

ANA CARLA CAIRES

**SÍNTESE, ESTRUTURA E ATIVIDADE DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DE ParD, O
ANTÍDOTO DO MÓDULO TOXINA-ANTITOXINA ParDE.**

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

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto

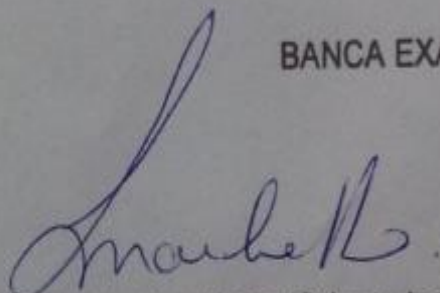
ARARAQUARA - SP
2014

ANA CARLA CAIRES

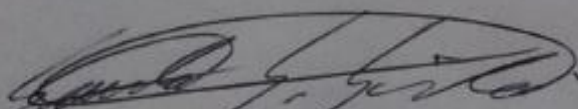
Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestra em Biotecnologia.

Araraquara, 15 de dezembro de 2014.

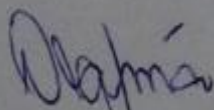
BANCA EXAMINADORA



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



Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



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

DADOS CURRICULARES

Nome: Ana Carla Caires

Nome em citações bibliográficas: CAIRES, A.C.

Filiação: Luiz Carlos Caires e Antonia Sperti Caires

Data de nascimento: 26/04/1988

Estado civil: solteira

Telefone: (16) 99156-2685

E-mail: caires.ana@gmail.com

Resumo das qualificações: Mestre em Biotecnologia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP, na área de síntese de peptídeos com ênfase em sistema toxina-antitoxina e peptídeos antimicrobianos. Especialista em Hematologia Clínica e Banco de Sangue pela Academia de Ciências e Tecnologia de São José do Rio Preto. Bacharel em Biomedicina pelo Centro Universitário de Araraquara – UNIARA (2009).

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2012 - 2014

Mestrado em Biotecnologia.

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

Título: Síntese, Estrutura e Atividade de Peptídeos Derivados de ParD, o Antídoto do Módulo Toxina-Antitoxina ParDE

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto.

Bolsista FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

2010 - 2011

Especialização em Hematologia e Banco de Sangue pela Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto – SP.

2006 - 2009

Bacharelado em Biomedicina - Habilitação em Patologia Clínica pelo Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, SP.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

- Laboratório de Análises Clínicas da Santa Casa de Misericórdia de Araraquara

Cargo: Biomédica

Descrição: Realização de coleta de sangue, triagem e exames nas áreas de Hematologia Clínica, Bioquímica, Imunologia, Imuno-Hematologia e Líquidos Corporais. Plantonista em urgência e emergência, liberação e digitação de laudos.

Período: 04/11/2010 – 02/03/2013

- Voluntariado no Laboratório de Análises Clínicas da Santa Casa de Misericórdia de Araraquara

Período: 13/09/2010 a 03/11/2010

- Iniciação Científica realizada no Laboratório de Hematologia Clínica do Centro Universitário de Araraquara.

Descrição: padronização da curva de fragilidade osmótica para auxílio no diagnóstico das anemias ferropriva, falciforme, megaloblástica, hemolítica esferocítica e talassemias.

Período: janeiro de 2008 a novembro de 2009

- Estágio realizado no Laboratório de Análises Clínicas da Santa Casa de Misericórdia de Araraquara

Período: 30 de Março de 2008 a 09 de Agosto de 2008

Carga Horária: 267 horas

- Iniciação Científica no Laboratório de Hematologia do Centro Universitário de Araraquara.

Período: Janeiro de 2008 a Novembro de 2009

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS

CAIRES, A.C.; ROCHA, C.A; GARCIA, A.; MARCHETTO, R. Synthesis and Interaction Studies of Peptides from ParD, the Antitoxin of the ParD-ParE System In: 43rd Annual Meeting of SBBq, 2014, Foz do Iguaçu.

GARCIA, A., ROSSI, D., AGUIAR, C.R., CAIRES, C, A., VALENTINI, S, R., ZANELLI, C, R., MARCHETTO, R. Inhibition Activity of Human Topoisomerase IIa by protein YacG of *Klebsiella pneumoniae*. In: 43rd Annual Meeting of SBBq, 2014, Foz do Iguaçu.

ROCHA, C. A., BARBOSA, L. C. B., GARCIA, A., SANCHES, P. R. S., ABREU, E. M., CAIRES, A. C., MARCHETTO, R. Peptide Inhibitors of Bacterial Topoisomerases derived from *Escherichia coli* Toxin ParE In: 5th Symposium on Biological Chemistry, Health and Medicine: Frontier and New Perspectives, 2013, Ilha Bela.

ROCHA, C. A., GARCIA, A., SANCHES, P. R. S., ZOTTIS, A., CAIRES, A. C., ABREU, E. M., MARCHETTO, R. Design e síntese de peptídeos inibidores de topoisomerases derivados da proteína ParE de *Escherichia coli* In: XXI Jornada de Jovens Investigadores da AUGM, 2013, Corrientes, Argentina.

ROCHA, C. A.; CAIRES, A.C.; ZOTTIS, A.; GARCIA, A.; SANCHES, P. R. S.; ABREU, E. M.; MARCHETTO, R. Topoisomerases Inhibitors Peptides derived from *E. coli* Toxin ParE. In: III International Symposium on Drug Discovery, 2013, Araraquara.

CAIRES, A.C.; GILENO, M.C. Padronização e Aplicação da Curva de Fragilidade Osmótica In: IV Congresso de Iniciação Científica, 2009, Araraquara.

PRÊMIOS RECEBIDOS

“Qualidade Científica e Acadêmica” em IV Congresso de Iniciação Científica.

“Padronização e Aplicação da Curva de Fragilidade Osmótica”, UNIARA – Centro Universitário de Araraquara (2009).

IDIOMAS

Inglês: Avançado

É com grande carinho que dedico este trabalho,

Aos meus queridos pais, Luiz Carlos (in memoriam) e Antonia.

Ao meu amado Tiago.

Ao meu irmão Rodrigo e minha cunhada Cristiane.

Obrigado! Vocês tornam a vida mais incrível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais por todo o amor e carinho, pela educação que me deram, e por me ensinarem sempre as coisas importantes da vida pelas quais devemos lutar.

Querido pai, você partiu, mas estará presente para sempre em meu coração, todas as suas palavras e ensinamentos irão refletir em mim eternamente. A você pai, o meu amor eterno. A minha querida mãe, amor incondicional!

Obrigada por ser uma mãezona, sempre. E também por toda a paciência, eu sei que não sou fácil (risos).

Meus pais, a base da minha existência e da minha educação, o meu “obrigado” é pequeno diante de tudo que fizeram por mim. Sou eternamente grata, e agradeço a Deus por ter me dado pais como vocês.

Ao meu irmão Rodrigo (tato) e a “cunha” Cristiane, por todo apoio, carinho, amizade e risos! Vocês são demais.

Ao Tiago, além de melhor amigo, o meu grande amor. Obrigada por todo o carinho, amor, paciência, por estar sempre caminhando junto comigo e me incentivando. Meu companheiro de todos os momentos. Você torna a vida mais alegre e as dificuldades mais leves. Obrigada por tudo amor!

A todos os meus familiares, em especial ao meu “primo-irmão” Juninho, minha prima Alana, e minhas amigas do coração Nayara, Karen e Agatha (Maria's!), por todo o apoio e incentivo.

Ao orientador Dr. Reinaldo Marchetto, pela oportunidade concedida, pela atenção, ensinamentos e por toda a paciência, amizade e dedicação na realização deste trabalho.

Aos meus companheiros de laboratório Isabelle, Matheus, Larissa, Edson (Araka), Aline, Crusca, Júlia, Norival e Esteban pela convivência diária, por toda a ajuda e conhecimentos compartilhados.

Um agradecimento especial para o amigo Anderson Garcia que me auxiliou desde o primeiro experimento, obrigada pela paciência e amizade, e, também a querida amiga Rute Lopes por todo o apoio, carinho e por todas as risadas juntas.

Ao pós-doutorando Aderson, pelas análises de modelagem molecular e *docking*, que contribuíram muito para este trabalho.

Ao professor Dr. Saulo Santesso pela amizade, conhecimentos compartilhados, e pela disposição em prestar ajuda sempre que necessário.

Ao professor Eduardo Maffud por colaborar na conduta laboratorial e também compartilhar seus conhecimentos.

Aos funcionários da seção de Pós-graduação, especialmente à Célia, Wennia, Paula e Sandra por toda a atenção e paciência.

Aos funcionários da biblioteca, especialmente à Maria Isabel, por toda atenção e ajuda na elaboração das referências.

Aos funcionários do Instituto de Química Luísa, Ademir, Gaspar, Tarcísio e Rogério, por toda a disposição em ajudar.

À FAPESP pela bolsa concedida.

*“A mais profunda emoção que podemos experimentar é inspirada pelo senso de mistério.
Essa é a emoção fundamental que inspira a verdadeira arte e a verdadeira ciência.”*
(Albert Einstein)

RESUMO

O sistema ParE-ParD, identificado no plasmídeo RK2 de uma ampla gama de hospedeiros, é um sistema toxina-antitoxina (TA), sendo ParE (103 aminoácidos) a toxina e ParD (83 aminoácidos) a antitoxina. ParD é capaz de neutralizar a ação de ParE pela formação de um complexo estável, que também é eficaz na auto-repressão do operon *parDE*. ParE possui atividade citotóxica na replicação do DNA por interferir no mecanismo de ação da DNA girase. Diversos estudos demonstraram que ParD consiste de duas regiões estruturalmente distintas: uma N-terminal, bem ordenada que consiste no sítio de ligação do DNA e outra C-terminal, não estruturada, onde sugere-se ocorrer a ligação da toxina. Em relação à ligação com a toxina, um modelo atual de reconhecimento e ligação em sistemas TA invoca uma transição de fases desordenada-ordenada, na parte C-terminal da antitoxina, porém faltam dados que confirmem se este modelo de transição de fases desordenada-ordenada também pode ser aplicado para o sistema ParE-ParD. Neste sentido, este trabalho objetivou o design, a síntese e o estudo de interação de peptídeos derivados da toxina ParE, com peptídeos derivados da antitoxina ParD. Com base nas informações estruturais destas proteínas, sequências peptídicas derivadas de ParE e ParD foram projetadas, com o propósito de encontrar a estrutura mínima de ParD capaz de neutralizar a ação tóxica de ParE. As sequências peptídicas foram sintetizadas pela metodologia de fase sólida, purificadas e analisadas por HPLC e caracterizadas por espectrometria de massas. Os estudos de interação dos peptídeos foram realizados através de ensaios de cromatografia de afinidade e supressão de fluorescência. A fluorescência intrínseca dos peptídeos denominados ParEAC2 e ParEAC3 foi suprimida pelos derivados de ParD, evidenciando a formação de complexos estáveis entre as espécies, resultados confirmados pelos ensaios de cromatografia de afinidade. Estudos de *Docking* molecular demonstraram que o modo de interação do complexo ParEAC3-ParDAC3 foi coerente com o complexo cristalográfico obtido para ParE-ParD de *Caulobacter crescentus*. Com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que o análogo ParDAC3 representa uma estrutura peptídica mínima para neutralizar o efeito da toxina ParE.

PALAVRAS-CHAVE: toxinas bacterianas, topoisomerases, Sistema ParE-ParD, peptídeos

ABSTRACT

The ParE-ParD system represents a toxin-antitoxin module of the broad host range plasmid RK2. ParE (103 amino acids) is the toxin, whereas ParD (83 amino acids) constitutes the antidote able to neutralize ParE by forming a stable complex that is also effective in the autorepression of the *parDE* operon. The ParE toxin inhibits DNA gyrase activity and thereby blocks DNA replication. Several studies have shown that ParD consists of two structurally distinct regions: an N-terminal, orderly, consisting of the DNA binding site and another C-terminus, unstructured, where it is suggested to occur toxin binding. For binding with toxin, a current model of recognition and binding in TA systems invokes a disorder-to-order transition in the antitoxin. Specifically, a disordered region of the free antitoxin is organized into a well-defined secondary structure upon binding to its cognate toxin. But, no available data that proves the application of disorder-to-order transition model for ParE-ParD system. Therefore, this work aims to study the interaction of the ParE protein and its analogues with peptides from ParD antitoxin. Based on the structural information's of these proteins, peptide sequences derived from ParE and ParD were designed in order to find the minimal ParD structure able to neutralize the toxic effect of ParE. The peptide sequences were synthesized by solid phase methodology, purified and analyzed by HPLC and characterized by mass spectrometry. The interaction studies were performed by affinity chromatography and fluorescence quenching assays. The intrinsic fluorescence of the denominated ParEAC2 and ParEAC3 peptides was quenched by ParD derivatives, evidencing complex formation, results confirmed by affinity chromatography assays. Molecular Docking studies demonstrated that the interaction mode of ParEAC3-ParDAC3 complex was consistent with the obtained crystallographic complex ParE-ParD of *Caulobacter crescentus*. Based on our results, it is possible concluded that the ParDAC3 analogue is a minimum peptide structure necessary for neutralize the toxic effect of ParE protein.

KEYWORDS: bacterial toxins, topoisomerases, ParE-ParD system, peptides

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Número de ligações Lk. (A): Lk = 1 - existe somente um ponto de ligação entre as duas fitas do DNA. (B): existem seis pontos de ligações entre as fitas, gerando um Lk = 6.	18
Figura 2. Diagramas esquemáticos das estruturas das subunidades da DNA girase	20
Figura 3. Modelo de mecanismo de Ação da DNA Girase.	21
Figura 4. Reações catalisadas pela DNA Girase.....	22
Figura 5. Estrutura molecular dos antimicrobianos quinolônicos e cumarínicos	23
Figura 6. Representação esquemática da morte celular induzida por plasmídeo contendo sistema TA.....	25
Figura 7. Estrutura primária de ParE e de ParD de E. coli (plasmídeo RK2).	26
Figura 8. Visualização progressiva de uma resina.	29
Figura 9. Protetores usuais para função α -amina na metodologia da fase sólida. ...	31
Figura 10. Mecanismo de formação de ligação peptídica empregando carbodiimidas.	33
Figura 11. Esquema da reação envolvida durante o teste de ninidrina.	33
Figura 12. Esquema ilustrativo da SPFS, utilizando a estratégia Fmoc.	34
Figura 13. Estrutura primária dos análogos de ParD e ParE sintetizados.	44
Figura 14. Sequências dos análogos do ParD com cisteína na extremidade N-terminal.....	45
Figura 15. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo ParDAC1 antes (A) e após (B) purificação.....	55
Figura 16. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo ParDAC2 antes (A) e após (B) purificação.....	56
Figura 17. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo ParDAC3 antes (A) e após (B) purificação.....	56
Figura 18. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo ParDAC1-Cys antes (A) e após (B) purificação.....	57
Figura 19. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo ParDAC2-Cys antes (A) e após (B) purificação.....	57
Figura 20. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo ParDAC3-Cys antes (A) e após (B) purificação.....	58
Figura 21. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo ParEAC1 antes (A) e após (B) purificação.....	59
Figura 22. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo ParEAC2 antes (A) e após (B) purificação.....	60
Figura 23. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo ParEAC3 antes (A) e após (B) purificação.....	60
Figura 24. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo ParEAC4 antes (A) e após (B) purificação.....	61
Figura 25. Espectro de massas do peptídeo ParDAC1.....	64
Figura 26. Espectro de massas do peptídeo ParDAC2.....	64
Figura 27. Espectro de massas do peptídeo ParDAC3.....	64
Figura 28. Espectro de massas do peptídeo ParEAC1.....	65
Figura 29. Espectro de massas do peptídeo ParEAC2.....	65
Figura 30. Espectro de massas do peptídeo ParEAC3.....	65
Figura 31. Espectro de massas do peptídeo ParEAC4.....	66
Figura 32. Espectro de massas do peptídeo ParDAC1-Cys.....	66

Figura 33. Espectro de massas do peptídeo ParDAC2-Cys.....	66
Figura 34. Espectro de massas do peptídeo ParDAC3-Cys.....	67
Figura 35. Imobilização dos análogos de ParD em resina Sepharose.	68
Figura 36. Ensaios de Cromatografia de afinidade com ParDAC1 imobilizado.	69
Figura 37. Ensaios de Cromatografia de afinidade com ParDAC2 imobilizado.	69
Figura 38. Ensaios de Cromatografia de afinidade com ParDAC3 imobilizado.	70
Figura 39. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo Acetil-ParEAC3 antes (A) e após (B) purificação.	71
Figura 40. Espectro de massas do peptídeo acetil-ParEAC3.....	72
Figura 41. Ensaios de Cromatografia de afinidade comparativos de ParEAC3 e acetil-ParEAC3.....	73
Figura 42. Representação gráfica de Stern-Volmer: ParEAC2.....	75
Figura 43. Representação gráfica de Stern-Volmer: ParEAC3.....	75
Figura 44. Representação gráfica de Stern-Volmer: Acetil-ParEAC3.....	76
Figura 45. Representação gráfica de Stern-Volmer: ParEAC1.....	78
Figura 46. Representação gráfica de Stern-Volmer: ParEAC4.....	79
Figura 47. Efeito da temperatura na interação do ParEAC1.....	80
Figura 48. Efeito da temperatura na interação do ParEAC4.....	81
Figura 49. Triagem inicial dos peptídeos análogos da toxina ParE de <i>E. coli</i> sobre a inibição da atividade da DNA girase.....	83
Figura 50. Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de inibição da DNA girase pelos peptídeos análogos de ParE na triagem inicial.....	84
Figura 51. Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) do peptídeo ParEAC2 sobre a atividade da DNA girase.	86
Figura 52. Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de MIC do peptídeo ParEAC2 sobre a ação da DNA girase.....	87
Figura 53. Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) do peptídeo ParEAC3 sobre a atividade da DNA girase.	87
Figura 54. Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de MIC do peptídeo ParEAC3 sobre a ação da DNA girase.....	88
Figura 55. Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) do peptídeo acetil-ParEAC3 sobre a atividade da DNA girase.....	88
Figura 56. Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de MIC do peptídeo acetil-ParEAC3 sobre a ação da DNA girase.	89
Figura 57. Ensaio de inibição do peptídeo ParDAC3 (antitoxina) sobre ação dos peptídeos da toxina ParE.	90
Figura 58. Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de inibição do peptídeo ParDAC3 sobre ação dos peptídeos ParEAC3 e acetil-ParEAC3.	91
Figura 59. Espectro de CD de estruturas secundárias de proteínas.	93
Figura 60. Espectro de dicroísmo circular do peptídeo ParDAC1.	94
Figura 61. Espectro de dicroísmo circular do peptídeo ParDAC2.	94
Figura 62. Espectro de dicroísmo circular do peptídeo ParDAC3.	95
Figura 63. Resultado do docking, realizado através do servidor SwarmDock, utilizando o melhor modelo de ParEAC3 e de ParDAC3 de <i>E. coli</i> fornecidos pelo servidor I-TASSER..	97
Figura 64. Gráfico de variação de energia livre de interação ($\Delta\Delta G$) dos resíduos localizados na interface de ParDAC3 e ParEAC3, de acordo com o servidor Drug-Score ^{PPI}	99
Figura 65. Resultado obtido após a simulação de dinâmica molecular com aumento contínuo de temperatura, até 380 K.	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Protocolo sintético padrão utilizando DIC/HOBt (estratégia Fmoc/tBu).	443
Tabela 2 - Relação das massas dos peptídeos purificados.....	62
Tabela 3 - Resultado das análises de espectrometria de massas.....	63
Tabela 4 - Valores de constante de associação comparativo. ^a	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aminoácidos

Ala (A) - alanina
Arg (R) - arginina
Asn (N) - asparagina
Asp (D) - ácido aspártico
Cys (C) - cisteína
Gln (Q) - glutamina
Glu (E) - ácido glutâmico
Gly (G) - glicina
His (H) - histidina
Ile (I) - isoleucina
Leu (L) - leucina
Lys (K) - lisina
Met (M) - metionina
Phe (F) - fenilalanina
Pro (P) - prolina
Ser (S) - serina
Thr (T) - treonina
Trp (W) - triptofano
Tyr (Y) - tirosina
Val (V) - valina

Outras

ACN – Acetonitrila
Boc – *t*-Butiloxicarbonila
CcdA – Antitoxina (*control cell division A*)
CcdB – Toxina (*control cell division B*)
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CD – Dicroísmo Circular
DCM – Diclorometano

DIC – Diisopropilcarbodiimida
DIEA – N-Diisopropiletilamina
DMF – N, N-Dimetilformamida
EDT – 1, 2-Etanoditol
EDTA – Ácido Etilenodiaminotetraacético
Fmoc – 9-Fluorenilmetiloxycarbonila
HOBt – N-Hidroxibenzotriazol
LC-MS – Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas
NMP – N-metilpirrolidona
PDB – Protein Data Bank
SPFS – Síntese de Peptídeos em Fase Sólida
STEB – carregador de DNA - Sacarose, Tris, EDTA e azul de Bromofenol
TA – Sistema Toxina-Antitoxina
TBE – tampão para eletroforese tris/boro/EDTA
tBu – terc-butila
TFA – Ácido Trifluoroacético
TFE – Trifluoroetanol
TIS – Triisopropilsilano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 DNA Topoisomerases	17
1.1.1 DNA girase	18
1.2 Sistemas Toxina-antitoxina (TA)	24
1.3 Síntese Química de Peptídeos.....	28
1.4 Modelagem Molecular	35
1.5 <i>Docking</i> Molecular.....	37
1.6 Simulação de dinâmica molecular.....	38
2. OBJETIVOS	40
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1 Reagentes e Solventes	41
3.2 Enzimas	42
3.3 Equipamentos	42
3.4 Síntese de peptídeos	43
3.5 Purificação e Caracterização	46
3.6 Espectrometria de Massas.....	46
3.7 Análise de Aminoácidos	46
3.8 Cromatografia de Afinidade.....	47
3.9 Estudos de Supressão de Fluorescência	48
3.10 Ensaio de Inibição da atividade da DNA girase	50
3.11 Dicroísmo circular (CD).....	51
3.12 Estudo de Modelagem	51
3.13 <i>Docking</i>	52
3.14 Estudo de Dinâmica Molecular	52
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1 Síntese, Purificação e Caracterização dos Peptídeos	54
4.2 Cromatografia de Afinidade.....	67
4.3 Estudos de Supressão de Fluorescência	74
4.4 Inibição da atividade da DNA Girase.....	82
4.5 Estudos estruturais por Dicroísmo Circular	92
4.6 Estudos de Modelagem e <i>Docking</i>	96
4.7 Dinâmica Molecular.....	101
5. CONCLUSÕES	104

1. INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana tem emergido como um problema mundialmente importante, fazendo com que muitas classes de antimicrobianos venham se tornando cada vez menos efetivos. O uso intensivo ou inadequado desses compostos resulta na seleção de patógenos resistentes e tem gerado um grande problema relacionado à saúde pública. Esses fatores têm motivado a busca por drogas cada vez mais potentes no combate às doenças infecciosas (LOHNER & STAUDEGGER, 2001) e principalmente estáveis aos mecanismos de resistência bacteriana.

Assim, é de grande importância, a busca por substâncias naturais ou sintéticas que exibam atividades antimicrobianas específicas e, acima de tudo, que as exerçam através de mecanismos de ação alternativos aos antibióticos disponíveis.

Neste contexto, as toxinas encontradas em organismos vivos são uma grande promessa para alcançar estes objetivos. Além disso, a pesquisa, purificação, caracterização química, biológica e estrutural de substâncias produzidas por microrganismos, bem como alterações químicas destas substâncias com ação antimicrobiana comprovada, são valiosas para fazer com que o país venha a se tornar um produtor de inovações na área.

Dentro dessa incessante busca por novas estruturas antibióticas na biodiversidade brasileira, a toxina bacteriana ParE (JOHNSON et al., 1996) constitui um exemplo importante da riqueza química e biológica associada a antibióticos de origem natural com potencial considerável, a qual exerce sua função sobre um grupo de enzimas denominado DNA topoisomerases.

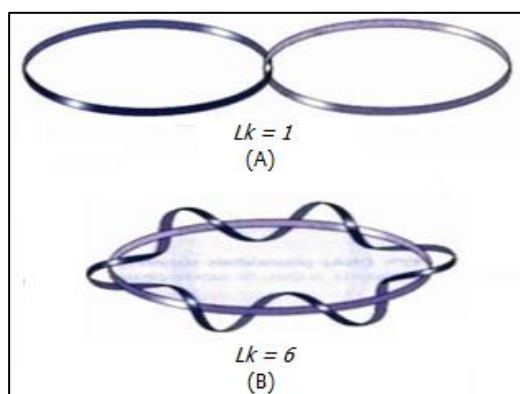
1.1 DNA Topoisomerases

As DNA topoisomerases estão presentes tanto nas células procarióticas quanto nas eucarióticas, e se tornaram alvos efetivos para agentes farmacológicos. Estas enzimas apresentam funções imprescindíveis à viabilidade dos microrganismos sendo responsáveis por catalisar, no DNA, mudanças topológicas essenciais para a multiplicação celular (REECE & MAXWEL, 1991; ANDRIOLE, 2000; NÖLLMANN et al., 2007). A necessidade fundamental de topoisomerases

deriva da estrutura de dupla hélice do DNA. Para a maioria dos processos que necessitam acessar as informações armazenadas no DNA, as duas fitas da hélice devem se separar de forma temporária, como na transcrição ou recombinação, ou permanentemente, como na replicação. Nestes eventos, assim como em outras situações, as topoisomerases se encarregam de resolver todos os impasses topológicos do DNA para manter o funcionamento e viabilidade celular (CHAMPOUX, 2001).

Topoisomerases são divididas em diferentes subfamílias com base em seus mecanismos e semelhanças de sequência. As topoisomerases do tipo I agem pela quebra transitória de uma das duas fitas do DNA, girando uma das extremidades sobre a fita não quebrada e reunindo as extremidades quebradas, proporcionando uma alteração no número de ligações das fitas, com aumentos de uma unidade. As topoisomerases do tipo II quebram as duas fitas do DNA simultaneamente, reunindo-as, posteriormente, resultando em um aumento do número de ligações em duas unidades (Figura 1).

Figura 1. Número de ligações Lk . (A): $Lk = 1$ - existe somente um ponto de ligação entre as duas fitas do DNA. (B): existem seis pontos de ligações entre as fitas, gerando um $Lk = 6$.



Fonte: NELSON & COX (2011).

1.1.1 DNA girase

A enzima bacteriana DNA Girase descoberta por GELLERT e colaboradores em 1976, em *Escherichia coli*, é uma enzima da classe de topoisomerases tipo II.

Esta enzima, assim com as demais topoisomerases, é capaz de relaxar o superenovelamento negativo do DNA, facilitando deste modo os processos de replicação e tradução. A DNA girase também é capaz de introduzir super-hélices negativas no DNA, usando energia livre liberada pela hidrólise do ATP (REECE & MAXWELL 1991). Esta característica única, torna a DNA girase distinta dos demais tipos de topoisomerases (WANG, 1996).

Em termos estruturais, a DNA girase é composta por duas subunidades proteicas, A (GyrA) e B (GyrB), codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB* respectivamente. Essas subunidades quando unidas formam um heterotetrâmero A_2B_2 , que constitui a sua forma ativa (WIGLEY, 1995; MAXWELL, 1993).

A subunidade A tem uma massa molecular de 97-kDa, e é composta por dois domínios, sendo um amino-terminal de 64-kDa responsável pela quebra e união das fitas do DNA e por interação com quinolonas, e outro carboxi-terminal de 33-kDa responsável pela interação da proteína com o DNA (Figura 2). O domínio amino-terminal compreende os resíduos 1 a 571 da proteína, que inclui o resíduo de tirosina 122, envolvido na ligação covalente da subunidade GyrA com a molécula de DNA, atuando na quebra e união da dupla fita (MAXWELL, 1992; MAXWELL, 1997; NOLLMANN et al., 2007).

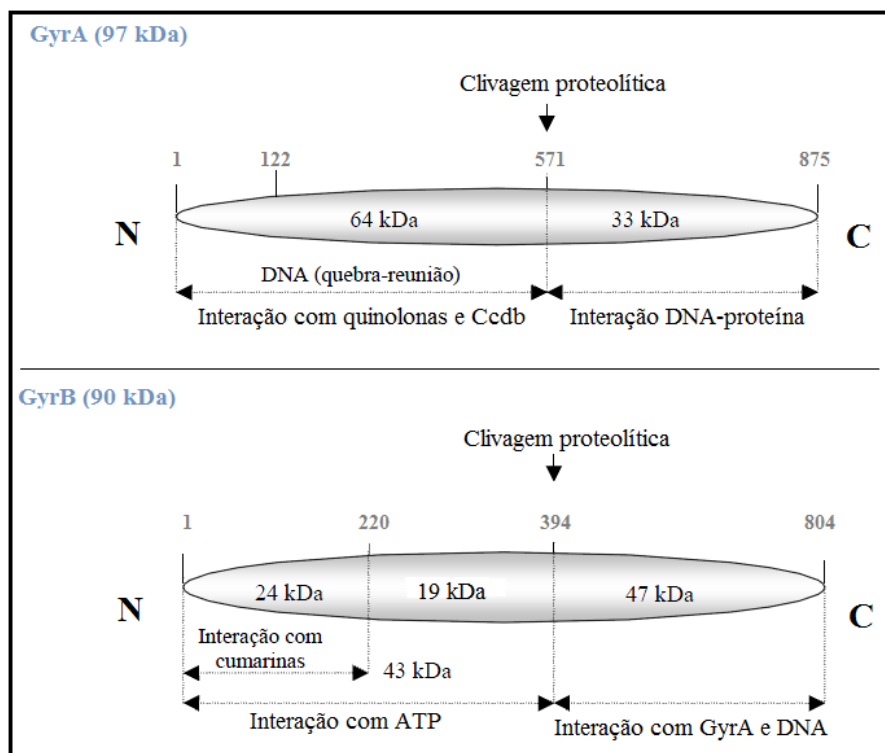
A subunidade B (GyrB) tem massa molecular de 90-kDa e contém um domínio amino-terminal (43 kDa), o qual inclui o sítio de ligação do ATP, bem como um domínio carboxi-terminal (47 kDa), envolvido na interação com GyrA e o DNA (WIGLEY, et al., 1991; ALI, et al., 1993; NOLLMANN et al., 2007). O domínio amino-terminal inclui dois subdomínios (uma parte N-terminal de 24-kDa e uma parte C-terminal de 19-kDa). O sítio de ligação do ATP está localizado no primeiro subdomínio (ALI, et al., 1993).

A DNA girase executa uma série de interconversões topológicas na molécula de DNA, sendo que todas envolvem a ligação da proteína ao DNA, a clivagem do DNA, a passagem das fitas, religação da fita de DNA clivada, e em muitos casos a hidrólise do ATP (MARCHETTO, 2006).

No superenovelamento do DNA (torção da dupla hélice sobre seu próprio eixo), a DNA girase catalisa uma quebra transitória em uma molécula de DNA, a passagem de outro segmento da mesma molécula através dessa abertura e, posteriormente, religa as duas fitas do DNA. Neste processo, a enzima necessita,

não somente do ATP, mas também de um cátion bivalente, tal como o Mg^{+2} , e essa reação é estimulada pela presença de espermidina (GELLERT, et al., 1976).

Figura 2. Diagramas esquemáticos das estruturas das subunidades da DNA girase: GyrA e GyrB.

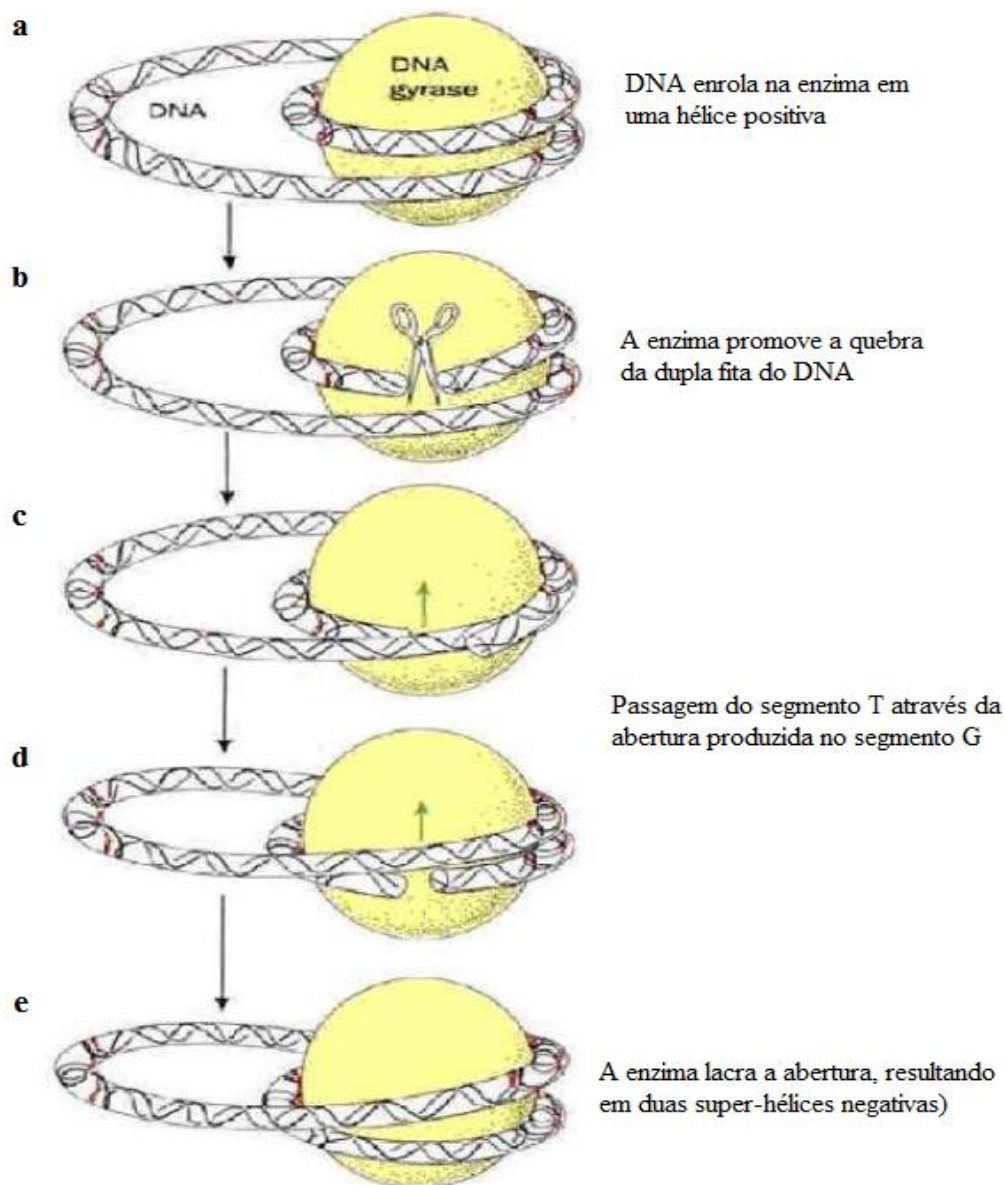


Fonte: Adaptado de MARCHETTO (2006).

Para que esse processo ocorra, inicialmente a DNA girase liga-se a um segmento de DNA, de aproximadamente 130 bp, envolvendo-o ao redor do tetrâmero e formando nele uma super-hélice positiva (Figura 3a). Em seguida, ocorre a ligação de uma molécula de ATP à subunidade GyrB. O ATP produz então mudanças conformacionais na enzima, que sofre uma rotação. GyrB dimeriza e captura um segmento desse DNA denominado segmento T. Simultaneamente GyrA catalisa uma clivagem nas duas fitas de um outro segmento, denominado segmento G (Figura 3b). O complexo intermediário formado entre DNA e a DNA girase é chamado de complexo clivável e nele o DNA está covalentemente ligado à enzima por uma ligação entre a terminação 5' do DNA clivado e o resíduo de tirosina 122 da GyrA. O segmento T é transportado através da abertura produzida no segmento G (Figuras 3c e 3d), que depois desta passagem tem suas fitas religadas (Figura 3e).

O segmento T é então liberado da enzima por uma abertura transitória na GyrA. Com o religamento do DNA clivado, duas super-hélices negativas são introduzidas na molécula. O retorno da enzima à sua conformação original é promovido pela hidrólise da molécula de ATP (ROCA & WANG, 1992; SMITH & MAXWELL, 1998).

Figura 3. Modelo de mecanismo de Ação da DNA Girase.

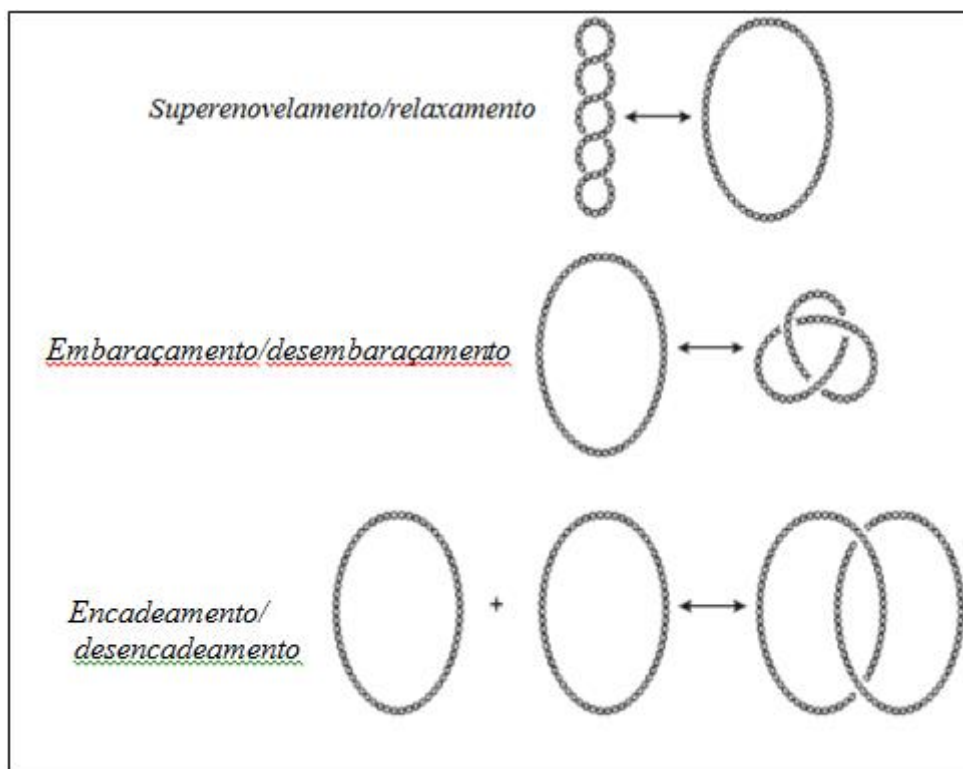


Fonte: MARCHETTO (2006).

Somada à habilidade única de catalisar a introdução de voltas helicoidais negativas no DNA circular, a girase também pode aliviar o superenovelamento do

DNA, na ausência de ATP (HIGGINS, et al., 1978), bem como promover o encadeamento ou desencadeamento de dois DNA duplex cíclicos (KREUZER & COZZARELLI, 1980; MARIANS, 1987), além de desfazer o embaraço topológico (LIU, et al., 1980) de uma única molécula de DNA duplex circular (Figura 4).

Figura 4. Reações catalisadas pela DNA Girase.



Fonte: MARCHETTO (2006).

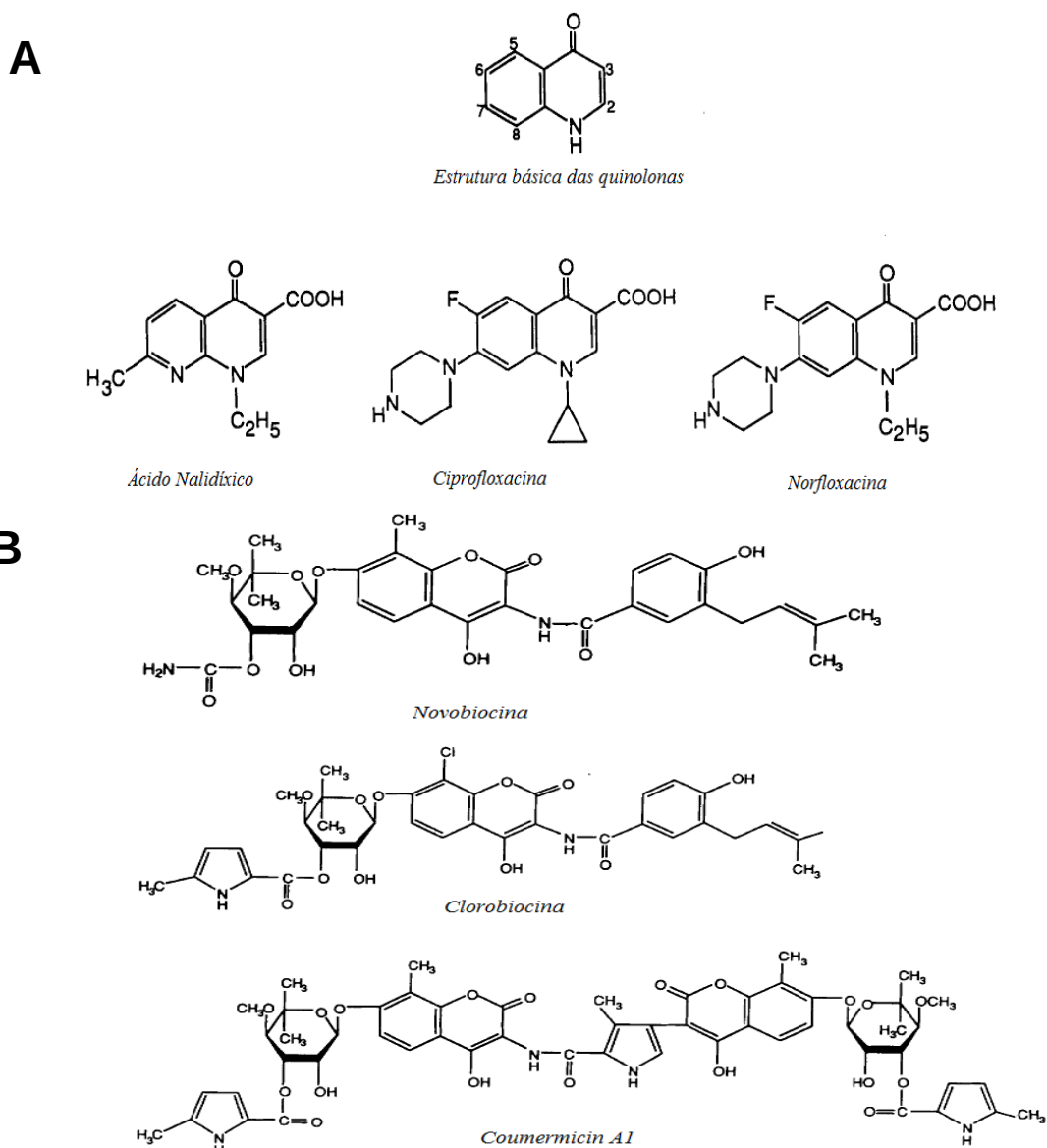
O estudo das topoisomerasas se expandiu nos campos da farmacologia e medicina clínica através da identificação da DNA girase bacteriana e posteriormente da topoisomerase IV, como alvos para antibióticos e algumas toxinas, e as topoisomerasas I e II de células eucarióticas como alvos para um amplo número de agentes antitumorais (WANG, 1996).

A DNA girase é encontrada em todas as bactérias e ausentes em eucariotos, diferenciando-se das topoisomerasas II de células eucarióticas somente em relação à sua região de interação com o DNA (LEVINE et al., 1998). Daí a importância como

alvo para agentes antimicrobianos, já que esta diferença permite uma ótima toxicidade seletiva para microrganismos.

Um número considerável de compostos tem demonstrado efeito inibitório sobre a DNA girase, dentre elas, as famílias das quinolonas (Figura 5A) e das cumarinas (Figura 5B) tem grande destaque (MAXWELL, 1992, 1993 e 1997), além de proteínas bacterianas como CcdB (BERNARD & COUTURIER, 1992) e ParE (JIANG et al., 2002) e seus peptídeos derivados (TROVATTI et al., 2008; BARBOSA, et al., 2012).

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



Fonte: Adaptado de: REECE & MAXWELL (1991)

As perspectivas para o desenvolvimento de novos fármacos com ação antibacteriana e antitumoral incluem aquelas baseadas na ação das proteínas naturais, produzidas por microrganismos da macrodiversidade brasileira, inclusive as que têm como alvo as topoisomerasas bacterianas, dentre as quais está incluída a toxina ParE, que conjuntamente à antitoxina ParD, constitui o denominado sistema toxina-antitoxina ParE-ParD.

1.2 Sistemas Toxina-antitoxina (TA)

Uma característica fundamental de plasmídeos bacterianos é a sua manutenção estável em populações de bactérias em crescimento. Esta estabilidade é a resposta de processos mediados pelos plasmídeos, que certificam-se de que estes são capazes de se replicar de forma controlada, para que haja um número suficiente de cópias desse elemento plasmidial em uma célula bacteriana, e que cada célula filha, na divisão celular, receba pelo menos uma cópia desse elemento (ROBERTS, et al., 1994).

Na manutenção dos plasmídeos, sistemas de morte pós-segregacional (PSK) exercem uma função essencial em virtude da sua capacidade em matar ou inibir o crescimento de uma célula filha que não recebe uma cópia do plasmídeo durante a divisão celular (GERDES et al., 1986; NAVARRO, et al., 2013).

Sistemas PSK ativos já foram descritos para um número de plasmídeos em uma ampla gama de bactérias (GERDES et al., 2000). Uma classe importante de sistemas PSK, designado sistemas toxina-antitoxina (TA), consiste em duas proteínas, uma que tem atividade de toxina e a outra com atividade de antídoto ou antitoxina, em virtude da sua capacidade para formar um complexo estável com a toxina (HAYES, 2003; BARBOSA, et al., 2014).

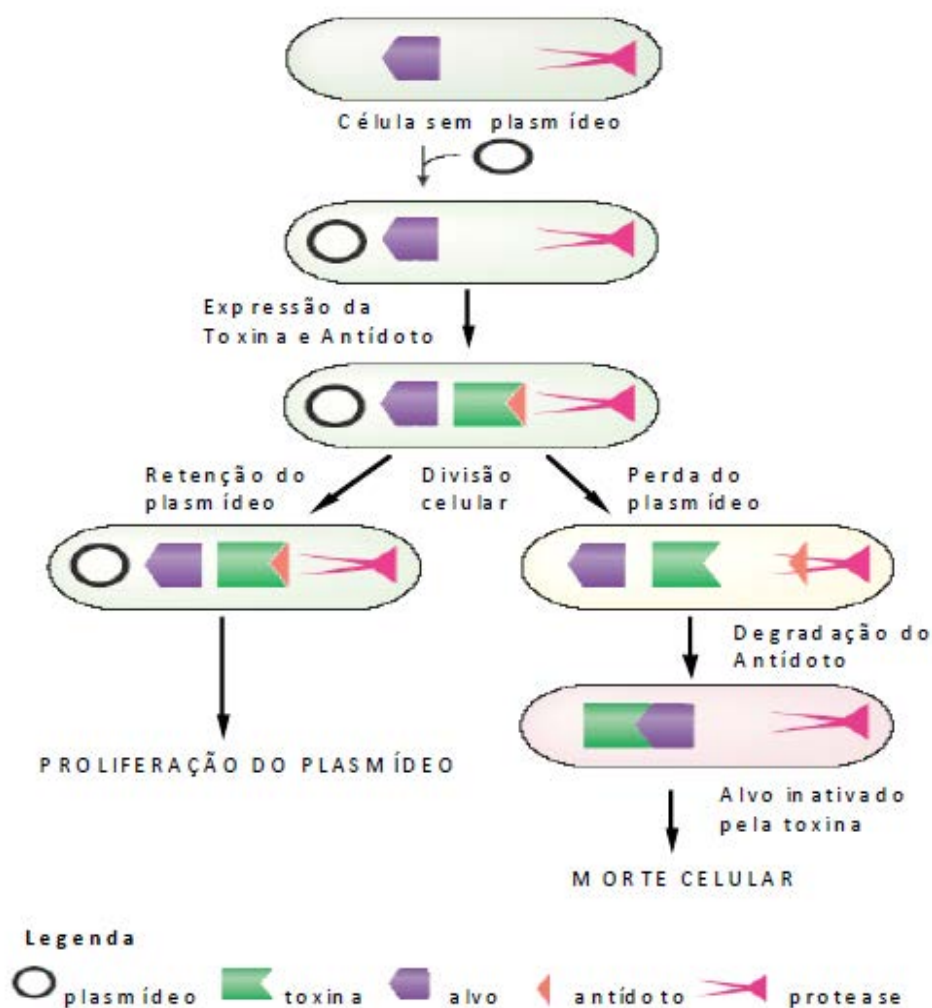
A antitoxina e a toxina são codificadas por dois pequenos genes, que estão sobre influência de um mesmo promotor, ou seja, estão organizados em um operon. (VAN MELDEREN e SAAVEDRA DE BAST, 2009).

A antitoxina é uma proteína instável degradada por uma protease ATP dependente, quer dizer, possui uma meia vida mais curta do que as toxinas (GERDES, et al., 2005). Já a toxina, é uma proteína estável que inibe um processo celular essencial, como por exemplo, a replicação do DNA ou a síntese proteica.

Essa diferença de estabilidade, e a meia vida *in vivo* das duas proteínas é a chave para a funcionalidade dos sistemas TA.

Após a divisão celular, cada célula filha deverá herdar alguns dos complexos toxina-antitoxina do citoplasma (Figura 6). Se uma célula filha não herda uma cópia do plasmídeo, a antitoxina não é reposta de forma contínua (WILBAUX et al., 2007). Por ser mais susceptível a reação de proteases, a antitoxina é degradada, resultando na liberação da toxina, que ficará livre para agir no seu alvo e exercer a sua função, inibindo um determinado processo celular, consequentemente levando a célula à morte (HALLEZ, et al., 2010).

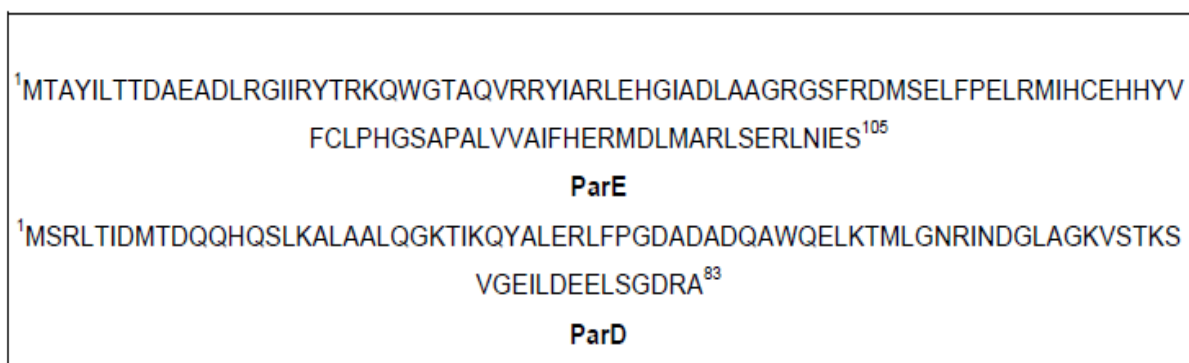
Figura 6. Representação esquemática da morte celular induzida por plasmídeo contendo sistema TA.



Fonte: Adaptado de: BUTS et al. (2005).

O sistema ParE-ParD, identificado no plasmídeo RK2 de uma ampla gama de hospedeiros, é um sistema TA, sendo ParE (103 aminoácidos) a toxina e ParD (83 aminoácidos) a antitoxina (Figura 7).

Figura 7. Estrutura primária de ParE e de ParD de *E. coli* (plasmídeo RK2).



ParD é capaz de neutralizar a ação de ParE pela formação de um complexo estável, que também é eficaz na auto-repressão do operon *parDE* (JOHNSON et al., 1996). Em contraste com os sistemas TA que requerem o complexo para a regulação negativa completa, ParD sozinho é suficiente para a auto-repressão (DAVIS, et al., 1992). ParE, inibe a DNA girase, possivelmente interagindo com uma das subunidades da enzima, estabilizando o denominado “complexo clivável” (JIANG et al., 2002; DALTON & CROSSON, 2010).

Estudos específicos sobre ParD mostraram que esta proteína existe como um dímero em solução, e que ParD exibe uma elevada estabilidade térmica e excelente capacidade de reestruturação após desnaturação induzida pelo calor.

Uma análise estrutural empregando espectroscopia de dicroísmo circular (CD) e caracterização preliminar por ressonância magnética nuclear (RMN) indicaram que a proteína é composta por α -hélices e estruturas β . Além disso, estudos adicionais, envolvendo deslocamento químico e dados de relaxamento, mostraram que ParD consiste de duas regiões estruturalmente distintas: uma N-terminal, bem ordenada e outra C-terminal, não estruturada (OBERER et al. 2002).

Para outros sistemas TA, estudos de mutação sítio dirigida e estudos estruturais confirmaram esta separação em regiões, sendo a região N-terminal responsável principalmente pelo processo de auto-regulação, e a C-terminal que

funciona na neutralização da toxina (BERNARD & COUTURIER, 1991; KAMADA, et al., 2003; TAKAGI et al., 2005).

A estrutura homodimérica da antitoxina ParD do plasmídeo RK2 de *E. coli* foi esclarecida através de espectroscopia de RMN heteronuclear multidimensional (OBERER et al. 2007). Estes estudos confirmaram resultados de que ParD está organizado em pelo menos duas regiões estruturalmente e funcionalmente distintas. A estruturação do domínio N-terminal resulta em uma dobra RHH (do inglês: ribbon-helix-helix), um motivo de ligação de DNA encontrado em diferentes repressores procarióticos com estruturas 3D conhecidas, obtidas por cristalografia de raio-X e espectroscopia de RMN (PHILLIPS, 1994; del SOLAR et al., 2002). Por outro lado, a região C-terminal permanece altamente flexível em solução.

Os resultados obtidos por estes estudos estão perfeitamente de acordo com os dois papéis biológicos do ParD, a saber, de repressor e de antídoto. Eles também corroboram dados bioquímicos que mostram que a função de ligação do DNA reside na parte N-terminal da proteína enquanto que a atividade de ligação da toxina é sugerida residir na parte C-terminal (ROBERTS et al. 1993).

Em relação à ligação com a toxina, um modelo atual de reconhecimento e ligação em sistemas TA invoca uma transição de fases desordenada-ordenada, na antitoxina. Especificamente, uma região desordenada da antitoxina livre é organizada em uma estrutura secundária definida após a ligação com a sua respectiva toxina (OBERER et al., 2007; LI et al., 2008; LI et al., 2009). Até o momento, não existem dados que venham a confirmar se este modelo de reconhecimento com transição de fases desordenada-ordenada também pode ser aplicado para o sistema TA ParE-ParD.

Enquanto as pesquisas nesta área têm fornecido novas perspectivas de evolução para as diferentes combinações repressor-toxina em geral, a importância da interação entre o antídoto e a toxina e o efeito na funcionalidade do sistema TA, especialmente ParE-ParD, permanece elusiva nestes estudos.

Diferentemente do sistema CcdA-CcdB em que, uma forma truncada mutante da antitoxina CcdA (41 resíduos de aminoácidos) mantém a capacidade de neutralizar a ação do CcdB (BERNARD & COUTURIER, 1991), nenhum estudo tem relacionado o número mínimo de aminoácidos da parte C-terminal de ParD com a manutenção da atividade de antídoto. Também não existem evidências da existência

de algum segmento de ParE, que atue como provável sítio de reconhecimento para o ParD, a exemplo do loop formado pelos resíduos R40 – L50 de CcdB (VAN MELDEREN et al., 1996).

Neste sentido, o estudo alternativo empregando peptídeos derivados de ParD, bem como de ParE, pode fornecer um novo caminho para estudar e melhor entender os contatos chave existentes entre as duas proteínas, o que é especialmente importante para o desenho racional de novos inibidores peptídicos de topoisomerasas bacterianas, cuja ação antitóxica do ParD seja desprezível.

1.3 Síntese Química de Peptídeos

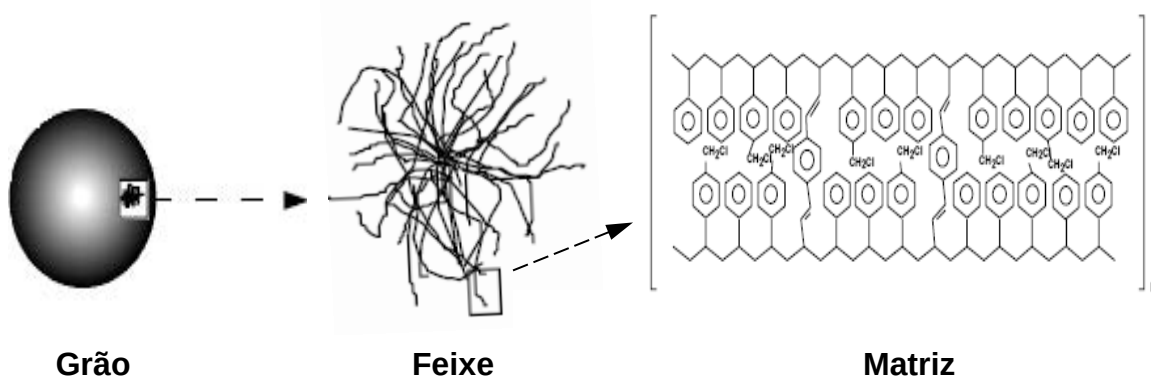
A síntese química de peptídeos poderia ser explicada, de maneira bastante simplificada, como a formação química de repetidas ligações amida com a finalidade de conectar grupos amina e carboxílica de L- α -aminoácidos adjacentes (MARCHETTO, 2006). Mais precisamente é assim denominada porque utiliza um reagente químico para ativar o grupo carboxílico de um N^{α} -acil-aminoácido ou de um N^{α} -acil-peptídeo. Este componente ativado sofre o ataque nucleofílico do grupo α -amino de outro aminoácido ou fragmento peptídico C^{α} -bloqueados, resultando na formação da ligação peptídica entre eles. Neste caso, os grupos funcionais reativos que não estão diretamente envolvidos na formação da ligação peptídica devem estar previamente protegidos ou bloqueados. Assim, a síntese torna-se mais controlada em relação à possível formação de subprodutos (MACHADO et al., 2004)

A síntese pode ocorrer tanto em solução (síntese clássica) como na presença de um suporte polimérico, sendo portanto denominada síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS). Esta metodologia tem como base o fato do grupo carboxílico C-terminal se encontrar unido covalentemente a um polímero e, portanto, o componente que contém esta extremidade é insolúvel nos solventes utilizados no processo de síntese (MERRIFIELD, 1963). Assim, o excesso de reagentes e uma grande maioria dos produtos secundários podem ser eliminados por simples filtração e lavagens do polímero que contém o peptídeo em crescimento. Este fato influencia favoravelmente para que se possam utilizar grandes excessos de reagentes, conseguindo em muitas etapas, rendimentos elevados. As vantagens adicionais são

que se minimizam as perdas por manipulação e que todo processo sintético pode ser automatizado.

Genericamente, pode-se descrever um suporte sólido como sendo uma estrutura complexa, a qual é formada por polímeros retilíneos compostos por unidades monoméricas constantes, formando uma espécie de rede. Os feixes desta são interligados transversalmente através de um monômero bi-funcional (ligações cruzadas, *cross-linking*) formando, na maioria delas, uma esfera (*grão*), de tamanho padronizado (Figura 8). Em intervalos mais ou menos regulares surgem estruturas químicas diferenciadas (ligantes, *linkers*), constituídas por moléculas contendo diferentes grupos funcionais, onde ocorre o crescimento da cadeia peptídica.

Figura 8. Visualização progressiva de uma resina, a partir de uma unidade macroscópica e as cadeias poliméricas que a compõem até a fórmula molecular de um determinado polímero.



Fonte: MARCHETTO (2006).

Em geral, as características físicas do suporte sólido, ou resina, são determinadas pelo seu arcabouço, enquanto que as características químicas (tipo de grupo funcional aceitável pelo polímero, condições de clivagem, grupo funcional formado após clivagem, etc.) são determinadas pelo ligante (LLOYD-WILLIAMS et al., 1993). Em relação às características físicas, o grau de resistência frente à agitação mecânica, temperatura, pressão e comportamento quando em contato com solventes, são bastante influenciadas pela proporção de ligações cruzadas existentes no polímero; esse último fator também é fortemente determinado pelas características dos ligantes, ainda que em menor extensão.

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

Desde os trabalhos iniciais de Merrifield, o suporte mais utilizado é um polímero microporoso de estireno, que contém 1% de *p*-divinilbenzeno. O grau de substituição destes suportes está compreendido entre 0,2 e 1,0 mmol/g. Enquanto os grãos de poliestireno secos apresentam um diâmetro de aproximadamente 50 µm, na presença dos solventes ou sistemas de solventes mais comuns utilizados na síntese de peptídeos, costumam inchar até 2 a 6 vezes o seu volume inicial (MARCHETTO et al., 1992). Desta forma é possível conseguir que todos os ligantes, que estão no interior da rede polimérica fiquem expostos e, portanto acessíveis aos diferentes solventes e reagentes utilizados na síntese.

A metodologia de fase sólida possui duas estratégias, a linear e a convergente. Atualmente, a estratégia linear (sequencial) é a mais utilizada para peptídeos que contém até 50 ou 60 resíduos de aminoácidos. Esta estratégia baseia-se no crescimento sequencial, ou seja, aminoácido por aminoácido da cadeia peptídica (BARANY et al., 1987; FIELDS et al., 1992).

Este crescimento se realiza, ao contrario do que ocorre nos ribossomos, desde a extremidade C-terminal para N-terminal, para evitar a perda de quiralidade do residuo associado ao grupo carboxilico que se acopla.

Já para os casos de sequências que possuem mais de 60 aminoácidos, é necessário utilizar a estrategia convergente, que baseia-se na união de dois fragmentos de peptideos de tamanhos variados, podendo ser totalmente em fase sólida ou em solução ou ainda combinando ambas: síntese dos peptideos protegidos em fase solida e posterior acoplamento dos mesmos em solução.

Como já citado, a formação controlada de qualquer ligação peptídica requer que todos os grupos funcionais presentes nas moléculas, exceto os dois que vão participar da formação da ligação, estejam protegidos. Uma vez formada a ligação e

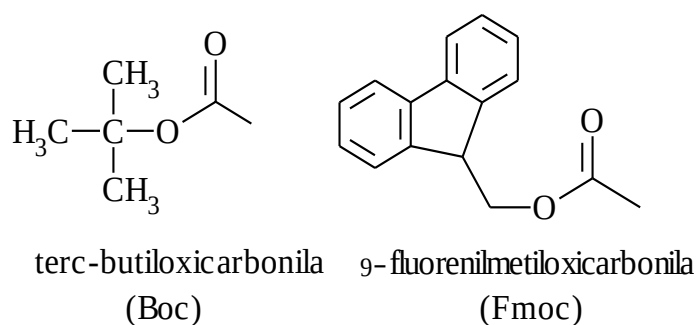
antes da incorporação do seguinte aminoácido ou peptídeo, deve-se eliminar o protetor do grupo funcional que irá permitir o crescimento da cadeia peptídica. Por último e ao final do processo sintético, os protetores de todos os grupos funcionais devem ser eliminados. Assim, pode-se concluir que o esquema de proteção é crucial para concluir com êxito a síntese de um peptídeo.

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

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

As duas principais estratégias da síntese de peptídeos em fase sólida são a Boc/Bzl e Fmoc/tBu, que se baseiam na proteção temporária do grupamento α -amínico dos aminoácidos com um dos dois protetores *tert*-Butiloxicarbonila (ANDERSON & MCGREGOR, 1957) e 9-Fluorenil-metiloxicarbonila (CARPINO & HAN, 1970), respectivamente, os quais se diferenciam, principalmente, quanto à labilidade ácido-base (Figura 9).

Figura 9. Protetores usuais para função α -amina na metodologia da fase sólida.



Fonte: GARCIA (2010).

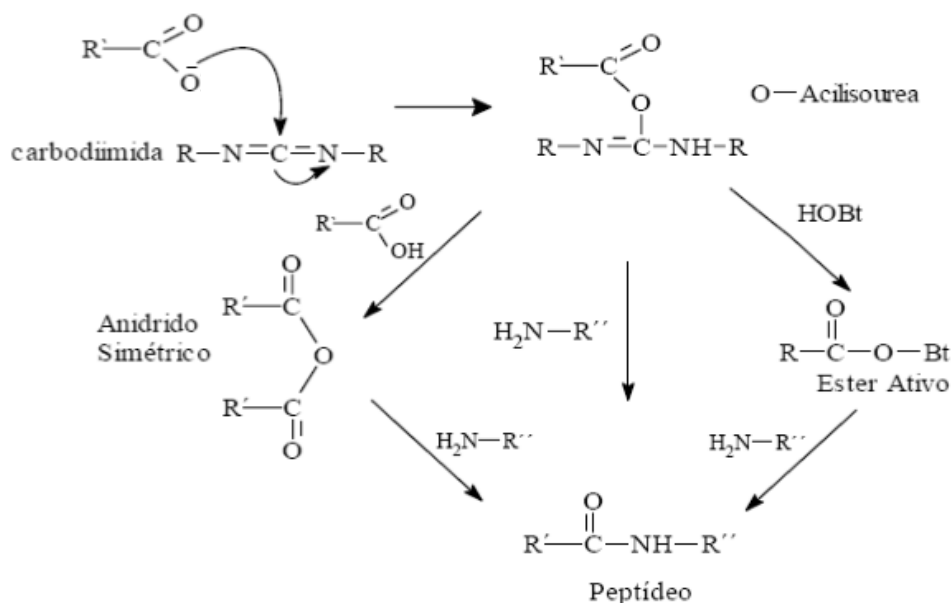
O grupamento protetor *t*-Boc é eliminado mediante acidólise, utilizando ácidos diluídos (TFA 30% em DCM), o que implica na utilização de protetores permanentes estáveis nestas condições. Os protetores do tipo benzila (Bzl) são bastante utilizados, porém, para sua eliminação é necessário utilizar ácidos fortes, como o ácido fluorídrico anidro. Em seguida ao tratamento com ácido é preciso realizar uma neutralização (que é feita geralmente com solução de DIEA 5%), assim, a função amina permanece em sua forma desprotonada (ANDERSON & MCGREGOR, 1957; CARPINO, 1957).

O grupamento Fmoc é eliminado com bases de força moderada (normalmente piperidina diluída), permitindo a utilização de protetores de cadeias laterais, baseados no grupo *terc*-butila (tBu), lábeis ao ácido trifluoroacético (CARPINO & HAN, 1972).

Durante a síntese, para que ocorra a formação da ligação peptídica entre os aminoácidos adjacentes, é necessário que o componente eletrófilo (C carbonílico do ácido) esteja ativado, pois caso contrário, seria formado um sal de amônio. Esta ativação do ácido carboxílico, que é a base da formação da ligação peptídica, tem sido uma das etapas da síntese de peptídeos que mais evoluiu nos últimos anos, devido ao interesse em obter bons rendimentos na formação da ligação peptídica, mantendo a integridade da cadeia em crescimento. Assim, ele pode sofrer ataque pelo grupo amina do aminoácido que permanece ligado a resina e, assim, formar a ligação amida.

Os reagentes de acoplamento (ou condensação) reagem com o grupo carboxila livre de um aminoácido, gerando assim, espécies reativas. Os mais comumente empregados são as carbodiimidas (SHEEHAN & HESS, 1955). O mecanismo envolve a formação da O-acilisouréa, a qual sofre aminólise por parte da amina, para produzir a ligação amida. Se for empregado um segundo equivalente de ácido carboxílico, será formado o anidrido simétrico. Do mesmo modo, na presença de hidroxilaminas, por exemplo, 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) ou 7-aza-1-hidroxibenzotriazol (HOAt), será obtido um éster ativo (Figura 10). Independentemente da espécie reativa formada, O-acilisouréa, anidrido simétrico ou éster ativo, todas atuam como bons agentes acilantes.

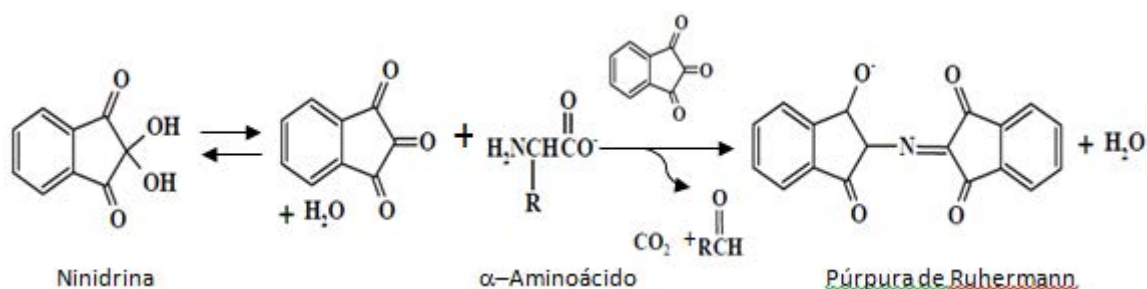
Figura 10. Mecanismo de formação de ligação peptídica empregando carbodiimidas.



Fonte: MARCHETTO (2006).

O processo de acoplamento dos aminoácidos é monitorado através de um teste qualitativo, o qual detecta grupos aminas livres. Nesse teste (KAISER et al., 1970), a ninidrina reage com aminas primárias levando a formação de um produto de coloração violeta (Figura 11). Desta forma, após acoplamento de aminoácidos à cadeia polipeptídica, o teste deve apresentar coloração amarela, indicando a ausência de aminas primárias livres, uma vez que o grupamento amina do aminoácido que está sendo acoplado apresenta-se protegido. Por outro lado, após a desproteção do grupamento amina, o teste deve apresentar coloração violeta.

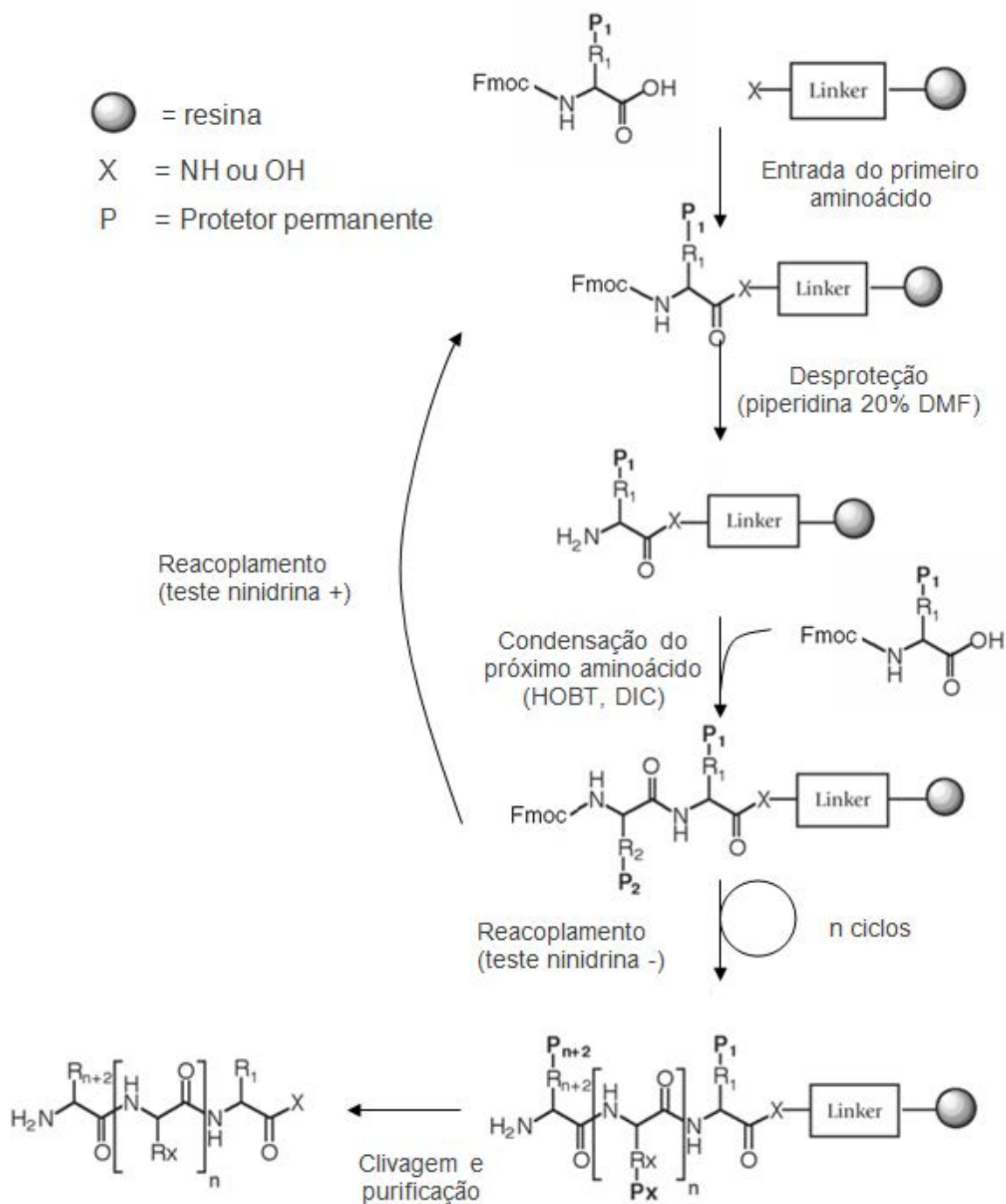
Figura 11. Esquema da reação envolvida durante o teste de ninidrina.



Fonte: Elaborada pela autora

Um esquema geral da síntese de peptídeos em fase sólida utilizando a estratégia Fmoc, está representado na Figura 12.

Figura 12. Esquema ilustrativo da SPFS, utilizando a estratégia Fmoc.



Fonte: AMBLARD (2005).

1.4 Modelagem Molecular

A modelagem molecular consiste em um conjunto de ferramentas para construção, edição e visualização, análise e armazenamento de sistemas moleculares complexos. Estas ferramentas podem ser aplicadas em estratégias de modelagem de novas drogas (COHEN et al., 1990). A disponibilidade de programas computacionais de química e os bancos de dados em rede são, atualmente, ferramentas fundamentais para a descoberta e planejamento de fármacos. Novos agentes terapêuticos podem ser desenvolvidos pela análise de dados teóricos de estrutura-atividade de forma tridimensional, obtidos por técnicas de modelagem molecular.

O problema de predição de estruturas tridimensionais de proteínas (PEP) através de métodos computacionais é uma das questões centrais da Biologia Molecular. O conhecimento de estruturas tridimensionais é essencial para o entendimento das funções das diferentes proteínas, as quais são fundamentais para a maioria dos processos biológicos. A predição de estruturas por técnicas de modelagem molecular, baseada unicamente em sua sequência de aminoácidos é um problema que vem, ao longo dos últimos anos, desafiando cientistas das mais variadas áreas (BAXEVANIS & QUELLETTE, 2005). O principal desafio consiste em compreender como a informação codificada na sequência linear de aminoácidos (estrutura primária) traduz-se na estrutura 3D (estrutura terciária) de uma proteína, e a partir deste conhecimento, desenvolver metodologias computacionais que possam prever, de forma correta, a estrutura nativa da proteína.

Desde 1994, a cada dois anos, a avaliação CASP (*Comparative Assessment of methods for protein Structure Prediction*) é realizada para analisar os métodos de predição de estruturas de proteínas. A CASP é uma organização com o objetivo principal de avaliar e verificar a qualidade e eficiência dos métodos de predição de estruturas existentes. Existem diversas sequências proteicas alvo que são disponibilizadas e ao final uma classificação é divulgada com o desempenho dos grupos participantes (MOULT et al., 2014).

Essas sequências alvo são divididas em duas categorias: *template – based modeling* e *template free modelling*. A categoria *template-based modeling* corresponde àquelas sequências que possuem estruturas tridimensionais relacionadas já conhecidas, enquanto para a categoria *template free modelling* esse

tipo de relacionamento não pode ser detectado (MOULT et al., 2014). Muitas metodologias foram propostas ao longo dos últimos anos como solução para o problema de predição do enovelamento de proteínas (MOUT, 2005).

Existem dois tipos básicos de abordagem para o problema de PEP: os métodos *ab initio* (primeiros princípios), que utilizam princípios físicos para prever a estrutura da proteína e os métodos baseados em homologia e métodos baseados em conhecimento.

O método *ab initio* (primeiro princípio, de novo ou *free modeling* como tem sido referido no CASP) consiste em prever a estrutura tridimensional de uma proteína utilizando, geralmente, apenas a sequência de aminoácidos. Para isso, realiza uma busca no espaço conformacional a fim de encontrar a estrutura, ou estruturas mais apropriadas, as quais são assumidas como sendo as que possuem menor energia livre. Esta metodologia simula o espaço conformacional da proteína utilizando uma função de energia potencial, a qual descreve a energia interna da proteína e suas interações com o meio em que está inserida. O objetivo é encontrar um mínimo global de energia livre que corresponda ao estado nativo ou funcional da proteína (TRAMONTANO & LESK, 2006).

Já os métodos baseados em homologia incluem técnicas como modelagem comparativa por homologia e modelagem baseada em conhecimento via *threading* (ou *folding recognition*), e normalmente utiliza alinhamento de sequências para construir seus modelos (CONTRERAS-MOREIRA et al., 2005). Proteínas não evolutivamente relacionadas (não homólogas) também podem ter estruturas similares, assumindo o mesmo tipo de enovelamento. Essa abordagem considera que o número de enovelamentos possíveis é finito e ao invés de procurar por todo o espaço conformacional, se limita a buscar pelo melhor enovelamento possível, dentre as proteínas que possuem estrutura conhecida. Para isso, os métodos de *threading* alinham uma sequência proteica de busca diretamente nas estruturas tridimensionais conhecidas, buscando assim encontrar o enovelamento da proteína de interesse.

As estruturas proteicas conhecidas podem ser encontradas no PDB (Protein Data Bank). O banco de dados público de proteínas PDB é um repositório internacional de estruturas proteicas, que possibilita a busca por estruturas já

conhecidas, favorecendo assim, a utilização de técnicas baseadas em conhecimento.

No CASP7, os melhores resultados na categoria *free modeling* foram obtidos através de abordagens mistas, combinando princípios físicos com técnicas baseadas em conhecimento (ZHANG, 2008). O conhecimento proveniente de estruturas já conhecidas pode melhorar a eficiência de métodos *ab initio*. Um importante exemplo de preditor que utiliza técnica *ab initio* combinada com estratégia baseada em conhecimento é o I-TASSER (ZHANG e SKOLNICK, 2004).

O I-TASSER (*Iterative Threading Assembly Refinement*) é uma plataforma para predição de estrutura e função de proteínas. A predição de estrutura tridimensional é realizada utilizando a abordagem de *threading*. O servidor I-TASSER está disponível em: <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>

1.5 Docking Molecular

Interações entre biomoléculas são fundamentais para todos os processos biológicos. Utilizando essas interações, os organismos vivos mantêm redes de interações reguladoras e metabólicas complexos que juntos constituem os processos da vida. O trabalho experimental, simulação e análises computacionais são ferramentas científicas essenciais para compreender tais processos e encontrar moléculas que podem ser utilizadas como substâncias bioativas para modificá-los e controlá-los, além de oferecer um caminho promissor para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (LENGAUER & RAREY, 1996; KRUGER & GOHLKE, 2010; TORCHOLA, 2013).

A maior parte dos estudos computacionais em *docking* molecular (ou também conhecido como Docagem Molecular, Acoplamento Molecular ou Ancoragem Molecular) presume que um dos ligantes de ancoragem é uma proteína. Isto se deve, em parte, devido às interações envolvendo proteínas serem especialmente interessantes e, parcialmente, porque um número relativamente grande de estruturas proteicas são conhecidas. Proteínas podem se ligar ao DNA, RNA, outras proteínas, compostos organo-metálicos além de outras moléculas. Dependendo do ligante molecular da proteína, a solução para problema de ancoragem requer diferentes modelos computacionais e algoritmos (LENGAUER & RAREY, 1996).

O *docking* molecular é uma simulação computacional com a qual é possível avaliar e analisar detalhadamente a formação de complexos receptor-ligante e então utilizar os resultados para *screening* virtual e/ou entender mecanismos de reação. O objetivo central é encontrar o melhor ajuste para o encaixe entre duas moléculas (complexo receptor-ligante) (ARMELIN, 2010; RODRIGUES, 2012).

O servidor SwarmDock foi utilizado para o *docking*. Este servidor gera estruturas 3D de complexos proteína-proteína e está disponível em: <http://bmm.cancerresearchuk.org/~SwarmDock/index.html>.

Após o upload de arquivos PDB dos ligantes de ancoragem, o servidor gera conformações de baixa energia e retorna uma lista ordenada de configurações de ancoragem agrupadas e suas estruturas correspondentes (TORCHOLA, 2013).

1.6 Simulação de dinâmica molecular

Nos algoritmos de simulação, a estratégia mais empregada é a dinâmica molecular. Para uma análise mais apurada, que obtenha detalhes em nível atômico das interações proteína-ligante, foram desenvolvidos mecanismos de dinâmica molecular que permitem uma melhor exploração da energia livre do sistema, como o aumento da temperatura da simulação (RODRIGUES, et al., 2012).

A dinâmica Molecular (DM) é uma ferramenta computacional muito utilizada em Química Medicinal para o planejamento racional de fármacos. A DM é usada tanto para simular possíveis processos de interação intermolecular quanto para investigar a estrutura e função de biomoléculas e seus respectivos complexos, contribuindo de forma significativa na compreensão aprofundada do mecanismo associado à cinética de interação (ALONSO; BLIZNYUK & GREARY, 2006; HANSSON; NAMBA; SILVA & SILVA, 2008).

A metodologia da DM é fundamentada nos princípios da Mecânica Clássica e fornece informações sobre o comportamento dinâmico a nível molecular, dependente do tempo e dos átomos individuais que compõem o sistema (NAMBA; SILVA & SILVA, 2008), ou seja, o comportamento dinâmico de biomoléculas com ou sem seus ligantes é simulado através da integração numérica das equações de movimento (HOLTJE et al., 2003; NAMBA; SILVA & SILVA, 2008).

O arrefecimento simulado (*simulated annealing*) é uma ferramenta que é utilizada para o estudo da simulação de dinâmica molecular do complexo receptor-ligante. O arrefecimento simulado consiste na variação da temperatura do sistema durante o procedimento de dinâmica molecular. O aumento de energia que incide no sistema através da ampliação de temperatura, caso seja muito grande, tende a desfazer o complexo receptor-ligante. Para o estudo do mesmo sistema que apresente mutações em resíduos específicos, pode-se utilizar este procedimento para, indiretamente, inferir na força de interação entre cadeias peptídicas e de como estas mudanças interferem na estabilidade deste complexo. De outra forma, também pode ser aplicado um aumento de temperatura suficiente para desestabilizar o complexo sem, no entanto, rompê-lo e, a partir deste ponto, realizar uma diminuição gradual de temperatura. O intuito, através deste protocolo, é permitir que o sistema saia de um mínimo local e, ao retornar de forma lenta, apresente maior probabilidade de atingir um estado de mínimo global garantindo, assim, um estudo mais confiável e uma avaliação mais precisa da natureza das forças intermoleculares envolvidas.

2. OBJETIVOS

Esse trabalho teve como objetivo principal, a busca de uma estrutura peptídica mínima, derivada da parte C-terminal de ParD, necessária para a manutenção da atividade antídoto desta proteína

De maneira específica objetivou-se:

- 1) Projetar e sintetizar quimicamente sequências peptídicas derivadas de ParD, dimensionando-as de modo a abranger toda parte C-terminal da proteína;
- 2) Projetar e obter análogos da toxina ParE, com especial atenção à região de interação com a antitoxina ParD;
- 3) Empregar as técnicas de cromatografia de afinidade e de fluorescência no estado estacionário, a fim de identificar a possibilidade de interação entre análogos de ParE e os derivados de ParD, além de quantificar a associação entre os mesmos;
- 4) Executar ensaios de inibição da atividade da DNA Girase para avaliar o efeito antídoto dos derivados de ParD sintetizados;
- 5) Realizar análises de bioinformática para levantamento de dados estruturais das sequências peptídicas e comparar com os dados de dicroísmo circular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes e Solventes

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

- Resina (suporte polimérico): Rink amide (MBHA) Resina, com grau de substituição inicial de 0,59 mmol/g da marca Novabiochem®.
- Resina (suporte polimérico): Fmoc-Ala-Wang Resina, com grau de substituição inicial de 0,60 mmol/g da marca Novabiochem®.
- Aminoácidos protegidos: todos os L- α -aminoácidos utilizados neste trabalho apresentavam a extremidade amino-terminal protegida com o grupo base-lábil Fmoc e grupos t-butílicos ou derivados para a proteção das cadeias laterais dos aminoácidos trifuncionais. Esses aminoácidos foram adquiridos da Novabiochem® ou da Advanced Chem Tech®.
- Os agentes de condensação utilizados na síntese dos diferentes análogos, 1-Hidroxibenzotriazol (HOBt) e N,N'-Diisopropilcarbodiimida (DIC), foram adquiridos da Novabiochem® e Fluka®, respectivamente.
- Como reagente de desproteção do grupo Fmoc, foi utilizada uma solução 20% (v/v) de piperidina, da marca Merck®, em DMF.
- O reagente utilizado para a clivagem ácida final foi o ácido trifluoracético (TFA), adquirido da Fluka®.
- Etanoditiol (EDT) e triisopropilsilano (TIS), substâncias responsáveis pela captura de espécies responsáveis por alquilação eletrofílica e liberadas no meio reacional durante o processo de clivagem ácida, foram adquiridos da Sigma® ou da Acros®.

- Os eluentes cromatográficos utilizados foram acetonitrila (ACN) da marca Tedia® ou J.T.Baker® e água ultrapura, obtida através de um sistema de filtração Barnstead, equipado com cartuchos para retenção de sais e de compostos orgânicos.
- Demais reagentes e solventes como ácido acético glacial, anidrido acético, diclorometano (DCM), diisopropiletilamina (DIEA), dimetilformamida (DMF), hexafluoroisopropanol e N-metilpirrolidona (NMP) e demais sais, foram adquiridos da Merck®, Aldrich®, Mallinckrodt®, J.T.Baker® e Fluka®.

3.2 Enzimas

A enzima DNA girase, produzida heterologicamente em bactérias, foi adquirida comercialmente da *Inspiralis Ltda* (<http://www.inspirallis.com>) e fornecida com os seguintes tampões:

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

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

3.3 Equipamentos

- Espectrofotômetro UV-Visível Shimatzu UV 1601PC;
- Eletroforese: sistema de eletroforese GNA 100, equipado com fonte Pharmacia Biotech modelo EPS 301.
- Fotodocumentador Alpha Imager EP system da Alpha Innotech;
- Espectrofluorímetro Cary Eclipse da Varian.

- Sistema de cromatografia líquida de média pressão (CLME): Composto por uma bomba Laballiance Series I, coletor de frações Foxy Jr. e um detector UV Konik, conectado a um registrador 112 da Amersham Biosciences.
- Sistema de Cromatografia Líquida em modo analítico: Cromatógrafo Shimadzu LC-10A/C-47A equipado com uma coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (150 x 4,6mm; 5 μ m; 300 Å. O aparelho possui três bombas LC 10AT, injetor automático SIL 10AF e detectores de UV SPD 10A e fluorescência RF 10A.
- LC/ESI-MS constituído por um UFLC Shimadzu composto por duas bombas LC 20AD, detector "UV-visível" modelo SPD 20A, injetor automático modelo SIL 20AHT e um espectrômetro de massas Bruker modelo Amazon SL. O sistema é controlado por uma Workstation empregando o Software LC-Solution.

3.4 Síntese de peptídeos

Todos os peptídeos deste trabalho foram sintetizados manualmente pelo método da fase sólida (STEWART & YOUNG, 1984; AMBLARD et al., 2005), de acordo com o protocolo padrão (Tabela 1) que emprega o grupamento base-lábil Fmoc como protetor dos α -amino grupos, e derivados t-butilicos (t-Bu) para a proteção das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos trifuncionais (CHAN & WHITE, 2000).

As sequencias sintetizadas (Figura 13), foram projetadas considerando a região C-terminal da antitoxina ParD e a região N-terminal da toxina ParE, tendo em vista que mais de uma dezena de derivados da parte C-terminal de ParE, já foram sintetizados anteriormente (BARBOSA, et al. 2012).

Os análogos de ParD, foram sintetizados a partir de uma Fmoc-Ala-Wang resina de partida (0,6 mmol/g) e DIC/HOBt como agentes de condensação. Na etapa de acoplamento de cada aminoácido, empregou-se o excesso molar de 3 equivalentes para o Fmoc-aminoácido e 3 equivalentes para os reagentes de

acoplamento em DCM:DMF (1:1), por 2 horas. A desproteção dos grupos α -amínicos (remoção do grupo base lábil Fmoc), após a entrada de cada aminoácido, foi realizada empregando-se uma solução de piperidina 20% (v/v) em DMF (Tabela 1).

Figura 13. Estrutura primária dos análogos de ParD (A) e ParE (B) sintetizados.

<u>Análogos ParD</u>		A
Acetil- ⁵⁸ NDGLAGKVSTKSVGEILDEELSGDRA ⁸³ -COOH	→	ParDAC1
Acetil- ⁵¹ TMLGNRI NDGLAGKVSTKSVGEILDEELSGDRA ⁸³ -COOH	→	ParDAC2
Acetil- ³⁹ DADADQAWQELKTM LGNRI NDGLAGKVSTKSVGEILDEELSGDRA ⁸³ -COOH	→	ParDAC3

<u>Análogos ParE</u>		B
Acetil- ²⁴ QWGTAQVRRYIARLEHGIADLA ⁴⁵ CONH ₂	→	ParEAC1
Acetil- ⁸ TDAEADLRGIIRYTRKQWGTAQVRRYIARLEHGIADLA ⁴⁵ CONH ₂	→	ParEAC2
¹ MTAYILTTDAEADLRGIIRYTRKQWGTAQVRRYIARLEHGIADLA ⁴⁵ CONH ₂	→	ParEAC3
Acetil- ⁸ TDAEADLRGIIRYTRKQWG ²⁶ -CONH ₂	→	ParEAC4

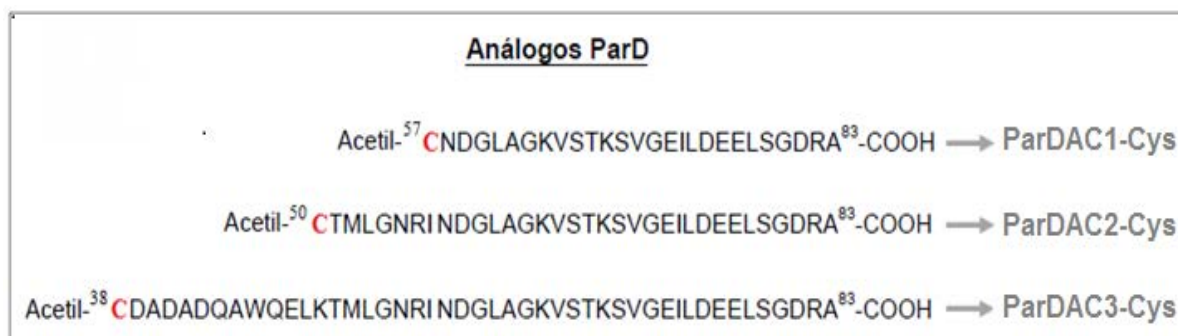
Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 1 - Protocolo sintético padrão utilizando DIC/HOBt (estratégia Fmoc/tBu).

Reagente/solvente	Operação	Tempo (min)	Número de ciclos
DMF	Lavagem	1	4
Piperidina 20% em DMF	Desproteção	1	1
Piperidina 20% em DMF	Desproteção	20	1
DCM/DMF	Lavagem	1	6
Fmoc-AA-OH (3 eq) + DIC/HOBt(3 eq) em DCM/DMF (1:1)	Acoplamento	120	1
DCM/DMF	Lavagem	1	6

A eficiência das etapas de acoplamento foi monitorada pelo teste de Kaiser ou ninidrina (KAISER et al., 1970) e, quando positivo, o processo era repetido com 50% dos reagentes. Acetilação, quando necessária, foi feita com anidrido acético e diisopropiletilamina (10 equivalentes cada) em DMF, por 30 minutos. Após a síntese dos análogos de ParD (Figura 13A), separou-se uma porção de cada peptidil-resina, às quais foi dada continuidade à síntese, através do acoplamento de um único resíduo de cisteína, utilizando a metodologia já descrita. Estes peptídeos foram denominados ParDAC1-Cys, ParDAC2-Cys e ParDAC3-Cys, respectivamente (Figura 14).

Figura 14. Sequências dos análogos do ParD com cisteína na extremidade N-terminal.



Fonte: Elaborado pela autora.

A clivagem final dos peptídeos das respectivas resinas e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais, foi efetuada pelo tratamento das respectivas peptidil-resinas com uma solução de clivagem contendo TFA (94,5%), água deionizada (2,5%), EDT (2,5%) e TIS (0,5%), a 25°C por 3 horas. Peptídeos, denominados brutos, foram precipitados e lavados com éter dietílico gelado e centrifugados (seis vezes), dissolvidos em solução aquosa de ácido acético 10% e liofilizados em seguida.

Na síntese dos análogos de ParE (Figura 13B), empregou-se as mesmas condições de acoplamento e clivagem, descritas para os análogos do ParD, porém partindo-se de uma resina RinK Amida MBHA, com grau de substituição de 0,59 mmol/g.

3.5 Purificação e Caracterização

A purificação dos peptídeos foi realizada através de Cromatografia Líquida de Média Eficiência (CLME), usando uma coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 25mm; 15µm; 300 Å) com um gradiente convexo de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,04% TFA) variável de acordo com a sequência peptídica, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi realizada em modo analítico em um cromatógrafo Shimadzu LC-10A/C-47A, empregando uma coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (15 x 0,46 cm; 5 µm; 300 Å), com um gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.

A caracterização dos produtos após purificação foi feita através de análises de aminoácidos e espectrometria de massas.

3.6 Análise de Aminoácidos

As análises de aminoácidos foram efetuadas pelo método da derivatização pós-coluna usando *orto*-phtalaldeído (OPA) em um analisador automático Shimadzu LC-10A/C-47A. O sistema é periodicamente calibrado com uma mistura padrão de aminoácidos, obtendo-se um valor para o tempo de saída de cada aminoácido e um fator de conversão entre a área de cada pico e a concentração de aminoácidos da amostra. Os peptídeos (0,2 - 1 mg) foram hidrolisados em 1 mL de HCl 6 mol.L⁻¹, na presença de 180 µL de fenol 5% (v/v) em H₂O, a 110 °C por 72 horas em atmosfera de N₂. Após a hidrólise, o material foi concentrado à vácuo, dissolvido em tampão de diluição, pH 2,2 e filtrado em unidade filtrante GV Millex - Millipore antes de ser injetado no aparelho. Para o cálculo da proporção relativa dos aminoácidos da amostra, determinou-se a relação entre as suas concentrações unitárias e a média.

3.7 Espectrometria de Massas

A caracterização dos peptídeos foi realizada em um espectrômetro de massas Bruker Amazon SL acoplado a um cromatógrafo líquido Shimadzu (LC-MS)

empregando o modo de ionização positivo (ES-MS positivo) e a técnica de injeção direta. Esta técnica baseia-se em um analisador de massa que apresenta como resultado final a razão massa molar/carga (MM/z).

3.8 Cromatografia de Afinidade

As colunas utilizadas para os ensaios de cromatografia de afinidade foram preparadas através da imobilização das sequências derivadas de ParD, contendo cisteína como aminoácido N-terminal, em uma resina EAH-Sepharose, seguindo as especificações do fabricante e previamente preparada pela introdução do espaçador ácido ϵ -maleimidocapróico (MARCHETTO et al., 2001). Resumidamente, 5 mL de EAH-Sepharose 4B foram colocadas para reagir com 160 mg do ácido ϵ -maleimidocapróico e 145 mg da carbodiimida hidrossolúvel EDC, em 4 mL de uma mistura contendo água:etanol (2,5:1,5), ajustando o pH para 4,5, por um período de 20 horas à temperatura ambiente. Após este período, a resina foi recolhida em uma seringa de polipropileno, contendo um filtro de polietileno poroso, e lavada sucessivamente (6 X 10 mL cada) com: mistura água:etanol (1:1); água; tampão acetato pH 4,0; água; tampão Tris-HCl 10 mmol.L⁻¹, pH 8,0 (NaCl 50 mmol.L⁻¹); água; etanol e novamente água. A resina foi então acetilada, adicionando-se 4 mL de ácido acético 1 mol.L⁻¹ e 382 mg de EDC, por um período de 2 horas, ou até teste de ninidrina se apresentar negativo e confirmar a ausência de grupos aminas primárias livres. A resina assim obtida foi dividida em frações para o preparo de quatro colunas (1mL cada), sendo uma delas utilizada como controle negativo.

Assim, três pequenas colunas, foram empacotadas com 1 mL de resina cada, lavadas e equilibradas em tampão fosfato pH 7,8. Adicionou-se a cada uma delas cerca de 2 mg de cada um dos peptídeos ParDAC1-Cys, ParDAC2-Cys e ParDAC3-Cys (Figura 14) dissolvidos em tampão fosfato pH 7,8. Deixou-se sob agitação por um período de 20 horas. Após esse período, lavou-se exaustivamente a resina com tampão fosfato, água e finalmente tampão Tris.HCl 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2 (20 mmol.L⁻¹ de NaCl). Repetiu-se o procedimento por 3 vezes, reutilizando os peptídeos recuperados no processo de filtração. Uma alíquota de cada uma das amostras foi retirada e liofilizada, para análise de aminoácidos, seguindo a metodologia utilizada na caracterização de peptídeos. Cada um dos peptídeos derivados de ParE (500 μ L

de uma solução entre 300 e 400 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), foi inserido em cada uma das três colunas e após 1 hora de contato à temperatura ambiente, foram eluídos da coluna através de lavagens sucessivas com tampão de eluição (Tris-HCl 10 mmol.L^{-1} , pH 7,0), até que as frações recolhidas não apresentassem mais emissão de fluorescência a 350 nm (excitação a 280 nm). A eluição dos derivados de ParE retidos nas colunas, foi realizada com NaCl (soluções tamponadas 0,4 e 4 mol.L^{-1}), sendo feita a troca de soluções somente após a estabilização das leituras de fluorescência (excitação a 280 nm e emissão a 350 nm). Ao final a coluna foi reequilibrada com o tampão de eluição.

3.9 Estudos de Supressão de Fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é uma das principais técnicas aplicadas em estudos com proteínas e peptídeos, mais especificamente em análises estruturais, conformacionais e de interações com outros tipos de estruturas moleculares. Isto se deve à sensibilidade da técnica e da favorável escala de tempo do fenômeno da fluorescência. Essa técnica baseia-se na propriedade de certos grupos químicos, denominados cromóforos, de absorver e emitir radiação eletromagnética (GARRIDO, 2002).

A fluorescência de peptídeos e proteínas deve-se a presença de fluoróforos naturais, mais especificamente os resíduos de aminoácidos aromáticos triptofano (W) e tirosina (Y), que absorvem luz na faixa espectral de ultravioleta. A fenilalanina (F) também apresenta fluorescência, mas possui um rendimento quântico muito baixo e, por isso, sua emissão é raramente observada. Os espectros de emissão de proteínas e peptídeos são sensíveis à interação com substratos, reações de associação e desnaturação. Geralmente são excitados a 280 nm, devido à absorção dos resíduos de triptofano e tirosina, entretanto, a emissão de cada um dos aminoácidos ocorre em comprimentos de onda diferenciados, como por exemplo, 303-305 nm para o resíduo de Tyr e 345-350 nm para o resíduo de Trp. Pequenas variações nestes valores máximos podem ser observadas em razão da variação das propriedades de transmissão dos componentes ópticos dos diferentes instrumentos empregados na análise (GARRIDO, 2002).

O ambiente que envolve os fluoróforos está diretamente relacionado com a frequência de emissão dos mesmos. Alteração no meio seja por variações na polaridade, proximidade de moléculas específicas, processos de interações moleculares, incluindo agregações e associações com membranas, podem alterar a energia do estado excitado e, conseqüentemente, a frequência de emissão. Neste caso, variações no λ_{max} de emissão, na intensidade de fluorescência (supressão), no rendimento quântico, entre outros, podem ser utilizadas na avaliação de propriedades estruturais e de processos de interação das moléculas peptídicas.

O fenômeno de supressão intermolecular da fluorescência está relacionado a qualquer processo que resulte na diminuição da intensidade de fluorescência da substância analisada (fluoróforo). Esta diminuição pode estar relacionada com a ocorrência de dois tipos de processos, dinâmico ou estático, ambos dependentes do contato molecular entre o fluoróforo e o agente supressor. No caso do processo dinâmico, também conhecido como supressão colisional, o supressor deve difundir para o fluoróforo durante o tempo de vida do estado excitado. Com o contato, o fluoróforo volta ao estado padrão, sem a emissão de fóton. Já no processo estático, um complexo é formado entre o fluoróforo e o supressor, e o mesmo não apresenta fluorescência e o tempo de vida no estado excitado não é afetado (HOLLER, et al., 2009). A ocorrência de supressão depende do mecanismo envolvido, que por sua vez depende da estrutura das moléculas individuais.

Desta forma, a supressão da fluorescência de cada um dos peptídeos derivados de ParE, pelos análogos ParDAC1, ParDAC2 e ParDAC3 foi determinada como uma função da concentração de cada um deles, como segue: Alíquotas (2 – 50 μL) de uma solução estoque de ParDAC1 (740 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), ParDAC2 (570 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) ou ParDAC3 (410 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), foram adicionadas a uma solução 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de ParEAC1, ParEAC2, ParEAC3 ou ParEAC4 (500 μL) em tampão padrão (Tris-HCl 10 mmol.L^{-1} , pH 7,2 / NaCl 20 mmol.L^{-1} / MgCl_2 5 mmol.L^{-1}), à 25°C. Antes da medida da fluorescência, as amostras foram homogeneizadas e equilibradas no suporte de cubeta com o obturador de excitação fechado. O comprimento de onda de excitação foi de 280 nm, com a emissão medida a 350 nm. Para evitar a contribuição de ParDAC3 nas medidas de fluorescência dos derivados de ParE, ensaios paralelos foram executados, nas mesmas condições anteriores, porém na ausência de dos derivados peptídicos de ParE. Os valores de emissão intrínseca de

ParDAC3 na região de análise, foram então utilizados na correção da emissão de fluorescência dos derivados de ParE, subtraindo a fluorescência obtida na ausência dos derivados peptídicos dos valores de fluorescência na presença dos mesmos, obtidos após a adição de cada alíquota. A intensidade de fluorescência observada, em todas as condições, foi corrigida para perda de sinal devido ao efeito de diluição e por efeito de filtro óptico causada por uma possível absorção dos análogos peptídicos (BORISSEVITCH, 1999).

Os dados obtidos foram representados em um gráfico de Stern-Volmer, onde a variação da fluorescência relativa dos derivados de ParE (F_0/F) foi avaliada em função da concentração de cada um dos análogos de ParD (Q). As constantes de supressão para cada ensaio foram determinadas a partir do coeficiente angular da curva descrita pela equação abaixo.

$$F_0/F = 1 + K_{sv} [Q] \quad (\text{Equação 1})$$

Nesta equação, F_0 e F representam a intensidade de fluorescência dos peptídeos derivados de ParE, na ausência e presença de um dos derivados peptídicos de ParD, respectivamente, [Q] a concentração dos peptídeos derivado de ParD e K_{sv} a constante de supressão (LAKOWICZ, 2006).

3.10 Ensaios de Inibição da atividade da DNA girase

Os ensaios de inibição do superenovelamento do DNA (inibição da atividade da girase) foram realizados incubando-se 1 unidade (U) de enzima (DNA girase) com 0,5 µg de plasmídeo pBR322 relaxado em um volume de reação de 30 µL, na ausência ou na presença de concentração variável de cada um dos peptídeos derivados de ParE. A reação foi incubada a 37°C por 1 hora em tampão de ensaio 1x (descrito anteriormente no item 3.2). A reação foi interrompida pela adição de 3 µL de SDS 2% e posterior incubação durante 2 minutos a 65°C. Em seguida foram adicionados 15 µL de STEB (20% sacarose; 0,05 mol.L⁻¹ Tris. HCl, pH 7,5; 0,05 mol.L⁻¹ EDTA; 50 µg/mL azul de bromofenol) e 60 µL da mistura clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Posteriormente as amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes das mesmas foram analisados por eletroforese em gel de agarose

1% em tampão TBE (89 mmol.L^{-1} ; 89 mmol.L^{-1} de ácido bórico; 2 mmol.L^{-1} EDTA, pH 8,2), submetidas à tensão constante de 60V ou 4V/cm à temperatura ambiente por 4 horas). Após a corrida, o gel foi corado durante 30 minutos com uma solução de brometo de etídio ($1 \text{ } \mu\text{g/mL}$) em tampão de corrida (GELLERT et al., 1976). A análise do gel foi realizada em um fotodocumentador Alpha Imager da Alpha Innotech.

3.11 Dicroísmo circular (CD)

A espectroscopia de dicroísmo circular (CD) é um método utilizado para analisar estruturas secundárias de proteínas e peptídeos em solução (WHITMORE & WALLACE, 2007). O fenômeno de dicroísmo circular é uma forma de espectroscopia que utiliza absorção diferenciada da luz polarizada no sentido horário ou anti-horário. Para uma molécula quiral apresentando o fenômeno de dicroísmo circular, o componente circularmente polarizado à direita é absorvido em diferente intensidade em relação ao polarizado à esquerda. Assim, a combinação das duas ondas transmitidas resulta em uma luz elipticamente polarizada. (PURDIE, 2007).

A estrutura secundária de cada peptídeo foi analisada por dicroísmo circular utilizando o equipamento JASCO J-815 CD spectrometer. Utilizou-se uma concentração de $80 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ de cada peptídeo em um volume final de $300 \text{ } \mu\text{L}$. Os espectros de CD foram feitos com acúmulo de 4 varreduras de 190 a 250 nm em água deionizada em temperatura ambiente, e também em diferentes concentrações de TFE (10, 20, 30 e 60%), em uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 mm, com aproximadamente $300 \text{ } \mu\text{L}$ de volume. Foi realizado um branco para cada medida, o qual apresentou sinal desprezível, sendo subtraído mesmo assim de todas as curvas.

3.12 Estudo de Modelagem

Para a modelagem das sequências de peptídeos selecionadas foi utilizado o servidor I-TASSER (ROY & ZHANG, 2010), por diversas vezes avaliado como o melhor servidor para predição de estruturas proteicas, de acordo com a CASP (*Critical Assessment of protein Structure Prediction*) (MOULT, et al, 2014). Para cada sequência submetida para modelagem foram obtidos dez modelos. A partir destes,

foi selecionado o melhor para cada sequência, de acordo com os parâmetros utilizados pelo próprio servidor para os modelos gerados.

3.13 Docking

Após a modelagem, foi realizado um estudo de *docking* entre a melhor sequência de ParDAC2 e a melhor sequência de ParE, utilizando o servidor SwarmDock (TORCHOLA, et al., 2013). Foram identificados 500 complexos e selecionados os sete melhores pontuados em termos de energia de interação, que também apresentaram o mesmo modo de interação.

3.14 Estudo de Dinâmica Molecular

O complexo ParD-ParE que apresentou a melhor pontuação durante o estudo de *docking*, foi utilizado para um estudo posterior de simulação de dinâmica molecular, empregando o arrefecimento simulado (*simulated annealing*) (KARPLUS & MCCAMMON, 2002).

O pacote GROMACS, versão 4.5.6 foi utilizado para conduzir o estudo de simulação molecular e as condições, previamente padronizadas através de outros estudos, foram: campo de força OPLS/AA (JORGENSEN, et al., 1996), com modelo de água tipo SPCE, que acrescenta uma correção da polarização média à função de energia potencial em relação ao modelo SPC (*single point charge*), apresentando melhor densidade e constante de difusão; a distância do complexo à parede da caixa de simulação foi mantida em 10 Å e os termos de repulsão e dispersão envolveram interações de Lennard-Jones e de Coulomb; para a redução do número de interações (*cutoff*) foi utilizado o método PME (*ParticleMeshEwald*) (ESSMANN, et al., 1995) e um raio de corte para a distância de van der Waals (VDW) de 1,2nm e, para a restrição do comprimento das ligações foi utilizado o algoritmo LINCS (HESS, et al., 1996). As seguintes etapas foram conduzidas: i) construção da caixa de simulação; ii) minimização do sistema formado pelo complexo, água, íons NaCl a 0,15 mmol.L⁻¹ (concentração similar ao de líquidos biológicos), utilizando algoritmo *steepestdescent* com mil passos; iii) equilíbrio do sistema a volume e temperatura constantes, através uma etapa de estabilização utilizando *ensembleNVT*, com

restrição dos peptídeos, para estabilizar as moléculas de água e íons em torno do complexo, durante 500 ps; iv) equilíbrio do sistema a pressão e temperaturas constantes, utilizando ensemble *NPT* (mols, pressão e temperatura constantes) durante 1000 ps; v) simulação de dinâmica molecular, durante 10 ns, aplicando-se o protocolo de *simulated annealing*, com a temperatura variando de 300 a 380 K em 10ns, com amostragem das conformações a cada 10 ps.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese, Purificação e Caracterização dos Peptídeos

Considerando a atividade inibitória sobre a DNA girase, atribuída à toxina bacteriana ParE e o efeito antídoto da proteína ParD, diversos fragmentos peptídicos foram projetados tendo como base a estrutura primária destas duas proteínas. Para isso, considerou-se a região C-terminal da antitoxina ParD e a região N-terminal da toxina ParE, variando a dimensão das sequências sintetizadas (Figura 13).

Assim, empregando-se a estratégia Fmoc/tBu, sintetizou-se manualmente três fragmentos peptídicos derivados de ParD (Figura 13A). Como o aminoácido C-terminal de ParD é uma alanina, utilizou-se como suporte de partida, uma resina de Wang contendo Fmoc-Ala pré-incorporada (Grau de Substituição: 0,6 mmol/g), na síntese de todas sequencias análogas ao ParD, incluindo aquelas com cisteína na extremidade N-terminal.

Deste modo, empregando-se 1,0 g desta resina, partiu-se para síntese da sequencia C-terminal ParDAC1, comum às demais. Após a retirada do grupo protetor Fmoc (desproteção) com uma solução de piperidina 20% em DMF, iniciou-se o acoplamento dos demais aminoácidos, seguindo sempre os passos de lavagens e desproteções apresentados na Tabela1, seguindo as condições descritas em Metodologia.

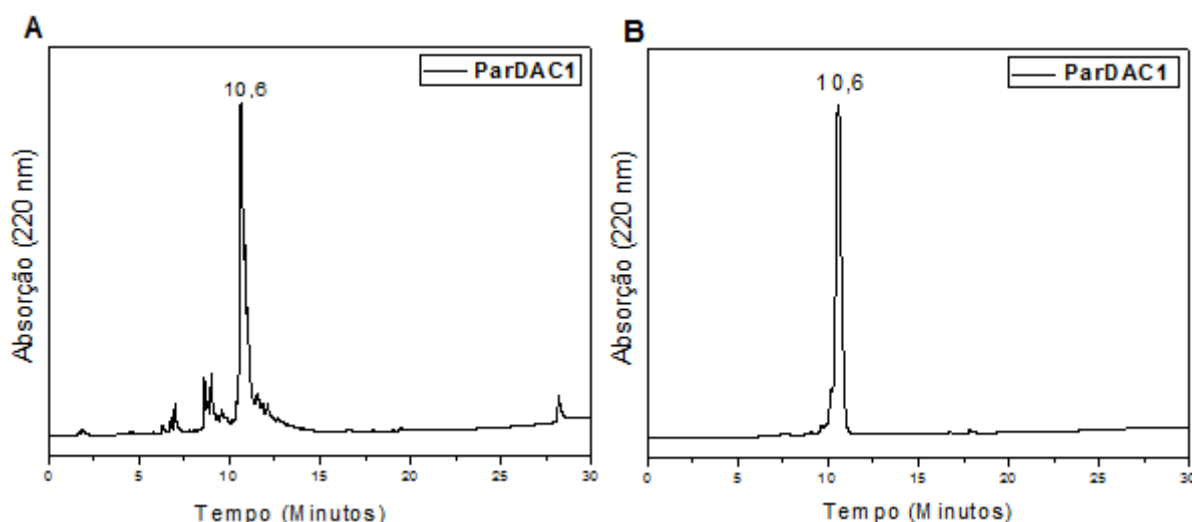
Após a síntese do primeiro análogo (ParDAC1 – Figura 13A), obteve-se uma massa de peptidil-resina de 2,5 g, sendo que 1,3 g foi utilizada para o acoplamento dos 16 resíduos seguintes para obtenção de ParDAC2. Foi obtida assim uma massa de 1,7 g de peptidil-resina, sendo 1 g armazenados e 700 mg utilizados para a síntese de ParDAC3. Em todos os peptídeos a região N-terminal foi acetilada empregando anidrido acético após o término da síntese. Isto foi necessário para mimetizar a ligação peptídica na região, visto que em todos os peptídeos o resíduo da extremidade N-terminal corresponde a um resíduo interno da sequência da antitoxina.

De cada uma das peptidil-resinas obtidas, foi reservada uma porção de 300 mg para adição de cisteína, obtendo-se ao final as sequências descritas na Figura 14 e utilizadas na preparação das colunas para ensaios de cromatografia de

afinidade. Ao final, todos análogos foram clivados da resina, precipitados, extraídos e liofilizados de acordo com o protocolo descrito em Metodologia.

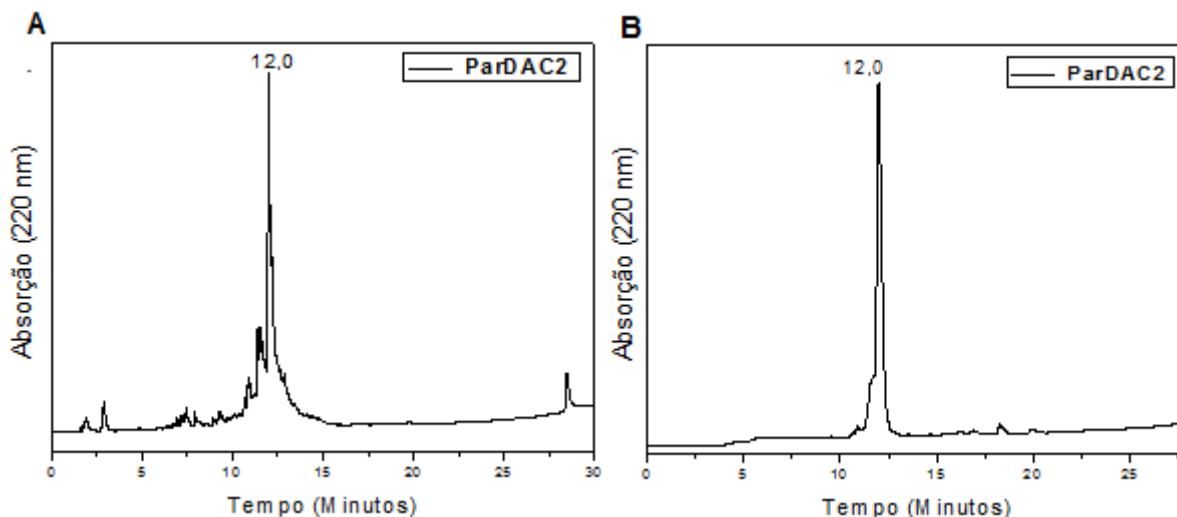
Após as etapas de síntese, clivagem e liofilização, uma pequena quantidade de cada peptídeo liofilizado (aproximadamente 1 mg) foi dissolvida em 1 mL de água ultrapura, filtrada e submetida à análise qualitativa por CLAE, como descrito em metodologia. A partir dos resultados de tempo de retenção e porcentagem de solvente obtidos nestas análises, foram definidas as condições relativas à concentração de solvente para purificação dos peptídeos em escala semi-preparativa. As frações provenientes do processo de purificação foram analisadas por CLAE em modo analítico. O conteúdo dos tubos que continham o perfil desejado foi reunido e liofilizado. Posteriormente, uma amostra foi submetida novamente à análise em CLAE para confirmar sua pureza. Os perfis cromatográficos de cada peptídeo derivado de ParD, antes e após a purificação estão representados nas Figuras 15 a 20.

Figura 15. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo ParDAC1 antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa C18 Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5-95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1 ml/min e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 25 mm; 15µm; 300 Å) com um gradiente convexo de 10 – 50% de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,04% TFA), fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.



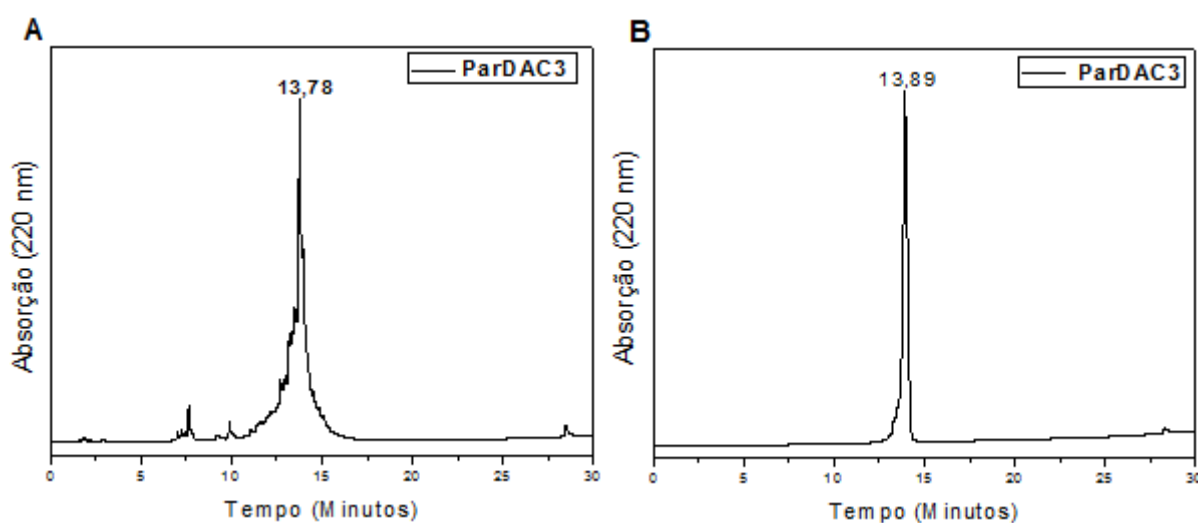
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 16. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo ParDAC2 antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa C18 Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 μ m; 300 Å). Gradiente linear de 5-95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1 mL/min e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 25 mm; 15 μ m; 300 Å) com um gradiente convexo de 10 – 60% de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,04% TFA), fluxo de 1 mL/min e detecção a 220 nm.



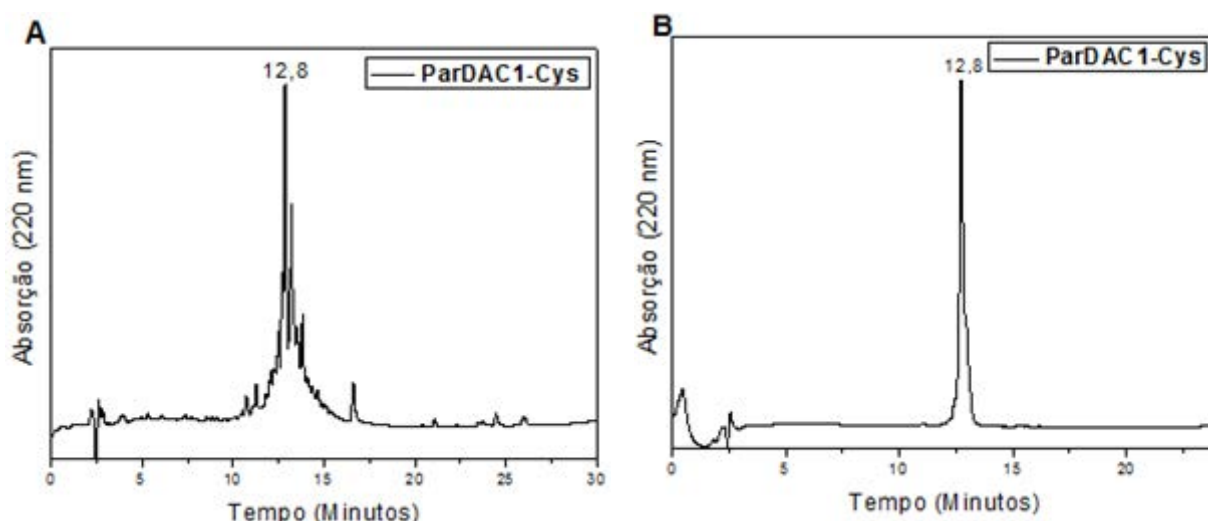
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 17. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo ParDAC3 antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa C18 Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 μ m; 300 Å). Gradiente linear de 5-95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1 mL/min e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 25 mm; 15 μ m; 300 Å) com um gradiente convexo de 15-60% de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,04% TFA), fluxo de 1 mL/min e detecção a 220 nm.



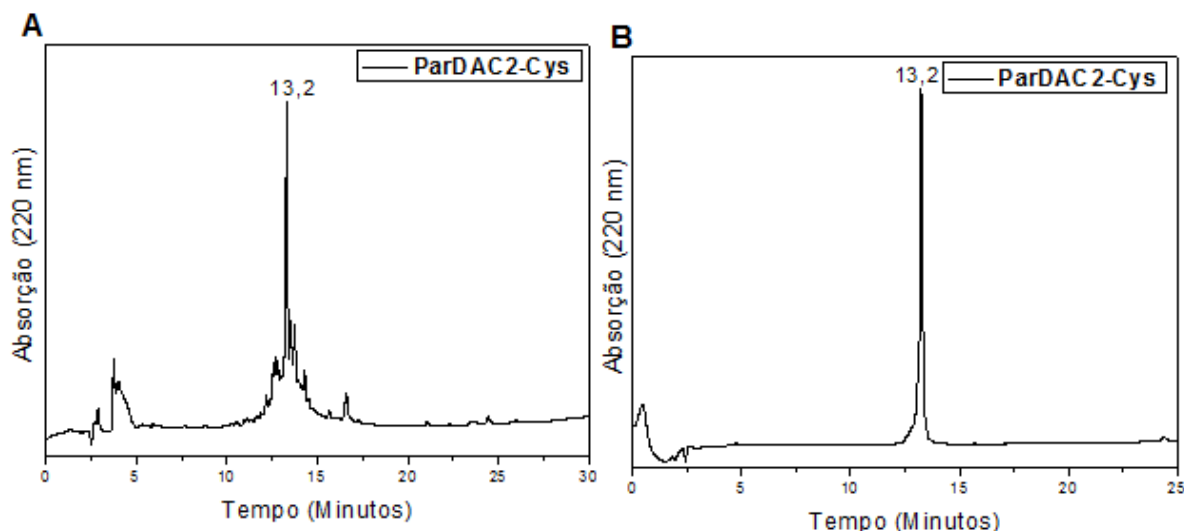
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 18. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo **ParDAC1-Cys** antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa C18 Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5-95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1 ml/min e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 25 mm; 15 µm; 300 Å) com um gradiente convexo de 10-60% de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,04% TFA), fluxo de 1 mL/min e detecção a 220 nm.



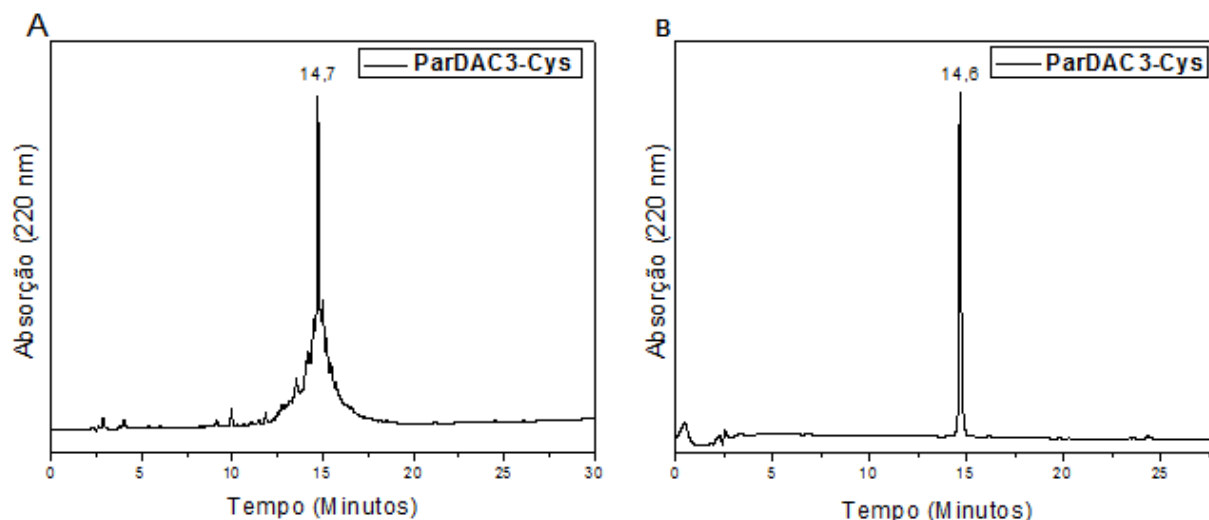
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 19. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo **ParDAC2-Cys** antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa C18 Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5-95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1 ml/min e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 25 mm; 15 µm; 300 Å) com um gradiente convexo de 10-60% de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,04% TFA), fluxo de 1 mL/min e detecção a 220 nm.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 20. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo ParDAC3-Cys antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa C18 Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5-95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1 ml/min e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 25 mm; 15 µm; 300 Å) com um gradiente convexo de 20-75% de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,04% TFA), fluxo de 1 mL/min e detecção a 220 nm.



Fonte: Elaborado pela autora.

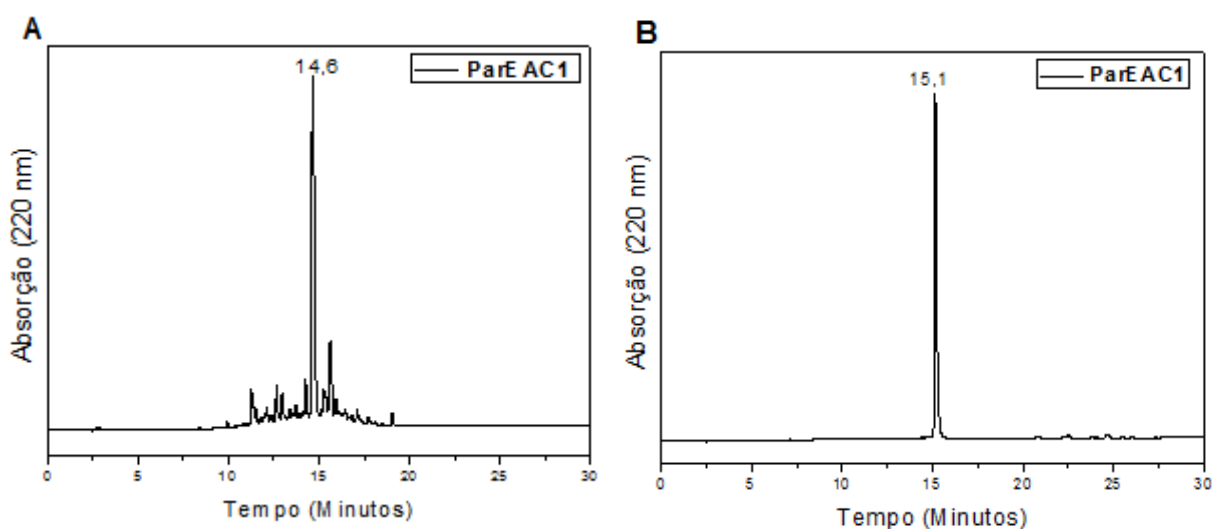
Na síntese dos peptídeos derivados de ParE (Figura 13B) foi utilizado o mesmo protocolo utilizado para os derivados de ParD, diferenciando-se na resina de partida que foi uma Rink Amida MBHA com grau de substituição de 0,59 mmol/g. O uso desta resina, resulta em peptídeos com um grupamento amida na extremidade C-terminal após a clivagem final. Isso foi necessário para mimetizar a ligação peptídica nesta região, pois nestes peptídeos o resíduo da extremidade C-terminal corresponde a um resíduo interno da sequência da toxina. Em todos os peptídeos, com exceção de ParEAC3, a região N-terminal foi acetilada com o anidrido acético após o término da síntese. Este procedimento foi necessário também para mimetizar a ligação peptídica na região, visto que em todos os peptídeos o resíduo da extremidade N-terminal corresponde a um resíduo interno da sequência da toxina.

Assim, empregando-se 700 mg desta resina, partiu-se para síntese da sequência ParEAC1, a qual deu origem a ParEAC2 e ParEAC3. Ao final foram obtidas cerca de 1 g de cada uma das três peptidil-resinas. No caso do peptídeo

ParEAC4, utilizou-se 340 mg da mesma Rink Amida MBHA, obtendo-se ao final, 690 mg da respectiva peptidil-resina.

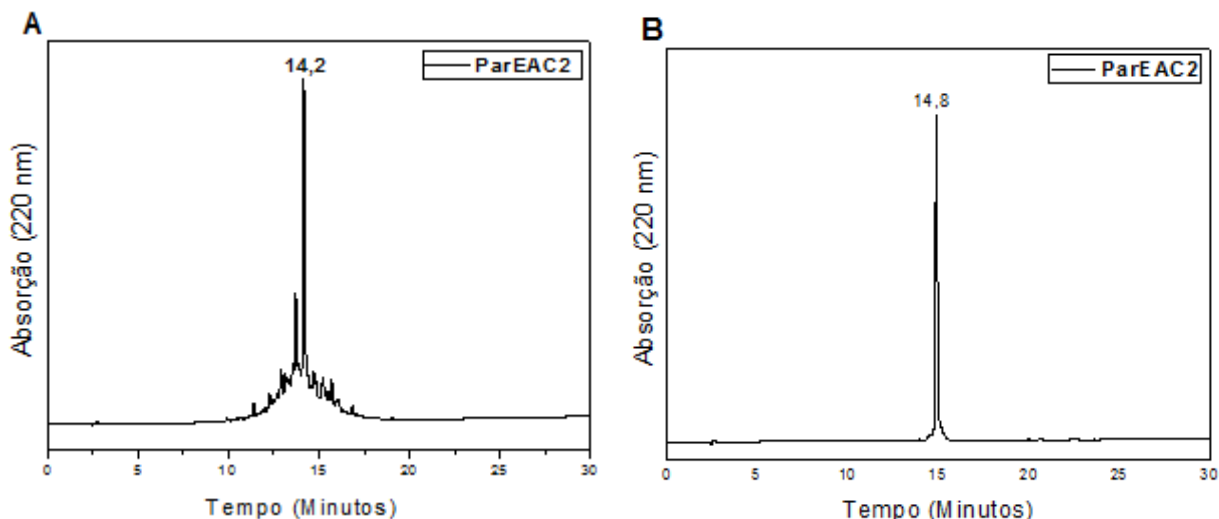
Após as etapas de síntese, clivagem e liofilização, assim como no caso dos derivados de ParD, uma pequena quantidade de cada peptídeo liofilizado (aproximadamente 1 mg) foi dissolvida em 1 mL de água ultrapura, filtrada e submetida à análise qualitativa por CLAE, como descrito em metodologia. A partir dos resultados de tempo de retenção e porcentagem de solvente obtidos nestas análises, foram definidas as condições relativas à concentração de solvente para purificação dos peptídeos em escala semi-preparativa. As frações provenientes do processo de purificação foram analisadas por CLAE em modo analítico. Os conteúdos dos tubos que continham o perfil desejado foram unidos e liofilizados. Posteriormente, uma amostra foi submetida novamente à análise em CLAE para confirmar sua pureza. Os perfis cromatográficos de cada peptídeo derivado de ParE, antes e após a purificação estão representados nas Figuras 21 a 24.

Figura 21. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo ParEAC1 antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa C₁₈ Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5-95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1 ml/min e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 25 mm; 15 µm; 300 Å) com um gradiente convexo de 20-60% de componente orgânico (acetoneitrila; água; 0,04% TFA), fluxo de 1 mL/min e detecção a 220 nm.



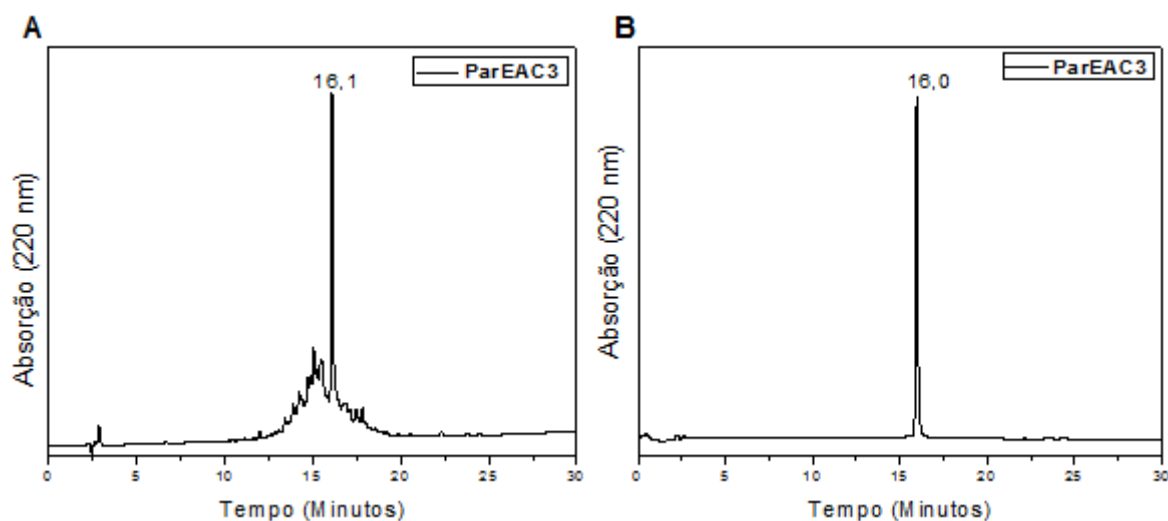
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 22. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo ParEAC2 antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa C18 Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 μ m; 300 Å). Gradiente linear de 5-95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1 ml/min e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 25 mm; 15 μ m; 300 Å) com um gradiente convexo de 20-60% de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,04% TFA), fluxo de 1 mL/min e detecção a 220 nm.



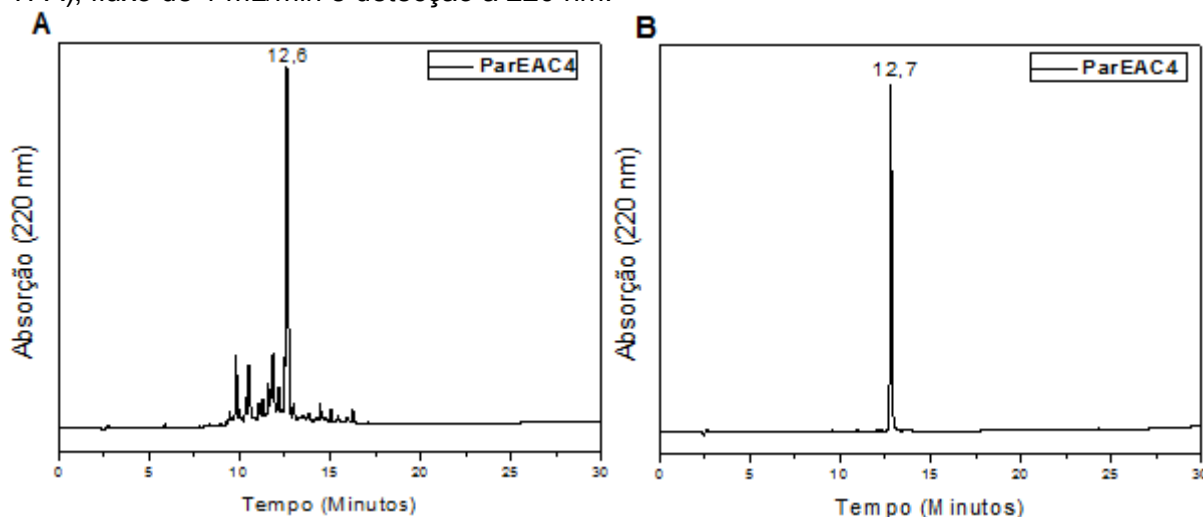
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 23. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo ParEAC3 antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa C18 Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 μ m; 300 Å). Gradiente linear de 5-95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1 ml/min e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 25 mm; 15 μ m; 300 Å) com um gradiente convexo de 40-80% de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,04% TFA), fluxo de 1 mL/min e detecção a 220 nm.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 24. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo ParEAC4 antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa C18 Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5-95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1 ml/min e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 25 mm; 15 µm; 300 Å) com um gradiente convexo de 20-60% de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,04% TFA), fluxo de 1 mL/min e detecção a 220 nm.



Fonte: Elaborado pela autora.

Tanto para os análogos de ParD quanto para os de parE, pode-se observar que os perfis cromatográficos dos peptídeos puros apresentaram um único pico em relação aos perfis cromatográficos dos peptídeos brutos, tanto para os derivados de ParD quanto de ParE. O parâmetro tempo de retenção dos peptídeos puros foi praticamente mantido em relação ao pico correspondente no extrato bruto.

O rendimento da purificação de cada análogo foi calculado através de uma relação com a massa do peptídeo em seu estado bruto (antes da purificação). O rendimento da purificação e as purezas relativas dos diferentes peptídeos estão representados na Tabela 2. Os conteúdos peptídicos, avaliados por análise de aminoácidos, situaram-se na faixa de 80 a 85% e a proporção relativa de aminoácidos apresentou-se dentro do esperado.

Tabela 2 - Relação das massas dos peptídeos purificados.

Peptídeo	Massa Peptídeo Bruto (mg)	Massa após purificação (mg)	Rendimento da Purificação (%)	Pureza Relativa (%)
<i>ParDAC1</i>	50	8	16,0	96
<i>ParDAC2</i>	50	12,2	24,4	95
<i>ParDAC3</i>	50	5,3	10,6	98,8
<i>ParEAC1</i>	50	14,4	28,8	97,8
<i>ParEAC2</i>	50	5,7	11,4	97
<i>ParEAC3</i>	50	5,3	10,6	100
<i>ParEAC4</i>	50	10,0	20,0	98,5
<i>ParDAC1-Cys</i>	50	4,5	9,0	97
<i>ParDAC2-Cys</i>	50	4,5	9,0	100
<i>ParDAC3-Cys</i>	50	4,0	8,0	99

Fonte: Elaborado pela autora.

A caracterização dos peptídeos sintetizados foi realizada através de ensaios de espectrometria de massas e análise de aminoácidos. Os valores de massa molecular obtidos no modo electrospray positivo [ES m/z : $(M + H)^+$], estão apresentados na Tabela 3 e os respectivos espectros podem ser visualizados nas Figuras 25 a 34.

Os resultados foram coincidentes com o teórico esperado, confirmando a identidade das estruturas peptídicas sintetizadas. Os resultados obtidos nas análises de aminoácidos para determinação da proporção relativa de cada um dos aminoácidos presentes nas diferentes sequências apresentaram-se próximos aos

valores teóricos esperados, excetuando-se aqueles susceptíveis à degradação nas condições de hidrólise.

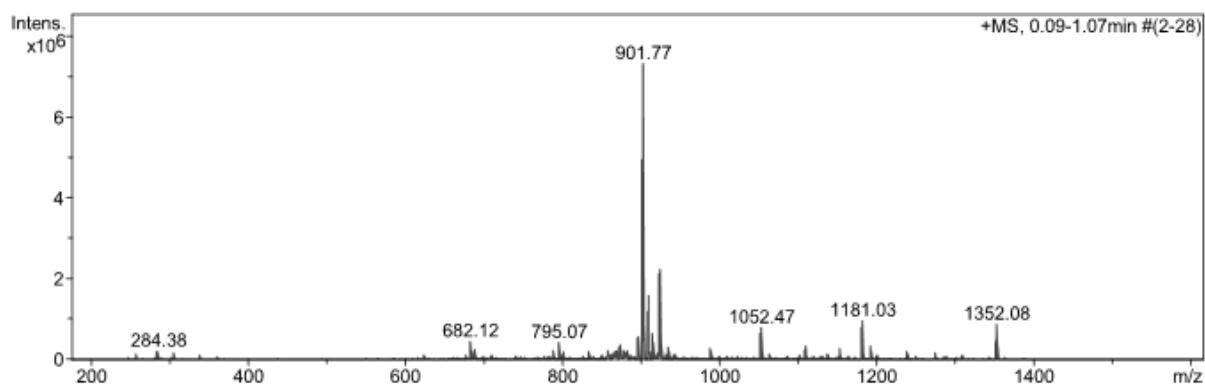
O conjunto de resultados de espectrometria de massas e análise de aminoácidos permite concluir que os procedimentos utilizados para síntese, clivagem de peptidil-resina e metodologias de purificação desenvolvidas foram adequados, levando à obtenção das sequências desejadas.

Tabela 3 - Resultado das análises de espectrometria de massas.

Peptídeo	Massa molecular Teórica (g/mol)	ES+	ES m/z (g/mol)
<i>ParDAC1</i>	2.702,91	+3	901,8
		+2	1.352,1
<i>ParDAC2</i>	3.488,88	+4	873,3
		+3	1.163,8
<i>ParDAC3</i>	4.860,31	+5	973,0
		+4	1.215,8
<i>ParEAC1</i>	2.565,92	+4	642,3
		+3	856,0
		+2	1.283,6
<i>ParEAC2</i>	4.426,03	+6	738,5
		+5	886,0
		+4	1.107,2
<i>ParEAC3</i>	5.177,98	+7	740,6
		+6	863,8
		+5	1.036,4
<i>ParEAC4</i>	2.290,57	+4	573,5
		+3	764,3
		+2	1.146,0
<i>ParDAC1-Cys</i>	2.806,06	+4	702,3
		+3	936,0
<i>ParDAC2-Cys</i>	3.592,03	+5	719,3
		+4	898,8
		+3	1.197,8
<i>ParDAC3-Cys</i>	4.963,46	+6	828,1
		+5	993,4
		+4	1.241,4

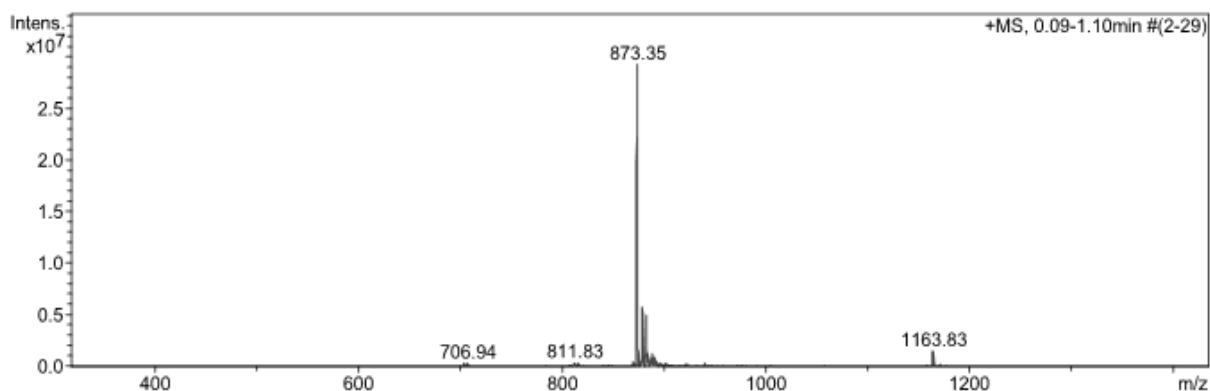
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 25. Espectro de massas do peptídeo ParDAC1.



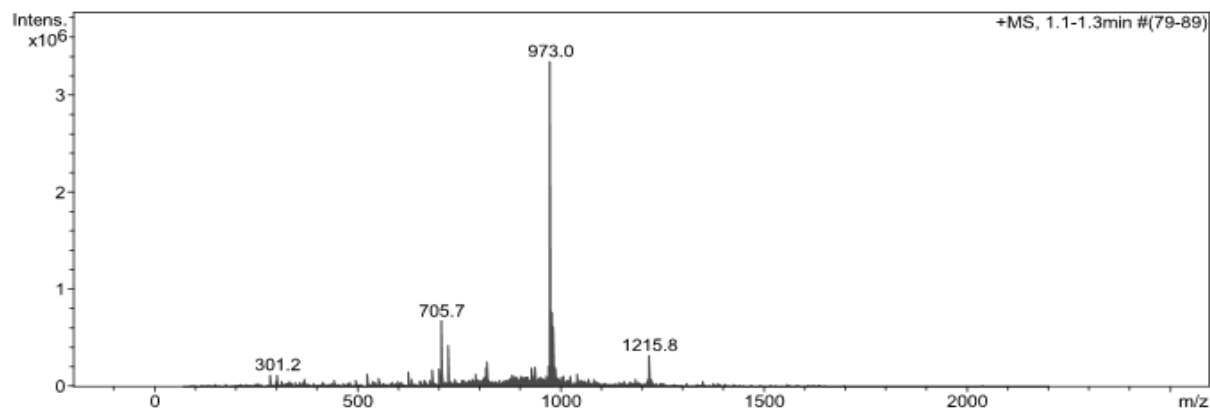
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 26. Espectro de massas do peptídeo ParDAC2.

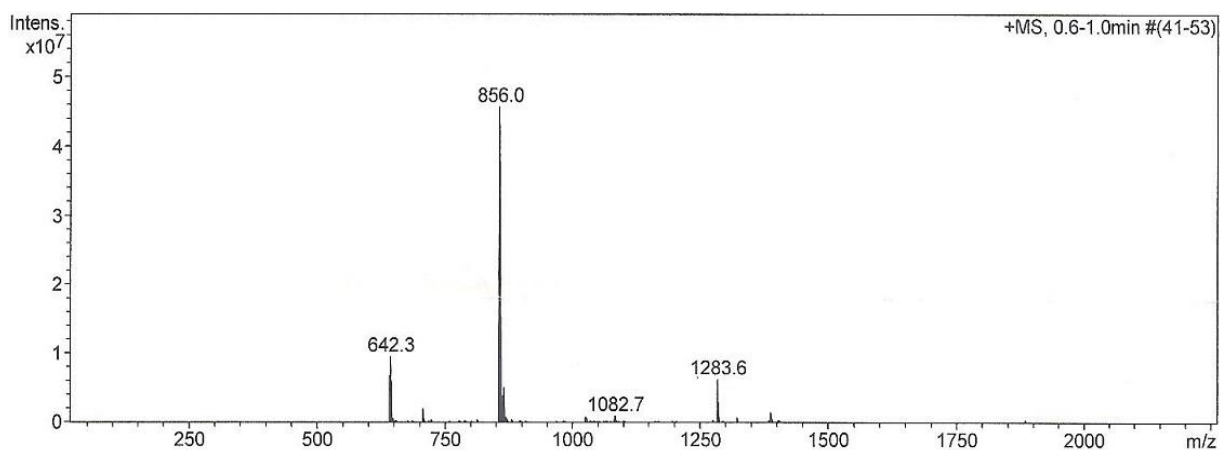


Fonte: Elaborado pela autora.

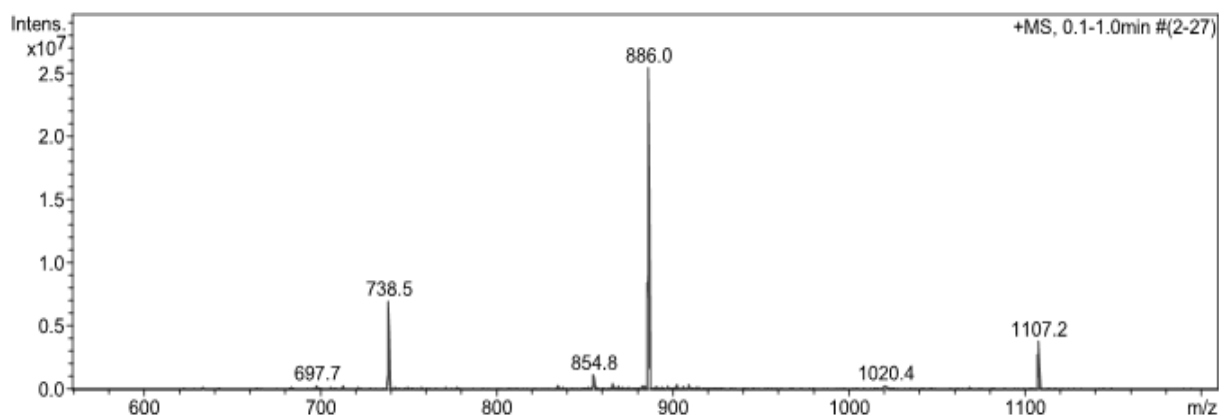
Figura 27. Espectro de massas do peptídeo ParDAC3.



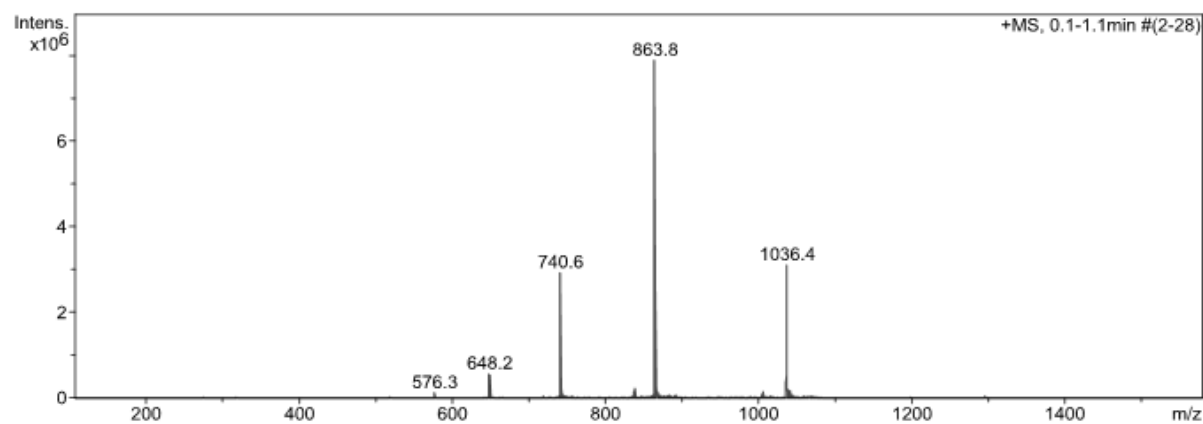
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 28. Espectro de massas do peptídeo ParEAC1.

Fonte: Elaborado pela autora.

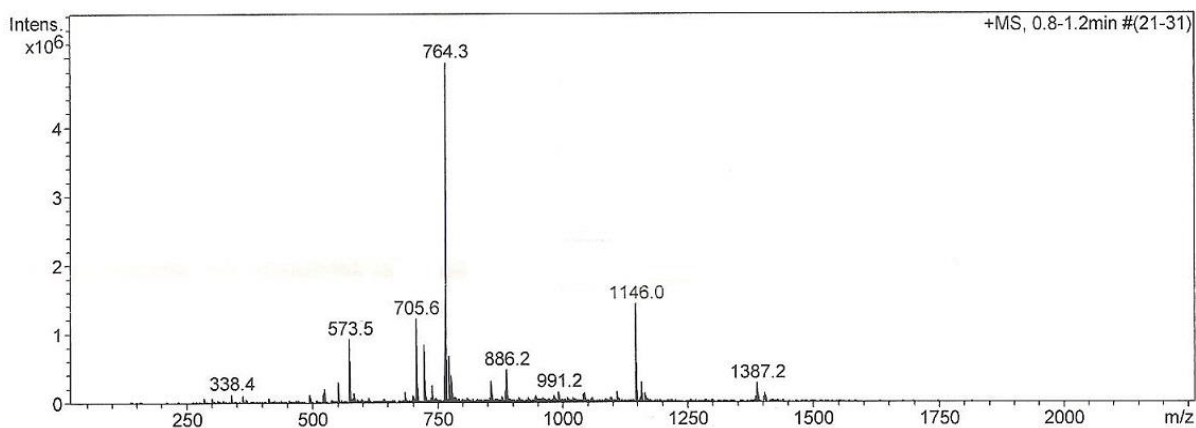
Figura 29. Espectro de massas do peptídeo ParEAC2.

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 30. Espectro de massas do peptídeo ParEAC3.

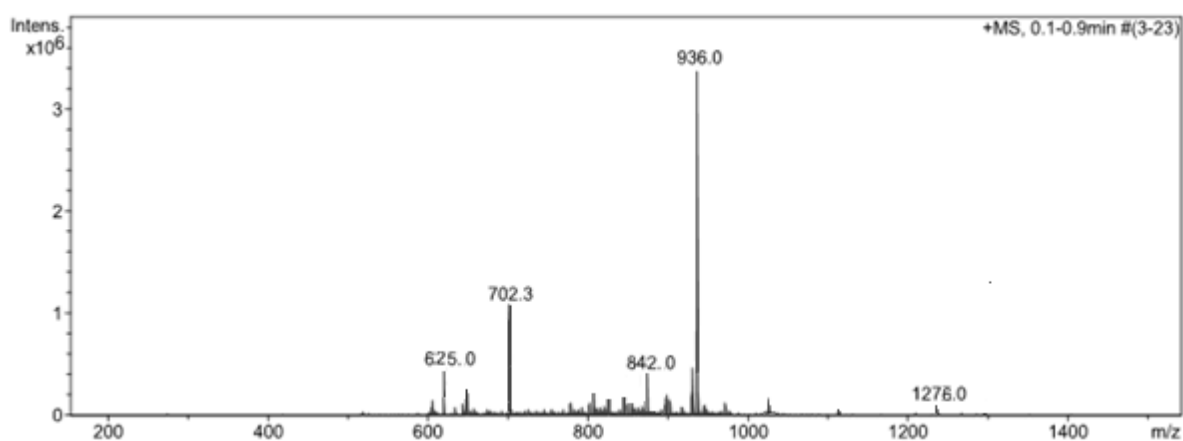
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 31. Espectro de massas do peptídeo ParEAC4.



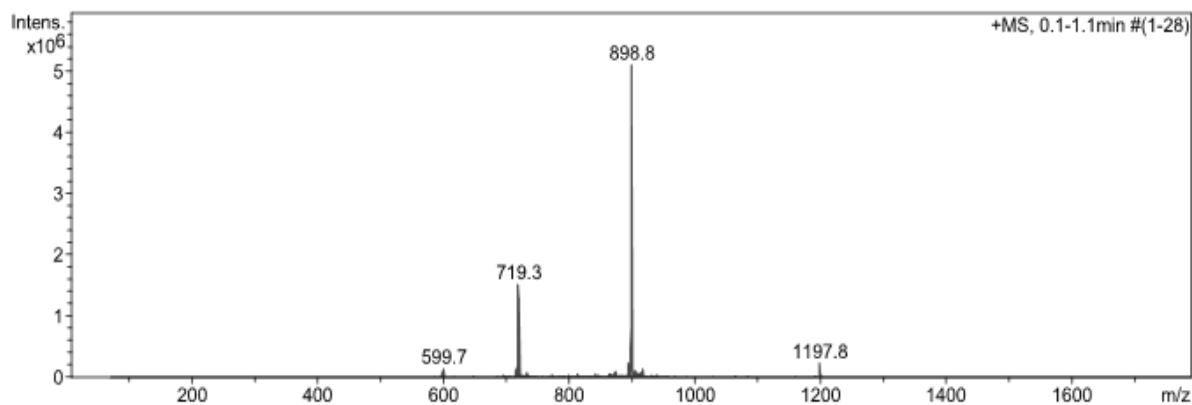
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 32. Espectro de massas do peptídeo ParDAC1-Cys.



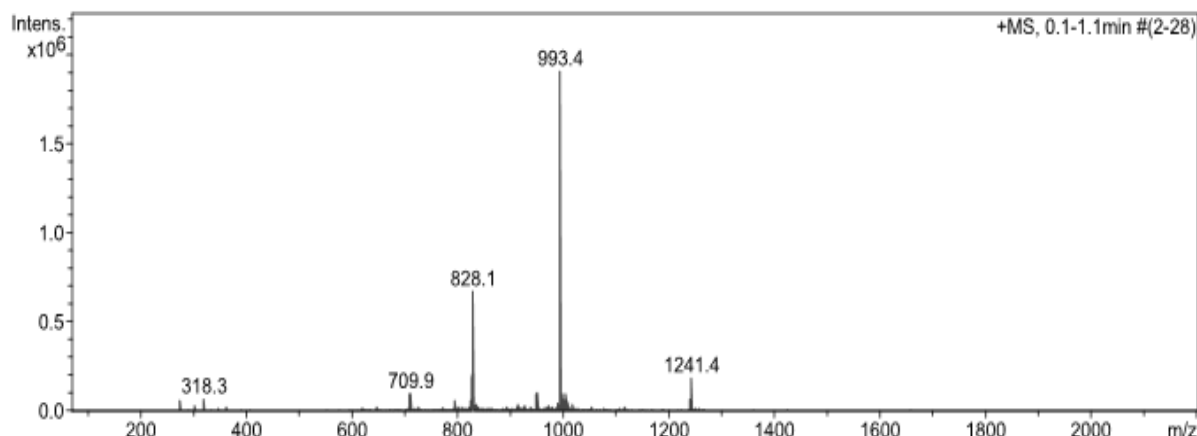
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 33. Espectro de massas do peptídeo ParDAC2-Cys.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 34. Espectro de massas do peptídeo ParDAC3-Cys.



Fonte: Elaborado pela autora.

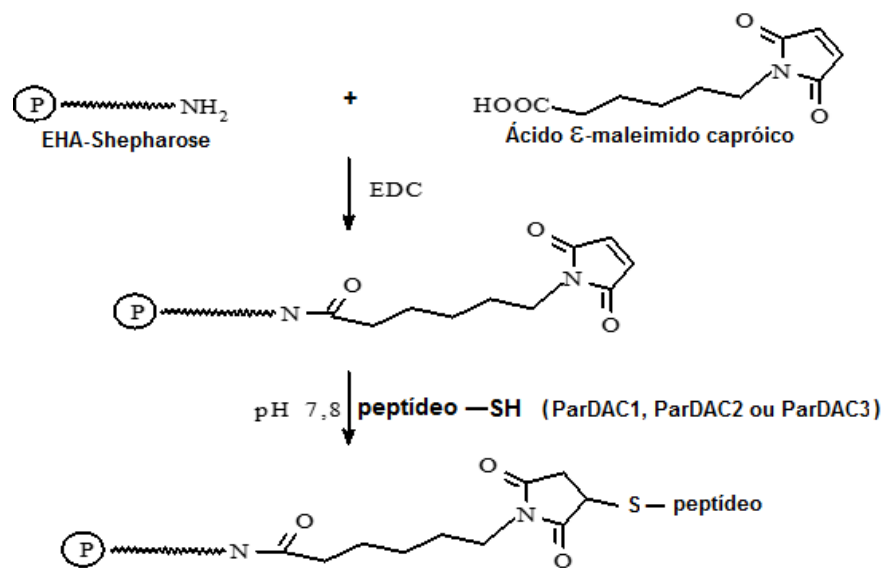
4.2 Cromatografia de Afinidade

Para se avaliar a possibilidade de interação entre os análogos de ParD e os peptídeos derivados de ParE, decidiu-se pela técnica de cromatografia de afinidade, que permite analisar a capacidade de retenção dos análogos de ParE frente às colunas contendo cada um dos análogos de ParD imobilizados.

Desta forma, inicialmente, os três análogos, ParDAC1-Cys, ParDAC2-Cys e ParDAC3-Cys, foram imobilizados em uma resina tipo Sepharose, que foi previamente funcionalizada pela reação com ácido ϵ -maleimidocapróico (Figura 35).

Os peptídeos foram acoplados ao suporte polimérico utilizando ParDAC1-Cys, ParDAC2-Cys ou ParDAC3-Cys (Figura 14), por adição nucleofílica do grupo tiol da cadeia lateral da cisteína à dupla ligação da função maleimido do ácido (MARCHETTO et al., 2001). A eficiência do acoplamento foi testada por análise de aminoácidos (item 3.6 da metodologia), que se mostrou satisfatória quando comparada com a sepharose sem os análogos de ParD incorporados.

Figura 35. Imobilização dos análogos de ParD em resina Sepharose.

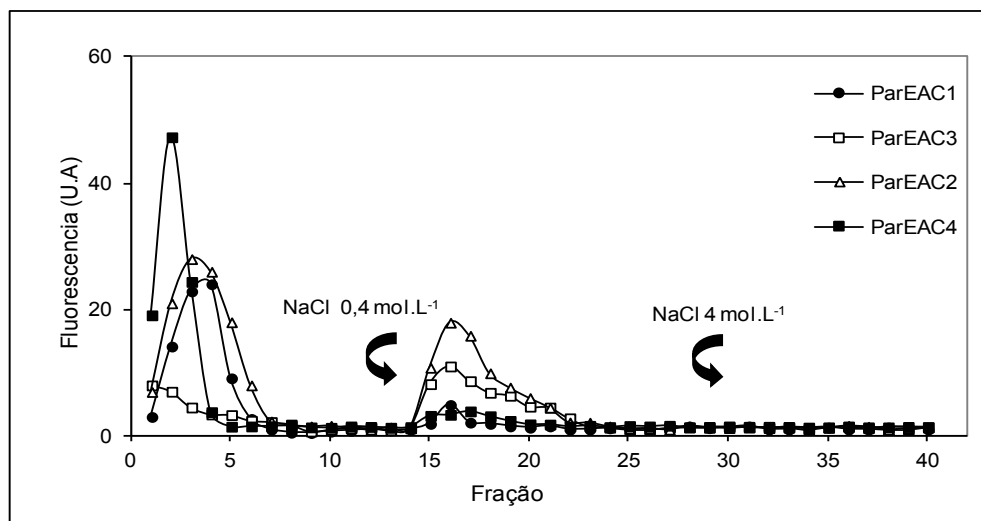


Fonte: Adaptado de: TROVATTI (2006).

Para prosseguir com os estudos de afinidade, soluções contendo os análogos ParEAC1, ParEAC2, ParEAC3 e ParEAC4 foram inseridos um a um a cada uma das três colunas e analisados como descrito em Metodologia, medindo-se a fluorescência intrínseca de cada peptídeo. O comportamento cromatográfico de cada um dos análogos de ParE, frente às colunas contendo análogos de ParD imobilizados, está representado nas Figuras 36, 37 e 38, respectivamente.

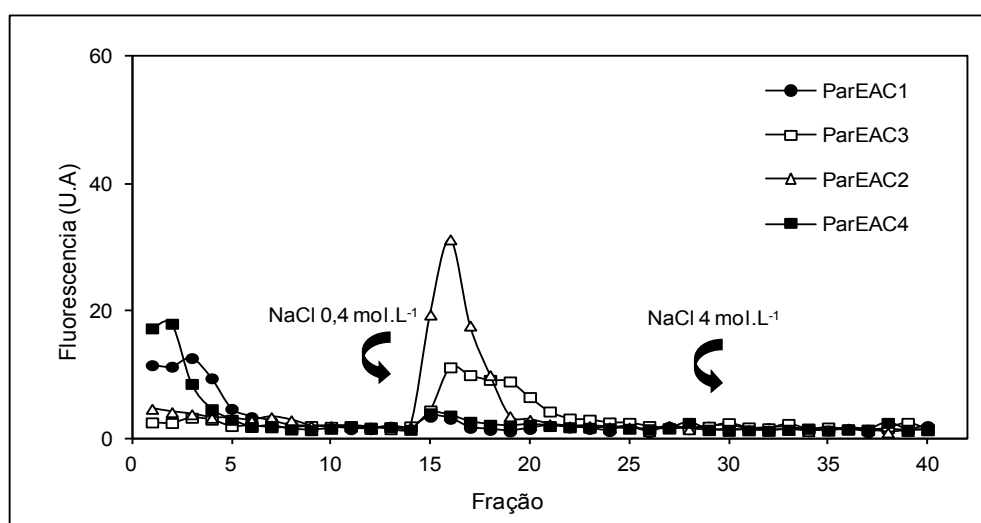
ParEAC2 e ParEAC3 apresentaram maior afinidade pelas colunas contendo ParDAC1, ParDAC2 e ParDAC3 imobilizados, sendo eluídos após adição de uma solução de NaCl $0,4 \text{ mol.L}^{-1}$. A eluição destes dois peptídeos das colunas sob condições suaves sugere que ligações de hidrogênio e não interações iônicas, são determinantes na interação entre os análogos de ParE e de ParD. Qualitativamente é possível concluir que a interação destes dois análogos, ParEAC2 e ParEAC3 é mais efetiva com as duas sequências mais longas derivadas de ParD (ParDAC2 e ParDAC3), haja vista a intensidade de fluorescência das frações eluídas contendo estes dois peptídeos após o tratamento da coluna com solução contendo NaCl $0,4 \text{ mol.L}^{-1}$. A ausência de fluorescência significativa, nas frações iniciais de lavagem das colunas (Figuras 37 e 38), corrobora esta conclusão.

Figura 36. Ensaios de Cromatografia de afinidade com ParDAC1 imobilizado. Amostras: ParEAC1 (●), ParEAC2 (Δ), e ParEAC3 (□) e ParEAC4 (■). As colunas foram equilibradas com tampão Tris.HCl 10 mmol.L⁻¹, pH 7,0. Eluição da coluna foi feita com o mesmo tampão contendo NaCl 0,4 ou 4 mol.L⁻¹ como indicado pelas setas. A eluição dos peptídeos foi monitorada pela fluorescência intrínseca dos respectivos análogos peptídicos de ParE (excitação a 280 nm e emissão a 350 nm); U.A = Unidade arbitrária.



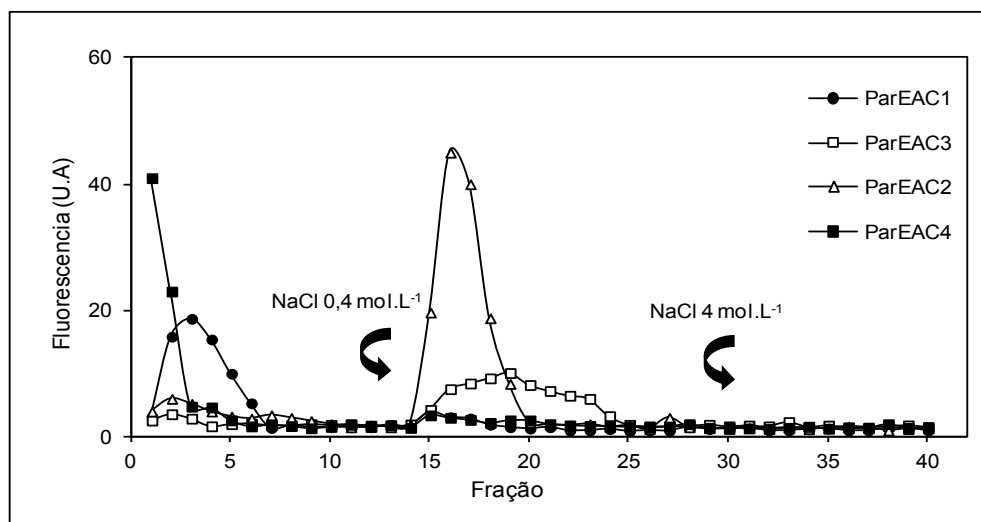
Fonte: Elaborado pela Autora.

Figura 37. Ensaios de Cromatografia de afinidade com ParDAC2 imobilizado. Amostras: ParEAC1 (●), ParEAC2 (Δ), e ParEAC3 (□) e ParEAC4 (■). As colunas foram equilibradas com tampão Tris.HCl 10 mmol.L⁻¹, pH 7,0. Eluição da coluna foi feita com o mesmo tampão contendo NaCl 0,4 ou 4 mol.L⁻¹ como indicado pelas setas. A eluição dos peptídeos foi monitorada pela fluorescência intrínseca dos respectivos análogos peptídicos de ParE (excitação a 280 nm e emissão a 350 nm); U.A = Unidade arbitrária.



Fonte: Elaborado pela Autora.

Figura 38. Ensaios de Cromatografia de afinidade com ParDAC3 imobilizado. Amostras: ParEAC1 (●), ParEAC2 (△), e ParEAC3 (□) e ParEAC4 (■). As colunas foram equilibradas com tampão Tris.HCl 10 mmol.L⁻¹, pH 7,0. Eluição da coluna foi feita com o mesmo tampão contendo NaCl 0,4 ou 4 mol.L⁻¹ como indicado pelas setas. A eluição dos peptídeos foi monitorada pela fluorescência intrínseca dos respectivos análogos peptídicos de ParE (excitação a 280 nm e emissão a 350 nm); U.A = Unidade arbitrária.



Fonte: Elaborado pela Autora.

O mesmo efeito não foi observado no caso da coluna contendo ParDAC1 imobilizado (Figura 36). As frações iniciais, correspondentes à lavagem com tampão, diferentemente das colunas contendo ParDAC2 e ParDAC3, apresentaram emissão de fluorescência intrínseca dos peptídeos ParEAC2 e ParEAC3, indicando menor interação destes peptídeos com o peptídeo ParDAC1.

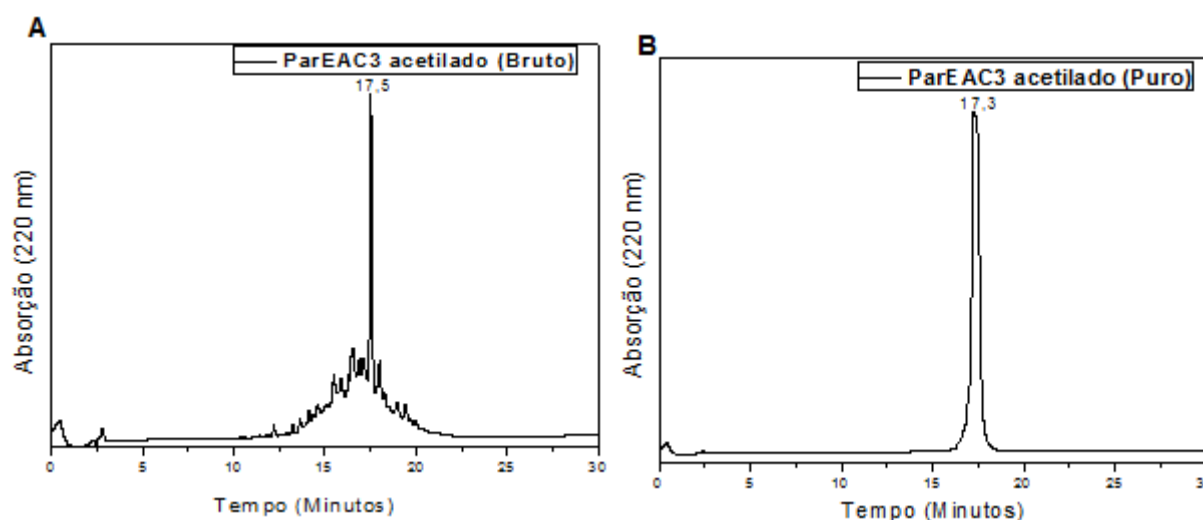
Por outro lado, a eluição do peptídeo ParEAC3, independentemente da coluna utilizada, sendo mais acentuada nas colunas contendo ParDAC2 e ParDAC3 (Figuras 37 e 38), ocorreu de uma forma mais dispersa (cerca de 10 frações), quando comparada a ParEAC2, eluído de forma mais concentrada, em um volume correspondente a 5 frações. Este resultado pode estar relacionado à extremidade N-terminal livre do peptídeo ParEAC3 que, no pH de ensaio, apresenta carga predominantemente positiva, ocasionando, possivelmente um pequeno incremento em relação à interação com os peptídeos derivados de ParD, imobilizados no suporte polimérico.

Para esclarecer o efeito da extremidade N-terminal livre de ParEAC3 no perfil cromatográfico e consequentemente na retenção na coluna, o peptídeo ParEAC3 foi

acetilado nesta extremidade e posteriormente testado por cromatografia de afinidade, utilizando as mesmas colunas.

Para isso, uma pequena fração de ParEAC3-resina, previamente armazenada, foi acetilada como descrito em Metodologia, e posteriormente clivada, purificada e analisada de acordo com o protocolo já descrito para o peptídeo ParEAC3. Ao final foram obtidas 80 mg de acetil-ParEAC3 cujos perfis cromatográficos, antes e após a purificação estão representados na Figura 39.

Figura 39. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo Acetil-ParEAC3 antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa C18 Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5-95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1 ml/min e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 25 mm; 15 µm; 300 Å) com um gradiente convexo de 20-60% de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,04% TFA), fluxo de 1 mL/min e detecção a 220 nm.



Fonte: Elaborado pela autora.

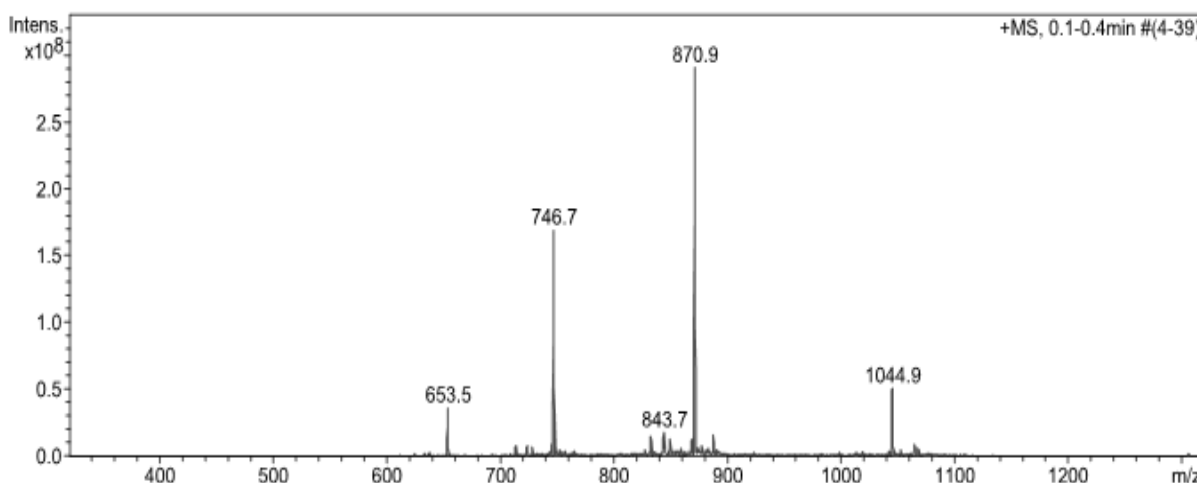
O rendimento da purificação foi de 15%, calculado através de uma relação com a massa do peptídeo (50 mg) em seu estado bruto (antes da purificação). A pureza relativa foi de 97%. O conteúdo peptídico, avaliado por análise de aminoácidos, manteve-se na faixa de 85% e a proporção relativa de aminoácidos apresentou-se dentro do esperado.

A caracterização do peptídeo acetil-ParEAC3 também foi realizada empregando espectrometria de massas e análise de aminoácidos. Os valores de massa molecular obtidos no modo electrospray positivo foram: m/z $(M + 5H)^{+5} =$

1044,9; $(M + 6H)^{+6} = 870,9$; $(M + 7H)^{+7} = 746,7$ e $(M + 8H)^{+8} = 653,5$; $M_T = 5.220,02$ g/mol, e o respectivo espectro está representado na Figura 40.

Os resultados foram coincidentes com o teórico esperado, confirmando a identidade da estrutura peptídica esperada. O resultado obtido na análise de aminoácidos, para determinação da proporção relativa de cada um dos aminoácidos presentes mostrou-se próximo dos valores teóricos esperados, excetuando-se aqueles susceptíveis à degradação nas condições de hidrólise.

Figura 40. Espectro de massas do peptídeo acetil-ParEAC3.

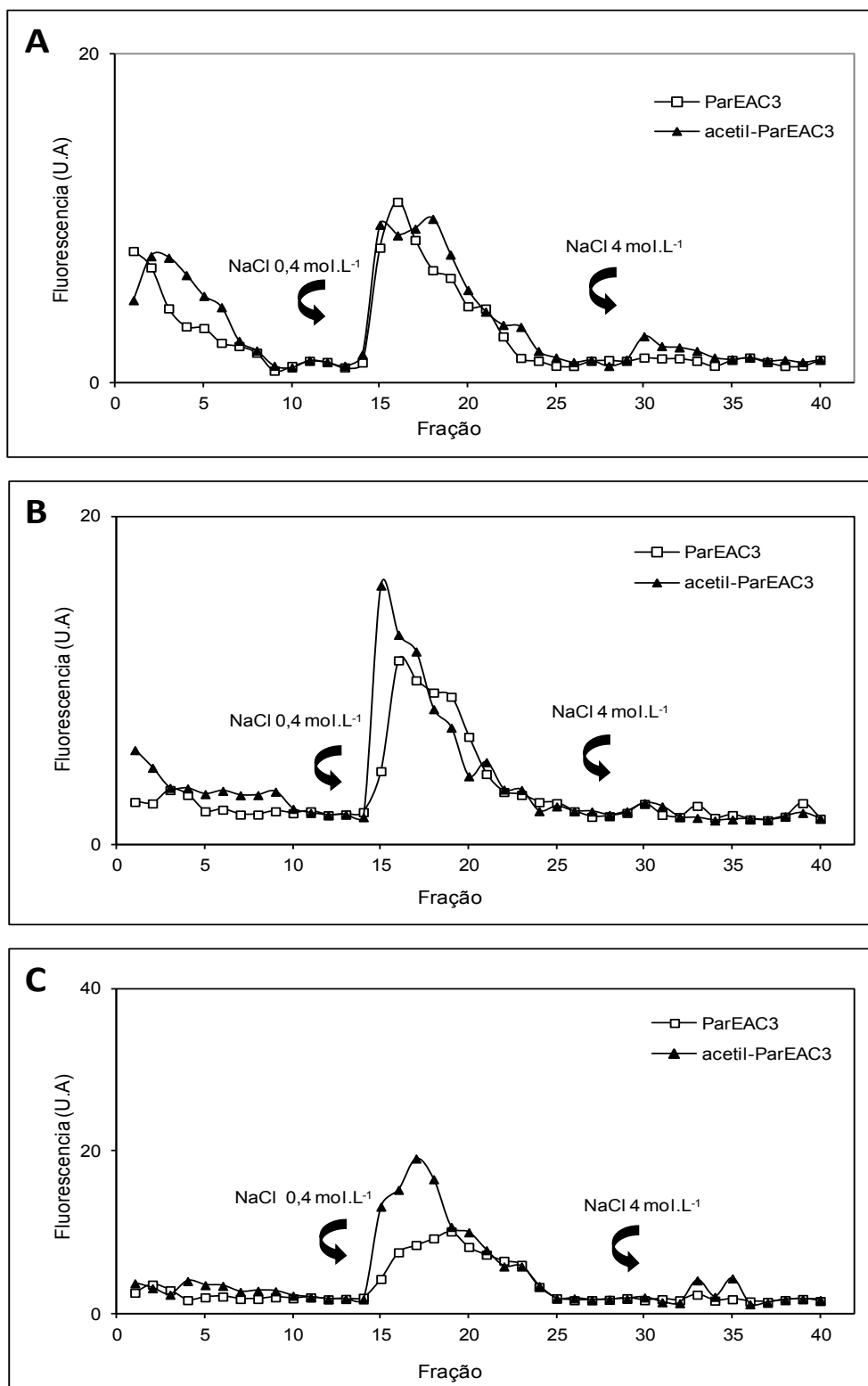


Fonte: Elaborado pela autora.

O peptídeo acetil-ParEAC3 assim obtido, foi introduzido a cada uma das três colunas e o comportamento cromatográfico, analisado como descrito em Metodologia (Figura 41).

É possível observar que o comportamento cromatográfico do peptídeo acetil-ParEAC3 é muito parecido ao do seu análogo não acetilado, ou seja, com uma eluição dispersa, independentemente da coluna utilizada. Assim sendo, é possível concluir que o fato da extremidade N-terminal de ParEAC3 estar livre, não significa necessariamente a existência de um possível efeito de carga, promovendo maior interação deste análogo com os derivados de ParD.

Figura 41. Ensaios de Cromatografia de afinidade comparativos de ParEAC3 e acetil-ParEAC3 em colunas contendo (A) ParDAC1, (B) ParDAC2 e (C) ParDAC3 imobilizados. As colunas foram equilibradas com tampão Tris.HCl 10 mmol.L⁻¹, pH 7,0. Eluição da coluna foi feita com o mesmo tampão contendo NaCl 0,4 ou 4 mol.L⁻¹ como indicado pelas setas. A eluição dos peptídeos foi monitorada pela fluorescência intrínseca dos respectivos análogos peptídicos de ParE (excitação a 280 nm e emissão a 350 nm); U.A = Unidade arbitrária.



Fonte: Elaborado pela Autora

Uma série de ensaios controle foi realizada utilizando o suporte polimérico não modificado (sem ácido ϵ -maleimidocapróico) ou modificado, porém na ausência dos peptídeos imobilizados. Nestes ensaios, não foi detectada a retenção de qualquer um dos peptídeos ensaiados. Deste modo, atribui-se a retenção observada nas diferentes colunas, exclusivamente à interação entre os peptídeos testados.

Estes resultados sugerem que os fatores determinantes para a atividade de ParD podem estar contidos nas sequências de aminoácidos dos derivados de ParE, especificamente ParEAC2 e ParEAC3, porém, pela técnica empregada, nada se pode concluir em relação ao complexo mais estável formado.

4.3 Estudos de Supressão de Fluorescência

Estudos qualitativos de cromatografia de afinidade apontaram para interação entre os dois análogos, ParEAC2 e ParEAC3 com as sequências derivadas de ParD, aparentemente mais efetiva com as duas sequências mais longas (ParDAC2 e ParDAC3). Assim sendo, os parâmetros de interação foram estudados através da análise de supressão de fluorescência intrínseca dos análogos de ParE resultante da possível interação com cada um dos peptídeos ParDAC1, ParDAC2 e ParDAC3.

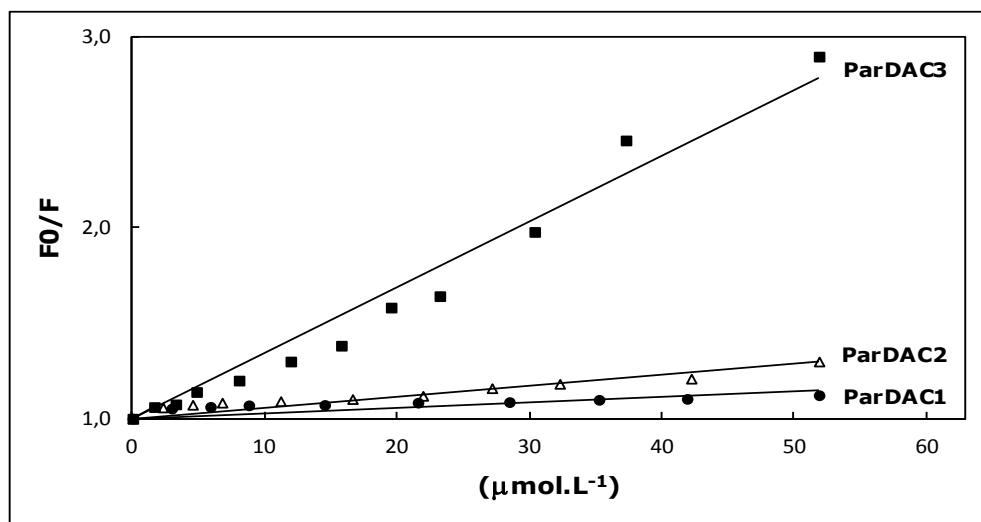
A variação da intensidade de fluorescência relativa de ParEAC2 e ParEAC3, no comprimento de onda de emissão de 350 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm) em função da concentração de cada um dos derivados de ParE, está representada nas Figuras 42 e 43.

Dados de supressão geralmente são apresentados como uma variação de F_0/F em função da concentração de um agente supressor, no caso um dos peptídeos derivados de ParD, de acordo com a Equação 1 (item 3.7) Uma linearidade, como observada nas Figuras 41 e 42, para cada um dos peptídeos derivados de ParD, é um indicativo da existência de uma única classe de fluoróforos, em ParEAC2 e ParEAC3, todos igualmente acessíveis aos supressores.

Por outro lado, uma linearidade na representação gráfica de Stern-Volmer pode ser resultante tanto de uma supressão dinâmica ou colisional como de uma supressão estática (formação de complexo). Como os dados de cromatografia de afinidade apontaram para interação entre os peptídeos, considerou-se, neste caso,

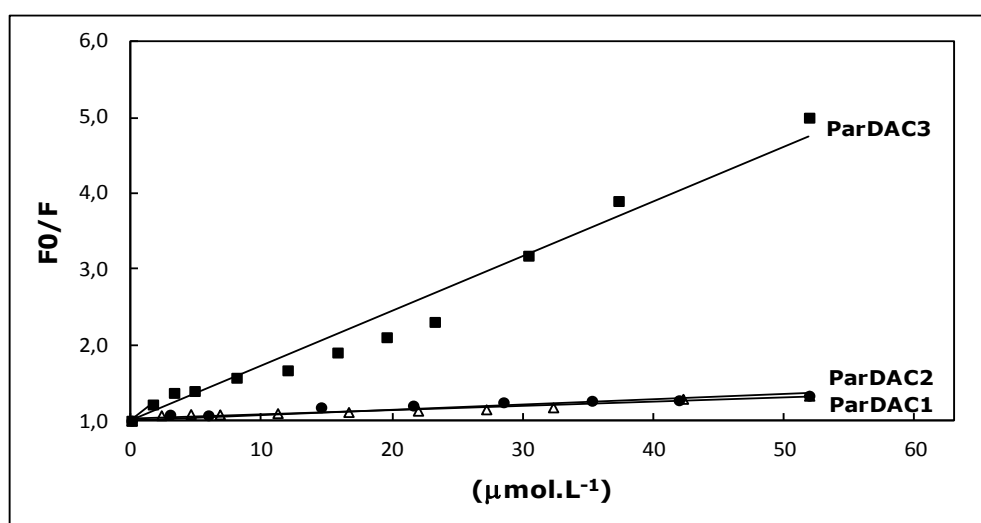
uma supressão estática e consequentemente K_{sv} , a constante de associação (K_a) dos complexos formados

Figura 42. Representação gráfica de Stern-Volmer: 25 nmol de ParEAC2 e (●) ParDAC1 (2,9–51,86 $\mu\text{mol. L}^{-1}$), (Δ) ParDAC2 (2,27–51,86 $\mu\text{mol. L}^{-1}$) ou (■) ParDAC3 (1,63–51,86 $\mu\text{mol. L}^{-1}$). A fluorescência foi medida a 25°C (excitação: 280 nm; emissão: 350 nm) após a adição das respectivas alíquotas de cada derivado de ParD.



Fonte: Elaborado pela Autora

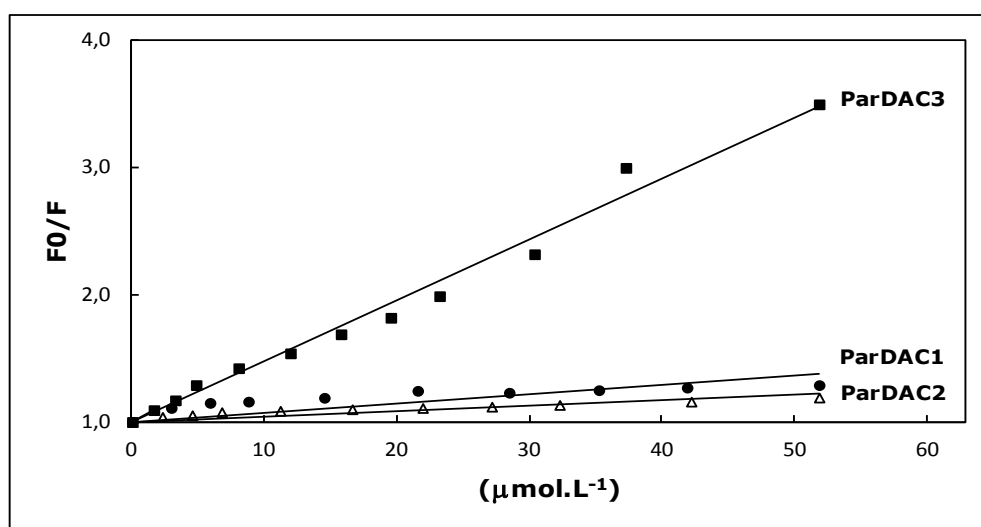
Figura 43. Representação gráfica de Stern-Volmer: 25 nmol de ParEAC3 e (●) ParDAC1 (2,9–51,86 $\mu\text{mol. L}^{-1}$), (Δ) ParDAC2 (2,27–51,86 $\mu\text{mol. L}^{-1}$) ou (■) ParDAC3 (1,63–51,86 $\mu\text{mol. L}^{-1}$). A fluorescência foi medida a 25°C (excitação: 280 nm; emissão: 350 nm) após a adição das respectivas alíquotas de cada derivado de ParD.



Fonte: Elaborado pela Autora.

Os ensaios de cromatografia de afinidade comparativo representados nas Figuras 41A, 41B e 41C, também levaram a concluir que o análogo acetilado de ParEAC3 apresenta interação com cada um dos peptídeos derivados de ParD. Desta forma, os estudos de fluorescência foram estendidos para este peptídeo e os resultados estão representados na Figura 44.

Figura 44. Representação gráfica de Stern-Volmer: 25 nmol de Acetil-ParEAC3 e (●) ParDAC1 (2,9–51,86 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), (Δ) ParDAC2 (2,27–51,86 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) ou (■) ParDAC3 (1,63–51,86 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). A fluorescência foi medida a 25°C (excitação: 280 nm; emissão: 350 nm) após a adição das respectivas alíquotas de cada derivado de ParD.



Fonte: Elaborado pela Autora.

Os valores das constantes de associação (K_a), representadas na Tabela 4 foram obtidos a partir do coeficiente angular das curvas de Stern-Volmer (Figuras 42, 43 e 44) para uma supressão considerada como estática (LAKOWICZ, 2006), de acordo com a Equação 1, descrita na Seção Material e Métodos.

De acordo com a Tabela 4, uma interação preferencial com ParDAC3 foi observada, independentemente do análogo de ParE (cerca de 10 vezes em relação a ParDAC1 e ParDAC2). Neste caso, o acréscimo de 19 resíduos de aminoácidos (comparado a ParDAC1) e de 12 resíduos (comparado a ParDAC2), à estrutura primária de ParDAC3, deve permitir uma melhor estruturação deste peptídeo em solução, disponibilizando pontos adicionais para o processo de interação, o que deve estar favorecendo a formação de um complexo mais estável com os análogos de ParE. Deste modo, se o modelo de reconhecimento com transição de fases for

verdadeiro para o sistema ParE-ParD, a estrutura do peptídeo ParDAC3 deve facilitar a organização da região C-terminal desordenada, em uma estrutura secundária definida após a ligação com os análogos de ParE, resultando em um produto com maior estabilidade, refletida pelo valor de K_a mais elevado, para o produto ParEAC3-ParDAC3.

Da mesma forma, a maior dimensão de ParEAC3, resulta em uma maior similaridade, em termos estruturais, com a proteína ParE, favorecendo uma maior interação com os derivados de ParD. O fato da extremidade N-terminal de ParEAC3 estar acetilada (em acetil-ParEAC3) e promover uma redução nos parâmetros de interação, corrobora com esta conclusão, uma vez que a toxina natural não possui esta extremidade acetilada.

Tabela 4 - Valores de constante de associação comparativo.^a

Peptídeos	K_a (10^3 mol.L^{-1})		
	ParEAC2	ParEAC3	Acetil-ParEAC3
ParDAC1	2,8	7,2	7,2
ParDAC2	5,7	7,0	4,2
ParDAC3	34,5	74,9	47,7

^a Ensaios de fluorescência foram executados como descrito em Materiais e Métodos. Misturas de reação contendo 25 nmol de cada um dos peptídeos derivados de ParE e quantidade variável de peptídeo ligante. A constante de associação (K_a) foi determinada pelo coeficiente angular da curva de Stern-Volmer (LAKOWICZ, 2006).

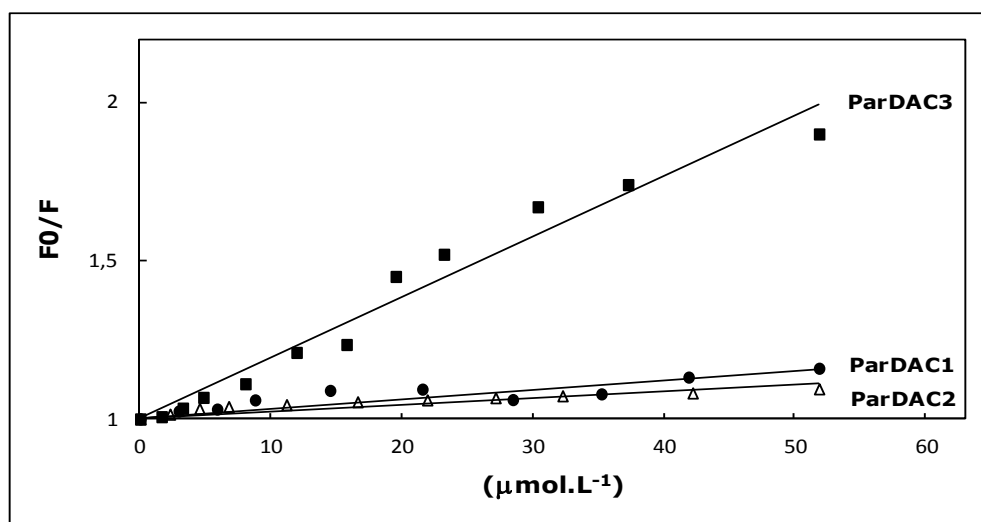
Fonte: Elaborado pela autora.

Apesar de existirem alguns estudos em relação ao sistema TA ParE-ParD, não existe até o momento, dados relativos à constante de associação entre estas proteínas. Em termos comparativos, o valor da constante de associação determinada para ParEAC3-ParDAC3 ($7,5 \times 10^4 \text{ mol.L}^{-1}$), é cerca de 5 vezes maior que o valor da constante de associação para o sistema CcdA41-CcdBET2, único valor disponível para um sistema TA (COTRIM et al, 2010).

De acordo com estes dados, ParDAC3, peptídeo derivado da parte C-terminal da antitoxina ParD, corresponde a uma provável estrutura mínima necessária para a manutenção da atividade antídoto atribuída a ParD. Nela, a parte C-terminal de ParDAC3 envolveria a toxina, estabilizada por interações polares, de van der Waals e pontes salinas. Assim, as cargas negativas (Asp39, Asp41, Asp43) da região ligante não estruturada e a α -hélice de ParDAC3 estariam expostas para interagirem com a superfície positiva de ParEAC3.

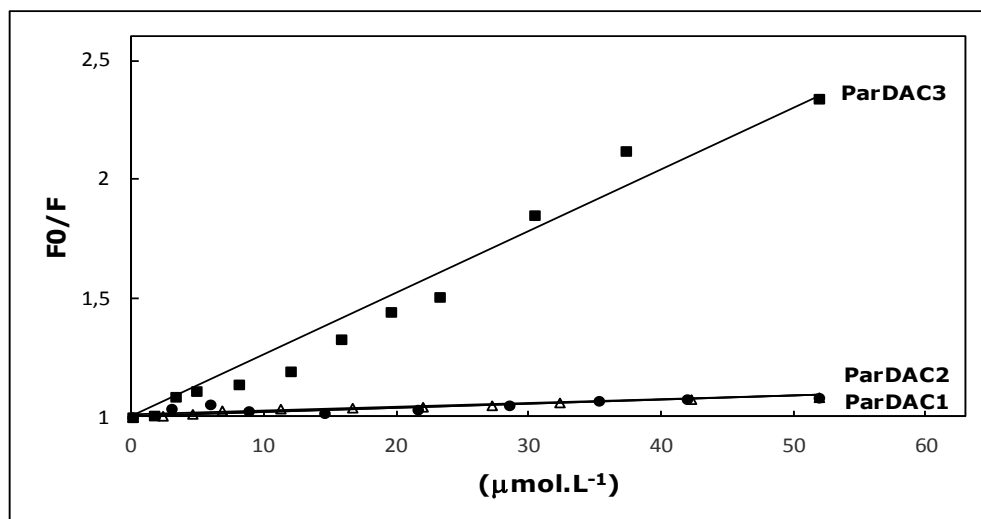
Em relação aos peptídeos ParEAC1 e ParEAC4, os resultados de cromatografia de afinidade indicaram a ausência de retenção em qualquer uma das colunas testadas, indicativo de que estes peptídeos não apresentam qualquer tipo de interação com os derivados peptídicos de ParD, imobilizados nas colunas. Mesmo assim, os ensaios de fluorescência no estado estacionário foram realizados, a exemplo dos peptídeos ParEAC2 e ParEAC3 e os resultados estão representados nas Figuras 45 e 46.

Figura 45. Representação gráfica de Stern-Volmer: 25 nmol de ParEAC1 e (●) ParDAC1 (2,9–51,86 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), (Δ) ParDAC2 (2,27–51,86 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) ou (■) ParDAC3 (1,63–51,86 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). A fluorescência foi medida a 25°C (excitação: 280 nm; emissão: 350 nm) após a adição das respectivas alíquotas de cada derivado de ParD.



Fonte: Elaborado pela Autora.

Figura 46. Representação gráfica de Stern-Volmer: 25 nmol de ParEAC4 e (●) ParDAC1 (2,9–51,86 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), (Δ) ParDAC2 (2,27–51,86 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) ou (■) ParDAC3 (1,63–51,86 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). A fluorescência foi medida a 25°C (excitação: 280 nm; emissão: 350 nm) após a adição das respectivas alíquotas de cada derivado de ParD.



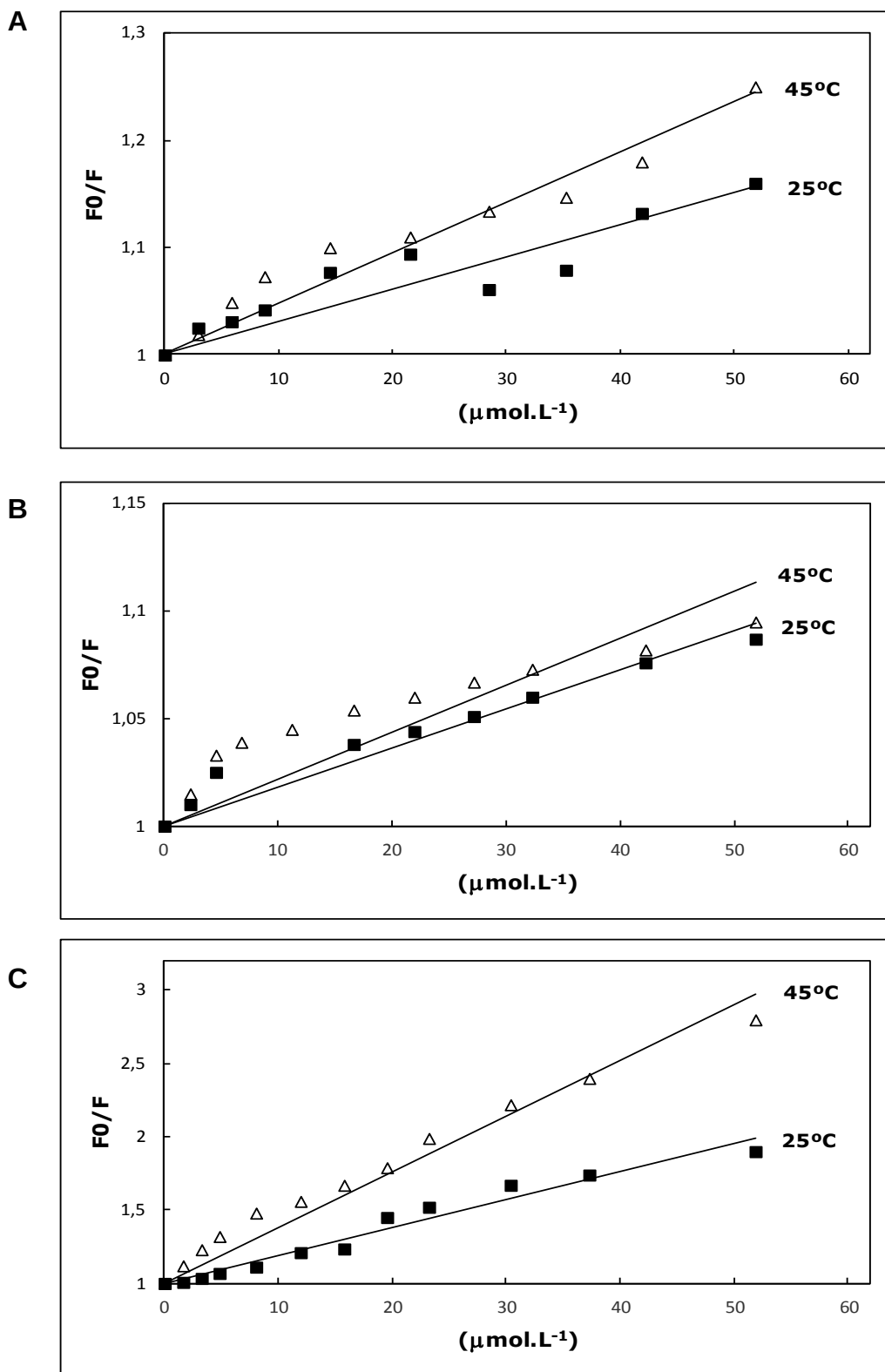
Fonte: Elaborado pela Autora.

A exemplo dos ensaios com ParEAC2 e ParEAC3, uma linearidade foi observada, para cada um dos peptídeos derivados de ParD, um indicativo da existência de uma única classe de fluoróforos, em ParEAC1 e ParEAC4, todos igualmente acessíveis aos supressores.

Como observado para ParEAC2 e ParEAC3, uma diminuição na intensidade da fluorescência de ParEAC1 e ParEAC4, em função da concentração de cada um dos peptídeos derivados de ParD, também ocorreu (Figuras 44 e 45). Estes resultados poderiam levar à conclusão de que estes dois peptídeos também podem formar produtos de interação com derivados da antitoxina, contrariando os resultados de cromatografia de afinidade.

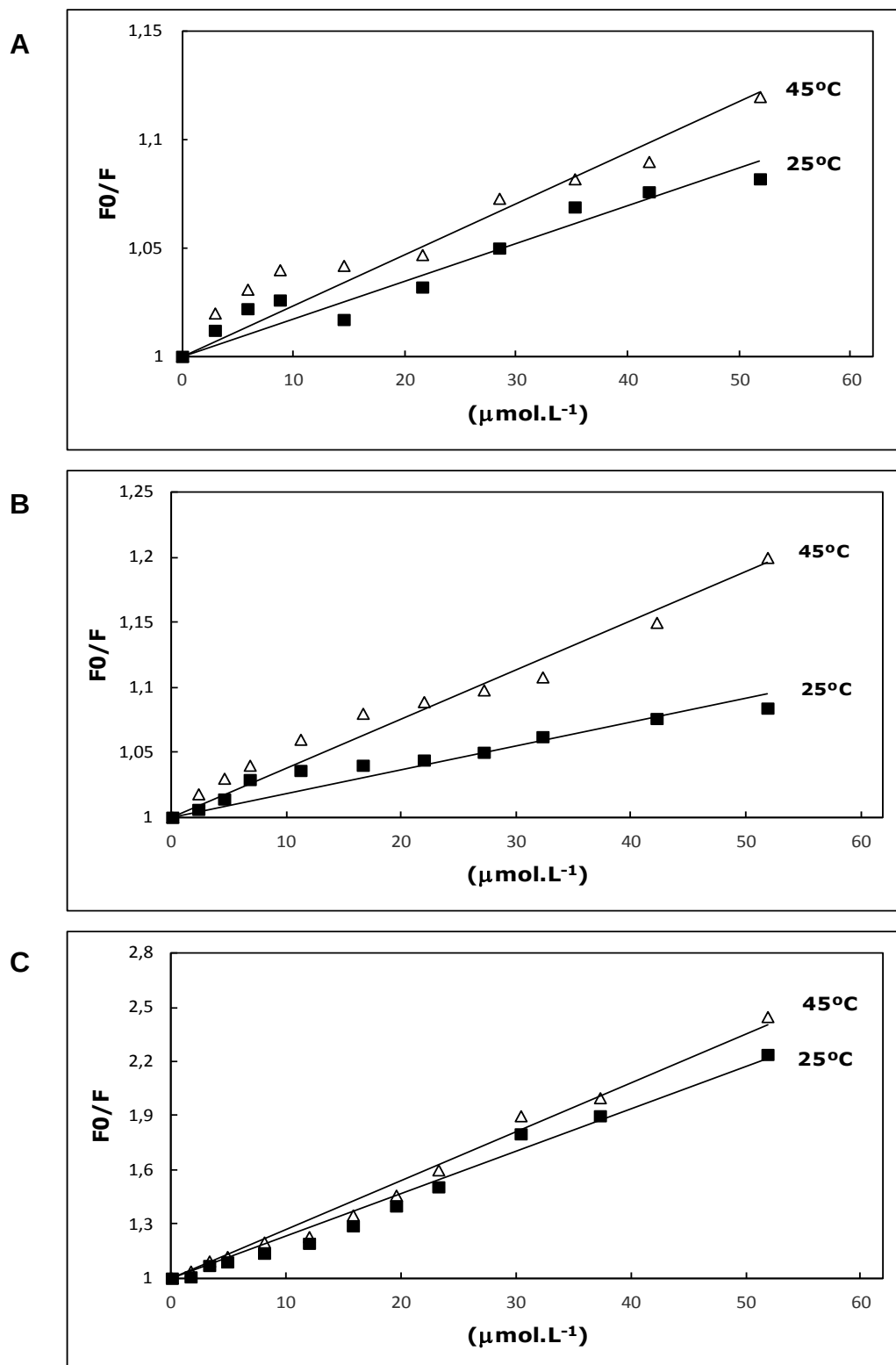
Desta forma, considerando que a linearidade na representação gráfica de Stern-Volmer, pode ser atribuída como resultante tanto de uma supressão dinâmica como de uma supressão estática (formação de complexo), e que estas podem ser diferenciadas através de uma avaliação comparativa da supressão, em diferentes temperaturas, decidiu-se por repetir os experimentos com ParEAC1 e ParEAC4 agora a 45°C, comparando-os com aqueles obtidos a 25°C (Figuras 47 e 48).

Figura 47. Efeito da temperatura na interação do ParEAC1 com (A) ParDAC1, (B) ParDAC2 e (C) ParDAC3. Cada um dos derivados de ParD (até um máximo de $51,86 \mu\text{mol.L}^{-1}$) foi adicionado a uma solução $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de ParEAC1 e a fluorescência medida após cada adição, com excitação a 280 nm e emissão a 350 nm, a (■) 25°C e (Δ) 45°C .



Fonte: Elaborado pela Autora.

Figura 48. Efeito da temperatura na interação do ParEAC4 com (A) ParDAC1, (B) ParDAC2 e (C) ParDAC3. Cada um dos derivados de ParD (até um máximo de $51,86 \mu\text{mol.L}^{-1}$) foi adicionado a uma solução $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de ParEAC4 e a fluorescência medida após cada adição, com excitação a 280 nm e emissão a 350 nm, a (■) 25°C e (Δ) 45°C .



Fonte: Elaborado pela Autora.

De acordo com as Figuras 47 e 48, a elevação da temperatura resultou em um aumento na constante de supressão, proporcionado pelo aumento da inclinação da curva de Stern-Volmer. O aumento na temperatura eleva os coeficientes de difusão e, conseqüentemente, aumento na constante de supressão bimolecular, assim como observado para ParEAC1 e ParEAC4. Neste caso, a supressão observada para estes dois peptídeos é do tipo dinâmico, resultante de encontros colisionais entre as espécies e não devido à formação de um complexo.

Por outro lado, para os peptídeos ParEAC2 e ParEAC3, uma diminuição na constante de supressão foi observada, com a elevação da temperatura, resultado da diminuição da estabilidade dos complexos formados, comportamento esperado para uma supressão do tipo estática (dados não mostrados).

Para os dois tipos de supressão, a dependência de F_0/F em relação a $[Q]$ (Equação 1) é idêntica, exceto que a constante de supressão (K_{sv}), para uma supressão estática, corresponde a constante de associação (K_a) do complexo formado.

4.4 Inibição da atividade da DNA Girase

Considerando a toxina ParE como um inibidor da replicação do DNA, algumas evidências indicam que a região C-terminal desta toxina é também a região de maior probabilidade de estar envolvida na interação com a DNA girase. A obtenção de proteínas ParE recombinantes truncadas na região C-terminal, tiveram sua atividade citotóxica muito reduzida ou extinta (FIEBIG et al., 2010). Além disso, a elucidação da primeira e única estrutura cristalográfica de ParE (DALTON e CROSSON, 2010), de *Caulobacter crescentus*, mostra que a antitoxina ParD bloqueia a região N-terminal da toxina ParE. Estes e outros fatos é que direcionaram a centrar o foco deste trabalho, na região N-terminal de ParE de *E. coli* como molde para o desenho e síntese de peptídeos derivados desta toxina.

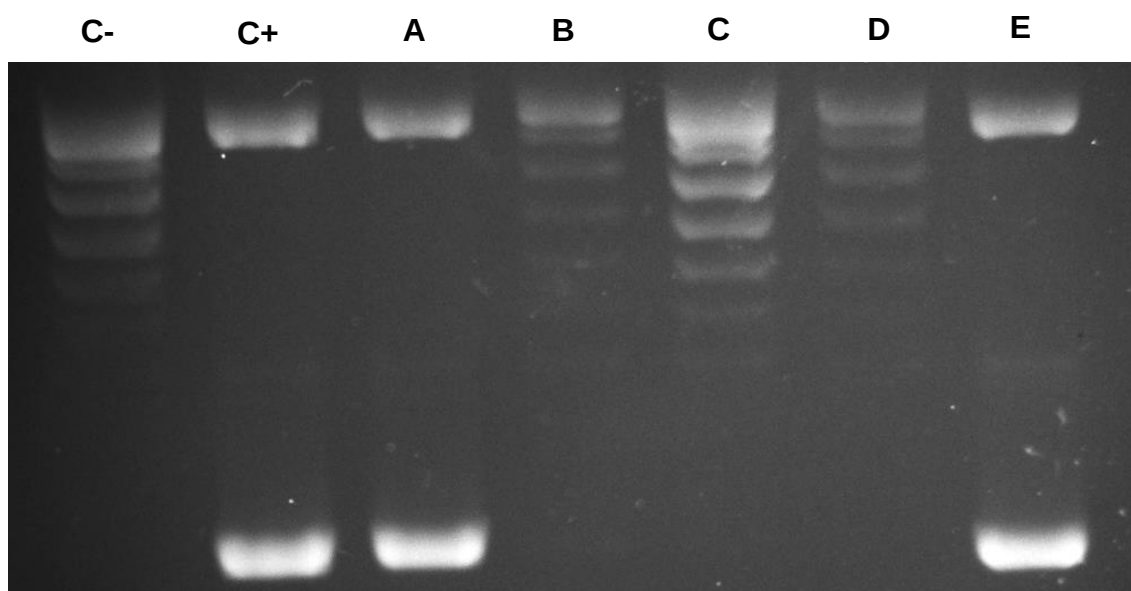
Os peptídeos sintetizados, apesar de terem uma estrutura baseada na extremidade N-terminal de ParE e teoricamente não apresentarem interação com a DNA girase, estes foram avaliados quanto a capacidade inibitória sobre a atividade desta enzima. A DNA girase introduz superenovelamento negativo em um DNA circular fechado gerando uma molécula mais compacta, que migra mais

rapidamente, em relação ao DNA relaxado fechado, quando submetida à eletroforese em gel de agarose.

Deste modo, a reação de superenovelamento da DNA girase foi realizada na presença de cada um dos peptídeos análogos de ParE e submetida à eletroforese em gel de agarose.

A triagem inicial dos peptídeos de interesse pode ser visualizada na Figura 49 onde é possível observar que a ação da DNA girase foi completamente inibida pela presença dos análogos ParEAC2, ParEAC3 e acetil-ParEAC3 (linhas B, C e D, respectivamente) em uma concentração de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, não sendo possível visualizar a banda do plasmídeo superenovelado ao final do experimento, evidenciando, assim, a capacidade de interação destes fragmentos com a enzima.

Figura 49. Triagem inicial dos peptídeos análogos da toxina ParE de *E. coli* sobre a inibição da atividade da DNA girase. A DNA girase (1U) foi incubada com $0,5 \mu\text{g}$ de plasmídeo pBR322 relaxado e $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de cada um dos peptídeos a 37°C por 2h: (A) ParEAC1. (B) ParEAC2. (C) ParEAC3; (D) Acetil-ParEAC3; (E) ParEAC4. Posteriormente, a mistura foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1%. (C-) controle negativo (plasmídeo pBR322 relaxado); (C+): controle positivo (ausência de peptídeo).



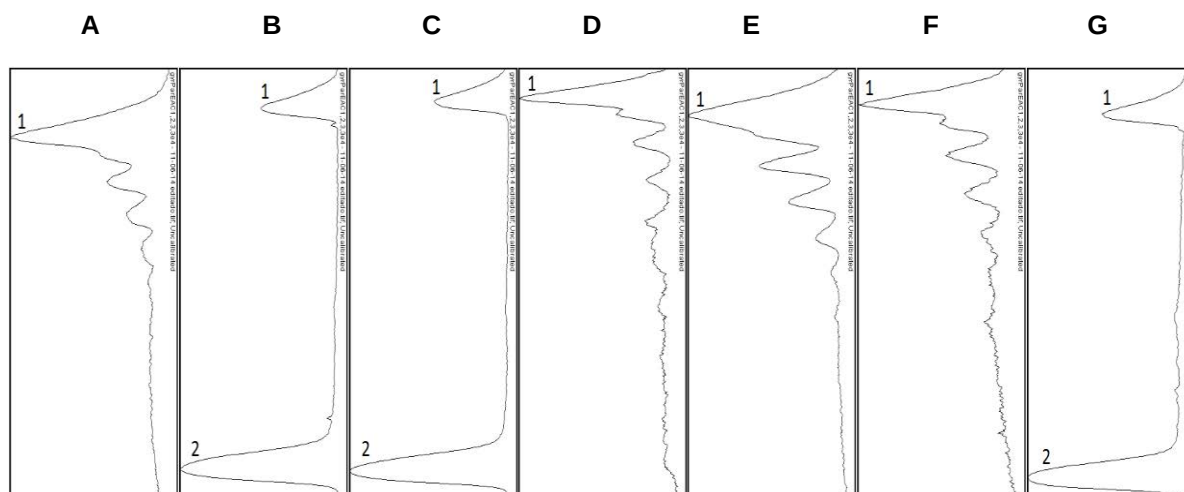
Fonte: Elaborado pela autora.

Foi realizada também uma densitometria do gel utilizando o software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>) com a finalidade de visualizar de maneira mais satisfatória a atividade da DNA girase nos ensaios de eletroforese em gel de agarose.

O ImageJ é um programa de código aberto, disponível na Internet, e é capaz de realizar a densitometria das bandas obtidas, contando cada microponto de tonalidade escura na foto. Sendo assim, o programa traça uma relação entre a densidade óptica da banda da sequência-alvo e a densidade óptica da banda controle. O Programa gera uma curva, cujos picos representam as regiões de maior densidade óptica e, portanto as regiões que apresentam bandas.

Na Figura 50 podem ser observados os gráficos gerados a partir da densitometria óptica do gel correspondente (Figura 49) através do ensaio de inibição da DNA girase na presença dos peptídeos na triagem inicial.

Figura 50. Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de inibição da DNA girase pelos peptídeos análogos de ParE na triagem inicial. (A) controle negativo (plasmídeo pBr322 relaxado); (B) controle positivo (plasmídeo pBR322 relaxado e DNA girase [1U] na ausência do inibidor); C até G: pBr322 relaxado + DNA girase 1 (U) na presença dos peptídeos ParEAC1, ParEAC2, ParEAC, e acetil-ParEAC3 e ParEAC4, respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os dados apresentados na análise de densidade óptica mostram os picos referentes às diferentes bandas apresentadas no gel de agarose. Na Figura 50A pode-se observar a presença do pico da banda do DNA relaxado (1) e os picos

referentes aos demais topoisômeros. Na Figura 50B, observa-se a diminuição do pico da banda relaxada (1) e o aparecimento do pico da banda superenovelada (2), resultante da ação da DNA girase (controle positivo). Nas Figuras 50C e 50G, observa-se a diminuição do pico da banda relaxada e o aparecimento do pico da banda superenovelada resultante da ação da DNA girase, a exemplo do controle positivo, comprovando, portanto, que os peptídeos ParEAC1 e ParEAC4 respectivamente, não foram capazes de inibir a ação da DNA girase.

Nas Figuras 50D, E e F, é possível observar a presença do pico da banda de DNA relaxado (1) e o demais picos referentes aos topoisômeros, sendo que nestes casos, ocorre ausência do pico da banda superenovelada, confirmando assim, a ação inibitória completa dos peptídeos ParEAC2, ParEAC3 e acetil-ParEAC3 respectivamente, sobre a ação da DNA girase.

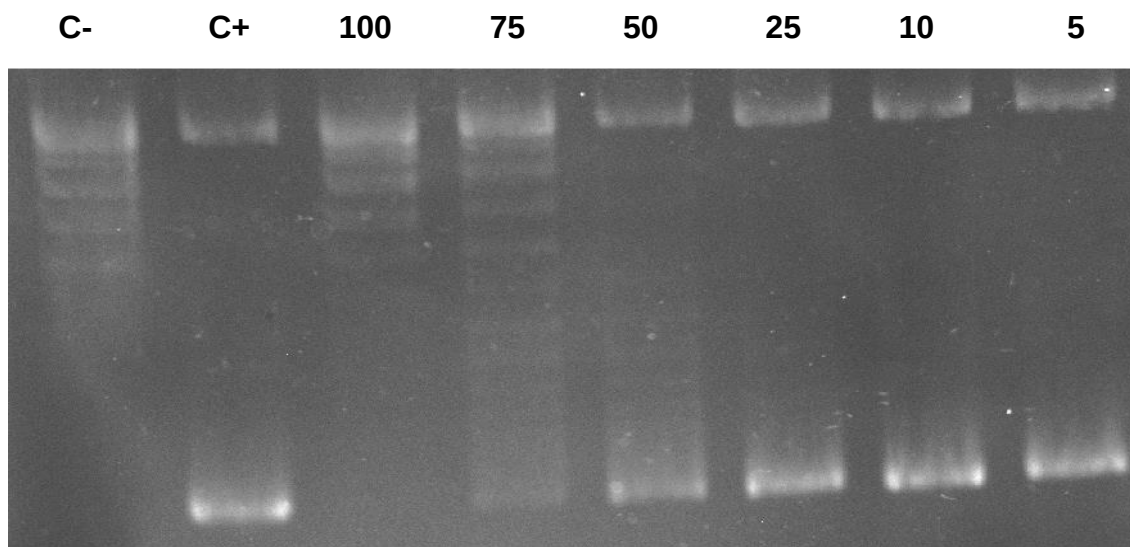
Interessante, é que a inibição observada para estes três peptídeos, estruturalmente desenhados a partir da extremidade N-terminal de ParE é contrária ao fato de que a toxicidade de ParE é dependente dos últimos 17 ou 10 resíduos de aminoácidos, os quais são importantes para as interações com o seu alvo celular. A estrutura cristalina do complexo ParE-ParD de *C. crescentus*, revela uma estruturação significativa nos 17 resíduos C-terminais (DALTON & CROSSON, 2010), sendo provável que a retirada destes resíduos desestabiliza a proteína, fato não observado em nossos experimentos.

A falta de atividade inibitória de ParEAC1 e ParEAC4, peptídeos complementares a ParEAC2, evidenciam a dependência estrutural, não somente em relação ao processo de interação com ParD, mas também na atividade inibitória sobre a DNA girase.

Diante destes resultados, os peptídeos que demonstraram atividade inibitória sobre a DNA girase foram selecionados para o ensaio de concentração mínima inibitória (MIC). Para determinar a concentração mínima inibitória, a concentração do peptídeo inibidor foi variada em concentrações de entre 100 e 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

De acordo com os ensaios pode-se observar que o peptídeo ParEAC2 (Figura 51) não foi muito mais além de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, ou seja IC_{100} para este peptídeo foi de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Entretanto, na concentração de 75 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pode ser observado uma leve presença da banda superenovelada, evidenciando que nesta concentração ainda ocorre inibição da enzima em torno 87% (determinado pelo software Image J).

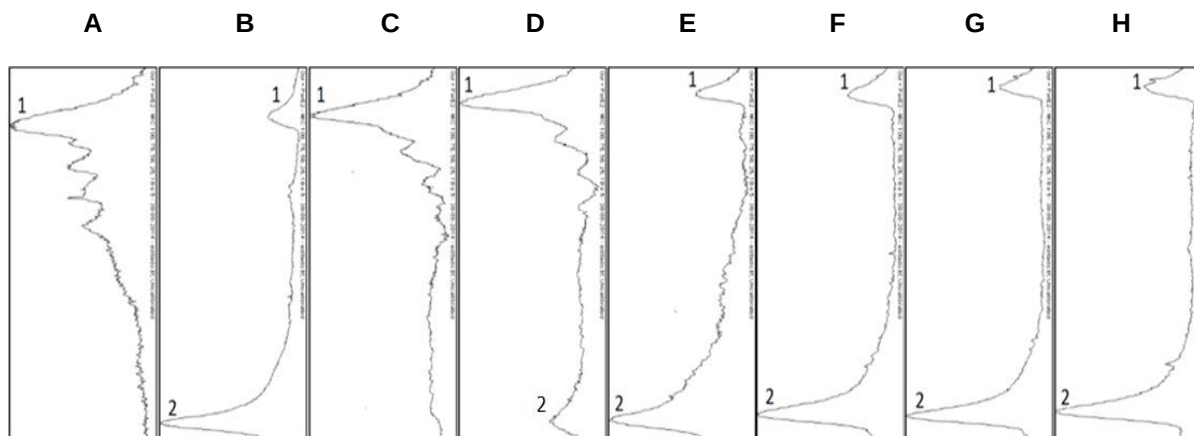
Figura 51. Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) do peptídeo ParEAC2 sobre a atividade da DNA girase. A DNA girase (1U) foi incubada com 0,5 µg de plasmídeo pBR322 relaxado e concentrações decrescentes do peptídeo a 37 °C por 1 hora. Posteriormente, a mistura foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1%. (C-) controle negativo: plasmídeo pBR322 relaxado; (C+): controle positivo: plasmídeo pBR322 relaxado e enzima DNA girase (1U) na ausência do inibidor. A concentração do peptídeo é representada em cada aplicação no gel em µmol.L⁻¹.



Fonte: Elaborado pela autora.

De acordo com os dados da densitometria óptica representada na Figura 52, pode-se observar que no controle negativo, presença do pico da banda do DNA relaxado (1) e os picos referentes aos demais topoisômeros e no controle positivo, a diminuição do pico da banda relaxada (1) e o aparecimento do pico da banda superenovelada (2), constatando a ação da DNA girase. A Figura 62C demonstra o pico da banda relaxada e ausência do pico da banda superenovelada, comprovando a eficácia do peptídeo na inibição da DNA girase a 100 µmol.L⁻¹. Na Figura 62D, a banda do pico relaxado está presente e também é possível observar o pico do DNA superenovelado, porém, ainda em menor intensidade, comprovando assim que nesta concentração (75 µmol.L⁻¹) o peptídeo inibe apenas parcialmente a atividade da DNA girase (87%). Já nas Figuras 52E, F, G e H, observa-se um perfil semelhante ao controle positivo, que nestas concentrações o peptídeo não possui atividade inibitória sobre a DNA girase.

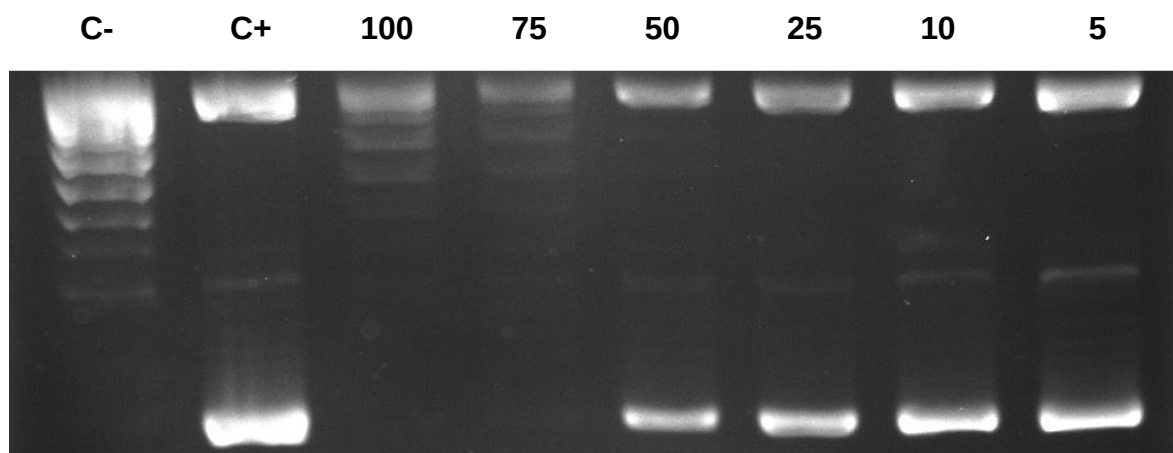
Figura 52. Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de MIC do peptídeo ParEAC2 sobre a ação da DNA girase. (A) controle negativo (plasmídeo pBr322 relaxado); (B) controle positivo (plasmídeo pBR322 relaxado e DNA girase [1U] na ausência do inibidor); C até H: pBr322 relaxado + DNA girase 1 (U) na presença de ParEAC2 a 100, 75, 50, 25, 10 e 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora.

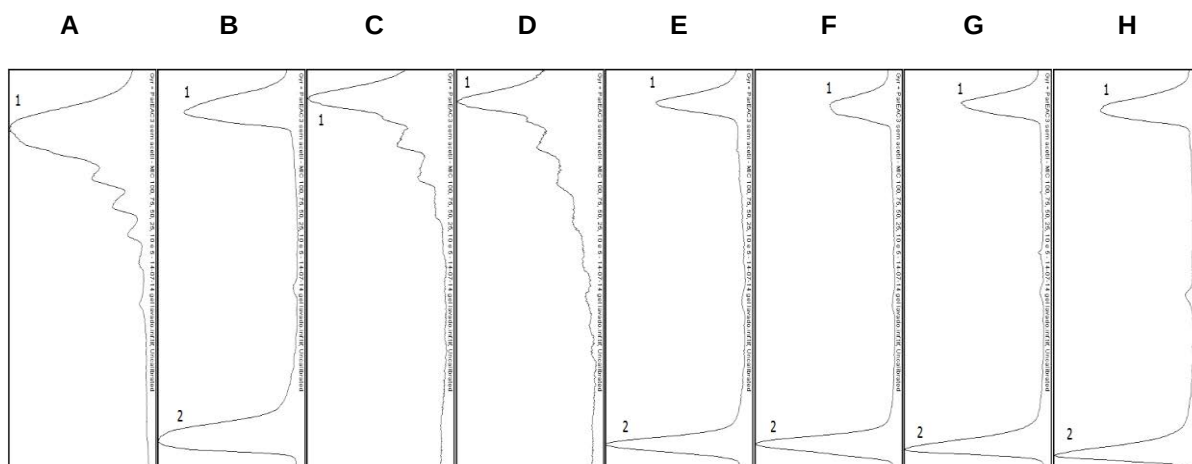
O ensaio de MIC foi realizado também com os análogos ParEAC3 e acetil-ParEAC3, ambos com ação inibitória frente a DNA girase em concentrações inferiores a 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ($\text{IC}_{100} = 75 \mu\text{mol.L}^{-1}$) como mostrado nas Figuras 53 a 56.

Figura 53. Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) do peptídeo ParEAC3 sobre a atividade da DNA girase. A DNA girase (1U) foi incubada com 0,5 μg de plasmídeo pBR322 relaxado e concentrações decrescentes do peptídeo a 37 °C por 1 hora. Posteriormente, a mistura foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1%. (C-) controle negativo: plasmídeo pBR322 relaxado; (C+): controle positivo: plasmídeo pBR322 relaxado e enzima DNA girase (1U) na ausência do inibidor. A concentração do peptídeo é representada em cada aplicação no gel em $\mu\text{mol.L}^{-1}$.



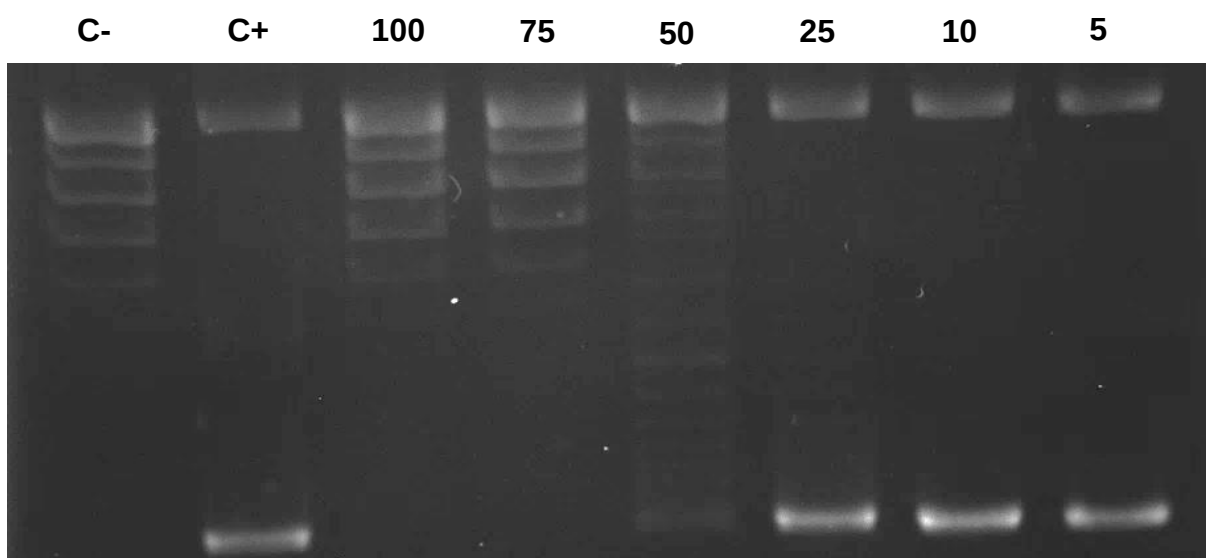
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 54. Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de MIC do peptídeo ParEAC3 sobre a ação da DNA girase. (A) controle negativo (plasmídeo pBr322 relaxado); (B) controle positivo (plasmídeo pBr322 relaxado e DNA girase [1U] na ausência do inibidor); C até H: pBr322 relaxado + DNA girase 1 (U) na presença de ParEAC3 a 100, 75, 50, 25, 10 e 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente.



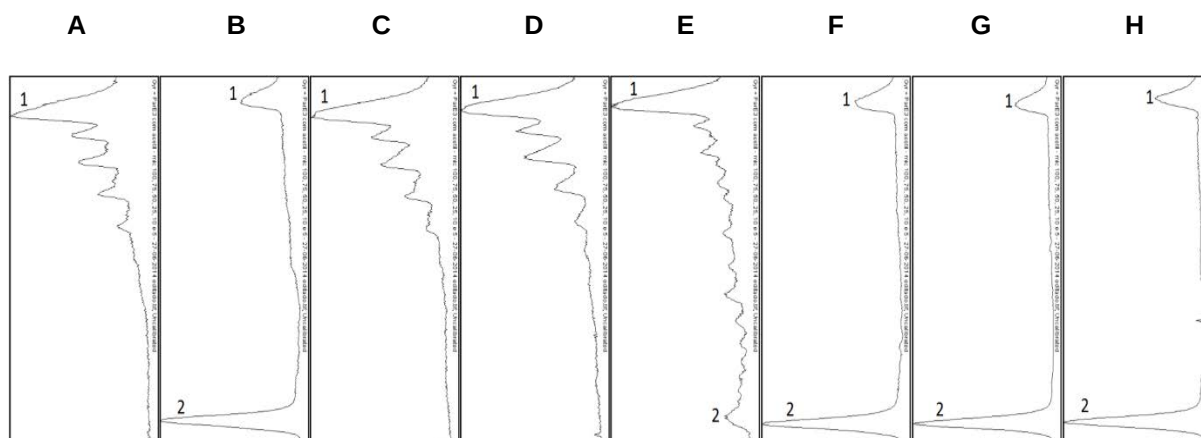
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 55. Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) do peptídeo acetil-ParEAC3 sobre a atividade da DNA girase. A DNA girase (1U) foi incubada com 0,5 μg de plasmídeo pBR322 relaxado e concentrações decrescentes do peptídeo a 37 °C por 1 hora. Posteriormente, a mistura foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1%. (C-) controle negativo: plasmídeo pBR322 relaxado; (C+): controle positivo: plasmídeo pBR322 relaxado e enzima DNA girase (1U) na ausência do inibidor. A concentração do peptídeo é representada em cada aplicação no gel em $\mu\text{mol.L}^{-1}$.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 56. Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de MIC do peptídeo acetil-ParEAC3 sobre a ação da DNA girase. (A) controle negativo (plasmídeo pBr322 relaxado); (B) controle positivo (plasmídeo pBR322 relaxado e DNA girase [1U] na ausência do inibidor); C até H: pBr322 relaxado + DNA girase 1 (U) na presença de acetil-ParEAC3 a 100, 75, 50, 25, 10 e 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora.

A similaridade entre os valores de IC_{100} entre os peptídeos ParEAC3 e acetil-ParEAC3, mostra que a extremidade N-terminal de ParE exerce pouca ou nenhuma influência na interação com a enzima e consequentemente na sua atividade inibitória. A carga positiva do resíduo N-terminal do peptídeo ParEAC3, aparentemente não favorece nenhum tipo de interação iônica entre as espécies envolvidas. Por outro lado, a acetilação deste resíduo, reduziu a interação com os derivados de ParD, o que fortalece a proposta de que a região N-terminal está mais envolvida com a interação com a antitoxina do que com a enzima.

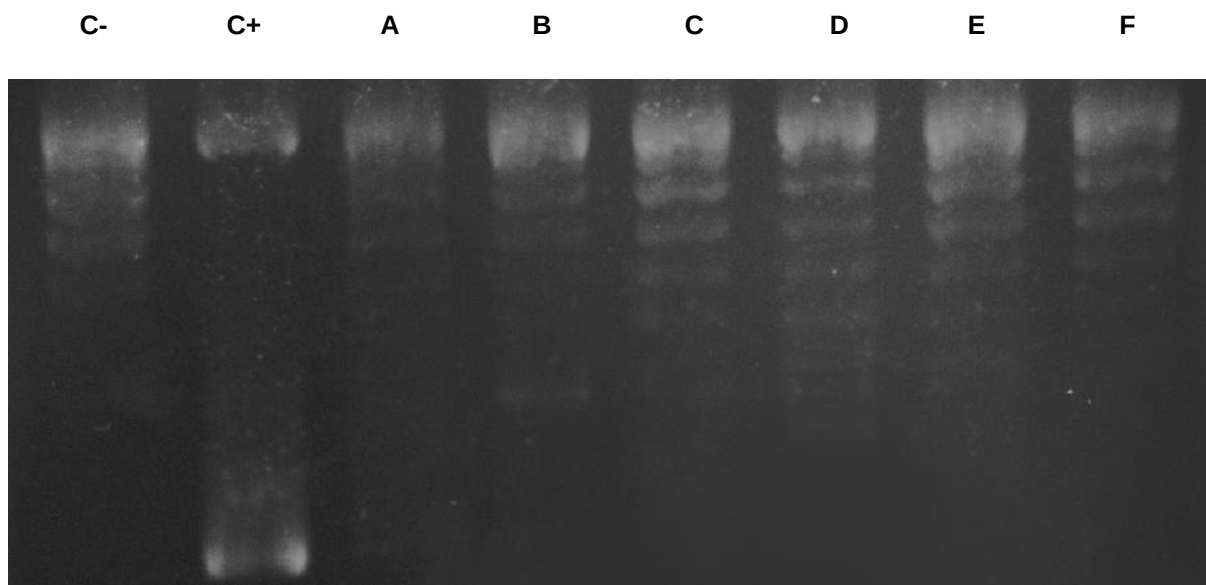
Apesar da inibição observada para os peptídeos ParEAC3 e seu análogo acetilado, esta não resultou em um IC_{100} inferior a 75 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, um valor relativamente elevado, quando comparado a diversos peptídeos derivados da extremidade C-terminal de ParE, que alcançaram valores de IC_{100} inferiores a 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (BARBOSA et al., 2012).

Neste caso, a inibição observada pode estar ocorrendo por um mecanismo secundário, que envolve a interação parcial de ParE, especificamente da sua região N-terminal com alguma região da enzima, que não aquela especialmente relacionada com o processo de formação do complexo ParE-Girase.

Para avaliar este efeito e o papel dos análogos de ParD na inibição da atividade inibitória dos análogos de ParE, foi realizado um ensaio de inibição da DNA girase, a exemplo dos anteriores, agora na presença de ParDAC3. Para isso, a metodologia empregada foi a mesma, porém antes da adição da enzima, o derivado da antitoxina foi colocado para incubar com um dos peptídeos ParEAC3 ou acetil-ParEAC3, por duas horas.

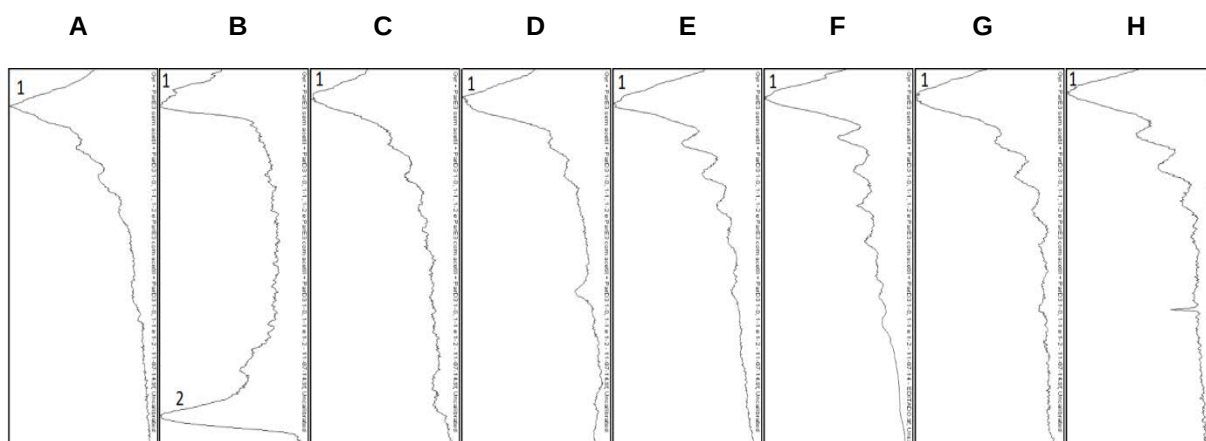
De acordo com este ensaio que pode ser visualizado na Figura 57, não houve qualquer tipo de inibição de ParDAC3 sobre os análogos da toxina ParE. Bandas relativas ao plasmídeo superenovelado não foram detectadas (Figura 58), resultado da ação inibitória dos análogos de ParE sobre a atividade da DNA girase.

Figura 57. Ensaio de inibição do peptídeo ParDAC3 (antitoxina) sobre ação dos peptídeos da toxina ParE. A antitoxina interagiu por 2 horas com a toxina, posteriormente foi adicionada a DNA girase (1U) e incubada com 0,5 µg de plasmídeo pBR322 relaxado por 1 hora. Após, a mistura foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1%. (C-) Controle negativo: plasmídeo pBR322 relaxado; (C+) Controle positivo: plasmídeo pBR322 relaxado e enzima DNA girase (1U) na ausência de inibidor. (A) pBr322 relaxado + DNA girase 1 (U) + ParEAC3 (100 µmol.L⁻¹); (B) pBr322 relaxado + DNA girase 1 (U) + ParEAC3 (100 µmol.L⁻¹) + ParDAC3 na proporção 1:1; (C) pBr322 relaxado + DNA girase 1 (U) + ParEAC3 (100 µmol.L⁻¹) + ParDAC3 na proporção 1:2; (D) pBr322 relaxado + DNA girase 1 (U) + acetil-ParEAC3 (100 µmol.L⁻¹); (E) pBr322 relaxado + DNA girase 1 (U) + ParEAC3 (100 µmol.L⁻¹) + aceti-ParDAC3 na proporção 1:1; (F) pBr322 relaxado + DNA girase 1 (U) + ParEAC3 (100 µmol.L⁻¹) + aceti-ParDAC3 na proporção 1:2.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 58. Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de inibição do peptídeo ParDAC3 sobre ação dos peptídeos ParEAC3 e acetil-ParEAC3. (A) controle negativo (plasmídeo pBr322 relaxado); (B) controle positivo (plasmídeo pBR322 relaxado e DNA girase [1U] na ausência do inibidor); (C) pBr322 relaxado + DNA girase 1 (U) + ParEAC3 ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$); (D) e (E) pBr322 relaxado + DNA girase 1 (U) + ParEAC3 ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) + ParDAC3 na proporção 1:1 e 1:2, respectivamente; (F) pBr322 relaxado + DNA girase 1 (U) + acetil-ParEAC3 ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$); (G) e (H) pBr322 relaxado + DNA girase 1 (U) + ParEAC3 ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) + acetil-ParDAC3 na proporção 1:1 e 1:2, respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nestes ensaios, observa-se que ParDAC3 não exerce qualquer efeito na atividade inibitória de ParEAC3 e acetil-ParEAC3, embora ensaios de cromatografia de afinidade e de fluorescência no estado estacionário, tenham direcionado à conclusão da existência de interação entre estes peptídeos. Muito provavelmente, os análogos de ParE, deficientes de uma estruturação mais adequada, pela ausência da extremidade C-terminal, tenha uma interação secundária, diferente daquela da proteína nativa, e que seja preferencial à DNA girase, inibindo-a, mesmo que em concentrações elevadas e não sendo susceptível ao efeito de ParDAC3.

Este resultado, em hipótese alguma significa que o peptídeo ParDAC3 não seja uma estrutura mínima necessária para a manutenção da atividade antídoto de ParD. Apenas indica que estudos com a proteína nativa se fazem necessários para uma avaliação concreta do seu real efeito, considerando a disponibilidade estrutural completa da toxina em solução.

4.5 Estudos estruturais por Dicroísmo Circular

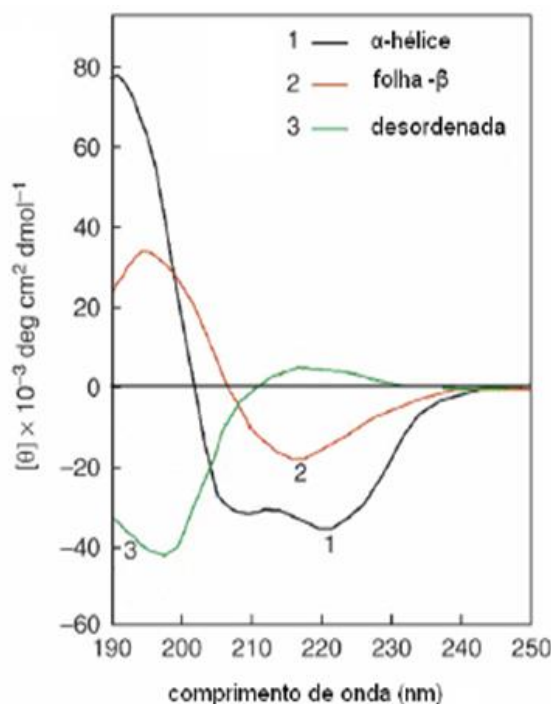
As proteínas e peptídeos, de um modo geral, apresentam regiões com arranjos helicoidais intercaladas com regiões menos estruturadas na constituição de sua estrutura secundária. Para uma molécula apresentar bandas de CD, deve apresentar quiralidade local ou global (Mulkerrin, 1996). Dessa forma, as medidas de CD são realizadas, passando-se através da amostra, de maneira alternativa, luz circularmente polarizada para a direita (A_D) e para a esquerda (A_E), determinando-se desta maneira, a diferença de absorbâncias ($\Delta A = A_E - A_D$). Por esta razão, as bandas podem apresentar sinais positivos ou negativos.

Os resultados de CD são apresentados, normalmente, na forma de elipicidade molar por resíduo ($\text{mdeg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}.\text{resíduo}^{-1}$), valores obtidos a partir da relação entre a elipicidade molar ($[\theta] = 3300 \Delta\epsilon$) e o número de resíduos de aminoácidos de uma cadeia polipeptídica.

Um espectro típico de CD de uma estrutura desordenada ou aperiódica apresenta uma banda negativa intensa por volta de 200 nm e outra de menor intensidade em 220 nm. O espectro típico de uma α -hélice apresenta 3 bandas características correspondentes às transições $n-\pi^*$ (banda negativa a 220-222 nm), $\pi-\pi^*$ paralela (banda negativa a 207 - 209 nm) e $\pi-\pi^*$ perpendicular (banda positiva a 195 - 200 nm). As 3 transições características de um giro β são $n-\pi^*$ (banda negativa a 225 - 230 nm) e $\pi-\pi^*$ (banda negativa a 205 - 210 nm e banda negativa a 180 - 190 nm). A Figura 59 representa espectros de CD para as possíveis estruturas secundárias de proteínas e foi utilizado como referência para a análise dos espectros deste trabalho.

As análises de CD foram as únicas informações estruturais obtidas dos peptídeos derivados de ParD, realizadas principalmente para correlacionar com os dados de modelagem molecular. As análises foram realizadas em meio aquoso, empregando uma concentração de $80 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de cada peptídeo em um volume final de 300 μL . Uma vez que um determinado fragmento de uma proteína, de forma isolada, pode deixar de apresentar toda uma série de interações com o restante da molécula, analisou-se a capacidade de estruturação dos peptídeos também na presença de do agente estruturante trifluoroetanol (TFE).

Figura 59. Espectro de CD de estruturas secundárias de proteínas.



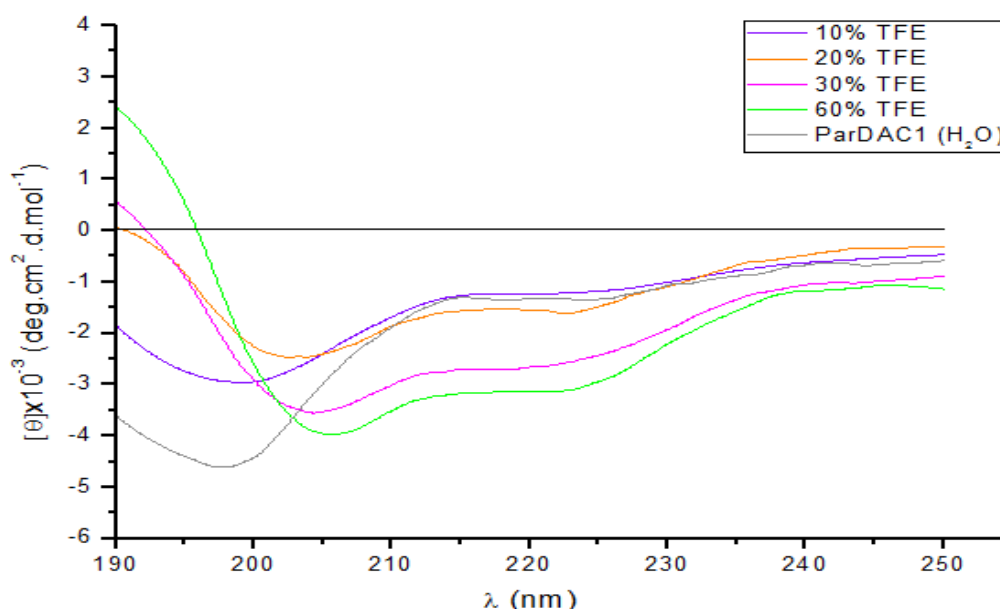
Fonte: WHITMORE & WALLACE (2007).

O espectro do peptídeo ParDAC1 está representado na Figura 60, e pode ser observado que em solução aquosa e solução com 10% de TFE (Trifluoroetanol) o espectro apresenta uma banda negativa em ~198nm, típico de uma estrutura desordenada, entretanto, aumentando a concentração de TFE para 20, 30 e 60% o peptídeo apresenta uma sutil tendência de formação de α-hélice (bandas positivas em ~190nm e bandas negativas em ~206nm e ~222nm).

O trifluoroetanol é um solvente eficiente utilizado no estudo de peptídeos e fragmentos proteicos, desde que foi descoberto para promover a formação de hélice, podendo, assim, ser aplicado para avaliar o potencial de formação da estrutura. Contudo, a origem do efeito do TFE tem sido um assunto de debate considerável. Estudos envolvendo peptídeos sintéticos indicam que o TFE aumenta a desidratação de resíduos específicos no interior de uma hélice, promovendo assim, a estabilidade da hélice (KELLY, et al., 2005).

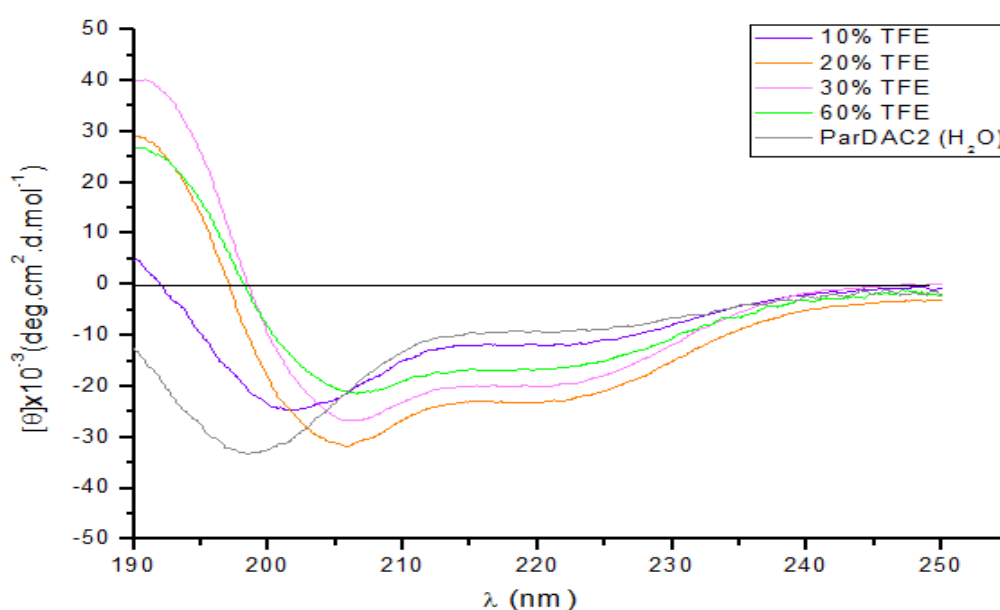
Para ParDAC2, o mesmo comportamento é observado. Em solução aquosa a estrutura é desordenada (*random coil*), apresentando uma banda negativa em ~198nm, deslocando-se sutilmente para uma estrutura em α-hélice (Figura 61).

Figura 60. Espectro de dicroísmo circular do peptídeo ParDAC1 obtido em solução aquosa e diferentes concentrações de TFE, utilizando-se uma cubeta retangular de quartzo, com caminho óptico de 1mm e concentração de peptídeo a $80 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Os espectros foram coletados na faixa de 190-250nm, com o tempo de integração de 1s, velocidade de aquisição 50nm/min e realizado em 4 aquisições.



Fonte: elaborado pela autora.

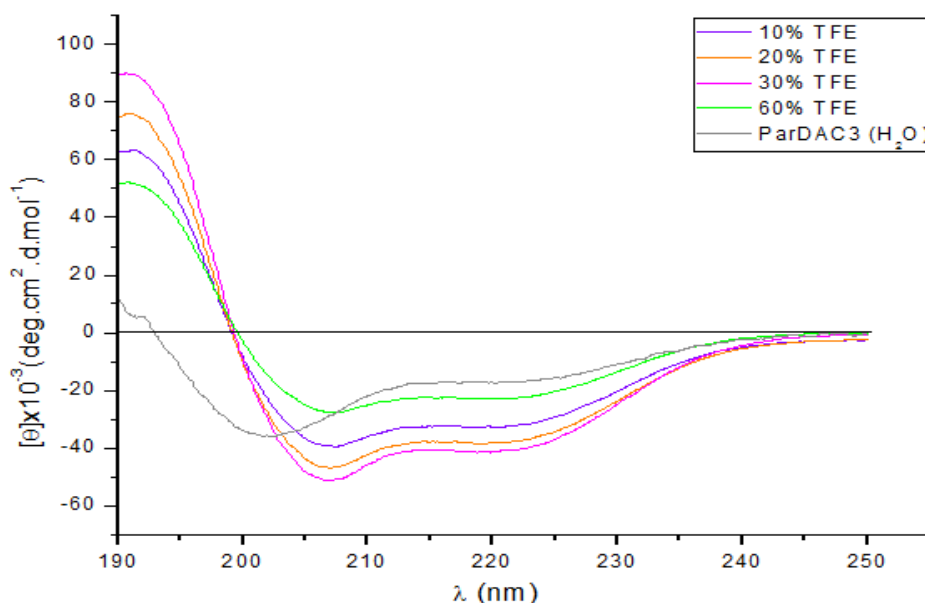
Figura 61. Espectro de dicroísmo circular do peptídeo ParDAC2 obtido em solução aquosa e diferentes concentrações de TFE, utilizando-se uma cubeta retangular de quartzo, com caminho óptico de 1mm e concentração de peptídeo a $80 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Os espectros foram coletados na faixa de 190-250nm, com o tempo de integração de 1s, velocidade de aquisição 50nm/min e realizado em 4 aquisições.



Fonte: elaborado pela autora.

Já o peptídeo ParDAC3 (Figura 62) apresentou uma banda levemente positiva em ~190nm e uma banda negativa em ~204nm, já demonstrando em solução aquosa uma estruturação em α -hélice. Esta estrutura torna-se ainda mais evidente com a adição do TFE. De fato, a estrutura primária de ParDAC3 contempla a denominada hélice C, formada pela sequência (D³⁹-ADADQAWQEL-K⁵⁰) da antitoxina ParD.

Figura 62. Espectro de dicroísmo circular do peptídeo ParDAC3 obtido em solução aquosa e diferentes concentrações de TFE, utilizando-se uma cubeta retangular de quartzo, com caminho óptico de 1mm e concentração de peptídeo a 80 μ mol⁻¹. Os espectros foram coletados na faixa de 190-250nm, com o tempo de integração de 1s, velocidade de aquisição 50nm/min e realizado em 4 aquisições.



Fonte: elaborado pela autora.

Estes resultados estão de acordo com aqueles previamente descritos para a estrutura de ParD (OBERER, et al., 2007), que é formada em sua porção C-terminal, por uma estrutura desordenada (T51 a A83) e uma α -hélice (D39 a K50). Estes autores, consideram esta região, como de grande probabilidade de interação com a antitoxina ParE. Esta região tem um superávit de cargas negativas (10 Glu e Asp, em comparação com 5 resíduos de Arg e Lys). Estas cargas estão acumuladas nos aminoácidos da α -hélice (D39-ADAD-Q44) e na sequência E72-ILDEELSG-D81,

próximos do resíduo de aminoácido C-terminal. São estas cargas, as responsáveis pela interação com ParE, uma toxina carregada positivamente.

Tendo em vista que ParDAC3 é o único derivado de ParD, que contém esta hélice, e consequentemente todos os resíduos de aminoácidos com carga negativa, não surpreende os resultados de fluorescência, que indicaram este peptídeo com as maiores constantes de associação.

A importância deste estudo reside exatamente no fato de que a proteína ParD natural contém uma α -hélice formada pela região que envolve os resíduos Asp-39 – Lys-50 da região C-terminal. Esta região está presente na estrutura de ParDAC3 e é importante por estar envolvida no processo de interação com a toxina ParE.

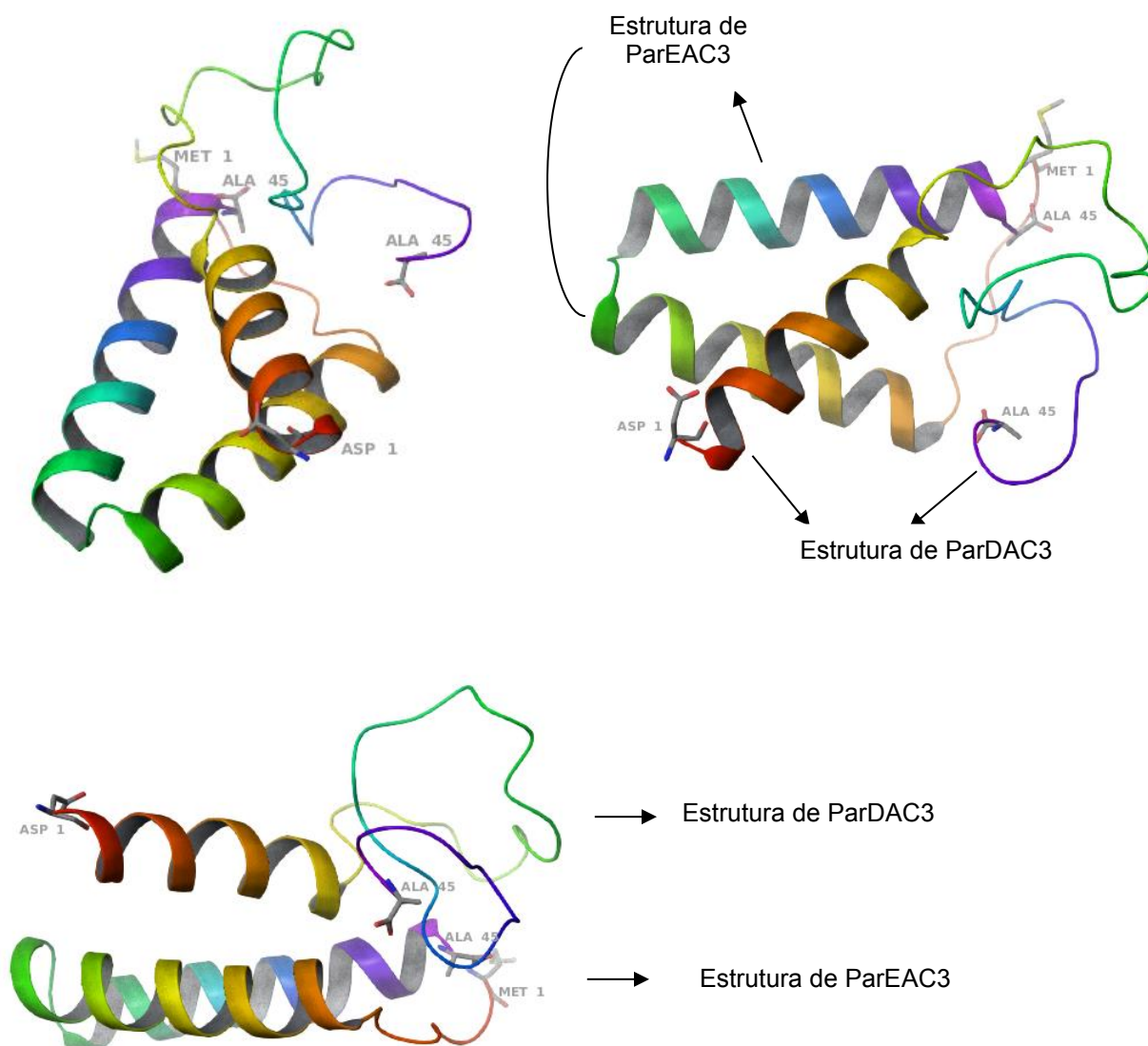
4.6 Estudos de Modelagem e Docking

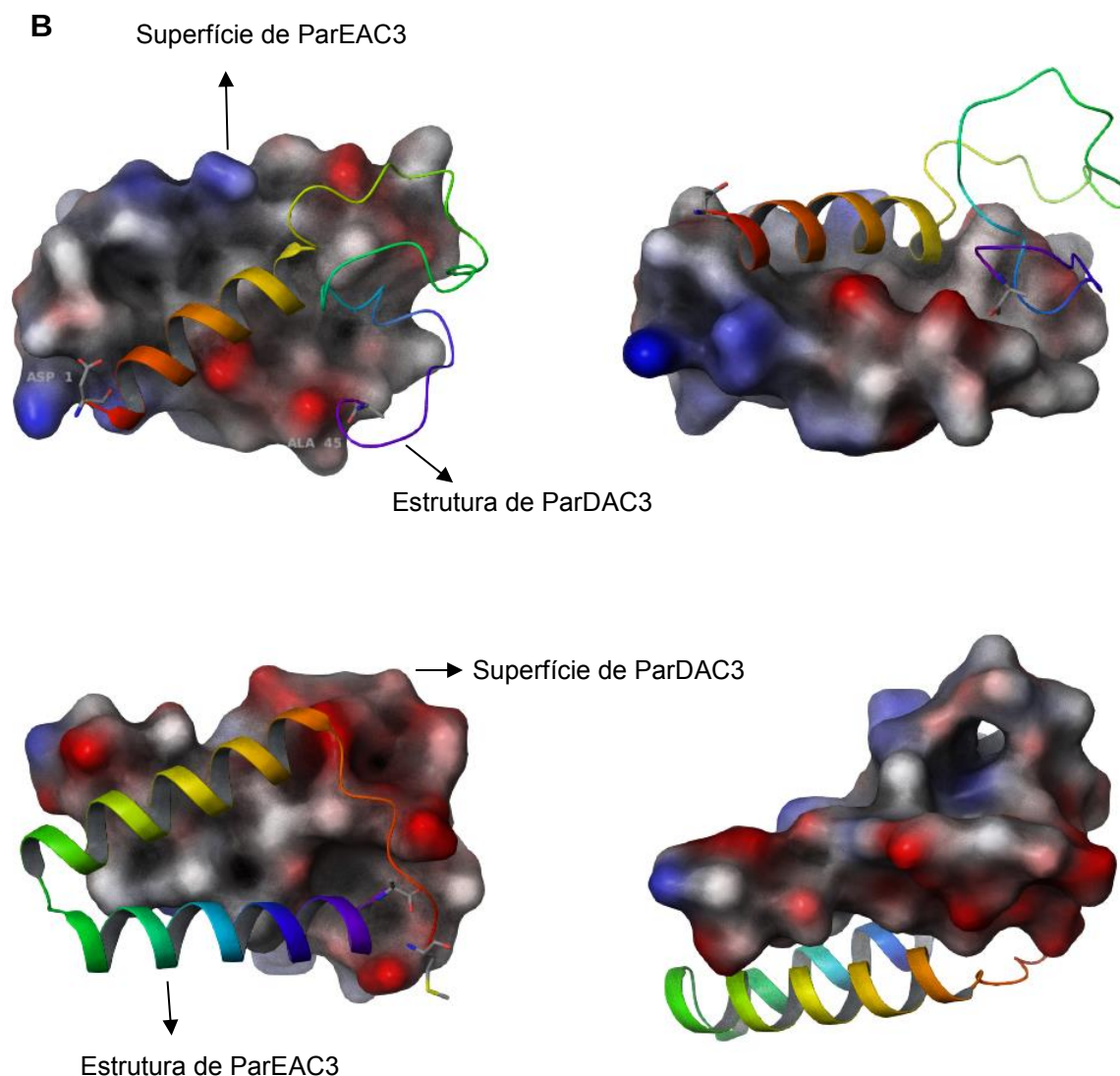
Através das técnicas experimentais de imobilização de peptídeos em cromatografia de afinidade e estudos de supressão de fluorescência, foi demonstrado que a sequência ParEAC3 apresentou melhor interação com ParDAC2 e ParDAC3.

Através do *docking* realizado com os modelos estruturais de ParEAC3 e ParDAC3, foi possível determinar um modo de interação plausível para explicar a formação do complexo ParEAC3-ParDAC3 para os experimentos realizados *in vitro*. Os primeiros sete complexos obtidos a partir desta abordagem apresentaram os melhores valores de interação em termos energéticos e evidenciaram a mesma região de interação, com pequenas variações no RMSD (*root mean square deviation*) devido à mudanças observadas entre os rotâmeros da cadeia lateral (Figura 63).

Figura 63. Resultado do docking, realizado através do servidor SwarmDock, utilizando o melhor modelo de ParEC3 e de ParDAC3 de *E. coli* fornecidos pelo servidor I-TASSER. A) Visualização do melhor modelo obtido em termos energéticos, que também foi utilizado para estudos no servidor Drug-Score^{PPI}. Figuras geradas com o programa Maestro (SCHRODINGER, 2014); B) Superfície de interação eletrostática do complexo dipeptídico ParEAC3-ParDAC3 com diversos modos de visualização (cor branca: superfície hidrofóbica; cor vermelha: superfície com carga negativa parcial e/ou total; cor azul: superfície com carga positiva parcial e/ou total). Figuras geradas com o programa Maestro (SCHRODINGER, 2014).

A





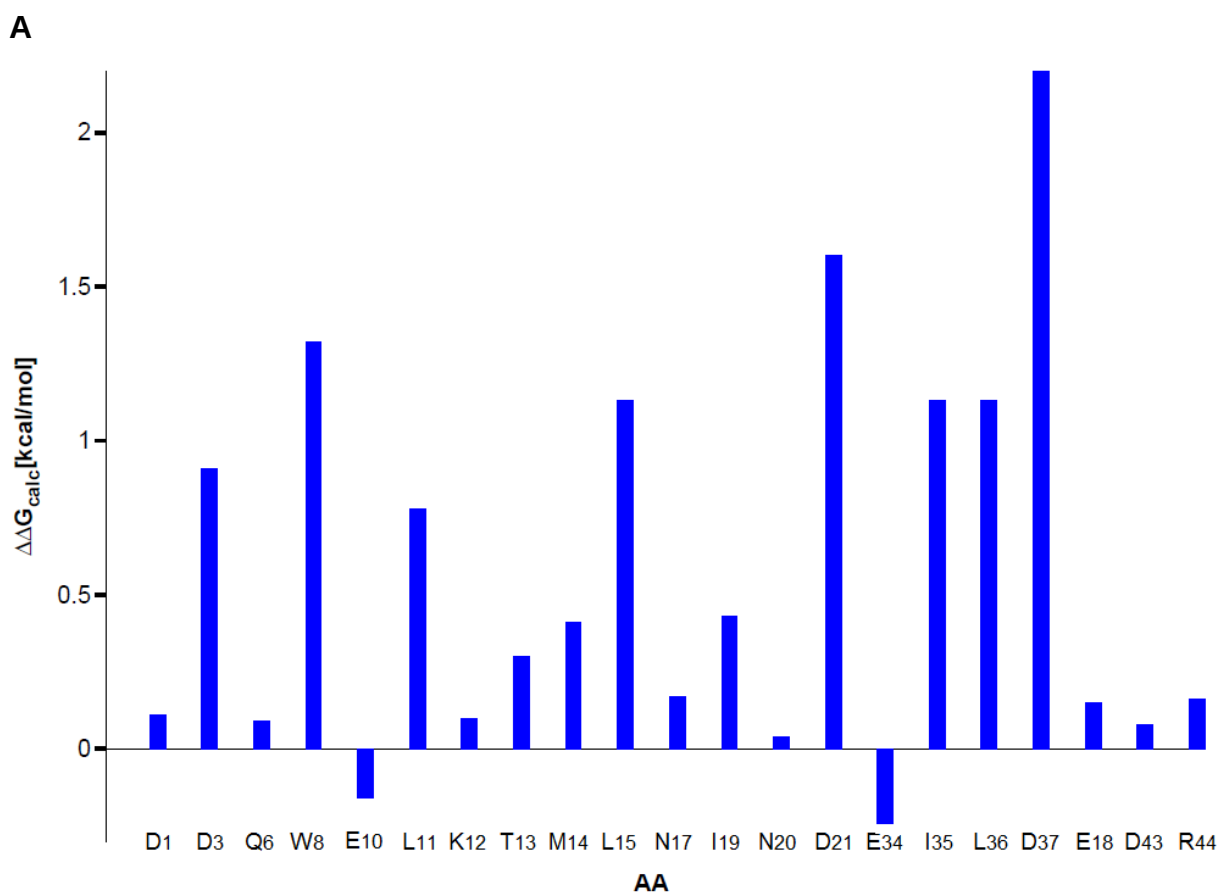
Fonte: Elaborado pela Autora.

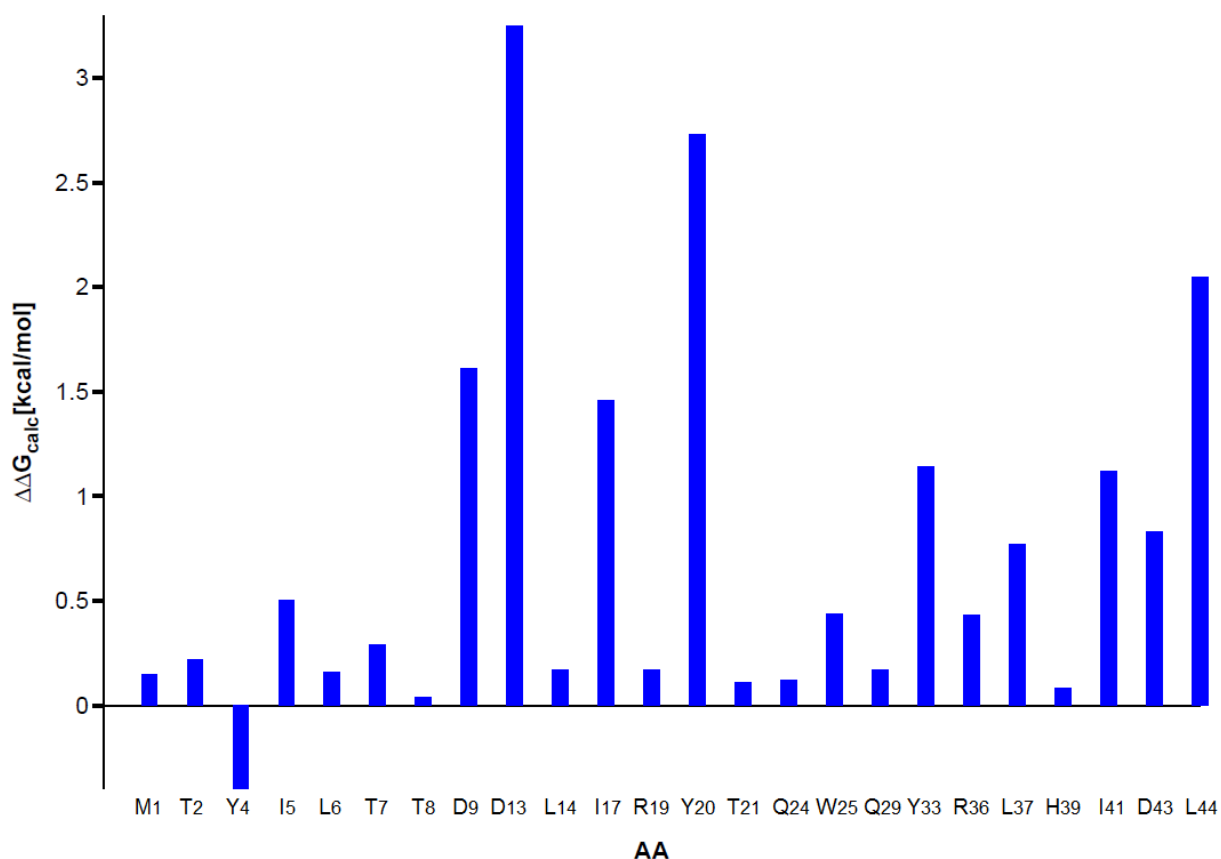
O modo de interação é semelhante à região equivalente com a estrutura cristalográfica do complexo ParE-ParD de *Caulobacter crescentus* (PDB ID 3KXE). Porém devido à baixa identidade entre a sequência de ParDAC3 de *E. coli* e dos resíduos equivalentes em ParD de *C. crescentus*, foi necessário utilizar uma combinação de protocolos de modelagem molecular para melhorar a qualidade de predição do modelo estrutural. Esta etapa é fundamental para que o processo posterior de *docking* produza resultados mais confiáveis para avaliar os possíveis modos de interação entre os peptídeos.

O complexo identificado na Figura 63A foi submetido a uma posterior análise com o servidor Drug-Score^{PPI} (KRUGER, 2010), que realiza uma avaliação dos

resíduos que interagem na interface de complexos proteicos e fornece os valores individuais de energia de interação (Figura 64). Isto apresenta grande importância para o planejamento racional de novas sequências e estruturas que possam apresentar maior afinidade para bloquear a atividade da antitoxina ParD e induzir indiretamente o processo de morte celular bacteriana através do ParE.

Figura 64. Gráfico de variação de energia livre de interação ($\Delta\Delta G$) dos resíduos localizados na interface de ParDAC3 e ParEAC3, de acordo com o servidor Drug-Score^{PPI}. A) $\Delta\Delta G$ de ParDAC3; B) $\Delta\Delta G$ de ParEAC3. Quanto maior o valor, melhor é a contribuição energética para a interação.



B

Fonte: Elaborado pela autora.

A figura 64A (ParDAC3) demonstra que a melhor contribuição para a formação do complexo com ParEAC3 são os resíduos Asp3, Trp8, Leu15, Asp21, Ile35, Leu36 e Asp37. Ainda, este modelo de docking avaliado pelo Drug-Score^{PPI} indica que a interação mais significativa ocorre através do resíduo Asp37 que faz parte da sequência randômica de ParDAC3.

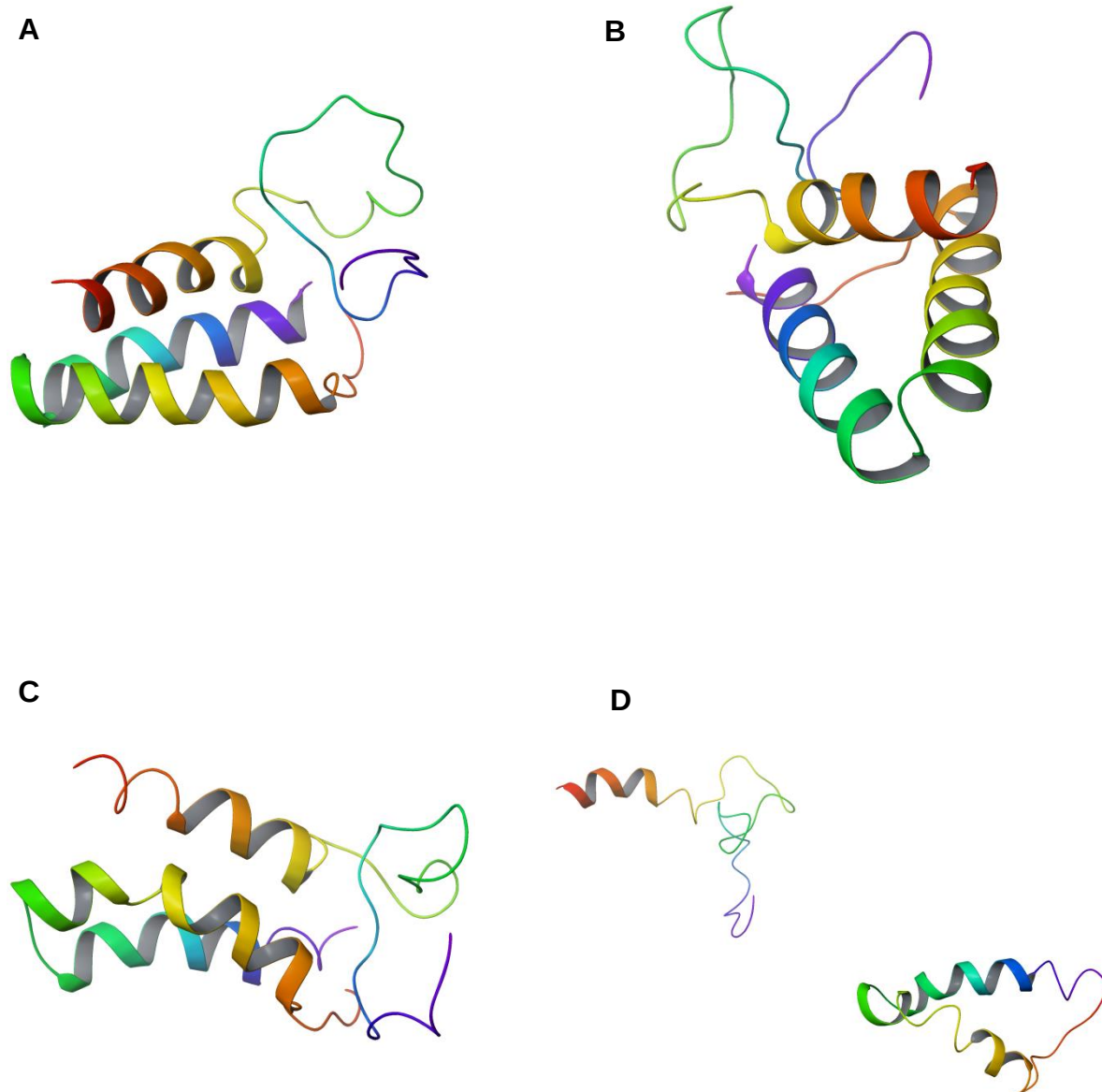
Já na figura 64B é possível observar que a melhor contribuição para a formação do complexo com ParDAC3 são os resíduos Asp9, Asp13, Ile17, Tyr20, Tyr33, Leu37, Ile41, Asp43 e Leu44. E este modelo avaliado pelo Drug-Score^{PPI} indica que a interação mais significativa ocorre pelo resíduo Asp13.

Sendo assim, o gráfico da figura 64B demonstra que os resíduos que apresentam baixa contribuição energética para a formação do complexo ($\Delta\Delta G \leq 0,5$) são essenciais para estudos de obtenção de novos derivados capazes de apresentar mutações estratégicas que resultem em maior afinidade pela sequência ParDAC3 derivada da proteína ParD de *E. coli*.

4.7 Dinâmica Molecular

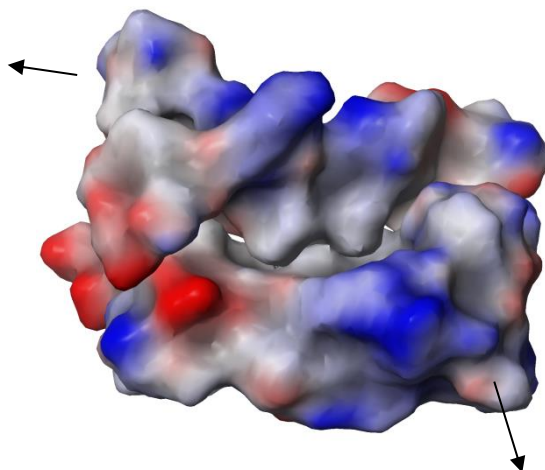
A simulação de dinâmica molecular do complexo ParEAC3-ParDAC3 foi conduzida seguindo-se as etapas descritas em *Materiais e Métodos* (item 3.12 da metodologia). Várias análises são efetuadas durante o processo para avaliar as diferentes etapas (minimização, equilíbrio do sistema e simulação), através de protocolo automatizado desenvolvido no Laboratório de Bioquímica Estrutural e Simulação Molecular. Para este estudo, foi utilizado um protocolo de aumento de temperatura até um valor final (Figura 65). O aumento de temperatura provoca uma maior mobilidade das moléculas de peptídeos, água e íons, e força a quebra das interações peptídicas intermoleculares. O aumento contínuo de temperatura durante toda a simulação resultou no rompimento do complexo peptídico em torno de 9,3 ns (temperatura final de 380 K). No entanto, as sequências em alfa hélice permaneceram estruturadas, o que demonstra relativa estabilidade estrutural de ambos os peptídeos e contribui para manter aproximadamente fixa a região de interação. Foi observado que as interações hidrofóbicas podem ser determinantes para formação do complexo ParEAC3-ParDAC3. Isto é um modelo indicativo do modo de reconhecimento da toxina ParE pela antitoxina ParD no ambiente celular. É interessante notar também que esta região compreende a sequência formada pelos resíduos R19, T21, R22, K23, Q24, que apresentam característica polar ou são carregados positivamente o que explica a desestruturação observada nesta região devido à maior interação com o solvente e/ou outros resíduos próximos.

Figura 65. Resultado obtido após a simulação de dinâmica molecular com aumento contínuo de temperatura, até 380 K. A) início da simulação; B) tempo: 3 ns; C) tempo: 8 ns; D) rompimento do complexo em 9-10 ns. E) Superfície de interação eletrostática do complexo dipeptídico ParEAC3-ParDAC3 (cor branca: superfície hidrofóbica; cor vermelha: superfície com carga negativa parcial e/ou total; cor azul: superfície com carga positiva parcial e/ou total). Figuras geradas com o programa Maestro (SCHRODINGER, 2014).



E

Superfície de ParDAC3



Superfície de ParEAC3

Fonte: Elaborado pela autora.

5. CONCLUSÕES

- A síntese dos peptídeos análogos de ParD foram mais dificultosas, possivelmente devido à proximidade de um grande número de aminoácidos trifuncionais nas sequências, resultando em maior impedimento estérico, produzido pelos grupos protetores, durante a etapa de acoplamento dos aminoácidos.
- As sequências análogas de ParD, com maior carga negativa, apresentaram menores rendimentos no processo de purificação, além de uma pureza inferior às sequências de ParE, carregados positivamente no pH de ensaio.
- As sequências Thr⁸-Gly²⁶ e Gln²⁴-Ala⁴⁵ de ParE, isoladamente representadas por ParEAC4 e ParEAC1, respectivamente, não são importantes para a interação com análogos de ParE.
- As duas sequências unidas, formando ParEAC2 (Ac-Thr⁸-Ala⁴⁵), possivelmente em virtude da sua estruturação, em solução, passa a interagir com os dois derivados de cadeias mais longas de ParD.
- Nossos estudos demonstraram que ensaios de Supressão de Fluorescência e Cromatografia de Afinidade são técnicas confiáveis na identificação de processos de interação (*binding*).
- Os análogos do peptídeo ParD suprimiram a fluorescência dos peptídeos ParEAC2 e ParEAC3, identificado como supressão estática, evidenciando a formação de complexo.
- A supressão da fluorescência dos peptídeos ParEAC1 e ParEAC4 foi identificado como colisional, entretanto, não houve formação de complexo com qualquer um dos derivados de ParD.

- O análogo ParDAC3, derivado da parte C-terminal de ParD, aparentemente representa uma estrutura peptídica mínima, necessária para a manutenção da atividade antídoto desta proteína
- ParDAC3 constitui o ponto de início para a identificação dos possíveis sítios de interações da proteína natural ParE e seu antídoto.
- As sequências peptídicas de ParEAC2 e ParEAC3 foram capazes de inibir a ação da DNA Girase.
- Através da modelagem molecular foi possível obter um modelo confiável e adequado para os estudos posteriores de *docking*.
- O procedimento de *docking* forneceu importantes evidências do modo de interação entre os fragmentos peptídicos ParDAC3 e ParEAC3, e são coerentes com o complexo cristalográfico ParE-ParD de *Caulobacter crescentus* reportado anteriormente na literatura.
- O estudo do complexo ParEAC3-ParDAC3 através do servidor Drug-Score^{PPI} forneceu importantes evidências da contribuição energética dos resíduos envolvidos neste processo de interação.
- A dinâmica molecular empregando o protocolo de *simulated annealing* foi uma estratégia importante para compreender melhor o mecanismo que determina a formação e manutenção do complexo ParEAC3-ParDAC3. Isto também contribuiu para uma análise da estabilidade relativa de sequências estruturais específicas de ambos os peptídeos.

REFERÊNCIAS

- ALI, J. A.; JACKSON, A. P.; HOWELLS, A. J.; MAXWELL, A. The 43-kilodalton Nterminal fragment of the DNA gyrase B protein hydrolyzes ATP and binds coumarin drugs. **Biochemistry**, v. 32, n. 10, p. 2717-2724, 1993.
- ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREASY, J. E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. **Med. Res. Rev.**, v. 26, n. 5, p. 531-568, 2006.
- AMBLARD, M.; FEHRENTZ, J. A.; MARTINEZ, J.; SUBRA, G. Fundamentals of modern peptide synthesis. HOWL, J. (Ed.). **Peptide synthesis and applications**. Totowa: Human Press, 2005. Chap. 1, p. 3-24. (Methods in molecular biology, v. 298).
- ANDERSON, G. W.; MCGREGOR, A. C. t-Butyloxycarbonylamino acids and their use in peptide synthesis. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 79, p. 6180-6183, 1957.
- ANDRIOLE, V. T. **The quinolones**. 3rd ed. San Diego: Elsevier, 2000.
- ARMELIN, P. R. G. **Modelagem molecular de derivados pirimidínicos e estudos de Docking nas enzimas ciclooxigenase 1 e ciclooxigenase 2**. 2010. 124 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.
- BARANY, G.; KNEIB-CORDONIER, N.; MULLEN, D. G. Solid phase peptide synthesis: a silver anniversary report. **Int. J. Peptide Res.**, v. 30, p. 705-739, 1987.
- BARBOSA, L. C. B.; GARRIDO, S. S.; GARCIA, A.; DELFINO, D. B.; SANTOS, L. N.; MARCHETTO, R. Design and synthesis of peptides from bacterial ParE toxin as inhibitors of topoisomerases. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 54, p. 591-596, 2012.
- BARBOSA, L. C. B.; CANGUSSU, A. S. R.; GARRIDO, S. S.; MARCHETTO, R. Toxin-antitoxin systems and its biotechnological applications. **African J. Biotech.**, v. 13, n. 1, p. 11-17, 2014.
- BAXEVANIS, A. D.; OUELLETTE, B. F. F. (Ed.). **Bioinformatics: a practical guide to the analysis of genes and proteins**. 3rd ed. Hoboken: John Wiley and Sons, 2005.
- BERNARD, P.; COUTURIER, M. The 41 carboxy-terminal residues of the miniF plasmid CcdA protein are sufficient to antagonize the killer activity of the CcdB protein. **Mol. Gen. Genet.**, v. 226, p. 297-304, 1991.
- BERNARD, P.; COUTURIER, M. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA topoisomerase II complexes. **J. Mol. Biol.**, v. 226, p. 735-745, 1992.
- BORISSEVITCH, I. E. More about the inner filter effect: corrections of Stern–Volmer fluorescence quenching constants are necessary at very low optical absorption of the quencher. **J. Lumin.**, v. 81, p. 219-224, 1999.

BUTS, L.; LAH, J.; DAO-THI, M. H.; WYNS, L.; LORIS, R. Toxin-antitoxin modules as bacterial metabolic stress managers. **Trends Biochem. Sci.**, v. 30, p. 672-679, 2005.

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

CARPINO, L. A.; HAN, G. Y. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 92, p. 5748-5749, 1970.

CARPINO, L. A.; HAN, G. A. The 9-fluorenylmethyloxycarbonyl amino-protecting group. **J. Org. Chem.**, v. 37, p. 3404-3409, 1972.

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

CHAN, W. C.; WHITE, P. D. **Fmoc solid phase peptide synthesis**: a practical approach. New York: Oxford University, 2000.

COHEN, N. C.; BLANEY, J. M.; HUMBLET, C.; GUND, P.; BARRY, D. C. Molecular modeling software and methods for medicinal chemistry. **J. Med. Chem.**, v. 33, p. 883-894, 1990.

CONTRERAS-MOREIRA, B.; EZKURDIA, I.; TRESS, M. L.; VALENCIA, A. Empirical limits for template-based protein next term structure previous term prediction: next term the casp5 example. **Febs Lett.**, v. 579, p. 1203-1207, 2005.

CORBETT, K. D.; SCHOEFFLER, A. J.; THOMSEN, N. D.; BERGER, J. M. The structural basis for substrate specificity in DNA topoisomerase IV. **J. Mol. Biol.**, v. 351, p. 545-561, 2005.

COTRIM, C. A.; GARRIDO, S. S.; TROVATTI, E.; MARCHETTO, R. Síntese, caracterização e estudos de interação de um análogo da antitoxina CcdA empregando fluorescência no estado estacionário. **Quím. Nova**, v. 33, p. 841-845, 2010.

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

DAVIS, T. L.; HELINSKI, D. R.; ROBERTS, R. C. Transcription and autoregulation of the stabilizing functions of broad-host-range plasmid RK2 in *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Mol. Microbiol.**, v. 6, p. 1981-1994, 1992.

DEL SOLAR, G.; HERNANDEZ-ARRIAGA, A. M.; GOMIS-RUTH, F. X.; COLL, M.; ESPINOSA, M. A genetically economical family of plasmid-encoded transcriptional repressors involved in control of plasmid copy number. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 4943-4951, 2002.

ESSMANN, U.; PERERA, L.; BERKOWITZ, L. M.; DARDEN, T.; LEE, H.; PEDERSEN, L. G. A smooth particle-mesh Ewald method. **J. Chem. Phys.**, v. 103, p. 8577-8593, Aug. 1995.

FIEBIG, A.; ROJAS, C. M. C.; SIEGAL-GASKINS, D.; CROSSON, S. Interaction specificity, toxicity and regulation of a paralogous set of ParE/RelE-family toxin antitoxin systems. **Mol. Microbiol.**, v. 77, p. 236-251, 2010.

FIELDS, G. B.; TIAN, Z.; BARANY, G. **Synthetic peptides: a user's guide**. New York: W. H. Freeman and Company, 1992.

GARRIDO, S. S. **Miméticos da cadeia B da DNA girase: síntese e estudos de interação com drogas cumarínicas**. 2002. 95 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.

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

GERDES, K.; CHRISTENSEN, S. K. Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 83, p. 371-382, 1986.

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

GERDES, K.; AYORA, S.; CANOSA, I.; CEGLOWSKI, P.; DÍAZ-OREJAS, R.; FRANCH, T. Plasmid maintenance systems. In: THOMAS, C. M. (Ed.). **The horizontal gene pool: bacterial plasmids and gene spread**. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 2000, p. 49-85.

HALLEZ, R.; GEERAERTS, D.; STERCKX, Y.; MINE, N.; LORIS, R.; VAN MELDEREN, L. New toxins homologous to ParE belonging to three-component toxin-antitoxin systems in *Escherichia coli* O157:H7. **Mol. Microb.**, v. 76, p. 719-732, 2010.

HANSSON, T.; OOSTENBRINK, C.; VAN GUNSTEREN, W. Molecular dynamics simulation. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 12, p. 190-196, 2002.

HAYES, F. Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. **Science**, v. 301, n. 5639, p. 1496-1499, 2003.

HESS, B.; BEKKER, H.; BERENDSEN, H. J. C.; FRAAIJE, J. G. E. M. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. **J. Comp. Chem.**, v. 18, p. 1463-1472, Feb. 1997.

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

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

HOLTJE, H. D.; SIPPL, W.; ROGNAN, D.; FOLKERS, G. **Molecular modeling**: basic principles and applications. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2003.

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

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

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

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

KAMADA, K.; HANAOKA, F.; BURLEY, S. K. Crystal structure of the MazE/MazF 788 complex: molecular bases of antidote-toxin recognition. **Mol. Cell.**, v. 11, p. 848-857, 2003.

KARPLUS, M.; McCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v. 9, n. 9, p. 646-652, Sept. 2002.

KATO, J.; NISHIMURA, Y.; IMAMURA, R.; NIKI, H.; HIRAGA, S.; SUZUKI, H. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. **Cell**, v. 63, n. 2, p. 393-404, 1990.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1751, p. 119-139, 2005.

KREUZER, K. N.; COZZARELLI, N. R. Formation and resolution of DNA catenates by DNA gyrase. **Cell**, v. 20, p. 245-254, 1980.

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

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3rd ed. New York: Springer Science, 2006.

LENGAUER, T.; RAREY, M. Computational methods for biomolecular docking. **Struct. Biol.**, v. 6, p. 402-406, 1996.

LEVINE, C.; HIASA, H.; MARIANS, K. J. DNA gyrase and topoisomerase IV – biochemical activities, physiological roles during chromosome-replication, and drug sensitivities. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1400, p. 29-43, 1998.

LI, G. Y.; ZHANG, Y.; INOUE, M.; IKURA, M. Structural mechanism of transcriptional autorepression of the *Escherichia coli* RelB/RelE antitoxin/toxin module. **J. Mol. Biol.**, v. 380, p. 107-119, 2008.

LI, G. Y.; ZHANG, Y.; INOUE, M.; IKURA, M. Inhibitory mechanism of *Escherichia coli* RelE-RelB toxin-antitoxin module involves a helix displacement near an mRNA interferase active site. **J. Biol. Chem.**, v. 284, p. 14628-14636, 2009.

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

LLOYD-WILLIAMS, P.; ALBERICIO, F.; GIRALT, E. Convergent solid-phase peptide synthesis. **Tetrahedron**, v. 49, p. 11065-11133, 1993.

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

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

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

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

MARCHETTO, R.; NICOLÁS, E.; CASTILLO, N.; BACARDIT, J.; NAVIA, M.; VILA, J.; GIRALT, E. Two short peptides including segments of subunit A of *E. coli* DNA gyrase as potential probes to evaluate the antibacterial activity of quinolones. **J. Pep. Sci.**, v. 7, n. 1, p. 27-40, 2001.

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

MAXWELL, A. The molecular basis of quinolone action. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 30, n. 4, p. 409-414, 1992.

MAXWELL, A. The interaction between coumarin drugs and DNA gyrase. **Mol. Microbiol.**, v. 9, n. 4, p. 681-686, 1993.

MAXWELL, A. DNA gyrase as a drug target. **Trends Microbiol.**, v. 5, p. 102-109, 1997.

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

MERRIFIELD, R. B. (Ed.). **Solid phase peptide synthesis**. 2nd ed. New York: Pierce Chemical Company, 1984.

MOUT, J. A decade of CASP: progress, bottlenecks and prognosis in protein structure prediction. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 15, p. 285-289, 2005.

MOULT, J.; FIDELIS, K.; KRYSHTAFOVYCH, A.; SCHWEDE, T.; TRAMONTANO, A. Critical assessment of methods of protein structure prediction (CASP). **Proteins**, v. 82, p. 1-6, 2014.

NAMBA, A. M.; SILVA, V. B.; SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Ecl. Quím.**, v. 33, n. 4, p. 13-24, 2008.

NAVARRO, E. D.; KONIECZNY, I.; HERNANDEZ-ARRIAGA, A. M.; KUBIK, S.; DIAS-OREJAS, R. Cleavage of the antitoxin of the parD toxin–antitoxin system is determined by the ClpAP protease and is modulated by the relative ratio of the toxin and the antitoxin. **Plasmid**, v. 70, p. 78-85, 2013.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NÖLLMANN, M.; STONE, M. D.; BRYANT, Z.; GORE, J.; CRISONA, N. J.; HONG, S. C.; MITELHEISER, S.; MAXWELL, A.; BUSTAMANTE, C.; COZZARELLI, N. R. Multiple modes of *Escherichia coli* DNA gyrase activity revealed by force and torque. **Nat Struct. Mol. Biol.**, v. 14, p. 264-271, 2007.

OBERER, M.; ZANGGER, K.; PRYTULLA, S.; KELLER, W. The anti-toxin ParD of plasmid RK2 consists of two structurally distinct moieties and belongs to the ribbon-helix-helix family of DNA-binding proteins. **Biochem. J.**, v. 361, p. 41-47, 2002.

OBERER, M.; ZANGGER, K.; GRUBER, K.; KELLER, W. The solution structure of ParD, the antidote of the ParDE toxin–antitoxin module, provides the structural basis for DNA and toxin binding. **Prot. Sci.**, v. 16, p. 1676-1688, 2007.

PHILIPS, S. E. The beta-ribbon DNA recognition motif. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, v. 23, p. 671-701, 1994.

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

REECE, R.; MAXWELL, A. DNA gyrase: structure and function. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v. 26, p. 335-375, 1991.

ROBERTS, R. C.; SPANGLER, C.; HELINSKI, D. R. Characteristics and significance of DNA binding activity of plasmid stabilization protein ParD from the broad host-range plasmid RK2. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 27109-27117, 1993.

ROBERTS, R. C.; STROM, A. R.; HELINSKI, D. R. The parDE operon of the broad-host-range plasmid RK2 specifies growth inhibition associated with plasmid loss. **J. Mol. Biol.**, v. 237, p. 35-51, 1994.

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

RODRIGUES, R. P.; MANTOANI, S. P.; ALMEIDA, J. R.; PINSETTA, F. R.; SEMIGHINI, E. P.; SILVA, V. B.; SILVA, C. H. P. Estratégias de triagem virtual no planejamento de fármacos. **Rev. Virtual Quim.**, v. 4, n. 6, p. 739-776, dez. 2012.

ROY, A. K.; ZHANG, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nat. Prot.**, v. 5, p. 725-738, Apr. 2010.

SCHRODINGER, LLC. **Maestro V**. New York, 2014. Disponível em: <<http://www.schrodinger.com/downloadcenter/>>. Acesso em: 05 out. 2014.

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

SMITH, C. V.; MAXWELL, A. Identification of a residue involved in transition-state stabilization in the ATPase reaction of DNA gyrase. **Biochemistry**, v. 37, p. 9658-9667, 1998.

TAKAGI, H.; KAKUTA, Y.; OKADA, T.; YAO, M.; TANAKA, I.; KIMURA, M. Crystal structure of archaeal toxin-antitoxin RelB-RelE complex with implications for toxin activity and antitoxin effects. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v. 12, p. 327-331, 2005.

TORCHOLA, M.; MOAL, L. H.; CHALEIL, R. A. G.; RECIO, J. F.; BATES, P. A. SwarmDock: a server for flexible protein-protein docking. **Bioinformatics**, v. 29, p. 807-809, Jan. 2013.

TRAMONTANO, A.; LESK, A. M. **Protein structure prediction**. Weinheim: Wiley-VCH, 2006.

TROVATTI, E. **Síntese e estudos de inibição da atividade da DNA girase por análogos peptídicos da toxina bacteriana CcdB**. 2006. 109 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

TROVATTI, E.; COTRIM, C. C.; GARRIDO, S. S.; BARROS, R. S.; MARCHETTO, R. Peptides based on CcdB protein as novel inhibitors of bacterial topoisomerases. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 18, p. 6161-6164, 2008.

VAN MELDEREN, L.; SAAVEDRA DE BAST, M. Bacterial toxin-antitoxin systems: more than selfish entitles? **PLoS Genetics**, v. 5, n. 3, 2009. doi: 10.1371/journal.pgen.1000437. Disponível em: <<http://www.plosgenetics.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pgen.1000437>>. Acesso em: 11 nov. 2014.

VAN MELDEREN, L.; THI, M. H. D.; LECCHI, P.; GOTTESMAN, S.; COUTURIER, M.; MAURIZI, M. R. TP-dependent degradation of CcdA by Lon protease. Effects of secondary structure and heterologous subunit interactions. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 27730-27738, 1996.

WANG, J. C. DNA topoisomerases. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 65, p. 635-692, 1996.

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

WIGLEY, D. B. Structure and mechanism of DNA gyrase. In: ECKSTEIN, F.; LILEY, D. M. J. (Ed.). **Nucleic acids molecular biology**. New York: Springer-Verlag, 1995. p. 165-176.

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

WILBAUX, M.; MINE, N.; GUÉROUT, A. M.; MAZEL, D.; VAN MELDEREN, L. Functional interactions between coexisting toxin-antitoxin systems of the *ccd* family in *Escherichia coli* O157:H7. **J. Bact.**, v. 189, p. 2712-2719, 2007.

ZHANG, Y. **I-TASSER server for protein 3D structure prediction**. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2105/9/40>>. Acesso em: 11 nov. 2014.

ZHANG, Y.; SKOLNICK, J. Automated structure prediction of weakly homologous proteins on a genomic scale. **Proc. Natl. Acad. USA**, v. 101, n. 20, p. 7594-7599, 2004.