



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA UNESP/IBILCE

Vinicius Moreira Vidotto

**Análises moleculares e estratégias para a inibição do processo de
reconhecimento e clivagem da Desmogleína 1 pela toxina esfoliativa A (ETA) de
*Staphylococcus aureus***

São José do Rio Preto

2023

Vinicius Moreira Vidotto

Análises moleculares e estratégias para a inibição do processo de reconhecimento e clivagem da Desmogleína 1 pela toxina esfoliativa A (ETA) de *Staphylococcus aureus*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES - 88887.649397/2021-00

Orientador: Dr. Jorge Enrique Hernández González

Co-orientadora: Profa. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida

São José do Rio Preto

2023

V654a

Vidotto, Vinicius Moreira

Análises moleculares e estratégias para a inibição do processo de reconhecimento e clivagem da Desmogleína 1 pela toxina esfoliativa A (ETA) de *Staphylococcus aureus* / Vinicius Moreira Vidotto. -- São José do Rio Preto, 2023

101 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Jorge Enrique Hernández González

Coorientadora: Margarete Teresa Gottardo de Almeida

1. Microbiologia. 2. Biologia molecular. 3. *Staphylococcus aureus*. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Vinicius Moreira Vidotto

Análises moleculares e estratégias para a inibição do processo de reconhecimento e clivagem da Desmogleína 1 pela toxina esfoliativa A (ETA) de *Staphylococcus aureus*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Banca examinadora

1. Prof. Dr. Jorge Enrique Hernández González (Orientador) Pós-doutorando / UNESP/Câmpus de São José do Rio Preto.
2. Profa. Dra. Gislane Lelis Vilela de Oliveira. Depto. de Ciências Químicas e Biológicas, UNESP/IB/Câmpus Botucatu.
3. Prof. Dr. Felipe Antunes Calil. University of California San Diego.

São José do Rio Preto

06 de outubro de 2023

Dedico este trabalho a minha família, em especial as mulheres da minha vida, minha mãe Liliane, avó Neuza, tia Nice e madrinha Rose, pelo apoio incondicional e atemporal.

AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho.

A minha Madrinha Rose e meu padrinho Cláudio que desde sempre me possibilitaram sonhar e realizar.

Agradeço a minha namorada, Mariana, por sempre acreditar no meu potencial e ser meu porto seguro.

A todos da equipe de pesquisa e do laboratório, que me auxiliaram com paciência em tudo que era preciso.

Ao professor Arni que disponibilizou o laboratório, equipamentos e reagentes.

Ao meu orientador, Dr. Jorge Enrique Hernández González, pela paciência, apoio, consideração e por todos os ensinamentos.

Aos meus amigos, que sempre me fizeram sentir em casa.

Aos meus professores pelo aprendizado e por proporcionarem uma ótima formação.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem contribuir com o presente trabalho.

Ao Ibilce, por ser minha segunda casa há uma década.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 88887.649397/2021-00, à qual agradeço.

“[...] Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.

Fernando Pessoa (1959, p. 16).

RESUMO

O *Staphylococcus aureus* é um microorganismo responsável pela Síndrome da Pele Escaldada Estafilocócica (SPEE) em algumas espécies de animais, inclusive em humanos. É uma doença que promove lesões cutâneas graves, causada por toxinas esfoliativas (ETs) de *S. aureus* (ETA e ETB no caso de humanos), as quais são serino-proteases do tipo quimotripsina (SPTQs) que clivam a caderina desmogleína 1 (Dsg1). Resultados prévios sugerem a ativação da cavidade oxianiónica das ETs antes da clivagem da Dsg1, através de uma mudança conformacional do resíduo Pro192 após a interação das toxinas com o substrato. Por causa da alta especificidade das ETs, as mesmas não degradam diversos substratos peptídicos e não são suscetíveis a inibidores clássicos das SPTQs. Porém, as bases moleculares para esta alta especificidade permanecem incompreendidas, dada não só à falta de informações estruturais sobre a interação dessas enzimas com os ligantes do sítio ativo, mas também, e principalmente, com seu substrato natural, a Dsg1. Todavia, o isolamento de cepas de *S. aureus* codificadoras das ETs com resistência a antibióticos aumenta a importância da busca de inibidores para ETA a fim de tratar as lesões cutâneas decorrentes das infecções por essas cepas. O objetivo geral deste trabalho foi expressar e purificar a proteína ETA wt para a realização de ensaios de cristalização, inibição da atividade enzimática e cristalização com ligantes promissores. Foi realizada a prospecção de potenciais inibidores peptídicos e carbônicos, inicialmente determinados *in silico* e depois testados *in vitro*. Os inibidores carbônicos demonstraram uma inibição da ETA nos ensaios enzimáticos. Todavia, a técnica Phage Display também foi empregada na bioprospecção de sequências peptídicas com alta afinidade ao alvo ETA. Os resultados do sequenciamento genético aliado a ferramentas computacionais demonstraram que existem algumas sequências peptídicas relacionadas a proteínas humanas de superfície como a Protocaderina-15. Por fim, a realização da cristalização da proteína ETA wt foi bem sucedida, e, porém, os ensaios de cristalização da ETA com ligantes promissores ainda não apresentaram resultados satisfatórios. A determinação da estrutura cristalográfica da enzima associada a um inibidor pode proporcionar informações acerca do mecanismo de acomodação dos ligantes nos sítios ativos das toxinas ou nos sítios secundários moduladores.

Palavras-Chave: *Staphylococcus aureus*. Síndrome da pele escaldada estafilocócica. Toxina esfoliativa. Ensaios de cristalização. Desmogleína 1. Phage Display.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is a human pathogen responsible for Staphylococcal Scalded Skin Syndrome (SSSS), a disease that causes severe skin lesions, driven by the exfoliative toxins (ETs) of *S. aureus* (ETA and ETB in the case of humans). These toxins are chymotrypsin-like serine proteases (CTSs) that cleave desmoglein1 (Dsg1). Previous results suggest the activation of the ETs' oxyanion hole before Dsg1 cleavage, via a conformational change of the Pro192 residue following toxin-substrate interaction. Due to the high specificity of the ETs, they don't degrade various peptide substrates and aren't susceptible to classic CTS inhibitors. However, the molecular bases for this high specificity remain poorly understood, not only due to the lack of structural information about these enzymes interacting with the active site ligands but also, and mainly, with their natural substrate, Dsg1. Still, the isolation of *S. aureus* strains encoding the ETs that are antibiotic-resistant heightens the importance of searching for ETA inhibitors to treat skin lesions resulting from these strain infections. The general objective of this study was to express and purify the wild-type ETA protein for crystallization assays, enzymatic activity inhibition, and co-crystallization with promising ligands. A prospecting of potential peptide and organic inhibitors was performed, initially determined *in silico* and later tested *in vitro*. The organic inhibitors showed ETA inhibition in enzymatic assays. However, the Phage Display technique was also used in the bioprospecting of peptide sequences with high affinity to the ETA target. Genetic sequencing results combined with computational tools showed that there are some peptide sequences related to human surface proteins like Protocadherin-15. Lastly, crystallization of the wild-type ETA protein was successful, and co-crystallization assays of ETA with promising ligands are underway. Determining the crystallographic structure of the enzyme associated with an inhibitor might provide insights into the mechanism of ligand accommodation in the active or modulatory secondary sites of the toxins.

Keywords: *Staphylococcus aureus*. Staphylococcal scalded skin syndrome. Exfoliative toxin. Crystallization tests. Desmoglein 1. Phage display.

Lista de Ilustrações

Figura 1. Em (A) representação em fita da estrutura cristalina da V8 protease, uma GEPase convencional (PDB: 2O8L) a esquerda, e da ETA a direita (PDB: 1EXF). Os resíduos da tríade catalítica Asp, His e Ser são representados em um modelo em bastão em vermelho, azul e amarelo, respectivamente. Exceto por uma hélice adicional característica das toxinas esfoliativas e pela conformação de algumas alças superficiais, o enovelamento geral de ambas as enzimas são semelhantes. (B) A sobreposição dos resíduos da tríade catalítica da GEPase e dos resíduos correspondentes da ETA, mostrados em vermelho e azul claro, respectivamente, demonstra que esta importante parte da maquinaria catalítica está bem desenvolvida na estrutura da toxina. Por outro lado, o buraco oxianion não é pré-formado na estrutura da ETA, como demonstrado pelas diferentes orientações do oxigênio carbonílico da ligação peptídica Pro192-Gly193 na ETA e a ligação peptídica G166-G167 correspondente na glutamilendopeptidase (círculo tracejado).....**28**

Figura 2. Estruturas cristalinas das ETs. A) Representações da cadeia principal e principais resíduos envolvidos no processo de catálise da ETA (PDB: 1EXF), ETB (PDBs: 1DT2, varetas magentas e 1QTF, varetas ciano) e a ETE (PDBs: 5C2Z, varetas ciano e 8DAX, varetas magentas). As principais características estruturais dessas proteínas são mostradas: a tríade catalítica Asp102-His75-Ser195, uma α -hélice N-terminal, a presença no bolsão S1 dos resíduos Thr190, His213 e Lys216, que são cruciais para a especificidade para Glu-P1, conformações de P/V192(O) atípicas e a alça D, que acredita-se controlar a orientação de Pro192(O) na ETA. B) Representações em varetas das conformações de P/V192 (O) alternativas observadas nas estruturas cristalinas disponíveis da ETA, ETB e ETE. Em todos os casos, as linhas tracejadas laranjas representam ligações de hidrogênio (ligações H). Os resíduos são marcados de acordo com o sistema de numeração da quimotripsina. Nota-se a presença de uma molécula de água, marcada com a letra w, que forma uma ponte de água (esfera vermelha) entre Gly193(N) e Y143(N) na estrutura cristalina da ETE (PDB: 5C2Z) e que ocupa uma posição equivalente à de Pro192(O) na conformação invertida.....**30**

Figura 3. Representação esquemática da distribuição de desmogleína em (A) pele saudável e (B) pele exposta às ETs34

Figura 4. Sobreposição dos modelos estruturais indicando os 5 ectodomínios (ECs) de Dsg1 humana (laranja; hDsg1), Dsg1 canina (verde; cDsg1) e Dsg1 murina (azul; mDsg1). As esferas cinzas representam íons de cálcio e o ácido glutâmico (Glu381) do sítio de clivagem é indicado por uma seta preta. As sequências de aminoácidos da Dsg1 humana, murina e canina, 110 resíduos a montante do sítio de clivagem, estão destacadas. A letra x indica resíduos de aminoácidos das Dsgs1 considerados não cruciais para o reconhecimento e clivagem das Dsgs1 pela ETA.....35

Figura 5. Sequência de proteína ExhC (I), ETE (II) e ETA (III) com uma cauda de poli-His (amarelo) e um sítio de clivagem TEV protease (ciano).....40

Figura 6. Processo de biopanning com uma biblioteca de peptídeos pentavalentes exibida. A estrutura alvo é fixada na placa de alta ligação (que no caso deste trabalho são as ETs), e na sequência expor a biblioteca de fagos selecionada sobre o alvo. Após isso, inicia-se a lavagem da superfície para eliminar os fagos com baixa afinidade, e na sequência os fagos que ficaram aderidos após a lavagem apresentam uma maior afinidade pelos alvos. Esses foram eluídos e posteriormente amplificados. A repetição desse processo de 2 a 3 vezes promove a seleção dos fagos de alta afinidade.....50

Figura 7. Bibliotecas de peptídeos disponíveis no NEB (New England Biolabs). Segmentos randomizados e sequências de linker são indicados.....52

Figura 8. SDS-PAGE 15% ExhC wt (A) de *S. sciuri*, ETE wt (G) e ETA wt (H) de *S. aureus* com diferentes concentrações de Imidazol: 40 mM de Imidazol (40); 60 mM de Imidazol (60); 80 mM de Imidazol (80) e eluição com 400 mM de Imidazol (E). As setas pretas indicam a presença das respectivas proteínas recombinantes e a letra “M” corresponde ao marcador molecular (LMW-SDS Marker KIT – GE Healthcare) em kDa.....56

Figura 9. Segunda etapa de purificação da proteína ExhC wt de *S. sciuri*. Perfil de cromatografia de exclusão molecular da proteína ExhC wt de *S. sciuri* em Superdex G75 10/300 (GE). O eixo y do gráfico corresponde a absorção em mili unidades de absorbância e o eixo x ao volume em mililitros. A linha azul indica a absorbância a 230 nm e a linha rosa indica a absorbância em 280 nm.....**58**

Figura 10. Segunda etapa de purificação da proteína ETE wt de *S. aureus*. Perfil de cromatografia de exclusão molecular da proteína ETE wt de *S. aureus* em Superdex G75 10/300 (GE). O eixo y do gráfico corresponde a absorção em mili unidades de absorbância e o eixo x ao volume em mililitros. Linha azul indica a absorbância a 230 nm e linha rosa indica a absorbância em 280 nm.....**59**

Figura 11. Segunda etapa de purificação da proteína ETA wt de *S. aureus*. Perfil de cromatografia de exclusão molecular da proteína ETA wt de *S. aureus* em Superdex G75 10/300 (GE). O eixo y do gráfico corresponde a absorção em mili unidades de absorbância e o eixo x ao volume em mililitros. Linha azul indica a absorbância a 230 nm e linha rosa indica a absorbância em 280 nm.....**60**

Figura 12. SDS-PAGE 15% ExhC wt (A) de *S. sciuri*, ETE wt (G) e ETA wt (H) de *S. aureus*. Os números 4, 5 e 6 (A), 3, 4, 5, 6 e 7 (G) e 5, 6 e 7 (H) dos géis SDS-PAGE 15% indicam as amostras coletadas a partir dos perfis cromatográficos das proteínas ExhC wt, ETE wt e ETA wt respectivamente, projetados pelo sistema AKTA-pure. As setas pretas indicam a presença das respectivas proteínas recombinantes e a letra “M” corresponde ao marcador molecular (LMW-SDS Marker KIT – GE Healthcare) em kDa.....**61**

Figura 13. Resultados do Western blot para detecção das proteínas ExhC wt (A), e ETA (J) de *S. aureus*. As proteínas alvo foram detectadas (seta preta) à direita do marcador molecular (Amersham ECL Rainbow Marker – GE Healthcare) em kDa (M).....**62**

Figura 14. Determinação dos parâmetros cinéticos ETA. Os painéis superiores mostram os gráficos de Michaelis-Menten e Hanes-Woolf para a enzima. No painel inferior contém os valores dos parâmetros cinéticos estimados a partir dos gráficos de Hanes-Woolf por meio de regressão linear. V_o , $[S]$, K_M , V_{max} e k_{cat} representam a velocidade inicial, concentração de substrato, constante de Michaelis, velocidade máxima e constante catalítica, respectivamente. A razão k_{cat}/K_M quantifica a eficiência catalítica de cada enzima. Valores médios $\pm$ erros padrão da média são mostrados.....**63**

Figura 15. Espectro de CD-UV característico da proteína ETA de *S. aureus* a 25 °C em solução tampão. O eixo y do gráfico corresponde a elipticidade molar em $\text{deg.cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ e o eixo x ao comprimento de onda em nanômetros.....**64**

Figura 16. Gráfico de porcentagem da viabilidade celular por ensaios de MTT das células BHK-21 na presença da proteína ETA de *S. aureus*. Os resultados plotados representam três experimentos independentes que se apresentam como média $\pm$ SD. O eixo y corresponde a viabilidade das células BHK-21 em porcentagem (calculada a partir do experimento controle na ausência de PBS 1X) e o eixo x as concentrações da ETA em μM**65**

Figura 17. Representação estrutural de ETA em complexo com α -MSH, β -MSH e derivados. A) ETA: α -MSH. B) ETA: α MSH-curto C) ETA:D- α - MSH D) ETA: β - MSH.. Os peptídeos são representados como bastões amarelos, enquanto a estrutura da proteína é representada como desenho e os resíduos que interagem com os peptídeos são representados como bastões verdes e sua superfície é mostrada em cinza. As ligações H intermoleculares são indicadas por linhas tracejadas laranja. Os principais resíduos de sítios ativos e interativos das toxinas são rotulados. Em todos os casos as estruturas centrais correspondentes aos maiores agrupamentos de cada trajetória foram escolhidas para representação estrutural. Os subsítios S1 e S4' estão marcados em itálico.....**68**

Figura 18. Alinhamento da sequência de α -MSH, β -MSH e hDsg-1 EC3-4linker de acordo com as posições que ocupavam nos sítios ativos dos ETs. As posições de P4 a P4' são indicadas no topo. Local de clivagem marcado por uma seta ($\downarrow$).....69

Figura 19. Atividade enzimática da proteína nativa (ETA), incubada com o peptídeo D- α MSH, e também associada ao peptídeo linear 1, em incubação de 1h e também de 18h , com concentração 20 mM de substrato BocL-Glu- $\downarrow$ OPh.....73

Figura 20. Demonstração in silico da interação entre os possíveis ligantes e as porções do sítio ativo da enzima. Em A) temos o resíduo de ácido na posição P1. B) Ligações de H com His213 e Thr213. C) Interação com Lys216. D) Ligação de Hidrogênio entre Gly193 e Ser195.....74

Figura 21: Compostos químicos utilizados em ensaios para inibir a atividade enzimática de ETA e ExhC contra o substrato sintético BocL-Glu- $\downarrow$ OPh. Os compostos foram selecionados por triagem virtual para a inibição do sítio ativo de toxinas esfoliativas.....75

Figura 22. Teste de atividade ETA controle DMSO. As seguintes concentrações finais de DMSO no ensaio de atividade foram testadas: 0, 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 15 e 20%.....77

Figura 23. Teste primário de ETA com compostos. As experiências foram realizadas em triplicado e os resultados são apresentados como média $\pm$ Desvio Padrão (DP).....78

Figura 24. Teste de atividade ETA controle DMSO. As seguintes concentrações finais de DMSO no ensaio de atividade foram testadas: 0, 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 15 e 20%.....79

Figura 25. Teste primário de ETA e ExhC com compostos. As experiências foram realizadas em triplicado e os resultados são apresentados como média $\pm$ Desvio Padrão (DP).....80

Fígura 26. Compostos carbônicos mais promissores nos testes de inibição da atividade enzimática. As letras foram usadas para referir aos compostos de forma mais

simplificada.....81

Figura 27. Efeito de inibição e curva de resposta à dose dos compostos selecionados sobre ETA. A e B: Composto A. C e D: Composto G. E e F: Composto M. G e H: Composto H. I e J: Composto J. Os dados mostrados são a média $\pm$ SD de três medições independentes.....82

Figura 28. Efeito de inibição e curva de resposta à dose dos compostos selecionados sobre ExhC. A e B: Composto A. C e D: Composto G. E e F: Composto H. G e H: Composto J. Os dados apresentados são a média $\pm$ DP de três medições independentes.....84

Figura 29. Cristal contendo ETA wt.....85

Figura 30. Cristais obtidos através do método Difusão de Vapor, em que a condição da solução precipitante foi PEG 4000 (23-26%) e 1% de DMSO e pH 6,5, sobre gotas contendo ETA wt + peptídeo D- α -MSH.....86

Figura 31. Comparação da densidade eletrônica encontrada na difração de Raios X. Em (A) é possível visualizar a estrutura que acreditamos ser o PEG 4000 associado a ETA wt; Em (B) densidade eletrônica típica das ramificações aparentadas no peptídeo D- α -MSH.....87

Figura 32. Placas de titulação de cultura de E. coli ER2738 após infecção por fagos obtidas da biblioteca C7C (New England Biolabs). Os fagos foram selecionados com base na interação dos peptídeos presentes em seus capsídeos virais e a toxinas ETA durante os ciclos de bioprospecção de exibição de fagos.....88

Figura 33. Gel de agarose a 1% de amostras de DNA do vírus M13 após extração e PCR de fagos M13 com inserções de sequências de nucleotídeos que codificam os peptídeos do capsídeo viral, e marcador molecular (M).....89

Figura 34: sequências traduzidas do DNA dos phagos selecionadas por alta afinidade ao alvo ETA.....90

Figura 35: Sequências de alta afinidade ao alvo ETA relacionados a fragmentos de sequências relevantes encontradas na natureza.....92

Figura 36. Em amarelo está representada a sequência obtida por phage display e posteriormente encontrada via blast com altíssima identidade e contida na proteína Dsg-4 murina. Em verde está a estrutura da Dsg-4 gerada por alpha fold e em amarelo está representada a sequência contida na Dsg-4 que apresentou match via blast quando a busca foi realizada com a sequência CSRSTHASC.....**93**

Figura 37. Em amarelo está representada a sequência obtida por phage display e posteriormente encontrada via blast com altíssima identidade e contida na proteína Protocaderina-15. Em verde está a estrutura da protocaderina 15 gerada por alpha fold e em amarelo está representada a sequência contida na protocaderina-15 que apresentou match via blast quando a busca foi realizada com a sequência: CDIYGTEQC.....**93**

Lista de tabelas

Tabela 1. Tampões utilizados para a diálise das proteínas alvo de acordo com condições experimentais. Cromatografia de exclusão molecular (SEC); Dicroísmo Circular (CD); Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Viabilidade celular (ensaios de MTT).....	43
Tabela 2. O termociclador utilizado Thermal Cycler C1000 Touch (BIO-RAD) para as reações de PCR foi programado nas condições apresentadas.....	52
Tabela 3. Dados das sequências primárias das proteínas ETA wt, ETE wt, ExhC wt, obtidos pelo programa ProtParam (ExPASy).....	54
Tabela 4. Resultados em porcentagem das frações de estrutura secundária da proteína ETA de <i>S. aureus</i> obtida por meio do experimento de UV-CD. A deconvolução e o cálculo das porcentagens de estrutura secundária foram realizados pelo software CONTINLL do pacote de programas CDPPro utilizando o conjunto de referências de proteínas SP29.....	63
Tabela 5. Efeitos do aumento progressivo da concentração da proteína ETA na viabilidade da linhagem celular BHK-21 em porcentagem (calculada a partir do experimento controle na ausência de PBS 1X) por ensaios de MTT. Os resultados representam três experimentos independentes que se apresentam como média $\pm$ SD. Diferença estatisticamente significativa entre os controles na ausência/presença do tampão PBS 1X e as amostras tratadas com ETA não foi comprovada pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).....	65
Tabela 6. Estabilidade de ETA em complexos com diferentes peptídeos.....	66
Tabela 7. Maiores contribuições de energia livre por resíduo para a formação do complexo ETA: α -MSH.....	72
Tabela 8. Valores de de compostos IC 50 direcionados a ETA.....	82
Tabela 9. Valores de IC 50 ExhC.....	82

Tabela 10. Número de colônias obtidas de cada etapa de titulação após ciclos de bioprospecção de exibição de fagos realizados com a biblioteca (New England Biolabs) e ETE, ETA e ExhC. T: titulação do alvo. NC: não contável.....**87**

Lista de Abreviaturas e Siglas

Arg	Arginina
Asp	Aspartato (Ácido aspártico)
Asn	Asparagina
BCIP/NBT	5-bromo-4chloro-3-indolylphosphate/nitro-bluetetrazolium
CD	Dicroísmo Circular
CNPEM	Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais
Dsg-1	Desmogleína 1
Dsgs	Desmogleínas
Dscs	Desmocollinas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
MD	Dinâmica Molecular
EE	Epidermite Exsudativa
ECs	Ectodomínios
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ETA	Toxina Esfoliativa A
ETB	Toxina Esfoliativa B
ETD	Toxina Esfoliativa D
ETs	Toxinas Esfoliativas
ExhC	Toxina Esfoliativa ExhC
GEPases	Glutamil-endoropeptidases
Glu	Glutamato (Ácido glutâmico)
Gln	Glicina
His	Histidina
H	Hidrogênio
HCl	Ácido Clorídrico
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
LB	Meio Luria-Bertani
Lys	Lisina
LPS	Lipopolissacarídeo da Membrana Externa
Met	Metionina

MM-GBSA	Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di- fenil brometo de tetrazolina
NaCl	Cloreto de Sódio
NaH₂PO₄	Fosfato monossódico
NaF	Fluoreto de sódio
Ni	Níquel
Nm	Nanômetro
OD	Densidade Ótica
PEG	Polietilenoglicol
Pro	Prolina
Phe	Fenilalanina
pI	Ponto isoelétrico teórico
PBS	Solução Salina Tamponada
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDB	Protein Data Bank
RMSD	Desvio quadrático médio da raiz
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de Poliacrilamida com Dodecil-Sulfato de Sódio
SPTQ	Quimotripsinas
SPEE	Síndrome da Pele Escaldada Estafilocócica
Ser	Serina
Thr	Treonina
Trp	Triptofano
wt	Wt
β-MSH	Peptídeo hormônio estimulante de beta-melanócitos
α-MSH	Peptídeo hormônio estimulante de alfa-melanócitos
µg	Microgramas
3D	Tridimensional
-OH	Hidroxila
µL	Microlitros

LISTA DE SÍMBOLOS

[]	Concentração
Km	Eficiência cinética
kcal	Quilocaloria
nm	Nanômetro
L	Litro
mL	Mililitro
μL	Microlitro
g	Grama
mg	Miligrama
μg	Micrograma
s	Segundo
min	Minuto
°C	Graus Celsius
mol	Mol
M	Molar
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
Å	Ångström
V	Volts
kb	Quilobases
pb	Pares de base
Rpm	Rotações por minuto
ΔG	Variação de energia livre de Gibbs
ΔS	Variação de entropia
ΔG _{eff}	Energia Livre Efetiva
T	Temperatura
Da	Dalton
kDa	Quilodalton
>	Maior que
<	Menor que
%	Porcentagem
IC ₅₀	Concentração inibitória média

SUMÁRIO

Sumário

1. INTRODUÇÃO	24
1.1 Síndrome da Pele Escaldada Estafilocócica (SPEE) de <i>Staphylococcus aureus</i>	24
1.2 Toxinas esfoliativas do gênero <i>Staphylococcus</i>	26
1.3 Alvo das toxinas esfoliativas na adesão celular da pele	33
2. OBJETIVOS	38
3. JUSTIFICATIVA	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 Vetores de expressão em <i>Escherichia coli</i>	40
4.2 Análise da sequência primária das proteínas de estudo	41
4.3 Transformação bacteriana	41
4.4 Expressão das proteínas alvo	42
4.5 Purificação das proteínas alvos	42
4.6 Diálise das proteínas alvo	44
4.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15%	45
4.8 Western blot	45
4.9 Aquisição de compostos potencialmente inibidores	46
4.10 Dicroísmo Circular (CD)	46
4.11 Ensaios de cristalização e co-cristalização.....	47
4.12 Ensaios Enzimáticos	47
4.13 Exibição de fagos com biblioteca de peptídeos (Phage Display).....	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 Análise da sequência primária das proteínas alvo	55
5.2 Expressão das proteínas alvo	55
5.3 Purificação das proteínas recombinantes	56
5.4 Western blot	62
5.5 Ensaios de atividade enzimática	62

5.6 Dicroísmo Circular	63
5.7 Ensaios MTT	65
5.8 Identificação in silico de inibidores contra a Toxina Esfoliativa A (ETA)	66
5.9 Inibidores carbônicos da ação esfoliativa.....	73
5.10 Co-cristalização de toxinas esfoliativas com potenciais inibidores peptídicos.....	85
5.11 Phage Display.....	87
6. CONCLUSÕES	94
REFERÊNCIAS	95

1. INTRODUÇÃO

1.1 Síndrome da Pele Escaldada Estafilocócica (SPEE) de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus são bactérias Gram catalase-positivas, com aproximadamente 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, imóveis, não esporuladas. Estas bactérias apresentam capacidade de adaptação a diferentes ambientes e alta capacidade de dispersão, além de serem resistentes à dessecação, sobrevivendo em ambientes não fisiológicos (COUTO et al., 2000; DAKIC et al., 2005). Até o momento, foram descritas 33 espécies de estafilococos, 17 das quais podem ser isoladas de amostras biológicas humanas (CHESNEAL et al., 1993). Além disso, são amplamente distribuídas na natureza e podem fazer parte da microbiota da pele e mucosa de uma grande parte dos mamíferos (GIAMMARINARO et al., 2005). Também, o *S. aureus* pode ser encontrado no ambiente de circulação do ser humano, além de estar presente em diversas partes do corpo, como fossas nasais, garganta, intestinos e pele (CARVALHO et al., 2005). Desses sítios anatômicos, as narinas possuem o maior índice de colonização, cuja prevalência é de cerca de 40% na população adulta, podendo ser ainda maior dentro de hospitais (CARVALHO et al., 2005).

Ao contrário de muitas bactérias, cuja virulência depende principalmente da produção de um único ou limitado número de fatores de virulência aos quais os sintomas clínicos observados podem ser diretamente atribuídos, os estafilococos secretam um amplo espectro de diversas proteínas extracelulares, que tornam a bactéria virulenta, promovendo desde infecções de pele como a Síndrome da Pele Escaldada Estafilocócica (SPEE), até pneumonias e septicemias. (ALVES et al., 2009). Sendo assim, algumas das doenças provocadas por *S. aureus* são causadas pela produção de toxinas, como a SPEE, enquanto outras doenças resultam da proliferação dos microrganismos, levando à formação de abscessos e a destruição dos tecidos como infecção cutânea, endocardite, pneumonia, empiema, osteomielite e artrite séptica (MURRAY, 2009).

A SPEE é o termo usado para designar várias doenças de pele características pela formação de bolhas no tecido epidérmico, que são causadas pela ação local de Toxinas Esfoliativas (ETs) do *S. aureus*, também conhecidas como toxinas “epidermolíticas” (BUKOWSKI et al., 2010). Os primeiros sintomas da SPEE incluem

febre, mal-estar, letargia e diminuição do apetite, que são seguidos por erupção eritematosa e bolhas grandes, frágeis e cheias de líquido. As bolhas estouram com ação mecânica, deixando as partes afetadas do corpo sem uma camada protetora de epiderme (LADHANI et al., 1999). A SPEE afeta grande parte do corpo com lesões geralmente estéreis e que, em sua forma localizada, é conhecida como impetigo bolhoso, ambas as condições compartilham a mesma origem e diferem apenas na extensão dos danos à pele. (BUKOWSKI et al., 2010). A SPEE é predominante em neonatos e bebês, mas adultos com sistema imunológico e função renal comprometidos também são suscetíveis (BUKOWSKI et al., 2010). Notavelmente, casos de adultos saudáveis que desenvolvem a SPEE também têm sido relatados. A mortalidade infantil é relativamente baixa, ~ 5%, mas é expressivamente maior em adultos, chegando a 59%, de acordo com alguns estudos. A maior mortalidade em adultos é explicada pelo fato de a SPEE ocorrer predominantemente com doença subjacente grave (BUKOWSKI et al., 2010).

O diagnóstico pode distinguir a SPEE de outras doenças de pele, como necrólise epidérmica tóxica, epidermólise bolhosa, eritema multiforme bolhoso ou listeriose e queimaduras térmicas ou químicas, todas as quais podem se manifestar com sintomas semelhantes (LADHANI et al., 1999). Os métodos mais simples e adequados de diagnóstico de rotina são PCR para genes que codificam toxinas ou análise de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (SAKURAI et al., 1995; JOHNSON et al., 1991). O tratamento comum consiste na administração de antibióticos intravenosos (CRIBIER et al., 1994). No entanto, cepas resistentes podem se tornar um problema no futuro (YAMAGUCHI et al., 2002). Problemas com o tratamento da SPEE associado à cepas resistentes à metilicina já foram relatados no Japão (NOGUCHI et al., 2006). Além do tratamento com antibióticos, também são recomendados manter a temperatura corporal e proteger a pele desnuda para prevenir infecções secundárias e perda de líquidos (LADHANI et al., 1999).

1.2 Toxinas esfoliativas do gênero *Staphylococcus*

As características da SPEE foram descritas pela primeira vez pelo Barão Gottfried Ritter Von Rittershain em 1878 (VON RITTERSHAIN, 1878). No entanto, foi somente em 1967 que a relação entre a esfoliação da pele e o *S. aureus* foi determinada por Lyell (LYELL, 1967). Este atraso significativo foi causado pelo fato de o fluido da bolha e as regiões esfoliadas estarem frequentemente livres de estafilococos cultiváveis, porque a toxina é distribuída a partir de locais distantes de infecção através da corrente sanguínea. A existência de uma toxina hipotética foi sugerida por Lyell e confirmada por Melish *et al.* em 1972, que demonstrou a indução de bolhas com filtrados estéreis de culturas bacterianas (MELISH *et al.*, 1972). Até o momento, dois sorotipos de ETs de natureza proteica, denominadas ETA (UniProtKB: P09331) e ETB (UniProtKB: P09332), foram associados ao aparecimento da SPEE e do impetigo bolhoso em humanos. Os genes que codificam essas toxinas foram encontrados em cerca de 2 a 5% das cepas de *S. aureus* (LADHANI, 2003). Na Europa, EUA e África, a ETA é predominante e é expressa por mais de 80% das cepas produtoras dessas toxinas (AZEVEDO; ARBUTHNOTT, 1981; ADESIYUN *et al.*, 1991). Tanto a ETA quanto a ETB podem induzir a esfoliação da pele em humanos e camundongos, mesmo na ausência do patógeno, no entanto, somente no Japão as cepas produtoras de ETB são mais prevalentes do que aquelas que expressam ETA (BUKOWSKI *et al.*, 2010). Tais toxinas clivam as caderinas desmossômicas, especificamente a desmogleína 1 (Dsg1) das camadas superficiais da pele (BUKOWSKI *et al.*, 2010). Basicamente a clivagem causa uma dissociação de queratinócitos implicando na manifestação clínica SPEE. (BUKOWSKI *et al.*, 2010). Por outro lado, duas outras ETs de *S. aureus*, a ETC (UniProtKB: Q9KWG9) e a ETE (anteriormente denominada ETD-like, UniProtKB: L0RUV7), foram descobertas em isolados de fleimão de cavalo e mastite de ovelha, respectivamente, e foram capazes de causar danos à pele em modelos animais (MARIUTTI *et al.*, 2017). Já as cepas produtoras de ETD são principalmente isoladas de furúnculos e abscessos cutâneos (YAMAGUCHI *et al.*, 2002). Finalmente, é importante notar que, apesar de a SPEE ser tratada com sucesso na maioria dos casos com antibióticos existentes, cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos e codificadoras de ETs já foram isoladas de pacientes doentes (HISATSUNE *et al.*, 2013).

Além das ETs de *S. aureus*, essas toxinas foram descritas em outras espécies do

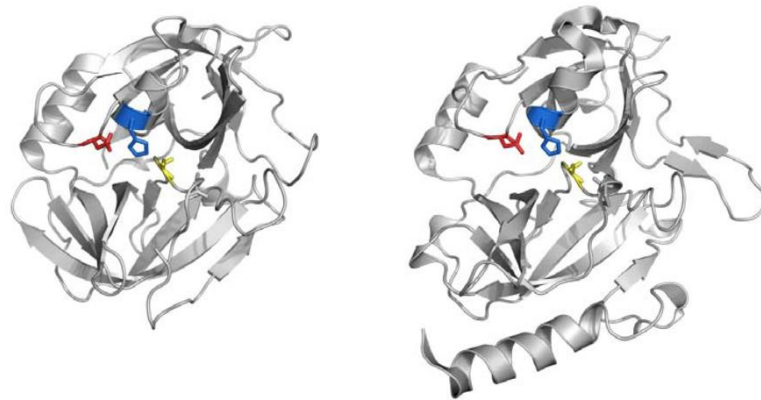
gênero *Staphylococcus*, como *S. hyicus* ExhA, ExhB, ExhC e ExhD), *S. chromogenes* (ExhB e SCET), *S. sciuri* (ExhC), *S. pseudintermedius* (ExpA ou EXI e ExpB) e *S. intermedius* (SIET), cada um com suas peculiaridades no nível de gravidade para o hospedeiro e localização gênica (MARIUTTI et al., 2017).

Entretanto, as quatro isoformas de toxinas esfoliativas produzidas por *S. aureus* (ETA, ETB, ETD e ETE) apresentam as sequências de resíduos de aminoácidos típicas de uma serino-proteinases da família das quimotripsinas (NISHIFUJI et al., 2008). Porém, apesar das sequências primárias das ETs mostrarem alta homologia entre si e com as proteínas pertencentes à família das serino-proteinases do tipo quimotripsina (SPTQs), ainda não são totalmente conhecidos os determinantes estruturais envolvidos na alta especificidade pelo substrato (Dsg-1) mostrado por essas toxinas, diferentemente à maioria das SPTQs, que são enzimas generalistas (BUKOWSKI et al., 2010). Outra característica interessante, é que os inibidores clássicos de SPTQs já testados em ETs não inibem a atividade dessas enzimas (BUKOWSKI et al., 2010).

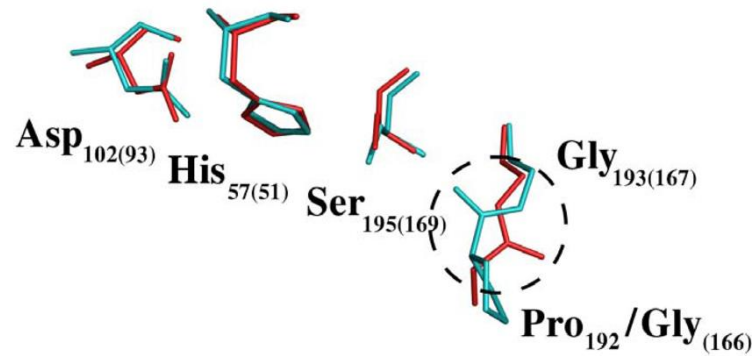
A homologia entre as ETs e as SPTQs é reforçada pelas estruturas cristalinas das ETA (PDB IDs: 1EXF, 1AGJ, 1DUE e 1DUA) ETB (PDB IDs: 1DT2 e 1QTF) e ETE (PDB IDs: 5C2Z e 8DAX). Essas estruturas revelaram também a grande similaridade dessas ETs com as glutamil-endopeptidases (GEPases) e confirmaram a presença da tríade catalítica Asp-His-Ser característica, como demonstrado na figura 1 (BUKOWSKI et al., 2010).

Figura 1. Em (A) representação em fita da estrutura cristalina da V8 protease, uma GEPase convencional (PDB: 2O8L) a esquerda, e da ETA a direita (PDB: 1EXF). Os resíduos da tríade catalítica Asp, His e Ser são representados em um modelo em bastão em vermelho, azul e amarelo, respectivamente. Exceto por uma hélice adicional característica das toxinas esfoliativas e pela conformação de algumas alças superficiais, o enovelamento geral de ambas as enzimas são semelhantes. (B) A sobreposição dos resíduos da tríade catalítica da GEPase e dos resíduos correspondentes da ETA, mostrados em vermelho e azul claro, respectivamente, demonstra que esta importante parte da maquinaria catalítica está bem desenvolvida na estrutura da toxina. Por outro lado, o buraco oxianion não é pré-formado na estrutura da ETA, como demonstrado pelas diferentes orientações do oxigênio carbonílico da ligação peptídica Pro192-Gly193 na ETA e a ligação peptídica G166-G167 correspondente na glutamiledopeptidase (círculo tracejado).

A.



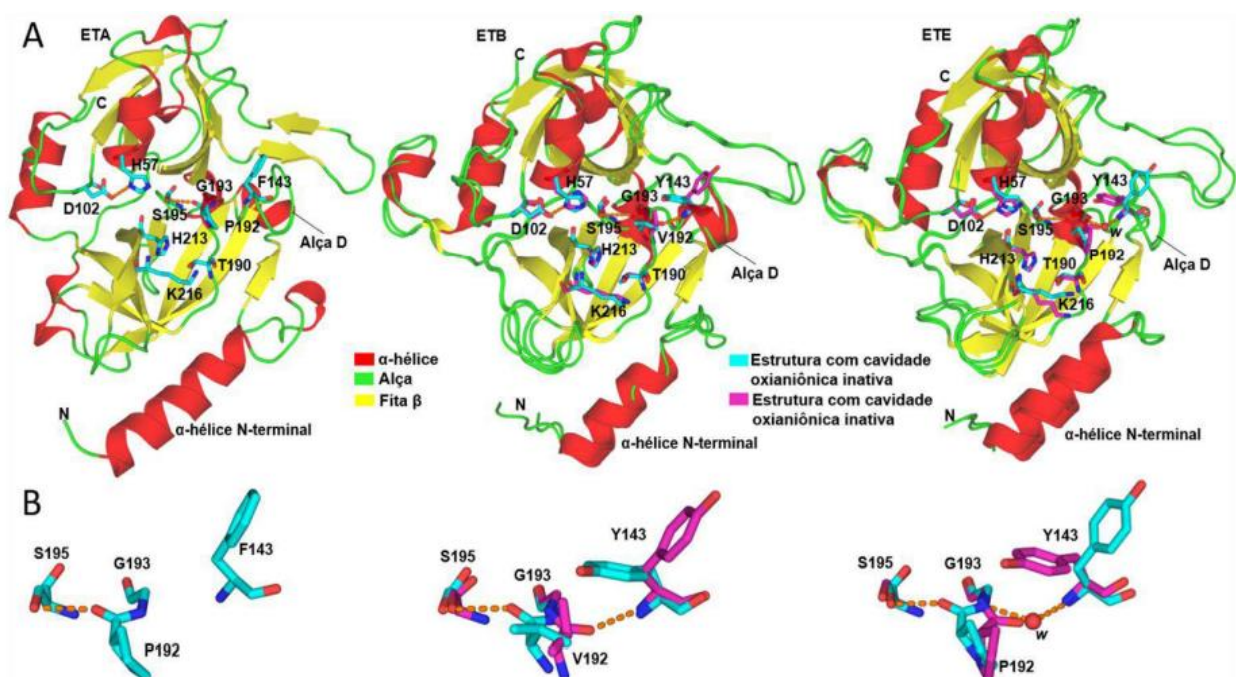
B.



Fonte: BUKOWSKI et al., 2010.

As estruturas cristalinas disponíveis das ETs também mostraram que seus bolsões S1 (Fígura 2), que são os principais determinantes da especificidade pelo substrato, contém dois elementos presentes em todas as GEPases conhecidas e que desempenham um papel central na acomodação do Glu na posição P1 do substrato: um resíduo de His na posição 213 e Thr/Ser (Thr no caso das ETs) na posição 190. Por outro lado, as ETs de *S. aureus* possuem um resíduo de Lys característico na posição 216 em vez do resíduo Ser encontrado em muitas GEPases. De fato, esse resíduo de Lys é conservado em todas as ETs conhecidas, exceto na ExhA de *S. hyicus*, que apresenta um Arg na posição equivalente. Além disso, foi proposto que o grupo amina carregado positivamente ($-NH_3^+$) de Lys216 ajuda a estabilizar o grupo carboxila de Glu-P1, um papel desempenhado pelo $-NH_3^+$ do resíduo N-terminal em outras GEPases (DEMIDYUK et al., 2017). Uma análise mutacional prévia confirmou a importância de Lys216 na atividade da ETA, já que a substituição por Ala incapacitou a enzima de hidrolisar o substrato sintético BocL-Glu-↓OPh, que de fato promoveria a atividade esterase das ETs como já relatado previamente (RAGO et al., 2000). Todas essas descobertas sugerem que Lys216 é um elemento estrutural chave para a especificidade para Glu em posição P1 (Glu-P1) e, dada a longa cadeia lateral da Lys, ela também pode impedir a ligação às ETs dos inibidores clássicos das SPTQs. No entanto, alguns autores têm argumentado, com base em considerações estruturais e funcionais envolvendo várias GEPases, que não há evidência direta sobre o papel de Lys216 na especificidade para Glu-P1, e que este resíduo pode apenas atuar como um compensador da carga negativa do Glu e afetar a catálise (DEMIDYUK et al., 2017).

Figura 2. Estruturas cristalinas das ETs. A) Representações da cadeia principal e principais resíduos envolvidos no processo de catálise da ETA (PDB: 1EXF), ETB (PDBs: 1DT2, varetas magentas e 1QTF, varetas ciano) e a ETE (PDBs: 5C2Z, varetas ciano e 8DAX, varetas magentas). As principais características estruturais dessas proteínas são mostradas: a tríade catalítica Asp102-His75-Ser195, uma α -hélice N-terminal, a presença no bolsão S1 dos resíduos Thr190, His213 e Lys216, que são cruciais para a especificidade para Glu-P1, conformações de P/V192(O) atípicas e a alça D, que acredita-se controlar a orientação de Pro192(O) na ETA. B) Representações em varetas das conformações de P/V192 (O) alternativas observadas nas estruturas cristalinas disponíveis da ETA, ETB e ETE. Em todos os casos, as linhas tracejadas laranjas representam ligações de hidrogênio (ligações H). Os resíduos são marcados de acordo com o sistema de numeração da quimotripsina. Nota-se a presença de uma molécula de água, marcada com a letra w, que forma uma ponte de água (esfera vermelha) entre Gly193(N) e Y143(N) na estrutura cristalina da ETE (PDB: 5C2Z) e que ocupa uma posição equivalente à de Pro192(O) na conformação invertida.



Fonte: GISMENE et al., 2022 .

As ETs de *S. aureus* exibem algumas outras características estruturais, que as diferenciam das serino-proteinases típicas da família das SPTQs. Na ETA, ETB e ETD há extensões alfa-hélices nas porções N e C terminais, sendo a alfa-hélice N-terminal anfipática e altamente carregada (MARIUTTI et al., 2015), uma das características estruturais mais notáveis dessas toxinas. As alças são altamente flexíveis, o que torna essas zonas susceptíveis a alterações conformacionais e de possível influência na ligação ao substrato (MARIUTTI et al., 2015). Destacam-se também os resíduos de aminoácidos envolvidos na formação da *cavidade oxianiónica*, que consiste num bolsão crucial para estabilizar a carga negativa formada em um intermediário tetraédrico durante a catálise (Figs. 2A e 2B) (DEMIDYUK, et al., 2017). Entretanto, os resultados de experimentos cristalográficos sugeriram que as ETs são

proteoliticamente inativas ou que deve existir algum tipo de mecanismo de ativação. Especulou-se imediatamente que a remoção da extensão N-terminal atípica encontrada exclusivamente em ETs, e não em outras SPQT, era a responsável. Embora vários estudos tenham sugerido a ativação proteolítica das ETs, ainda carecem de informações conclusivas (BUKOWSKI et al., 2010). No geral, até ao início do século XXI, não estava disponível nenhuma evidência direta da atividade proteolítica dos ETs e especialmente da sua associação com a esfoliação da pele, embora vários fatos favorecessem esta hipótese.

Entretanto, foi observado que, na ETA, a ligação peptídica Pro192-Gly193 se encontra invertida 180° em relação ao valor típico encontrado em outras SPTQs (VATH et al., 1997). Devido a esta conformação incomum, o oxigênio carbonílico de Pro192 aponta diretamente para o grupo -OH de Ser195 e forma uma ligação H com ele (Fig. 2B), dificultando assim o acesso de substratos à cavidade oxianiônica (VATH et al., 1997). Portanto, a ativação catalítica da ETA requer que Pro192(O) adote a conformação padrão, um processo com uma barreira energética associada de ~3 kcal/mol, de acordo com cálculos de energia livre realizados para peptídeos contendo resíduos de prolina e glicina (CAVARELLI et al., 1997). Com base em análises estruturais, Vath e colaboradores hipotetizaram que a inversão de Pro192(O) para a orientação correta poderia ser promovida por um ativador cuja identidade ainda era desconhecida naquele momento e que desencadearia uma mudança conformacional na alça D (alça 143-153, Fig. 2A) ao interagir com a α -hélice do outro extremo (VATH et al., 1997). A importância dessa α -hélice para a atividade esterolítica e funcional da ETA foi posteriormente confirmada por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo* envolvendo variantes mutadas da toxina desprovidas de até os primeiros 20 resíduos N-terminais (CAVARELLI et al., 1997). Por outro lado, é importante notar que, além da conformação incomum da cavidade oxianiônica, algumas estruturas cristalinas da ETB apresentam a orientação típica de V192(O) (Fig. 2B) (BUKOWSKI et al., 2010). Da mesma forma, uma estrutura cristalina recente da ETE (PDB: 8DAX) (GISMENE et al., 2022) contém uma cópia da proteína com conformações opostas de Pro192(O) (Fig. 2B). Esses resultados sugerem a ocorrência de um equilíbrio dinâmico entre as duas conformações que, pelo menos para a ETB e a ETE, parece ser de alguma forma influenciado pelas condições de cristalização.

Outra toxina esfoliativa de interesse é a ExhC, expressa em certas cepas virulentas de *S. hyicus* e *S. sciuri*, e responsável pelas lesões cutâneas associadas à

epidermite exsudativa (EE) em suínos. Além disso, descobriu-se que ExhC induz necrose em múltiplas linhagens celulares de mamíferos, o que sugere que esta toxina pode desempenhar papéis adicionais durante infecções por *Staphylococcus*, além da esfoliação da pele (LI et al., 2011). Curiosamente, ExhC é o único ET que é conhecido por induzir necrose celular. No entanto, o papel de sua atividade necrótica *in vivo* permanece indefinido. Li et al. relataram que ExhC é um dímero em solução com base em cromatografia de exclusão de tamanho e eletroforese PAGE nativa (LI et al., 2011).

Somando-se à incerteza geral relativa ao mecanismo da atividade das ETs, foi desenvolvida outra teoria relativa ao modo de ação da toxina, simultaneamente com esforços para demonstrar a sua atividade proteolítica. Com base em informações sobre outras toxinas estafilocócicas, foi proposto que as ETs funcionam como superantígenos, proteínas que induzem a proliferação policlonal atípica de células T. De forma clássica, os antígenos processados pelas células apresentadoras de antígenos são expostos como peptídeos ligados a moléculas MHC-II e induzem seletivamente a proliferação de células T, que reconhecem especificamente o antígeno apresentado através do receptor de células T (TCR). Os superantígenos interagem diretamente com regiões invariantes do MHC-II e do TCR, induzindo a proliferação independente do antígeno de grandes populações de células T, resultando na desregulação da resposta imune (VAISHNANI, 2009). Os resultados iniciais relativos à suposta atividade superantígena dos ETs foram confusos e contraditórios. Os primeiros trabalhos de Morlock et al. e Choi et al. demonstraram a atividade mitogênica do ETA purificado a partir de sobrenadantes de culturas estafilocócicas. Foi testada a atividade em preparações de esplenócitos murinos, demonstrando que a ETA interage principalmente com células T e que sua mitogenicidade é semelhante à da enterotoxina A (MORLOCK et al., 1980). No outro estudo, ficou demonstrada a expressão elevada de uma variante específica do gene que codifica a cadeia β do TCR em células T humanas e murinas após sua interação com ETA (CHOI et al., 1989). Logo depois, outros pesquisadores sugeriram que os resultados obtidos pelos grupos de Morlock e Choi eram efeitos da contaminação da amostra com vestígios de enterotoxinas, demonstrando que a ETA recombinante isolado de cepas de *S. aureus* livres de superantígenos ou cepas de *E. coli* não tinha nenhuma atividade mitogênica quando avaliada em células mononucleares do sangue periférico humano e esplenócitos murinos. Os mesmos autores também demonstraram que a superantigenicidade de preparações comerciais das ETs poderia ser neutralizada com anticorpos direcionados

contra enterotoxinas A e B (FLEISCHER, 1992).

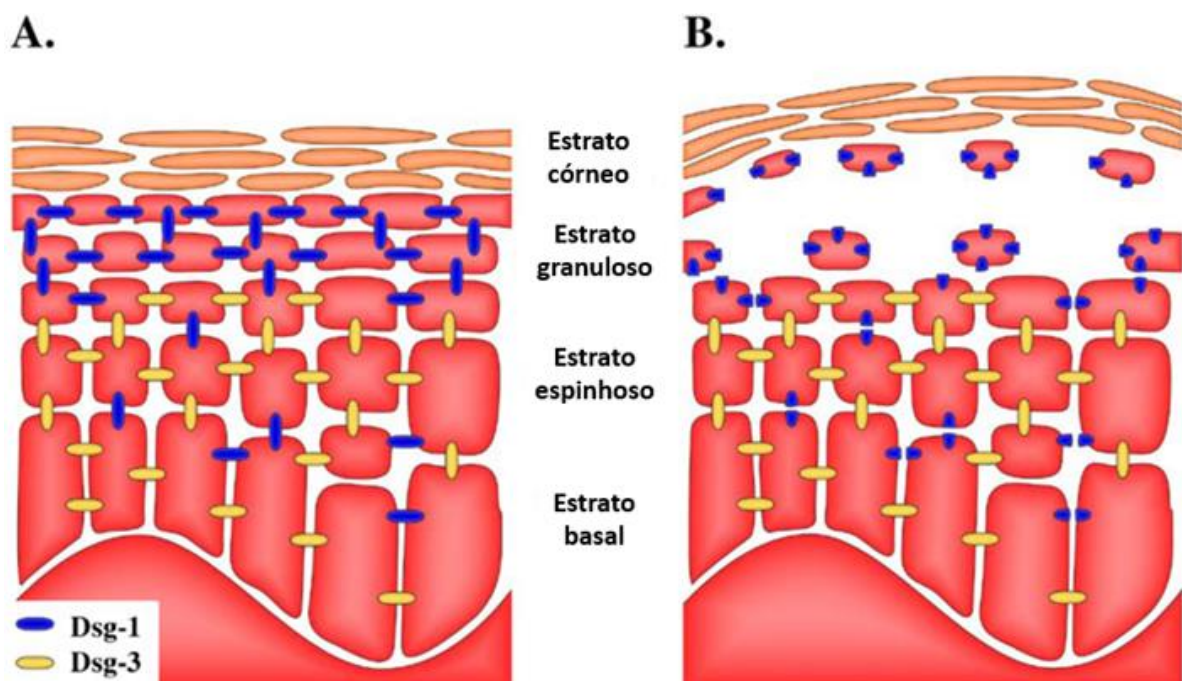
No entanto, relatórios posteriores indicaram que as ETs são verdadeiramente superantigénicos e que a sua atividade mitogénica é independente da sua atividade proteolítica. Neste sentido, foi demonstrado que tanto a toxina mutante de tipo wt quanto uma toxina proteoliticamente inativa purificada de cepas de *S. aureus* livres de superantígenos induziram a incorporação de timidina em linfócitos T humanos (VATH et al., 1997). Também, foram produzidos mutantes com atividade mitogénica modulada em outro estudo. Como exemplo mais marcante, a mutação Asp146Gly na alça D do ETA aboliu totalmente sua atividade mitogénica (RAGO et al., 2000). A atividade superantígenica de ETA e ETB altamente purificados também foi confirmada por Monday et al., que mostraram a expressão estimulada de genes específicos da cadeia β do TCR em células T humanas e esplenócitos de camundongos após tratamento com toxinas (MONDAY et al., 1999). Os mesmos autores apontaram que o ETB tinha atividade pirogénica significativamente maior do que o ETA em um modelo de coelho, onde a esfoliação não foi induzida e, portanto, os outros efeitos dos ETs poderiam ser facilmente distinguidos. No entanto, ambas as toxinas mostraram efeitos mais suaves do que o superantígeno clássico TSST-1 (MONDAY et al., 1999). Outros pesquisadores também confirmaram o efeito mitogénico significativamente menor dos ETs em comparação com os de outros superantígenos (NISHIFUJI et al., 2008). No geral, parece que se as ETs forem verdadeiramente superantigénicos (o que permanece controverso com base em evidências contraditórias), as suas propriedades mitogénicas seriam claramente mais fracas do que as de outras toxinas superantigénicas estafilocócicas. Como as lesões SPEE não mostram evidência de recrutamento de células T (LADHANI et al., 1999), a suposta superantigenicidade das ETs provavelmente não está envolvida na patogénese do SPEE.

1.3 Alvo das toxinas esfoliativas na adesão celular da pele

A epiderme, que corresponde à camada mais superficial da pele, é um tecido epitelial multiestratificado com células justapostas, as quais funcionam como uma barreira de proteção contra a invasão de micro-organismos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018). A manutenção da estrutura tecidual por meio da adesão célula-célula é realizada por proteínas denominadas de desmogleínas (DsGs) e desmocollinas (DsCs) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018). As desmogleínas cruciais para a integridade da

epiderme (STANLEY; AMAGAI, 2006) possuem 4 isoformas (Dsg1 a Dsg4) descritas e apenas a Dsg1, proteína transmembrana formada por cinco ectodomínios (ECs) (Figura 3) (AOKI et al., 2005), é seletivamente reconhecida e hidrolisada pelas ETs, enquanto Dsg3 não é clivada (AMAGAI et al. 2000). Como Dsg1 é expressa em todos os estratos da epiderme e a Dsg3 é expressa apenas nos estratos espinhoso e basal (GETSIOS et al., 2004), nas camadas mais profundas da epiderme, a clivagem de Dsg1 por ETs é compensada pela presença de Dsg3, ou seja, a esfoliação ocorre apenas no estrato granuloso, onde Dsg3 não está presente (Figura 3), também indicando que a distribuição diferencial das isoformas de desmogleína (Dsg1 e Dsg3) na epiderme é induzida por ação das toxinas esfoliativas no estrato granuloso. (BUKOWSKI et al., 2010). Em todos os estratos, exceto o estrato granuloso, a hidrólise mediada por toxina esfoliativa da desmogleína 1 (Dsg1) é compensada pela desmogleína 3 (Dsg3). Dsg3 está ausente no estrato granuloso, o que explica o desprendimento celular e a divisão das camadas epidérmicas após a hidrólise de Dsg1.

Figura 3 Representação esquemática da distribuição de desmogleína em (A) pele saudável e (B) pele exposta às ETs..

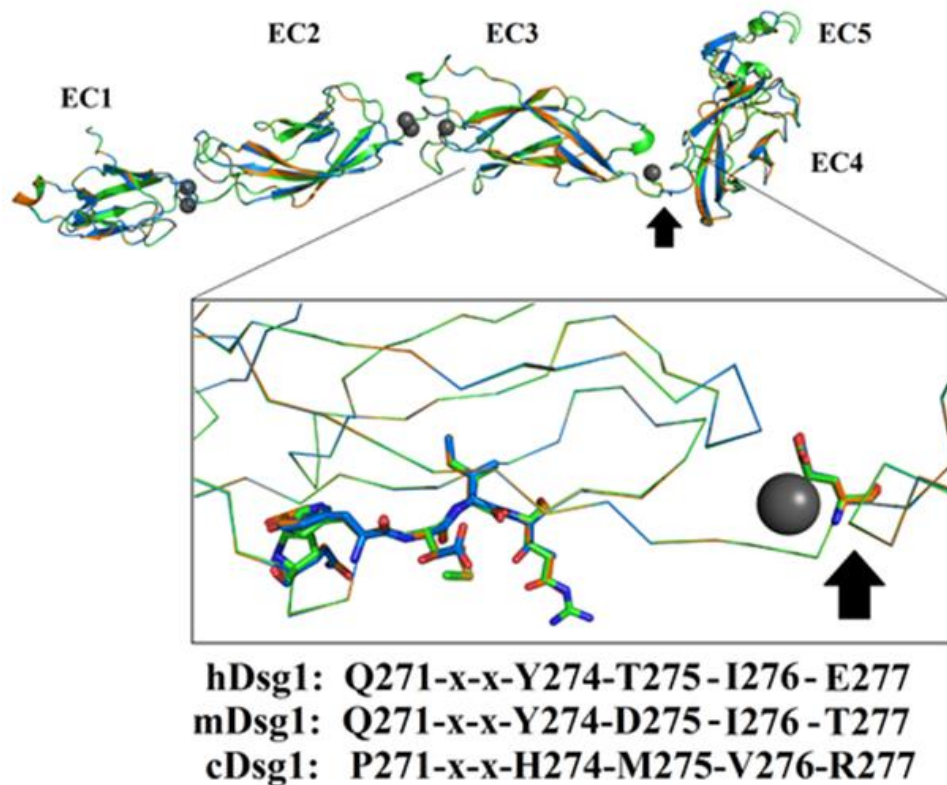


Fonte: BUKOWSKI et al., 2010.

A clivagem das Dsgs-1 pelas ETs promove desprendimento celular, característico de manifestações clínicas epidermolíticas, facilitando a propagação de

infecções microbianas (AMAGAI et al., 2002). Embora exista alta homologia estrutural entre as Dsgs1 de diferentes mamíferos, há também uma alta especificidade das ETs no reconhecimento e clivagem dos seus substratos (BUKOWSKI et al, 2010; MARIUTTI et al, 2017), o que ainda é pouco estudado e compreendido. Experimentalmente foi verificado que a ETA de *S. aureus* reconhece especificamente cinco resíduos de aminoácidos anteriores ao sítio de clivagem das Dsgs1 humana, murina e canina (Figura 4), e esses resíduos seriam cruciais para o acoplamento da enzima ao seu substrato. Entretanto, a hidrólise enzimática entre os resíduos Glu381 e G382 ocorre apenas nas Dsgs1 humana e murina, que possuem quatro resíduos de aminoácidos idênticos (HANAKAWA et al., 2004).

Figura 4. Sobreposição dos modelos estruturais indicando os 5 ectodomínios (ECs) de Dsg1 humana (laranja; hDsg1), Dsg1 canina (verde; cDsg1) e Dsg1 murina (azul; mDsg1). As esferas cinzas representam íons de cálcio e o ácido glutâmico (Glu381) do sítio de clivagem é indicado por uma seta preta. As sequências de aminoácidos da Dsg1 humana, murina e canina, 110 resíduos a montante do sítio de clivagem, estão destacadas. A letra x indica resíduos de aminoácidos das Dsgs1 considerados não cruciais para o reconhecimento e clivagem das Dsgs1 pela ETA.



Fonte: MARIUTTI et al., 2017.

As propriedades mencionadas anteriormente foram críticas para avaliar a influência das regiões distais da Dsg-1 na clivagem proteolítica. Hanakawa e colaboradores demonstraram que a atividade da ETA independe de os domínios EC4 e EC5 serem intactos ou não. Além disso, os autores mostraram que a substituição de cinco resíduos do domínio EC3 da Dsg-1 canina, localizados 110 resíduos antes do local de clivagem em direção ao extremo amino, por aqueles em posições equivalentes da hDsg-1 foi suficiente para promover a hidrólise (HANAKAWA et al., 2004). Portanto, é provável que a região que contém esses resíduos atue como um local de reconhecimento crítico, permitindo o posicionamento correto e/ou a ativação da ETA. Dancer e colaboradores relataram em 1990 que a pré-incubação da ETA com fenilmetilsulfonil fluoreto e diisopropilfluorofosfato, inibidores de largo espectro das SPTQs, não preveniu a esfoliação epidérmica em camundongos após administração subcutânea. No entanto, o aparecimento dos primeiros sinais de epidermólise após a inoculação da ETA foi atrasado na presença desses inibidores (DANCER et al., 1990). Como a enzima é ativada *in situ* após sua interação com a mDsg-1, há possibilidade de que os inibidores acessem a cavidade oxianiónica formada previamente, sendo assim, pode ser interpretados como dados que apoiam a necessidade da ativação prévia da cavidade oxianiónica da ETA para deixar a enzima suscetível à inibição. De fato, como a enzima é ativada *in situ* após sua interação com a mDsg-1, há uma possibilidade, ainda que pequena, de que os inibidores acessem a cavidade oxianiónica corretamente formada (DANCER et al., 1990). Isso, por sua vez, sugere que misturas de inibidores e ativadores podem reduzir a atividade proteolítica de ETs de forma mais eficiente (DANCER et al., 1990). Portanto, a compreensão aprofundada do mecanismo de ativação das ETs é necessária para planejar moléculas capazes de promover a inversão da orientação de P/V192(O) antes da ligação do inibidor (DANCER et al., 1990). Entretanto, as bases moleculares para a alta especificidade das ETs permanecem incompreendidas, dada não só à falta de informações estruturais sobre a interação dessas enzimas com os ligantes do sítio ativo, mas também, e principalmente, com seu substrato natural, a Dsg1.

1.4 Potenciais inibidores da atividade esfoliativa das toxinas

A combinação de técnicas computacionais com experimentos cuidadosamente planejados podem auxiliar na compreensão mais detalhada da regulação complexa

ETs em escala molecular, elucidando possíveis caminhos no desenho de inibidores da atividade esfoliativa. Em estudos recentes, ficou demonstrado que o peptídeo hormônio estimulante de beta-melanócitos (beta-MSH) é clivado por ETA e que tanto ETA quanto ETB são capazes de clivar alfa-MSH. Ambas as toxinas exibem clivagem em resíduos específicos de ácido glutâmico em peptídeos MSH (RAGO et al., 2000).

Inspirado nesse estudo, foram testados no nosso grupo dois peptídeos, alpha-MSH e alpha-MSH com o glutâmico invertido (L->D), o intuito de inverter a configuração do Glu-P1 foi tornar o peptídeo resistente à hidrólise e portanto um inibidor. Além disso, outra família de potenciais inibidores, agora de natureza orgânica, também foram testados previamente *in silico* e, os mais promissores, foram sintetizados e adquiridos para os testes inibição da atividade enzimática.

Ainda, o presente trabalho também trouxe resultados de possíveis ligantes peptídicos, selecionados *in vitro* por afinidade ao alvo (as toxinas esfoliativas), através de uma técnica de exibição de fagos, do inglês "Phage Display", que consiste na seleção de peptídeos a partir de uma biblioteca de fagos (New England Biolabs Inc.) que apresentam na parte externa do fago uma sequência de 7 aminoácidos aleatórios, enquanto o material genético que codifica cada variante reside no interior (CLACKSON; LOWMAN, 2004). Desse modo, cria-se uma ligação física entre cada peptídeo e a variante sequência de DNA que a codifica. Sendo assim, através de um processo de seleção *in vitro* chamado panning (CLACKSON; LOWMAN, 2004), é possível realizar o particionamento rápido com base na afinidade de ligação às ETs de *Staphylococcus aureus*. Em resumo, é possível que os ligantes peptídicos sejam selecionados por afinidade aos alvos e posteriormente identificados, fornecendo assim informação para o desenho de peptídeos mais eficientes na interação e ou inibição do potencial esfoliativo dessas toxinas.

Na literatura, já ficou demonstrado por experimentos utilizando produtos da New England Biolabs, que a identificação de sequências peptídicas contra uma variedade de proteínas, incluindo enzimas, receptores de superfície celular e anticorpos monoclonais, pode ser executada utilizando as diversas bibliotecas de fagos disponíveis. O sistema tem sido usado para inúmeras aplicações, incluindo mapeamento de epítomos (PETERS et al., 1994; ROWLEY et al., 2000), peptídeos antimicrobianos/virais (DIELTJENS et al., 2010), peptídeos específicos de material (SAWADA et al., 2009), aglutinantes de moléculas pequenas (SCHWEMMER et al., 2012; ZHAO, 2005) e novos substratos enzimáticos (SUGIMURA et al., 2006). As

bibliotecas de fagos têm sido amplamente utilizadas para a descoberta de peptídeos bioativos por meio de abordagens de seleção *in vitro* e *in vivo* (KELLY et al., 2008). Todavia, a prospecção de possíveis moléculas inibidoras do potencial esfoliativo das ETs, seja por meio da técnica Phage Display ou por Dinâmica Molecular (MD), pode direcionar estratégias para mitigar os efeitos epidermiolíticos das toxinas esfoliativas de *Staphylococcus aureus*.

2. OBJETIVOS

1. O objetivo geral deste trabalho foi expressar e purificar a ETA, ETE e ExhC wt, para a realização de ensaios de cristalização, inibição do potencial esfoliativo e co-cristalização com ligantes promissores, buscando elucidar questões moleculares de interação da enzima com seu substrato (Dsg1).

2. Como objetivos específicos desta pesquisa, destaca-se:

- Caracterização da atividade catalítica da ETA;
- Identificação dos resíduos de aminoácidos envolvidos no processo de especificidade fina das enzimas de *S. aureus* e a Dsg1;
- Testes *in vitro* de possíveis inibidores do potencial esfoliativo das toxinas esfoliativas de *S. aureus*;
- Bioprospecção de peptídeos mais eficientes na interação com a enzima e ou inibição do potencial esfoliativo das ETs, através da técnica “Phage Display”;
- Co-cristalização da ETA com os inibidores mais promissores, visando encontrar as melhores condições para a resolução das suas estruturas tridimensionais, no intuito de elucidar os mecanismos moleculares de reconhecimento e clivagem das toxinas.

3. JUSTIFICATIVA

Embora *S. aureus* faça parte da microbiota dos seres humanos, essa bactéria também corresponde a um problema de saúde pública global, principalmente envolvendo ambientes hospitalares (CAVALCANTI et al., 2005). É importante ressaltar que, apesar de a SPEE ser tratada com sucesso na maioria dos casos com antibióticos existentes, cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos e codificadoras de ETs já foram isoladas de pacientes doentes. (CAVALCANTI et al., 2005). Portanto, além da identificação de novos antibióticos, a busca concomitante de fármacos contra as ETs pode auxiliar na atenuação da gravidade dos quadros de SPEE. Todavia, apesar de toda a disponibilidade de várias estruturas cristalinas dessas toxinas e dados experimentais, as técnicas de modelagem molecular ainda não foram empregadas com o fim de elucidar os mecanismos moleculares de reconhecimento fino ao substrato Dsg1. Desse modo, mesmo com um escopo de dados descritivos sobre o assunto, estudos da compreensão dos mecanismos de interação molecular "entre sítios secundários/sítio ativo/substrato alvo", podem abrir caminho para uma compreensão mais detalhada da regulação complexa da atividade das ETs em escala molecular. Isso, por sua vez, promoverá a descoberta de possíveis drogas/inibidores cada vez mais eficientes na prevenção das lesões cutâneas causadas por essas proteases.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Vetores de expressão em *Escherichia coli*

Inicialmente, três alvos foram analisados: a ExhC de *S. sciuri*, ETE e ETA de *S. aureus*. A ExhC e ETA foram sintetizadas pela FastBio em plasmídeos pET-28a(+), enquanto a ETE foi sintetizada em plasmídeo pD441. Essas proteínas alvo foram fusionadas a uma cauda de histidina (His-tag) e sítio de clivagem para a TEV-protease como pode ser visualizado na Figura 5, com as sequências das proteínas ETA, ETE e ExhC wt. A cauda de poli-His e o sítio de clivagem TEV protease foram adicionados para permitir a purificação da proteína por cromatografia de afinidade de Ni²⁺-Sepharose e posteriormente remover a cauda, se necessário, respectivamente.

Figura 5. Sequência de proteína ExhC (I), ETE (II) e ETA (III) com uma cauda de poli-His (amarelo) e um sítio de clivagem TEV protease (ciano).

(I)

MDEESDLKDHRDKWNKYYGVSPDQLSKDLFDKVSPEQIKNSPYQSVGRLNVQGEA
VATGVFIGKNTVVTNHIAKEAKNNPSKIIFSPGRHADESNTGTVLPHGTFEASEIIDA
PFGTGVDISVIIFKPNAEGKSIGDVIKAADLGNSNSLKKGDTANLIGYPYDFDSKNMY
RSQVEFQSTDFGLKYYGYTPGNSGSGIFNSEGKFVGLHIGKAKHINSQNEINYAVS
FNDFLIRDLKQLIKGGENLYFQSHHHHHH

(II)

HHHHHHENLYFQSMGSSMIEYTDEEIQKKRDFFKTRPSDSELFSKIQDTTRSPYSSV
GTVFVKGKTIATGILIGKNTVITNKHIARLAENDPNKVIFTPGSTRDEGSLVKKPFGE
FIAEEINEAPYGGGTDLSIIKLKPNQYGKSAGDLVTPAAIPDNVDVQKGDKISLLGYPY
NTSTHSLYKSQIEVFNNQTFQYFAYTEPGNSGSGIFNLHGELVGIHSGKGGQYGLPF
GILFNRQIGSSYSTDKTVTTLAIDLKNAKTQE

(III)

HHHHHHENLYFQSMGGEVSAEEIKKHEEKWNKYYGVNAFNLPKELFSKVDEKDRQ
KYPYNTIGNVFVKGQTSATGVLIGKNTVLTNRHIAKFANGDPSKVSFRPSINTDDNG
NTETPYGEYEVKEILQEPFGAGVDLALIRLKPQNGVSLGDKISPAKIGTSNDLKDGD
KLELIGYPFDHKVNQMHRSEIELTTLRGLRYYGFTVPGNSGSGIFNSNGELVGIHS
SKVSHLDREHQINYGVGIGNYVKRIINEKNELE

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Análise da sequência primária das proteínas de estudo

A análise da sequência primária das proteínas de estudo – ExhC de *S. sciuri*, ETE e ETA wt de *S. aureus* – foi feita utilizando o programa ProtParam (web.expasy.org/protparam/), localizado a partir do servidor ExPASy (ca.expasy.org/). O programa ProtParam é uma ferramenta que permite a análise computacional de vários parâmetros físicos e químicos da proteína de estudo a partir da sequência de resíduos de aminoácidos. Esses parâmetros são importantes para avaliar quais métodos experimentais serão utilizados para a expressão e purificação proteica.

4.3 Transformação bacteriana

Linhagens celulares competentes de *E. coli* C43(DE3), C41(DE3), BL21(DE3), BL21 Star-pLysS, BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, BL21(DE3)-T1, Origami, Rosetta, Rosetta-pLysS e NovaBlue(DE3), foram utilizadas em experimentos de transformação celular para encontrar o melhor rendimento da produção em larga escala das proteínas ExhC wt, ETE wt e ETA wt. Inicialmente 80 ng de plasmídeos (adquiridos através da empresa FastBio) foram adicionados a 50 µL de solução contendo células competentes. Essa mistura permaneceu no gelo durante 30 minutos, e então, foi submetida ao choque de temperatura a 42 °C por 1 minuto seguida de 2 minutos no gelo. Após esse procedimento, foram adicionados 450 µL de meio líquido SOC e as bactérias foram submetidas a agitação a 250 rpm por 1 hora a 37 °C. Em seguida, as bactérias foram plaqueadas em meio sólido seletivo LB contendo canamicina (50 mg/ml). As colônias obtidas foram inoculadas em tubos individuais contendo 10 ml de meio líquido LB seletivo sob agitação e aeração constantes e utilizadas para expressão e purificação em pequena escala. Posteriormente, as amostras da ExhC wt, ETA wt e ETE wt após a purificação por cromatografia de exclusão molecular (Superdex G75 10/300) e a purificação com cromatografia de afinidade por íons imóveis (Ni-Sepharose), foram aplicadas em SDS-PAGE 15% para a confirmação da presença das proteínas recombinantes pela metodologia do *Western blot*.

4.4 Expressão das proteínas alvo

As colônias isoladas e/ou estoques de *E. coli* transformados com vetores contendo os genes codificadores da ExhC wt, ETE wt e ETA wt foram cultivadas por 16 horas a 37 °C em meio LB contendo canamicina (30 µg/ml) e o antibiótico de resistência de cada linhagem celular. Posteriormente, essas culturas foram diluídas 100 vezes em meio LB fresco contendo os antibióticos e incubadas a 37 °C até a densidade óptica (D.O. 600 nm) atingir 0,6, obtida em espectrofotômetro Biomate 3S (*Thermo Fisher Scientific*). Após atingir essa densidade, as culturas contendo os vetores dos genes codificadores da ExhC e ETE selvagens foram induzidas com 0,3 mM de IPTG (Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo) e mantidas a 30 °C sob agitação durante 5 horas. No entanto, a cultura contendo o vetor de expressão da ETA wt foi induzida com 0,3 mM de IPTG e mantida a 16 °C por 20 horas e 20 °C por 16 horas. As culturas foram centrifugadas a 5000 x g durante 10 minutos a 4 °C, os sobrenadantes foram descartados e as células precipitadas contendo as proteínas alvo foram suspensas em tampão de lise 50 mM Fosfato de Sódio; 400 mM de NaCl; 10% de glicerol e 10 mM de Imidazol (pH: 7,5). Após a adição do tampão, as células foram submetidas ao processo de lise celular por sonicação (4 pulsos de 40 segundos), e centrifugadas a 15.000 x g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado para a realização das etapas de purificação.

4.5 Purificação das proteínas alvos

A primeira etapa de purificação das proteínas recombinantes foi por cromatografia de afinidade em Ni-Sepharose (*GE healthcare*) e posteriormente, em uma segunda etapa, os contaminantes das amostras contendo as proteínas ExhC wt, ETE wt e ETA wt foram removidos por meio da cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex G75 10/300 (GE) utilizando o sistema AKTA-pure.

4.5.1 Cromatografia de afinidade por Ni-Sepharose

A purificação em coluna de afinidade utilizando resina Ni-Sepharose (*GE healthcare*) foi realizada conforme instruções do fabricante. Primeiramente, um volume de 2 ml de resina (Ni-Sepharose – *GE healthcare*) presentes em cada coluna de cromatografia de afinidade, foram equilibradas com o mesmo tampão utilizado no processo de lise das células cultivadas. Em seguida, cada coluna de purificação (coluna de gravidade Bio-Rad) foi carregada com o sobrenadante do lisado celular obtido após centrifugação, para que as proteínas recombinantes fossem adsorvidas. Após a adsorção, a resina foi lavada utilizando tampões de lavagem com aumento gradativo da concentração de Imidazol, buscando remover contaminantes adsorvidos de forma inespecífica. Primeiramente, um volume de 10 ml de tampão de lise foi adicionado em cada coluna. O aumento gradativo de Imidazol iniciou-se com uma primeira lavagem de 10 ml de uma solução contendo 50 mM de Fostato de Sódio; 400 mM de NaCl; 10% de glicerol e 40 mM de Imidazol (pH: 7,5), seguida de uma segunda lavagem de 10 ml de uma solução contendo 50 mM de Fosfato de Sódio, 400 mM de NaCl, 10% de glicerol e 60 mM de Imidazol (pH 7,5). A terceira lavagem foi feita com 5 ml de uma solução contendo 50 mM de Fosfato de Sódio, 400 mM de NaCl, 10% de glicerol e 80 mM de Imidazol (pH 7,5). Por fim, para a eluição total das proteínas alvo, foi adicionado 15 ml de uma solução contendo 50 mM Fostato de Sódio; 400 mM de NaCl; 10% de glicerol e 400 mM de Imidazol (pH: 7,5). Todas as amostras obtidas por meio das diferentes lavagens com variações crescentes na concentração de Imidazol, foram coletadas e analisadas em gel de SDS-PAGE 15%, para verificar em qual delas as proteínas alvo foram eluídas.

4.5.2 Cromatografia de gel filtração

As amostras contendo as proteínas ExhC wt, ETE wt e ETA wt obtidas a partir da purificação por cromatografia de afinidade, foram concentradas em dispositivos para concentração em centrífuga (*Amicon Ultra Centrifugal Filters* - 10 kDa) e submetidas à segunda etapa de purificação por gel filtração em coluna Superdex G75 10/300 (GE) equilibrada com tampão 20 mM de Tris HCl e 100 mM de NaCl em pH 7,5, utilizando o sistema AKTA-pure (*GE-Healthcare Life Sciences*).

As amostras referentes aos picos do cromatograma foram coletadas e analisadas por meio do gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%).

Essa etapa de cromatografia também está sendo utilizada, juntamente com outras metodologias experimentais, para avaliar o estado oligomérico das proteínas alvo em diferentes soluções tamponantes, uma vez que a cromatografia de gel filtração separa as biomoléculas por tamanho molecular. Amostras contendo 15 mg/mL de proteínas alvo - ETA wt - após purificação, foram dialisadas em diferentes soluções tampões (Tabela 1) e submetidas a gel filtração com um fluxo de 0,7 mL por minuto usando a coluna Superdex G75 10/300 GL (GE) no sistema AKTA-pure (GE-Healthcare Life Sciences) e a absorbância foi monitorada por meio da avaliação do comprimento de onda de 280 nm.

4.6 Diálise das proteínas alvo

A fim de caracterizar biofisicamente a ETA wt de *S. aureus*, após as etapas de purificação, as amostras das proteínas alvo, foram concentradas em dispositivos e dialisadas em diferentes soluções tampões (Tabela 1) em uma temperatura constante de 4 °C, utilizando a membrana de diálise a Fischerbrand (MWCO 6.000-8.000). Primeiramente, foram realizadas duas diálises de duas horas cada, e posteriormente, essas amostras foram dialisadas por 16 horas. As variações nas soluções tamponantes foram necessárias de acordo com as condições dos experimentos realizados (Tabela 1).

Tabela 1. Tampões utilizados para a diálise da proteína alvo de acordo com condições experimentais. Cromatografia de exclusão molecular (SEC); Dicroísmo Circular (CD) e Viabilidade celular (ensaios de MTT).

TAMPÃO	SAL	pH	Experimentos
20 mM Fosfato de Sódio Monobásico	100 mM de NaCl	8,0	SEC
20 mM Tris Hidroclorato	100 mM de NaCl	7,5	SEC
20 mM Tris Hidroclorato	150 mM de NaCl	7,5	SEC
20 mM MES	150 mM de NaCl	5,5	SEC
5 mM Dihidrogenofosfato de Sódio	50 mM NaF	7,4	CD
10 mM Na_2HPO_4 + 1,8 mM KH_2PO_4	137 mM NaCl + 2,7 mM KCl	7,4	Viabilidade Celular (MTT)

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15%

Para a verificação das etapas de purificação foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE 15%), possibilitando a separação das proteínas de acordo com a massa molecular. Primeiramente, a proteína purificada foi transferida para microtubos, desnaturada em tampão de amostra 3x (Tris HCl 0,5 M pH 6,8; SDS 10%; β -mercaptoetanol; glicerol; azul de bromofenol; água q.s.p.), posteriormente fervida por 3 minutos e 10 μ L do sobrenadante foram aplicados em gel de poliacrilamida 15%, assim como o marcador molecular. O gel de poliacrilamida foi previamente preparado e incubado juntamente com o tampão de corrida (25 mM Trisma Base, 250 mM Glicina, SDS 10% e água q.s.p.), que permite que o pH permaneça neutro. A eletroforese foi conduzida por aproximadamente 90 minutos à 100 V no aparelho Protean II, à uma corrente elétrica de 130 mA e 50 Watts. Após esse procedimento, o gel foi fixado e corado em mistura contendo metanol, água, ácido acético (50:50:10) e Comassie Blue 0,25% por 10 horas e descorado com metanol e água (1:1), permitindo a visualização do resultado.

4.8 Western blot

Para o procedimento, as amostras foram misturadas com tampão de amostra (1:1) e aplicadas em gel SDS-PAGE 15%. As proteínas contidas no gel foram transferidas para a membrana de nitrocelulose a partir de um eletrotransferidor (*Mini TransBlot Electrophoretic Transfer Cell Bio-Rad*) operando sob voltagem constante (100 V) por 2 horas. O tampão de transferência utilizado foi o Tris-Glicina (Tris 0,025 M, Glicina 0,192 M) contendo metanol 20%. A membrana foi incubada com antissoro monoclonal Antipoli-histidina diluído 1:10.000 (produzido em camundongo; Sigma) e posteriormente com antissoro secundário anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Sigma) diluído 1:30.000. A detecção da reação antígeno/anticorpo foi feita com a mistura de BCIP/NBT (*5-bromo-4chloro-3-indolylphosphate/nitro-bluetetrazolium*) até o aparecimento do resultado da reação (coloração azul púrpura) que ocorre apenas na presença da fosfatase alcalina.

4.9 Aquisição de compostos potencialmente inibidores

Os esforços computacionais foram obtidos através de dinâmica molecular (MD) e cálculos de energia livre MM-GBSA pelo Dr. Jorge Henrique Gonzalez, para o delineamento de compostos carbônicos e peptídicos com potencial promissor de inibição da ação das ETs, bem como testes *in vitro* dos melhores inibidores. .

O trabalho computacional concentrou os esforços iniciais para a identificação do modo de ligação de peptídeos que mimetizam a alça que liga os ectodomínios 3 e 4 da Dsg1 humana com a ETs. A partir dos resultados obtidos com o emprego de técnicas como simulações de DM e cálculo de energia livre, foram propostas estruturas de complexos das ETs com os peptídeos mencionados. Uma primeira tentativa de observar a inibição da ETA com os peptídeos desenhados foi realizada adquirindo análogos do alfa-MSH.

Posteriormente, a conformação da ETA ligada aos peptídeos foi utilizada para realizar triagem virtual de compostos carbônicos contendo grupos carboxílicos no sítio ativo da enzima. Após análise computacional, os melhores candidatos foram adquiridos da companhia Enamine Ltd e testados *in vitro*.

Já o “peptídeo linear 1” (CGGGSIPYMEQSSYTIEIQENTLNSGGGC) foi planejado para mimetizar a sequência da hDsg-1 que se liga na ETA, sendo adquirido de estudos anteriores de Mariutti et al, 2012.

4.10 Dicroísmo Circular (CD)

Para a determinação dos componentes de estrutura secundária, foram realizados experimentos de dicroísmo circular (CD) com a proteína ETA. Os espectros UV-CD foram coletados no espectropolarímetro Jasco J-710 (Jasco, Brasil) em temperatura constante de 25 °C e utilizando uma cubeta de quartzo de 0,5 mm. Para a coleta, foi utilizado o intervalo de 190-260 nm, com varredura de 50 nm/min, tempo de resposta de 1 segundo, largura de banda espectral de 1 nm, resolução espectral de 0,2 nm e número de acumulações igual a 10. Após a obtenção dos dados, todos os espectros de CD registrados em miligraus, foram corrigidos, subtraindo o espectro da solução tampão (5 mM NaH₂PO₄ e 50 mM NaF, pH 7,4) obtido em condições idênticas, e convertidos em elipticidade molar em unidades de deg·cm²·dmol⁻¹ pelo software

OriginLab. As porcentagens das estruturas secundárias foram estimadas pelo software CONTINLL do pacote de programas de deconvolução espectral CDPPro, utilizando o conjunto de referências de proteínas SP29. Os valores de Desvio Quadrático Médio da Raiz (RMSD) foram determinados e avaliados.

4.11 Ensaios de cristalização e co-cristalização

A proteína esfoliativa ETA, foi purificada e concentrada utilizando dispositivos Amicon Ultra Centrifugal Filters até atingir a concentração de aproximadamente 17 mg/ml. A enzima já apresenta sua estrutura resolvida e publicada, sendo assim, submetemos a ETA a ensaios de cristalização utilizando a técnica de hanging drop utilizando o precipitante PEG 4000 18%, 1% DMSO e pH 7.0, como descrito (CAVARELLI et al, 1997). Após o sucesso do crescimento dos cristais da ETA wt, a proteína foi submetida a ensaios de co-cristalização de forma que a proteína foi pré incubada com possíveis ligantes e submetida às mesmas condições, anteriormente citadas, e, apresentou cristais de tamanhos adequados para difração de raios X.

A incubação foi realizada por 16h a 5°C e a proporção de ligante:proteína foi 2:1. A princípio os ligantes testados foram os peptídeos alpha-MSH e D-alpha-MSH (Genscript), e com base nas triagens dos resultados de Phage Display (BioLabs) como descrito no item 5.11, também com os peptídeos: CSRSTHASC (sequência contida na proteína Dsg-4 de *Mus musculus*) e CDIYGTEQC (sequência contida na proteína Protocadeirina 15 humana), sintetizados pela empresa Genscript (contendo ponte dissulfeto entre as Cys 1 e 9).

Os compostos carbônicos que se mostraram os inibidores mais promissores em testes de atividade enzimática (como demonstrado na Tabela 9) também foram submetidos a ensaios de co-cristalização como citado acima.

4.12 Ensaios Enzimáticos

4.12.1 Ensaios de atividade enzimática e de inibição por peptídeos

A atividade esterolítica de ETA contra o substrato sintético BocL-Glu-↓OPh foi determinada conforme relatado anteriormente (RAGO, et al. 2000). Resumidamente, foram preparadas soluções com volume total de 800 µL, contendo ETA e ETA +

inibidor (foram testados dois possíveis moduladores da atividade proteolítica: o peptídeo D-alpha-MSH descrito no item 5.8; também o peptídeo linear 1 (CGGGSIPYMEQSSYTIEIQENTLNSGGGC, descrito por Mariutti et al, 2012), cada uma na concentração final de 1 µg/mL, 1-4 dioxano (Sigma) 2% (v / v) e variáveis concentrações de BocL-Glu-↓OPh (1,0, 5,0, 10,0, 15,0 e 20,0 mM) dissolvidas em tampão HEPES 50 mM pH 7,4. O progresso da reação foi acompanhado pela medição da absorbância em $\lambda = 270$ nm e $T = 37^\circ\text{C}$ a cada 15 s por 20 min com um espectrofotômetro Cary UV-Vis Compact Peltier (Agilent) disponível no ICMBio. Cada condição foi ensaiada em triplicado. As velocidades iniciais foram estimadas encontrando as pendentes dos dados de absorbância versus tempo por meio de regressão linear. Em seguida, os parâmetros cinéticos para definir a atividade enzimática da ETA wt foi estimado usando o método de linearização Hanes-Woolf (HANNES, 1932).

4.12.2 Ensaios de atividade enzimática e inibição por compostos carbônicos

Já os ensaios *in vitro* dos compostos carbônicos foram executados por Raphael J. Eberle e Mônica A. Coronado do Institute of Biological Information Processing (IBI-7, Structural Biochemistry), Forschungszentrum Jülich, Jülich, Germany, em um leitor de placas Infinite 200 PRO (Tecan) e empregando placas Greiner 96-Well (transparente).

O ensaio de atividade da ETA e ExhC foi utilizando uma solução estoque do substrato sintético BocL Glu-↓OPh 500 mM foi preparada (dissolvida em 100% DMSO). Diferente dos experimentos anteriores, nos quais 1-4 Dioxano foi usado para dissolver BocL-Glu-↓OPh. A troca de solvente ocorreu porque a maioria dos compostos propostos como inibidores (Tabela 8) são solúveis em DMSO. O tampão de ensaio continha HEPES 50 mM pH 7,4. O volume da mistura de reação na placa de 96 poços era de 200 µl e consistia em 1 µg/ml de ETA. Para identificar a concentração ideal de substrato, foram tituladas diferentes concentrações (2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5, 20 e 22,5 mM). A absorbância a 270 nm foi medida em intervalos de 20 segundos durante 20 minutos usando um leitor de placas Infinite 200 PRO e a temperatura foi ajustada para 37 °C.

Para o ensaio de inibição, foi utilizado o ensaio de atividade descrito anteriormente. Soluções de estoque compostas de 10 mM, dissolvidas em 100 % DMSO foram preparadas. Durante o teste primário, a concentração do composto foi ajustada para 50

μM . A sequência de pipetagem foi tampão, proteína, composto e substrato. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados são apresentados como $\text{media} \pm \text{Desvio Padrão (DP)}$.

4.12.3 Titulação de composto e determinação de IC_{50}

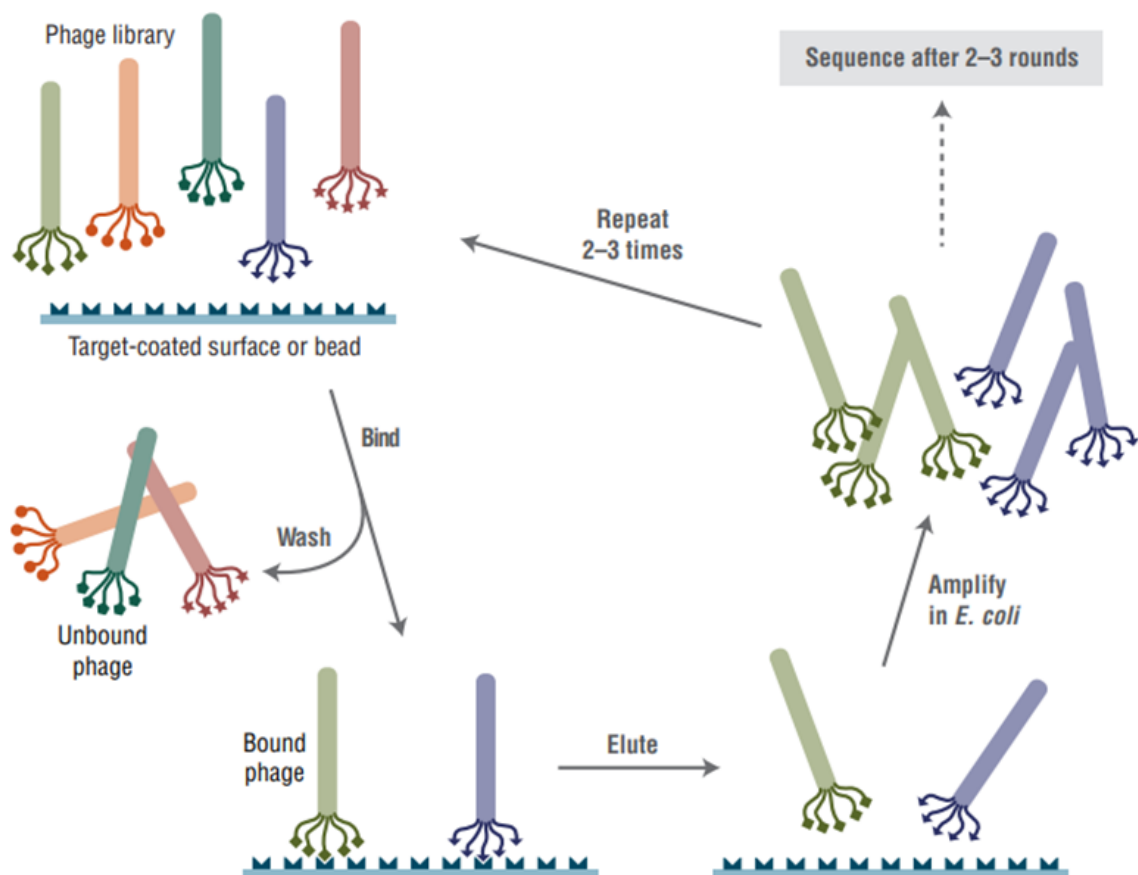
Os ensaios foram realizados utilizando 0 a 100 μM (Compostos designados pelas letras A, G e M demonstrado na tabela 8) e 0 a 175 μM (Compostos designados pelas letras H e J demonstrados na tabela 8) titulados para investigar o efeito inibidor dependente da dose contra ETA e ExhC, gerando uma curva “dose-resposta” sobre valores de IC_{50} correspondentes. A IC_{50} consiste na concentração de um composto inibidor em contato com a toxina, capaz de inibir a atividade enzimática em um 50% (metade). O eixo X apresenta a concentração da droga em escala logarítmica, e o eixo Y demonstra a unidade de medida da função biológica: a atividade enzimática sobre o substrato sintético BocL-Glu- $\downarrow$ OPh. Os cálculos de IC_{50} foram realizados através do software o GraphPad Prism 6.0 (GRAPHPAD, 2015).

4.13 Exibição de fagos com biblioteca de peptídeos (Phage Display)

A técnica foi realizada utilizando bibliotecas de bacteriófagos disponibilizadas pela BioLabs, que contêm aproximadamente 10^{13} peptídeos. Ocorreu uma seleção de peptídeos baseados na biblioteca de fagos com sequências de 7 aminoácidos de comprimento e com pontes dissulfeto nos extremos (Ph.D.-C7C), com o alvo sendo a ETA wt, buscando identificar ligações de peptídeos em sítios secundários das proteínas, que podem ou não atuar na modulação da atividade enzimática.

Foram realizados três ciclos de seleção, delineando as sequências com alta afinidade a ETA wt, os chamados “Múltiplos ciclos de biopanning”. o que consiste na incubação da biblioteca de peptídeos exibidos em fagos (biblioteca Ph.D.-C7C) na placa de alta ligação Greiner revestida com o alvo (ETA), seguido de sucessivas lavagens do fago não ligado e eluição do fago especificamente ligado (como pode ser exemplificado na Figura 6).

Figura 6. Processo de biopanning com uma biblioteca de peptídeos pentavalentes exibida. A estrutura alvo é fixada na placa de alta ligação (que no caso deste trabalho são as ETs), e na sequência expor a biblioteca de fagos selecionada sobre o alvo. Após isso, inicia-se a lavagem da superfície para eliminar os fagos com baixa afinidade, e na sequência os fagos que ficaram aderidos após a lavagem apresentam uma maior afinidade pelos alvos. Esses foram eluídos e posteriormente amplificados. A repetição desse processo de 2 a 3 vezes promove a seleção dos fagos de alta afinidade.



Fonte: New England Biolabs, 2022.

Para cada etapa de seleção, os poços da placa de alta ligação foram sensibilizados por 30 minutos com 30 pM de proteína e dissolvidos em 100 µL de tampão Acetato de Sódio 10 mM pH 5,2. Em seguida, a solução contendo os alvos foi removida e 100 µL de tampão de extinção foram adicionados por 30 minutos. A solução tampão de extinção variou de acordo com o alvo, e 1 M Etanolamina*HCl pH 8,5 foi usado para a proteína. Posteriormente, esta solução foi descartada e 100 µL de tampão de bloqueio (25 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,5 e 1% BSA) foram adicionados por 30 minutos. O descarte do tampão de bloqueio foi seguido por três

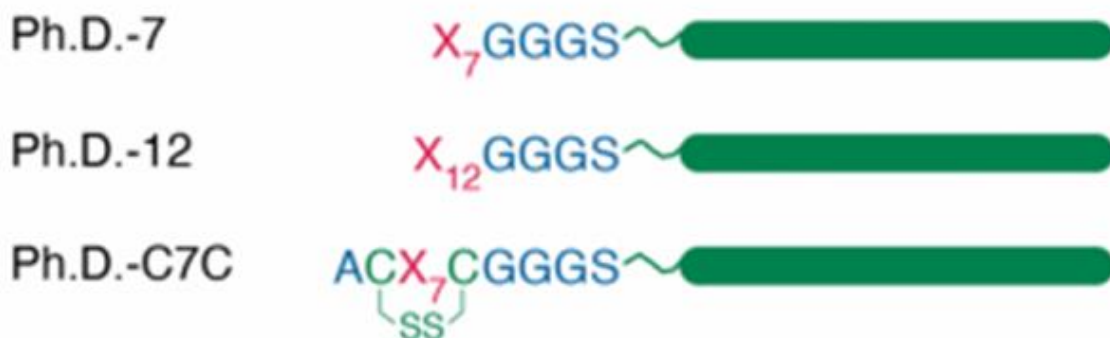
lavagens usando 200 μ L de tampão de lavagem (25 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,5 e 0,1% BSA). Em seguida, os alvos foram incubados com 100 μ L da biblioteca Ph.D.-C7C (Creative Biolabs, Shirley, EUA) por 30 minutos. Após a incubação, iniciou-se a etapa de biopanning: foram realizadas cinco lavagens com Tampão de Lavagem para cada poço, no primeiro ciclo de seleção, enquanto no segundo e terceiro ciclos foram realizadas 10 lavagens em cada uma. O objetivo desta etapa foi garantir a remoção dos fagos que não interagiram com os alvos e os fagos altamente interativos foram eluídos pela adição de 100 μ L de solução 0,2 M de Glicina-HCl pH 2,2 por 10 minutos. A neutralização desta solução de baixo pH foi realizada com 25 μ L de 1 M Tris pH 9,0, o que garantiu a obtenção de 125 μ L do eluato não amplificado de cada alvo (T). Todas as etapas foram realizadas em temperatura ambiente (RT) e com grupos controle de bactérias não infectadas pelos fagos. A etapa de amplificação dos fagos selecionados foi realizada a partir de *E. coli* - ER2738 em 20 mL de meio de cultura LB contendo tetraciclina (20 mg/mL), individualmente para cada eluato não amplificado. Depois de atingir uma OD de 600 e incubado com 120 μ L de cada eluato não amplificado foram adicionados a culturas bacterianas e incubadas por 4 horas sob agitação constante a 37 °C. Em seguida, as culturas foram centrifugadas a 4°C a 5.000 rpm por 20 minutos e os sobrenadantes foram transferidos para tubos estéreis contendo uma solução de 7 mL de PEG 8.000 a 25% e NaCl 2,5 M (PEG/NaCl). As soluções foram incubadas durante a noite a 4°C para precipitar os fagos amplificados e então centrifugadas a 5.000 rpm por 1 hora a 4°C para descartar os sobrenadantes. Os fagos foram então ressuspensos em 1 mL de tampão de seleção (HEPES 25 mM e NaCl 150 mM, pH 7,5) e precipitados novamente com 200 μ L de PEG/NaCl por 1 hora em gelo. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm a 4°C e os sobrenadantes foram descartados. Os precipitados foram ressuspensos em 100 μ L do tampão de seleção, obtendo-se assim os fagos amplificados. A concentração de cada fago amplificado foi medida com UV-VIS-Spektrophotometer UV-1800 (Shimadzu Deutschland GmbH) usando um comprimento de onda de 220 e 340 nm. As diluições dos fagos amplificados foram realizadas para garantir a concentração de $1.66.10^{11}$ partículas virais por mL, a ser utilizada no segundo e terceiro ciclo de seleção com os respectivos alvos: ExhC, ETE e ETA.

Já para avaliar se os peptídeos acoplados aos capsídeos virais estavam interagindo com os alvos ETA, ETE e ExhC, foi realizada a titulação de fagos durante as três etapas de seleção de exibição de fagos com a biblioteca Ph.D.-C7C, após a

etapa de eluição, 1 μL de cada o eluato obtido foi utilizado em experimentos de titulação entre 10^{-3} a 10^{-11} . As diluições seriadas foram incubadas com 100 μL de *E. coli* - ER2738 em 0,6 OD 600 e semeadas em meio LB contendo IPTG (0,5 mM) e X-gal (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) juntamente com 800 μL de Agarose Top. Após incubação em estufa por 16 horas a 37 °C, as colônias azuis foram contadas para avaliação do sucesso experimental.

As etapas anteriormente descritas utilizaram a biblioteca de fagos de peptídeos mencionadas anteriormente: Ph.D.-C7C, e os peptídeos foram classificados em termos de afinidades com base nos resultados de bioprospecção. O segmento aleatório da biblioteca Ph.D.-C7C é flanqueado por um par de resíduos de cisteína (Figura 7), que são oxidados durante a montagem do fago a uma ligação dissulfeto, resultando na apresentação dos peptídeos exibidos ao alvo como alças. A seleção de afinidade de bioprospecção foi baseada em ciclos repetidos de incubação, lavagem, amplificação e re-seleção do fago ligado.

Figura 7. Bibliotecas de peptídeos disponíveis no NEB (New England Biolabs). Segmentos randomizados e sequências de linker são indicados.



Fonte: New England Biolabs, 2022.

4.13.1 Extração de DNA e PCR

Dez microlitros dos fagos amplificados, obtidos de experimentos de exibição de fagos com alvos ExhC, ETE e ETA foram misturados com 90 μL de TBS 1X mais 200 μL de PEG /NaCl e incubados por 20 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por dez minutos a 4°C e o sobrenadante foi completamente removido. O pellet obtido de cada amostra foi

ressuspenso em 200 μ L de Acetato de Sódio 3M e 0,1 X TAE, em seguida foram adicionados 500 μ L de etanol 99% e as amostras foram incubadas por 15 minutos nesta solução. Novamente, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por dez minutos a 4°C e o sobrenadante foi completamente removido. Após a retirada do sobrenadante, foram adicionados 250 μ L de etanol 70% por tubo e sucessiva centrifugação nas mesmas condições já descritas, foi retirado. A partir da extração do DNA, as amostras foram secas a 30 °C e 40 μ L de água milliQ foram adicionadas a cada amostra para diluir o ácido nucleico. A concentração de DNA de cada extração foi medida usando o NanoDrop.

Para a amplificação do DNA viral obtido na extração foi realizada a técnica de PCR. Cada reação de PCR foi preparada a partir de: 12,5 μ L Kapa HiFi HotStart ReadyMix (Roche), 5 μ M de primer reverso, 5 μ M de primer forward e 25 ng de DNA. Todas as reações foram completadas com água milliQ em um volume final de 25 μ L.

Tabela 2: O termociclador utilizado Thermal Cycler C1000 Touch (BIO-RAD) para as reações de PCR foi programado nas condições apresentadas.

Passos	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
Desnaturação inicial	Começar	95	3
Desnaturação	25x	95	0,5
Anelamento	25x	55	0,5
Alongamento	25x	72	0,5

Fonte: Elaborado pelo autor.

Posteriormente à realização da PCR, a concentração de cada amostra foi medida pelo NanoDrop, e em todos os casos foram obtidas concentrações superiores a 500 ng/ μ L, sendo suficientes para a realização do sequenciamento. Além disso, as amostras foram avaliadas usando um gel de agarose 1%.

Todavia, em relação às perspectivas pós-identificação das sequências selecionadas por alta afinidade, foi realizado a caracterização *in silico* dos peptídeos (todos os descritores relevantes de estrutura/função foram calculados "por aminoácido" e armazenados com especificidade) que se ligam ao alvo imobilizado. Através da triagem virtual e os dados de Docking Molecular, as decisões serão orientadas sobre quais moléculas serão sintetizadas inicialmente, para futuros ensaios de inibição da atividade enzimática, co-cristalização e outras análises moleculares de interação entre enzima e peptídeo.

4.13.2 Avaliação das sequências obtidas via Phage Display

Os ensaios de Phage Display utilizando a proteína ETA possibilitaram a obtenção de 48 sequências nucleotídicas codificadoras de peptídicas de 7 resíduos de aminoácidos flanqueados por duas cisteínas.

Essas sequências nucleotídicas foram traduzidas e as sequências peptídicas obtidas foram utilizadas na busca de possíveis proteínas parceiras por meio do Blast programa, disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Para isso, primeiramente as cisteínas foram removidas da sequência e a busca foi realizada acessando apenas os bancos de dados de organismos hospedeiros já reportados de *Staphylococcus aureus* codificadores a proteína ETA. Nesse caso, o filtro permitiu a seleção de organismos alvo *Homo sapiens* (taxid 9606) e *Mus musculus* (taxid10090).

Após esse procedimento, foram escolhidas apenas sequências com cobertura de alinhamento maiores que 80% e uma segunda triagem foi realizada com base na seleção apenas de sequências de proteínas envolvidas no sistema tegumentar. A estrutura tridimensional dessas proteínas foi analisada utilizando o software Pymol e uma terceira triagem foi realizada escolhendo apenas sequências peptídicas obtidas por Phage Display que também fossem encontradas nas proteínas obtidas vias Blast que possuíssem a região correspondente na superfície da proteína e estruturada em forma de alça, uma vez que o ensaio utilizando fagos apresentavam peptídeos circulares.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise da sequência primária das proteínas alvo

Informações relevantes, como massa molecular das proteínas em Da, ponto isoelétrico teórico (pI) e número de resíduos de aminoácidos, foram obtidas usando a ferramenta ProtParam (ExPASy), permitindo um estudo mais detalhado das proteínas alvo (Tabela 3). Também, outras toxinas foram expressas e purificadas porém, anteriormente, já tinha sido feito o processo de aquisição dos plasmídeos e a clonagem em *E. coli*.

Tabela 3. Dados das sequências primárias das proteínas ETA wt, ETE wt, ExhC wt, obtidos pelo programa ProtParam (ExPASy).

PROTEÍNAS	AMINOÁCIDOS	MASSA MOLECULAR (Da)	pI teórico
ETA wt	260	29139,48	6,52
ETE wt	259	28473,93	7,88
ExhC wt	258	28546,60	6,34

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Expressão das proteínas alvo

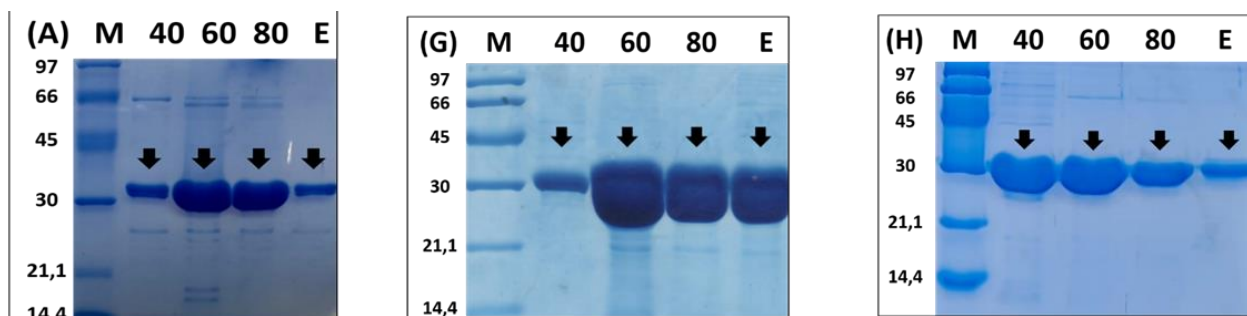
Das diferentes linhagens de *E. coli* testadas, as que proporcionaram um maior desempenho na expressão das proteínas alvo foram as linhagens BL21 (DE3)-T1 para a ExhC wt, C43(DE3) para a ETE wt, BL21(DE3) para ETA wt. A indução da expressão das proteínas ExhC e ETE selvagens teve maior rendimento quando realizada em 1 L de meio LB na presença do indutor IPTG a 0,3 mM em temperatura de 30 °C por 5 horas. Já a temperatura e tempo de indução para expressão ETA foram de 16 °C por 20 horas e 20 °C por 16 horas, respectivamente. Ainda, após a expressão bacteriana, definiu-se a solução tampão mais eficiente para o processo de lise celular, sendo essa composta por 50 mM de Fosfato de Sódio, 400 mM de NaCl, 10% glicerol e 10 mM Imidazol (pH 7,5) para todas as bactérias contendo as proteínas alvo.

5.3 Purificação das proteínas recombinantes

5.3.1 Cromatografia de afinidade

A metodologia utilizada na primeira etapa de purificação das proteínas ExhC wt, ETE e ETA selvagens foi a cromatografia de afinidade, na qual foram testados tampões de lavagem com concentrações crescentes de imidazol para a eliminação de proteínas contaminantes que se encontravam adsorvidas à resina (Níquel) juntamente com a proteína alvo. Após a conclusão da primeira etapa de purificação as amostras obtidas por meio das diferentes lavagens foram aplicadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%) e submetidas à eletroforese para verificar o sucesso da purificação por cromatografia de afinidade (Ni-Sepharose) de acordo com a Figura 8. Devido à presença de contaminantes nas amostras das proteínas alvo (Figura 8), realizou-se uma segunda etapa de purificação por cromatografia de exclusão molecular (descrita no item 5.3.2).

Figura 8. SDS-PAGE 15% ExhC wt (A) de *S. sciuri*, ETE wt (G) e ETA wt (H) de *S. aureus* com diferentes concentrações de Imidazol: 40 mM de Imidazol (40); 60 mM de Imidazol (60); 80 mM de Imidazol (80) e eluição com 400 mM de Imidazol (E). As setas pretas indicam a presença das respectivas proteínas recombinantes e a letra “M” corresponde ao marcador molecular (LMW-SDS Marker KIT – GE Healthcare) em kDa.



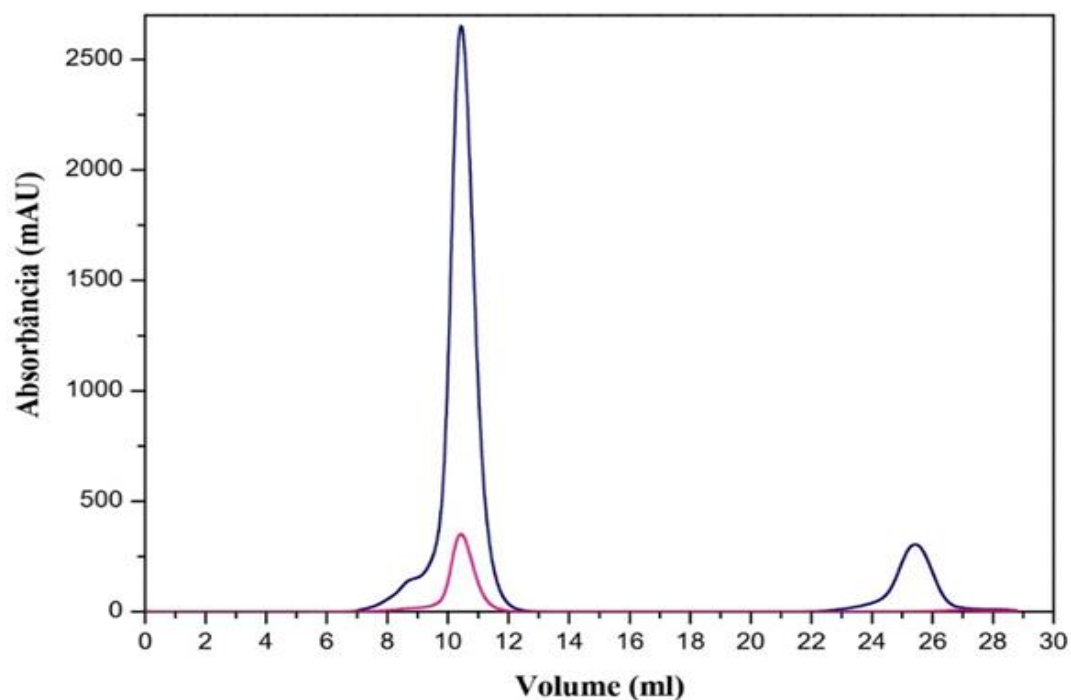
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.2 Cromatografia de gel filtração

A segunda etapa de purificação das amostras ExhC wt, ETE wt e ETA wt foram feitas por gel filtração. Essa estratégia permite eliminar agregados da proteína alvo. Os perfis de cromatografia de gel filtração foram obtidos adotando um comprimento de onda de 230 e 280 nm, específica para identificação de ligações

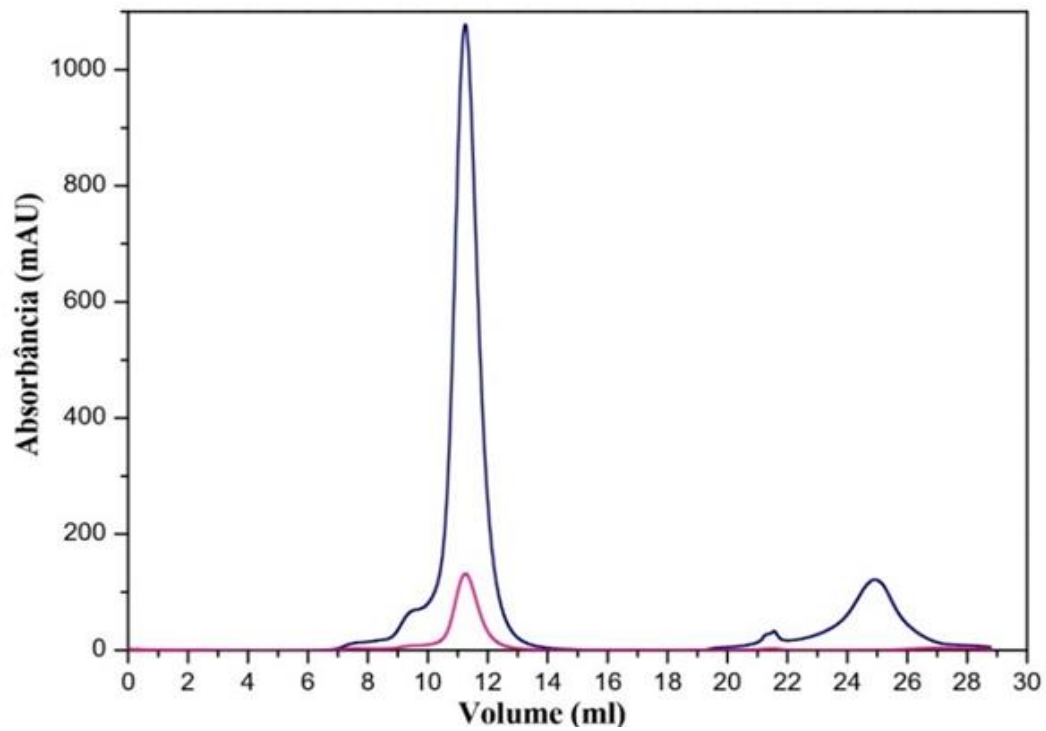
peptídicas e resíduos de aminoácidos aromáticos, respectivamente. O perfil de cromatografia da ExhC wt (Figura 9) evidenciou um pico acentuado entre os volumes 9-12 mL (formado pelas frações de pico 4, 5 e 6) com absorvância a 230 e 280 nm, correspondente a ExhC wt, que possui um resíduo do aminoácido triptofano. Já o cromatograma da ETE wt (Figura 10) apresentou um pico acentuado entre os volumes 10-12 mL (composto pelas frações 5, 6, 7) com absorvância em 230 e 280 nm, correspondente a proteína alvo que possui onze resíduos do aminoácido tirosina. Esses mesmos resultados foram observados para ETA wt (Figura 11), que apresentou um pico acentuado também entre os volumes 10-12 mL, composto pelas frações 5, 6 e 7. Os três cromatogramas (Figuras 9, 10 e 11) apresentaram um pico com absorvância apenas em 230 nm entre os volumes 22-28 mL, que corresponde provavelmente a liberação das moléculas de Imidazol (presentes no tampão utilizado para cromatografia de afinidade). As frações (amostras) referentes a esses picos não foram coletadas.

Figura 9. Segunda etapa de purificação da proteína ExhC wt de *S. sciuri*. Perfil de cromatografia de exclusão molecular da proteína ExhC wt de *S. sciuri* em Superdex G75 10/300 (GE). O eixo y do gráfico corresponde a absorção em mili unidades de absorbância e o eixo x ao volume em mililitros. A linha azul indica a absorbância a 230 nm e a linha rosa indica a absorbância em 280 nm.



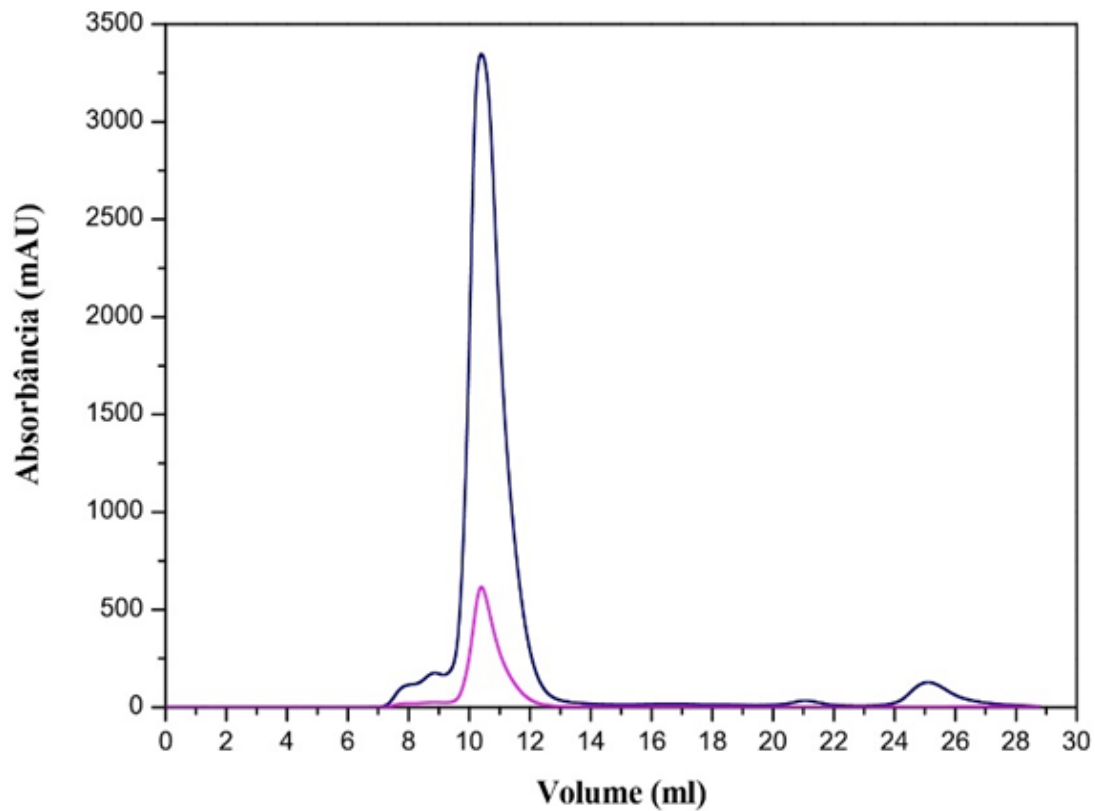
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 10. Segunda etapa de purificação da proteína ETE wt de *S. aureus*. Perfil de cromatografia de exclusão molecular da proteína ETE wt de *S. aureus* em Superdex G75 10/300 (GE). O eixo y do gráfico corresponde a absorção em mili unidades de absorbância e o eixo x ao volume em mililitros. Linha azul indica a absorbância a 230 nm e linha rosa indica a absorbância em 280 nm.



Fonte: Elaborado pelo autor.

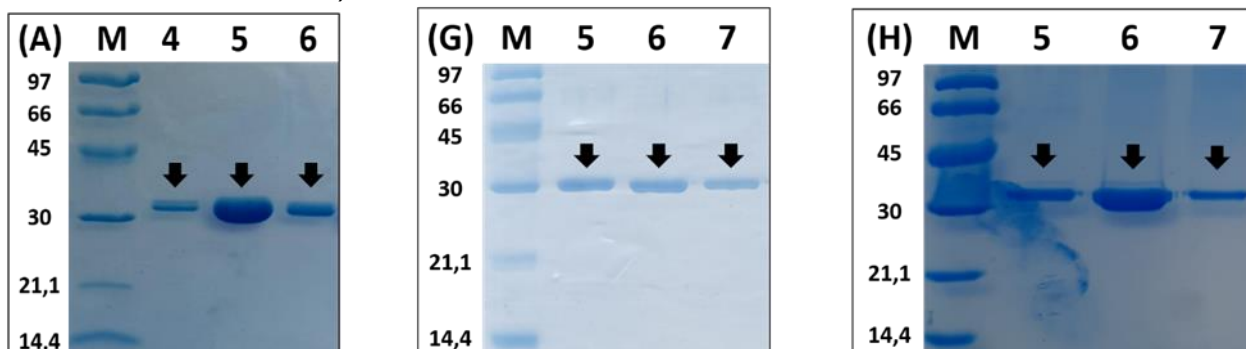
Figura 11. Segunda etapa de purificação da proteína ETA wt de *S. aureus*. Perfil de cromatografia de exclusão molecular da proteína ETA wt de *S. aureus* em Superdex G75 10/300 (GE). O eixo y do gráfico corresponde a absorção em mili unidades de absorbância e o eixo x ao volume em mililitros. Linha azul indica a absorbância a 230 nm e linha rosa indica a absorbância em 280 nm.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As frações de pico referentes às proteínas ExhC wt (amostras 4, 5 e 6), ETE wt (amostras 5, 6 e 7) e ETA wt (amostras 5, 6, 7) de cada perfil cromatográfico, foram coletadas e aplicadas em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%), sendo submetidas à eletroforese para verificar o sucesso da purificação por gel filtração (Superdex G75 10/300). Os resultados podem ser observados na Figura 12.

Figura 12. SDS-PAGE 15% ExhC wt (A) de *S. sciuri*, ETE wt (G) e ETA wt (H) de *S. aureus*. Os números 4, 5 e 6 (A), 3, 4, 5, 6 e 7 (G) e 5, 6 e 7 (H) dos géis SDS-PAGE 15% indicam as amostras coletadas a partir dos perfis cromatográficos das proteínas ExhC wt, ETE wt e ETA wt respectivamente, projetados pelo sistema AKTA-pure. As setas pretas indicam a presença das respectivas proteínas recombinantes e a letra “M” corresponde ao marcador molecular (LMW-SDS Marker KIT – GE Healthcare) em kDa.



Fonte: Elaborado pelo autor.

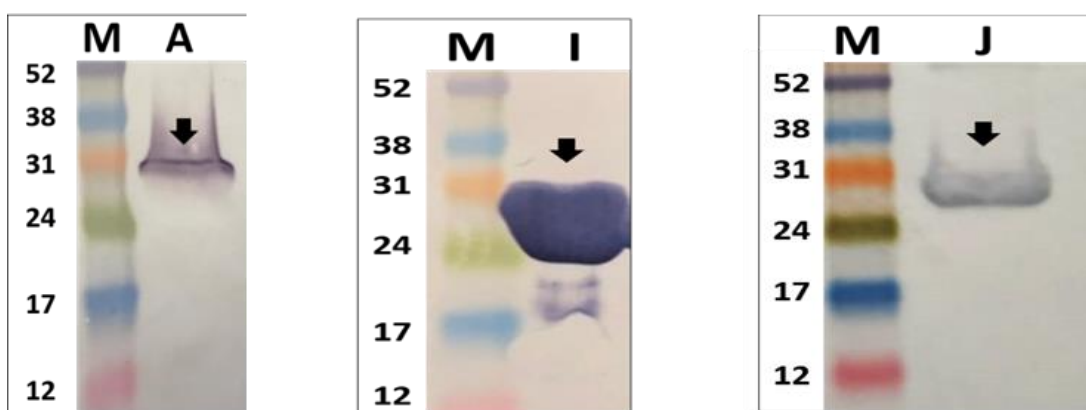
Com os resultados dos géis SDS-PAGE 15%, foi possível observar que as bandas proteicas de todas as amostras de ExhC wt (Figura 12.A), ETE wt (Figura 12.G) e ETA wt (Figura 12.H) obtiveram um alto grau de pureza.

As amostras das proteínas alvo que apresentaram alto grau de pureza foram e estão sendo utilizadas em diferentes técnicas experimentais. Para a realização de algumas dessas técnicas, as amostras foram concentradas por centrifugação em dispositivos *Amicon Ultra Centrifugal Filters* (10 kDa). As proteínas que apresentaram duas populações durante a etapa de cromatografia de exclusão molecular tiveram as amostras com estados oligoméricos distintos concentradas em dispositivos *Amicon Ultra Centrifugal Filters* (10 kDa) separados, com o objetivo de evitar a agregação de populações com tamanhos moleculares diferentes. Posteriormente, a concentração das proteínas em μM foi medida pelo espectrofotômetro Biomate 3S (*Thermo Fisher Scientific*) para a realização dos experimentos.

5.4 Western blot

A confirmação da expressão na forma solúvel das proteínas ExhC wt, ETE e ETA wt foi realizada por meio de *Western blot*, utilizando anticorpo primário anti-poli-histidina e anticorpo secundário anti-IgG conjugado à fosfatase alcalina. Dessa forma, constatou-se que os métodos utilizados para a transformação, expressão e purificação das proteínas alvo foram satisfatórios, como demonstrado na Figura 13.

Figura 13. Resultados do *Western blot* para detecção das proteínas ExhC wt (A), e ETA (J) de *S. aureus*. As proteínas alvo foram detectadas (seta preta) à direita do marcador molecular (*Amersham ECL Rainbow Marker – GE Healthcare*) em kDa (M).

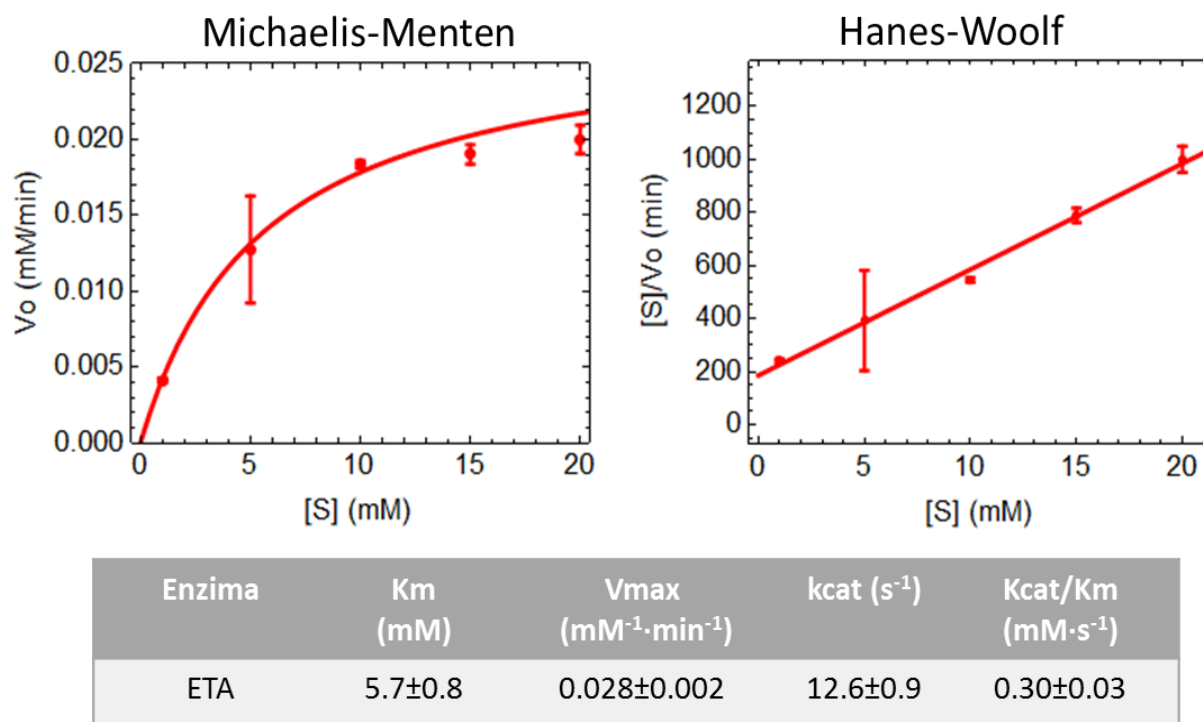


Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5 Ensaios de atividade enzimática

A atividade esterolítica de ETA contra o substrato sintético BocL-Glu↓-OPh foi determinada conforme descrito em Materiais e Métodos. A velocidade inicial da reação enzimática em diferentes concentrações de substrato seguem a hipérbole característica de Michaelis–Menten (Figura 14). No entanto, devido às concentrações relativamente altas de BocL-Glu↓-OPh usadas nos ensaios e ao limite de solubilidade dessa molécula em 1-4 dioxano, concentrações de substrato superiores a 20 mM não puderam ser testadas e, conseqüentemente, a saturação da enzima não foi totalmente atingida. À luz dessas questões, empregamos gráficos de Hanes-Woolf (HANNES, 1932) para estimar os parâmetros cinéticos das enzimas analisadas por meio de regressão linear.

Figura 14. Determinação dos parâmetros cinéticos ETA. Os painéis superiores mostram os gráficos de Michaelis-Menten e Hanes-Woolf para a enzima. No painel inferior contém os valores dos parâmetros cinéticos estimados a partir dos gráficos de Hanes-Woolf por meio de regressão linear. V_o , $[S]$, K_M , V_{max} e k_{cat} representam a velocidade inicial, concentração de substrato, constante de Michaelis, velocidade máxima e constante catalítica, respectivamente. A razão k_{cat}/K_M quantifica a eficiência catalítica de cada enzima. Valores médios $\pm$ erros padrão da média são mostrados.



Fonte: Elaborado pelo autor.

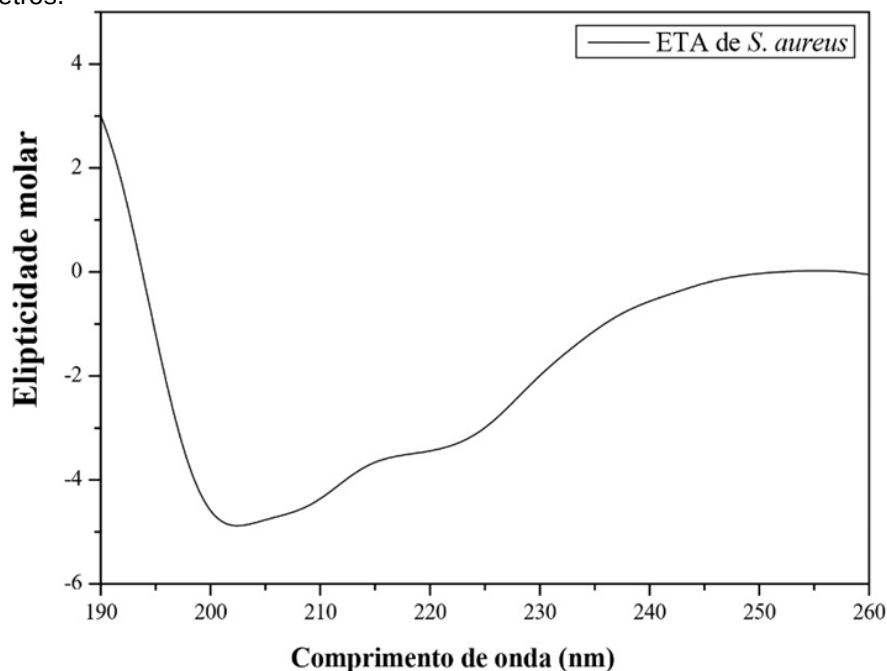
A caracterização enzimática será fundamental para os próximos trabalhos de interação com possíveis ligantes, oferecendo parâmetros de comparação cinéticos da enzima nativa. Além disso, esses dados demonstram que a enzima está cataliticamente ativa, assegurando seu uso em futuros ensaios funcionais.

5.6 Dicroísmo Circular

Os espectros em elipticidade molar obtidos a partir dos experimentos de UV-CD realizados com as amostras de proteína ETA wt, foram plotados em um gráfico a partir do software *OriginLab 7*. O gráfico (Figura 15) em conjunto com resultados de deconvolução espectral calculados pelo software CONTINLL do pacote de programas CDPPro, indicaram que as amostras apresentam uma variação esperada nas porcentagens de estrutura secundária da ETA e que as enzimas estão

estruturalmente enoveladas (Tabela 4) quando em comparação com os dados percentuais da literatura (LI et al. 2011). Sendo mais, essa informação associada com os testes de atividade enzimática indicam que a proteína se encontra dentro dos parâmetros para seu estado funcional.

Figura 15. Espectro de CD-UV característico da proteína ETA de *S. aureus* a 25 °C em solução tampão. O eixo y do gráfico corresponde a elipticidade molar em deg.cm² .dmol⁻¹ e o eixo x ao comprimento de onda em nanômetros.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4. Resultados em porcentagem das frações de estrutura secundária da proteína ETA de *S. aureus* obtida por meio do experimento de UV-CD. A deconvolução e o cálculo das porcentagens de estrutura secundária foram realizados pelo software CONTINLL do pacote de programas CDPro utilizando o conjunto de referências de proteínas SP29.

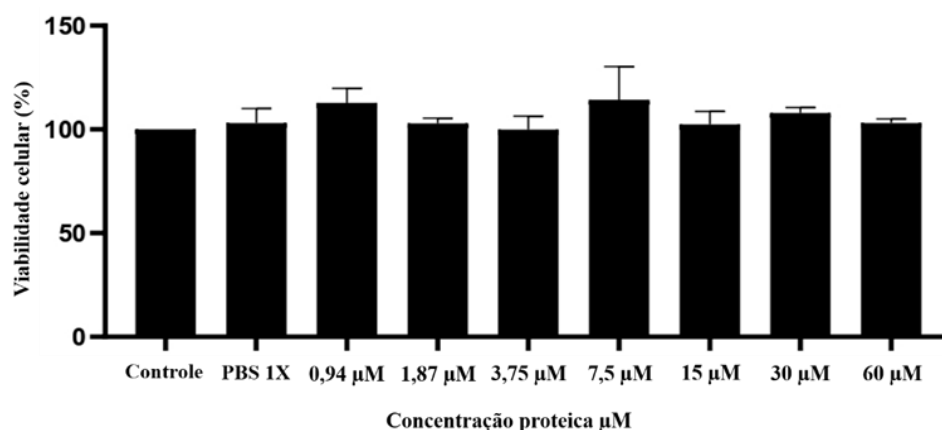
Proteína	α -hélice	Folha- β	Loops	Desordenado
ETA de <i>S. aureus</i>	17,5%	23,1%	12,3%	47,2%

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.7 Ensaios MTT

A toxina esfoliativa ExhC de *S. sciuri* contém maior identidade com a sequência de resíduos de aminoácidos da ETA de *S. aureus* em comparação com as demais ETs já descritas na literatura (AHRENS; ANDRESEN, 2004). A similaridade sequencial também foi observada estruturalmente a partir do uso da ferramenta FastSCOP (fastscop.life.nctu.edu.tw) que indicou 60,5% de identidade estrutural entre ExhC e a ETA (PDB ID: 1AGJ), seguida da ETB (PDB ID: 1QTF) (54,0%) e V8 protease (PDB ID: 1QY6) (42,8%). A V8 protease é uma típico serino-proteinase produzida pelo gênero *Staphylococcus*, com baixa especificidade ao substrato (RAGO et al., 2000; PRASAD et al., 2004), diferente do observado para as ETs, que possuem alta especificidade à Dsg-1 (BUKOWSKI et al., 2010). Os resultados obtidos pela adição da ETA em linhagem BHK-21 (Figura 16 e Tabela 5), devido a maior semelhança entre a ExhC e a ETA, são de extrema relevância para testar se a capacidade necrótica se mostra característica única da ExhC dentre as ET's. Desse modo, analisando os resultados, é possível notar que mesmo com um aumento progressivo na concentração da proteína ETA sobre as células BHK-21 (Tabela 5), o potencial necrótico dessa enzima se mostrou inexistente. Sendo assim, a única ET com essa capacidade necrótica comprovada até o momento continua a ser a ExhC. Diferença estatisticamente significativa entre os controles na ausência/presença do tampão PBS 1X e as amostras tratadas com ETA não foi comprovada pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).

Figura 16. Gráfico de porcentagem da viabilidade celular por ensaios de MTT das células BHK-21 na presença da proteína ETA de *S. aureus*. Os resultados plotados representam três experimentos independentes que se apresentam como média $\pm$ SD. O eixo y corresponde a viabilidade das células BHK-21 em porcentagem (calculada a partir do experimento controle na ausência de PBS 1X) e o eixo x as concentrações da ETA em μM .



Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 5. Efeitos do aumento progressivo da concentração da proteína ETA na viabilidade da linhagem celular BHK-21 em porcentagem (calculada a partir do experimento controle na ausência de PBS 1X) por ensaios de MTT. Os resultados representam três experimentos independentes que se apresentam como média $\pm$ SD. Diferença estatisticamente significativa entre os controles na ausência/presença do tampão PBS 1X e as amostras tratadas com ETA não foi comprovada pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).

CONCENTRAÇÃO	VIABILIDADE CELULAR (%) ETA
0,94 μ M	112,8 $\pm$ 7
1,87 μ M	102,9 $\pm$ 2,5
3,75 μ M	100,0 $\pm$ 6,4
7,5 μ M	114,4 $\pm$ 16
15 μ M	102,5 $\pm$ 6,2
30 μ M	106,0 $\pm$ 2,6
60 μ M	103,0 $\pm$ 2,1

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.8 Identificação *in silico* de inibidores contra a Toxina Esfoliativa A (ETA)

O modelo estrutural do complexo entre o segmento que liga os ectodomínios 3 e 4 da Dsg-1 (EC3-4linker) associado às toxinas foi gerado pelo Dr. Jorge Enrique Hernández González (GISMENE et al., 2022). Desse modo, foram gerados modelos para a interação dos peptídeos α - e β -MSH com ETA. Os modelos iniciais foram submetidos a minimização de energia e a simulações de DM de 1 μ s e cálculos de energia livre pelo método de MM-GBSA a fim de avaliar a estabilidade dos complexos (Tabela 6). Além disso, foi invertida a conformação do P1-Glu de α -MSH (D- α -MSH) para projetar um peptídeo linear que não seria a princípio hidrolisado por ETs. As sequências dos peptídeos analisados são as indicadas entre parênteses: α -MSH (SYSME↓HFRWGKPV), α -MSH-curto: (ACE-ME↓HFRWGK-NME), D- α -MSH: (SYSME[D-Glu]↓ HFRWGKPV), β -MSH: (AEKKDEGPYRME↓HFRWGSPPKD). O local de clivagem está marcado por uma seta. Já a representação estrutural de ETA em complexo com tais peptídeos pode ser visualizada no esquema abaixo (Figura 17).

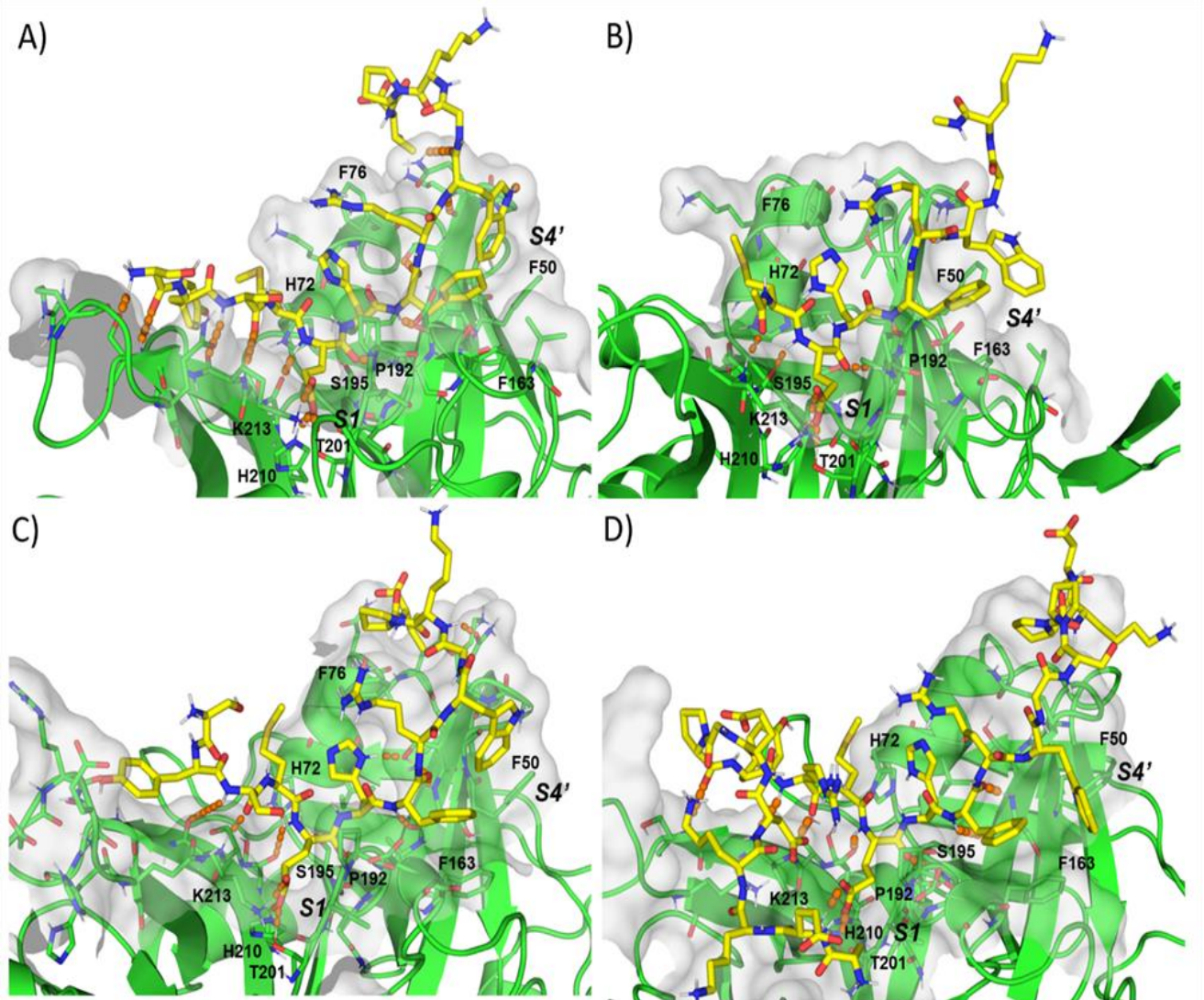
Tabela 6. Estabilidade de ETA em complexo com α - e β -MSH e peptídeos modificados

Peptídeo ^a	Enzima	Tempo (ns) ^b	RMSD (Å) ^c	d_{CD-NE2} (Å) ^d	ΔG_{eff} (kcal/mol) ^e	Estabilidade ^f
α -MSH	ETA	1000	9.13	3,67	-74,72-	Sim
α -MSH-curto	ETA	1000	3,81	3,69	-76,15	Sim
D- α -MSH	ETA	1000	6,60	3,72	-93.44-	Sim
β -MSH	ETA	1000	15.2	3,75	-118,02	Sim

^a Peptídeos de acordo com a Fig. 17. ^b Tempo de simulação até a conclusão ou interrupção manual devido à dissociação do ligante do sítio ativo. ^c Valor médio de RMSD para os átomos pesados do peptídeo em relação à estrutura inicial ($t = 0$), calculado para os últimos 4% dos quadros de cada trajetória. ^d Distância média entre o átomo CD do peptídeo GLU no átomo P1 e NE2 de ETA H210/204, calculada para o último dos quadros de cada trajetória (~4% de cada trajetória). $d_{CD-NE2} < 4$ Å correspondem a complexos estáveis. ^e Energias livres efetivas calculadas pelo método MM-GBSA para os complexos estáveis após descartar os primeiros 100 ns usando o modelo de solvatação implícito GB-neck2 (MILLER, et al. 2012). ^f Sim significa que o ligante não se dissociou do sítio ativo da proteína durante todo o tempo de simulação.

Fonte: Elaborado e cedido pelo Dr. Jorge Enrique Hernández González.

Figura 17. Representação estrutural de ETA em complexo com α -MSH, β -MSH e derivados. A) ETA: α -MSH. B) ETA: α MSH-curto C) ETA:D- α - MSH D) ETA: β - MSH.. Os peptídeos são representados como bastões amarelos, enquanto a estrutura da proteína é representada como desenho e os resíduos que interagem com os peptídeos são representados como bastões verdes e sua superfície é mostrada em cinza. As ligações H intermoleculares são indicadas por linhas tracejadas laranja. Os principais resíduos de sítios ativos e interativos das toxinas são rotulados. Em todos os casos as estruturas centrais correspondentes aos maiores agrupamentos de cada trajetória foram escolhidas para representação estrutural. Os subsítios S1 e S4' estão marcados em *itálico*.

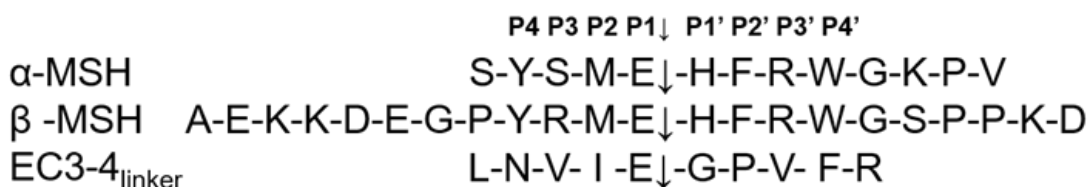


Fonte: Elaborado e cedido pelo Dr. Jorge Enrique Hernández González.

Os resultados apresentados na Tabela 6 e na Figura 17 indicam que α -MSH e β -MSH formam complexos estáveis com ETA, de acordo com os ensaios experimentais que demonstram que esta toxina, assim como o ETB, são capazes de clivar os primeiros peptídeos (RAGO et al., 2000). Os peptídeos α -MSH e β -MSH em complexos com ETA apresentam valores de RMSD relativamente altos, indicando assim que esses peptídeos são altamente flexíveis mesmo quando ligados ao sítio ativo da toxina. No entanto, os valores médios da distância entre o carbono CD do resíduo Glu-P1 e o átomo NE2 do anel de imidazol de H210(d_{CD-NE2}) para esses complexos mostram que seus respectivos resíduos P1-Glu permanecem fortemente ligados ao subsítio S1 até o final das simulações de DM. Ao comparar os valores de ΔG_{eff} para os complexos ETA: α -MSH e ETA: β -MSH, torna-se evidente que o último é significativamente menor, mas, até certo ponto, isso provavelmente é consequência de um viés de tamanho do peptídeo que pode levar o método de energia livre a superestimar a afinidade para o ligante maior.

Uma versão mais curta de α -MSH (Tabela 6) foi simulada em complexo com ETA para avaliar se um tamanho menor e, portanto, uma flexibilidade reduzida das regiões expostas ao solvente do peptídeo poderia levar a uma redução significativa ganho de afinidade de ligação. O valor de RMSD deste peptídeo mostra que, de fato, é menos flexível do que α -MSH de comprimento total, mas o ganho de afinidade foi bastante pequeno (~ 1 kcal/mol). Sendo assim, foi simulado pelo Dr. Jorge Enrique Hernández González o complexo ETA: α -MSH. Os resultados apresentados na Tabela 6 sugerem que este complexo pode realmente se formar e ser estável, dado ao alinhamento coincidente do sítio de clivagem de EC3-4_{linker} com α -MSH e β -MSH (Figura 18).

Figura 18. Alinhamento da sequência de α -MSH, β -MSH e hDsg-1 EC3-4_{linker} de acordo com as posições que ocupavam nos sítios ativos dos ETs. As posições de P4 a P4' são indicadas no topo. Local de clivagem marcado por uma seta ($\downarrow$).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Além disso, analisamos a ligação de um análogo heteroquiral de α -MSH, denominado D- α -MSH. Os resultados mostrados na Tabela 6 e na Fig. 17 sugerem que D- α -MSH apresenta uma afinidade melhorada para ETA em relação ao peptídeo nativo. Este resultado também sugere que a inversão da configuração do resíduo P1 é uma estratégia promissora para o desenho de inibidores peptídicos. Com base em nossas previsões, e também pelo custo em relação ao β -MSH (que se mostrou mais elevado por conta de ser um peptídeo maior), optou-se por comprar o peptídeo D- α -MSH que foi utilizado nos estudos de inibição da atividade enzimática e co-cristalização com ETA wt. Os próximos experimentos foram realizados em busca da identificação molecular da interação favorável de P1 D-Glu com resíduos do subsítio S1 de ETs, abrindo caminho para o desenho de peptídeos heteroquirais como inibidores de ETs.

Os modelos tridimensionais de ETs em complexos com diferentes peptídeos gerados até agora fornecem informações estruturais sobre os determinantes moleculares da ligação às toxinas. Desse modo, o segmento interdomínio EC3-4 (EC3-4_{linker}), α -MSH e β -MSH possuem resíduos aromáticos (triptofano ou fenilalanina) em posições equivalentes (P4) quando ligados aos sítios ativos dos ETs. Isso sugere que os subsítios S4 de ETA provavelmente preferem resíduos aromáticos, o que é consistente com o fato de que esses bolsões contêm resíduos aromáticos (Phe50 e Phe163 em ETA) e, portanto, hidrofóbicos. Vale a pena notar que, embora tenhamos modelado o EC3-4_{linker} de hDsg-1, quase todas as isoformas conhecidas de Dsg-1 expressas possuem Phe em P4 (alinhamento de sequência múltipla não mostrado).

Notavelmente, α -MSH e β -MSH não compartilham similaridade de sequência com o EC3-4_{linker} em posições diferentes de P1 e P4, sugerindo assim que a ETA é promíscua em tais posições. Por outro lado, a maior afinidade e estabilidade geral de α -MSH, α -MSH curto e β -MSH em relação ao peptídeo linear 1, inspirado na sequência do EC3-4_{linker} (Tabela 6), sugere que a substituição de resíduos nas posições P4, P3, P1', P2' e/ou P3' deste último peptídeo por aqueles encontrados nos primeiros poderia levar a um potencial aumento na afinidade de ligação para ETA.

Finalmente, foi realizada a decomposição de energia livre por resíduo de MM-GBSA para o complexo ETA: α -MSH, um método que permite estimar a contribuição de resíduos proteicos individuais para a formação do complexo. Resíduos-chave da bolsa S1, por exemplo, Lys213, H20 e Pro192, e da bolsa S4', por exemplo, Gln54 e Thr55, mostraram grandes contribuições de energia total ($\Delta G_{res,tot}$, Tabela 7), que incluem a influência de ambos os lados-cadeias e os átomos da espinha dorsal. Mais importante,

as cadeias laterais destes resíduos foram responsáveis pela maior parte das suas contribuições de energia (ver $\Delta G_{sc,res}$, Tabela 7), indicando assim que é esperada uma perda significativa de afinidade de ligação após mutação destes resíduos. Por outro lado, os resíduos de α -MSH com maior contribuição total para o processo de ligação foram Phe7 e Trp9 em P3' e P4', respectivamente (Tabela 7). Esses resultados reforçam nossas conclusões anteriores sobre a importância da natureza aromática do resíduo em P4'. Ao contrário do que seria esperado, a contribuição de energia da cadeia lateral do resíduo P1 (Glu5) é insignificante apesar de formar ligações de H chave com resíduos S1. Isso acontece porque as interações anteriores podem ser satisfeitas por moléculas de água antes da formação do complexo. Portanto, nenhum ganho líquido na contribuição de entalpia é previsto para a substituição das ligações de H mediadas por água por aquelas envolvendo a cadeia lateral Glu5. No entanto, espera-se que a presença de outros resíduos além de Glu em P1 tenha um impacto negativo na afinidade (uma contribuição positiva de energia de cadeia lateral), pois eles não podem satisfazer as interações acima mencionadas com resíduos S1. Vale ressaltar também que os cálculos aqui apresentados são aproximados e não levam em consideração importantes contribuições de entropia (GENHEDEN, 2015). No geral, os resultados mostrados na Tabela 7 indicam posições importantes do andaime peptídico que se prevê serem importantes para o processo de ligação e que devem ser consideradas durante as etapas de otimização do desenho de possíveis inibidores de natureza peptídica.

Tabela 7. Maiores contribuições de energia livre por resíduo para a formação do complexo ETA:α-MSH.

Resíduo	Posição	$\Delta G_{res,tot}$ (kcal/mol) ^a	$\Delta G_{res,sc}$ (kcal/mol) ^b
ETA			
Lys213	S1	-8,3	-7,6
Lys210	S1	-3,1	-3,0
Pro192	S1	-3,4	-2,9
Thr55	S4'	-3,6	-2,5
Gln54	S4'	-3,5	-2,2
α-MSH			
Phe7	P3'	-9,1	-5,7
Trp9	P4'	-5,1	-4,3
His6	P1'	-3,8	-2,7
Glu5	P1	-2,5	-0,1

^a Contribuição total de energia livre, incluindo a cadeia lateral e os átomos da espinha dorsal de cada resíduo.

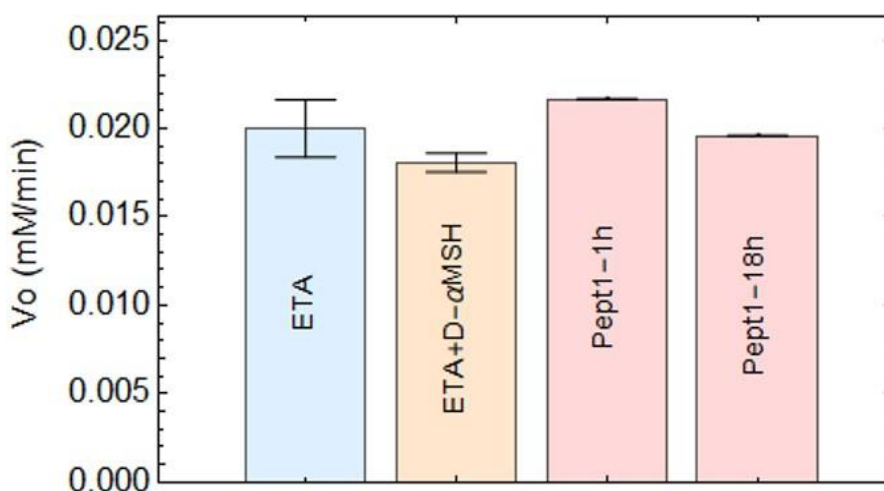
^b Contribuição de energia livre de cadeia lateral de cada resíduo.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.8.1 Ensaios de inibição da atividade enzimática por peptídeos

Os ensaios com os peptídeos adquiridos (D- α MSH e peptídeo linear 1, esse último sendo oriundo de ensaios anteriores de Mariutti et al, 2012), foram plotados no gráfico da Figura 19, e não se vê mudança significativa da atividade enzimática após incubação com os peptídeos em uma mesma condição contendo substrato sintético BocL-Glu- $\downarrow$ OPh (20 mM) e concentração da enzima ETA 1 μ g/ml.

Figura 19. Atividade enzimática da proteína nativa (ETA), incubada com o peptídeo D- α MSH, e também associada ao peptídeo linear 1, em incubação de 1h e também de 18h, com concentração 20 mM de substrato BocL-Glu- $\downarrow$ OPh.



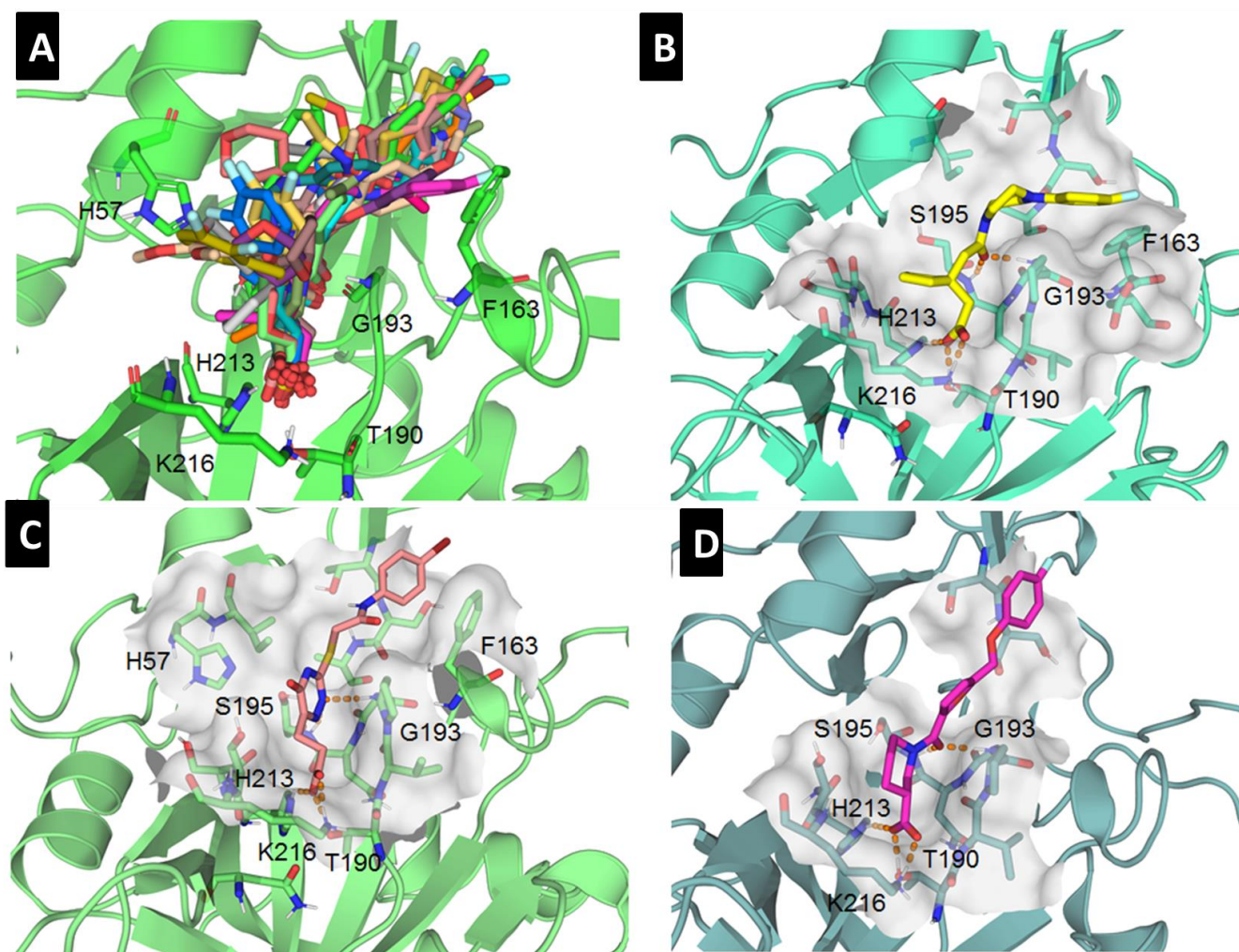
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.9 Inibidores carbônicos da ação esfoliativa

Os esforços computacionais foram obtidos através da combinação de técnicas computacionais como triagem virtual, dinâmica molecular (MD) e cálculos de energia livre MM-GBSA, utilizando como base a biblioteca de compostos para *High Throughput Screening* da Enamine (Enamine HTS), orquestrado pelo Dr. Jorge Enrique Gonzalez, para o delineamento de inibidores da ação esfoliativa das toxinas. A partir dos resultados *in silico*, foram identificados potenciais inibidores de ETA que cumprem características que se acredita serem essenciais para garantir a interação com a enzima, ou seja, a presença de um grupo carboxílico em P1 interagindo com os resíduos Thr213, His213 e Lys216, um Aceitador de ligação H interagindo com Gly193 e Ser195, e porções aromáticas inseridas em uma fenda hidrofóbica no lado Sn' do

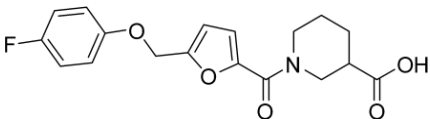
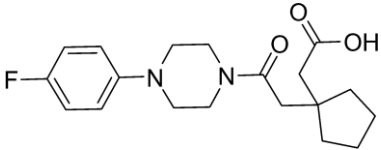
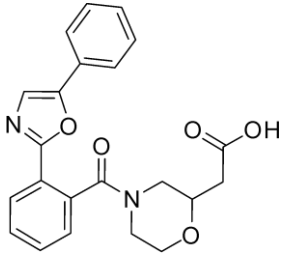
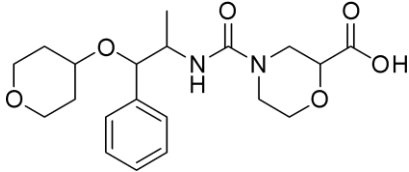
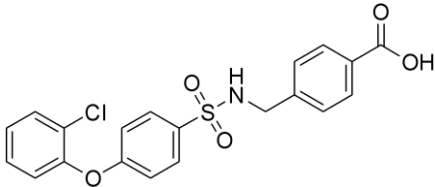
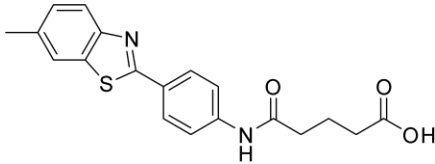
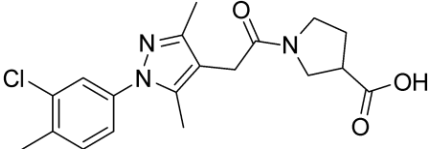
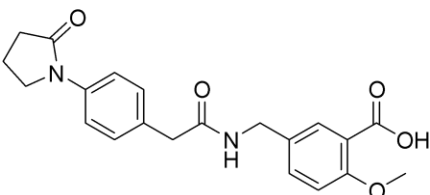
sítio ativo (Figura 20). Algumas moléculas pequenas foram selecionadas após a conclusão do fluxo de trabalho e adquiridas para os ensaios *in vitro* (figura 21);

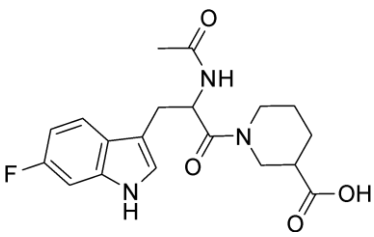
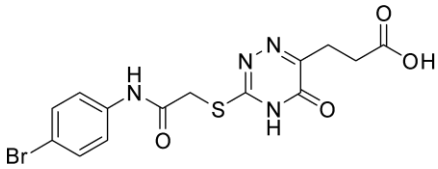
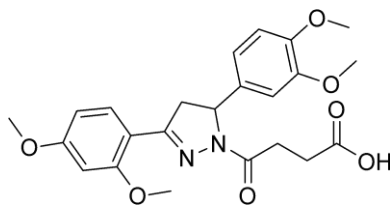
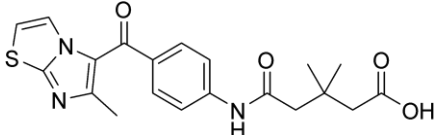
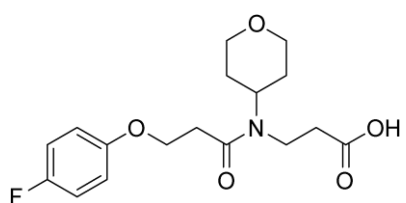
Figura 20: Demonstração *in silico* da interação entre os possíveis ligantes e as porções do sítio ativo da enzima. Em A) temos o resíduo de ácido na posição P1. B) Ligações de H com His213 e Thr213. C) Interação com Lys216. D) Ligação de Hidrogênio entre Gly193 e Ser195.



Fonte: Elaborado e cedido pelo Dr. Jorge Enrique Hernández González

Figura 21: Compostos químicos utilizados em ensaios para inibir a atividade enzimática de ETA e ExhC contra o substrato sintético BocL-Glu-↓OPh. Os compostos foram selecionados por triagem virtual para a inibição do sítio ativo de toxinas esfoliativas.

Fórmula - Símbolo	Estrutura	M (g/mol)
C ₁₈ H ₁₈ FNO ₅ - A		347.3
C ₁₉ H ₂₅ FN ₂ O ₃ - B		348.4
C ₂₂ H ₂₀ N ₂ O ₅ - C		392.4
C ₂₀ H ₂₈ N ₂ O ₆ - D		392.4
C ₂₀ H ₁₆ ClNO ₅ S - F		417.9
C ₁₉ H ₁₈ N ₂ O ₃ S - G		354.4
C ₁₉ H ₂₃ Cl ₂ N ₃ O ₃ - H		412.3
C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₅ - I		382.4

C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₄ - J		375.4
C ₁₄ H ₁₃ BrN ₄ O ₄ S - K		413.2
C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₇ - L		442.5
C ₂₀ H ₂₁ N ₃ O ₄ S - M		399.5
C ₁₇ H ₂₂ FNO ₅ - N		339.4

Fonte: Elaborado e cedido pelo Dr. Jorge Enrique Hernández González.

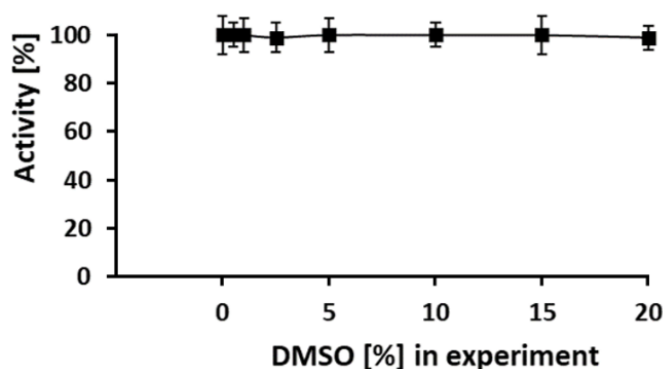
5.9.1 Ensaios de Inibição *in vitro* da atividade enzimática por compostos carbônicos

Os experimentos foram baseados no ensaio de atividade descrito em Gismene et al. 2022. No entanto, tivemos a possibilidade de realizar esses ensaios em um leitor de placas Infinite 200 PRO (Tecan, Männedorf, Suíça) em placas Greiner 96-Well (transparente). Portanto, foram feitos alguns ajustes em comparação com o ensaio enzimático anteriormente descrito. Também, foram realizados experimentos de controle para mostrar que o sistema de ensaio, mesmo com alterações, funciona bem. Para os

ensaios *in vitro*, os compostos carbônicos foram adquiridos da Enamine Ltd e os ensaios executados por Raphael J. Eberle e Mônica A. Coronado, sendo testados tanto para ETA quanto ExhC, pois, como já mencionado neste manuscrito, compartilham uma maior similaridade entre as ETs.

Inicialmente foi testada a atividade da ETA e ExhC sobre o substrato BocL-Glu- $\downarrow$ OPh, solubilizados em DMSO. Dependendo da concentração do substrato pudemos observar um aumento do sinal da absorbância do produto após a clivagem. Portanto, escolhemos uma concentração de substrato de 10 mM para ETA e 20 mM para ExhC. O procedimento para dissolver o substrato em DMSO não tem efeito negativo no sistema de ensaio, como demonstrado na Figura 22.

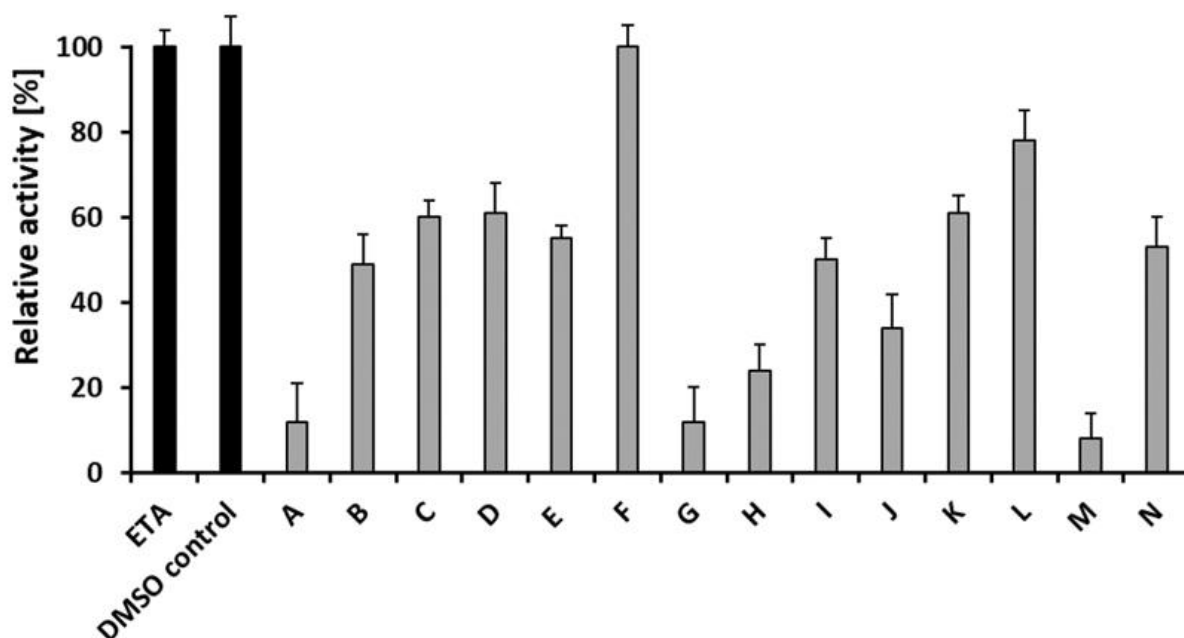
Figura 22. Teste de atividade ETA controle DMSO. As seguintes concentrações finais de DMSO no ensaio de atividade foram testadas: 0, 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 15 e 20%.



Fonte: Elaborado pelo autor.

No ensaio de inibição da ETA foi utilizado o experimento descrito anteriormente. Preparamos soluções estoque compostas de 10 mM de substrato, dissolvidas em 100 % DMSO. Durante o teste primário, a concentração dos compostos potencialmente inibidores foi ajustada para 50 μ M. A sequência de pipetagem foi tampão, proteína, composto e substrato. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados são apresentados como média $\pm$ Desvio Padrão (DP). Os resultados do teste primário ETA são mostrados na Figura 23. Um controle foi realizado para demonstrar que a concentração de DMSO testada não tem efeito na atividade de ETA.

Figura 23. Teste primário de ETA com compostos. As experiências foram realizadas em triplicado e os resultados são apresentados como média $\pm$ Desvio Padrão (DP).

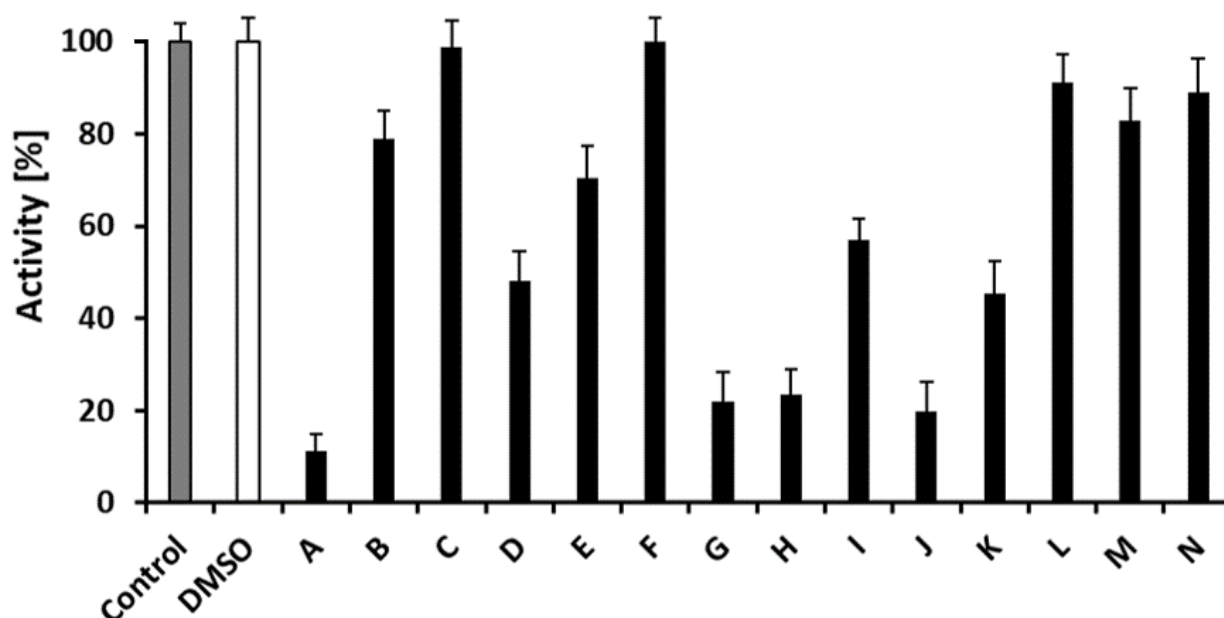


Fonte: Elaborado pelo autor.

A maioria dos compostos apresenta inibição da atividade de ETA, apenas um (Composto F) não possui efeito inibitório na concentração de 50 μ M. Para os compostos A, G e M foi observado o efeito mais forte (Inibição > 85%). O controle de DMSO demonstra que não há efeito sobre a atividade de ETA.

Agora, para o ensaio de inibição da ExhC utilizamos o ensaio de atividade descrito anteriormente. Preparamos soluções estoque compostas de 20 mM de substrato, dissolvidas em 100 % DMSO. Durante o teste primário, a concentração do composto foi ajustada para 50 μ M. A sequência de pipetagem foi tampão, proteína, composto e substrato. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados são apresentados como média $\pm$ Desvio Padrão (DP). Os resultados do teste primário ExhC são mostrados na Figura 24 Um controle foi realizado para demonstrar que a concentração de DMSO testada não tem efeito na atividade ExhC

Figura 24. Teste primário de ExhC com compostos. As experiências foram realizadas em triplicado e os resultados são apresentados como média $\pm$ Desvio Padrão (DP).

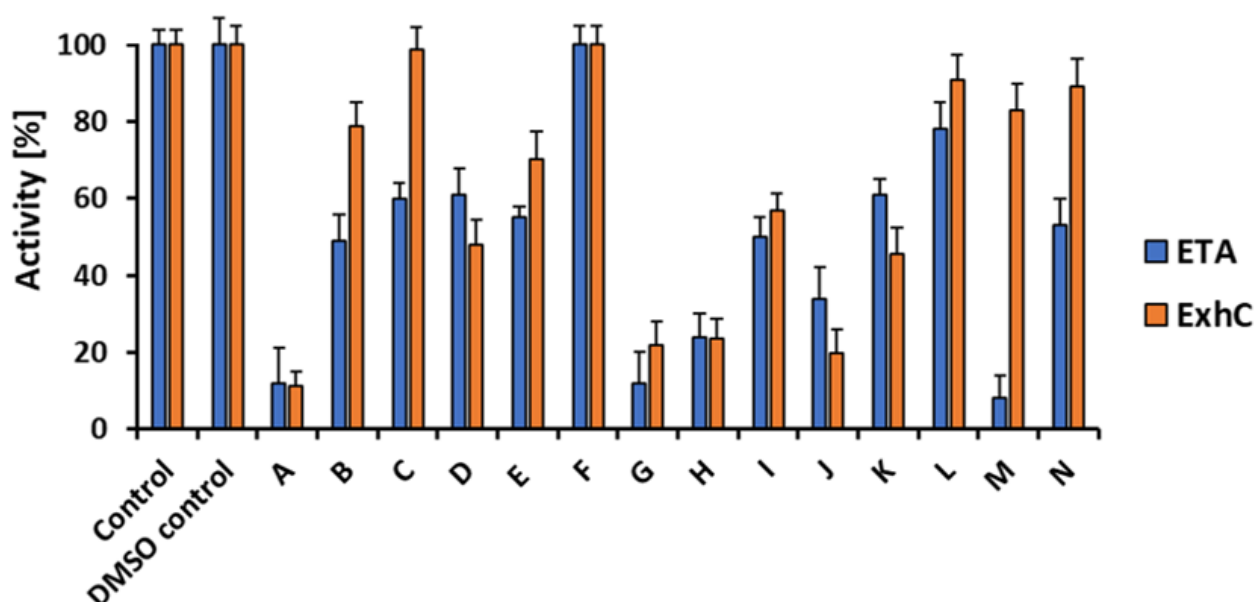


Fonte: Elaborado pelo autor.

Os compostos C, F, L, M e N possuem nenhum efeito inibidor ou um efeito inibidor fraco a uma concentração de 50 μ M contra ExhC. Para os compostos A, foi observado o efeito mais forte (inibição em torno de 90%).

Quando comparados os resultados dos testes primários ETA e ExhC (Figura 25), é possível observar que o composto A mostrou o efeito mais forte nos testes primários contra ambas as proteases, seguido por G, H e J. O composto M mostrou uma forte inibição contra ETA, entretanto se mostrou um composto de fraca inibição da ExhC.

Figura 25. Teste primário de ETA e ExhC com compostos. As experiências foram realizadas em triplicado e os resultados são apresentados como média $\pm$ Desvio Padrão (DP).



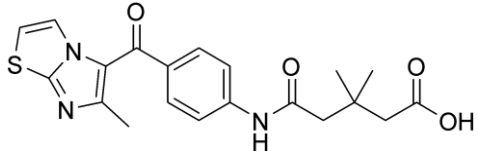
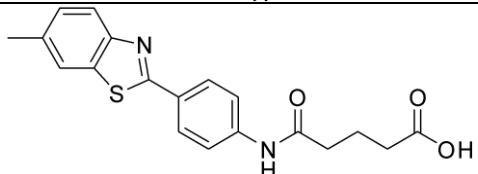
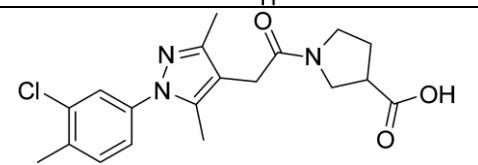
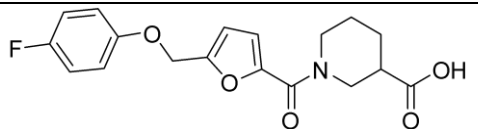
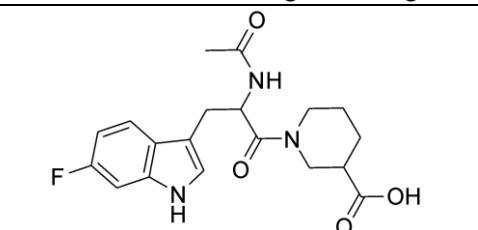
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.9.3 Titulação de composto e determinação de IC_{50}

Com base nos resultados primários do potencial inibidor dos compostos carbônicos sobre ETA e ExhC, os inibidores mais promissores (Figura 26) foram selecionados para uma caracterização do seu efeito dose-resposta.

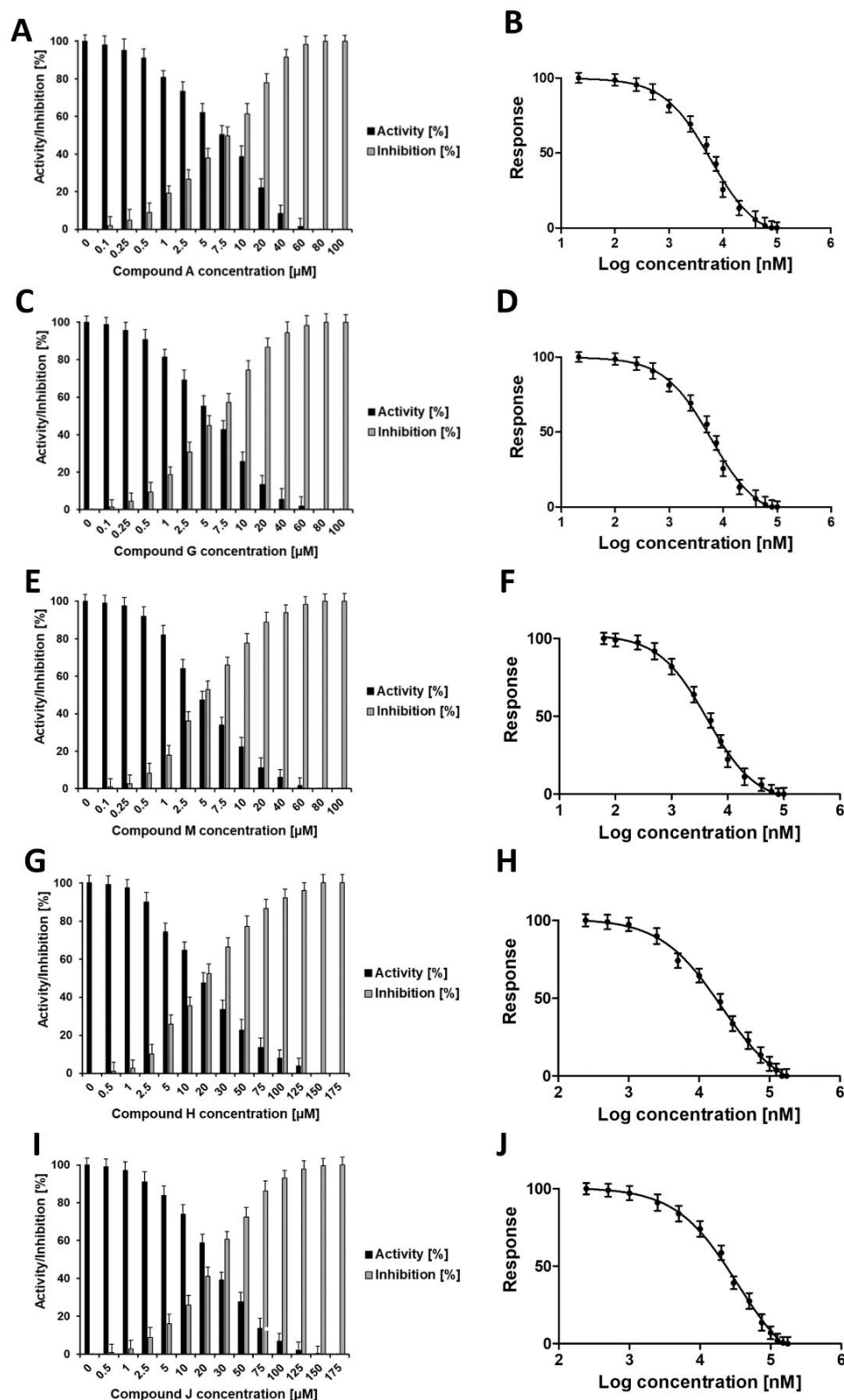
Na investigação do efeito inibidor dependente da dose contra ETA e ExhC (Figura 27 e 28 respectivamente), foram titulados de 0 a 100 μ M para os compostos inibidores A, G e M. Já, para os compostos H e J, foram titulados de 0 a 175 μ M. Com base nos resultados, uma curva dose-resposta foi usada para determinar os valores de correspondentes IC_{50} (Tabela 8 e 9).

Figura 26. Compostos carbônicos mais promissores nos testes de inibição da atividade enzimática. As letras foram usadas para referir aos compostos de forma mais simplificada.

Estrutura	M (g/mol)	Símbolo
	399.5	M
	354.4	G
	412.3	H
	347.3	A
	375.4	J

Fonte: Elaborado e cedido pelo Dr. Jorge Enrique Hernández González.

Figura 27. Efeito de inibição e curva de resposta à dose dos compostos selecionados sobre ETA. A e B: Composto A. C e D: Composto G. E e F: Composto M. G e H: Composto H. I e J: Composto J. Os dados mostrados são a média $\pm$ SD de três medições independentes.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 8. Valores de de compostos IC₅₀ direcionados a ETA.

Composto	IC ₅₀ ± DP [μM]
A	7,7 ± 0,60
G	5,0 ± 0,90
M	4,3 ± 0,80
H	20,7 ± 2,1
J	34,4 ± 5,5

Fonte: Elaborado pelo autor.

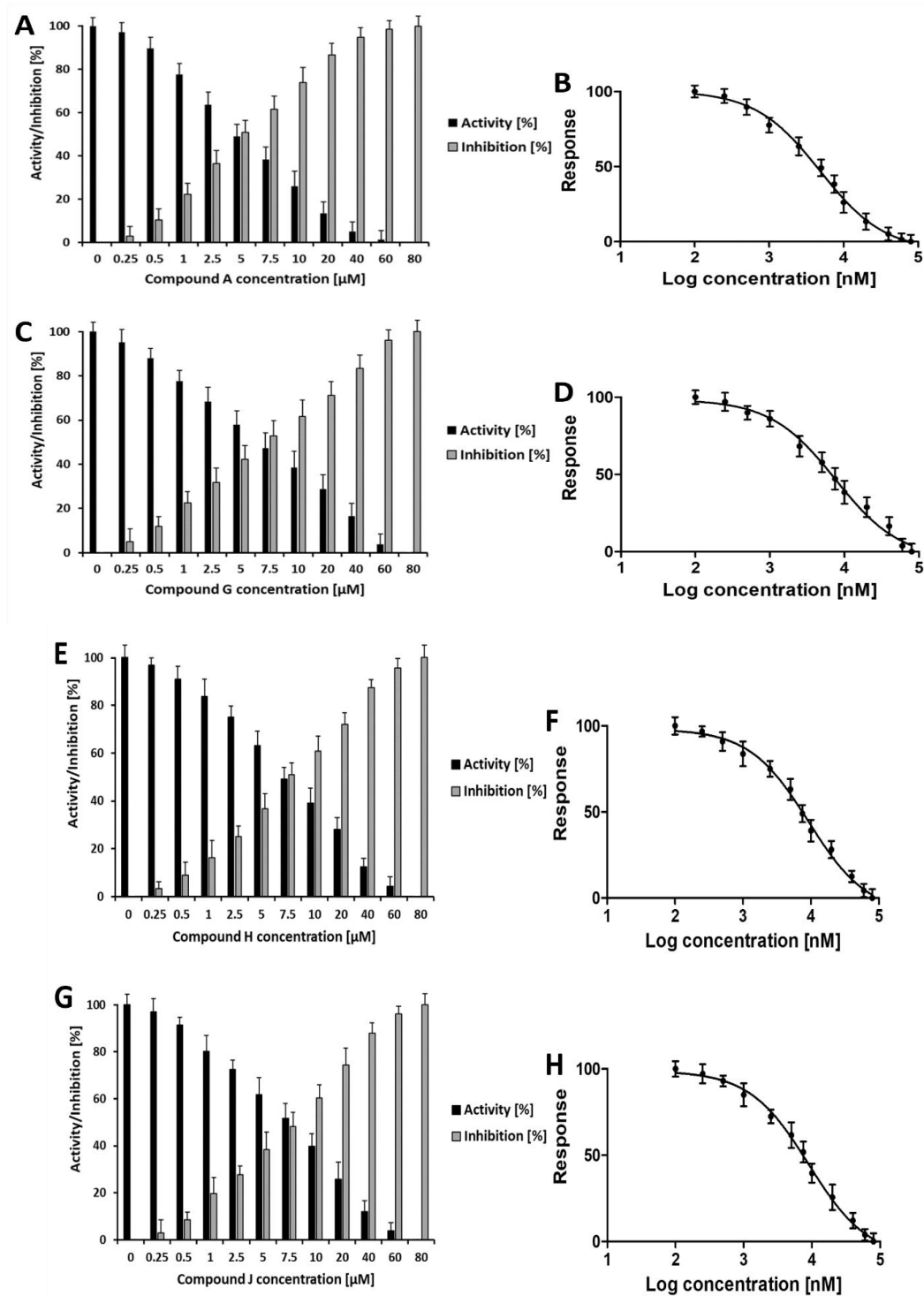
Tabela 9. Valores de IC₅₀ ExhC

Composto	IC ₅₀ ± DP [μM]
A	4,9 ± 0,90
G	8,7 ± 2,30
H	9,9 ± 2,50
J	9,3 ± 1,80

Fonte: Elaborado pelo autor.

Curva dose-resposta de inibição assumiu um formato sigmoidal, dentro do esperado para o estudo de sistemas biológicos (GADAGKAR; CALL, 2015). Demonstrando que quanto maior a concentração do composto químico testado, menor é a ocorrência do processo biológico analisado. Também, essa curva é caracterizada por apresentar dois platôs, um deles em baixas concentrações de inibidor e o outro em altas concentrações de inibidor. Os valores da tabela indicam grande potencial inibidor mesmo com os compostos carbônicos em baixas concentrações. Não existem inibidores para as toxinas esfoliativas descritos na literatura.

Figura 28. Efeito de inibição e curva de resposta à dose dos compostos selecionados sobre ExhC. A e B: Composto A. C e D: Composto G. E e F: Composto H. G e H: Composto J. Os dados apresentados são a média $\pm$ DP de três medições independentes.



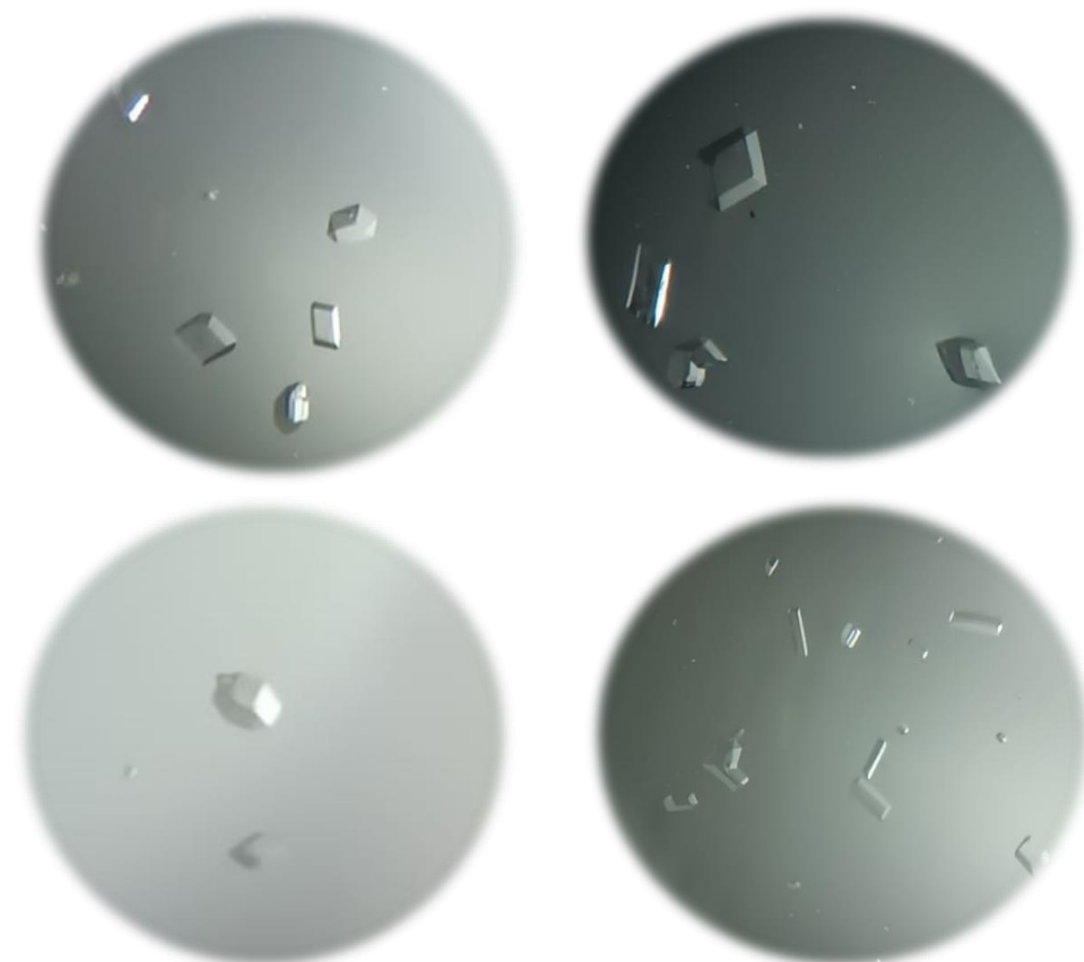
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.10 Co-cristalização de toxinas esfoliativas com potenciais inibidores peptídicos

A proteína ETA wt foi cristalizada (Figura 29) nas condições descritas (CAVARELLI et al, 1997), e o processo foi refinado em busca das melhores condições para que o experimento pudesse ser repetido utilizando ETA pré-incubada com possíveis ligantes de natureza peptídica.

A co-cristalização de ligantes promissores com o alvo ETA teve o intuito de obter informações altamente detalhadas, em nível atômico, sobre as interações intermoleculares. Sendo assim, alguns cristais foram obtidos contendo ETA e ligante na gota de hanging drop, e foram submetidos a experimentos de difração de raios X. Os outros cristais crescidos posteriormente, estão aguardando feixe disponível no Sírius em Campinas. Os cristais referentes às gotas contendo ETA + peptídeo D- α -MSH foram fotografados e podem ser vistos na Figura 30.

Figura 29: Cristal contendo ETA wt.



Fonte: Elaborado pelo autor.

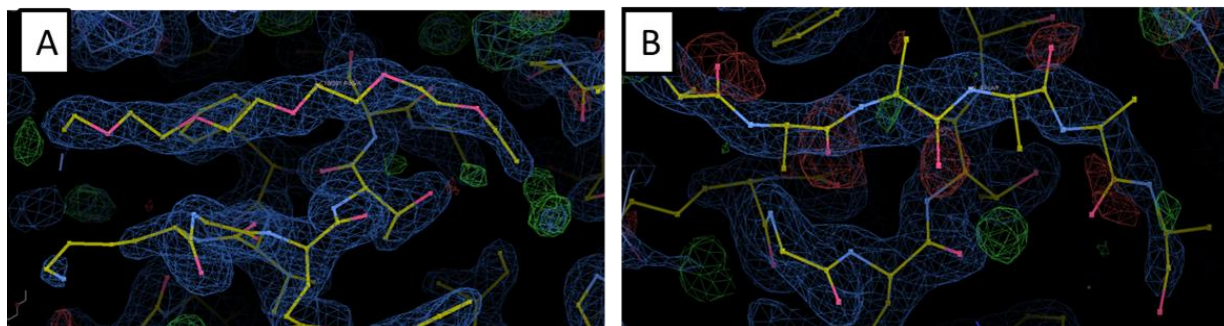
Figura 30: Cristais obtidos através do método Difusão de Vapor, em que a condição da solução precipitante foi PEG 4000 (23-26%) e 1% de DMSO e pH 6,5, sobre gotas contendo ETA wt + peptídeo D- α -MSH.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após os ensaios de difração e resolução das estruturas, não foi possível encontrar os possíveis ligantes e diversos fatores podem explicar o motivo, desde a concentração do peptídeo abaixo do necessário, hidrólise do ligante apesar de estar na conformação D (invertida), até uma competição do PEG 4000 em sítios secundários. O formato da densidade eletrônica encontrada complexada com a ETA, apresenta uma conformação típica de uma cadeia carbônica que corresponde ao PEG 4000 (Figura 31.A), diferente do esperado para a estrutura de ramificada do peptídeo (Figura 31.B). Sendo assim, é possível que o PEG 4000 possa estar ocupando/competindo pelo sítio de ligação do peptídeo. Isso, se mostra interessante para que em futuras análises seja encontrada uma nova condição de cristalização sem PEG. Também, em futuros ensaios de co-cristalização, aumentar a concentração do peptídeo nessa mesma solução contendo PEG, favorecendo a ligação com a ETA.

Figura 31: Comparação da densidade eletrônica encontrada na difração de Raios X. Em (A) é possível visualizar a estrutura que acreditamos ser o PEG 4000 associado a ETA wt; Em (B) densidade eletrônica típica das ramificações aparentadas no peptídeo D- α -MSH;

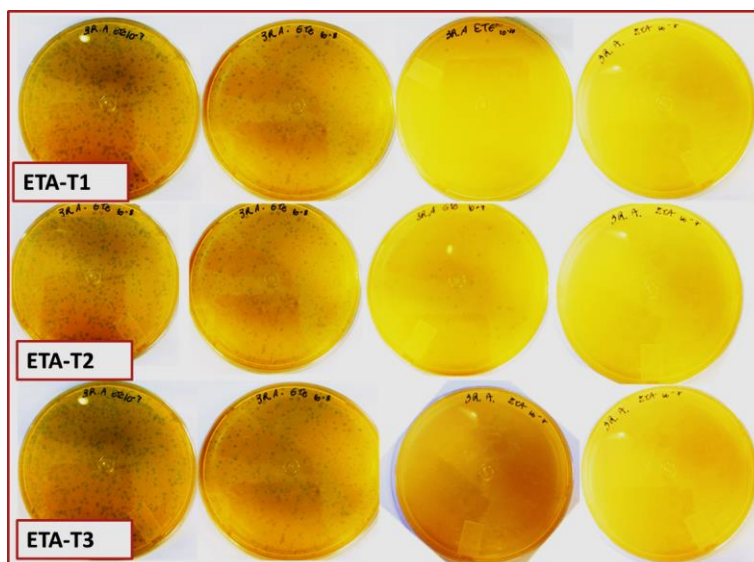


Fonte: Elaborado pelo autor.

5.11 Phage Display

Após incubação em estufa por 16 horas a 37 °C, as colônias azuis foram contadas para avaliar o sucesso experimental (Tabela 10). Na Figura 32, foram apresentados os resultados da titulação do eluato da três gerações e seleção do phage display realizado com ETA wt e biblioteca C7C (New England BioLabs), que demonstrou uma redução seriada de colônias dentro do esperado para o processo. Sendo assim, a partir do número de colônias para cada nível de titulação (Tabela 10), foi possível observar precisão na titulação viral de cada experimento alvo e controle.

Figura 32. Placas de titulação de cultura de *E. coli* ER2738 após infecção por fagos obtidas da biblioteca C7C (New England Biolabs).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 10. Número de colônias obtidas de cada etapa de titulação após ciclos de bioprospecção de exibição de fagos realizados com a biblioteca (New England Biolabs) sobre o alvo ETA wt. T: titulação do alvo. NC: não contável.

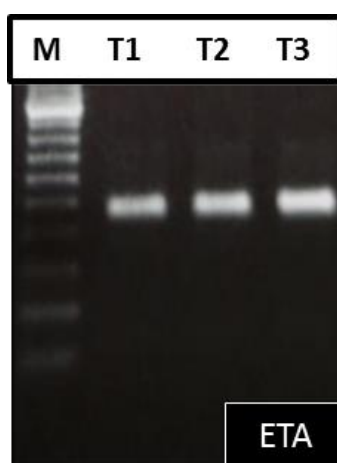
Experimento	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	Controle
ETA-T1	NC	423	122	12	2	0	0
ETA-T2	NC	493	169	9	4	0	0
ETA-T3	NC	323	113	7	2	0	0

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.11.1 Extração de DNA e PCR dos fagos selecionados

Após a extração e purificação do DNA dos fagos, foram submetidos a PCR para identificação das sequências selecionadas por alta afinidade de ligação à proteína alvo ETA wt. Posteriormente à realização da PCR, a concentração de cada amostra foi medida e foram obtidas concentrações superiores a 500 ng/μL, sendo suficientes para a realização do sequenciamento. Além disso, as amostras foram avaliadas usando um gel de agarose 1% (Figura 33).

Figura 33. Gel de agarose a 1% de amostras de DNA do vírus M13 após extração e PCR de fagos M13 com inserções de sequências de nucleotídeos que codificam os peptídeos do capsídeo viral. Ciclos de bioprocessamento (TS1, TS2 e TS3).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Posteriormente ao sequenciamento, as sequências peptídicas foram avaliadas a fim de investigar domínios críticos de reconhecimento entre as ETA e o substrato Dsg-1 para atividade epidérmica, ainda desconhecida. Esta etapa foi realizada utilizando a ferramenta BLAST, através do qual encontramos a identidade dos peptídeos selecionados pelo phage display ETA e as sequências lineares dos substratos reconhecíveis da enzima.

5.11.2 Sequenciamento do DNA dos Phagos

Após sequenciamento, foram obtidas 49 sequências que foram traduzidas em

sequências peptídicas (Figura 34) e utilizadas para encontrar possíveis proteínas parceiras via blast, como descrito no item 13.

Figura 34: sequências traduzidas do DNA dos phagos selecionadas por alta afinidade ao alvo ETA.

Primer	Sequência do fago
>3A11-SS_3487-Primer-GIII_6	CSRSTHASC
>3A3-SS_3569-Primer-GIII_5	CTGSGTLSC
>3A4-SS_3570-Primer-GIII_6	CNTGYGLKC
>3A5-SS_3571-Primer-GIII_6	CKDHEDYMC
>3A7-SS_3573-Primer-GIII_4	CTRLGPTHC
>3A8-SS_3574-Primer-GIII_4	CTQPGDTGC
>3A9-SS_3575-Primer-GIII_5	CDIYGTEQC
>3B1-SS_3576-Primer-GIII_5	CHANTWRTC
>3B10-SS_3497-Primer-GIII_6	CSTYTRSFC
>3B11-SS_3498-Primer-GIII_5	CSHAGKISC
>3B12-SS_3499-Primer-GIII_5	CNSDQTYSC
>3B2-SS_3577-Primer-GIII_6	CNANLTMKC
>3B4-SS_3579-Primer-GIII_4	CEQKTGLTC
>3B5-SS_3580-Primer-GIII_5	CEEGFRVLC
>3B6-SS_3581-Primer-GIII_4	CGQNPGALC
>3B7-SS_3582-Primer-GIII_4	CSNKVPLIC
>3B8-SS_3583-Primer-GIII_4	CSHGSSPHC
>3B9-SS_3584-Primer-GIII_4	CTGQTHGAC
>3C10-SS_3509-Primer-GIII_5	CSHMDSRMC

>3C11-SS_3510-Primer-GIII_5	CFPNLARTC
>3C12-SS_3511-Primer-GIII_5	CSMATTWVC
>3C3-SS_3587-Primer-GIII_5	CTSLFQSSC
>3C4-SS_3588-Primer-GIII_5	CNWMINKEC
>3C5-SS_3589-Primer-GIII_4	CLSGQHAVC
>3C6-SS_3590-Primer-GIII_4	CRHANDRMC
>3C7-SS_3591-Primer-GIII_4	CLPTQLKRC
>3C8-SS_3592-Primer-GIII_4	CDTRSISWC
>3C9-SS_3593-Primer-GIII_5	CHNQSMPIC
>3E10-SS_3529-Primer-GIII_6	CMRDSIYMC
>3E11-SS_3530-Primer-GIII_4	CPSSPTSRC
>3E3-SS_3595-Primer-GIII_4	CLSSSKPWC
>3F11-SS_3542-Primer-GIII_5	CNALTHQAC
>3F12-SS_3543-Primer-GIII_6	CISPNRTHC
>3F3-SS_3600-Primer-GIII_4	CPNSSWLLC
>3F4-SS_3601-Primer-GIII_6	CNAPPRHSC
>3F5-SS_3602-Primer-GIII_6	CTIGQVNQC
>3F6-SS_3603-Primer-GIII_5	CNDTSRETC
>3G12-SS_3555-Primer-GIII_6	CPHSPTNSC
>3G3-SS_3607-Primer-GIII_5	CFHNETNLC
>3G4-SS_3608-Primer-GIII_6	CTSIRTAEC
>3G6-SS_3610-Primer-GIII_5	CVMPHTASC

>3G8-SS_3612-Primer-GIII_6	CSDYNLSRC
>3H10-SS_3565-Primer-GIII_4	CFASTNSLC
>3H12-SS_3567-Primer-GIII_5	CSQPNSYQC
>3H2-SS_3613-Primer-GIII_6	CTLNYTMGC
>3H5-SS_3616-Primer-GIII_6	CTTKDVMMC
>3H7-SS_3618-Primer-GIII_5	CKMPGTLEC

Fonte: Elaborado pelo autor.

Após busca via blast realizando triagens com base nos critérios comparativos de similaridade estrutural ao substrato, as seguintes possíveis estruturas com alguma relevante similaridade a ETA estão descritos abaixo na figura 35.

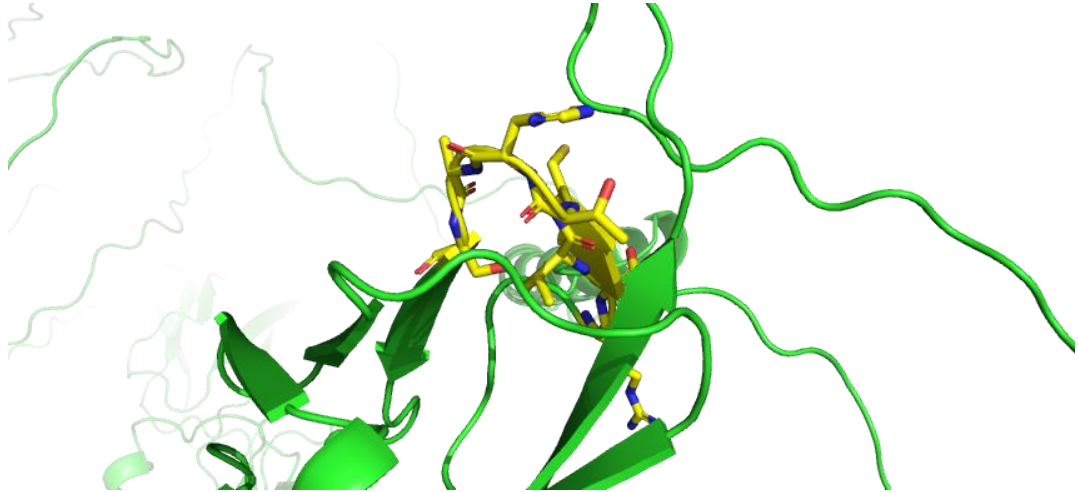
Figura 35: Sequências de alta afinidade ao alvo ETA relacionados a fragmentos de sequências relevantes encontradas na natureza.

Primer	Sequência do Fago	Sequência Correspondente	Espécie
3A11-SS_3487-Primer-GIII_6	CSRSTHASC	Desmoglein 4	<i>Mus musculus</i>
3A3-SS_3569-Primer-GIII_5	CTGSGTLSC	Protocaderina beta	<i>Mus musculus</i>
3A9-SS_3575-Primer-GIII_5	CDIYGTEQC	Protocaderina beta	<i>Homo sapiens</i>
3B8-SS_3583-Primer-GIII_4	CSHGSSPHC	Protocolageno	<i>Homo sapiens</i>
3C8-SS_3592-Primer-GIII_4	CDTRSISWC	Integrina	<i>Homo sapiens</i>
3F12-SS_3543-Primer-GIII_6	CISPNRTHC	Colageno alfa	<i>Homo sapiens</i>
3H10-SS_3565-Primer-GIII_4	CFASTNSLC	Integrina	<i>Homo sapiens</i>

Fonte: Elaborado pelo autor.

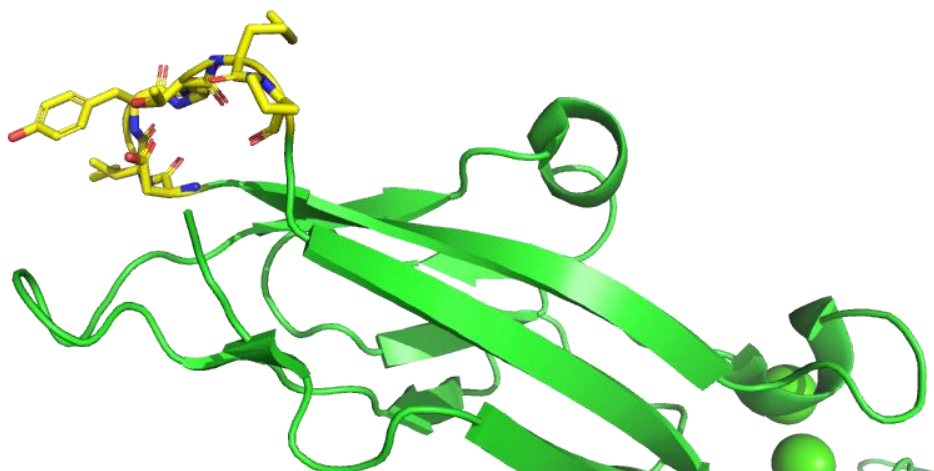
Dentre sequências supracitadas na figura 35, as correspondentes à Dsg-4 de *Mus musculus* (Figura 36) e Integrina de *Homo sapiens* (Figura 37) foram escolhidas para serem sintetizadas com base na triagem envolvendo avaliação de critérios como localização na superfície e estrutura em formato de alça, uma vez que o peptídeo no Phago era circular.

Figura 36. Em amarelo está representada a sequência obtida por phage display e posteriormente encontrada via blast com altíssima identidade e contida na proteína Dsg-4 murina. Em verde está a estrutura da Dsg-4 gerada por alpha fold e em amarelo está representada a sequência contida na Dsg-4 que apresentou match via blast quando a busca foi realizada com a sequência CSRSTHASC.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 37. Em amarelo está representada a sequência obtida por phage display e posteriormente encontrada via blast com altíssima identidade e contida na proteína Protocaderina 15. Em verde está a estrutura da Protocaderina 15 gerada por alpha fold e em amarelo está representada a sequência contida na Protocaderina 15 que apresentou match via blast quando a busca foi realizada com a sequência: CDIYGTEQC.



Fonte: Elaborado pelo autor.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados alcançados, podemos concluir que o processo de transformação, expressão e purificação das proteínas ETA, ETE e ExhC wt fora um sucesso. E, as técnicas empregadas nos testes *in silico* e *in vitro* de potenciais inibidores das ETs, foram promissoras. Agora, os dados servirão de base para futuros estudos *in vivo*. *Enquanto que*, a bioprospecção de possíveis peptídeos de alta afinidade ao alvo (ETA) através da técnica “Phage Display”, também, promoveram sequências peptídicas de alta afinidade ao alvo. Desse modo, o estudo *in silico* de peptídeos potencialmente inibidores da ação esfoliativa, se configurou como uma base norteadora embasada em dados empíricos. Assim, acredita-se que com esse respaldo, às decisões de quais serão os próximos peptídeos a serem comprados e testados *in vivo*, nos próximos estudos, terão chances de serem assertivas enquanto a interação com as ETs.

Com respaldo da literatura, a cristalização da proteína ETA wt foi bem sucedida. Agora, buscamos a co-cristalização das ETs com os ligantes, tanto os carbônicos como os peptídicos (o que seria um resultado inédito na literatura). Desse modo, novos protocolos de cristalização estão sendo realizados para encontrar a condição ideal de co-cristalização dessas proteínas com tais ligantes promissores. Resultados positivos na determinação de sua estrutura cristalográfica associada a um ligante podem proporcionar informações acerca do mecanismo fino de acomodação dos peptídeos nos sítios ativos das toxinas e/ou sítios secundários moduladores, e assim, possibilitando a extração de informações valiosas para a descoberta de novos inibidores, bem como, a elucidação dos mecanismos moleculares da ação esfoliativa, que ainda carecem de dados conclusivos.

REFERÊNCIAS

- ADESIYUN, A. A., LENZ, W., SCHAAL, K. P. Exfoliative toxin production by *Staphylococcus aureus* strains isolated from animals and human beings in Nigeria. **Microbiol.**, v. 14, p. 357–362, 1991.
- AHRENS, P., ANDRESEN, L. O. Cloning and sequence analysis of genes encoding *Staphylococcus hyicus* exfoliative toxin types A, B, C, and D. **J. Bacteriol.**, v. 25, p. 1833–1837, 2004.
- ALVES, P. D. D., et al. Molecular characterisation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from small and large ruminants reveals a host rather than tissue specificity. **Vet. Microbiol.**, v. 137, p. 190–195, 2009.
- AMAGAI, M., et al. Staphylococcal exfoliative toxin B specifically cleaves desmoglein 1. **JID.**, v.118, n. 5, p. 845-850, 2002
- AMAGAI, M., et al. Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein-1. **Nat. Med.**, v. 6, p. 1275-1277, 2000.
- AOKI, V., RIVITTI, E. A., ITO, L. M., HANS-FILHO, G., DIAZ, L. A. **Historical profile of the immunopathogenesis of endemic pemphigus foliaceus. An. Bras. Dermatol.**, v. 80, n. 3, p. 287-92, 2005.
- AZAVEDO, J., ARBUTHNOTT, J. P. Prevalence of epidermolytic toxin in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **J. Med. Microbiol.**, v. 14, p. 341–344, 1981.
- BUKOWSKI, M., WLADYKA, B., DUBIN, G., Exfoliative Toxins of *Staphylococcus aureus*. **Toxins (Basel)**, v. 2, p. 1148-1165, 2010.
- CARVALHO, C. et al. Monitoramento microbiológico sequencial da secreção traqueal em pacientes intubados internados em unidade de terapia intensiva pediátrica. **J.**

Pediatr., v. 81, n. 1, p. 29-33, 2005.

CAVALCANTI, S. *et al.* Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a university hospital. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 9, n. 1, p. 56- 63, 2005.

CAVARELLI, J., *et al.* The Structure of *Staphylococcus aureus* Epidermolytic Toxin a, an Atypic Serine Protease, at 1.7 Å Resolution. **Struct.**, v. 5, p. 813-824, 1997.

CHESNEAU O., *et al.* *Staphylococcus pasteurii* sp. Nov. Isolated from human, animal, and food specimens. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v 43, p. 237-44, 1993.

CHOI, Y. W., *et al.* Interaction of *Staphylococcus aureus* toxin "superantigens" with human T cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 86, p. 8941–8945, 1989.

CLACKSON T., LOWMAN H. B. Phage Display: a practical approach. **Oxford University Press, Inc., New York**, 2004.

COUTO, I., SANTOS S. I., SA-LEÃO R., DE LENCASTRE, H. Molecular characterization of *Staphylococcus sciuri* strains isolated from humans. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 1136–1143, 2000.

CRIBIER, B., PIEMONT, Y., GROSSHANS, E. Staphylococcal scalded skin syndrome in adults. A clinical review illustrated with a new case. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 30, p. 319–324, 1994.

DAKIC, I., *et al.* S. Isolation and molecular characterization of *Staphylococcus sciuri* in the hospital environment. **J. Clin.**, v. 43, n. 6, p. 2782–2785, 2005.

DANCER, S. J., *et al.* The Epidermolytic Toxins Are Serine Proteases. **FEBS Lett.**, v. 268, p. 129-132, 1990.

DEMIDYUK, I. V., CHUKHONTSEVA, K. N., KOSTROV, S. V. Glutamyl Endopeptidases: The Puzzle of Substrate Specificity. **Acta Nat.**, v. 9, p. 17-33, 2017.

DIELTJENS, T., et al. Unravelling the antigenic landscape of the HIV-1 subtype A envelope of an individual with broad cross-neutralizing antibodies using phage display peptide libraries. **J. Virol. Meth.**, v. 169, p. 95–102, 2010.

DOTI N., MARDIROSSIAN M., SANDOMENICO A., RUVO M., CAPORALE A. Recent Applications of Retro-Inverso Peptides. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 22, n. 16, p. 8677, 2021.

PESSOA, F. Poema X Mar Português. **Edições Ática: Lisboa**, p. 16. 1959.

FLEISCHER, B., BAILEY, C. J. Recombinant epidermolytic (exfoliative) toxin A of *Staphylococcus aureus* is not a superantigen. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 180, p. 273–278, 1992.

GETSIOS, S., HUEN, A. C., GREEN, K. J. Working out the strength and flexibility of desmosomes. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 5, n. 4, p. 271, 2004.

GENHEDEN S., RYDE U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods for estimating ligand binding affinities. **Specialist Opin Drug Discv.**, v. 10, n. 5, p. 449-61, 2015.

GIAMMARINARO P., et al. Development of a new oligonucleotide array to identify *Staphylococcal* strains at species level. **J. Clin. Microbiol.**, v. 2, n. 43, p. 3673-80, 2005.

GISMENE, C., et al. *Staphylococcus aureus* Exfoliative Toxin E, Oligomeric State and P186 Flip: Implications for its Mechanism of Action. **Int. J. Mol. science**, v. 23, p. 9857, 2022.

HANAKAWA, Y., et al. Enzymatic and molecular characteristics of the efficiency and specificity of exfoliative toxin cleavage of desmoglein 1. **J. Biological Chem.**, v. 279, n. 7, p. 5268-5277, 2004.

HANES, C. S. Studies on plant amylases: The effect of starch concentration on the rate of hydrolysis by amylase from sprouted barley. **Biochem. J.**, v. 26, p. 1406–1421, 1932.

HISATSUNE, J., et al. Emergence of *Staphylococcus aureus* Carrying Multiple Drug Resistance Genes on a Plasmid Encoding Exfoliative Toxin B. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 57, p. 6131-6140, 2013.

IWATSUKI, K. et al. Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. **J. Dermatol Sci.**, v. 42, p. 203-14, 2006.

JOHNSON, W. M., et al. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, p. 426–430, 1991.

JUNQUEIRA, L. C. U., CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2018.

KELLY, K. A., BARDEESY, N., ANBAZHAGAN, R. Targeted nanoparticles for imaging incipient pancreatic ductal adenocarcinoma. **PLoS Med.**, v. 5, p. 657–668, 2008.

LADHANI, S., et al. Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrom. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, p. 224–242, 1999.

LADHANI, S. Understanding the Mechanism of Action of the Exfoliative Toxins of *Staphylococcus aureus*. **Immunol. Med. Microbiol.**, v. 39, p. 181-189, 2003.

LEE, C. Y., et al. Sequence determination and comparison of the exfoliative toxin A and toxin B genes from *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.**, v. 3, p. 3904–3909, 1987.

LI H., WANG Y., DING L., ZHENG S. J. A toxina esfoliativa C de *Staphylococcus sciuri* (ExhC) é um indutor de necrose para células de mamíferos. **PLoS Um**, v. 6, n. 7, p. 23145, 2011.

LYELL, A. A review of toxic epidermal necrolysis in Britain. **J. Dermatol.**, v. 79, p. 662–

671, 1967.

MARIUTTI, R. B., et al. Crystal structure of *Staphylococcus aureus* exfoliative toxin D-like protein: Structural basis for the high specificity of exfoliative toxins. **Biochem. Biophys. Research Communications**, v. 467, n. 1, p. 171-177, 2015.

MARIUTTI, R. B. et al Exfoliative Toxins of *Staphylococcus aureus*, p.127–143. In **Enany, S., Crotty Alexander, L. E.** The Rise of Virulence and Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. InTec, 2017.

MELISH, M. E., GLASGOW, L. A. The staphylococcal scalded-skin syndrome: development of an experimental model. **N. E. J. M.**, v. 282, n. 20, p. 1114-1119, 1970.

MELISH, M. E., GLASGOW, L. A., TURNER, M. D. The staphylococcal scalded-skin syndrome: isolation and partial characterization of the exfoliative toxin. **J. Infect. Dis.**, v.125, p. 129–140, 1972.

MILLER, B. R., et al. AE MMPBSA.py: An efficient program for final state free energy calculations. **J. Chem. Theoretical computation**, v. 8, p. 3314–3321, 2012.

MONDAY, S.R., et al. Unique superantigen activity of staphylococcal exfoliative toxins. **J. Immunol.**, v. 162, p. 4550–4559, 1999.

MORLOCK, B. A., SPERO, L., JOHNSON, A. D. Mitogenic activity of staphylococcal exfoliative toxin. **Infect. Immun.**, v. 30, p. 381–384, 1980.

MURRAY P. R. **Microbiologia Médica. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier**, 2009.

NISHIFUJI, K., SUGAI, M., AMAGAI, M. Staphylococcal exfoliative toxins: “Molecular scissors” of bacteria that attack the cutaneous defense barrier in mammals. **J. Dermatol. Sci.**, v. 49, p. 21–31, 2008.

NOGUCHI, N ., et al. Antimicrobial agent of susceptibilities and antiseptic resistance gene distribution among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients with impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 2119–2125, 2006.

PETERS, E. A., et al. Membrane insertion defects caused by positive charges in the early mature region of protein pIII of filamentous phage fd can be corrected by prfA suppressors. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 4296–4305, 1994.

RAGO, J. V. et al. Mutational analysis of the superantigen staphylococcal exfoliative toxin A (ETA). **J. Immunol.**, v. 164, p. 2207–2213, 2000.

RAGO J. V., et al. Staphylococcal exfoliative toxins cleave alpha- and beta-melanocyte-stimulating hormones. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 4, p. 2366, 2000.

ROWLEY, M. J., SCEALY, M., WHISSTOCK, J. C., JOIS, J. A., WIJEYEWICKREMA, L. C. AND MACKAY, I. R. Identification of conformational epitopes for human IgG on Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*. **J. Immunol.**, v. 164, p. 3413–3419, 2000.

SAKURAI, S., SUZUKI, H., MACHIDA, K. Rapid identification by polymerase chain reaction of staphylococcal exfoliative toxin serotype A and B genes. **Microbiol. Immunol.**, v. 39, p. 379–386, 1995.

SANTOS, A. L., et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar , **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SCHWEMMER, T. et al. Peptide-Mediated Nanoengineering of Inorganic Particle Surfaces: A General Route toward Surface Functionalization via Peptide Adhesion Domains. **J. Amer. Chem. Soc.**, v. 134, p. 2385–2391, 2012.

STANLEY, J. R., AMAGAI, M. Pemphigus, bullous impetigo, and the staphylococcal scalded-skin syndrome. **N. E. J. M.**, v. 355, n. 17, p. 1800-1810, 2006.

SAWADA, T. et al. Affinity-Based Screening of Peptides Recognizing Assembly States of Self-Assembling Peptide Nanomaterials **J. Amer. Chem. Soc.**, v. 131, p. 14434–14441, 2009.

SUGIMURA, Y., et al. Screening for the preferred substrate sequence of transglutaminase using a phage-displayed peptide library: identification of peptide substrates for TGASE 2 and Factor XIIIa. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 17699–17706, 2006.

VAISHNANI, J. Superantigen. **Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.**, v. 75, p. 540–544, 2009.

VATH, G. M., et al. The structure of the superantigen exfoliative toxin A suggests a novel regulation as a serine protease. **Biochem.**, v. 36, p. 1559–1566, 1997.

VELÁZQUEZ-MEZA, M. E. *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination. **Salud Pública de México**, v. 47, p. 381-7, 2005.

VON RITTERSHAIN, G. R. Die exfoliative dermatitis jungener senglunge. **Z. Kinderheilkd**, v. 2, p. 3–23, 1878.

WATERHOUSE, A., et al. Swiss-Model: Homology Modelling of Protein Structures and Complexes. **Nucleic Acids Res.**, v. 46, p. 296-303, 2018.

YAMAGUCHI, T., et al. Identification of the *Staphylococcus aureus* pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. **IAI**, v. 70, p. 5835-5845, 2002.

YAMAGUCHI, T., et al. Clonal association of *Staphylococcus aureus* causing bullous impetigo and the emergence of new methicillin-resistant clonal groups in Kansai district in Japan. **J. Infect. Dis.**, v. 185, p. 1511–1516, 2002.

ZHAO, S. W. Selecting peptide ligands of microcystin-LR from phage displayed random libraries. **Environ. Int.**, v. 31, p. 535–541, 2005.