solventes: A: H₂O contendo 0,1% de TFA
B: Acetonitrila 75% em água, contendo 0,1% TFA;
- gradiente: 5% a 95% de B em 20 minutos;
- fluxo: 0,4 mL/minuto;
- comprimento de onda: 190-300nm;

4.2. Determinação de grupos sulfidrilas livres nas amostras peptídicas.

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

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

Para determinação dos grupos sulfidrilas livre foi construída uma curva de calibração empregando N-acetil-L-cisteína em tampão Tris.HCl 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2, partindo-se de uma concentração de 10 µmol.L⁻¹ até 50 µmol.L⁻¹.

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

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

Para os ensaios de cada uma das amostras peptídicas empregou-se o mesmo procedimento, utilizando 10 µL de uma solução contendo um dos peptídeos, de modo que a concentração final resultasse em 3,5 µmol.L⁻¹.

4.3. Titulação com Co²⁺

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

A titulação foi realizada adicionando-se alíquotas de uma solução de cloreto de cobalto 1 g/L (concentração final entre 2,5 e 50 µmol.L⁻¹) em uma solução contendo um dos fragmentos peptídicos (30 µmol.L⁻¹) até se observar a mudança no espectro e atingir a estequiometria desejada.

As amostras peptídicas foram preparadas em tampão Tris.HCl 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2. Destas amostras, foi retirada uma alíquota de 137 µL e diluída a 1,5 mL com o mesmo tampão de preparo, para se obter uma concentração final de 30 µmol.L⁻¹ para assim realizar a titulação com o íon cobalto.

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

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

4.4. Ensaios de competição com Zn^{2+} .

O ensaio de competição com íons zinco iniciou-se logo após o término da titulação com íons cobalto, adicionando alíquotas de uma solução de ZnCl_2 de concentração proporcionalmente equivalente à de Co^{+2} , na mesma solução recém titulada com este íon. Os espectros foram traçados nas mesmas condições citadas acima, até serem observadas mudanças no espectro em relação aqueles obtidos com a titulação do íon cobalto.

4.5. Ensaio da 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 com 0,5 μg de plasmídeo pBR322 relaxado em um volume de reação de 30 μL , a 37°C por 1 hora em tampão de ensaio. A reação foi interrompida pela adição de 3 μL de uma solução de SDS 2% e posterior incubação por 2 minutos a 65°C; logo após foram acionados 15 μL de STEB (20% sacarose, 0,05 mmol.L^{-1} Tris $\cdot$ HCl [pH 7.5], 0.05 M EDTA, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ azul de bromofenol) e 60 μL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e centrifugado. Em seguida as amostras foram submetidas à análise por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris 89 mmol.L^{-1} / ácido bórico 89 mmol.L^{-1} / EDTA 2 mmol.L^{-1} , pH 8,2), submetidas à tensão constante de 90V, à temperatura ambiente, por 2 horas. Ao término da corrida, o gel foi corado durante 15 minutos com solução de brometo de etídio 1 $\mu\text{g/mL}$ em tampão de corrida (GELLERT *et al.*, 1976). O gel foi analisado em transiluminador de luz ultravioleta, o qual foi fotografado com luz ultravioleta incidente, utilizando-se câmera fotográfica Kodak Digital Screen DC40.

4.6. Teste de sensibilidade microbiana

A atividade antimicrobiana dos peptídeos sintetizados foi avaliada por um ensaio de inibição de crescimento em meio líquido, descrito por EHRET-SABATIER e colaboradores (1996). Resumidamente, 20 μL de uma solução de cada um dos

peptídeos (concentração final 120 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), foram adicionados a 180 μL de uma suspensão de bactérias em meio de cultura de Peptona Bacteriológica, PB (Tabela I), contidas em uma microplaca estéril de 96 poços. Após a adição das amostras peptídicas, a microplaca foi incubada durante 6 horas em estufa a 37 °C, sob agitação constante. 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 uma análise comparativa com amostras controles presentes na mesma placa, sendo o controle positivo composto de 180 μL de suspensão de bactérias em PB e 20 μL de água destilada estéril, e o negativo composto de 180 μL de suspensão bacteriana em PB e 20 μL de ciprofloxacina (CFX) 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ou 180 μL de meio de cultura PB (sem bactérias) e 20 μL água destilada estéril.

Tabela I. Composição do meio de cultura LB.

Triptona	1%
Extrato de levedura	0,5%
NaCl	1%
H ₂ O qsq	100 mL

As suspensões de bactérias utilizadas nos testes foram preparadas inoculando cada uma das diferentes bactérias descritas anteriormente (item 3.2), em nutriente LB Agar (Tabela II) e incubando-as *overnight* a 37°C. Após o período, as bactérias produzidas foram suspensas em NaCl 0,9% (m/v) % e a densidade ótica (D.O) corrigida através de microdiluição até atingir o padrão McFarland (que contém aproximadamente 1×10^8 UFC/mL).

Tabela II. Composição do meio de cultura LB Agar.

Triptona	1%
Extrato de levedura	0,5%
NaCl	1%
Ágar	2%
H ₂ O qsq	100 mL

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Planejamento e síntese dos fragmentos peptídicos

Considerando a importância dos denominados *zinc-fingers* em diferentes processos celulares que envolvem interação com o DNA e interação com proteínas, bem como a atividade inibitória sobre a DNA girase, recentemente proposta à YacG, diversos fragmentos peptídicos foram projetados tendo como base a estrutura primária desta pequena proteína, proposta por RAMELOT *et al.*, (2002). Segundo estes autores, YacG é constituída por uma sequência de 65 resíduos de aminoácidos, organizados em duas estruturas β (formando β -hairpin) seguidas de um loop de 12 resíduos de aminoácidos e uma α -hélice. Um íon zinco apresenta-se coordenado a quatro resíduos de cisteínas (Cys-9, Cys-12, Cys-28 e Cys-32), duas localizadas em uma volta que une as duas estruturas β , uma imediatamente antes da hélice e a última, na primeira volta da α -hélice.

Deste modo, considerou-se na síntese dos fragmentos peptídicos, a região entre os resíduos Thr-6 a Gly-38, englobando assim, os quatro resíduos de cisteína. Para avaliar a importância desses resíduos, alternativamente substituíram-se estes resíduos por dois ou mais resíduos de serina. A serina foi escolhida, por possuir estrutura molecular semelhante à cisteína, diferenciando-se apenas pela presença de um átomo de oxigênio no lugar de um de átomo de enxofre. Essa substituição supostamente deverá resultar em modificações estruturais no domínio *zinc finger*, devido a diminuição da hidrofobicidade (KYTE & DOOLITTLE, 1982) e consequente aumento na formação de ligações de hidrogênio e impedimento na ligação do íon zinco, Isso se deve à diferença de hidrofobicidade entre estes dois aminoácidos (Escala Kyte-Doolittle: 2,50 para Cys e -0,80 para Ser), cujas modificações podem vir a envolver mudanças na interação com a DNA girase, o que se objetiva avaliar neste trabalho.

Assim, empregando-se a estratégia Fmoc/tBu, sintetizou-se manualmente oito fragmentos peptídicos sendo quatro com as extremidades N e C-terminais livres e outros quatro idênticos porém com as extremidades N-terminais acetiladas e C-terminais na forma de amida (Figura 15), a fim de se mimetizar ligações peptídicas nestas posições. Empregou-se um sistema composto por uma seringa de polipropileno (capacidade de 10 mL), equipada com filtro de polietileno poroso. Partiu-se, portanto,

de 700 mg de Fmoc-Gly-Wang-Resina (0,55 mmol/g) para os quatro análogos YacGAG (fragmentos com extremidades N e C-terminais livres) e 700 mg de Rink Amida AM Resina (0,68 mmol/g) para os quatro fragmentos YacGAG-AC (fragmentos com as extremidades N-terminal acetilada e C-terminal na forma de amida), ao qual sofreram inicialmente um processo de retirada do grupo protetor Fmoc (desproteção) com uma solução de piperidina 20% em DMF, seguido de acoplamento do primeiro aminoácido da sequência a ser sintetizada. A introdução de cada um dos resíduos de aminoácidos, para cada uma das oito seqüências obtidas, seguiu o protocolo sintético descrito na Tabela III.

Tabela III. Protocolo sintético utilizando DIC/HOBt (estratégia Fmoc/tBu)

Reagente/Solvente	Operação	Tempo (min)	Número de ciclos
DMF	Lavagem	1	4
Piperidina 20% em DMF	Desproteção	1	1
Piperidina 20% em DMF	Desproteção	10	1
DCM/DMF	Lavagem	1	6
Fmoc-AA-OH (3eq) + DIC/HOBt (3eq) em DCM/DMF (1:1)	Acoplamento	60	1
DCM/DMF	Lavagem	1	6

Após a entrada dos seis primeiros aminoácidos, a peptidil-resina foi dividida em duas partes (400 mg cada), para variação do 7º resíduo (Cisteína ou Serina). Após a condensação deste resíduo, prosseguiu-se com a introdução dos 19 resíduos comuns das duas seqüências individualizadas, onde novamente estas duas partes, contendo agora 26 resíduos de aminoácidos cada, foram divididas em duas outras (600 mg cada), para o acoplamento do 27º resíduo (Cisteína ou Serina), resultando em quatro frações distintas, onde foram acoplados, a cada uma, os 6 resíduos restantes. A Figura 16 mostra o esquema de síntese dos fragmentos denominados YacG, ou seja, aqueles com as extremidades N e C-terminais livres.

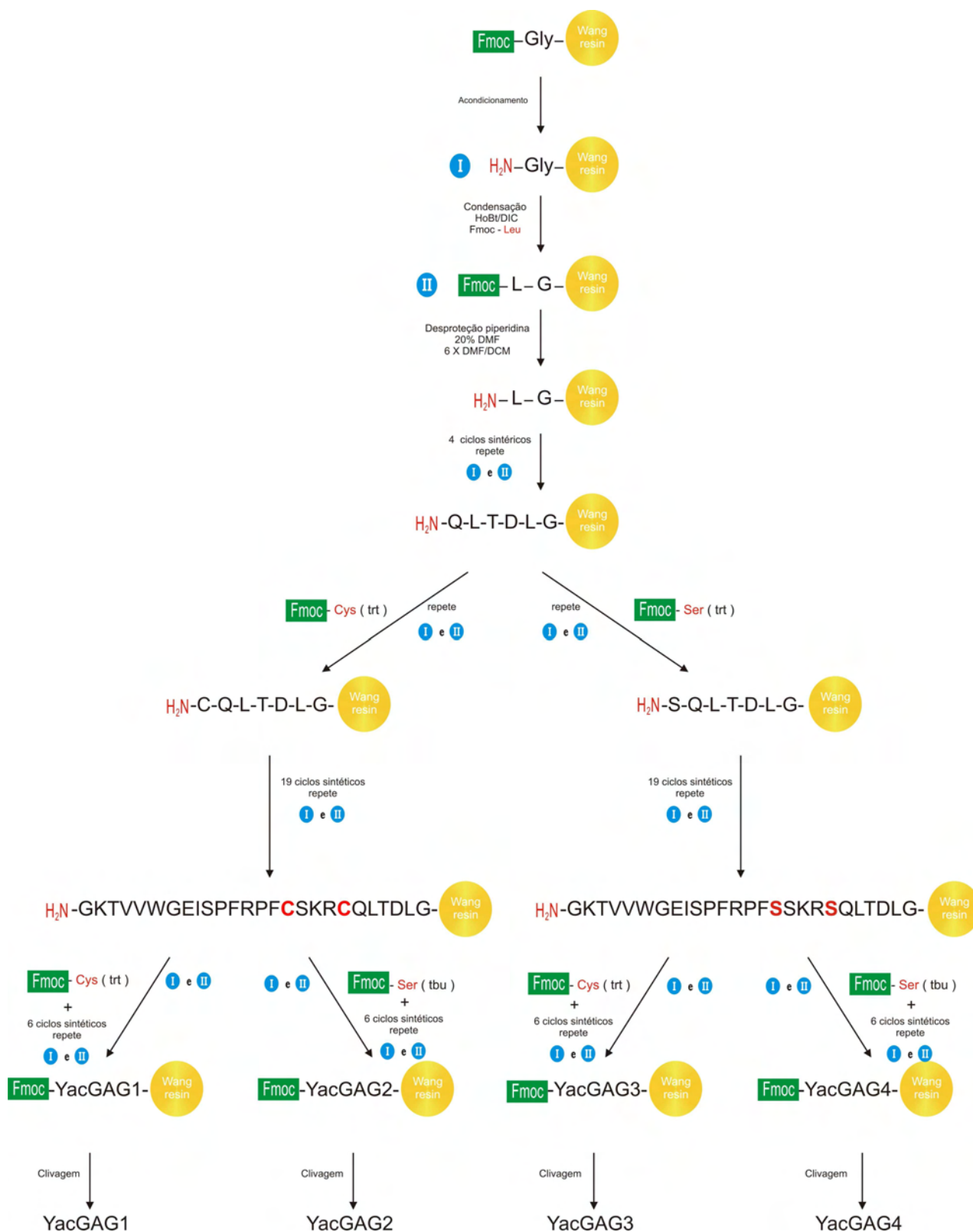


Figura 16. Esquema de síntese das seqüências YacGAG1, YacGAG2, YacGAG3 e YacGAG4, empregando a estratégia Fmoc/tbu.

Para os fragmentos YacGAG-Ac, o mesmo protocolo de síntese foi utilizado, diferenciando apenas no final da síntese, no qual empregou-se anidrido acético, para promover acetilação da extremidade N-terminal (Figura 17). Este procedimento serviu para, a exemplo da extremidade C-terminal (amida pelo uso de Rink Amida resina), mimetizar outra ligação peptídica. A importância de se ter miméticos de ligação peptídica nas regiões C e N-terminal se deve pelo fato de se evitar o efeito que suas respectivas cargas,, possam vir a exercer na atividade destes análogos peptídicos, além de se tentar simular uma estrutura mais próxima possível da estrutura protéica de origem.

Todas as reações de acoplamento (condensação dos aminoácidos) foram realizadas empregando o agente de condensação DIC na presença de HOBt com excesso molar de 3 vezes em relação à substituição inicial da resina, utilizando-se uma mistura de solventes 1:1 DMF/DCM em quantidade suficiente para solubilizar os reagentes e cobrir toda a peptidil-resina, de modo a manter uma alta concentração dos mesmos (entre 0,1 e 0,5 mol.L⁻¹), o que permite acelerar o processo. Os grupos protetores das cadeias laterais dos aminoácidos trifuncionais foram os seguintes: tBu para Asp, Glu, Thr e Ser; Trt para Cys, Asn e Gln; Pmc para Arg e Boc para Lys e Trp.

Ao final foram clivadas 200 mg de cada peptidil-resina, conforme metodologia descrita anteriormente e liofilizados, seguindo para o processo de purificação e caracterização.

5.2. Purificação e caracterização dos análogos peptídicos.

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

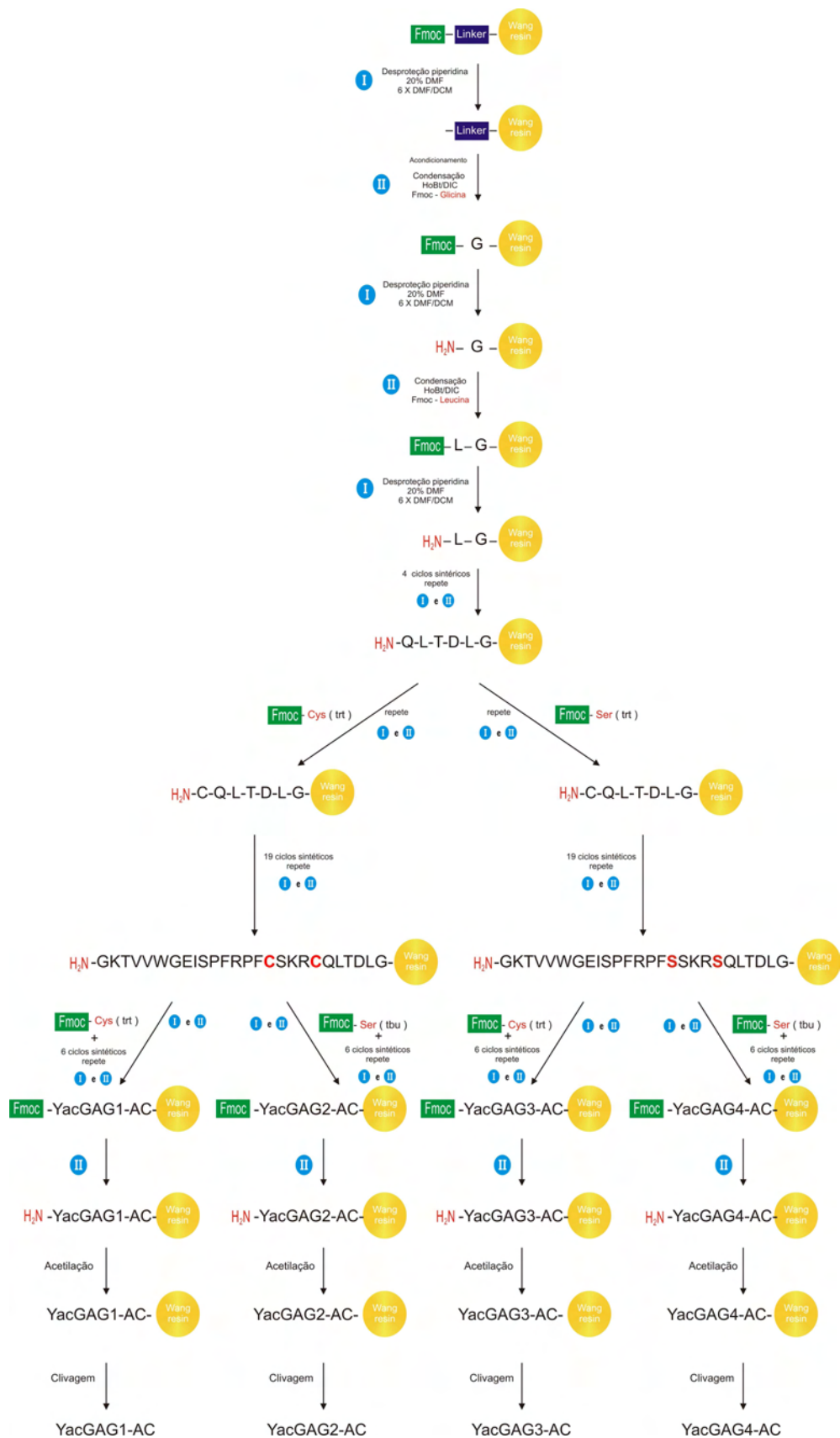


Figura 17. Esquema de síntese das seqüências YacGAG1-AC, YacGAG2-AC, YacGAG3-AC e YacGAG4-AC, empregando a estratégia Fmoc/tbu.

Os perfis cromatográficos dos peptídeos obtidos após purificação estão representados nas Figuras 18 a 25, juntamente com os respectivos cromatogramas obtidos antes da purificação, para efeitos comparativos.

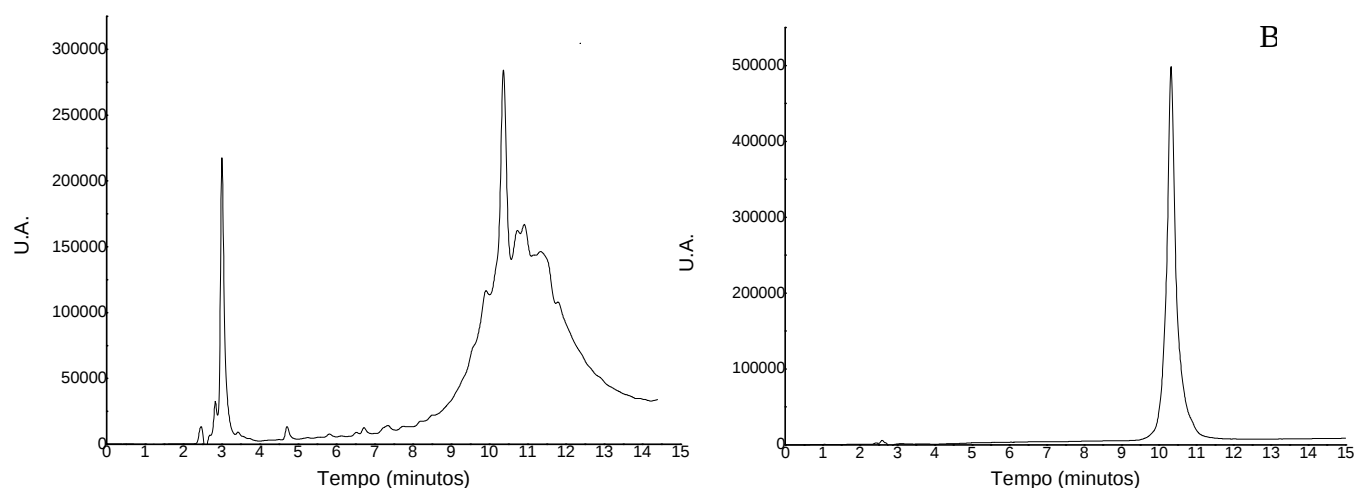


Figura 18. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo YacGAG1, antes (A) e após (B) a purificação. Coluna de fase reversa Kromasil C₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å), com um gradiente linear de 20 a 50% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 15 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.

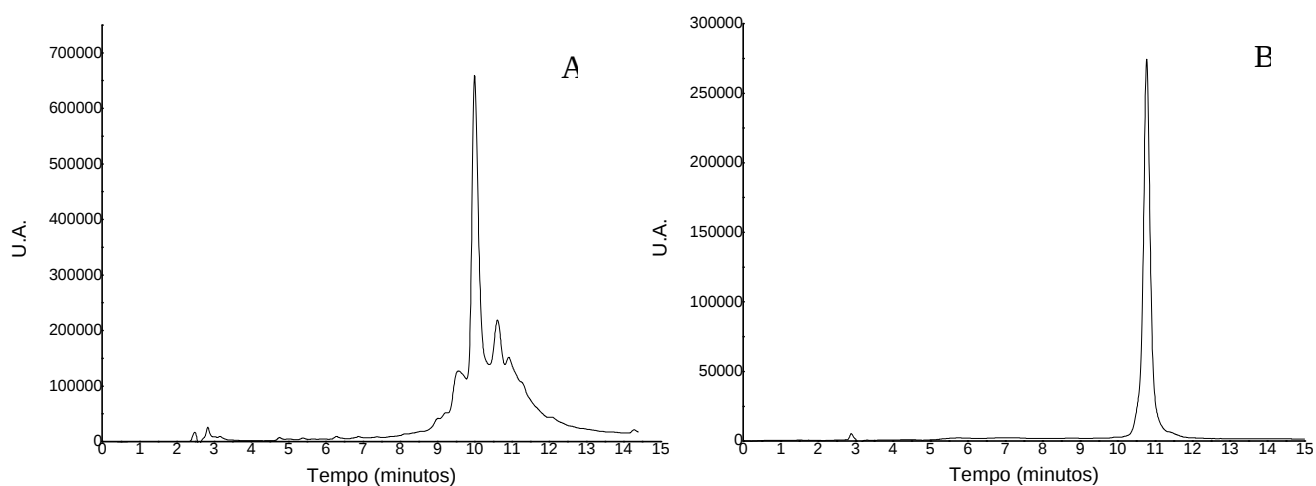


Figura 19. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo YacGAG2, antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa Kromasil C₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å), com um gradiente linear de 20 a 50% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 15 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.

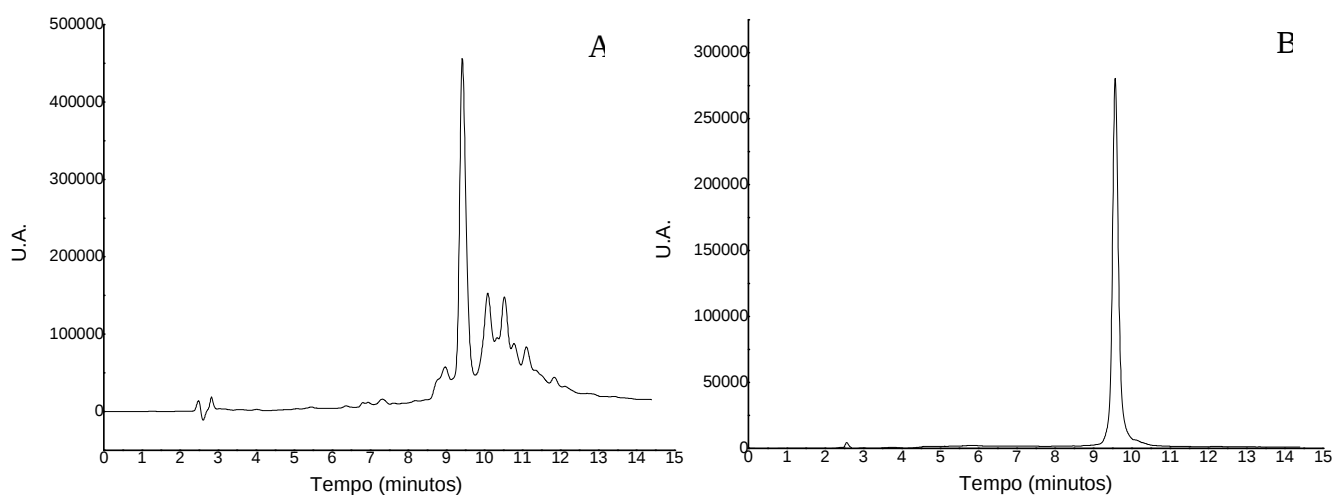


Figura 20. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo YacGAG3, antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa Kromasil C₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å), com um gradiente linear de 20 a 50% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 15 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.

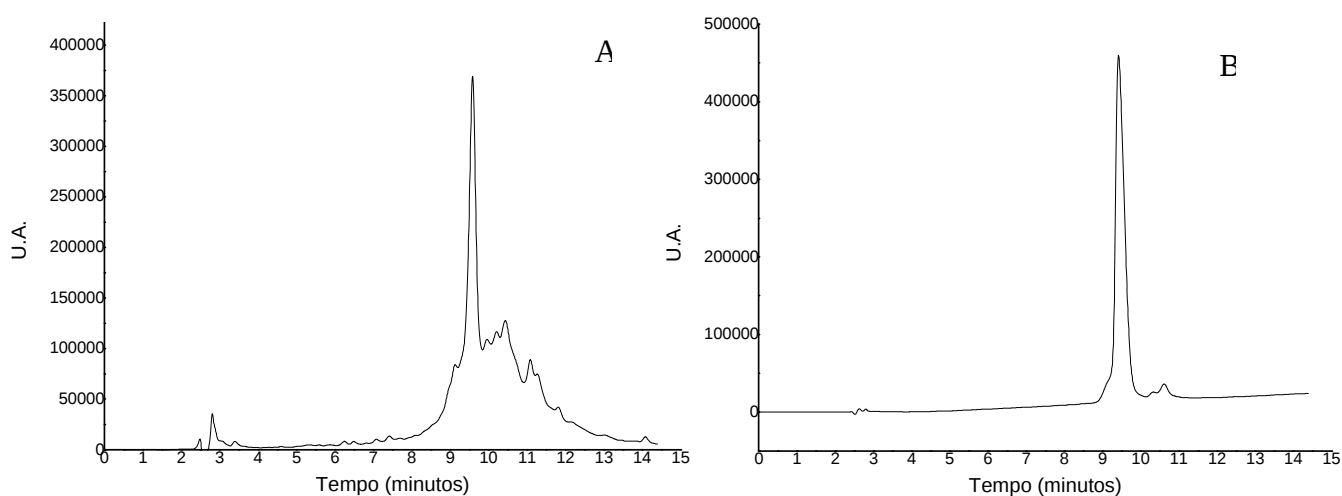


Figura 21. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo YacGAG4, antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa Kromasil C₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å), com um gradiente linear de 20 a 50% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 15 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.

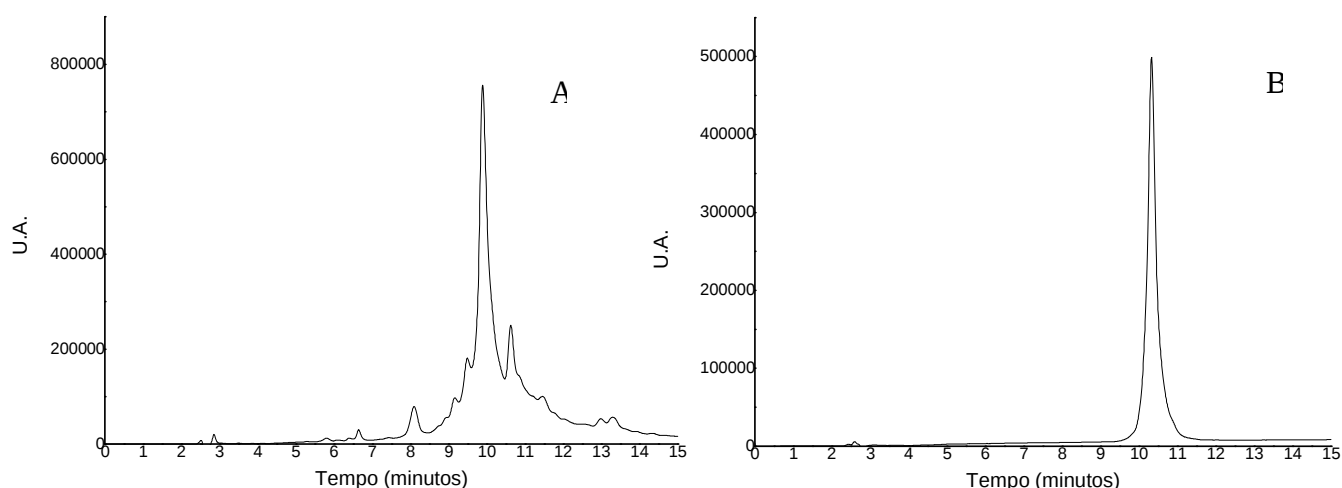


Figura 22. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo YacGAG1-AC, antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa Kromasil C₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å), com um gradiente linear de 20 a 50% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 15 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.

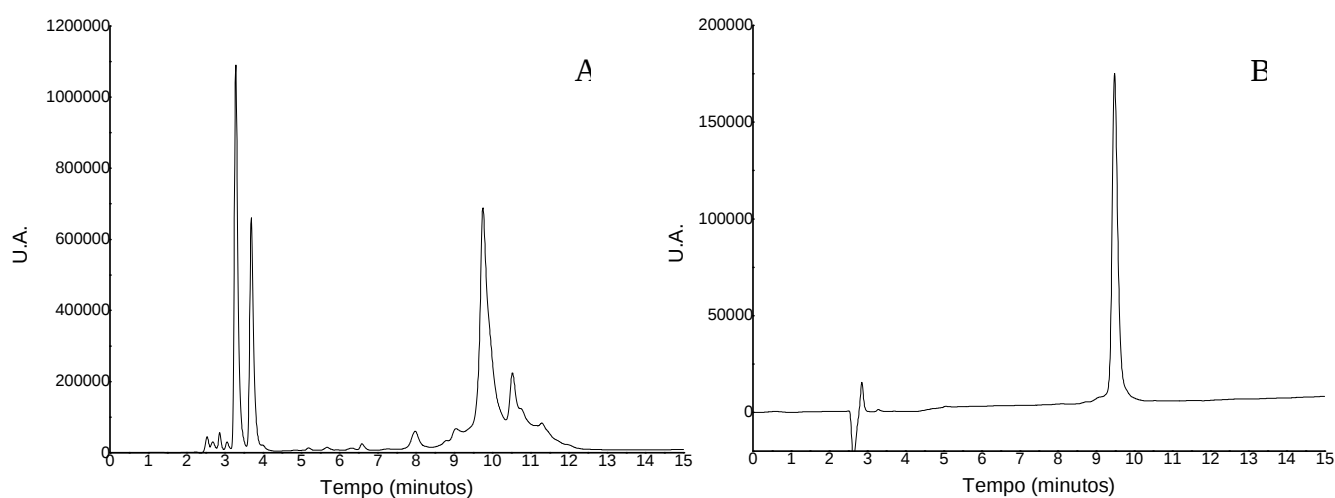


Figura 23. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo YacGAG2-AC, antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa Kromasil C₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å), com um gradiente linear de 20 a 60% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 15 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.

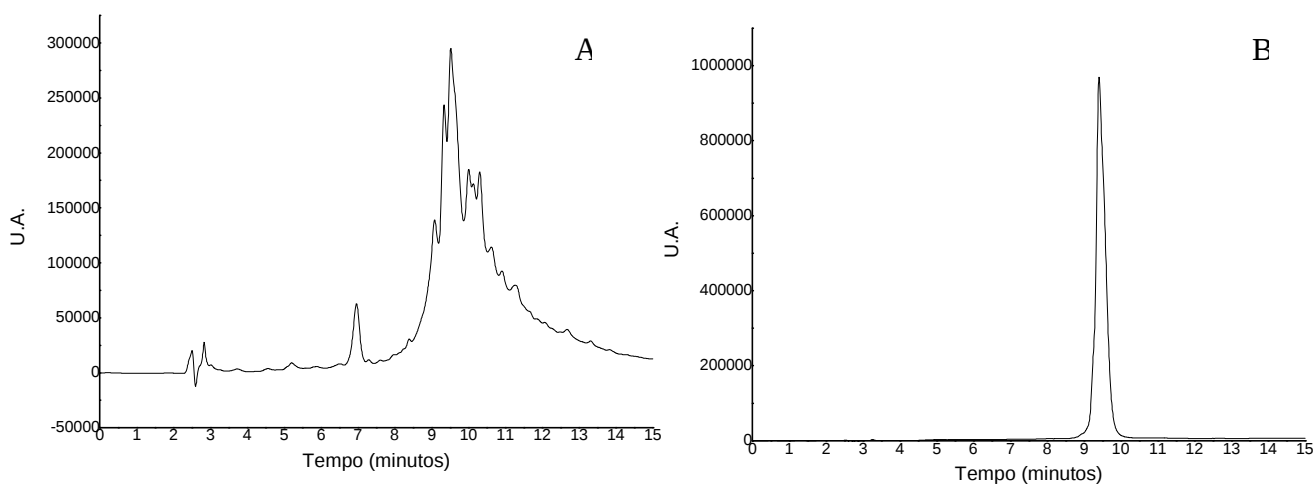


Figura 24. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo YacGAG3-AC, antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa Kromasil C₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å), com um gradiente linear de 20 a 60% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 15 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.

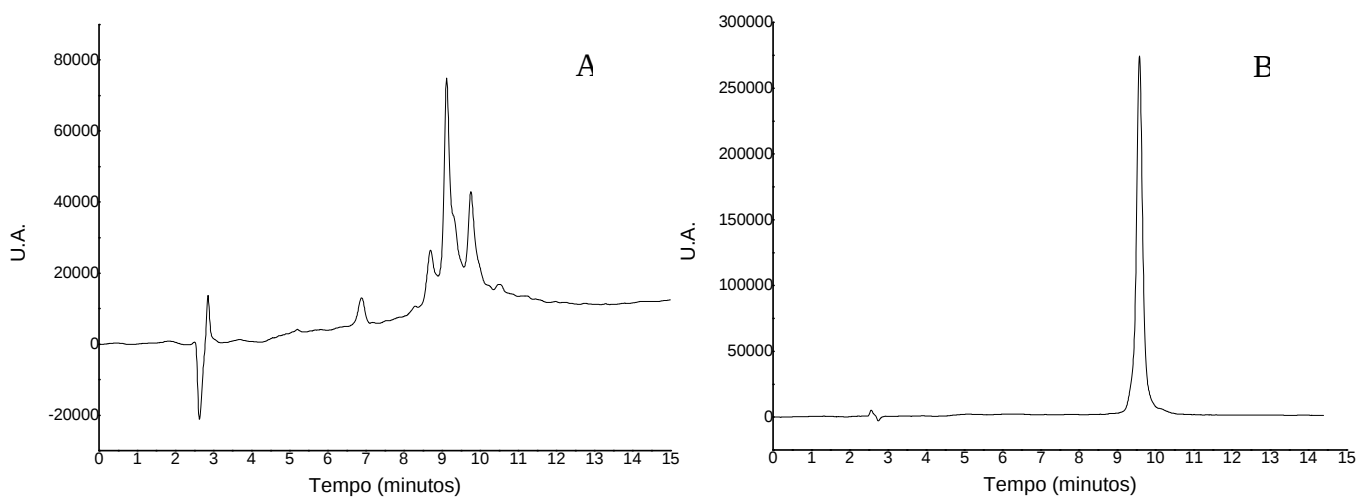


Figura 25. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo YacGAG4-AC, antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa Kromasil C₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å), com um gradiente linear de 20 a 60% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 15 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm

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

Tabela IV. Relação das massas dos peptídeos purificados

Peptídeo	Massa peptídeo bruto (mg)	Massa após purificação (mg)	Rendimento da síntese (%)	Rendimento da purificação (%)	Pureza relativa (%)
YacGAG1	105	10	31,58	30,3	99,6
YacGAG2	92	9	39,47	26,1	94,2
YacGAG3	62	6	47,10	32,8	97
YacGAG4	105	4	42,79	8,9	97,3
YacGAG1-AC	105	15	35,16	36,8	97
YacGAG2-AC	110	20	57,95	21,3	97,5
YacGAG3-AC	100	9	21,73	41,4	98,5
YacGAG4-AC	105	7	38,49	18,31	98

A caracterização dos peptídeos sintetizados foi realizada através de ensaios de espectrometria de massas e análise de aminoácidos. Os valores de massa molecular obtidos no modo electrospray positivo [ES m/z : $(M + H)^+$], estão apresentados na Tabela V. Os resultados foram coincidentes com o teórico esperado, confirmando a identidade das estruturas peptídicas sintetizadas. Os resultados obtidos nas análises de aminoácidos para determinação da proporção relativa de cada um dos aminoácidos presentes nas diferentes sequências apresentaram-se próximos aos valores teóricos esperados, excetuando-se aqueles susceptíveis à degradação nas condições de hidrólise.

O conjunto de resultados de espectrometria de massas e análise de aminoácidos permitem concluir que os procedimentos utilizados para síntese, clivagem de peptidil-resinas e metodologias de purificação desenvolvidas foram bem sucedidos, o que levaram à obtenção das seqüências desejadas.

Tabela V. Resultado das análises de espectrometria de massas

Peptídeo	Massa molecular (g/mol)*	ES m/z (g/mol)
YacGAG1	3643,31	3644
YacGAG2	3611,18	3612
YacGAG3	3611,18	3612
YacGAG4	3579,05	3580
YacGAG1-AC	3685,31	3686
YacGAG2-AC	3653,25	3654
YacGAG3-AC	3653,25	3654
YacGAG4-AC	3621,19	3622

*Calculado empregando o software POMWIN by Morten Meldal (Calsberg Laboratory - Dinamarca)

5.3. Determinação de grupos sulfidrila livre

O zinco, íon característico das denominadas proteínas *zinc-fingers* participa, no caso da YacG, juntamente com quatro resíduos de cisteínas (Cys-9, Cys-12, Cys-28 e Cys-32), de um sitio de ligação tetraédrico. Neste caso, é condição para esta disposição, que os grupos tióis, da cadeia lateral dos resíduos de cisteína estejam na sua forma reduzida.

Desta forma, para que os fragmentos peptídicos sintetizados possam simular adequadamente o ambiente de ligação, assim como na proteína nativa, é importante quantificar estes grupos em cada uma das seqüências sintetizadas..

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

A Curva padrão empregando Acetil-L-cisteína, está representada na Figura 26, cujo coeficiente de extinção molar obtido a partir da mesma foi $13.900 \text{ L.mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

A análise de grupos SH livres foi feita para as oito sequências peptídicas, sendo que os valores obtidos e representados na Tabela VI mostram que os grupos SH estão originalmente na forma reduzida, o que permite a utilização direta dos mesmos nos estudos de complexação com íons metálicos.

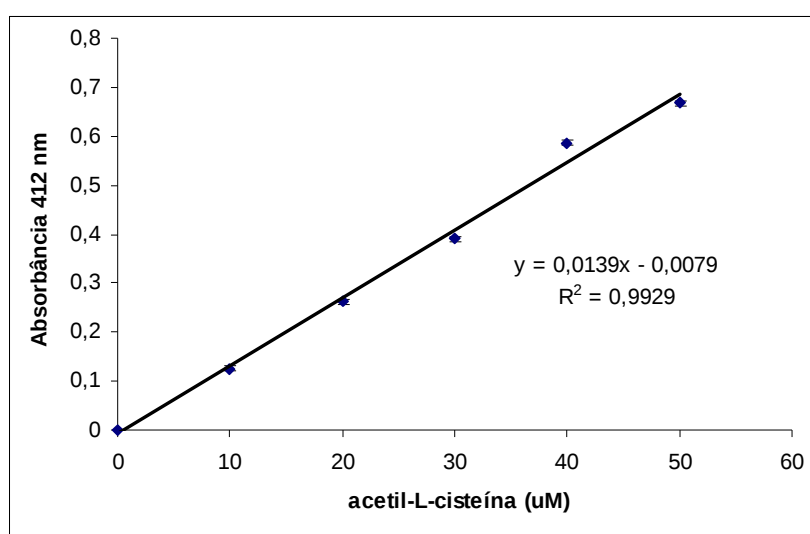


Figura 26. Curva Padrão de Acetil-L-cisteína para determinação de grupos SH livres empregando o teste de Ellman's.

Tabela VI. Teor de grupos tióis nos fragmentos peptídicos sintetizados

Peptídeo	A (412 nm)	SH livres ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
YacGAG1	0,187	13,4
YacGAG2	0,105	7,5
YacGAG3	0,100	7,2
YacGAG4	0,000	0,0
YacGAG1-AC	0,200	14,4
YacGAG2-AC	0,100	7,2
YacGAG3-AC	0,098	7,1
YacGAG4-AC	0,000	0,0

5.4. Titulação dos fragmentos peptídicos com íon Cobalto

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

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

Desta forma, mudanças observadas nos espectros no UV-visível dos peptídeos derivados de YacG, após adição do íon Cobalto (II), foram utilizadas para investigar a natureza e a geometria do complexo peptídeo-metal (a configuração eletrônica do íon zinco (II) impossibilita este tipo de análise para este metal). Como pode ser observado na Figura 27, as bandas de transferência de cargas Co(II) → S observadas a 310 e 350 nm nos espectros UV-visível, para a titulação do YacGAG1 e YacGAG1-AC com uma solução de CoCl₂, sugerem a ligação de cisteinato (FRANKEL *et al.*, 1987). No visível, bandas de alta intensidade, descritas para transições *d-d* a 640, 690 e 740 nm (por exemplo, $\epsilon_{690} = 1100 \text{ L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para YacGAG1-AC) mostram que o modo de coordenação é tetraédrico (SHI *et al.*, 1993). O número de bandas, atribuídas a três transições *d-d* direcionam para uma esfera de coordenação tipo Cys4 (HUHEEY, 1993). A coloração levemente azulada da solução final corrobora a hipótese de um sítio de coordenação tetraédrico.

Como o íon Cobalto (II) é adicionado para uma solução $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de YacGAG1-AC, as bandas de transferência de cargas $\text{Co(II)} \rightarrow \text{S}$ em 310 e 350 nm, bem como as alta intensidades das transições $d-d$ do íon Co(II) , são crescentes, até a estabilização, que depende da estequiometria do complexo formado e consequentemente do número de grupos sulfidrilas coordenada ao íon metálico (Figuras 27 e 28). Ao acompanhar o aumento de absorbância em qualquer um destes comprimentos de onda (por exemplo, a 310 nm na Figura 27 - *inserção*), as mudanças espectrais metal-induzidas saturam com quantidades aproximadamente equimolares do íon Co(II) e peptídeo, evidenciando a formação de um complexo na proporção 1:1 de YacGAG1-AC e Cobalto (II).

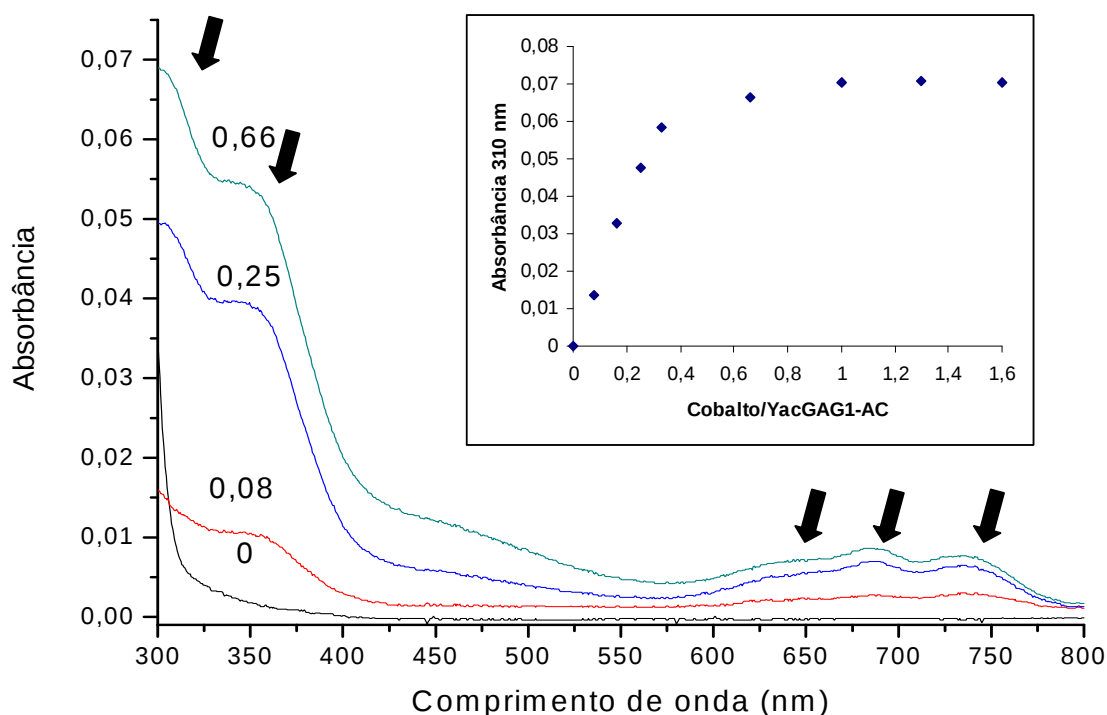


Figura 27. Espectros de absorção no UV-visível de Cobalto (II) coordenado com YacGAG1-AC com 0, 0,08, 0,25 e 0,66 eq de Co^{+2} . A inserção mostra a dependência da banda de transferência de cargas $\text{Co(II)} \rightarrow \text{S}$ a 310 nm, com o aumento da quantidade de Co^{+2} adicionado.

Por outro lado, as mudanças espectrais durante a titulação do peptídeo YacGAG2-AC com Cobalto (II) (Figura 28), resultou em saturação com quantidades

inferiores à 1 (Figura 28 – inserção), evidenciando a formação de um provável complexo na proporção 2:1 de YacGAG2-AC e Cobalto (II). Comparativamente, neste peptídeo dois ligantes de íons zinco (II) deixaram de estar disponíveis com a substituição de dois resíduos de cisteína. Neste caso, duas moléculas peptídicas foram necessárias para coordenar a cada íon de Cobalto (II), o que resultou em um padrão de bandas de absorção no UV e visível semelhante ao observado para YacGAG1-AC ou seja, formação de ligação de cisteinato em geometria tetraédrica, formando um complexo com a participação de duas moléculas peptídicas e um íon Co^{+2} .

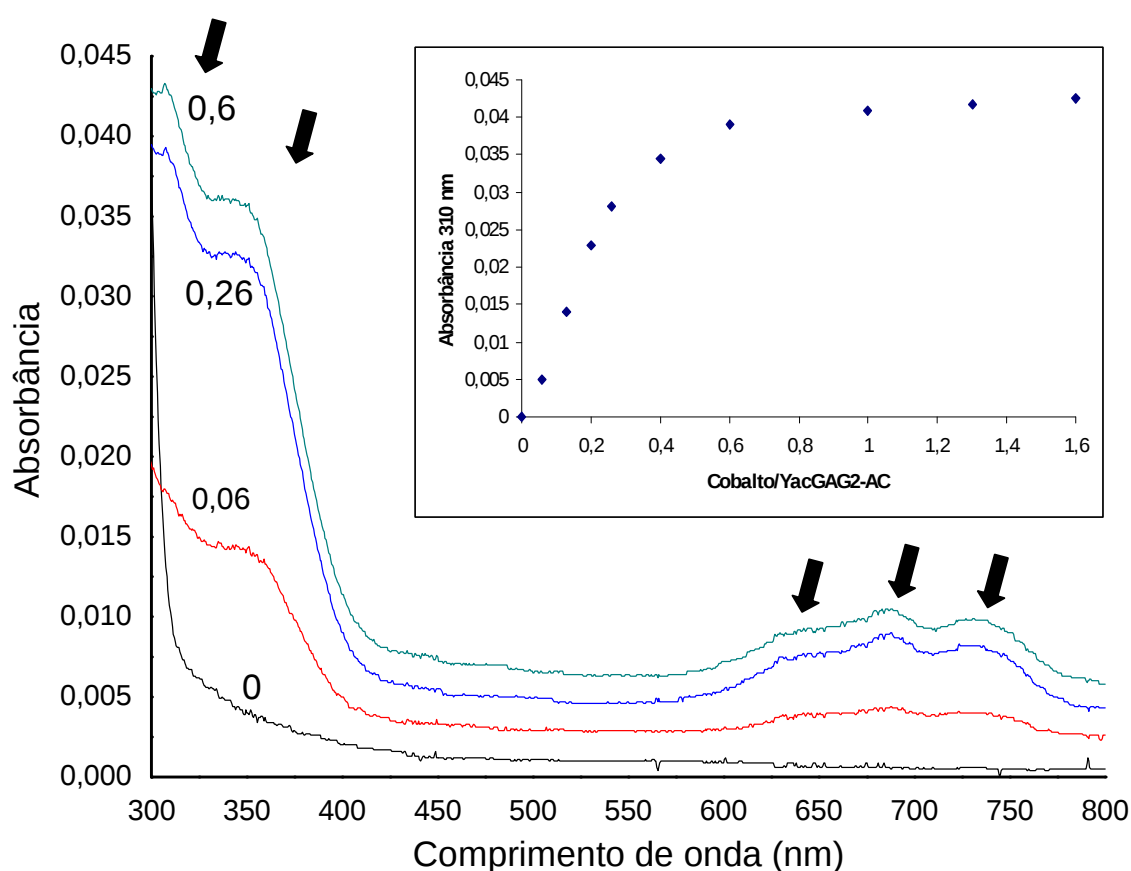


Figura 28. Espectros de absorção no UV-visível de Cobalto (II) coordenado com YacGAG2-AC com 0, 0,08, 0,25 e 0,66 eq de Co^{+2} . A inserção mostra a dependência da banda de transferência de cargas $\text{Co(II)} \rightarrow \text{S}$ a 310 nm, com o aumento da quantidade de Co^{+2} adicionado.

Resultados semelhantes foram obtidos na titulação do YacGAG3-AC com Cobalto (II), sendo que, a exemplo de YacGAG2-AC, o complexo formado foi na proporção 2:1.

Na titulação do peptídeo YacGAG4-AC com Cobalto (II) não foram observadas bandas características de transferência de cargas $\text{Co(II)} \rightarrow \text{S}$, tampouco aquelas de altas intensidades atribuídas às transições *d-d* que demonstram uma esfera de coordenação com Cys4, de acordo portanto com a ausência de grupos tióis livres, neste peptídeo, resultado da substituição de todos resíduos de cisteína por serina.

Em experimentos controle, íons Cobalto (II) foram adicionados nas mesmas proporções, a uma solução contendo YacGAG1-AC oxidado. Os resultados foram idênticos àqueles obtidos com YacGAG4-AC. A adição de um excesso molar de íons Cobalto (II), até cerca de 3 vezes, não resultou em alterações nos espectros.

No caso dos peptídeos YacGAG1, YacGAG2, YacGAG3 e YacGAG4, o comportamento espectrofotométrico durante a titulação com íons Cobalto (II) foi o mesmo, quando comparados com as respectivas formas acetiladas, não sendo evidente nenhum tipo de interferência em relação à presença de cargas (N ou C-terminal), no processo de coordenação com o metal.

5.5. Ensaio de competição entre Cobalto e Zinco

A afinidade do Zn^{+2} para com os peptídeos sintetizados foi determinada usando experimentos de competição. Estes experimentos mostraram que o íon zinco (II) desloca facilmente o íon Cobalto (II) do complexo. Como pode ser observada na Figura 29, a adição de Zn^{+2} elimina a absorção em 640, 690 e 740 nm e reduz absorção em 310 e 350 nm. Este ensaio mostrou que o Zn^{2+} liga-se ao mesmo sítio de ligação do Co^{+2} , porém mais fortemente, uma vez que a concentração da solução de ZnCl_2 é estequiométrica em relação aos peptídeos, enquanto que a quantidade de cobalto presente no meio é cerca de 3 vezes maior.

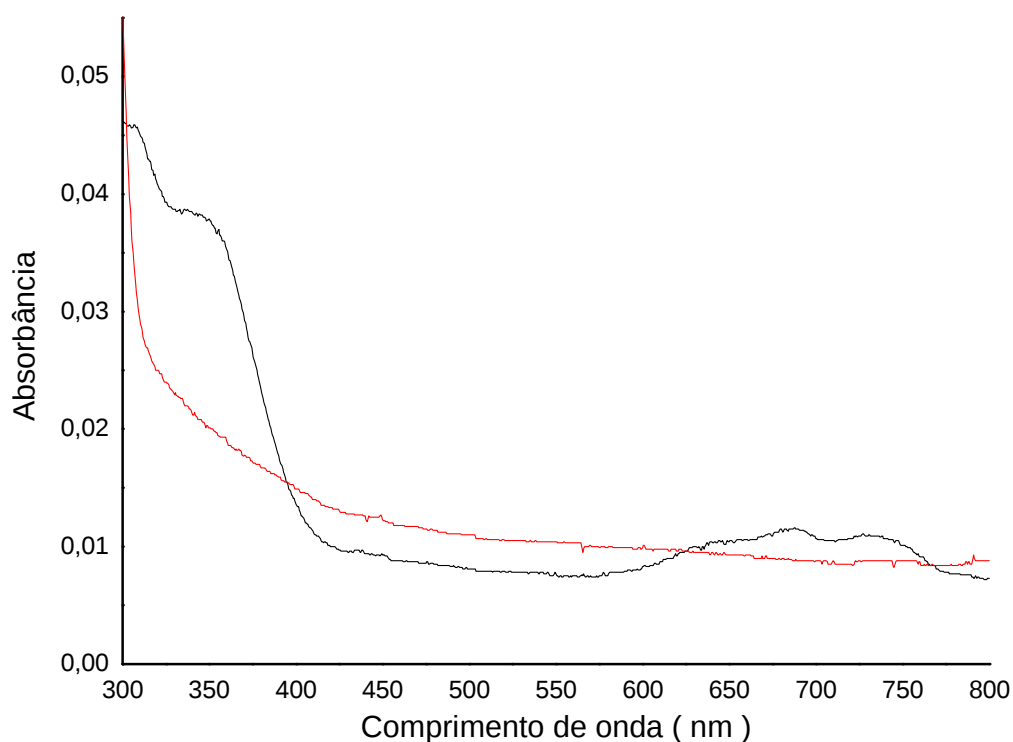


Figura 29. Espectros de absorção ótica de YacGAG1-AC com Co^{+2} . Linha preta: Espectro de YacGAG1-AC ($30 \mu\text{mol.L}^{-1}$) com CoCl_2 ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$); Adicional CoCl_2 foi adicionado (até $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) sem mudanças no espectro. Linha vermelha: Espectro após adição de ZnCl_2 ($30 \mu\text{mol.L}^{-1}$) à solução contendo YacGAG1-AC ($30 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e CoCl_2 ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$).

5.6. Ensaios de inibição da DNA girase

Topoisomerases são enzimas responsáveis pela manutenção da topologia do DNA, processo indispensável para a sobrevivência de organismos vivos. Topoisomerases atuam introduzindo superhélices negativas e positivas. Estas diferentes formas topológicas do DNA possibilita o estudo e interação destas enzimas com agentes inibidores, através do processo de migração do DNA quando submetido a um campo elétrico (GELLERT *et al.*, 1976).

Com base nestas informações, tornou-se possível analisar a interação dos fragmentos YacG com a DNA girase, através das diferentes formas do DNA

(superenovelado ou relaxado), empregando a técnica de eletroforese em gel de agarose.

Na figura 30, observa-se a interação de cada uma das sequências peptídicas YacGAG-AC complexadas com íon zinco, frente a inibição da enzima DNA girase. Com base nesta Figura, é possível concluir a respeito do efeito dos derivados de YacG complexados com íon zinco, na inibição da atividade de superenovelamento da DNA girase. Os análogos YacGAG1-AC, YacGAG2-AC e YacGAG3-AC e YacGAG4-AC, não inibem completamente a atividade da DNA girase, mas observa-se a formação de topoisômeros do DNA relaxado, indicando que a presença destes análogos tem pouca atuação na inibição da atividade desta enzima.

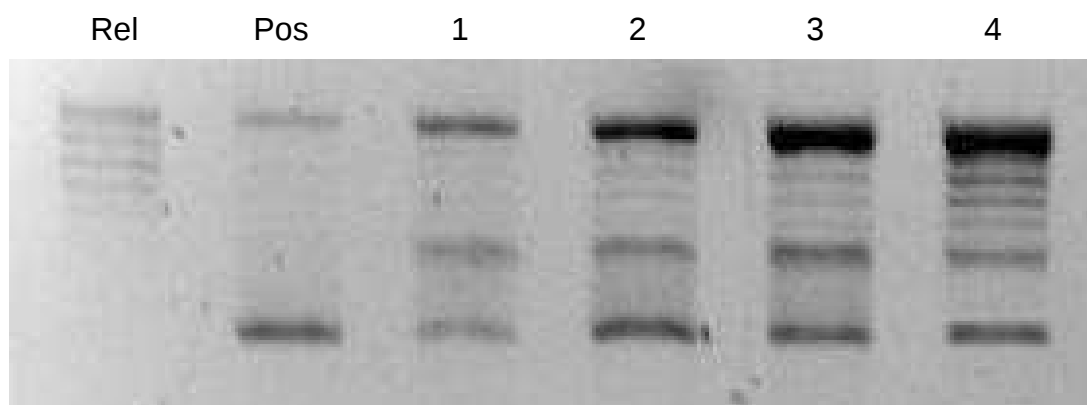


Figura 30. Ensaio de inibição da atividade da DNA girase pelos peptídeos a $120 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Volume de reação de $30 \mu\text{L}$ contendo: (Rel) plasmídeo pBr322 relaxado controle; (Pos) plasmídeo pBr322 relaxado e girase (1U) na ausência de inibidor; (linhas **1, 2, 3, 4**) plasmídeo pBR322 relaxado, girase (1U) e os peptídeos complexados com íon Zinco YacGAG1-AC, YacGAG2-AC, YacGAG3-AC e YacGAG4-AC, respectivamente. Corrida a 50 V por 2,5 horas.

Para melhor observar e quantificar a atividade de inibição da DNA girase apresentada nos ensaios de eletroforese em gel de agarose, foi feita uma densitometria do gel utilizando o software ImageJ. Trata-se de um programa de código aberto, disponível na Internet. O ImageJ faz a densitometria das bandas obtidas, contando cada microponto de tonalidade escura na foto. Deste modo, traça-se uma relação entre a densidade óptica da banda da sequência-alvo e a densidade óptica da banda controle.

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

Na Figura 31, podem ser observados os gráficos gerados a partir da densitometria óptica do gel obtido (Figura 30) através do ensaio de inibição da DNA girase na presença dos análogos complexados com íon zinco.

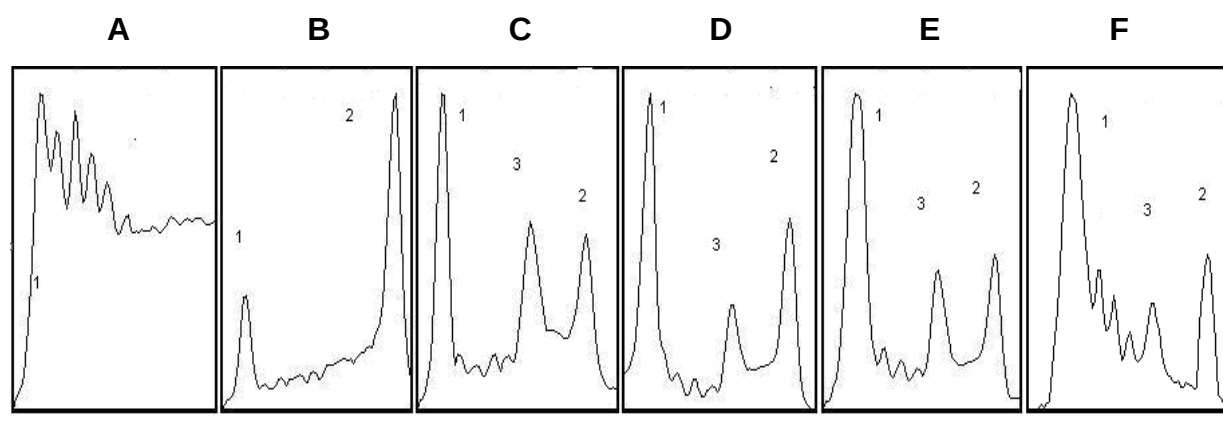


Figura 31. Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de inibição da DNA girase pelos análogos peptídicos com a presença do íon zinco. Figura 31A plasmídeo pBr322 relaxado; Figura 31B, plasmídeo pBr322 relaxado + DNA girase 1 (U) na ausência do inibidor; Figuras 31C, D, E e F, pBr322 relaxado + DNA girase 1 (U) na presença dos peptídeos YacGAG1-AC, YacGAG2-AC, YacGAG3-AC e YacGAG4-AC respectivamente.

Os dados apresentados na análise de densidade óptica mostram os picos referentes às diferentes bandas apresentadas no gel de eletroforese. Na Figura 31A pode-se observar a presença do pico da banda do DNA relaxado (1) e os picos referentes aos demais topoisômeros. Na Figura 31B, observa-se a diminuição do pico da banda relaxada (1) e o aparecimento do pico da banda superenovelada (2), resultante da ação da DNA girase. As Figuras 31C, D, E e F, mostram a atividade de inibição dos análogos peptídicos YacGAG1-AC, YacGAG2-AC e YacGAG3-AC e YacGAG4-AC, frente à atividade da DNA girase, respectivamente. É possível observar que o pico da banda do DNA relaxado (1) é mais intenso, em todos os casos, enquanto a banda do DNA superenovelado (2) diminui em intensidade, além do aparecimento de um pico referente a um dos topoisômeros do DNA relaxado (3), deixando evidente que os análogos peptídicos exibem atividade inibitória na DNA girase, porém não superior a 50%.

Em relação aos fragmentos peptídicos não acetilados, na Figura 32, é possível observar a atividade dos fragmentos YacGAG1, YacGAG2, YacGAG3 e YacGAG4

complexados com íon zinco, frente a inibição da DNA girase. Os fragmentos não possuem atividade de inibição na presença do íon zinco, exceto YacGAG4, ao qual não faz nenhum tipo de ligação com este íon.

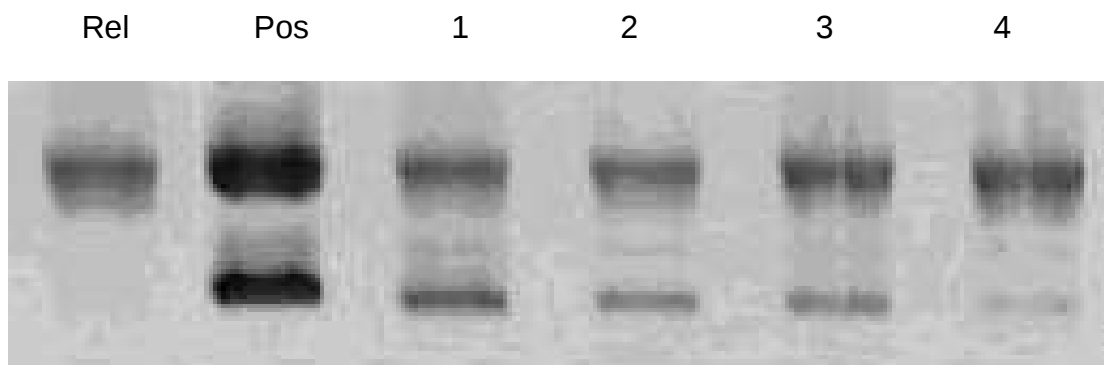


Figura 32. Ensaio de inibição da atividade da DNA girase pelos peptídeos a $120 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Volume de reação de $30 \mu\text{L}$ contendo: (Rel) plasmídeo pBr322 relaxado controle; (Pos) plasmídeo pBr322 relaxado e girase (1U) na ausência de inibidor; (linhas 1, 2, 3, 4) plasmídeo pBr322 relaxado, girase (1U) e os peptídeos complexados com íon Zinco YacGAG1, YacGAG2, YacGAG3 e YacGAG4, respectivamente. Corrida a 50 V por 2,5 horas.

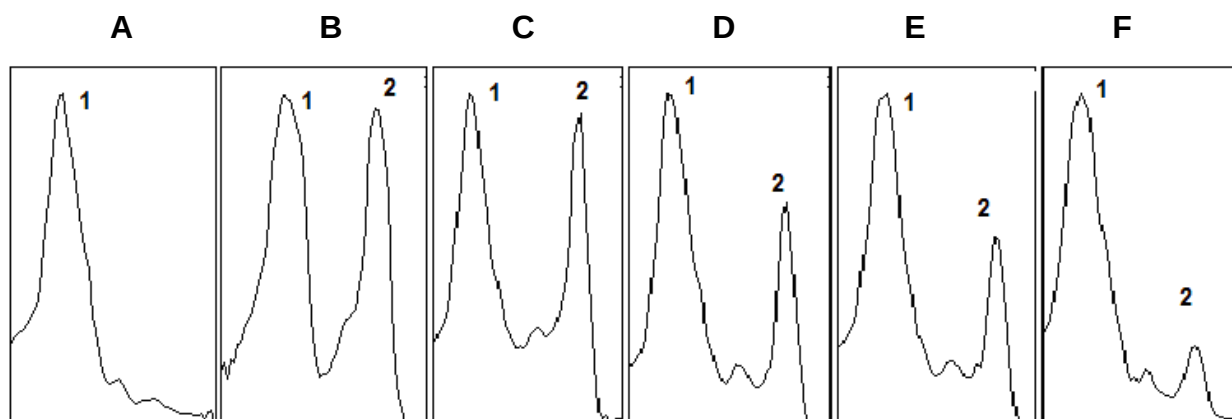


Figura 33. Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de inibição da DNA girase pelos análogos peptídicos na presença do íon zinco. Figura 33A, plasmídeo pBr322 relaxado; Figura 33B, plasmídeo pBr322 relaxado + DNA girase 1 (U) na ausência do inibidor; Figuras 33C, D, E e F, pBr322 relaxado + DNA girase 1 (U) na presença dos peptídeos YacGAG1, YacGAG2, YacGAG3 e YacGAG4 respectivamente.

Conforme mostra os dados da densitometria óptica do gel (Figuras 33C, D e E), os fragmentos peptídicos YacGAG1, YacGAG2 e YacGAG3 complexados com íon zinco, a exemplo dos análogos acetilados, não apresentam grande atividade não chegando a 50% da inibição da atividade catalítica da DNA girase, pois é possível

observar a forte intensidade dos pico do DNA superenovelado (2) em todos os gráficos, sendo menos intenso nas Figuras 33D e E. Já a Figura 33F que corresponde ao fragmento YAcGAG4 a intensidade é pequena ou quase inexistente, comparativamente aos demais, mostrando assim uma eficácia na inibição da reação catalisada pela DNA girase.

Foram também feitos ensaios com os análogos peptídicos na ausência do íon zinco (Figuras 34 a 37). Os resultados mostram que YacGAG1-AC, YacGAG2-AC, YacGAG3-AC e YacGAG4-AC, assim como na presença do Zn^{2+} , apresentaram pouca atividade inibitória sobre a DNA girase (Figuras 34 e 35).

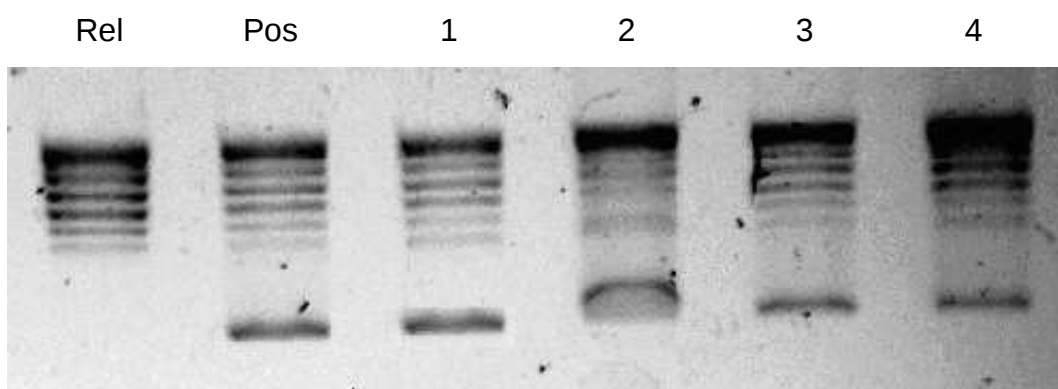


Figura 34. Ensaio de inibição da atividade da DNA girase pelos peptídeos a $120 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Volume de reação de $30 \mu\text{L}$ contendo: (Rel) plasmídeo pBr322 relaxado controle; (Pos) plasmídeo pBr322 relaxado e girase (1U) na ausência de inibidor; (linhas **1, 2, 3, 4**) plasmídeo pBr322 relaxado, girase (1U) e os peptídeos na ausência de íon Zinco YacGAG1-AC, YacGAG2-AC, YacGAG3-AC e YacGAG4-AC, respectivamente. Corrida a 50 V por 2,5 horas.

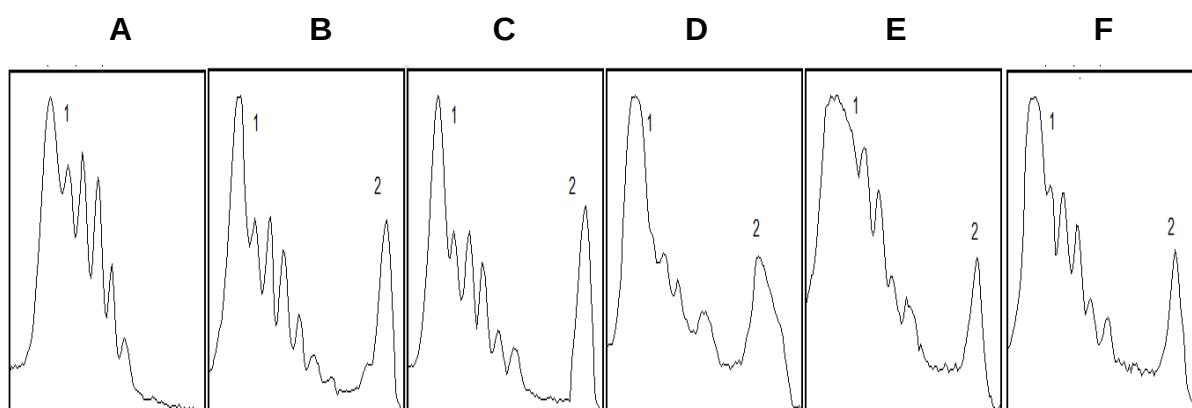


Figura 35. Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de inibição da DNA girase pelos análogos peptídicos sem a presença do íon zinco. Figura 33A plasmídeo pBr322 relaxado; Figura 33B plasmídeo pBr322 relaxado + DNA girase 1 (U) na ausência do inibidor; Figuras 33C, D, E e F , pBr322 relaxado + DNA girase 1 (U) na presença dos peptídeos YacGAG1-AC, YacGAG2-AC, YacGAG3-AC e YacGAG4-AC respectivamente.

Os fragmentos YacGAG1, YacGAG2, YacGAG3, na ausência Zn^{+2} , também apresentaram baixa atividade na inibição da DNA girase, mas surpreendentemente o fragmento YacGAG4 mostrou-se eficaz na inibição da atividade desta enzima como pode ser observado na Figura 36.

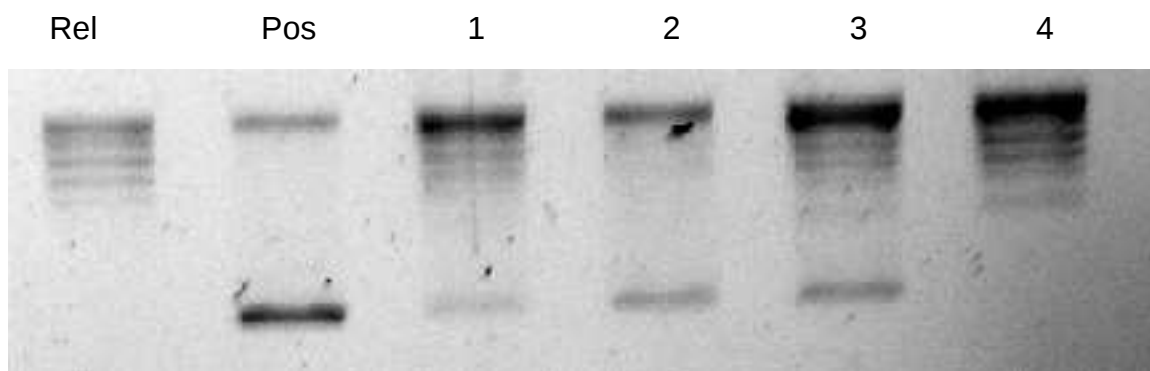


Figura 36. Ensaio de inibição da atividade da DNA girase pelos peptídeos a $120 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Volume de reação de $30 \mu\text{L}$ contendo: (Rel) plasmídeo pBr322 relaxado controle; (Pos) plasmídeo pBr322 relaxado e girase (1U) na ausência de inibidor; (linhas 1, 2, 3, 4) plasmídeo pBr322 relaxado, girase (1U) e os peptídeos na ausência de íon Zinco YacGAG1, YacGAG2, YacGAG3 e YacGAG4, respectivamente. Corrida a 50 V por 2,5 horas.

Na Figura 37 é possível observar a densitometria óptica do gel referente aos fragmentos YacGAG1, YacGAG2, YacGAG3 e YacGAG4, também na ausência do íon zinco. A Figura 33F mostra o total desaparecimento do pico atribuído à banda correspondente ao DNA superenovelado (2).

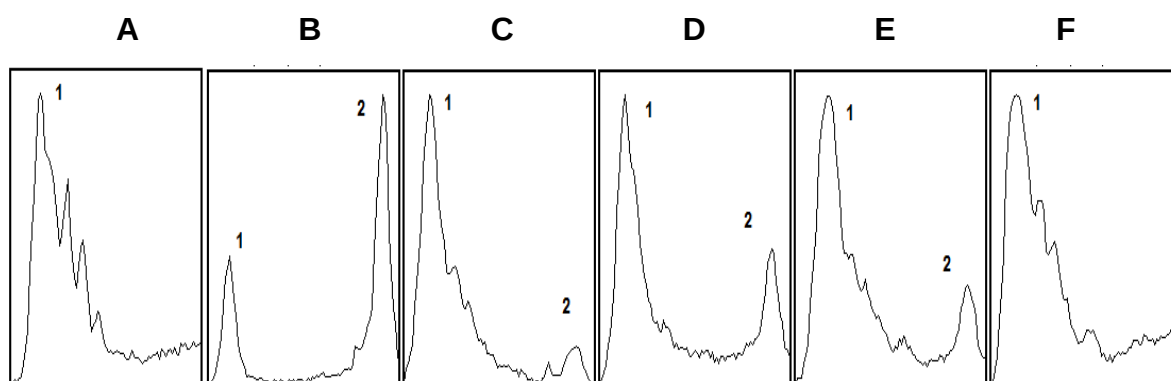


Figura 37. Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de inibição da DNA girase pelos análogos peptídicos sem a presença do íon zinco. Figura 37A plasmídeo pBr322 relaxado; Figura 37B plasmídeo pBr322 relaxado + DNA girase 1 (U) na ausência do inibidor; Figuras 37C, D E e F, pBr322 relaxado + DNA girase 1 (U) na presença dos peptídeos YacGAG1, YacGAG2, YacGAG3 e YacGAG4 respectivamente.

De uma maneira geral, todos os oito peptídeos ensaiados apresentaram melhor atividade inibitória, na ausência de Zn^{2+} . É possível observar que o pico da banda do DNA relaxado (1) é mais intenso, comparativamente à presença de Zn^{2+} , em todos os casos.

Porém, esta aparente melhora foi mais acentuada no caso dos peptídeos não acetilados, especialmente YacGAG1 e YacGAG4, onde o pico referente ao DNA relaxado (1) foi mais intenso e a banda referente ao DNA superenovelado (2) ao qual tem uma intensidade mínima ou totalmente ausente em comparação com aqueles complexados com o íon zinco.

É bem provável que, na ausência de Zn^{+2} , as cadeias peptídicas possam adotar conformações menos rígidas em solução, favorecendo o acesso da região responsável pela atividade inibitória ao sítio de ligação na DNA girase. A presença de cargas nas extremidades das sequências não acetiladas, devem também favorecer esta interação, na qual estão envolvidas as cargas negativas das moléculas de DNA, que efetivamente participam da formação de um complexo ternário Girase-DNA-peptídeo (MARCHETTO *et al.*, 2001).

O que emerge dos resultados obtidos através dos ensaios de inibição da atividade da DNA girase é que aparentemente, o domínio *zinc-finger* da YacG natural não é exatamente o responsável pela atividade inibitória descrita para esta proteína. Isso pode ser explicado pelo fato da atividade inibitória dos diferentes peptídeos ter sido independente da presença de Zn^{2+} , ou mais adequadamente, da formação do complexo metálico peptídeo- Zn^{2+} .

5.7. Ensaio de sensibilidade microbiana.

A atividade antimicrobiana dos peptídeos produzidos foi avaliada pela análise do crescimento bacteriano, em meio líquido, estimado através da determinação turbidimétrica do meio de cultura pós-incubação, na presença dos diferentes peptídeos, na presença ou ausência de Zn^{+2} , e comparativamente aos controles positivo e negativo, descritos no item 4.6. Nestes ensaios, o antibiótico ciprofloxacina foi utilizado para certificar a eficiência do método.

Avaliando os dados representados na Figura 38, observa-se que, na ausência de zinco, a inibição do crescimento pelos fragmentos YacGAG1, YacGAG2, YacGAG3, YacGAG3-AC e YacGAG4-AC não são tão significativos quando comparados a inibição do crescimento provocada pelos fragmentos YacGAG4, YacGAG1-AC e YacGAG2-AC, mesmo tendo o YacGAG1 inibido em 44% o crescimento da *Klebsciella pneumonie* e 40% da *Escherichia coli* K-100.

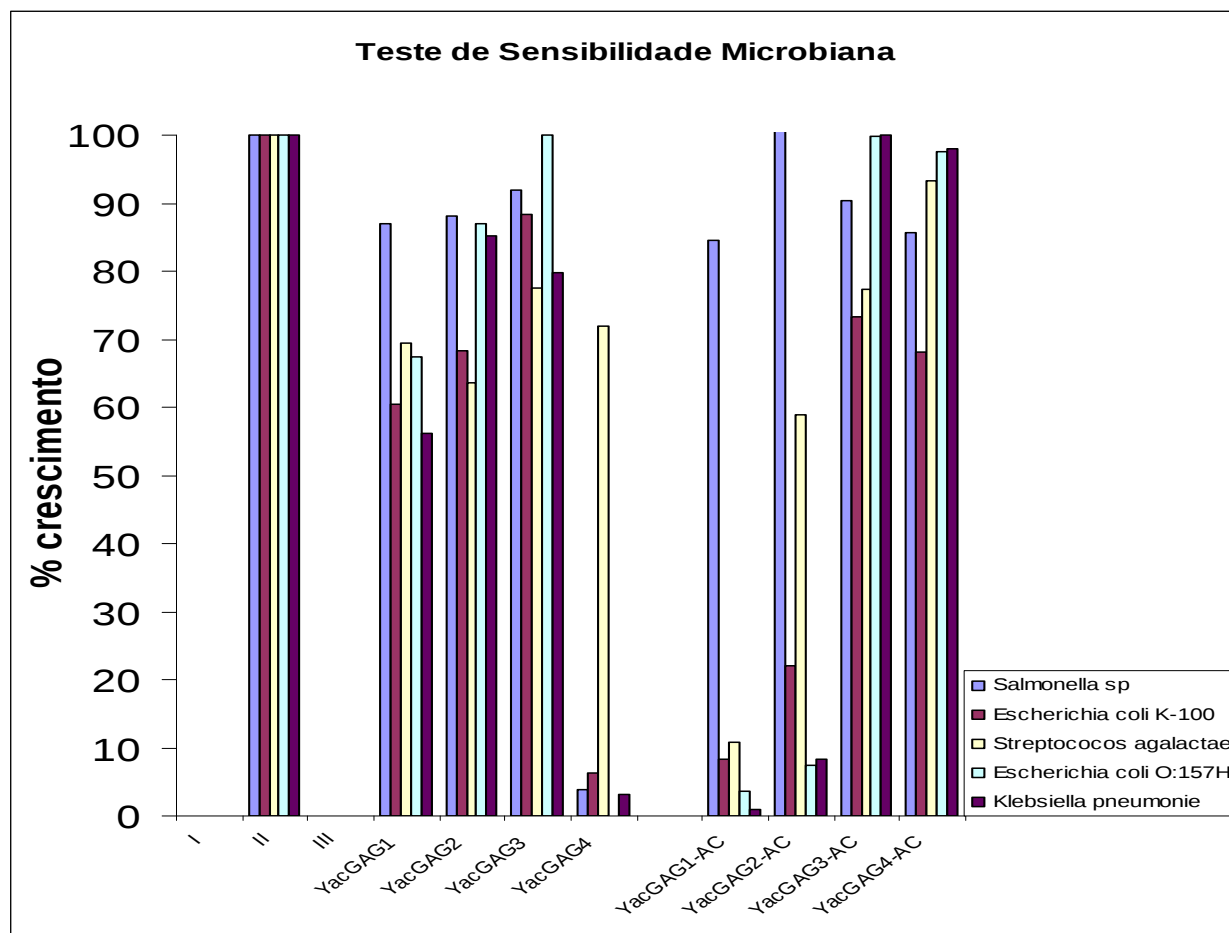


Figura 38. Teste de sensibilidade microbiana aos peptídeos sintetizados ($120 \mu\text{mol.L}^{-1}$) na ausência de zinco. I – controle negativo contendo somente meio de cultura, II controle positivo contendo meio de cultura + bactérias, III controle negativo contendo meio de cultura+bactéria+ciprofloxacina. (leitura a 595 nm; volume amostra 200 μL)

De acordo com os resultados de inibição, obtidos por eletroforese em gel de agarose, o fragmento YacGAG4 demonstrou-se mais eficaz em inibir por completo o crescimento das bactérias *Salmonella* sp, *Escherichia coli* K-100, *Escherichia coli* O:157H e *Klebsciella pneumonie*, não tendo muito sucesso apenas na inibição do

crescimento da bactéria *Streptococos agalactae* na qual conseguiu inibir somente 30% do seu crescimento.

O fragmento YacGAG1-AC inibe quase que por completo o crescimento das bactérias *Escherichia coli* K-100, *Streptococos agalactae*, *Escherichia coli* O:157H e *Klebsciella pneumonie* ao qual resulta em inibição a valores de 92, 90, 97 e 99% respectivamente, do crescimento, não tendo muita eficácia somente sobre o crescimento de *Salmonella* sp.

Observa-se também que o fragmento YacGAG2-AC demonstra atividade inibitória do crescimento contra *Escherichia coli* O:157H, inibindo 93% do seu crescimento e 92% de *Klebsciella pneumonie*. Este fragmento consegue também inibir cerca de 80% do crescimento de *Escherichia coli* K-100, não obtendo muito sucesso na inibição de *Salmonella* sp e *Streptococos agalactae* na qual inibiu apenas 42% do crescimento.

Na Figura 39 podemos observar a inibição do crescimento bacteriano pelos fragmentos de YacG complexados com o íon zinco.

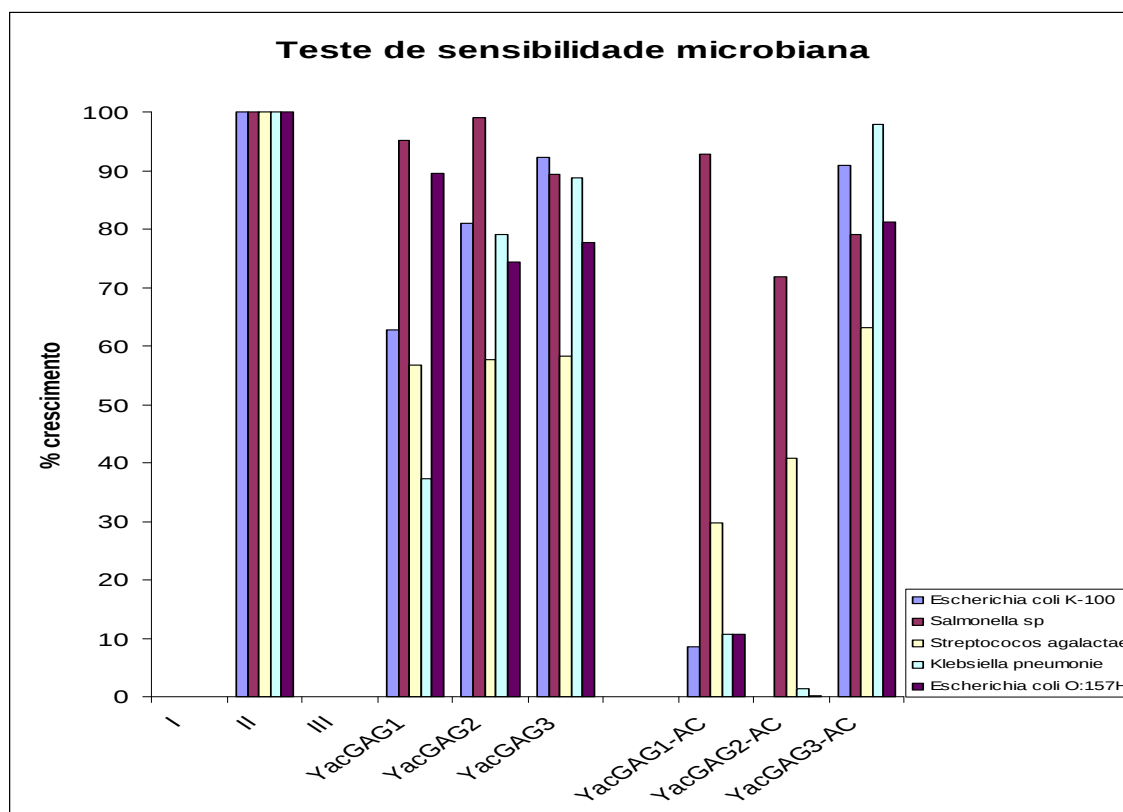


Figura 39. Teste de sensibilidade microbiana aos peptídeos sintetizados ($120 \mu\text{mol.L}^{-1}$) na presença de zinco. I – controle negativo contendo somente meio de cultura, II controle positivo contendo meio de cultura + bactérias, III controle negativo contendo meio de cultura+bactéria+ciprofloxacina. (leitura a 595 nm; volume amostra 200 μL).

Com base nos dados apresentados na Figura 39 observa-se que o fragmento YacGAG1 consegue inibir 63% do crescimento da bactéria *Klebsciella pneumonie*, 44% do crescimento de *Streptococos agalactae* e 38% do crescimento de *Escherichia coli* K-100.

YacGAG1-AC inibe o crescimento das bactérias *Escherichia coli* K-100, *Streptococos agalactae*, *Klebsciella pneumonie* e *Escherichia coli* O:157H em 92, 71, 90 e 90% respectivamente. Já YacGAG2-AC inibe o crescimento das bactérias *Streptococos agalactae*, *Klebsciella pneumonie* e *Escherichia coli* O:157H em 60, 99, e 100% respectivamente.

Tanto na presença, quanto na ausência de zinco os peptídeos YacGAG1-AC e YacGAG2-AC demonstraram uma ótima capacidade de inibição, pois inibem o crescimento de todas as linhagens de bactérias utilizadas no ensaio, exceto *Salmonella* sp. Esta capacidade de inibição do crescimento bacteriano pode estar associada a outros mecanismos de interação e inibição, não relativos a interação com a DNA girase, uma vez que estes peptídeos não apresentaram a capacidade de inibir a atividade da DNA girase *in vitro*.

6. CONCLUSÕES

No planejamento, especificamente no caso das sequências YacGAG1 e YacGAG1-AC, foi adotada, na simplificação estrutural, a manutenção das estruturas secundárias características do grupo *Treble clef finger* dos *zinc-finger*, basicamente para avaliar a importância deste domínio, na atividade inibitória recentemente descrita para YacG. A proposta dos demais peptídeos, era exatamente a de avaliar a importância de resíduos pontuais de cisteína, na coordenação com o Zn^{2+} , além do quanto este íon é importante na atividade de inibição da DNA girase.

De acordo com os resultados obtidos e apresentados neste trabalho, aparentemente nem o domínio estrutural, tampouco o íon Zn^{+2} são importantes para atividade inibitória desta proteína. Surpreendentemente, o fragmento peptídico com maior atividade foi aquele cujo domínio estrutural sequer existe (YacGAG4) e portanto é incapaz de coordenar Zn^{+2} .

Apesar dos *zinc-fingers* serem funcionalmente diversos por interagirem com uma grande diversidade de biomoléculas, e estarem envolvidos nas ligações com ácidos nucleicos e interações proteína-proteína, o que aparenta é que no caso da YacG, estas interações não estão relacionadas com a única atividade descrita para esta proteína, que é a inibição da ação da DNA girase. Neste caso, é bem provável que esta propriedade deve estar relacionada com outra região da proteína, que possa impedir o acesso do ATP ao seu sítio de ligação na cadeia B da enzima evitando o fornecimento de energia de hidrólise, necessária para a quebra-ligação do DNA, catalisada pela cadeia A da mesma enzima.

Desta forma é possível enumerar algumas conclusões, a partir dos resultados obtidos, tal como segue:

1. A metodologia de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) mostrou-se uma técnica eficaz para a produção de peptídeos com domínios *zinc finger*.

2. A titulação com íons Co^{+2} é um procedimento adequado para o estudo de coordenação de íons Zn^{+2} , uma vez que este íon apresenta muitas das propriedades desejáveis de uma sonda espectroscópica.

3. O íon Zn^{+2} em YacG deve coordenar com quatro grupos SH pelo modo tetraédrico, como demonstra o número de bandas do espectro UV-visível, atribuídas a três transições *d-d* que caracteriza uma esfera de coordenação tipo Cys4.

4. O íon Zn^{+2} liga-se mais fortemente aos peptídeos derivados do YacG, pois é capaz de deslocar facilmente os íons Co^{+2} , substituindo-o no mesmo sítio de ligação.

5. O domínio contendo os sítios de ligação de Zn^{+2} na proteína YacG não deve estar diretamente relacionado com o processo de inibição da atividade da DNA girase, e sim com alguma atividade ainda não descrita.

6. YacGAG4 demonstrou ser um bom inibidor de crescimento bacteriano, possivelmente devido a maior liberdade estrutural imposta pela ausência de interação com íons Zn^{+2} e melhor ajuste molecular ao sítio de ligação com a enzima, resultado de interações iônicas dos grupos terminais livres.

7. A capacidade inibitória dos peptídeos YacGAG1-AC e YacGAG2-AC frente ao crescimento bacteriano, não confirmada pelos ensaios *in vitro*, evidenciam um mecanismo de ação inibitória diferente daquele que envolve a enzima DNA girase.

8. De um modo geral, o fragmento YacGAG4 constitui um bom ponto de partida para o aprimoramento das seqüências derivados do YacG, além de ser um bom modelo para o desenvolvimento de novos inibidores da DNA girase.

REFERÊNCIAS

- ALBERICIO, F.; BARANY, G. Improved approach for anchoring N^α-9 Fluorenylmethyloxycarbonylamino acids as p-alkoxybenzyl esters in solid-phase peptide synthesis. **Int. J. Peptide Protein Res.**, v. 26, p. 92-97, 1985.
- ALBERICIO, F.; LLOYD-WILLIAMS, P.; GIRALT, E. Convergent solid-phase peptide synthesis. **Methods Enzymol.**, v. 289, p. 313-336, 1997.
- ALBERICIO, F.; KNEIB-CORDONIER, N.; BIANCALANA, S.; GERA, L.; MASADA, R. I.; HUDSON, D.; BARANY, G. Preparation and application of the 5-(4-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)aminomethyl-3,5-dimethoxyphenoxy)-valeric acid (PAL) handle for the solid-phase synthesis of C-terminal Peptide amides under mild conditions. **J. Org. Chem.**, v. 55, p. 3730-3743, 1990.
- ALBERTS, I. L.; NADASSY, K. ; WODAK, S. J. Analysis of zinc binding sites in protein crystal structures. **Protein Sci.**, v. 7, p. 1700-1716, 1998.
- 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.
- ANDERSON, G. W.; MCGREGOR, A. C. t-Butiloxycarbonylamino acids and their use in peptide synthesis. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 79, p. 6180-6183, 1957.
- BERG J. M.; SUN, Y. The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. **Science**, v. 271, p. 1081-1085, 1996.
- BERGER, J. M. Review: structure of DNA topoisomerases. **Biochim. et Biophys. Acta.**, v. 1400, p. 3-18, 1998.
- BROWN, J. M.; COLBOURN, E. A.; WATSON, J. K. G.; WAYNE, F. D. An effective Hamiltonian for diatomic molecules: Ab initio calculations of parameters of HCl⁺. **J. Mol. Spectrosc.**, v. 74, p. 294, 1979.
- BULAJ, G.; KORTEEMME, T.; GOLDENBERG, D. P. Ionization-reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides. **Biochemistry**, v. 37, p. 8965-8972, 1998.
- 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 solid-phase peptide synthesis. **J. Chem. Soc. Chem. Commun.**, n. 2, p. 201-203, 1994.

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

COSTE, J.; CAMPAGNE, J. M. A propos de l'estérification 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, 1998.

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

CLARKE, N.; BERG, J. M. Zinc fingers in *Caenorhabditis elegans*: finding families and probing pathways. **Science**, v. 282, p. 2018-2022, 1998.

CHAMPOUX, J. J. Dna is linked to the rat liver DNA nicking-closing enzyme by a phosphodiester bond to tyrosine. **J. Biol. Chem.**, v. 256, p. 4805-4809, 1981.

CHASTRE, J.; WOLFF, M.; FAGON, J. Y.; CHEVRET, S.; THOMAS, F.; WERMERT, D. Comparison of 8 vs 15 days of antibiotic therapy for ventilator-associated pneumonia in adults: a randomized trial. **JAMA**, v. 290, p. 2588-98, 2003.

DOURTOGLOU, V.; ZIEGLER, J. C.; GROSS, B. L'-Hexafluorophosphate de O-benzotriazolyl-N,N'-tetraméthyluronium: un Réactif de couplage peptidique nouveau et efficace. **Tetrahedron Lett.**, v. 19, p. 1269-1272, 1978.

EHRET-SABATIER, L.; LOEW, D.; GOYFFON, M.; FEHLBAUM, P.; HOFFMANN, J. A.; VAN DORSSELAER, A.; BULET, P. Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 29537-29544, 1996.

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.

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

- FISCHER, J. E.; HARBARTH, S.; AGTHE, A. G.; BENN, A.; RINGER, S. A.; GOLDMANN, D. A. Quantifying uncertainty: physicians' estimates of infection in critically ill neonates and children. **Clin. Infect. Dis.**, v. 38, p. 1383-1393, 2004.
- FRANKEL, A. D.; BERG, J. M.; PABO, C. O. Metal-dependent folding of a single zinc finger from transcription factor IIIA. **Biochemistry**, v. 84, p. 4841-4845, 1987.
- 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.
- GRAY, H. B. Electronic absorption spectroscopy. **Adv. Inorg. Biochem.**, v. 2, p. 1-25, 1980.
- HARBATH, S.; SAMORE, M. H. Antimicrobial resistance determinants and future control. **Emerg. Infect. Diseases**, v. 11, p. 794-801, 2005.
- 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.
- 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.
- HOLMES, V. F.; COZZARELLI, N. R. Closing the ring: links between SMC proteins and chromosome partitioning, condensation, and supercoiling. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 1322-1324, 2000.
- HUHEEY, J. E. **Inorganic chemistry**. 4th ed. New York: Harper and Row, 1993.
- KAISER, E.; COLESCOT, R. L.; BOSSINGE, C. D.; COOK, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in solid-phase synthesis of peptides. **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.
- KLUG, A.; SCHWABE, J. W. Protein motifs 5. Zinc fingers. **FASEB J.**, v. 9, p. 597-604, 1995.
- KREUZER, K. N.; COZZARELLI, N. R. Formation and resolution of DNA catenates by DNA gyrase. **Cell**, v. 20, p. 245-254, 1980.

KRISHNA, S. S.; MAJUMDAR, I.; GRISHIN, N. V. Structural classification of zinc fingers. **Nucleic Acids Res.**, v. 31, p. 532-550, 2003.

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

LAVIGNE, P.; KONDEJEWSKI, L. H.; HOUSTON, M. E.; SONNICHSEN, F. D.; LIX, B.; HODGES, R. S.; KAY, C. M. Preferential heterodimeric parallel coiled-coil formation by synthetic Max and c-Myc leucine zippers: a description of putative electrostatic interactions responsible for the specificity of heterodimerization. **J. Mol. Biol.**, v. 254, p. 505-520, 1995.

LEE, M. S.; GIPPERT, G. P.; SOMAN, K. V.; CASE, D. A.; WRIGHT, P. E. Three-dimensional solution structure of a single zinc finger DNA-binding domain. **Science**, v. 245, p. 635-637, 1989.

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.

LIVERMORE, D. Can better prescribing turn the tide of resistance? **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 73-78, 2004.

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

LOHNER, K.; STAUDEGGER, E. **Development of novel antimicrobial agents: emerging strategies**. Wymondham: Horizon Scientific Press, 2001. p. 1-15.

MackAY, J.; CROSSLEY, M. Zinc fingers are sticking together. **Trends Biochem. Sci.**, v. 23, p.1-4, 1998.

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.

MARCHETTO, R.; NICOLÁS, E.; CASTILLO, N.; BACARDIT, J.; NAVIA, M.; VILA, J.; GIRALT, E. Two short peptides including segments of subunit A of *Escherichia coli* DNA Gyrase as potential probes to evaluate the antibacterial activity of quinolones. **J. Peptide Science**, v. 7, p. 27-40, 2001.

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

MARQUARDT, M.; EIFLER-LIMA, V. L. A síntese orgânica em fase sólida e seus suportes poliméricos mais empregados. **Quim. Nova**, v. 24, n. 6, p. 846-855, 2001.

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.

MITCHELL, A. R.; ERICKSON, B. W.; RYABTSEV, M. N.; HODGES, R. S.; MERRIFIELD, R. B. Tert-butyloxycarbonylaminoacyl-4-(oxymethyl)-phenyl-acetamidomethyl-resin, a more acid-resistant support for solid-phase peptide synthesis. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 98, p. 7357-7362, 1976.

MORRISON, A.; HIGGINS, N. P.; COZZARELLI, N. R. Interaction between DNA gyrase and its cleavage site on DNA. **J. Biol. Chem.**, v. 10, p. 2211-2219, 1980.

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

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.

RAMELOT, T. A.; CORT, J. R.; YEE, A. A.; SEMESI, A.; EDWARDS, A. M.; ARROWSMITH, C. H.; KENNEDY, M. A. Proteins: structure, function and genetics. **Proteins**, v. 49, p. 289, 2002.

RINK, H. Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy diphenyl methylester resin. **Tetrahedron Lett.**, v. 28, p. 3787-3790, 1987.

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.

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.

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

SHEEHAN, J. C.; HESS, G. P. A new method of forming peptide bonds. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 77, p. 1067-1068, 1955.

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

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.

STAROVASNIK, M. A.; BLACKWELL, T. K.; LAUE, T. M.; WEINTRAUB, H.; KLEVIT, R. E. Folding topology of the disulfide-bonded dimeric DNA-binding domain of the myogenic determination factor MyoD. **Biochemistry**, v. 31, p. 9891-9903, 1992.

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

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.

WEBSTER, K. A.; PRENTICE, H.; BISHOPRIC, N. H. Oxidation of zinc finger transcription factors: physiological consequences. **Antioxidants & Redox Signal**, v. 3, p. 535-548, 2001.

WIGLEY, D. B. Structure and mechanism of DNA gyrase. **Nucleic acids and molecular biology**. New York: Springer-Verlag, 1995. p. 165-176.

WILCOX, D. E.; SCHENK, A. D.; FELDMAN, B. M.; XU, Y. Oxidation of zinc-binding cysteine residues in transcription factor proteins. **Antioxidants & Redox Signal**, v. 3, p. 549-563, 2001.