



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**



**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
Campus Araraquara

**CAMILA AGUIAR ROCHA**

**Peptídeos derivados da toxina ParE: síntese,  
estrutura e estudos de inibição de DNA  
topoisomerasas**

Araraquara  
2014

**CAMILA AGUIAR ROCHA**

**Peptídeos derivados da toxina ParE: síntese, estrutura e estudos de inibição de DNA topoisomerasas**

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

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Rocha, Camila Aguiar

R672p Peptídeos derivados da toxina ParE: síntese, estrutura e estudos de inibição de DNA topoisomerasas / Camila Aguiar

Rocha. – Araraquara : [s.n], 2014

110 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Química

Orientador: Reinaldo Marchetto

1. Biotecnologia. 2. Peptídeos. 3. Toxina ParE.  
4. Topoisomerasas. I. Título.

CAMILA AGUIAR ROCHA

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

Araraquara, 29 de janeiro 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. CLOVIS RYUICHI NAKAIE  
Universidade Federal de São Paulo / UNIFESP / São Paulo

## DADOS CURRICULARES

**Nome:** Camila Aguiar Rocha

**Nome em citações bibliográficas:** ROCHA, C. A.

**Filiação:** Néviton Antônio David Rocha

Mariana de Aguiar Rocha

**Data de nascimento e local:** 12/11/1987, Montes Claros - MG

**Estado civil:** solteira

**Endereço:** Avenida Itápolis, 2422 – Araraquara - SP

**CEP:** 14800000

**Telefone:** (16) 81188538

**E\_mail:** rocha\_aguiarmila@yahoo.com.br

**Resumo das qualificações:** Mestranda em Biotecnologia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP, na área de síntese de peptídeos com ênfase em peptídeos antimicrobianos. Bacharel em Farmácia - Bioquímica pela Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri- UFVJM, (2010).

### FORMAÇÃO ACADÊMICA

#### 2012-2014

Mestrado em Biotecnologia.

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

Título: PEPTÍDEOS DERIVADOS DA TOXINA ParE: SÍNTESE, ESTRUTURA E ESTUDOS DE INIBIÇÃO DE DNA TOPOISOMERASES.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto.

Bolsista Capes - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

#### 2006-2010

Graduação em Farmácia-Bioquímica Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM, Câmpus de Diamantina, MG.

### ATUAÇÃO PROFISSIONAL

#### 2011

Professor de Química- Escola Estadual João de Freitas Neto - 12 aulas- 05/05 a 03/06/2011.

Professor de Química- Escola Estadual Dr. Carlos Albuquerque - 16 aulas - 25/08/2011 a 31/12/2011.

Professor de Química- Escola Estadual Cel. Filomeno Ribeiro -13 aulas- 21/09/2011 a 31/12/2011

## **2010**

Monitoria Voluntária da disciplina de Parasitologia Clínica – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, UFVJM – Diamantina, MG.

## **2009**

Estágio extracurricular nos setores de manipulação de sólidos e semi-sólidos da drogaria - Guedes e Paixão Ltda (Minas Brasil) - Montes Claros, MG.

Estágio na drogaria Guedes e Paixão Ltda - Montes Claros - envolvendo atividades de dispensação, aquisição e armazenamento de medicamentos, SNGPC e outras.

Treinamento de sorologia para Diagnóstico de Leishmaniose Canina - Gerência Regional de Saúde/ Diamantina, MG.

Estágio em laboratório de Análises Clínicas (SIPER), Montes Claros- MG.

Estágio curricular em laboratório de Análises Clínicas (Hospital Universitário Clemente de Faria - UNIMONTES) - Montes Claros, MG.

## **2008-2010**

Iniciação Científica no Laboratório de Parasitologia da Farmácia Análises Clínicas da UFVJM, com orientação do Prof. Dr. Herton Helder Pires.

## **PRODUÇÃO CIENTÍFICA**

### **TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS**

ROCHA, C. A., GARCIA, A., SANCHES, P. R. S., ABREU, E. M., MARCHETTO, R. New Peptide Inhibitors Of Bacterial Topoisomerases. XLII Annual Meeting of SBBQ, Foz do Iguaçu, 2013.

ROCHA, C. A.; 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.

SANCHES, P. R. S., FERREIRA, J., VALENTE, V., SOARES, C. P., ROCHA, C. A., CILLI, E. M. Structure, Activity and Relationship of new peptide conjugates against breast cancer. In: III International Symposium on Drug Discovery, 2013, Araraquara

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.

SANCHES, P. R. S., PICCOLI, J. P., ROCHA, C. A., CILLI, E. M. Design of New Conjugated Peptides using Electrical Characteristics of Breast Cancer Cell Membrane 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 topoisomerasas derivados da proteína ParE de *Escherichia coli* In: XXI Jornada de Jovens Investigadores da AUGM, 2013, Corrientes, Argentina.

SANCHES, P. R. S., FERREIRA, J., VALENTE, V., SOARES, C. P., ROCHA, C. A., CILLI, E. M. Design, Síntese, Avaliação Biofísica e Farmacológica de Novos conjugados Peptídicos Contra o Câncer de Mama In: XXI Jornada de Jovens Investigadores da AUGM, 2013, Corrientes, Argentina.

ROCHA, C. A.; TEIXEIRA, I. E.; TIBÃES, G. G.; OLIVEIRA, G. H. B.; PIRES, H. H. R. Avaliação da Atividade Inseticida do Extrato Etanólico da *Ageratum fastigiatum* em *Rhodnius nasutus*. In: 25ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e 13ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses, 2009, Uberaba.

ROCHA, C. A.; OLIVEIRA, G. H. B.; RODRIGUES, C. E.; PIRES, H. H. R. Diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina pelo Método de Imunofluorescência Indireta realizado na GRS/ Diamantina. In: XI Jornada Acadêmica, Científica e Tecnológica da UFVJM, 2009, Diamantina.

ROCHA, C. A.; LOPES, A. C. V.; GIANOTI, A. R. C.; Watanabe, E.; FERREIRA, M. S.; DANTAS, A. K. D.; SANTOS, S. L. B. Quantificação e Posterior Estudo da Atividade Antibacteriana do Óleo do Pinhão Manso (*Jatropha curcas* L.) Obtidos Através do Processo de Extração com Solvente. In: X Jornada Acadêmica, Científica e Tecnológica da UFVJM, 2008, Diamantina.

TIBÃES, G. G.; OLIVEIRA, G. H. B.; ROCHA, C. A.; AVELAR, B. A.; Dias, J. V. L.; PIRES, H. H. R. Vigilância Epidemiológica de Vetores da Doença de Chagas no Alto e Médio Jequitinhonha. In: 24ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e 12ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses, 2008, Uberaba.

AVELAR, B. A.; TIBÃES, G. G.; ROCHA, C. A.; OLIVEIRA, G. H. B.; PIRES, H. H. R. Aspectos da Vigilância Entomológica de Vetores da Doença de Chagas em Municípios Pertencentes à Gerência Regional de Saúde de Diamantina. In: IX Jornada Acadêmica, Científica e Tecnológica da UFVJM, 2007, Diamantina.

## **PRÊMIOS RECEBIDOS**

Best Abstract at the III International Symposium on Drug Discovery. "Topoisomerases Inhibitors Peptides Derived from *Escherichia coli* Toxin ParE", UNESP- FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

## **IDIOMAS**

Inglês: Avançado  
Espanhol: Básico

**Com imenso carinho,**

**A Deus.**

**Aos meus pais Néviton e Mariana.**

**À minha irmã querida Kênya.**

**Ao meu cunhado Ângelo.**

**À minha sobrinha e afilhada Maria Eduarda.**

**Ao meu namorado Diego,**

**E a todos os meus amigos do coração.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, do mais fundo do meu coração, por ter ouvido minhas preces e ter me concedido a graça de realizar esse sonho. Por ter estado sempre ao meu lado, iluminando o meu caminho, mesmo quando eu não percebia.

Aos meus pais, por terem me dado o dom da vida e me transformado na pessoa que hoje sou. A minha eterna gratidão por toda a preocupação, apoio e amor.

À minha irmã Kênya e ao meu cunhado Ângelo pelo incentivo e carinho.

À minha sobrinha Maria Eduarda, presente de Deus, simplesmente por existir.

Ao meu querido orientador Reinaldo Marchetto pela oportunidade concedida, pela paciência e amizade.

Aos meus companheiros de laboratório Ana, Larissa, Edson (Araka), Rute, Grazielly, Matheus, Isabelle, Estéban, Eduardo (lentilha), Júlia e Norival pela convivência, alegrias e dificuldades compartilhadas e por toda a ajuda, em especial ao Anderson, pelo acompanhamento inicial nos experimentos.

Ao pós-doutorando Aderson pelas análises de bioinformática, que contribuíram imensamente para este trabalho.

Ao amigo Paulo Sanches pela parceria de trabalho, pela ajuda nos experimentos e pelos momentos felizes e difíceis compartilhados.

Aos professores Saulo Santesso e Eduardo Maffud pelo carinho e pelas ideias que ajudaram a desenvolver este trabalho.

Às minhas queridas amigas Daniele, Thainá, Juliana, Caroline, Milene, Carla e Lorena pelo ombro amigo e pela força.

Às minhas companheiras da república Dariane, Yara e Juliana pela convivência e amizade.

À querida amiga Marcela, pelo acolhimento em Araraquara e incentivo em participar do processo seletivo que me conduziu ao mestrado.

Ao Sandro, pelo incentivo na decisão de realizar o mestrado.

Ao meu namorado Diego por tantos momentos divididos, pelo companheirismo, pelo amor e por ter trazido tanta luz e alegria aos meus dias.

Aos queridos Ana e Tita por tantos momentos compartilhados, por todo o carinho, apoio e por terem se tornado a minha família em Araraquara.

Ao Instituto de Química por ter me acolhido e permitido a minha formação.

À seção de Pós-graduação, em especial à Célia, Wennia e Sandra por toda a atenção despendida.

Ao pessoal da biblioteca, em especial à Valéria, Cristina e Maria Isabel por toda atenção e ajuda na confecção das referências.

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

À Capes pela bolsa concedida.

“Na busca dos resultados nem sempre o produto final é o mais importante. Por vezes a riqueza se esconde é no processo das descobertas. O processo do ir é tão importante quanto o processo do chegar.” (Padre Fábio de Melo)

## RESUMO

O sistema toxina-antitoxina ParE-ParD é um sistema bacteriano de morte pós-segregacional codificado numa ampla gama de hospedeiros. ParE é uma proteína pequena, de aproximadamente 12 kDa codificada pelo gene *parE*. ParD é uma antitoxina de cerca de 9 kDa, codificada pelo gene *parD*, capaz de complexar com ParE e neutralizá-la. Estudos têm mostrado o envolvimento da enzima DNA girase no processo de morte celular pela ParE, entretanto, não se tem disponível na literatura nenhuma evidência de inibição desta proteína sobre a atividade da topoisomerase IV. Embora encontrada numa ampla diversidade de microorganismos, ParE não possui função celular totalmente elucidada e seu mecanismo de citotoxicidade permanece ainda desconhecido. Com base na estrutura primária da proteína ParE de *E. coli* e nos escassos dados disponíveis para esta toxina, peptídeos miméticos foram racionalmente projetados visando compreender o mecanismo de inibição de ParE sobre a atividade da DNA girase, bem como, avaliar a ação destes miméticos na atividade da Topoisomerase IV e da Topo II humana. Estas sequências peptídicas foram sintetizadas pela metodologia de fase sólida, purificadas e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência e caracterizadas por espectrometria de massas. A capacidade de inibição destes peptídeos miméticos sobre a atividade das topoisomerases foi testada por ensaios de eletroforese em gel. Os peptídeos que apresentaram melhores resultados de inibição sobre a atividade das topoisomerases foram o ParERM3 e o ParEC3, projetados para conter os resíduos de aminoácidos L61-R100 e L69-R100, respectivamente, presentes na porção C-terminal da estrutura da proteína ParE de *Escherichia coli*. A sequência "LNIES" (L101 a S105), quando presente nos peptídeos miméticos atenuou a toxicidade dos mesmos frente às topoisomerases, provavelmente por interferir na interação peptídeo-topoisomerase. Embora não existam dados na literatura abordando a toxicidade da proteína ParE sobre a atividade da topoisomerase IV e da topo II humana, os análogos peptídicos ParERM3 e ParEC3 apresentaram melhores resultados de inibição sobre a atividade destas enzimas, quando comparados à DNA girase. Os resultados de dicróismo circular das sequências peptídicas foram coerentes com a maioria dos modelos gerados por modelagem molecular. A utilização da carboxifluoresceína como marcador para os peptídeos inibidores provavelmente promoveu a desestruturação das sequências peptídicas, o que impossibilitou a análise da interação peptídeo-DNA girase pela técnica de anisotropia de fluorescência. Através da simulação de dinâmica molecular foi possível obter um modelo estrutural para o peptídeo ParERM3 mais próximo da estrutura real em solução. Isto permitiu com que o estudo de docagem molecular fornecesse dados mais satisfatórios, abrindo perspectivas mais promissoras para abordagens de síntese e avaliação de novos compostos peptídicos inibidores da subunidade A da enzima DNA girase. A partir dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que os peptídeos análogos ParERM3 e ParEC3, representam potenciais moléculas bioativas para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos e antitumorais.

**Palavras-chave:** peptídeos, toxina ParE, topoisomerases.

## ABSTRACT

The toxin-antitoxin system ParE-ParD is a bacterial system of post-segregational death encoded in a wide range of hosts. ParE is a small protein of approximately 12 kDa encoded by *parE* gene. ParD is an antitoxin about 9 kDa, encoded by the *parD* gene, able of complexing with ParE and neutralize it. Studies have shown the involvement of the enzyme DNA gyrase in the cell death process by ParE, however, is not available in the literature any evidence of inhibition of this protein on the activity of topoisomerase IV. Although found in a wide variety of micro-organisms, the ParE function has not been fully elucidated and its cytotoxic mechanism remains unknown. Based on the primary structure of the *E. coli* ParE and the limited data available for this toxin, mimetic peptides were rationally designed aiming at understanding the mechanism of inhibition of ParE on the activity of DNA gyrase, as well as on the topoisomerase IV and human topoisomerase II activities. These peptides sequences were synthesized by solid phase methodology, purified and analyzed by high performance liquid chromatography and characterized by mass spectrometry. The ability of these mimetics to inhibit the activity of topoisomerases was tested by electrophoresis on agarose gel. The peptides that showed better results on the inhibition activity of topoisomerases were ParERM3 and ParEC3, designed to contain the L61-R100 and L69-R100 amino acids sequence, respectively, found of the C-terminal portion of the ParE structure of *Escherichia coli*. The "LNIES" sequence (L101 to S105), when present in the mimetic peptides, attenuated the toxicity of the peptides on topoisomerases activity, probably by interfering in the topoisomerase - peptide interactions. Despite the absence of data in the literature regarding the toxicity of ParE protein on the topo IV and human topo II activities, the peptides ParERM3 and ParEC3 showed better inhibitory activity on these enzymes when compared to DNA gyrase. The results of the circular dichroism were consistent with the models generated by molecular modeling. The use of carboxyfluorescein as a marker for inhibitory peptides probably promoted a destructure of the peptide sequences, precluding the analysis of the interaction peptide-DNA gyrase by the fluorescence anisotropy technique. Through the molecular dynamics simulation was possible to obtain a structural model for the peptide ParERM3 closer to the actual structure in solution. So, more satisfactory data from molecular docking data, was provided, opening promising perspectives for new approaches to synthesis and evaluation of novel peptide inhibitor of the A subunit of DNA gyrase enzyme. From the results obtained in this study it is possible concluded that ParERM3 ParEC3 peptides, represent potential bioactive molecules for development of new antimicrobial and antitumor agents.

**Keywords:** peptides, toxin ParE, topoisomerases.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Esquema da molécula do DNA relaxada e subenrolada	21
<b>Figura 2</b> - Esquema da quebra e passagem de um segmento de DNA catalisada por uma topoisomerase	22
<b>Figura 3</b> - Número de ligações <i>Lk</i>	22
<b>Figura 4</b> - Reações catalisadas pelas diferentes topoisomerases	23
<b>Figura 5</b> - Esquema da reação de quebra transitória e posterior união da fita de DNA, catalisada por uma topoisomerase	24
<b>Figura 6</b> - Ação da DNA girase à frente da forquilha de replicação do DNA, introduzindo superenovelamentos negativos, permitindo o alívio da tensão na porção do DNA adjacente à forquilha de replicação	25
<b>Figura 7</b> - Representação dos domínios estruturais da DNA girase de <i>E. coli</i>	26
<b>Figura 8</b> - Similaridade entre as enzimas girase e topo IV	27
<b>Figura 9</b> - Posição do DNA durante ação da DNA girase e da topo IV	28
<b>Figura 10</b> - Esquema geral de sistemas toxina-antitoxina em bactérias	30
<b>Figura 11</b> - Representação esquemática de um processo típico de modelagem comparativa por homologia	34
<b>Figura 12</b> - Representação esquemática de um processo típico de modelagem baseada no reconhecimento de padrões de enovelamento	36
<b>Figura 13</b> - Representação esquemática de um método <i>de novo</i> utilizando combinação de fragmentos	40
<b>Figura 14</b> - Representação esquemática da formação de uma ligação peptídica pela condensação de dois aminoácidos	41
<b>Figura 15</b> - Visualização progressiva de uma resina, a partir de uma unidade macroscópica e as cadeias poliméricas que a compõem até a fórmula molecular de um determinado polímero (a) e principais resinas PS/DVB disponíveis comercialmente, mostrando os diversos <i>linkers</i> (b)	43
<b>Figura 16</b> - Protetores usuais para o grupo $\alpha$ -amina na metodologia da fase sólida	45
<b>Figura 17</b> - Mecanismo de formação de ligação peptídica empregando carbodiimidas	46
<b>Figura 18</b> - Esquema da reação durante o teste de ninidrina	47

<b>Figura 19</b> - Esquema ilustrativo da SPFS	48
<b>Figura 20</b> - Representação da luz circularmente polarizada à direita e à esquerda incidente “a” e transmitida após interagir com a molécula dicróica “b”	56
<b>Figura 21</b> - a) Diagrama da ligação peptídica mostrando a orientação da transição de dipolo $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ . b) Espectros típicos de CD mostrando o perfil característico de $\alpha$ -hélice, folha- $\beta$ e estrutura desordenada	57
<b>Figura 22</b> - Peptídeos racionalmente desenhados com base na região C-terminal da toxina ParE de <i>E.coli</i> . Na figura, E (em azul) representa folha $\beta$ e H (em vermelho) representa $\alpha$ -hélice	64
<b>Figura 23</b> - Estrutura da proteína ParE predita por modelagem molecular	65
<b>Figura 24</b> - Representação de um dos modelos gerados para o Peptídeo ParERM3 e a sequência correspondente	69
<b>Figura 25</b> - Estrutura representativa de um dos modelos gerados para o peptídeo ParEC2 e sequência correspondente	70
<b>Figura 26</b> - Estrutura representativa de dois dos modelos gerados para o peptídeo ParEC3 pelo servidor PEP-FOLD	74
<b>Figura 27</b> - Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo ParERM3 antes (A) e após (B) purificação	76
<b>Figura 28</b> - Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo ParERM3-CBF antes (A) e após (B) purificação	76
<b>Figura 29</b> - Perfil cromatográfico obtido em escala analítica para o peptídeo ParEC1 bruto	77
<b>Figura 30</b> - Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo ParEC2 antes (A) e após (B) purificação	77
<b>Figura 31</b> - Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo ParEC3 antes (A) e após (B) purificação	78
<b>Figura 32</b> - Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo ParEC3-CBF antes (A) e após (B) purificação	78
<b>Figura 33</b> - Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo ParEC4 antes (A) e após (B) purificação	79
<b>Figura 34</b> - Espectro de massas do peptídeo ParERM3	80
<b>Figura 35</b> - Espectro de massas do peptídeo ParERM3-CBF	81
<b>Figura 36</b> - Espectro de massas do peptídeo ParEC1	81

<b>Figura 37</b> - Espectro se massas do peptídeo ParEC2	82
<b>Figura 38</b> - Espectro se massas do peptídeo ParEC3	82
<b>Figura 39</b> - Espectro se massas do peptídeo ParEC3-CBF	83
<b>Figura 40</b> - Espectro se massas do peptídeo ParEC4	83
<b>Figura 41</b> - Espectro de CD de $\alpha$ -hélice (a), folha- $\beta$ (b) e estrutura desordena (c) formadas pelo polipeptídeo poli-L-lisina	85
<b>Figura 42</b> - Espectro de CD do peptídeo ParERM3 (A) e ParERM3-CBF (B)	86
<b>Figura 43</b> - Espectro de CD do peptídeo ParEC2	86
<b>Figura 44</b> - Espectro de CD do peptídeo ParEC3 (A) e ParEC3-CBF (B)	87
<b>Figura 45</b> - Espectro de CD do peptídeo ParEC4	88
<b>Figura 46</b> - Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) dos peptídeos ParERM3 (a), ParEC2 (b), ParEC3 (c) e ParEC4 (d) sobre a atividade da DNA girase	89
<b>Figura 47</b> - Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) dos peptídeos ParERM3 (a), ParEC2 (b), ParEC3 (c) e ParEC4 (d) sobre a atividade da topoisomerase IV	91
<b>Figura 48</b> - Alinhamento múltiplo de várias sequências C-terminal de toxinas bacterianas ParE	92
<b>Figura 49</b> - Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) dos peptídeos ParERM3 (a), ParEC2 (b), ParEC3 (c) e ParEC4 (d) sobre a atividade da topoisomerase II humana	94
<b>Figura 50</b> - Análise da formação de complexos ParERM3-GyrA e ParERM3-GyrB por anisotropia de fluorescência	97
<b>Figura 51</b> - Análise da formação de complexos ParEC3-GyrA e ParEC3-GyrB por anisotropia de fluorescência	97
<b>Figura 52</b> - Ensaio de inibição da atividade da DNA girase pelos peptídeos ParERM3-carboxifluoresceína e ParEC3-carboxifluoresceína	98
<b>Figura 53</b> - Representação dos modelos moleculares para o peptídeo ParERM3 gerados no início (a) e final (b) da simulação de dinâmica molecular	99
<b>Figura 54</b> - Representação dos modelos de docagem molecular realizada para o peptídeo ParERM3 e GyrA	100

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Estrutura primária dos análogos de ParE sintetizados	53
<b>Tabela 2</b> - Protocolo sintético utilizando DIC/HOBt (estratégia Fmoc/tBu)	54
<b>Tabela 3</b> - Estrutura primária dos análogos de ParE sintetizados	64
<b>Tabela 4</b> - Representação dos 10 modelos sobrepostos para a sequência de aminoácidos do peptídeo ParERM3 gerados pelo servidor LOMETS	67
<b>Tabela 5</b> - Representação dos 10 modelos sobrepostos para a sequência de aminoácidos do peptídeo ParERM3 gerados pelo servidor QUARK	68
<b>Tabela 6</b> - Representação dos 10 modelos sobrepostos para a sequência de aminoácidos do peptídeo ParEC2 gerados pelo servidor PEP-FOLD	70
<b>Tabela 7</b> - Representação dos 10 modelos sobrepostos para a sequência de aminoácidos do peptídeo ParEC3 gerados pelo servidor LOMETS	72
<b>Tabela 8</b> - Representação dos 10 modelos sobrepostos para a sequência de aminoácidos do peptídeo ParEC3 gerados pelo servidor PEP-FOLD	73
<b>Tabela 9</b> - Representação dos modelos sobrepostos para a sequência de aminoácidos do peptídeo ParEC4 gerados pelo servidor PEP-FOLD	74
<b>Tabela 10</b> - Relação das massas dos peptídeos purificados	79
<b>Tabela 11</b> - Resultado das análises de Espectrometria de massas	84
<b>Tabela 12</b> - Comparação da atividade inibitória dos peptídeos análogos da proteína ParE de <i>E.coli</i> em topoisomerasas bacterianas	92

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

### 1.0 Aminoácidos

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

### 2.0 Outras

ACN - acetonitrila  
Boc - *t*-Butiloxicarbonila  
CBF - carboxifluoresceína  
CcdA - Antitoxina (*control cell division A*)  
CcdB - Toxina (*control cell division B*)  
CD - dicroísmo circular  
DCM - diclorometano  
DIC - diisopropilcarbodiimida

DIEA - N - diisopropiletilamina  
DM - dinâmica molecular  
DMF - N, N - Dimetilformamida  
Girase - DNA-girase  
EDT - 1, 2-etanoditiol  
EDTA - ácido etilenodiaminotetraacético  
Fmoc - 9- Fluorenilmetiloxicarbonila  
HOBt - N-Hidroxibenzotriazol  
HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência  
LC-MS - cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas  
NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards  
NMP - N-metilpirrolidona  
PDB - protein data bank  
RP- HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa  
SPFS - síntese de peptídeos em fase sólida  
STEB - carregador de DNA - sacarose, tris, EDTA e azul de bromofenol  
TA - sistema toxina-antitoxina  
TBE - tampão para eletroforese tris/boro/EDTA  
tBu - terc-butila  
TFA - ácido trifluoroacético  
TFE - trifluoroetanol  
TIS - triisopropilsilano  
Topo IV - Topoisomerase IV

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>20</b>
1.1	Prospecção de novos antimicrobianos (fármacos)	20
1.2	DNA Topoisomerases: alvos estratégicos para novos fármacos	21
1.3	DNA Girase	25
1.4	Topo IV	27
1.5	Sistemas Toxina-Antitoxina (TA): Perspectivas biotecnológicas	28
1.6	Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos	31
1.6.1	Modelagem comparativa ou por homologia	32
1.6.2	Modelagem baseada em conhecimento: reconhecimento de padrões de enovelamento via <i>threading</i> (alinhamento)	35
1.6.3	Modelagem por Primeiros Princípios ou Predição <i>ab initio</i>	36
1.6.4	Predição <i>de novo</i>	38
1.7	Química de peptídeos	41
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>49</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>50</b>
3.1	Reagentes e solventes	50
3.2	Material Biológico	51
3.3	Equipamentos	51
3.4	Predição de estruturas secundárias das sequências peptídicas	52
3.5	Síntese de peptídeos	52
3.6	Síntese de peptídeos	54
3.7	Dicroísmo circular (CD)	55
3.8	Ensaio de Inibição da atividade da DNA girase	58

3.9	Inibição da atividade da topoisomerase IV	58
3.10	Inibição da atividade da Topoisomerase II	59
3.11	Marcação dos peptídeos ParERM3 e ParEC3 com carboxifluoresceína	59
3.12	Espectroscopia de fluorescência	59
3.13	Simulação de dinâmica molecular associada a docking	61
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	63
4.1	Desenho racional dos peptídeos derivados da proteína ParE de <i>E. coli</i>	63
4.2	Predição da estrutura secundária dos peptídeos derivados da proteína ParE de <i>E. coli</i> – Bioinformática	65
4.3	Síntese, purificação e caracterização dos peptídeos	75
4.4	Estudos estruturais por dicroísmo circular (CD)	84
4.5	Ensaio de inibição da atividade das topoisomerasas bacterianas	88
4.6	Ensaio de inibição da atividade da topoisomerase II humana	93
4.7	Avaliação da interação dos peptídeos com a DNA Girase	95
5	<b>CONCLUSÕES</b>	101
	<b>REFERÊNCIAS</b>	103

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Prospecção de novos antimicrobianos (fármacos)

As doenças infecciosas estão entre as principais causas de morte da população humana o que, em grande parte, está relacionado com o surgimento de microrganismos multirresistentes aos medicamentos existentes no mercado. A resistência a antimicrobianos é um exemplo clássico de evolução em resposta a uma forte pressão de seleção, geralmente atribuído ao uso intensivo ou inadequado desses compostos. Este fato está relacionado a questões de duração e intensidade do tratamento, resultando em graves problemas de saúde pública e vultosos prejuízos econômicos. Embora exista uma ampla gama de antibióticos de última geração disponível atualmente, a pesquisa por novos antimicrobianos, mais potentes e menos susceptíveis a resistência bacteriana é de fundamental importância. O uso de novas tecnologias para o desenvolvimento de fármacos mais eficazes constitui uma estratégia promissora no campo da biotecnologia, possibilitando a iniciativa de prospecção de novas classes de moléculas naturais ou sintéticas (LOHNER & STAUDEGGER, 2001).

Peptídeos antimicrobianos isolados a partir de vários organismos tais como bactérias, plantas, vertebrados e invertebrados são conhecidos por atuarem em mecanismos de defesa (BOMAN, 1995; JACK et al., 1995). Estes peptídeos e seus análogos possuem um amplo espectro de ação contra bactérias resistentes a antibióticos, e estão, atualmente, entre a classe de potenciais agentes antimicrobianos que podem vir a complementar a ação dos antibióticos já existentes (SKERLAVAJ et al., 1999; CUDIC et al., 2002; JASIR et al., 2003).

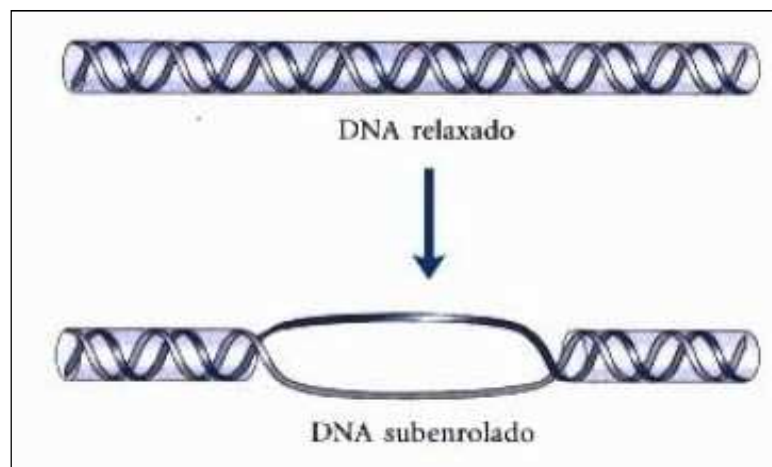
Os recentes anos testemunharam o renascimento das pesquisas no campo dos peptídeos biologicamente ativos. No início do século, mais de 40 peptídeos estavam no mercado, mais 4 estavam em fase de registro, 200 estavam sendo aplicados em testes clínicos e mais de 400 já passavam por ensaios pré-clínicos avançados (ALBERICIO, 2004). A *U.S. Food and Drug Administration*, a agência norte americana que aprova os novos medicamentos, multiplica a cada ano a entrada de peptídeos no mercado, com um crescimento anual de 8% e uma previsão de negócio de 11,5 bilhões de euros para 2013, segundo estudos do setor

(VLIEGHE, 2010). Este conjunto de dados comprova a importância dos peptídeos terapêuticos tanto para a área da saúde como para a área econômica e sinaliza um futuro muito promissor para a química de peptídeos.

## 1.2 DNA Topoisomerasas: alvos estratégicos para novos fármacos

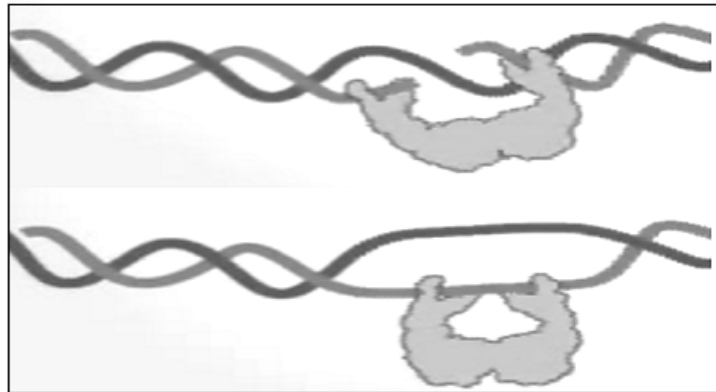
As topoisomerasas constituem um grupo de enzimas que se tornou alvo efetivo para vários agentes terapêuticos. Tais enzimas estão presentes em todas as células de eucariotos e procariotos (REECE & MAXWELL, 1991). Estas enzimas catalisam mudanças topológicas no DNA, imprescindíveis ao metabolismo (WANG, 1985). Para a maioria dos processos metabólicos que necessitam acessar as informações armazenadas no DNA, as duas fitas da hélice devem se separar de forma temporária, como na transcrição ou permanentemente, como na replicação (Figura 1). Os impasses topológicos do DNA gerados a partir destes e de outros eventos são solucionados pelas topoisomerasas, que se encarregam de manter o funcionamento e a viabilidade celular. Estas enzimas introduzem uma quebra transitória em um segmento do DNA, seguida da passagem de outro segmento por essa abertura, de modo a reduzir as tensões presentes na molécula devido ao seu alto estado de compactação ou geradas pela separação das fitas (Figura 2) (CHAMPOUX, 2001; NELSON & COX, 2011).

**Figura 1.** Esquema da molécula do DNA relaxada e subenrolada.



**Fonte:** NELSON & COX (2011).

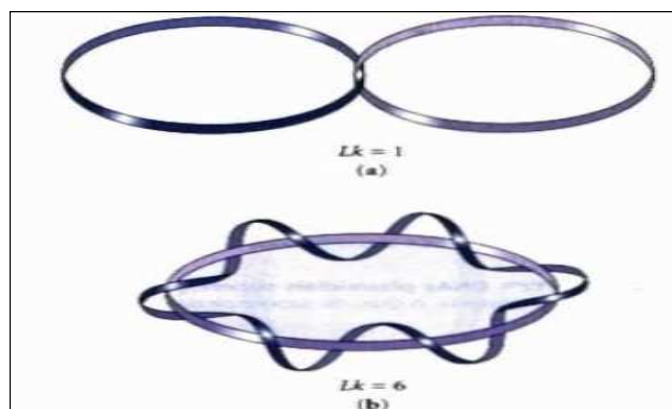
**Figura 2.** Esquema da quebra e passagem de um segmento de DNA catalisada por uma topoisomerase.



**Fonte:** Adaptado de <http://www.dnatube.com/video/283/Supercoiled-DNA-topoisomerase>.

Existem duas classes de topoisomerases: tipo I e tipo II. 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. Esta movimentação proporciona uma alteração no número de ligações das fitas, em aumentos de uma unidade. As topoisomerases do tipo II quebram as duas fitas do DNA simultaneamente, reunindo-as, posteriormente, resultando num aumento do número de ligações em duas unidades. Para melhor compreensão do processo de alteração do número de ligações das fitas, a Figura 3 representa de forma simplificada este conceito.

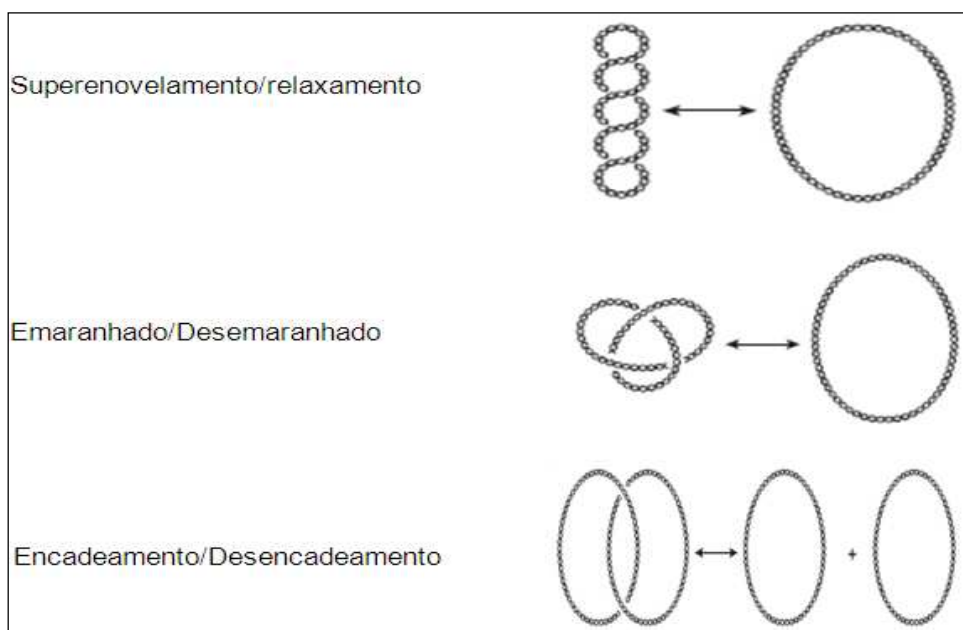
**Figura 3.** Número de ligações  $Lk$ . Em (a),  $Lk = 1$ , existe apenas um ponto de ligação entre as duas fitas do DNA, enquanto que em (b), pode-se observar a existência de seis pontos de ligações entre as fitas, gerando um  $Lk = 6$ .



**Fonte:** NELSON & COX (2011).

O relaxamento do DNA é uma reação comum a todas as topoisomerases, entretanto, outras reações também são catalisadas por estas enzimas (Figura 4). Exemplos destas diferentes reações essenciais para o metabolismo do DNA são: a introdução de super-hélices negativas ou positivas, “catenation” ou “decatenation” (encadeamento ou desencadeamento) de dois dúplex cíclicos (KREUZER & COZZARELLI, 1980; MARIANS, 1987), além de desfazer o “knotted” (emaranhado) topológico de uma única molécula de DNA dúplex circular (LIU, et al., 1980).

**Figura 4.** Reações catalisadas pelas diferentes topoisomerases.

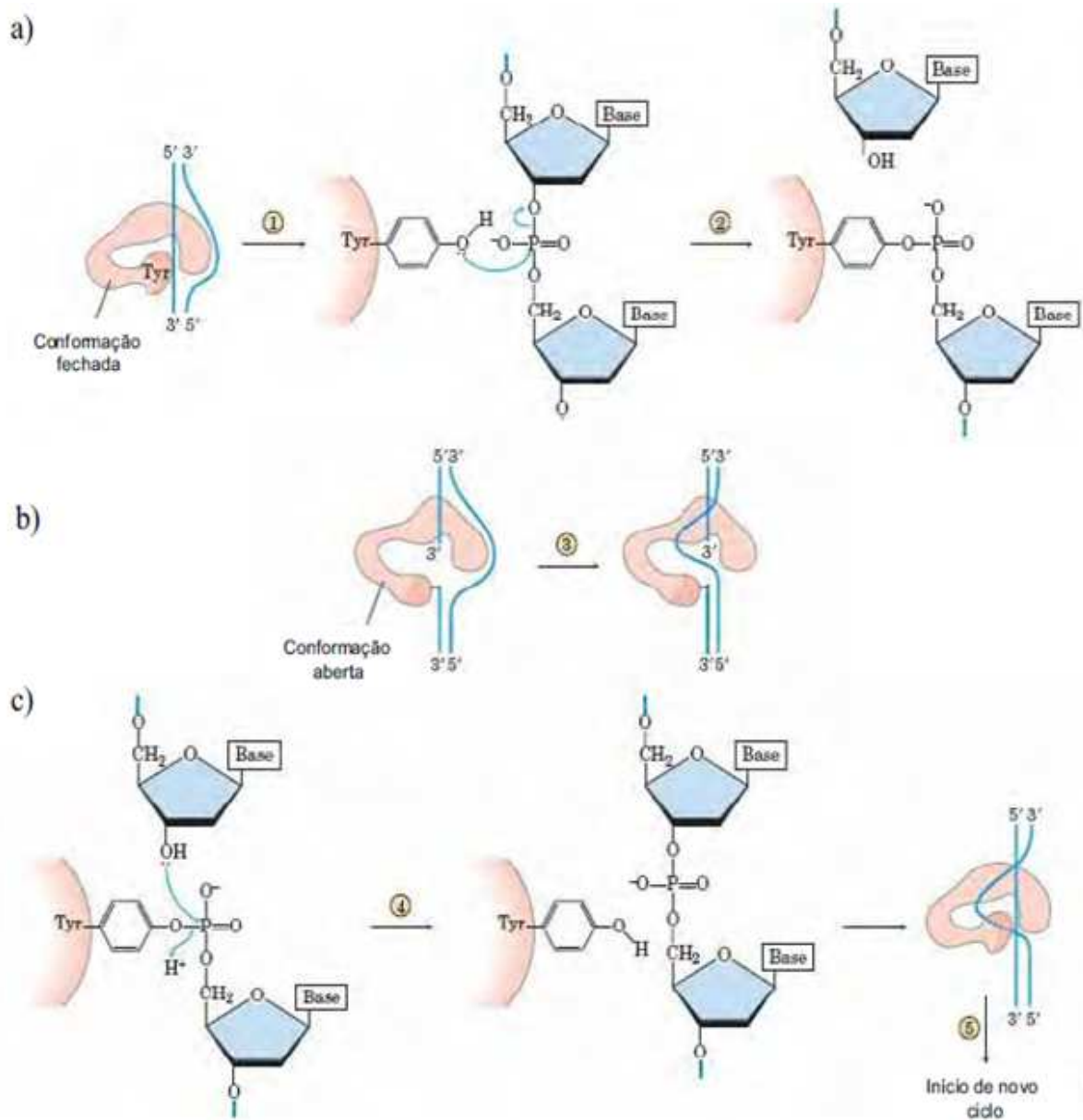


**Fonte:** Adaptado de HOLDEN (2001).

O mecanismo de ação das topoisomerases baseia-se em um processo de transesterificação. Na reação de quebra de um segmento do DNA, o par de elétrons livres do oxigênio fenólico do resíduo de tirosina 122 (Tyr-122) da enzima ataca o átomo de fósforo do DNA, formando uma ligação covalente com ele e, simultaneamente, quebrando a ligação fosfodiéster (Figura 5).

O religamento da molécula quebrada ocorre por uma segunda transesterificação, que basicamente é o inverso da primeira: o par de elétrons do oxigênio do grupo hidroxila terminal do DNA, gerado na primeira reação, ataca o átomo de fósforo da ligação covalente entre a proteína e o DNA, restabelecendo assim a ligação da estrutura original do DNA (WANG, 2002).

**Figura 5.** Esquema da reação de quebra transitória e posterior união da fita de DNA, catalisada por uma topoisomerase.



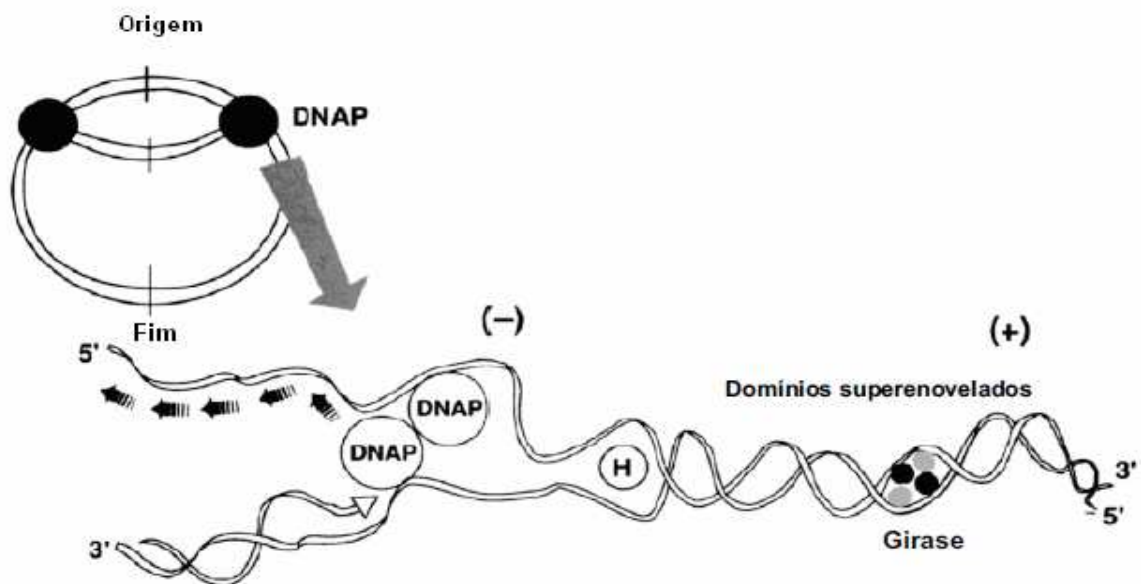
**Fonte:** NELSON & COX (2011).

DNA girase e topoisomerase IV (Topo IV) são exemplos de topoisomerases do tipo II, que compartilham considerável similaridade na sequência de aminoácidos e atuam essencialmente do mesmo modo, ou seja, pela formação de uma quebra simultânea nas duas fitas de DNA e pela catálise da passagem do DNA dúplice, reunindo as extremidades quebradas (TSE-DINH, 2009).

### 1.3. DNA Girase

Em 1976, Gellert e colaboradores descobriram uma enzima bacteriana responsável por controlar um processo bastante específico durante a replicação do DNA nas células. Além de compartilhar do mecanismo geral das topoisomerases, a DNA girase possui características de mecanismo especiais, que determinam sua habilidade única em introduzir super-hélices negativas no DNA. Tal reação de superenrolamento do DNA (torção da dupla hélice sobre seu próprio eixo) requer além de ATP, um cátion bivalente, tal como  $Mg^{2+}$  (GELLERT et al., 1976; MAXWELL, 1992). A capacidade da DNA girase em introduzir super hélices negativas em um anel ou loop do DNA relaxado (Figura 6), faz com que esta enzima desempenhe um papel essencial para os passos de iniciação e alongação durante a replicação do DNA, bem como para os processos de condensação e segregação, sendo, portanto de fundamental importância para a manutenção celular.

**Figura 6.** Ação da DNA girase à frente da forquilha de replicação do DNA, introduzindo superenovelamentos negativos, permitindo o alívio da tensão na porção do DNA adjacente à forquilha de replicação. DNAP (DNA-polimerase); H (helicase); as setas representam os fragmentos de Okazaki.



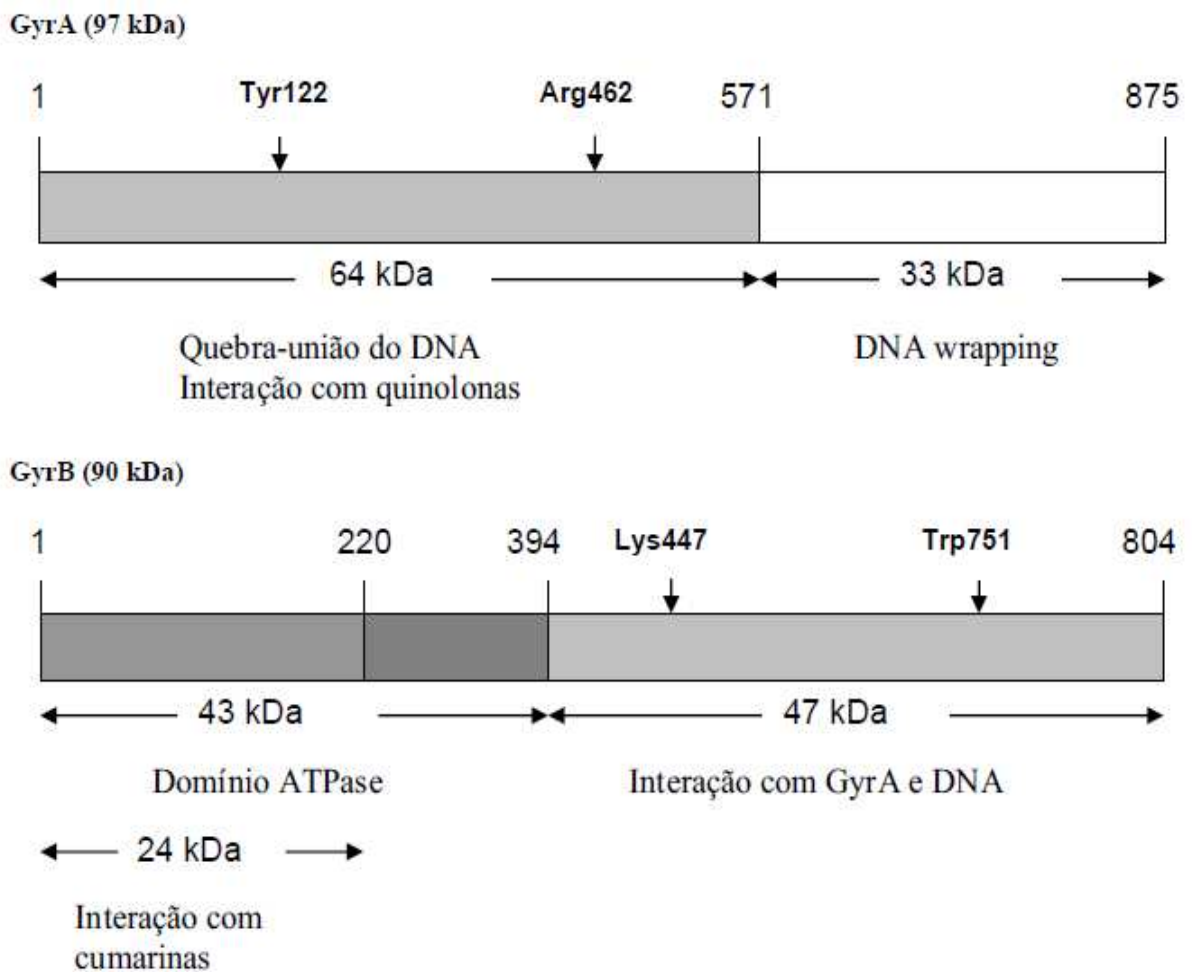
**Fonte:** ANDRIOLE (2000).

A DNA girase é encontrada somente em organismos procariotos, o que faz desta enzima alvo de importância indiscutível para agentes antimicrobianos. A característica única apresentada por esta classe de enzimas torna viáveis estudos

envolvendo interação e inibição enzimática através da análise da migração das diferentes formas do DNA, quando submetidas a um campo elétrico.

A estrutura da DNA girase de *Escherichia coli* consiste de duas subunidades A (GyrA) e duas B (GyrB), as quais estão organizadas formando um heterotetrâmero tipo  $A_2B_2$ , representando assim, a forma ativa da enzima (SMITH & MAXWELL, 2006). Cada uma das subunidades possui dois domínios com funções distintas. O domínio N-terminal da GyrA contém resíduos envolvidos na clivagem e religamento do DNA, enquanto o domínio C-terminal possui a função de ligação da enzima ao DNA. O domínio N-terminal da GyrB contém o sítio de hidrólise de ATP e o domínio C-terminal interage com a subunidade GyrA e com o DNA (Figura 7) (NOLLMANN et al., 2007).

**Figura 7.** Representação dos domínios estruturais da DNA girase de *E. coli*.

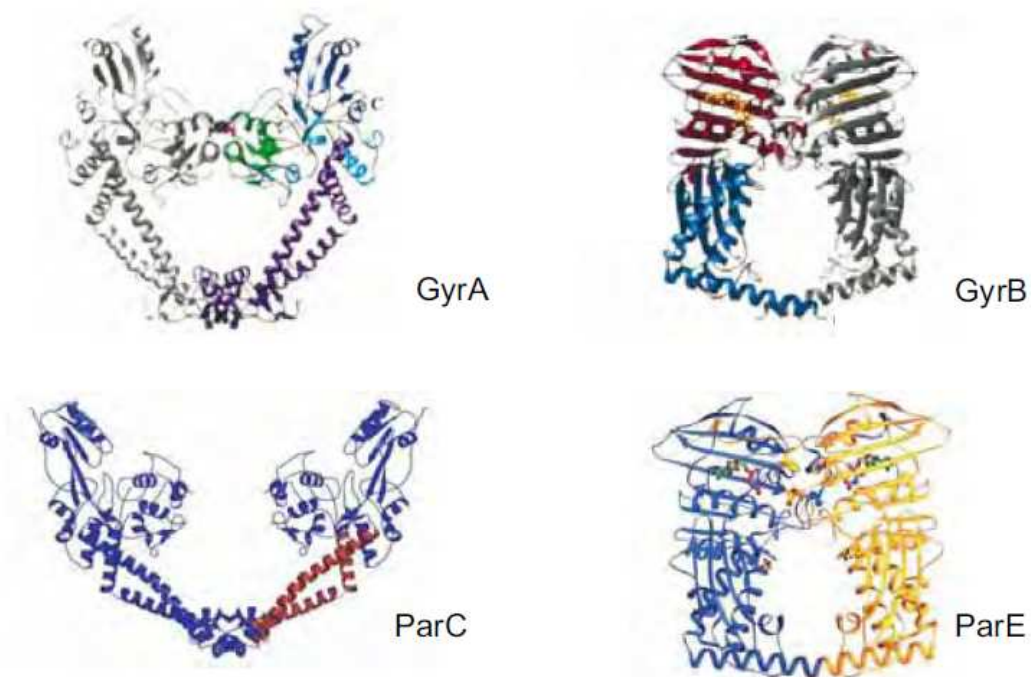


**Fonte:** Adaptado de REECE & MAXWELL (1991).

### 1.4 Topo IV

Em 1990, KATO e colaboradores descobriram uma enzima, denominada topoisomerase IV (topo IV), que compartilha significativa similaridade estrutural e catalítica com a DNA girase. A topo IV também é composta por quatro subunidades, duas ParC e duas ParE, tendo como forma ativa o heterotetrâmero ParC<sub>2</sub>ParE<sub>2</sub> (Figura 8) (PENG & MARIANS, 1993). Análises de sequência de DNA demonstraram que os genes *parC* e *parE* possuem significativa homologia com os genes *gyrA* e *gyrB* respectivamente da DNA girase (PENG & MARIANS, 1995). Como na GyrA, a subunidade ParC possui na região C-terminal o sítio de ligação da enzima ao DNA, enquanto a região N-terminal contém o domínio que envolve a clivagem e religação do DNA. A subunidade ParE, que corresponde à GyrB, possui na região C-terminal o domínio que envolve a interação com ParC e na região N-terminal o sítio de hidrólise de ATP.

**Figura 8.** Similaridade entre as enzimas girase e topo IV. Subunidades da DNA girase, GyrA e GyrB; Subunidades da Topo IV, ParC e ParE.

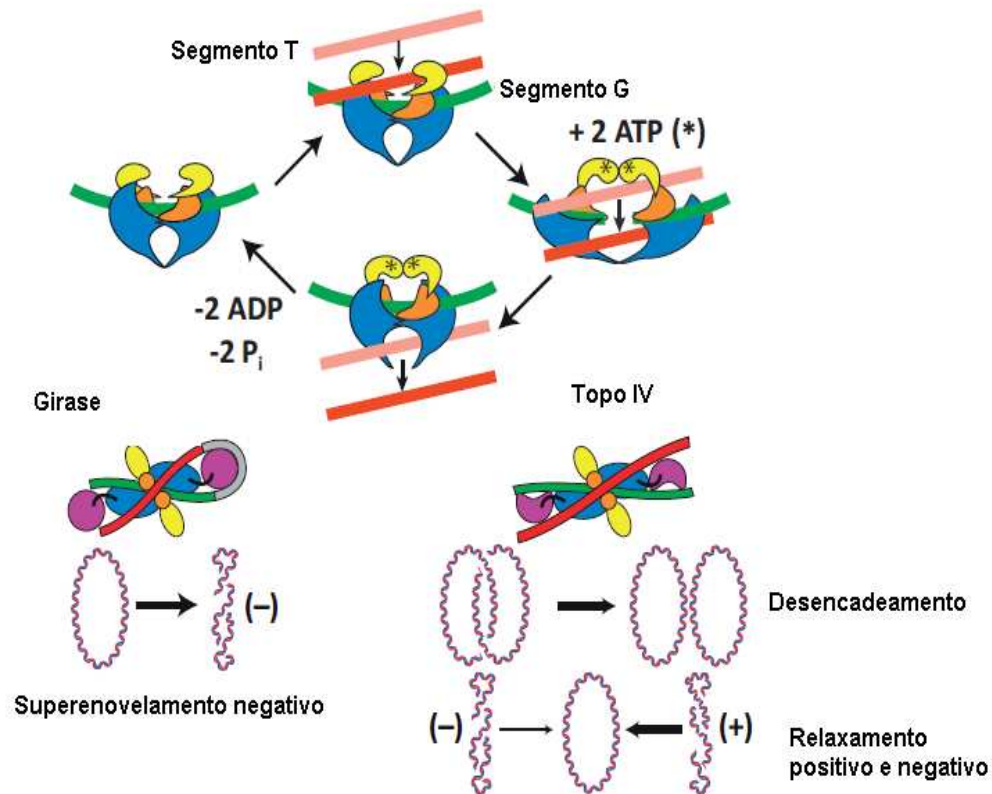


**Fonte:** PENG & MARIANS (1995).

Apesar da similaridade entre as enzimas, elas diferem entre si em um aspecto fundamental: a DNA girase envolve o DNA ao redor de si mesma, enquanto a topo IV não (Figura 9). Essa sutil diferença favorece a atividade da topo IV no

desencadeamento do DNA, além de dotá-la de certa especificidade em termos de relaxamento (NEUMAN, 2010).

**Figura 9.** Posição do DNA durante ação da DNA girase e da topo IV.



**Fonte:** Adaptado de NEUMAN (2010).

Uma gama considerável de compostos tem demonstrado efeito inibitório sobre a DNA girase e topo IV, dentre eles destacam-se as famílias das quinolonas e das cumarinas (MAXWELL, 1992, 1993 e 1997. Outros inibidores de topoisomerases tais como Microcinas B17 (HEDDLE et al., 2001), CcdB (COUTURIER et al., 1998) e ParE (JIANG et al., 2002; JOHNSON et al., 1996) inibem a DNA girase, entretanto nenhuma evidência quanto ao mecanismo da atividade inibitória dessas toxinas sobre a topo IV tem sido encontrada.

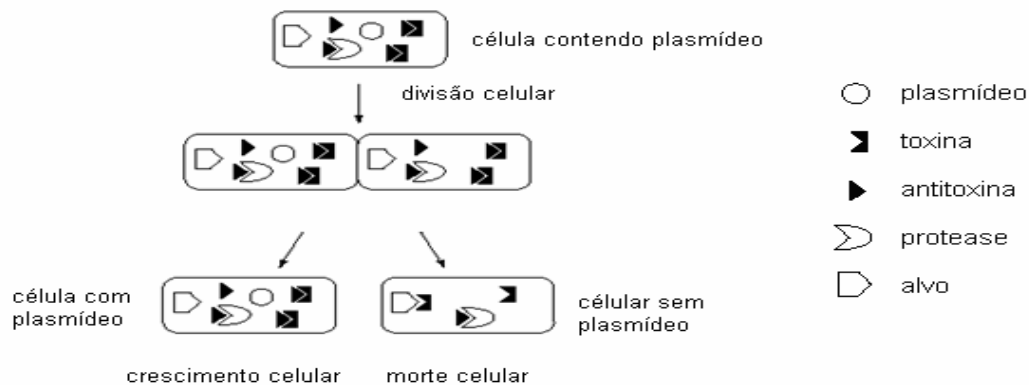
### 1.5 Sistemas Toxina-Antitoxina (TA): Perspectivas biotecnológicas

Os sistemas toxina-antitoxina bacterianos foram inicialmente identificados em plasmídeos como elementos genéticos que promovem estável herança plasmidial (GERDES et al.; JAFFE et al., 1985). Uma característica interessante de plasmídeos

bacterianos é a notória habilidade de se manter de forma estável em populações de bactérias em crescimento. Esta estabilidade resulta de processos codificados por plasmídeos que garantem a existência de um número suficiente de cópias de um plasmídeo em uma célula bacteriana e que cada célula filha receberá pelo menos uma cópia do elemento plasmidial durante a divisão celular. Uma variedade de mecanismos regulatórios é codificada por plasmídeos, o que permite responder a flutuações no número de cópias plasmidiais e na manutenção destes elementos. Sabe-se também que cópias de plasmídeos em número baixo e moderado não são distribuídas aleatoriamente para as células filhas durante a divisão celular, mas ao contrário, carregam genes de divisão que garantem a distribuição das cópias plasmidiais para cada célula filha. A presença de sistemas de morte pós-segregacional (PSK) em um plasmídeo também contribui para a manutenção plasmidial em virtude da habilidade do sistema em matar ou inibir o crescimento de células filhas que não herdaram uma cópia do plasmídeo durante o processo de divisão celular (JIANG et al., 2002).

Sistemas ativos de morte pós-segregacional (PSK) estão descritos para plasmídeos em uma ampla gama de bactérias. Uma grande classe de sistemas PSK, conhecidos como sistemas proteicos TA, consiste de duas proteínas, uma com atividade tóxica (toxina) e a outra com atividade neutralizante, ou seja, uma antitoxina. A viabilidade de células bacterianas que abrigam plasmídeos com sistemas TA é potencialmente comprometida pela presença de produtos codificados por genes plasmidiais, que são tóxicos para a célula. Células que carregam tais plasmídeos sobrevivem porque estes codificam, além da toxina, um segundo produto que age como um antídoto (JENSEN & GERDES, 1995; HAYES, 2003). Após a divisão celular, cada célula filha vai herdar alguns dos complexos toxina-antitoxina do citoplasma. Quando uma célula filha não herda uma cópia do plasmídeo, a síntese da antitoxina não é mais possível (WILBAUX et al., 2007). A degradação da antitoxina, menos estável, subsequentemente levará à liberação da toxina, que poderá então inibir um determinado processo celular, levando a célula à morte (LEPLAE et al., 2011) (Figura 10).

**Figura 10.** Esquema geral de sistemas toxina-antitoxina em bactérias.



**Fonte:** COUTURIER, BAHASSI & VAN MELDEREN (1998).

O sistema proteico PSK mais conhecido é codificado pelo plasmídeo F e consiste de duas proteínas, CcdB, a toxina, e sua antitoxina CcdA (JAFÉ et al., 1985). Outro sistema PSK bastante interessante é codificado pelo plasmídeo RK2 (60 Kb), presente numa ampla gama de hospedeiros. Apesar de relativo baixo número de cópias, cinco a oito cópias por cromossomo, este plasmídeo possui manutenção estável em uma variedade de bactérias Gram-negativas (THOMAS & HELINSKI, 1989). Devido a esse baixo número de cópias, é provável que ele codifique um ou mais elementos que garantam sua manutenção dentro de populações bacterianas. O plasmídeo RK2 e seu homólogo RP4, isolado de *Pseudomonas sp.*, possuem uma região de 3,2 Kb importante para a manutenção da estabilidade plasmidial. Esta região, conhecida como RK2 ou RP4par, codifica vários genes em dois operons distintos, *parDE* e *parCBA*. O operon *parCBA* codifica os genes *parC*, *parB* e *parA*. A proteína ParA, uma resolvase, converte formas multiméricas de plasmídeos em monômeros. Já as proteínas ParB e ParC não possuem função elucidada. O operon *parDE* codifica os genes para a toxina ParE (12kD) e a antitoxina ParD (9 kD). Os promotores *PparCBA* e *PparD* são autoregulados pelas proteínas ParA e ParD, respectivamente (JIANG et al., 2002; JOHNSON et al., 1996).

As toxinas bacterianas são divididas em superfamílias. A superfamília RelE inclui as famílias RelE, YafQ, Higb, Yoeb, Txe, YhaV e ParE. As toxinas da superfamília RelE são caracterizadas por possuírem atividade RNase (FRANCUSKI & SAENGER, 2009). Um estudo mostrou que a toxina ParE, diferentemente dos

outros elementos que compõem a superfamília RelE, possui atividade citotóxica na replicação do DNA por interferir na ação da DNA girase (JIANG et al, 2002). Deste modo, embora a ParE apresente uma origem comum e similaridade de sequência significativa, tal toxina pode ter divergido em seu mecanismo de ação (ANANTHARAMAN & ARAVIND, 2003).

Até o momento existe apenas uma estrutura cristalográfica disponível para a toxina ParE e o mecanismo de citotoxicidade da mesma permanece a ser determinado (DALTON & CROSSON, 2010).

Uma estratégia para o desenvolvimento de novas drogas antibacterianas é a projeção de um inibidor específico baseado na interação entre a toxina e o alvo celular. Assim, o modo como a toxina se liga ao alvo celular poderia ser simulado por moléculas pequenas, que poderiam ser desenvolvidas como novos agentes antibacterianos (BARBOSA et al., 2013).

As proteínas com ação antimicrobiana, tal como a toxina ParE, bem como seus análogos químicos e peptídeos derivados podem contribuir para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, mais potentes e menos susceptíveis a resistência bacteriana. Nesse contexto, a modelagem molecular pode ser utilizada como importante ferramenta para o planejamento racional de compostos com potencial farmacológico.

### **1.6. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos**

A modelagem molecular consiste em um conjunto de ferramentas para a 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 recentes de modelagem molecular (WERMUTH et al., 1998).

A predição da estrutura tridimensional (3D) de proteínas (PEP) 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 & OUELLETTE, 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 avaliação bianual CASP (*Comparative Assessment of Methods for Protein Structure Prediction*) é realizada para avaliar os métodos de predição de estruturas de proteínas (MOULT et al., 2009). O principal objetivo dessa avaliação é verificar a qualidade e eficiência dos métodos de predição de estruturas existentes. Diversas sequências proteicas são disponibilizadas e ao final da competição uma classificação é então divulgada com o desempenho dos grupos participantes. As sequências alvo são divididas em duas categorias: *template - based modelling* e *template free modelling*. A primeira categoria corresponde àquelas sequências que já possuem estruturas tridimensionais relacionadas conhecidas, enquanto para a segunda categoria esse relacionamento não pode ser detectado (MOULT et al., 2009).

Muitas metodologias foram propostas ao longo dos últimos anos como solução para o problema da predição do enovelamento de proteínas (MOUT, 2005; OSGUTHORPE, 2000; TRAMONTANO & LESK, 2006). Essas metodologias podem ser classificadas em dois grandes grupos. Ao primeiro grupo pertencem os métodos de modelagem comparativa por homologia e métodos baseados em conhecimento (MARTIM-REMO et al., 2000). Ao segundo grupo pertencem os métodos *ab initio* e os métodos *de novo* (ROHL et al., 2004; SRINIVASAN & ROSE, 1995) os quais possuem a capacidade de prever novas formas de enovelamento para proteínas que não possuem homólogas no PDB (*Protein Data Bank*).

### 1.6.1 Modelagem comparativa ou por homologia

As proteínas existentes na natureza foram selecionadas ao longo do processo de evolução. Neste contexto, as proteínas evolutivamente relacionadas possuem similaridade de estrutura primária, a qual é chamada homologia. Segundo (KACZANOWSKI e ZIELENKIEWICZ, 2010), proteínas homólogas quase sempre possuem estruturas tridimensionais semelhantes. Quando a homologia é detectada,

geralmente com mais de 30% de identidade, a modelagem pode proceder realizando a cópia das coordenadas 3D de um molde ou obtendo a média entre múltiplos moldes e substituindo estas na proteína-alvo (KOLINSKI, 2004; BUJNICKI, 2006).

Na modelagem comparativa por homologia uma sequência de resíduos de aminoácidos de uma proteína (sequência alvo) é alinhada contra a sequência de aminoácidos de outra proteína com estrutura conhecida e armazenada no PDB (sequência e estrutura-molde) (BERMAN et al., 2000). De acordo com (STERNBERG, 1997), um método de predição baseado em homologia possui seis passos básicos:

1. Encontrar um conjunto de proteínas, determinadas experimentalmente, que são homólogas à sequência da proteína-alvo;
2. Estabelecer um alinhamento de sequência entre a sequência-alvo e as proteínas com estruturas determinadas experimentalmente;
3. Identificar segmentos da cadeia principal da estrutura desconhecida que são conservados em relação a estruturas conhecidas;
4. Modelar as regiões variáveis;
5. Modelar as cadeias laterais da proteína-alvo;
6. Refinar a estrutura predita através de métodos de refinamento, tendo como base a energia potencial.

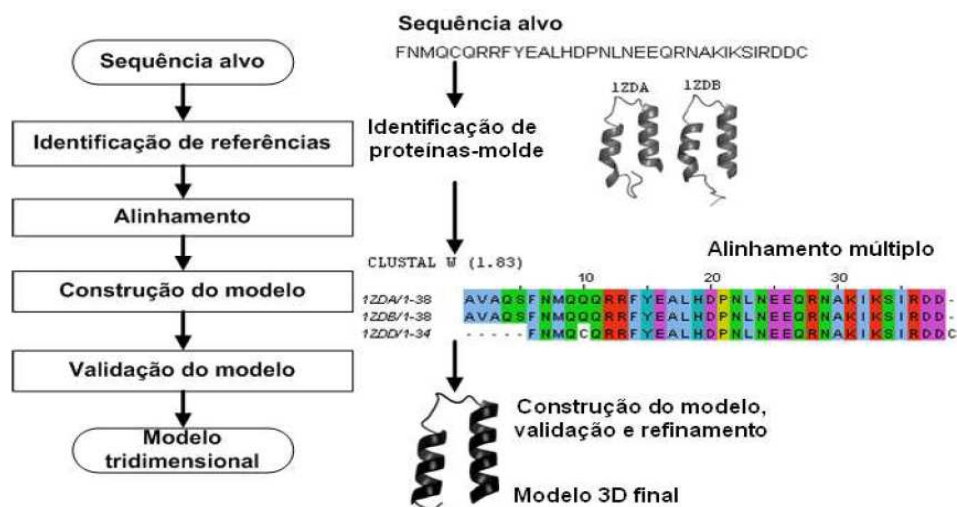
A Figura 11 esquematiza um processo típico de modelagem comparativa por homologia. Inicialmente, sequências similares à sequência-alvo são coletadas usando ferramentas de busca em banco de dados (TRAMONTANO & LESK, 2006). As sequências encontradas são realinhadas usando um programa específico para alinhamento múltiplo de sequências, como por exemplo, o CLUSTALW (HIGGINS et al., 1994). Este alinhamento entre a sequência da proteína-alvo e as sequências de proteínas com estruturas conhecidas irão formar a base do modelo. Em seguida, procede-se construindo a cadeia principal das regiões homólogas à estrutura da cadeia principal de regiões divergentes e por último as cadeias laterais. A avaliação final do modelo é feita levando-se em consideração toda a informação disponível da proteína de interesse (TRAMONTANO & LESK, 2006). Segundo (BAXEVANIS & OUELLETTE, 2005), o passo mais crítico na modelagem por homologia é o

alinhamento. Um alinhamento incorreto pode produzir um efeito de distorção dos demais passos, gerando um modelo de estrutura final distorcido e incorreto.

A modelagem comparativa por homologia de sequência se apresenta como o método de predição com maior acurácia nos resultados finais (MARTIM-REMON et al., 2000). Segundo (TRAMONTANO & LESK, 2006), este método é o mais utilizado para predição de estruturas de proteínas, e isto se deve a duas razões: primeiro à qualidade dos modelos preditos, que possuem uma razoável relação evolucionária, apresentam-se com uma acurácia maior do que aquelas produzidas com técnicas diferentes. O segundo motivo, se refere ao fato de que a confiabilidade do modelo pode ser estimada *a priori*. Desta forma, é possível estimar a qualidade da estrutura predita.

Apesar das vantagens descritas para a modelagem comparativa por homologia, tal como a alta qualidade em suas predições, esta técnica também apresenta suas limitações. A primeira limitação diz respeito à impossibilidade de realizar a predição de novas formas de enovelamento. Isto é explicado pelo fato de tal metodologia estar presa às formas de enovelamento conhecidas e armazenadas no banco de dados de estruturas (PDB). A segunda limitação se refere ao fato de não ser possível estudar o processo de enovelamento da proteína, ou seja, o caminho que a proteína percorre do seu estado de desenovelado até o seu estado enovelado e funcional (estado nativo).

**Figura 11.** Representação esquemática de um processo típico de modelagem comparativa por homologia.



**Fonte:** Adaptado de MARTIM-REMON et al., (2000).

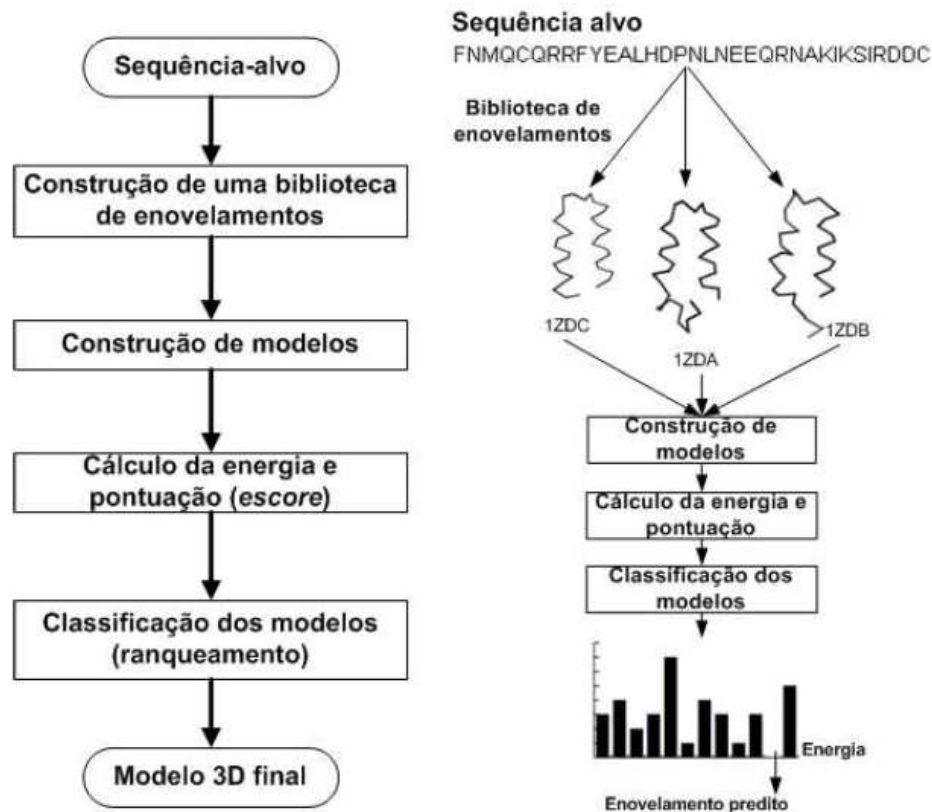
### 1.6.2 Modelagem baseada em conhecimento: reconhecimento de padrões de enovelamento via *threading*

Proteínas não evolutivamente relacionadas (não homólogas) também podem ter estruturas, similares, assumindo o mesmo tipo de enovelamento. Baseando-se nos enovelamentos protéicos conhecidos, os cientistas têm assumido que o número de enovelamentos possíveis seja finito, para todas as proteínas existentes (ISAEV, 2004). Isso devido ao fato de que algumas proteínas com o mesmo enovelamento conhecido não possuem relação evolutiva nem funcional.

Os métodos baseados em conhecimento utilizam, para realizar as suas predições, potenciais estatísticos derivados da análise de padrões de enovelamento de proteínas com estruturas 3D conhecidas e armazenadas em uma base de dados de estruturas. Métodos de reconhecimento de motivos estruturais via *threading* são um exemplo de método pertencente a esta metodologia. Estes métodos se baseiam na observação de que uma larga porcentagem de proteínas adota um número limitado de formas de enovelamento. Existem aproximadamente dez diferentes formas de enovelamento em 50% das estruturas conhecidas (RUSSELL & BARTON, 1994). Através da detecção de similaridades estruturais, as quais não podem ser detectadas unicamente pela similaridade entre as sequências de aminoácidos, são construídos os modelos 3D. A Figura 12 esquematiza um método genérico de predição de estruturas baseado no reconhecimento de padrões de enovelamento.

Inicialmente, para uma dada sequência de resíduos de aminoácidos, é construída uma biblioteca de padrões de enovelamento. Se fragmentos da sequência da proteína-alvo se ajustam bem à estas formas de enovelamento, é possível deduzir um alinhamento, mesmo que não haja informação suficiente para construir um modelo 3D completo. Em um segundo momento, a partir das informações obtidas de proteínas com estruturas conhecidas, modelos estruturais são construídos. Com base no valor retornado de uma função objetivo, estes modelos estruturais são pontuados (*score*). A partir da pontuação obtida por cada modelo estrutural todas as conformações construídas são classificadas (ranqueadas) e o modelo 3D final é escolhido. A modelagem por *threading* é frequentemente utilizada para identificar homologias que não podem ser descobertas por um alinhamento par a par de sequências de proteínas.

**Figura 12.** Representação esquemática de um processo típico de modelagem baseada no reconhecimento de padrões de enovelamento (via *Threading*).



**Fonte:** HIGGINS et al. (1994).

### 1.6.3 Modelagem por Primeiros Princípios ou Predição *ab initio*

A modelagem *ab initio*, ou primeiros princípios, ou *free modeling*, como tem sido referida no CASP, consiste em prever a estrutura tridimensional de uma proteína partindo de sua sequência de aminoácidos. Para isso, realiza uma busca no espaço conformacional a fim de encontrar as estruturas mais apropriadas, as quais são assumidas como sendo as que possuem menor energia livre. Os métodos *ab initio* são fundamentados na termodinâmica e baseiam-se no fato de que a estrutura nativa de uma proteína corresponde ao mínimo global de sua energia livre (TRAMONTANO & LESK, 2006). 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 (OSGUTHORPE, 2000; TRAMONTANO & LESK, 2006).

Os métodos *ab initio* conseguem prever novas formas de enovelamento, pois, não estão limitados à proteínas que possuem sua estrutura já conhecida como na modelagem comparativa por homologia e no alinhamento. No entanto, os métodos *ab initio* apresentam problemas no que se refere à dimensão do espaço de busca conformacional (KARPLUS; LEVINTHAL, 1997). Este problema é conhecido e frequentemente referenciado por vários autores como o *Paradoxo de Levinthal*, devido aos estudos realizados por Cyrus Levinthal (1968), onde este verificou que é impossível, computacionalmente, reproduzir o processo de enovelamento de uma proteína, devido ao grande número de estados conformacionais que tal molécula pode assumir.

Há algum tempo, os campos de força eram vistos como sendo promissores para o problema de enovelamento de proteínas. Hoje, no entanto, a modelagem *ab initio* que utiliza apenas campos de força ocupa uma posição periférica no CASP (GOPAL et al, 2009; KRYSHTAFOVYCH, FIDELIS & MOULT, 2007). Segundo Takeshi et al. (2008), apesar da grande quantidade de trabalhos na área empregando métodos *ab initio*, ainda não existe uma técnica *ab initio* completamente segura. No CASP7, os melhores resultados *ab initio* foram obtidos através de abordagens mistas, combinando princípios físicos com técnicas baseadas em conhecimento (ZHANG, 2008).

Diversos métodos para busca por conformações com menor energia potencial foram desenvolvidos nos últimos anos. Estes métodos são classificados em dois grupos: métodos estocásticos e métodos determinísticos. Algoritmos baseados em técnicas estocásticas como Monte Carlo pertencem ao primeiro grupo e métodos determinísticos, como Dinâmica Molecular (DM), pertencem ao segundo grupo. Métodos por DM simulam o espaço conformacional de uma proteína através de movimentos ao longo de uma trajetória. Porém esta não é a única opção, outra alternativa é mover-se de uma conformação à outra por meio de amostragens de aceitação ou rejeição da nova conformação de acordo com uma única função de energia (TRAMONTANO & LESK, 2006).

Métodos baseados na técnica de Monte Carlo iniciam o processo de busca por conformações de menor energia potencial, partindo de uma conformação inicial com energia potencial  $E$  e realizando alterações na conformação obtendo novas conformações (SALI, SHAKHNOVICH & KARPLUS, 1994). A energia  $E'$  de uma nova conformação é calculada. Se  $E'$  é menor que  $E$  o movimento realizado na

conformação é aceite, e assim procede o processo de busca. Nos métodos de Monte Carlo aceita-se uma configuração que reduz a energia do sistema, porém não necessariamente excluem-se as demais conformações que não obtiveram valores de energia menores. O não descarte destes valores fará com que, durante o processo de busca, o método de Monte Carlo não fique preso em um mínimo local (TRAMONTANO & LESK, 2006).

Em uma simulação por Dinâmica Molecular, uma trajetória de um sistema molecular é gerada pela solução simultânea da equação de movimento de *Newton* para todos os átomos do sistema molecular. Cada átomo de uma proteína possui uma energia potencial e sente conseqüentemente uma força externa igual à derivação espacial desta energia. Através da segunda lei de *Newton* é possível calcular a força de ação de cada átomo. A partir da força de ação de cada átomo é possível calcular a posição de cada átomo ao longo de uma série de curtos passos de tempo, e isto, resulta numa série de estruturas ao longo do tempo, a qual é comumente chamada de trajetória. Na prática é selecionada uma temperatura  $T$ , a partir da qual é computada uma velocidade inicial de distribuição dos átomos conforme a energia cinética total do sistema. Segundo (TRAMONTANO & LESK, 2006), o passo de tempo precisa ser suficientemente pequeno para garantir que a aceleração seja praticamente constante durante o mesmo. Simulações por Dinâmica Molecular a uma temperatura relativamente alta podem ser usadas para explorar uma fração mais ampla do espaço conformacional da proteína.

#### 1.6.4 Predição *de novo*

Os métodos *de novo* são aqueles métodos de predição que, através de um conjunto de funções de classificação e de funções especiais para cálculo de energia potencial (EP), derivadas de métodos puramente *ab initio*, buscam a predição de novas formas de enovelamento. Os métodos *de novo* são os que, atualmente, apresentam os melhores resultados nas predições realizadas no CASP (MOUT, 2005).

A metodologia *de novo* busca realizar a predição de novas formas de enovelamento baseando-se em moldes. Esta concepção surge a partir da observação de que quando um novo enovelamento é descoberto, este é composto por motivos estruturais comuns de fragmentos ou de estruturas supersecundárias de proteínas com estruturas conhecidas (TRAMONTANO & LESK, 2006). Desta forma,

se existem fragmentos da proteína que se enovelam em estruturas similares, então é possível utilizar esta informação ou estes fragmentos na construção de novos modelos estruturais 3D de proteínas. Esta é a base dos métodos *de novo* baseados em fragmentos. Nestes métodos, a conformação de uma dada sequência alvo é construída com base em informações extraídas de fragmentos de proteínas com estruturas 3D conhecidas (TRAMONTANO & LESK, 2006). A conformação de uma proteína passa a ser vista como um conjunto de vários fragmentos da sequência de aminoácidos representando motivos estruturais diversos.

A estratégia adotada pelos métodos baseados em fragmentos é coletar as estruturas locais assumidas por pequenos segmentos de fragmentos em estruturas 3D já conhecidas e realizar a combinação destas estruturas para produzir um número de prováveis modelos 3D de uma proteína-alvo, onde o modelo final é selecionado levando-se em consideração a energia potencial mínima (derivada de métodos *ab initio*) (TRAMONTANO & LESK, 2006).

Sequências locais semelhantes nem sempre assumem a mesma estrutura 3D, em virtude do efeito do grande número de interações ocorrentes na estrutura terciária da proteína. Devido a este fato, os métodos de predição baseados em fragmentos não podem simplesmente fragmentar a sequência de aminoácidos da proteína-alvo e através de consulta em bases de dados de estruturas de proteínas-molde, obter as informações de enovelamento do fragmento em questão e realizar a junção destes fragmentos sem nenhum critério. É necessário que sejam estabelecidos critérios de relação entre fragmentos de forma que se possa determinar os fragmentos com maior probabilidade de inserção durante a construção do modelo final da sequência-alvo. Estes critérios surgem da ideia de que existem interações não covalentes entre os átomos da molécula e de que desta forma uma determinada região da proteína é influenciada por interações que ocorrem em outra região estrutural (TRAMONTANO & LESK, 2006).

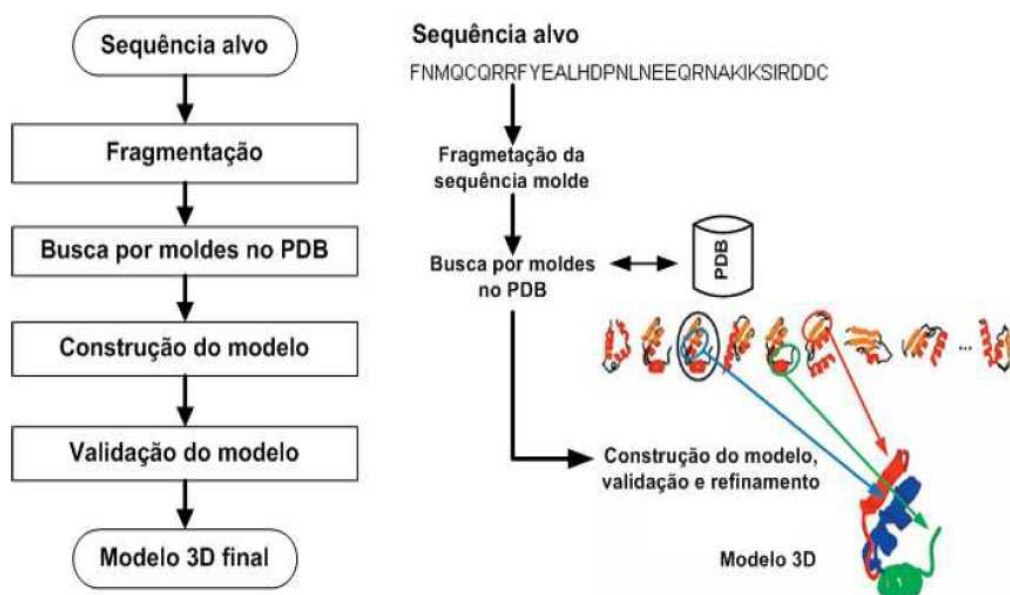
Em métodos baseados em fragmentos, a cadeia principal da proteína-alvo é enovelada através da alteração em seus ângulos de torção com base em ângulos de estruturas de proteínas-molde ou ainda a partir de informações de posicionamento de átomos no espaço 3D. Um aspecto importante destes métodos de predição está relacionado à forma e aos termos utilizados por uma função que realiza a classificação (ranqueamento) e exploração de todas as possíveis combinações de fragmentos para construção das estruturas. A classificação dos fragmentos visa

estabelecer uma relação de ordem no conjunto de fragmentos, buscando organizar aqueles que são mais aptos a ocupar determinada região na cadeia principal da proteína-alvo. Esta classificação é realizada por meio da análise do grau de similaridade entre os fragmentos e através da análise das interações de outros fragmentos da proteína que podem influenciar na forma que este fragmento irá enovelar-se. De forma geral, um método de predição baseado em análise e combinação de fragmentos é composto por quatro etapas distintas onde, dada a sequência completa de aminoácidos de uma proteína, este procede:

- Dividindo a sequência alvo em fragmentos;
- A partir de cada fragmento, realiza-se a busca por sequências (dos fragmentos) similares em um banco de dados de estruturas conhecidas;
- Os fragmentos-molde são classificados (ranqueamento);
- A partir dos fragmentos-molde e com a utilização de uma técnica de combinação, a estrutura tridimensional é construída;
- Refinamento da conformação.

A Figura 13 apresenta o diagrama esquemático do processo de um método *de novo*.

**Figura 13.** Representação esquemática de um método *de novo* utilizando combinação de fragmentos.



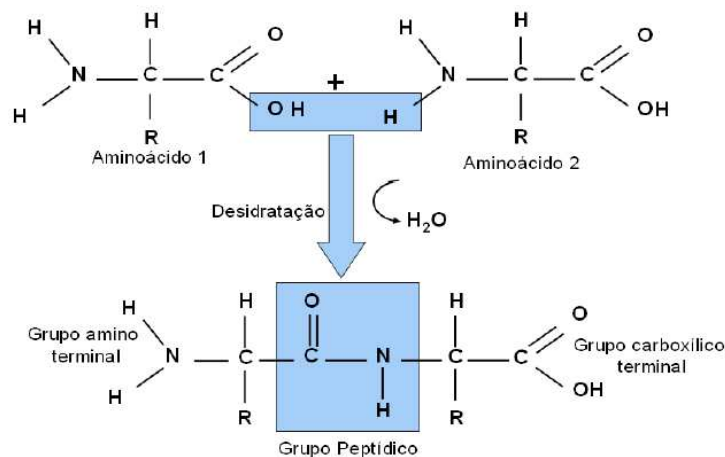
Fonte: DORN (2008).

Os métodos de predição *de novo* apresentam vantagens em relação aos outros métodos de predição. A primeira vantagem se refere à capacidade de predição de novas formas de enovelamento, o que não é possível de ser realizado pelos métodos baseados em análise comparativa por homologia. A segunda vantagem se refere à redução do espaço de busca conformacional, o que em métodos de predição *ab initio* é um grande problema e que demanda grande esforço computacional. No entanto, apesar de reduzir o espaço de busca conformacional, os métodos *de novo*, que utilizam fragmentos de proteínas-molde, ainda possuem duas principais limitações. A primeira está relacionada ao desafio de tratar o grande espaço de busca conformacional originado pelas diferentes formas de combinação de fragmentos molde. A segunda se refere ao desafio de reduzir a energia potencial da conformação nas regiões onde ocorre a combinação dos fragmentos

### 1.7 Química de peptídeos

Peptídeos são compostos formados pela união entre dois ou mais resíduos de aminoácidos (NELSON & COX, 2004). Esta união ocorre por uma reação de condensação envolvendo um grupo  $\alpha$ -carboxílico e um grupo  $\alpha$ -amínico de duas moléculas de aminoácidos distintas, formando a denominada “ligação peptídica” (Figura 14).

**Figura 14:** Representação esquemática da formação de uma ligação peptídica pela condensação de dois aminoácidos.



**Fonte:** DORN (2008).

Os peptídeos podem ser produzidos de forma natural ou por diferentes metodologias sintéticas, tais como clonagem gênica, síntese enzimática e síntese química que pode ser em solução ou em fase sólida.

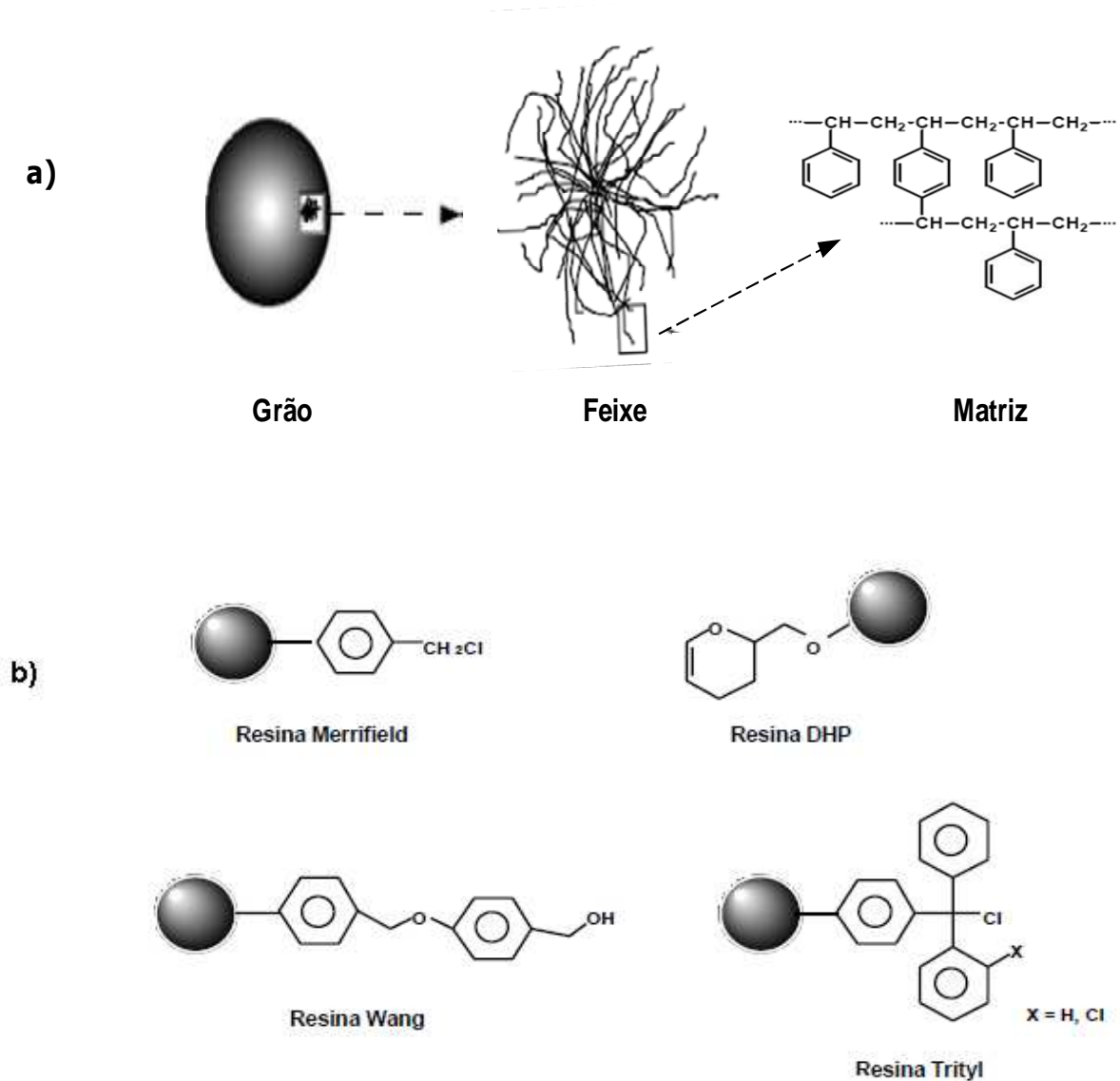
Classicamente e desde os trabalhos pioneiros de Fischer (FISCHER & FOURNEAU, 1901) e CURTIUS (1902), todo processo associado à síntese de um peptídeo ocorria quimicamente e em solução. Há mais de cinco décadas, uma inovadora metodologia para a síntese de peptídeos foi apresentada à comunidade científica por Bruce Merrifield. Tal metodologia veio revolucionar a síntese orgânica por suas características peculiares, uma vez que abandonou a tradicional rotina, própria da síntese em solução, e introduziu o uso de polímeros insolúveis como suporte (MERRIFIELD, 1963; PINILLA, 1995). Este método, denominado síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS), tem como base o fato do grupo carboxílico do aminoácido C-terminal de uma cadeia peptídica, se encontrar unido covalentemente a um polímero e, portanto, o componente que contém esta extremidade é insolúvel nos solventes utilizados no processo de síntese. 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 bem satisfatórios. As vantagens adicionais são que se minimizam as perdas por manipulação e que todo processo sintético pode ser automatizado. Este método conduziu Merrifield ao Prêmio Nobel de química em 1984, com a síntese da bradiginina (CAREY, 1996).

Os polímeros utilizados na SPFS, muitas vezes chamados de resinas, são partículas de tamanho e forma adequados à manipulação e filtração. Apresentam como característica um alto grau de solvatação em solvente apolar, permitindo a entrada de reagentes através das partículas e certificando a acessibilidade dos reagentes aos sítios reativos. Possuem grupos funcionais passíveis de sofrer modificações químicas para permitir que o primeiro aminoácido possa ser prontamente inserido, ocorrendo a formação de uma ligação covalente entre ambos (MARQUARDT & LIMA, 2001).

Genericamente, pode-se descrever uma resina utilizada como 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

bifuncional (ligações cruzadas, *cross-linking*) formando, na maioria delas, uma esfera (grão), de tamanho padronizado (Figura 15a). Em intervalos mais ou menos regulares surgem estruturas químicas diferenciadas (ligantes, *linkers*), que podem constituir-se por apenas um átomo ou mesmo serem formadas por moléculas de dimensão considerável com diversos grupos funcionais (Figura 15b) (MARQUARDT & LIMA, 2001).

**Figura 15.** Visualização progressiva de uma resina, a partir de uma unidade macroscópica e as cadeias poliméricas que a compõem até a fórmula molecular de um determinado polímero (a) e principais resinas PS/DVB disponíveis comercialmente, mostrando os diversos linkers (b).



Fonte: Modificado de MARQUARDT & LIMA (2001).

Desde os trabalhos iniciais de Merrifield, o suporte mais utilizado é um polímero microporoso de estireno (PS), que contém 1% de *p*-divinilbenzeno (DVB) como *crosslinker* (Figura 15a). Enquanto os grãos de poliestireno secos apresentam um diâmetro de aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ , na presença dos solventes ou sistemas de solventes mais comuns utilizados na síntese de peptídeos, costumam aumentar de 2 a 6 vezes o seu volume inicial (MARCHETTO *et al.*, 1992). Desta forma é possível conseguir que todos os ligantes, que estão no interior da rede polimérica fiquem expostos e, portanto acessíveis aos diferentes solventes e reagentes utilizados na síntese.

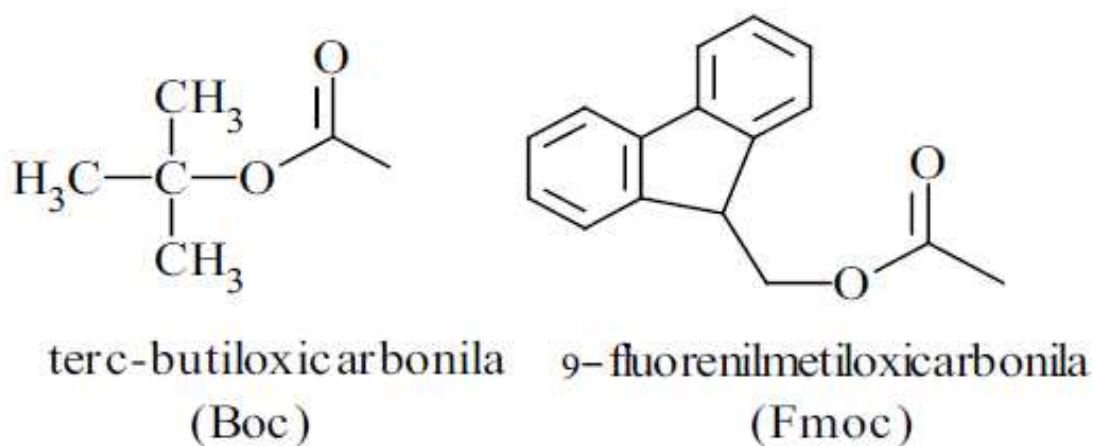
A formação controlada de qualquer ligação peptídica requer que todos os grupos funcionais presentes nas moléculas, exceto os dois que vão participar da formação da ligação peptídica, estejam protegidos. Uma vez formada a ligação e antes da incorporação do seguinte aminoácido, deve-se eliminar o protetor 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 existem dois tipos diferentes de protetores. Por um lado, está aquele tipo que mascara o grupo funcional que irá participar da nova ligação peptídica e, portanto, deve ser eliminado a cada ciclo sintético, denominado “protetor temporário”. Como normalmente a síntese é executada na direção  $\text{C} \rightarrow \text{N}$ , este tipo de protetor é aquele que normalmente protege a função amina. Por outro, estão os “protetores permanentes”, que são os que devem permanecer estáveis durante todo processo sintético e que são eliminados no final do mesmo. Neste tipo podem-se diferenciar aqueles da função carboxílica do aminoácido C-terminal dos que protegem as funções laterais dos aminoácidos trifuncionais. Na metodologia da fase sólida, o protetor da função carboxílica C-terminal está unido de forma covalente a um suporte polimérico insolúvel e assim este protetor pode ser considerado como o ancoradouro da cadeia peptídica que vai crescendo ligada ao suporte sólido. A natureza química do grupo protetor da função  $\alpha$ -amina marca, de certa forma a estratégia de síntese, uma vez que os protetores permanentes devem ser estáveis às condições utilizadas para eliminar repetidas vezes o protetor

temporário. Por sua vez, os protetores permanentes devem ser eliminados eficazmente na última etapa (AMBLARD; KIMMERLIN & SEEBACH, 2005).

As duas principais estratégias da síntese de peptídeos em fase sólida são a Boc/Bzl e a Fmoc/tBu, que se baseiam na proteção temporária do grupamento  $\alpha$ -amínico dos aminoácidos com um dos dois protetores *tert*-Butiloxicarbonila (ANDERSON & MCGREGOR, 1957) e 9-Fluorenil-metiloxicarbonila (CARPINO & HAN, 1972), respectivamente, os quais se diferenciam, principalmente, quanto à labilidade ácido-base (Figura 16).

**Figura 16.** Protetores usuais para o grupo  $\alpha$ -amina na metodologia da fase sólida.



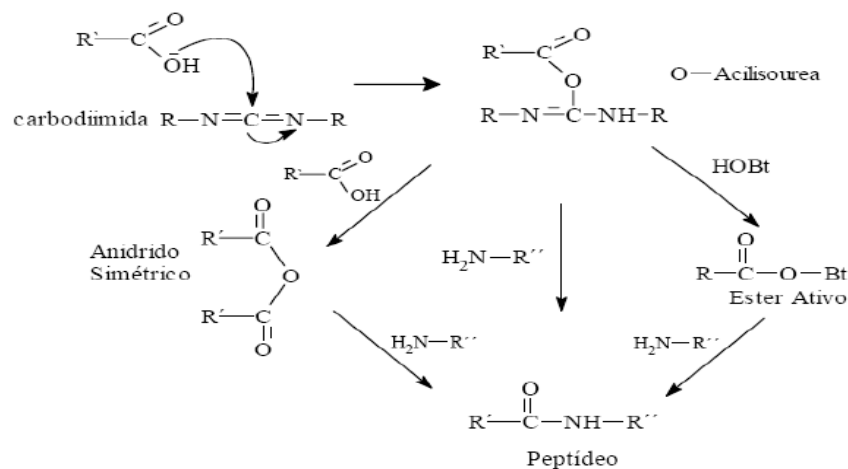
**Fonte:** GARCIA (2010).

A eliminação do grupamento protetor *t*-Boc ocorre mediante acidólise com ácidos de força moderada (TFA 30% em DCM), o que implica na utilização de protetores permanentes estáveis nestas condições. Protetores do tipo benzila (Bzl) são bastante utilizados para esta função, os quais requerem para sua eliminação, o uso de ácidos fortes como o ácido fluorídrico anidro. Neste caso, em seguida ao tratamento ácido, deve-se realizar uma neutralização (normalmente com DIEA 5% em DCM) para que a função amina fique em sua forma desprotonada (ANDERSON & MCGREGOR, 1957). Já o grupamento Fmoc é eliminado com bases de força moderada (geralmente piperidina 20% em DMF), permitindo a utilização de protetores baseados no grupo *tert*-butila (tBu), lábeis ao ácido trifluoroacético (CARPINO & HAN, 1972).

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

Os reagentes de acoplamento ou de condensação têm a função de reagir com o grupo carboxila livre de um aminoácido e gerar espécies reativas. As carbodiimidadas são os reagentes de acoplamento mais utilizados (SHEEHAN & HESS, 1955). O mecanismo envolve a formação da O-acilisouréia, que sofre aminólise por parte da amina, para produzir a ligação amida. Se for empregado um segundo equivalente de ácido carboxílico, será formado o anidrido simétrico. Do mesmo modo, na presença de hidroxilaminas (p. ex. Hidroxibenzotriazol - HOBt ou 7-aza-1-hidroxibenzotriazol - HOAt), será obtido um éster. Qualquer uma das três espécies reativas, O-acilisouréia, anidrido simétrico ou éster ativo, são bons agentes acilantes (Figura 17).

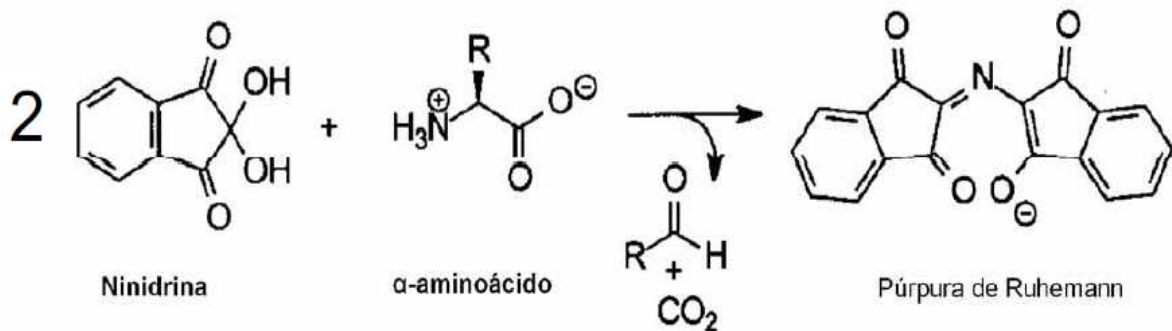
**Figura 17.** Mecanismo de formação de ligação peptídica empregando carbodiimidadas.



**Fonte:** GARRIDO (2007).

A reação de condensação ou o acoplamento dos aminoácidos é monitorado através do teste de ninidrina (KAISER et al., 1970). Este composto reage com aminas primárias levando à formação de um produto de coloração violeta (púrpura de Ruhemann). Desta forma, após acoplamento de aminoácidos à cadeia polipeptídica, o teste deve apresentar coloração amarela, indicando a ausência de aminas livres, pois o grupamento amina apresenta-se protegido e, após a desproteção do grupamento amina, deve apresentar coloração violeta (Figura 18).

**Figura 18.** Esquema da reação durante o teste de ninidrina.

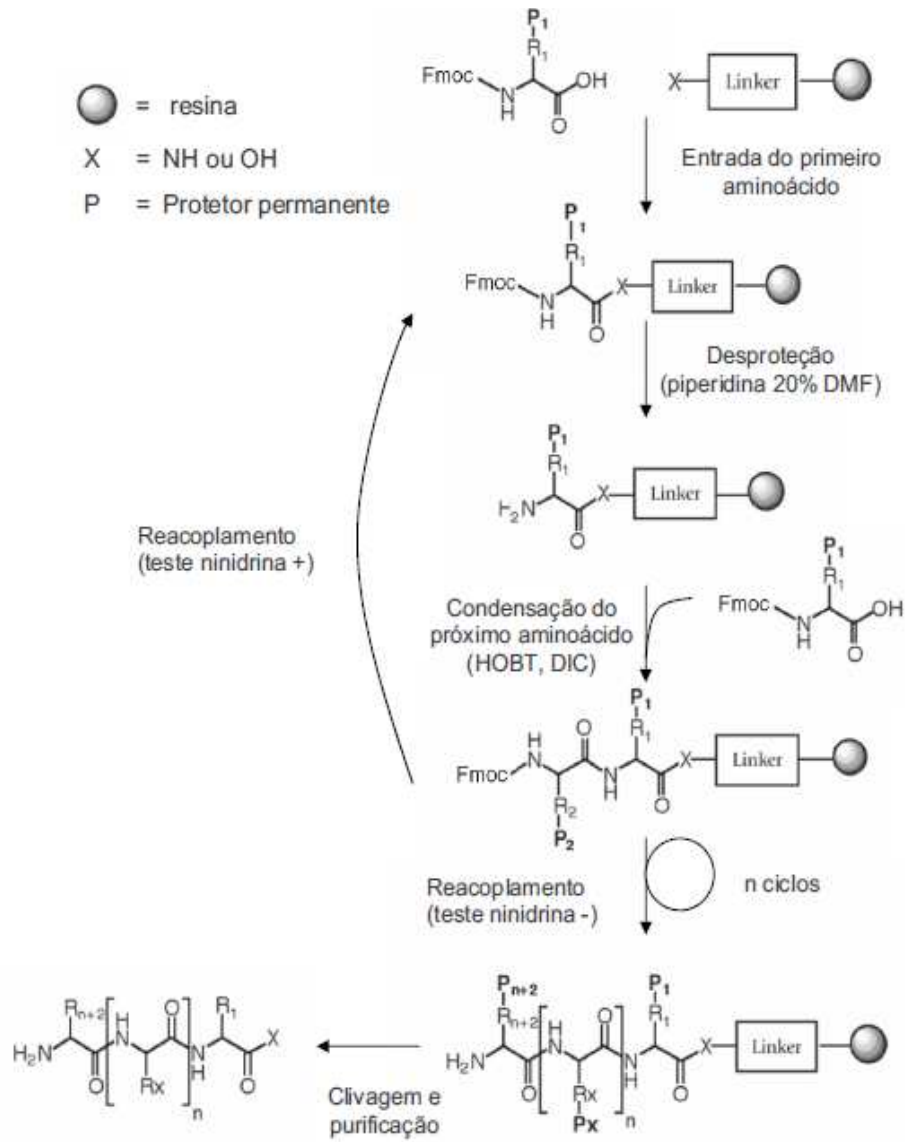


**Fonte:** GARCIA (2010).

Um esquema geral da SPFS utilizando a estratégia Fmoc, a qual foi utilizada na obtenção dos fragmentos peptídicos de ParE empregados nos estudos contidos neste trabalho, está representado na Figura 19.

Após o processo de clivagem do peptídeo da resina (com HF na estratégia Boc ou TFA na estratégia Fmoc), o peptídeo bruto é liofilizado para posterior purificação, onde é empregada a cromatografia líquida de fase reversa, que se tornou a técnica de escolha para a purificação de peptídeos (MACHADO et al., 2004). Posteriormente, espectrometria de massas tem sido amplamente utilizada na determinação da identidade química dos peptídeos sintéticos.

**Figura 19.** Esquema ilustrativo da SPFS.



Fonte: AMBLARD (2005).

## 2 OBJETIVOS

O objetivo primordial deste trabalho foi o estudo de análogos da porção C-terminal da proteína ParE de *Escherichia coli*, buscando avaliar os resíduos de aminoácidos envolvidos na interação com diferentes topoisomerasas. De maneira específica objetivou-se:

1. Realizar análises de bioinformática para levantamento de dados estruturais das sequências peptídicas;
2. Projetar e sintetizar análogos peptídicos da proteína bacteriana ParE, com base em sua estrutura primária;
3. Analisar a capacidade de interação e inibição destes novos análogos, frente à atividade da DNA girase, topoisomerase IV e topoisomerase II humana;
4. Isolar a melhor sequência peptídica com potencial atividade inibitória sobre as enzimas DNA topoisomerasas.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Reagentes e solventes

Os reagentes e solventes utilizados durante a síntese, purificação e caracterização de peptídeos estão relacionados abaixo:

- Suporte polimérico: Resinas Rink amida AM e Wang-Phe com grau de substituição inicial de 0,59 mmol/g e 0,34 mmol/g respectivamente, da marca Novabiochem®.
- Aminoácidos protegidos: todos os L- $\alpha$ -aminoácidos utilizados apresentavam a extremidade amino-terminal protegida com o grupo base-lábil Fmoc e grupos t-butilícos ou derivados para a proteção das cadeias laterais dos aminoácidos trifuncionais;
- Os agentes de condensação utilizados na síntese dos peptídeos foram: Diisopropilcarbodiimida (DIC) N-Hidroxibenzotriazol (HOBT), N-Hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt), O-Benzotriazolil-N,N,N',N'-tetrametiluronio-hexafluorofosfato (HBTU);
- 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 dos peptídeos foi o ácido trifluoracético (TFA), adquirido da Fluka®.
- Etanoditiol (EDT) e triisopropilsilano (TIS), substâncias responsáveis pela captura de espécies responsáveis por alquilação eletrofílica e liberadas no meio reacional durante o processo de clivagem ácida, foram adquiridos ou da Sigma® e ou da Acros®;
- Os eluentes cromatográficos utilizados foram acetonitrila (ACN) da marca J.T.Baker® e água ultrapura, obtida através de um sistema de filtração Barnstead, equipado com cartuchos para retenção de sais e de compostos orgânicos;
- Demais reagentes e solventes como ácido acético glacial, anidrido acético, diclorometano (DCM), diisopropiletilamina (DIEA), dimetilformamida (DMF), hexafluoroisopropanol e N-metilpirrolidona (NMP), foram adquiridos da Merck®, Aldrich®, Mallinckrodt®, Baker® e Fluka®.

### 3.2 Material Biológico

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

*DNA girase:*

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

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

*Topoisomerase IV:*

Tampão de diluição: HEPES-KOH 40 mmol.L<sup>-1</sup>; glutamato de potássio 100 mmol.L<sup>-1</sup>; Ditioneitol 1 mmol.L<sup>-1</sup>; EDTA 1 mmol.L<sup>-1</sup>; glicerol 40% (v/v); pH = 7,6

Tampão de ensaio (concentrado 5x): HEPES-KOH 40 mmol.L<sup>-1</sup>; glutamato de potássio 100 mmol.L<sup>-1</sup>; acetato de magnésio 10 mmol.L<sup>-1</sup>; Ditioneitol 10 mmol.L<sup>-1</sup>; ATP 1 mmol.L<sup>-1</sup>; Albumina 50 µg/mL; pH = 7,6.

*Topoisomerase II humana*

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

Tampão de ensaio (concentrado 5x): Tris.HCl 50 mmol.L<sup>-1</sup>; NaCl 125 mmol.L<sup>-1</sup>; MgCl<sub>2</sub> 10 mmol.L<sup>-1</sup>; Ditioneitol, 5 mmol.L<sup>-1</sup>; Albumina 100 µg /mL; pH = 7,5.

### 3.3 Equipamentos

- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em modo semi-preparativo: cromatógrafo Beckman System Gold, equipado com coluna de fase reversa C18, Delta Pak, Waters, 15 µm, 300 Å, de dimensão 300 x 19 mm. O equipamento é composto por duas bombas modelo 116 e detector UV/Visível, conectado a um registrador 112 da Amersham Biosciences;

- Sistema de Cromatografia líquida em modo analítico: Cromatógrafo Shimadzu LC-10A/C-47A equipado com três bombas LC 10AT, injetor automático SIL 10AF e detectores de UV SPD 10A e fluorescência RF 10A.
- 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.
- Espectrofotômetro UV-Visível Shimadzu 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.

### 3.4 Predição de estruturas secundárias das sequências peptídicas

A predição de estrutura secundária dos análogos peptídicos foi realizada inicialmente por modelagem molecular do tipo *Threading*, utilizando o servidor LOMETS (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/LOMETS>). Devido à acentuada diferença apresentada pelos modelos gerados decorrentes das muitas possibilidades de combinação, a alternativa mais viável foi a modelagem *ab initio* utilizando o programa QUARK (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/QUARK/>), em virtude do seu desempenho descrito pelo CASP (*Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction*).

### 3.5 Síntese de peptídeos

Os análogos peptídicos de ParE (Tabela 1), foram sintetizados manualmente pelo método da fase sólida (STEWART & YOUNG, 1984; AMBLARD *et al.*, 2005), de acordo com o protocolo padrão que emprega o grupamento base-lábil Fmoc como protetor dos  $\alpha$ -amino grupos, e derivados t-butilicos (t-Bu) para a proteção das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos trifuncionais (Tabela 2). A resina de partida para todos os peptídeos, com exceção do ParEC1, foi uma Rink amida AM

Resina, com substituição inicial 0,59 mmol/g. O peptídeo ParEC1 foi sintetizando utilizando como suporte uma Fmoc- Wang-Phe Resina com grau de substituição inicial de 0,55 mmol/g. Os agentes de condensação mais utilizados foram DIC e HOBt. Para as sequências peptídicas em formação que apresentaram problemas de acoplamento, empregaram-se outros agentes de condensação, tais como HOAt/DIC e HBTU/DIEA.

Na etapa de acoplamento de cada aminoácido, foi empregado um excesso molar de três vezes, em relação à quantidade de resina de partida, tanto para o Fmoc-aminoácido quanto para os agentes de condensação, inicialmente em DCM:DMF (1:1), por um período de 2 horas. A desproteção dos grupos  $\alpha$ -amínicos (remoção do grupo base lábil Fmoc), após a entrada de cada aminoácido, foi realizada empregando-se uma solução de piperidina 20% (v/v) em DMF.

A eficiência das etapas de entrada de cada aminoácido foi monitorada pelo teste de ninidrina (KAISER *et al.*, 1970) e, quando positivo (condensação incompleta), o processo foi repetido com 50% da quantidade inicial dos reagentes.

A clivagem final dos peptídeos das respectivas resinas e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais, foi efetuada pelo tratamento das respectivas peptidil-resinas com uma solução de clivagem contendo TFA (94,0%), água deionizada (2,5%), EDT (2,5%) e TIS (1,0 %) à temperatura ambiente por 2 horas. Peptídeos, denominados brutos, foram precipitados e lavados com éter dietílico gelado, centrifugados (seis vezes) e em seguida retidos em placa porosa para serem eluídos em uma solução aquosa de acetonitrila 70% e posteriormente liofilizados.

**Tabela 1.** Estrutura primária dos análogos de ParE sintetizados.

Peptídeo	Sequência
ParERM3	Acetil - <sup>61</sup> LRMIHCEHHYVFCLPHGSAPALVVAIFHERMDLMARLSER <sup>100</sup> -NH <sub>2</sub>
ParEC1	H <sub>2</sub> N- <sup>80</sup> PALVVAIF <sup>87</sup> -COOH
ParEC2	Acetil- <sup>69</sup> HYVFCLPHGSA <sup>79</sup> -NH <sub>2</sub>
ParEC3	Acetil- <sup>69</sup> HYVFCLPHGSAPALVVAIFHERMDLMARLSER <sup>100</sup> -NH <sub>2</sub>
ParEC4	Acetil- <sup>80</sup> PALVVAIFHER <sup>90</sup> -NH <sub>2</sub>

Fonte: Elaborado pela autora.

**Tabela 2.** Protocolo sintético utilizando DIC/HOBt (estratégia Fmoc/tBu).

Reagente/solvente	Operação	Tempo (min)	Número de ciclos
DMF	Lavagem	1	2
Piperidina 20% em DMF	Desproteção	1	1
Piperidina 20% em DMF	Desproteção	20	1
DCM/DMF	Lavagem	1	4
Fmoc-AA-OH (3 eq) + DIC/HOBt(3 eq) em DCM/DMF (1:1)	Acoplamento	120	1
DCM/DMF	Lavagem	1	4

**Fonte:** Elaborado pela autora.

### 3.6 Purificação e identificação

A purificação das sequências peptídicas foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala semipreparativa e a análise das frações obtidas foi realizada por CLAE em escala analítica, conforme descrito a seguir:

#### Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) – Semipreparativa

A cromatografia líquida de alta eficiência, em escala semipreparativa, foi efetuada em um aparelho Beckman. Os solventes utilizados foram todos de grau cromatográfico e a água empregada foi do tipo ultrapura.

No geral, as condições cromatográficas foram:

- coluna: fase reversa C18, Kromasil (250 x 10 mm); d = 5 µm; 300 Å
- solventes: A: Água contendo 0,045% de TFA  
B: Acetonitrila contendo 0,036% de TFA
- gradiente: de 15 a 61% de B em 120 minutos
- fluxo: 3 mL/minuto
- comprimento de onda do detector: 220 nm

## Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) – Analítica

A cromatografia líquida de alta eficiência, em escala analítica, foi efetuada em um sistema Shimadzu. Os solventes utilizados foram todos de grau cromatográfico e a água empregada foi do tipo ultrapura.

No geral, as condições cromatográficas foram:

- coluna: fase reversa C18, Jupiter Phenomenex (250 x 4,6 mm); d= 5 µm; 300 Å
- solventes: A: Água contendo 0,045% de TFA  
B: Acetonitrila contendo 0,036% de TFA
- gradiente: de 5 a 95% de B em 30 minutos
- fluxo: 1 mL/minuto
- comprimento de onda do detector: 220 nm

Para o peptídeo ParEC1 utilizou-se coluna de fase reversa C4 (Vydac, d= 5 µm; 250 x 4,6 mm; 300 Å) nas escalas analítica (gradiente 5-95% de B em 30 min) e coluna C4 (Vydac, d= 10 µm; 250 x 22 mm; 300 Å) em escala semipreparativa (40 a 70% de B em 100 min e 26 a 76% de B em 120 min).

A caracterização dos peptídeos foi realizada através da determinação da massa molecular dos mesmos, utilizando um espectrômetro de massas Bruker Amazon SL acoplado a um cromatógrafo líquido Shimadzu (LC-MS) empregando o modo de ionização positivo.

### **3.7 Dicroísmo circular (CD)**

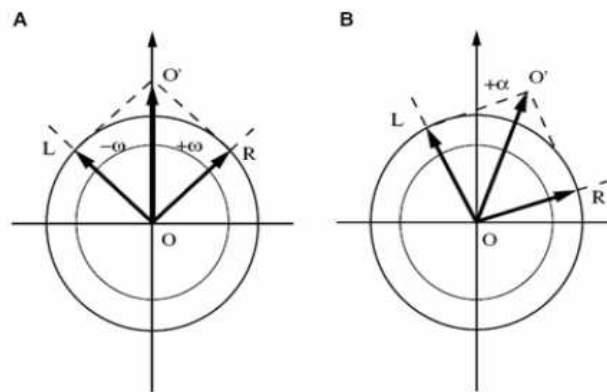
A espectroscopia de dicroísmo circular (CD) é um poderoso método em biologia estrutural usado desde 1960 para examinar estruturas secundárias de proteínas e peptídeos em solução (WHITMORE & WALLACE, 2007). O fenômeno de dicroísmo circular está relacionado à absorção diferenciada da luz circularmente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

A técnica de dicroísmo circular se baseia no desvio da luz circularmente polarizada incidente em compostos quirais (CAMPANA et al., 2001). A luz circularmente polarizada é gerada quando a fonte de luz oscila em duas direções

perpendiculares entre si, com amplitudes iguais, mas com uma diferença de fase ( $\pi/2$ ). Com isso, a trajetória do vetor resultante de propagação de luz é helicoidal. Devido a isso, a onda resultante será circularmente polarizada à direita ou à esquerda, conforme a diferença de fase for  $+\pi/2$  ou  $-\pi/2$  (CAMPBELL, 1984).

Para uma molécula quiral apresentando o fenômeno de dicroísmo circular, o componente circularmente polarizado à direita é absorvido em diferente intensidade em relação ao polarizado à esquerda. Assim, a combinação das duas ondas transmitidas resulta em uma luz elipticamente polarizada como exemplificado na Figura 20 (PURDIE, 2007).

**Figura 20.** Representação da luz circularmente polarizada à direita e à esquerda incidente “a” e transmitida após interagir com a molécula dicroica “b”.



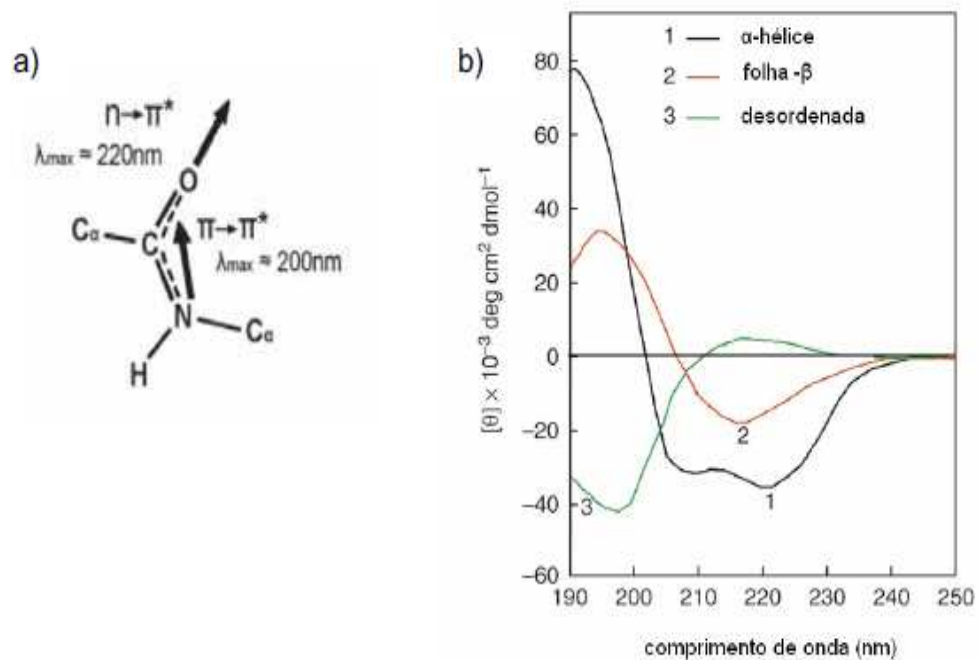
Fonte: PURDIE (2007).

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

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

A estrutura  $\beta$  apresenta uma banda negativa centrada em 218 nm e outra banda positiva centrada em 196 nm. O espectro de uma  $\alpha$ -hélice possui essas mesmas bandas. No entanto, ele é mais complexo, pois nele a transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  é desdobrada em  $\pi \rightarrow \pi^*$  perpendicular, centrada em 191 nm, e  $\pi \rightarrow \pi^*$  paralela centrada em 208 nm. A transição  $n \rightarrow \pi^*$  é deslocada para menor energia, centrada em 222 nm (Figura 21). Assim, de acordo com a conformação estrutural adquirida pelas proteínas é possível caracterizar a estrutura secundária destas macromoléculas devido ao perfil espectral de CD particular destes arranjos (WHITMORE & WALLACE, 2007).

**Figura 21.** a) Diagrama da ligação peptídica mostrando a orientação da transição de dipolo  $n \rightarrow \pi^*$  e  $\pi \rightarrow \pi^*$ . b) Espectros típicos de CD mostrando o perfil característico de  $\alpha$ -hélice, folha- $\beta$  e estrutura desordenada.



**Fonte:** WHITMORE & WALLACE (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  $80 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de cada peptídeo em um volume final de  $300 \mu\text{L}$ . Os espectros de CD foram feitos com acúmulo de 10 varreduras de 190 a 280 nm em tampão Tris.HCl  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  em temperatura ambiente, numa cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 mm, com aproximadamente  $300 \mu\text{L}$  de volume. Foi realizado

um branco (solução tampão Tris.HCl 10 mmol.L<sup>-1</sup>) para cada medida, o qual apresentou sinal desprezível, sendo subtraído mesmo assim de todas as curvas

### **3.8 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 (girase) com 0,5 µg de plasmídeo pBR322 relaxado (DNA) e concentrações decrescentes do peptídeo de interesse em um volume de reação de aproximadamente 30 µL. 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, 15 µL de STEB (20% sacarose; 0,05 mol.L<sup>-1</sup> Tris. HCl, pH 7,5; 0,05 mol.L<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup>; 89 mmol.L<sup>-1</sup> de ácido bórico; 2 mmol.L<sup>-1</sup> EDTA, pH 8,2). Após a corrida (tensão constante de 60V ou 4V/cm à temperatura ambiente por 3 horas), o gel foi corado durante 30 minutos com uma solução de brometo de etídio (1 mg/mL) e analisado em um fotodocumentador Alpha Imager EP System da Alpha Innotech.

### **3.9 Inibição da atividade da topoisomerase IV**

Os ensaios de inibição do relaxamento do DNA superenovelado (inibição da atividade da topoisomerase IV) foram realizados incubando-se 1 unidade (U) de topoisomerase IV com 0,5 µg de plasmídeo pBR322 superenovelado e concentrações decrescentes do peptídeo de interesse em um volume de reação de aproximadamente 30 µL. A reação foi incubada a 37 °C por 1 hora em tampão de ensaio 1x (descrito anteriormente – item 3.2.). Posteriormente as amostras foram tratadas, submetidas à análise de eletroforese em gel de agarose e analisadas em fotodocumentador, conforme descrito anteriormente para os ensaios de inibição da DNA girase.

### **3.10 Inibição da atividade da Topoisomerase II**

Os ensaios de inibição do relaxamento do DNA superenovelado (inibição da atividade da topoisomerase II humana) foram realizados incubando-se 1 unidade (U) de topoisomerase II com 0,5 µg de plasmídeo pBR322 superenovelado e concentrações decrescentes do peptídeo a ser testado em um volume de reação de aproximadamente 30 µL. A reação foi incubada a 37 °C por 1 hora em tampão de ensaio 1x (descrito anteriormente – item 3.2.). Posteriormente as amostras foram tratadas, submetidas à análise de eletroforese em gel de agarose e analisadas em fotodocumentador, conforme descrito anteriormente para os ensaios de inibição da DNA girase.

### **3.11 Marcação dos peptídeos ParERM3 e ParEC3 com carboxifluoresceína**

Os peptídeos que foram capazes de inibir a atividade das topoisomerasas nos ensaios de eletroforese, ParERM3 e ParEC3, foram resintetizados, nas mesmas condições descritas no item 3.5, porém, à extremidade N-terminal de cada peptídeo, foi acoplada a sonda fluorescente 5-6-carboxifluoresceína, empregando o mesmo excesso molar, agentes de condensação e solventes, utilizado nas demais etapas que a antecederam. Os procedimentos de clivagem, purificação e caracterização foram realizados conforme descrito anteriormente.

### **3.12 Espectroscopia de fluorescência**

A espectroscopia de fluorescência tem sido utilizada no estudo de diversos processos e sistemas de interesse biológico, principalmente por medidas de anisotropia de fluorescência, a qual envolve a marcação de proteínas de interesse com determinado fluoróforo e o monitoramento da polarização da fluorescência das proteínas marcadas em solução.

Os fluoróforos possuem valores de absorção e emissão alinhados em direções específicas relativas a suas estruturas moleculares. Estes dois vetores determinam o eixo preferencial da polarização da luz absorvida e emitida,

respectivamente. Assim, quando um fluoróforo é excitado com luz plano-polarizada, a emissão resultante também é plano-polarizada, porém não necessariamente na direção da excitação. Para uma molécula fluorescente que se encontra em solução e, em consequência, em rotação difusiva livre, a luz difusiva pode adotar todas as direções de polarização possíveis, visto que as moléculas estarão orientadas aleatoriamente e dinamicamente. Conseqüentemente, apesar de se excitar a amostra com luz polarizada numa determinada orientação, um observador medindo a polarização da luz fluorescente total obteria a média de um grande número de orientações dinâmicas, ou seja, uma luz com baixo grau de anisotropia. Entretanto, variações de anisotropia de fluorescência podem indicar a interação da molécula marcada com um ligante de interesse. Dois fenômenos podem afetar o nível de anisotropia de fluorescência do fluoróforo. O primeiro está relacionado ao tamanho efetivo da molécula marcada, visto que a anisotropia desta é tanto menor quanto mais rápida é a velocidade de rotação da molécula. Como resultado, o grau de anisotropia da luz emitida pelo fluoróforo é inversamente proporcional a sua velocidade de rotação e diretamente proporcional ao seu tamanho molecular, já que moléculas maiores possuem rotações mais lentas. Este princípio pode ser utilizado para monitorar a formação de complexos moleculares entre moléculas marcadas com um fluoróforo e ligantes específicos, visto que com a formação da ligação, o complexo apresentará tamanho molecular maior, uma rotação mais lenta e uma emissão mais anisotrópica. O segundo fenômeno envolve a mobilidade local do fluoróforo, em uma escala temporal bastante inferior ao efeito anterior. A interação da molécula marcada com o ligante de interesse pode alterar a mobilidade local do fluoróforo com conseqüências para a anisotropia de emissão deste, de forma análoga ao efeito descrito acima. Deste modo, ambos os fenômenos contribuirão para o nível de anisotropia de fluorescência da molécula marcada.

A interação dos peptídeos ParERM3 e ParEC3 com a GyrA e GyrB foi analisada por anisotropia de fluorescência (fluorescência com luz polarizada). Para este tipo de ensaio, a uma solução  $500 \text{ nm.L}^{-1}$  de cada um dos peptídeos marcados com carboxifluoresceína, em  $\text{Tris.HCl } 10 \text{ mmol.L}^{-1}$  foram adicionadas quantidades crescentes das proteínas GyrA ou GyrB (até um máximo de  $1 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), em um volume de  $500 \text{ } \mu\text{L}$ . Após agitação suave, medidas de anisotropia foram feitas, com excitação da amostra a  $495 \text{ nm}$  e emissão medida a  $525 \text{ nm}$ .

### 3.13 Simulação de dinâmica molecular associada a docking

A dinâmica Molecular (DM) é um método computacional largamente utilizado tanto para o estudo de macromoléculas (proteínas, carboidratos, DNA) quanto para simular possíveis processos de interação intermolecular e, por isto, representa uma valiosa ferramenta em Química Medicinal (HANSSON, OOSTENBRINK & VAN GUNSTEREN, 2002). No planejamento racional de fármacos baseado na estrutura do alvo biológico (proteínas de membrana, enzimas, etc.), a DM têm contribuído de forma muito significativa, permitindo uma compreensão mais aprofundada do mecanismo associado à cinética de interação (ALONSO, BLIZNYUK & GREARY, 2006).

A 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, 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). Aplicações específicas da DM, como o arrefecimento simulado (SA, do inglês *simulated annealing*) permitem, através da aplicação de diferenciais de temperatura, inferir na estabilidade estrutural do peptídeo em solução. Com isto, procura-se obter uma estrutura tridimensional do peptídeo que apresente uma conformação mais próxima daquela em solução e, assim, torna-se mais confiável a utilização desta estrutura para estudos de interação entre peptídeo e proteína, através de *docking*. Este tipo de procedimento permite maior confiabilidade dos modelos gerados para comparação com os dados obtidos através de experimentos *in vitro*.

A combinação de DM com docagem molecular (*docking*) representa uma alternativa promissora para o entendimento das interações ligante-receptor e para o planejamento racional de novos inibidores (NAMBA, SILVA & SILVA, 2008). Com base nesse contexto, uma abordagem de simulação de DM/SA aliada ao *docking* foi realizada para se investigar possíveis modos de interação entre a sequência peptídica ParERM3 com a GyrA, obtida através de modelagem molecular empregando-se o servidor Phyre2. Este servidor baseia-se na detecção de modelos remotamente homólogos, os quais empregam algoritmo de busca do tipo perfil-perfil (do inglês *profile-profile*) (KELLEY & STERNBERG, 2009) e é um dos servidores de modelagem melhores classificados segundo o *ranking* CASP (MOULT, 2005). Para

o *docking*, foi utilizado o servidor ZDOCK, o qual realiza o estudo de interação peptídeo-proteína através de uma busca tridimensional que envolve o grau de liberdade espacial entre duas moléculas (PIERCE, HOURAI & YWENG, 2011).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Desenho racional dos peptídeos derivados da proteína ParE de *E. coli*

As sequências peptídicas obtidas neste trabalho, foram projetadas tendo como base a estrutura primária da toxina bacteriana ParE, considerada um inibidor do processo de replicação, cujo alvo é a enzima DNA girase (JIANG et al., 2002). Algumas evidências indicam que a porção C-terminal desta toxina é uma região crítica para sua estabilidade e toxicidade e, portanto com maior probabilidade de estar envolvida na interação com a DNA girase. Estudos prévios com a toxina ParE obtida a partir do plasmídeo RK2 mostrou que o truncamento da região C-terminal atenua a toxicidade da proteína (ROBERTS & HELINSKI, 1992). Resultados semelhantes foram obtidos, utilizando proteínas ParE recombinantes truncadas na região C-terminal (FIEBIG et al., 2010). A estrutura cristalográfica do complexo ParD-ParE de *Caulobacter crescentus*, revelou uma importante sequência de três folhas  $\beta$  na região C-terminal de ParE, mostrando que a antitoxina ParD deve bloquear a região C-terminal da toxina (DALTON & CROSSON, 2010). Para ParE de *E. coli*, esta sequência de folhas  $\beta$  na região C-terminal, também foi prevista por estudos de modelagem molecular (BARBOSA et al., 2010).

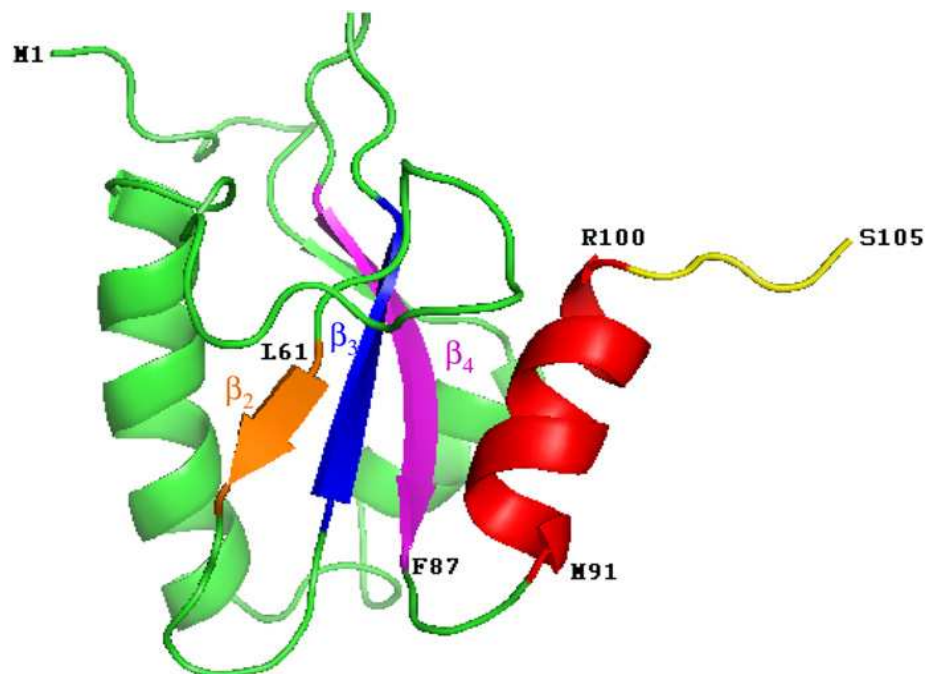
Considerando o exposto e os resultados obtidos previamente (BARBOSA et al., 2012), que demonstraram prováveis regiões da proteína ParE responsáveis pela interação com as topoisomerases (Figura 22), novos peptídeos foram projetados tendo como molde a porção C-terminal de ParE de *Escherichia coli* (Tabela 3). As sequências peptídicas foram projetadas de modo a incluir ou excluir determinadas estruturas secundárias previstas para a região, bem como avaliar a influência da porção terminal “LNIES” na atividade inibitória dos peptídeos. Esta sequência de cinco aminoácidos, quando presente nos peptídeos de interesse, parece atenuar a inibição dos peptídeos sob a atividade das topoisomerases (BARBOSA et al., 2012). Neste contexto, como pode ser visualizado na Tabela 3, para o desenho das sequências peptídicas, atenção foi dada para a região contendo os resíduos L<sup>61</sup> a R<sup>100</sup>, desconsiderando no design, o pentapeptídeo “LNIES”.



## 4.2 Predição da estrutura secundária dos peptídeos derivados da proteína ParE de *E. coli* – Bioinformática

Estudos prévios envolvendo o plasmídeo RK2 e a bactéria *C. crescentus* mostram que a porção C-terminal de ParE é crítica para a estabilidade e toxicidade da proteína (ROBERTS & HELINSKI, 1992; FIEBIG et al., 2002). A estrutura C-terminal de ParE de *E.coli* predita por modelagem molecular (Figura 23) mostrou um núcleo de estruturas folha  $\beta$  (L61 a F87), bem como uma alfa hélice C-terminal entre os resíduos M91 e R100 (BARBOSA et al., 2012).

**Figura 23.** Estrutura da proteína ParE predita por modelagem molecular.



**Fonte:** BARBOSA et al. (2012)

Nesse contexto, o peptídeo ParERM3 foi projetado para conter o núcleo das três folhas beta e a alfa hélice C-terminal. A estrutura de ParE predita por modelagem molecular mostra na porção C-terminal uma conformação randômica envolvendo cinco resíduos de aminoácidos (L101 a S-105). Estudos anteriores, realizados por BARBOSA et al. (2012), mostraram que esta estrutura, quando presente nos peptídeos miméticos, atenua a toxicidade dos mesmos frente às topoisomerasas. Deste modo, o peptídeo ParERM3 foi projetado semelhantemente

ao peptídeo ParELC8 já sintetizado anteriormente (BARBOSA et al., 2012), excluindo-se a sequência C-terminal de cinco resíduos de aminoácidos, visando a obtenção de um peptídeo altamente tóxico para as enzimas DNA girase e topo IV.

A modelagem molecular deste peptídeo foi realizada inicialmente por *Threading* pelo servidor LOMETS. Este servidor também é utilizado para modelagem em outro servidor, I-TASSER, do mesmo grupo de pesquisa em modelagem de proteínas e faz parte dos melhores servidores para geração de modelos de proteína segundo o CASP. Uma descrição melhor do servidor está em <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/LOMETS>. Foram gerados dez modelos para a sequência de aminoácidos deste peptídeo, conforme pode ser observado na Tabela 4. Verificou-se que os modelos apresentaram acentuada diferença. Isto decorre do fato de que, como há muitas possibilidades de combinação, o modelo gerado acaba tendo desvios provenientes do modo como cada programa de *threading* utilizado (10 programas ao todo) gera o seu modelo correspondente. Neste caso, a alternativa mais viável é a modelagem *ab initio*, que se fundamenta na termodinâmica e consegue prever novas formas de enovelamento. Para este fim, utilizou-se o programa QUARK, do mesmo grupo de pesquisa que desenvolveu o LOMETS, devido ao seu desempenho também descrito pelo CASP. Foram obtidos 10 modelos sobrepostos, demonstrados na Tabela 5. Um dos modelos pode ser mais bem visualizado na Figura 24.

O peptídeo ParEC1 foi projetado para conter apenas a estrutura secundária denominada folha  $\beta_4$ . Segundo BARBOSA et al. (2012), a estrutura  $\beta_4$  parece desempenhar um papel importante nas interações peptídeo-topoisomerase, visto que todos os peptídeos que se mostraram ativos possuíam em sua estrutura primária os aminoácidos correspondentes a mesma. Inicialmente esta sequência foi sintetizada em resina Rink amida e acetilada, do mesmo modo que as demais sequências. No entanto, devido à ausência de solubilidade apresentada no processo de extração do peptídeo da resina, optou-se por sintetizar novamente a mesma sequência, utilizando a resina Wang-Phe e não realizando acetilação na extremidade N-terminal, visando assim uma melhor solubilidade para o peptídeo em questão. A modelagem molecular do peptídeo ParEC1 não pôde ser realizada devido ao pequeno tamanho da sequência de aminoácidos e à sua natureza apolar. A grande probabilidade de esta sequência assumir várias conformações tornou inviável tal procedimento.

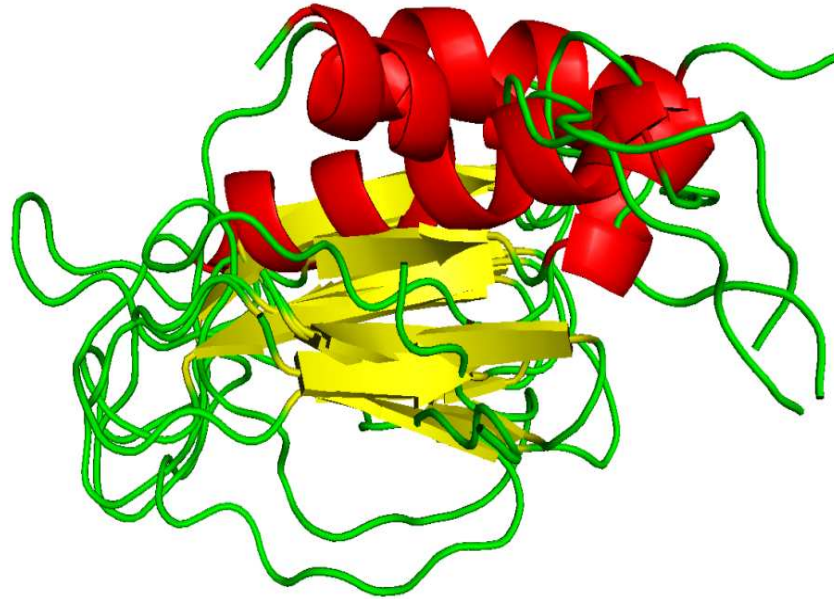
**Tabela 4.** Representação dos 10 modelos sobrepostos para a sequência de aminoácidos do peptídeo ParERM3 gerados pelo servidor LOMETS.

As possíveis estruturas de alfa-hélice, folha-beta e randômica estão representadas pelas cores vermelha, amarela e verde, respectivamente.

---

**Sobreposição dos modelos e sequências correspondentes**

---



1	<b>LRMIHCEHHYVFC</b> LPHGSAPALVVAIFHERMDLMARLSER
2	<b>LRMIHCEHHYVFC</b> LPHGSAPALVVAIFHERMDLMARLSER
3	<b>LRMIHCEHHYVFC</b> LPHGSAPALVVAIFHERMDLMARLSER
4	<b>LRMIHCEHHYVFC</b> LPHGSAPALVVAIFHERMDLMARLSER
5	<b>LRMIHCEHHYVFC</b> LPHGSAPALVVAIFHERMDLMARLSER
6	<b>LRMIHCEHHYVFC</b> LPHGSAPALVVAIFHERMDLMARLSER
7	<b>LRMIHCEHHYVFC</b> LPHGSAPALVVAIFHERMDLMARLSER
8	<b>LRMIHCEHHYVFC</b> LPHGSAPALVVAIFHERMDLMARLSER
9	<b>LRMIHCEHHYVFC</b> LPHGSAPALVVAIFHERMDLMARLSER
10	<b>LRMIHCEHHYVFC</b> LPHGSAPALVVAIFHERMDLMARLSER

---

**Fonte:** Elaborado pela autora.

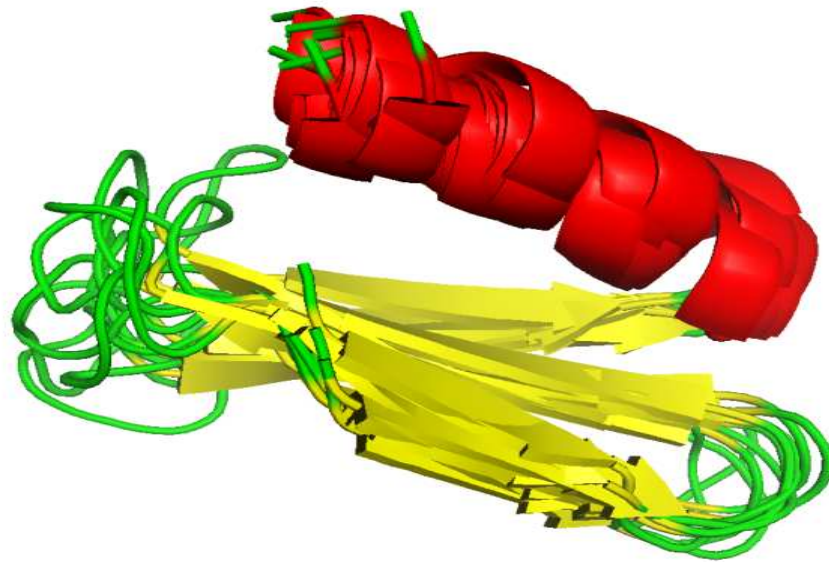
**Tabela 5.** Representação dos 10 modelos sobrepostos para a sequência de aminoácidos do peptídeo ParERM3 gerados pelo servidor QUARK.

As possíveis estruturas de alfa-hélice, folha-beta e randômica estão representadas pelas cores vermelha, amarela e verde, respectivamente.

---

**Sobreposição dos modelos e sequências correspondentes**

---

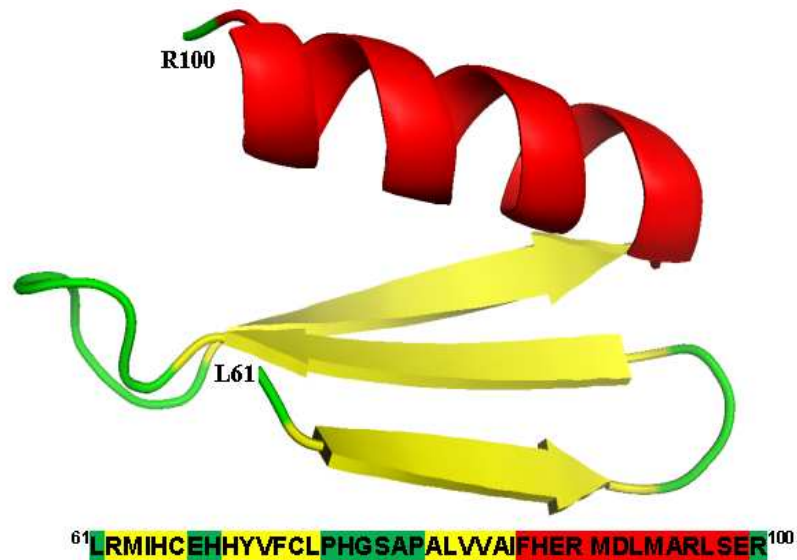


1	<b>LRMIHCEHHYVFCLPHGSAPALVVAIFHER MDLMARLSER</b>
2	<b>LRMIHCEHHYVFCLPHGSAPALVVAIFHER MDLMARLSER</b>
3	<b>LRMIHCEHHYVFCLPHGSAPALVVAIFHER MDLMARLSER</b>
4	<b>LRMIHCEHHYVFCLPHGSAPALVVAIFHER MDLMARLSER</b>
5	<b>LRMIHCEHHYVFCLPHGSAPALVVAIFHER MDLMARLSER</b>
6	<b>LRMIHCEHHYVFCLPHGSAPALVVAIFHER MDLMARLSER</b>
7	<b>LRMIHCEHHYVFCLPHGSAPALVVAIFHER MDLMARLSER</b>
8	<b>LRMIHCEHHYVFCLPHGSAPALVVAIFHER MDLMARLSER</b>
9	<b>LRMIHCEHHYVFCLPHGSAPALVVAIFHER MDLMARLSER</b>
10	<b>LRMIHCEHHYVFCLPHGSAPALVVAIFHER MDLMARLSER</b>

---

**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Figura 24.** Representação de um dos modelos gerados para o Peptídeo ParERM3 e a sequência correspondente.

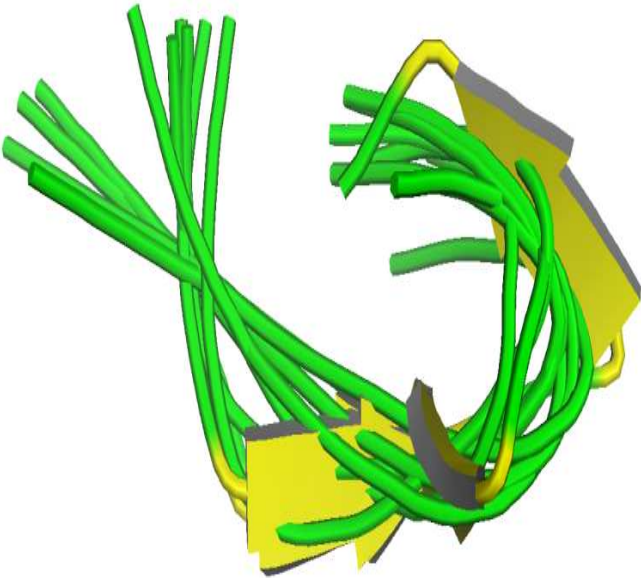


**Fonte:** Elaborado pela autora.

O peptídeo ParEC2 foi projetado de modo a conter os resíduos referentes à estrutura  $\beta$ -3. A modelagem molecular deste peptídeo não pôde ser realizada por homologia nem por métodos baseados em conhecimento (*Threading*) devido ao pequeno tamanho da sequência. Isto pode ser explicado devido ao fato de que mesmo que uma determinada sequência de interesse envolva uma sequência estruturada de uma proteína molde, há que se considerar que isto apenas não é suficiente para se gerar um modelo mais realístico. Em outras palavras, o modelo deve ser gerado por uma modelagem do tipo *de novo*, que leva em consideração as forças físicas de interação de modo a gerar uma estrutura tridimensional energeticamente mais favorável, considerando-se as interações favoráveis e desfavoráveis da pequena sequência. A sequência modelada através do servidor PEP-FOLD (<http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/PEP-FOLD/>) pode ser visualizada na Tabela 6 e na Figura 25. Verifica-se, através dos modelos gerados para o peptídeo ParEC2, que existe uma tendência de estruturação em folha-beta, porém uma maior probabilidade de formação de estrutura desordenada.

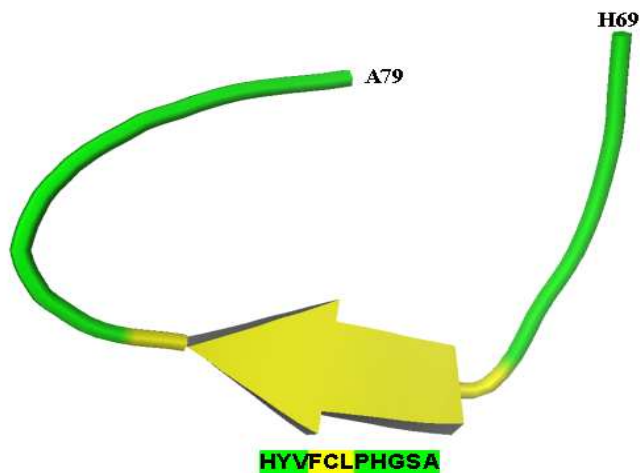
**Tabela 6:** Representação dos 10 modelos sobrepostos para a sequência de aminoácidos do peptídeo ParEC2 gerados pelo servidor PEP-FOLD.

As possíveis estruturas de folha-beta e randômica estão representadas pelas cores amarela e verde, respectivamente.

Sobreposição de modelos	Modelo	Sequência
	1	<b>HYVFCLPHGSA</b>
	2	<b>HYVFCLPHGSA</b>
	3	<b>HYVFCLPHGSA</b>
	4	<b>HYVFCLPHGSA</b>
	5	<b>HYVFCLPHGSA</b>
	6	<b>HYVFCLPHGSA</b>
	7	<b>HYVFCLPHGSA</b>
	8	<b>HYVFCLPHGSA</b>
	9	<b>HYVFCLPHGSA</b>
	10	<b>HYVFCLPHGSA</b>

**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Figura 25.** Estrutura representativa de um dos modelos gerados para o peptídeo ParEC2 e sequência correspondente.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

O peptídeo ParEC3 corresponde à mesma sequência do peptídeo ParELC7, sintetizado anteriormente pelo grupo, com exceção dos últimos cinco resíduos da extremidade C-terminal, que foram excluídos. Esse peptídeo foi projetado visando comparar a influência desses resíduos na atividade inibitória sobre as topoisomerasas. Possui os resíduos correspondentes às estruturas  $\beta 3$ ,  $\beta 4$  e  $\alpha 3$ . A modelagem do peptídeo ParEC3, através do servidor LOMETS, forneceu um conjunto de sequências estruturadas em alfa-hélice e uma sequência em folha beta (Tabela 7).

Como pode ser verificado, não há como gerar modelos confiáveis para pequenas sequências peptídicas através da metodologia por *threading*, portanto neste caso foi utilizado o servidor PEP-FOLD, que realiza uma modelagem do tipo *de novo*. A sobreposição dos 10 melhores modelos gerados indica uma grande probabilidade de formação de uma alfa-hélice e baixa probabilidade de formação de folha beta para a mesma sequência (Tabela 8 e Figura 26).

O peptídeo ParEC4 corresponde à mesma sequência do peptídeo ParEC1, acrescido dos três resíduos de aminoácidos HER. Este peptídeo foi projetado visando a obtenção de uma sequência com melhor solubilidade e maior facilidade de purificação, em virtude das dificuldades apresentadas pelo ParEC1 nesses aspectos. A modelagem deste peptídeo, bem como para o peptídeo ParEC2, não pode ser realizada por homologia ou por métodos baseados em conhecimento (*Threading*) devido ao pequeno tamanho da sequência. Deste modo, foi utilizada a modelagem do tipo *de novo*, utilizando o servidor PEP-FOLD. Os modelos moleculares gerados para a sequência ParEC4 podem ser visualizados na Tabela 9. Verifica-se, através dos modelos gerados, que existe uma maior probabilidade de estruturação desordenada (randômica).

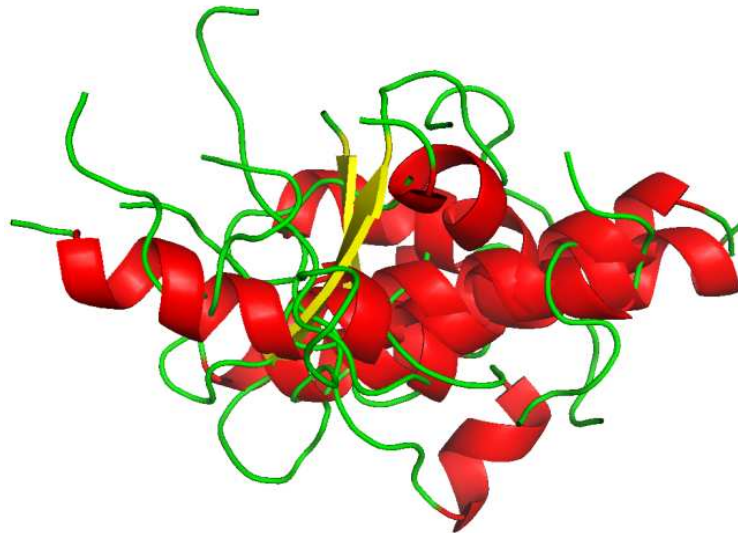
**Tabela 7:** Representação dos 10 modelos sobrepostos para a sequência de aminoácidos do peptídeo ParEC3 gerados pelo servidor LOMETS.

As possíveis estruturas alfa-hélice, folha-beta e randômica estão representadas pelas cores vermelha, amarela e verde, respectivamente.

---

**Sobreposição dos modelos e seqüências correspondentes**

---



1	<b>HYVFCLPHGSAPALVVAIFHERMDLMARLSER</b>
2	<b>HYVFCLPHGSAPALVVAIFHERMDLMARLSER</b>
3	<b>HYVFCLPHGSAPALVVAIFHERMDLMARLSER</b>
4	<b>HYVFCLPHGSAPALVVAIFHERMDLMARLSER</b>
5	<b>HYVFCLPHGSAPALVVAIFHERMDLMARLSER</b>
6	<b>HYVFCLPHGSAPALVVAIFHERMDLMARLSER</b>
7	<b>HYVFCLPHGSAPALVVAIFHERMDLMARLSER</b>
8	<b>HYVFCLPHGSAPALVVAIFHERMDLMARLSER</b>
9	<b>HYVFCLPHGSAPALVVAIFHERMDLMARLSER</b>
10	<b>HYVFCLPHGSAPALVVAIFHERMDLMARLSER</b>

---

**Fonte:** Elaborado pela autora.

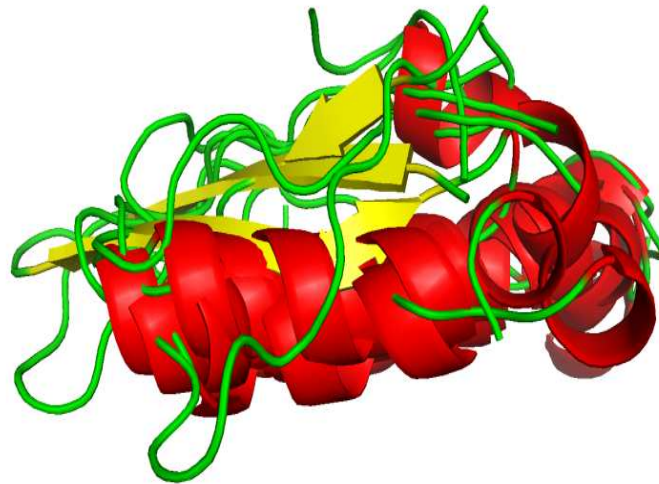
**Tabela 8.** Representação dos 10 modelos sobrepostos para a sequência de aminoácidos do peptídeo ParEC3 gerados pelo servidor PEP-FOLD.

As possíveis estruturas alfa-hélice, folha-beta e randômica estão representadas pelas cores vermelha, amarela e verde, respectivamente.

---

**Sobreposição dos modelos e sequências correspondentes**

---

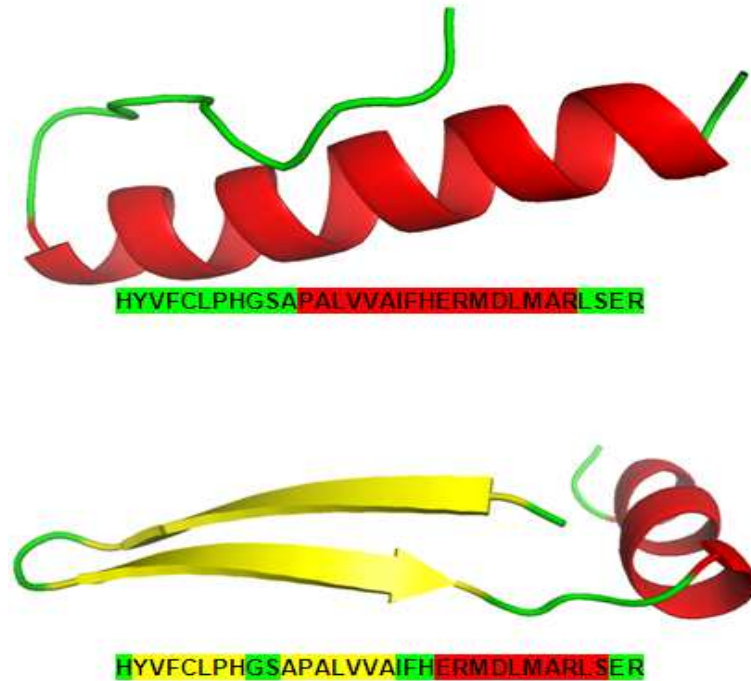


1	HYVFCLPHGS	APALVV	AIFHERMDLMARLSER
2	HYVFCLPH	GSAPALVV	AIFHERMDLMARLSER
3	HYVFCLPHGS	APALVV	AIFHERMDLMARLSER
4	HYVFCLPHGS	APALVV	AIFHERMDLMARLSER
5	HYVFCLPHGS	APALVV	AIFHERMDLMARLSER
6	HYVFCLPHGS	APALVV	AIFHERMDLMARLSER
7	HYVFCLPHGS	APALVV	AIFHERMDLMARLSER
8	HYVFCLPHGS	APALVV	AIFHERMDLMARLSER
9	HYVFCLPHGS	APALVV	AIFHERMDLMARLSER
10			

---

**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Figura 26.** Estrutura representativa de dois dos modelos gerados para o peptídeo ParEC3 pelo servidor PEP-FOLD.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Tabela 9.** Representação dos modelos sobrepostos para a sequência de aminoácidos do peptídeo ParEC4 gerados pelo servidor PEP-FOLD.

As possíveis estruturas de folha-beta e randômica estão representadas pelas cores amarela e verde, respectivamente.

Sobreposição de modelos	Modelo	Sequência
	1	PALVVAIFHER
	2	PALVVAIFHER
	3	PALVVAIFHER
	4	PALVVAIFHER
	5	PALVVAIFHER

**Fonte:** Elaborado pela autora.

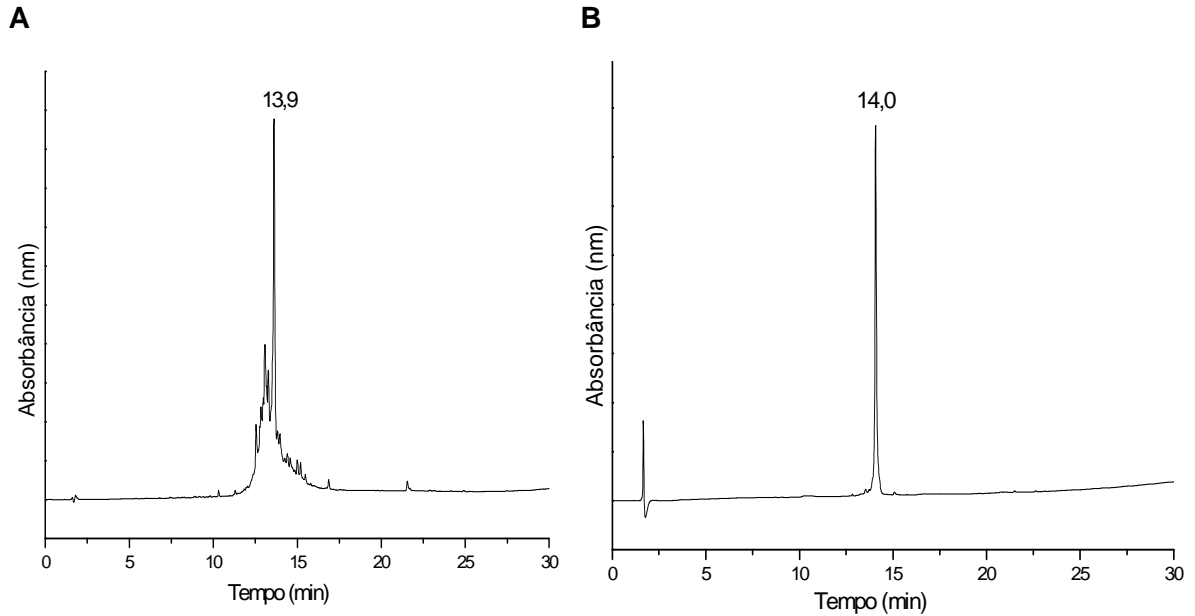
### 4.3 Síntese, purificação e caracterização dos peptídeos

Após a etapa de planejamento e desenho racional da estrutura primária dos peptídeos, os mesmos foram sintetizados manualmente pela metodologia da fase sólida de acordo com o protocolo padrão Fmoc, seguindo as etapas descritas em Materiais e Métodos. Todas as sequências peptídicas, com exceção da ParEC1, foram sintetizadas em resina Rink amida, a qual resulta em peptídeos com um grupamento amida na extremidade C-terminal após a clivagem final. Isso foi necessário para mimetizar a ligação peptídica nesta região, pois nestes peptídeos o resíduo da extremidade C-terminal corresponde a um resíduo interno da sequência da toxina. Em todos os peptídeos a região N-terminal foi acetilada com o anidrido acético após o término da síntese. Isto 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. No caso do peptídeo ParEC1, conforme descrito anteriormente, utilizou-se a resina Wang-Phe e não realizou a acetilação da região N-terminal visando melhorar a solubilidade do peptídeo, que possui todos os resíduos apolares.

Os peptídeos ParERM3 e ParEC3 também foram sintetizados contendo a sonda fluorescente carboxifluoresceína (CBF), na extremidade N-terminal. Estes peptídeos foram escolhidos por terem apresentado os melhores resultados em termos de inibição de atividade das topoisomerasas. Deste modo, foram marcados, para que pudessem ser utilizados em estudos de anisotropia da fluorescência, que visa buscar a subunidade da DNA gyrase que interage com a sequência peptídica.

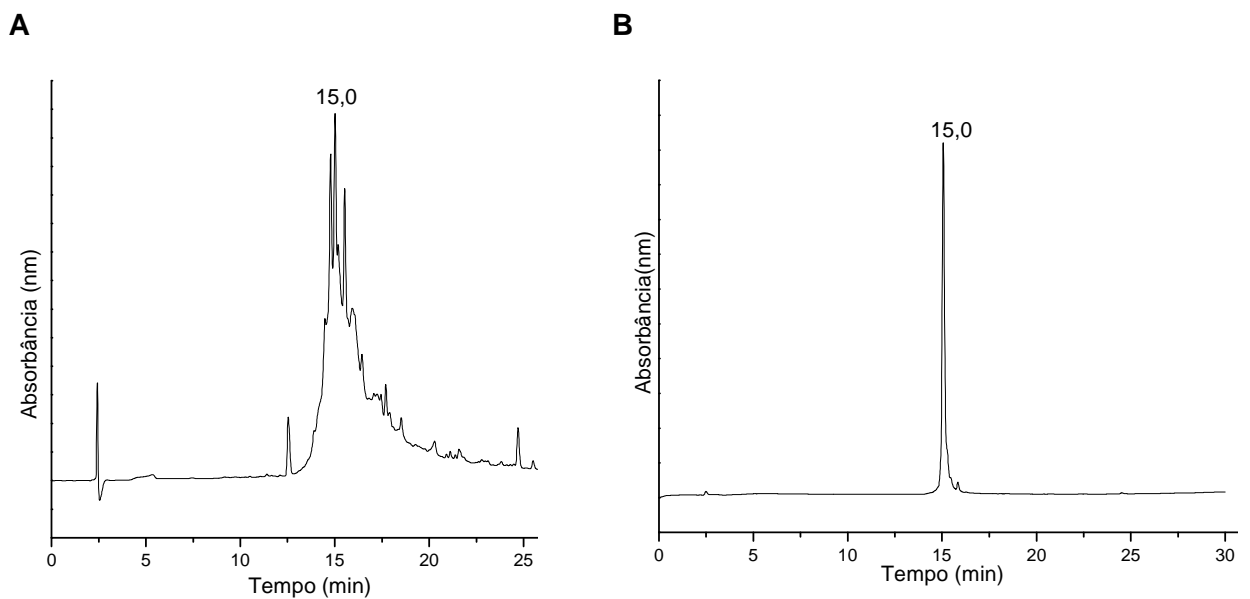
Após as etapas de síntese, clivagem e liofilização, uma pequena quantidade de cada peptídeo liofilizado (aproximadamente 1 mg) foi dissolvida em 1 mL de água ultrapura, filtrada e submetida à análise qualitativa por CLAE, como descrito em métodos. A partir dos resultados de tempo de retenção e porcentagem de solvente obtidos nestas análises, foram definidas as condições relativas à concentração de solvente para purificação dos peptídeos em escala semi-preparativa. 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, antes e após a purificação estão representados nas Figura 27 a 33.

**Figura 27.** Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo **ParERM3** antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa C<sub>18</sub> Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.



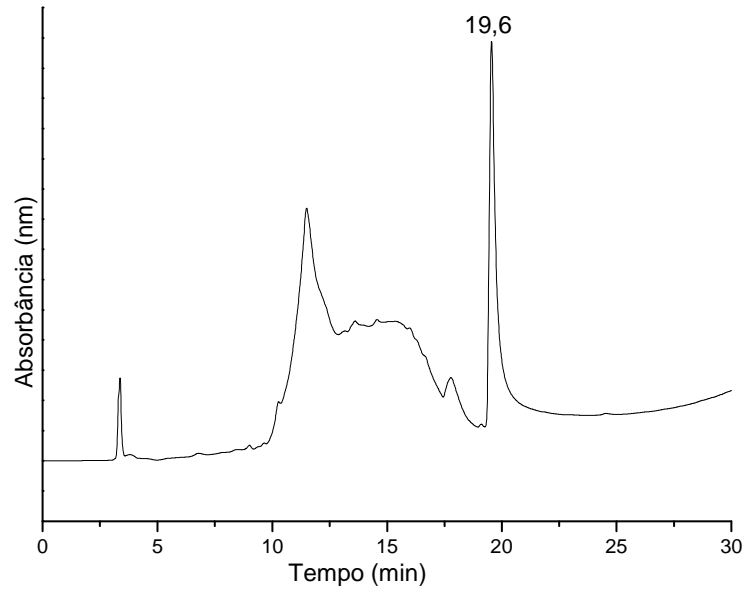
Fonte: Elaborado pela autora.

**Figura 28.** Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo **ParERM3-CBF** antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa C<sub>18</sub> Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å); gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.



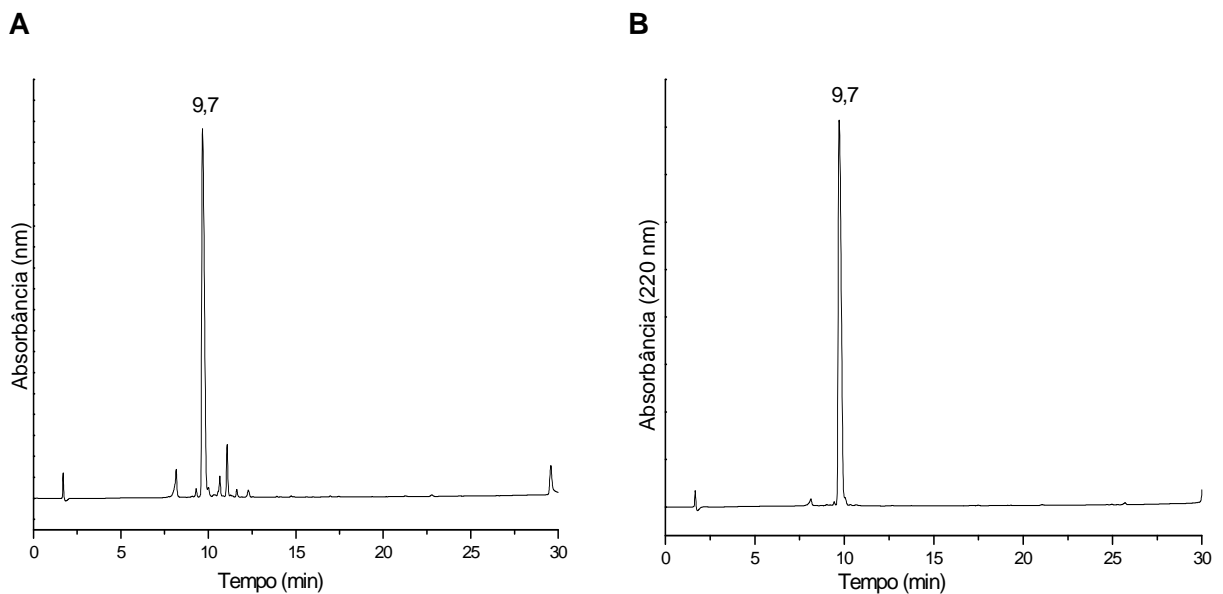
Fonte: Elaborado pela autora.

**Figura 29:** Perfil cromatográfico obtido em escala analítica para o peptídeo **ParEC1** bruto. Coluna de fase reversa C<sub>4</sub> Vydac (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å) com um gradiente linear de 5 a 95% de B (**A**: água, 0,045% TFA; **B**: ACN, 0,036% TFA) em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.



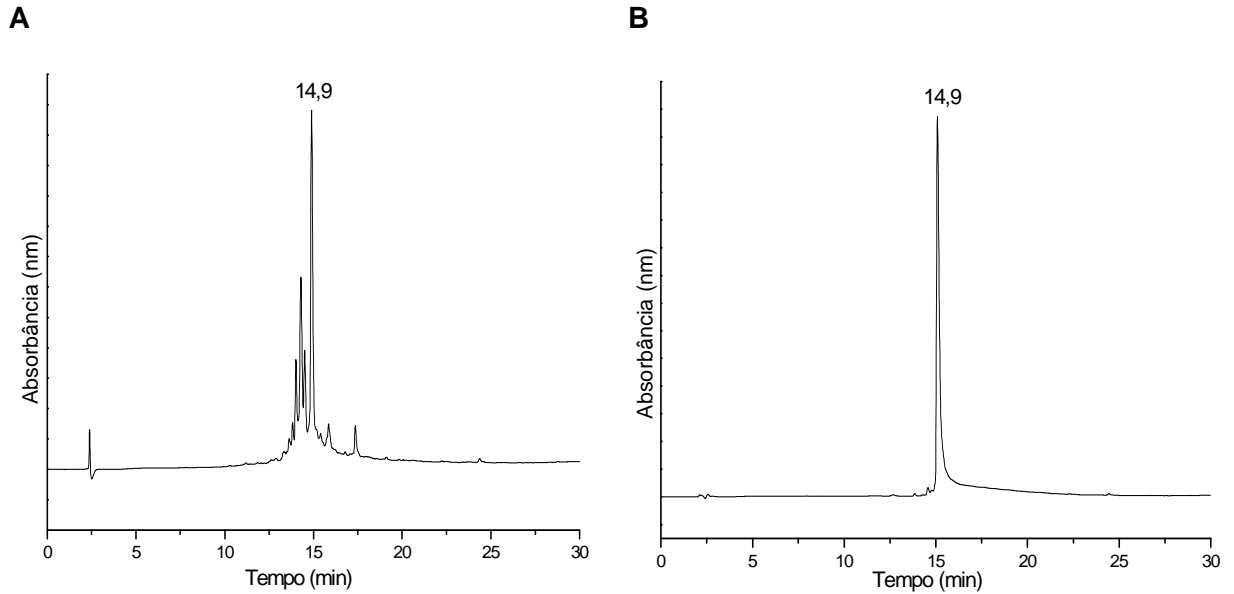
**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Figura 30.** Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo **ParEC2** antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa C<sub>18</sub> Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å), com um gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (**A**: água, 0,045% TFA; **B**: ACN, 0,036% TFA) em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.



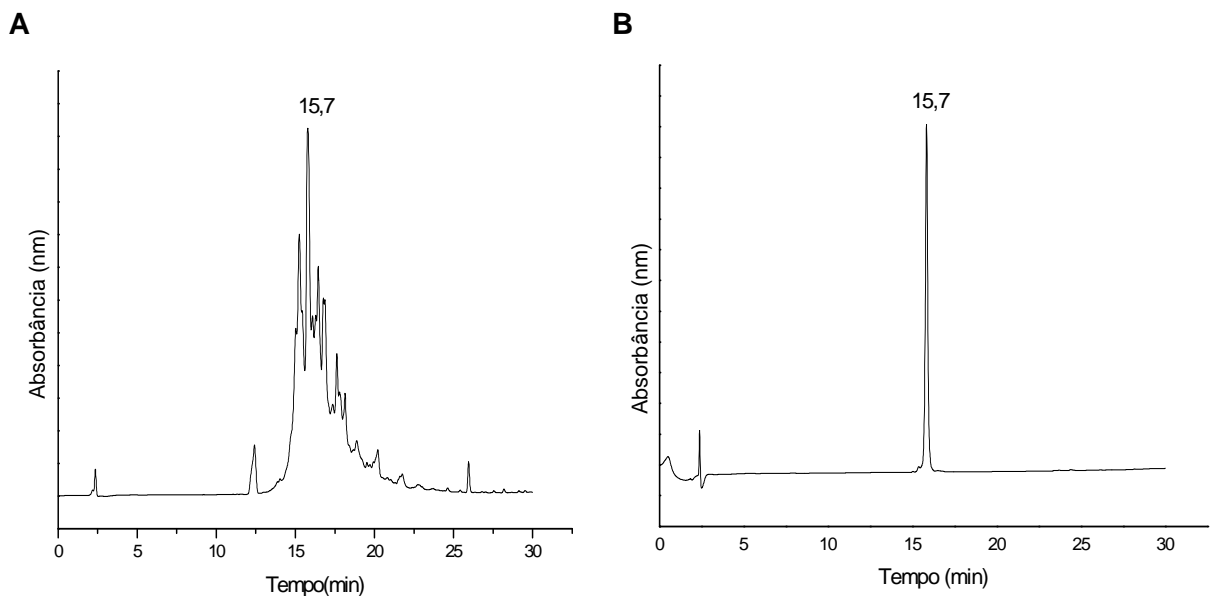
**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Figura 31.** Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo **ParEC3** antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa C<sub>18</sub> Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å), com um gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (**A**: água, 0,045% TFA; **B**: ACN, 0,036% TFA) em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.



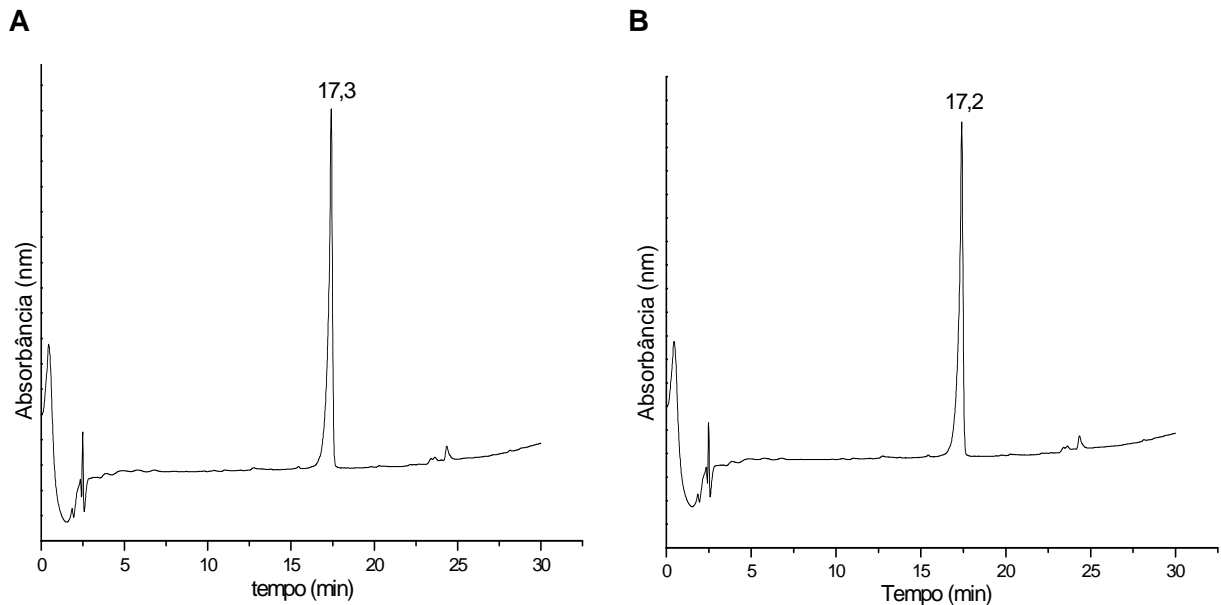
Fonte: Elaborado pela autora.

**Figura 32.** Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo **ParEC3-CBF** antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa C<sub>18</sub> Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å), com um gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (**A**: água, 0,045% TFA; **B**: ACN, 0,036% TFA) em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.



Fonte: Elaborado pela autora.

**Figura 33.** Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo **ParEC4** antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa C<sub>18</sub> Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 A), com um gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

O rendimento da purificação dos peptídeos 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 estão representados na Tabela 10.

**Tabela 10:** Relação das massas dos peptídeos purificados.

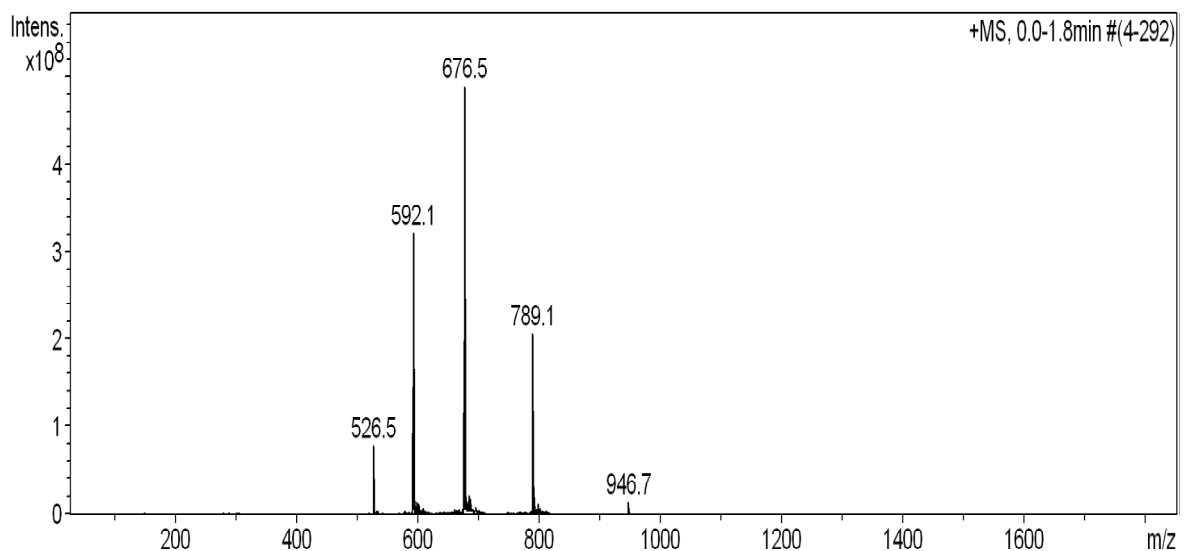
Peptídeo	Massa antes purificação (mg)	Massa após purificação (mg)	Rendimento da purificação %	Pureza relativa %
ParERM3	60	4,3	7,2	97,3
ParERM3-CBF	60	1,5	2,5	97,6
ParEC2	60	5,0	8,3	98,8
ParEC3	60	3,5	5,8	97,1
ParEC3-CBF	60	3,0	5	97,8
ParEC4	60	6,0	10,0	98,9

**Fonte:** Elaborado pela autora.

O peptídeo ParEC1 não consta na tabela devido à falta de sucesso no processo de purificação, embora tenha sido utilizada uma coluna C4, devido à hidrofobicidade do peptídeo. Como pode ser observado pelos dados da tabela, o rendimento das massas dos peptídeos após a purificação é relativamente baixo, o que poderia ser explicado pelas sequências de aminoácidos com acentuada hidrofobicidade, o que dificultou os processos de síntese e extração.

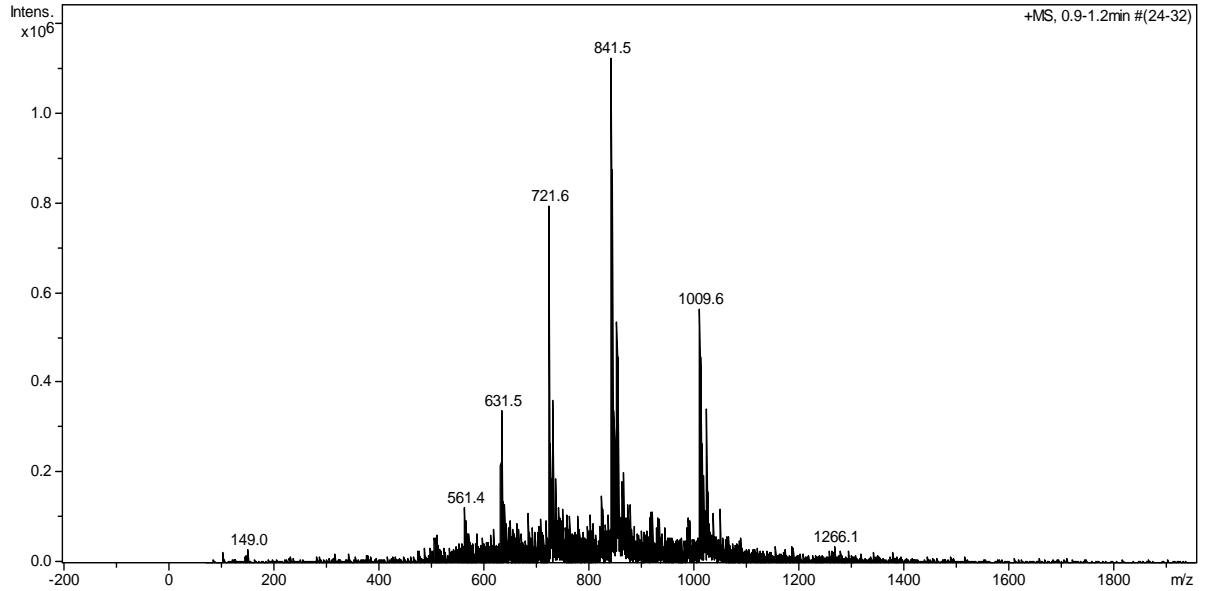
Os peptídeos foram caracterizados por espectrometria de massas, conforme descrito anteriormente em Métodos (Figura 34 a 40). Os valores de massa molecular obtidos por espectrometria de massas no modo electrospray [ES m/z: (MW)], apresentados na Tabela 11 foram coincidentes com os valores teóricos esperados, confirmando a identidade das estruturas peptídicas sintetizadas e levando à conclusão de que os procedimentos utilizados para síntese, clivagem da peptidil-resina e metodologias de purificação desenvolvidas foram bem sucedidas, levando à obtenção das sequencias peptídicas desejadas.

**Figura 34.** Espectro de massas do peptídeo ParERM3. Condições de ESI-MS: capilar: 3KV, cone:37 kV, modo de ionização ES<sup>+</sup>



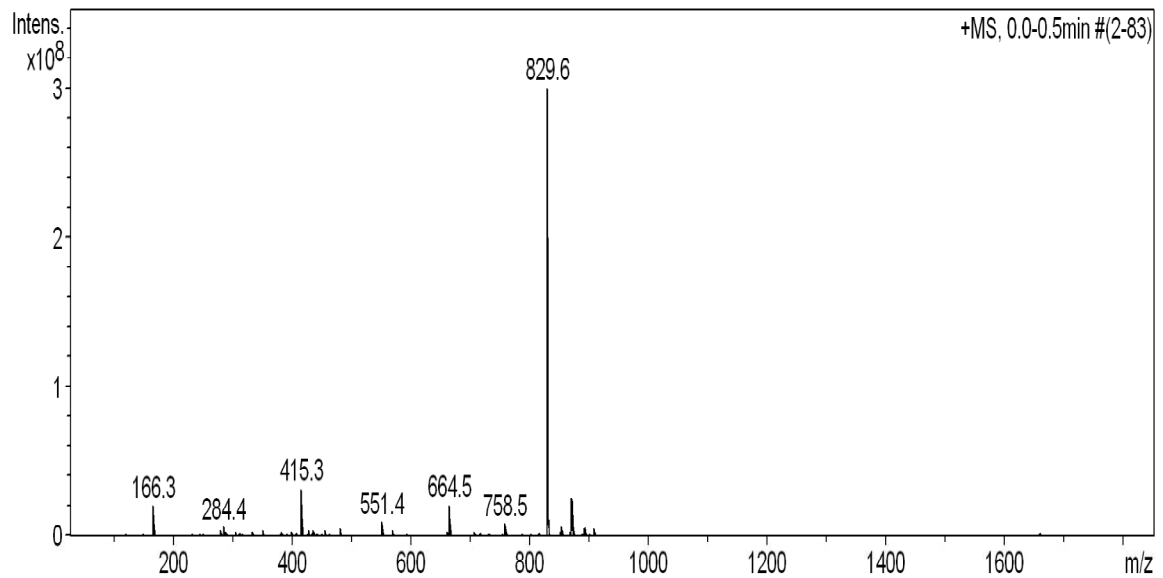
**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Figura 35.** Espectro de massas do peptídeo ParERM3-CBF. Condições de ESI-MS: capilar: 3KV, cone:37 kV, modo de ionização ES<sup>+</sup>



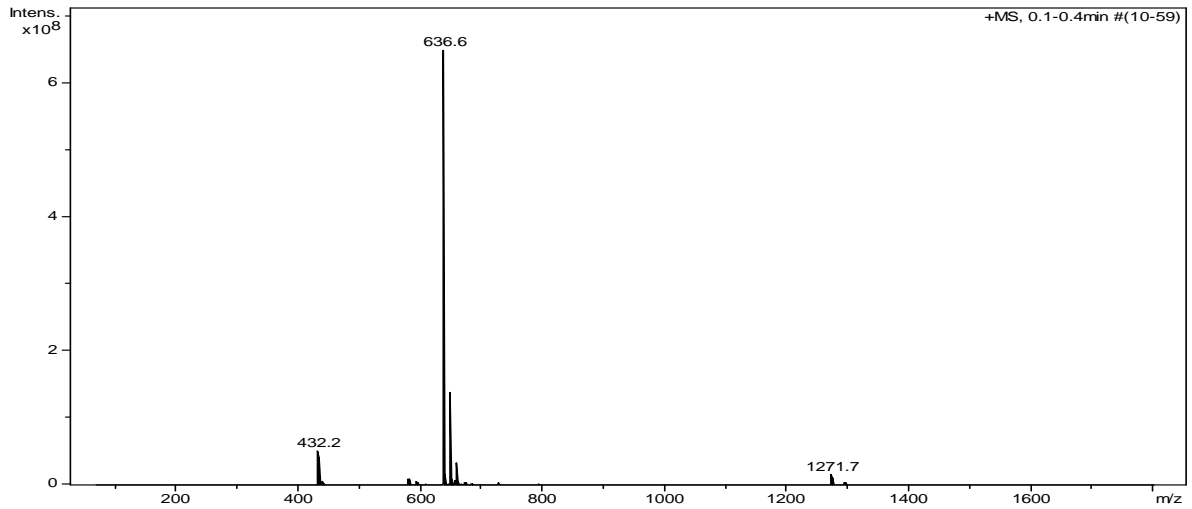
Fonte: Elaborado pela autora.

**Figura 36.** Espectro de massas do peptídeo ParEC1. Condições de ESI-MS: capilar: 3KV, cone:37kV, modo de ionização ES<sup>+</sup>



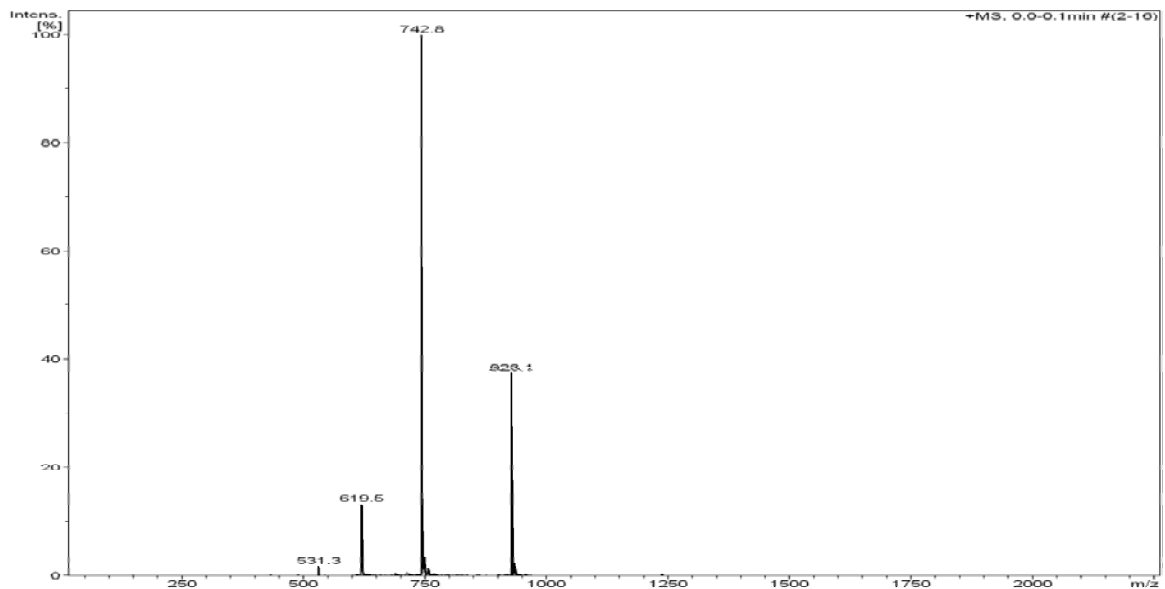
Fonte: Elaborado pela autora.

**Figura 37.** Espectro se massas do peptídeo ParEC2. Condições de ESI-MS: capilar: 3KV, cone:37 kV, modo de ionização ES<sup>+</sup>.



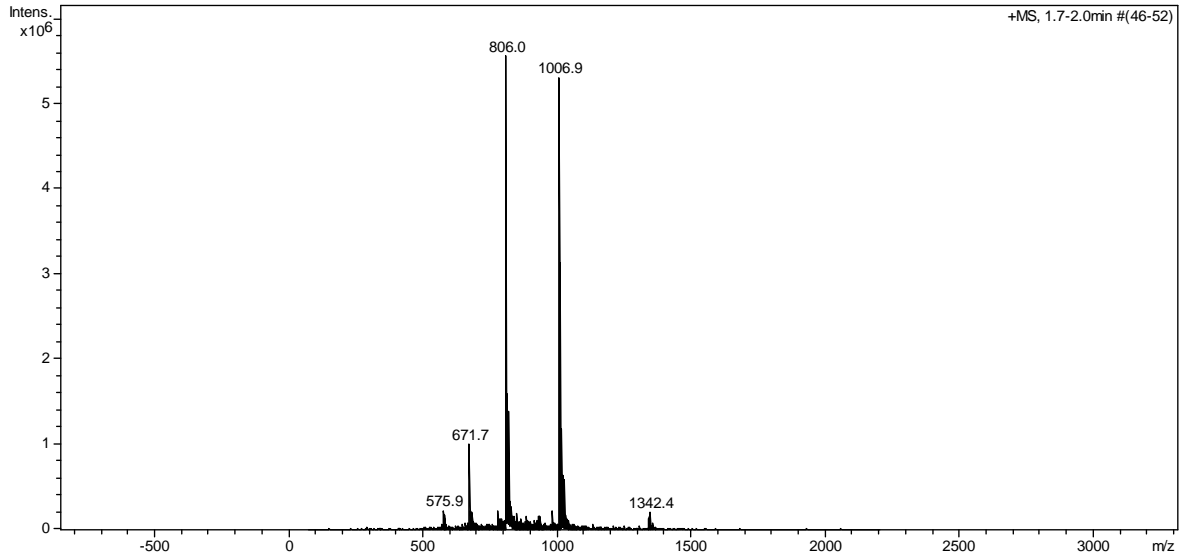
**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Figura 38.** Espectro se massas do peptídeo ParEC3. Condições de ESI-MS: capilar: 3KV, cone:37 kV, modo de ionização ES<sup>+</sup>.



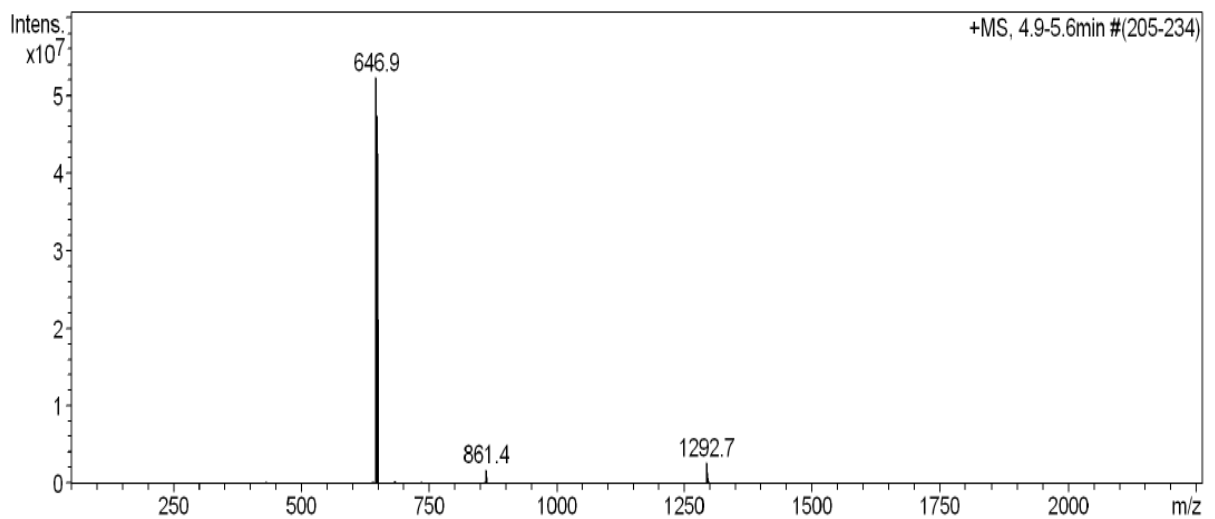
**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Figura 39.** Espectro se massas do peptídeo ParEC3-CBF. Condições de ESI-MS: capilar: 3KV, cone:37 kV, modo de ionização ES<sup>+</sup>.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Figura 40.** Espectro se massas do peptídeo ParEC4. Condições de ESI-MS: capilar: 3KV, cone:37 kV, modo de ionização ES<sup>+</sup>.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Tabela 11.** Resultado das análises de Espectrometria de massas.

Peptídeo	Massa molecular (g/mol)	ES+	ES m/z (MW)
ParERM3	4.728,65	+5	946,7
		+6	789,1
		+7	676,5
		+8	592,1
		+9	526,5
ParERM3-CBF	5.044,94	+5	1009,6
		+6	841,5
		+7	721,7
		+8	631,6
ParEC1	829,05	+1	829,60
		+2	415,3
ParEC2	1.271,47	+1	1271,7
		+2	626,6
ParEC3	3.708,40	+4	928,1
		+5	742,8
		+6	619,06
ParEC3-CBF	4.024,69	+4	1006,9
		+5	805,9
ParEC4	1.292,55	+1	1292,7
		+2	646,9

**Fonte:** Elaborado pela autora.

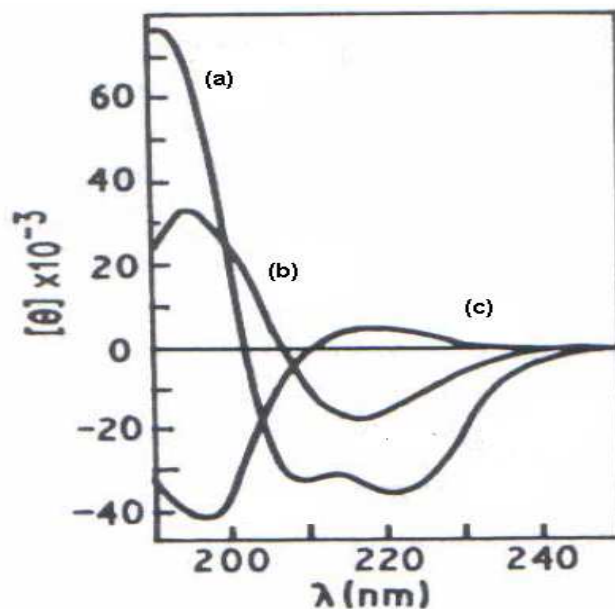
#### 4.4 Estudos estruturais por dicroísmo circular (CD)

Os resultados das análises de CD correspondem às únicas informações sobre estrutura secundária para os peptídeos sintetizados e foram utilizados para correlacionar com os dados de modelagem molecular e dos ensaios de inibição da atividade das topoisomerasas.

As análises foram realizadas conforme descrito na metodologia. Utilizou-se como referência para a análise dos espectros, a Figura 41, que mostra as diferentes formas de espectros de CD, que são referentes às possíveis estruturas secundárias de proteínas. A curva (a) representa o espectro característico de estrutura tipo alfa-

hélice, apresentando duas bandas negativas, uma em torno de 208 nm e outra em torno de 222 nm e, uma banda positiva em torno de 198 nm. A curva (b) representa o espectro característico de estrutura tipo folha- $\beta$  e apresenta uma banda positiva em torno de 196 nm e outra negativa em torno de 218 nm. Já a curva (c) representa o espectro característico de estrutura desordenada, apresentando uma banda negativa com mínimo em torno de 198 nm.

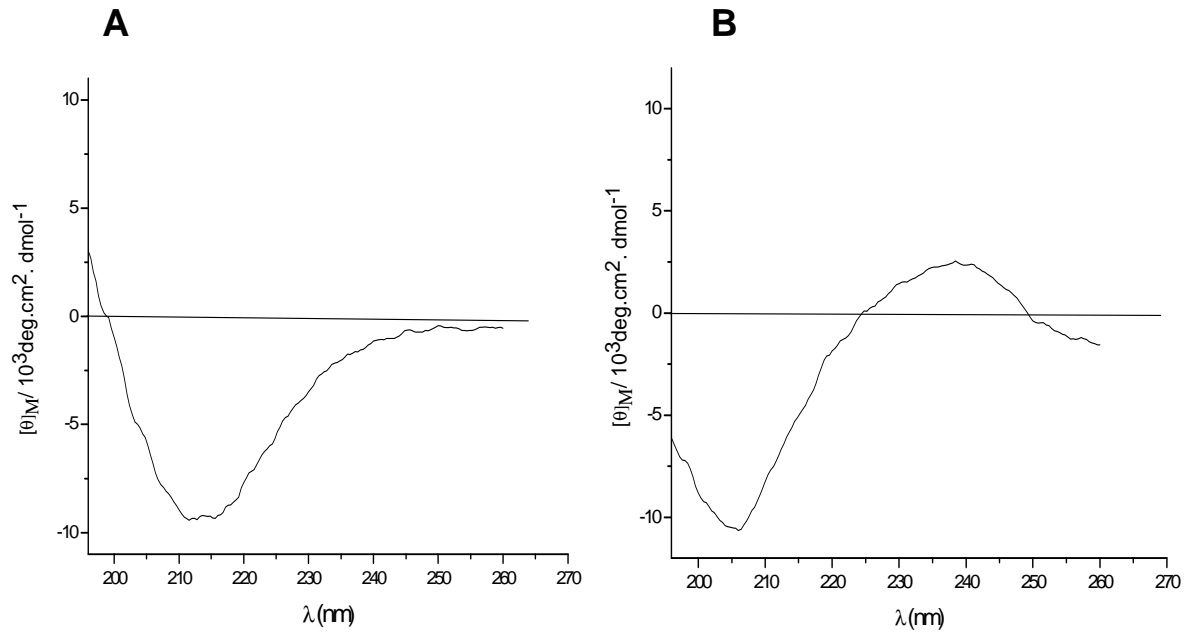
**Figura 41.** Espectro de CD de  $\alpha$ -hélice (a), folha- $\beta$  (b) e estrutura desordenada (c) formadas pelo polipeptídeo poli-L-lisina.



**Fonte:** Adaptado de CAMPBELL & DWEK (1983).

A análise do espectro de CD do peptídeo ParERM3 ( Figura 42A) apresentou uma sutil tendência de formação de alfa-hélice, com tendência predominante de estruturação em folha-beta. Este resultado confirma a existência do núcleo de folhas-beta seguido por uma alfa-hélice obtido pela modelagem molecular. Já o espectro obtido para o mesmo peptídeo sintetizado com carboxifluoresceína em sua porção N-terminal (Figura 42B) apresentou curva característica de estrutura desordenada, indicando a perda de estruturação devido a inserção da carboxifluoresceína na extremidade N-terminal.

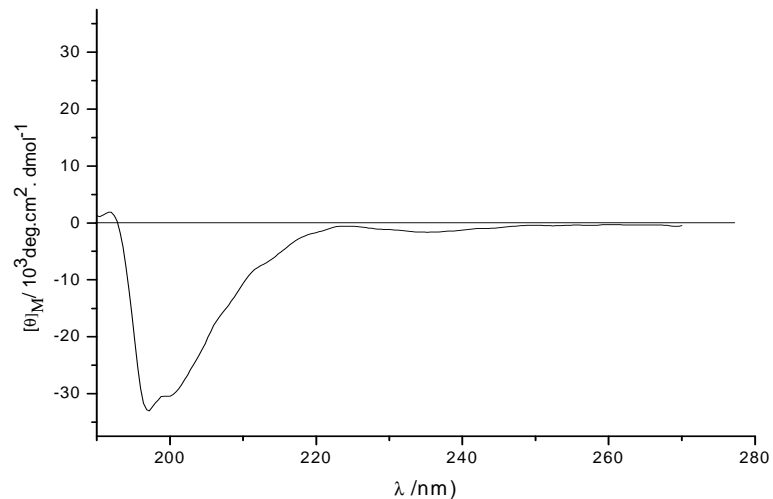
**Figura 42.** Espectro de CD do peptídeo ParERM3 (A) e ParERM3-CBF (B).



**Fonte:** Elaborado pela autora.

O espectro do peptídeo ParEC2 mostrou pequena tendência de estruturação em folha-beta e maior probabilidade de formação de estrutura desordenada, conforme pode ser visualizado na Figura 43. Os resultados obtidos da maioria dos modelos moleculares gerados para esta sequência são coincidentes com o espectro de CD obtido.

**Figura 43.** Espectro de CD do peptídeo ParEC2.



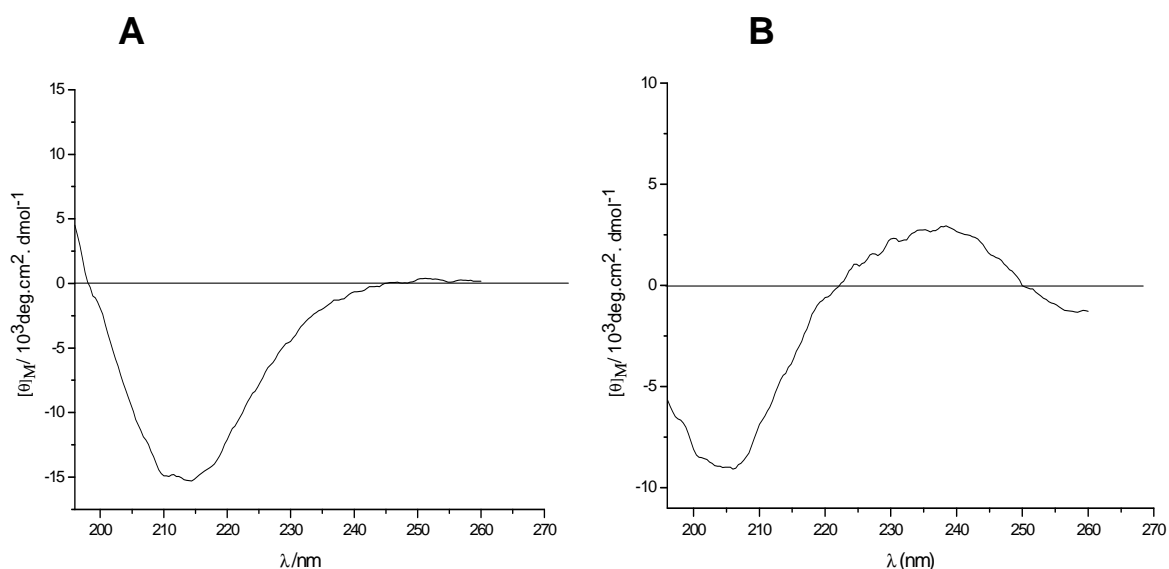
**Fonte:** Elaborado pela autora.

O peptídeo ParEC3 apresentou uma sutil tendência de formação de alfa-hélice, com tendência predominante de estruturação em folha-beta, conforme pode ser verificado no espectro representado na Figura 44A. Embora a maioria dos modelos gerados na modelagem molecular deste peptídeo apresente maior probabilidade de formação de alfa-hélice, dois desses modelos são coincidentes com a formação de folha-beta e, portanto, com os resultados do CD.

O peptídeo ParEC3-CBF também apresentou curva característica de estrutura desordenada (Figura 44B), semelhante à curva obtida para o peptídeo ParERM3-CBF, o que representa mais uma evidência de que a carboxifluoresceína promove desestabilização da sequência peptídica, favorecendo assim a perda de estrutura.

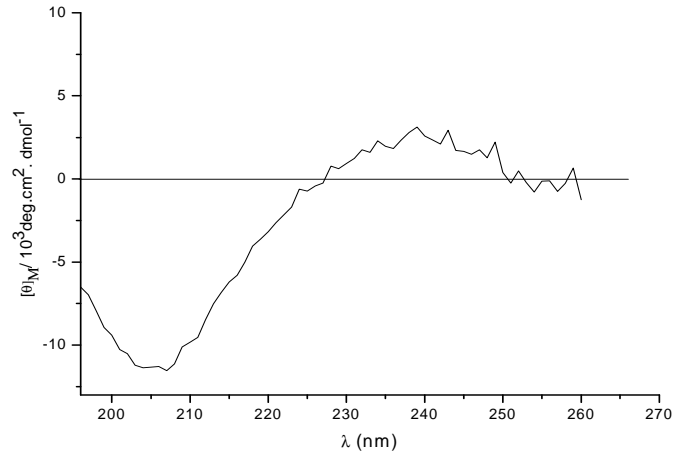
O espectro do peptídeo ParEC4 mostrou tendência de estruturação em folha-beta, conforme pode ser visualizado na Figura 45. Este resultado é coincidente com os modelos gerados para esta sequência na modelagem molecular.

**Figura 44.** Espectro de CD do peptídeo ParEC3 (A) e ParEC3-CBF (B).



**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Figura 45.** Espectro de CD do peptídeo ParEC4.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

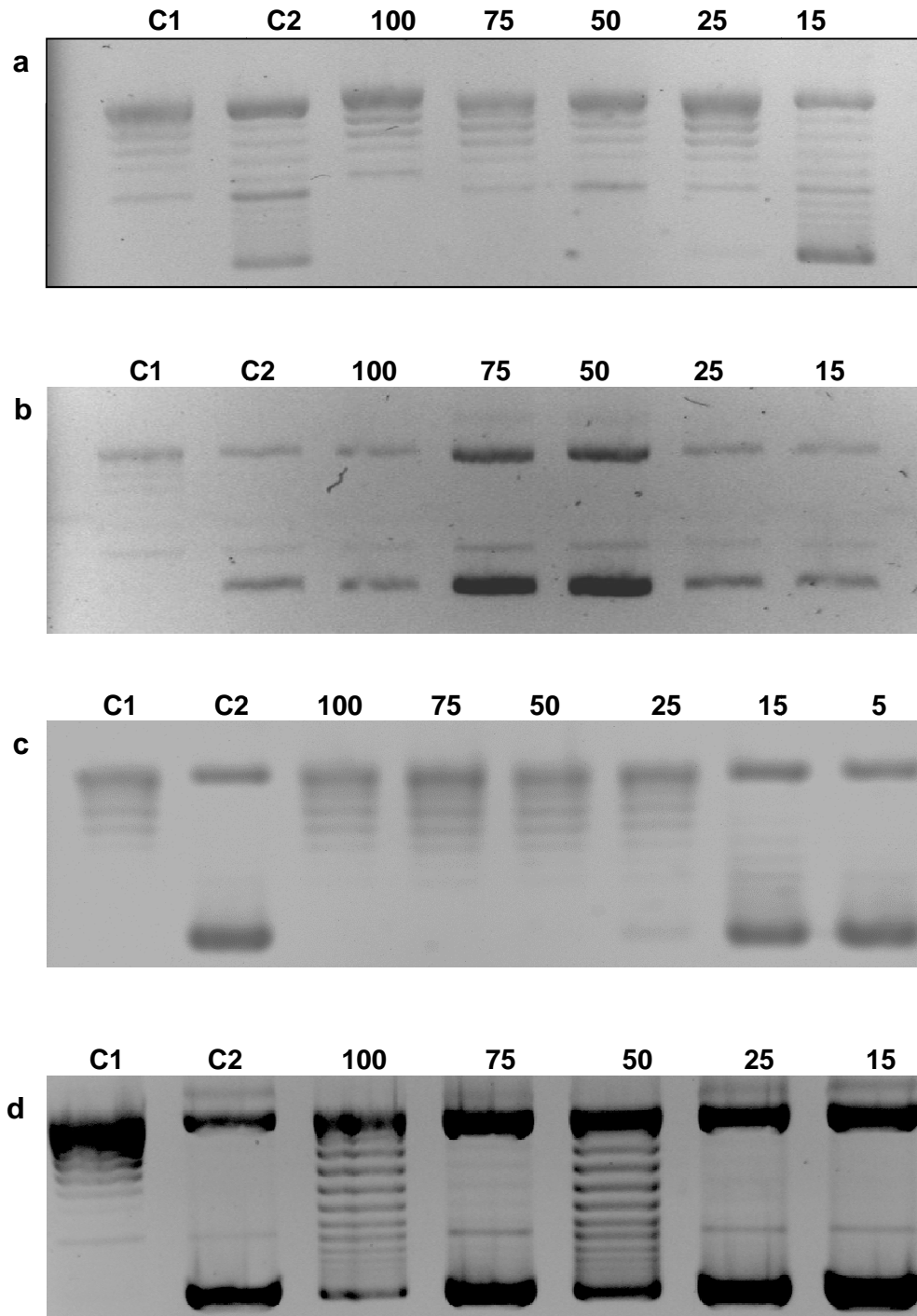
#### 4.5 Ensaio de inibição da atividade das topoisomerases bacterianas

Os peptídeos sintetizados e purificados foram testados quanto a suas capacidades inibitórias sobre a atividade das topoisomerases bacterianas.

A enzima DNA girase introduz superenovelamento negativo em um DNA circular fechado, gerando uma molécula mais compacta, que migra mais rapidamente em relação ao DNA relaxado durante a corrida em gel de eletroforese. Deste modo, foram realizadas as reações de superenovelamento do DNA pela girase na presença dos peptídeos de interesse e os resultados podem ser visualizados na Figura 46.

A toxina ParE é uma proteína com mecanismo de ação ainda não bem elucidado, mas com atividade inibitória sobre a DNA girase comprovada (JIANG et al., 2002). Outra toxina, a CcdB, é uma proteína muito bem estudada e que também possui atividade inibitória sobre a DNA girase. Usando tais proteínas como modelo para o desenho racional de peptídeos, nosso grupo mostrou que além de inibir a atividade da DNA girase, os peptídeos derivados dessas toxinas também inibiram a atividade da topoisomerase IV (TROVATTI et al., 2008; BARBOSA, et al., 2012).

**Figura 46.** Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) dos peptídeos ParERM3 (a), ParEC2 (b), ParEC3 (c) e ParEC4 (d) sobre a atividade da DNA girase. A DNA girase (1U) foi incubada com 0,5 µg de plasmídeo pBR322 relaxado e concentrações decrescentes dos peptídeos de interesse a 37°C por 1 hora. Posteriormente, a mistura foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1%. **C1:** controle positivo (plasmídeo pBR322 relaxado); **C2:** (plasmídeo pBR322 relaxado e a enzima DNA girase); os números em cada aplicação no gel representam a concentração de cada um dos peptídeos em µmol. L<sup>-1</sup>.

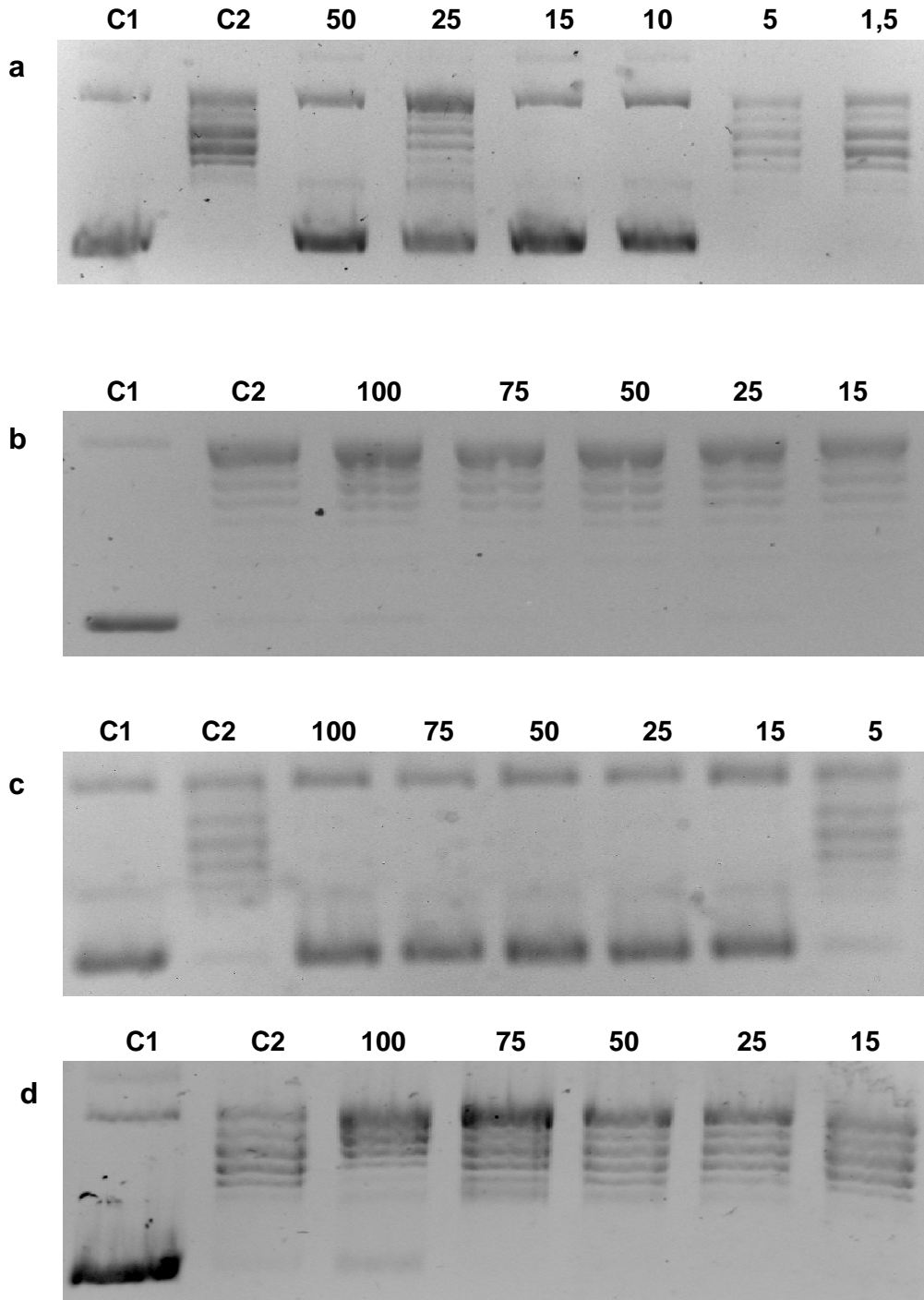


Fonte: Elaborado pela autora.

A topo IV é uma topoisomerase bacteriana do tipo II que possui estrutura e mecanismo catalítico semelhante à girase. A topo IV possui a capacidade de relaxar positiva ou negativamente moléculas de DNA superenovelado, gerando uma molécula mais volumosa que migra mais lentamente em relação à molécula de DNA superenovelado fechado durante a eletroforese em gel. Assim, a reação de relaxamento do DNA superenovelado catalisada pela topoisomerase IV foi realizada na presença de cada um dos peptídeos e submetidos à eletroforese em gel. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 47.

Os valores aproximados de IC 100 de cada peptídeo para as reações de superenovelamento e relaxamento das enzimas girase e topoisomerase IV, respectivamente, estão detalhados na Tabela 12. Conforme pode ser observado, os peptídeos ParERM3 e ParEC3 apresentaram os melhores valores de inibição para ambas as enzimas. Estes dois peptídeos possuem em comum a sequência de aminoácidos H<sup>69</sup> a R<sup>100</sup>, que parece desempenhar importante papel de estabilização e estruturação. Observa-se também que estes dois peptídeos apresentaram um relevante aumento da atividade inibitória das topoisomerasas, comparativamente às sequências contendo os cinco resíduos de aminoácidos C-terminal (LNIES), da proteína ParE de *E. coli*, representadas pelos peptídeos ParELC8 e ParELC7, previamente estudados por BARBOSA et al., 2012. Estes resultados deixam evidente que a sequência de aminoácidos “LNIES”, quando presente na porção C-terminal dos peptídeos em estudo, provoca uma acentuada diminuição da atividade inibitória. Isso poderia ser explicado pelo fato da sequência “LNIES” consistir em uma estrutura desordenada que provavelmente se dobra sobre a sequência peptídica, bloqueando a interação do peptídeo com as topoisomerasas. Tal fenômeno provavelmente não influencia na atividade tóxica da proteína ParE selvagem em virtude do seu maior tamanho e melhor estruturação e estabilização. Estudos anteriores de análise de alinhamento múltiplo com sequências ParE de diferentes espécies bacterianas mostram alta variabilidade para a região que compreende a sequência de aminoácidos “LNIES”. Tais estudos sugerem a possibilidade da conformação randômica de “LNIES” permitir uma aproximação das cadeias laterais dos dois aminoácidos altamente conservados entre diferentes espécies bacterianas, H88 e M91, prevenindo assim interações moleculares responsáveis pela inibição das topoisomerasas (Figura 48) (BARBOSA et al., 2012).

**Figura 47.** Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) dos peptídeos ParERM3 (a), ParEC2 (b), ParEC3 (c) e ParEC4 (d) sobre a atividade da topoisomerase IV. A topoisomerase IV (1U) foi incubada com 0,5 µg de plasmídeo pBR322 superenovelado e concentrações decrescentes dos peptídeos de interesse a 37 °C por 1 hora. Posteriormente, a mistura foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1%. **C1:** controle positivo (plasmídeo pBR322 relaxado); **C2:** (plasmídeo pBR322 relaxado e a enzima topoisomerase IV); os números em cada aplicação no do gel representam a concentração de cada um dos peptídeos em µmol. L<sup>-1</sup>.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Tabela 12.** Comparação da atividade inibitória dos peptídeos análogos da proteína ParE de *E.coli* em topoisomerases bacterianas.

Peptídeos	IC <sub>100</sub> (μmol L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	
	DNA girase	Topo IV
ParELC8 <sup>b</sup>	35	50
ParERM3 <sup>c</sup>	25	10
ParEC2 <sup>c</sup>	não inibe	não inibe
ParELC7 <sup>b</sup>	75	75
ParEC3 <sup>c</sup>	25	15
ParEC4 <sup>c</sup>	não inibe	não inibe

<sup>a</sup>Concentração do inibidor requerida para a completa inibição da atividade da topoisomerase (valor aproximado).

<sup>b</sup>Peptídeos previamente estudados (Barbosa et al, 2012).

<sup>c</sup>Peptídeos em estudo no presente trabalho.

**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Figura 48.** Alinhamento múltiplo de várias sequências C-terminal de toxinas bacterianas ParE. Os aminoácidos altamente conservados estão destacados em vermelho. A região de aminoácidos “LNIES” de ParE de *Escherichia coli* está marcada em azul.

<i>Escherichia coli</i>	DMSLFPPELRMIHCEHHYVFCPLPHGSAPALVVAIFHERMDLMARLSERLNIES----
<i>Caulobacter crescentus</i>	PDENLRAGYRRCASGSHVVFYRVG--VRVEIIRVLEQSMNARAHLG-----
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ACDEIRPGYRKLKLSAGSHTLFYRVGTGEGTIDVVRVLEQRMVDVDRNL-----
<i>Vibrio cholerae</i>	SCDEIREGYRKFPGQSHFIFYQQTGSQQIRVIRILKSMVDVNPIFGA-----
<i>Pseudomonas syringae</i>	DMSALFPALRMGRYEHYVFCPLPREGAPALIVAIFFHERMDLMTRLVDRLKE-----
<i>Stappia aggregata</i>	DMSGLYPSLRMARCEHHYVFCPLPRERAPALVVAIFHERMDLMTRLADRISAREF---
<i>Xylella fastidiosa</i>	NMSVLFPALRMGRCEHHYVFCPLPREGAPALIVAIFFHERMDLMTRLADRLK-----
<i>Shewanella baltica</i>	LKPDVGSNVMSFPHASHVIYYVTNEPQ-LIVFGVLEKRMVFPNHLGERDMIS-----
<i>Hahella chejuensis</i>	DRSYVRPSLRAYVYVGSVHVFYKPTVYG-VAVIRVLEQSMQVYVRHL-----
<i>Nitrosomonas europaea</i>	ACDDIREGYFKYGVGKHFVIFYRHTGKDQIEIIRILHGRMDIEQHL-----
<i>Gramella forsetii</i>	SAEQTRKNYRVTKIKSHLIFYRKDENQTVETIIRILHERMDIKRRL-----
<i>Methylobacter tundripaludum</i>	SFSERYPQIQVTRCEHHYIFFYIHPEGKRPCIIVLHERMKNKVALENRLD-----
<i>Novosphingobium nitrogenifigens</i>	VPVEFGVEGFYGRCGHHYVYWRLEKAGQVGIIVTILHERMHQISRFRDDVLP-----
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	VPAEFVVEGYFFRYERHFVYWRRLSNADIGIVTILHERMHQMDRFKQDFG-----
<i>Rhizobium etli</i>	VPADIKRSAYFGRCEHHYVFFRELKNGDLGVMSMLHERMNLVRLKEDLAALSNEQP

**Fonte:** Adaptado de BARBOSA et al. (2012).

Os peptídeos ParEC2 e ParEC4 não apresentaram atividade inibitória sobre as topoisomerases bacterianas. As sequências H<sup>69</sup> a A<sup>79</sup> e P<sup>80</sup> a R<sup>90</sup>, quando testadas isoladamente, como no caso destes dois peptídeos, parecem não influenciar na interação com as topoisomerases e, por conseguinte, não afetar a atividade das mesmas. Isto poderia ser explicado levando-se em consideração a reduzida dimensão das sequências e à tendência de não estruturação das mesmas, o que aparentemente reflete na interação com as enzimas, fator predominante no processo de inibição da atividade.

#### **4.6 Ensaio de inibição da atividade da topoisomerase II humana**

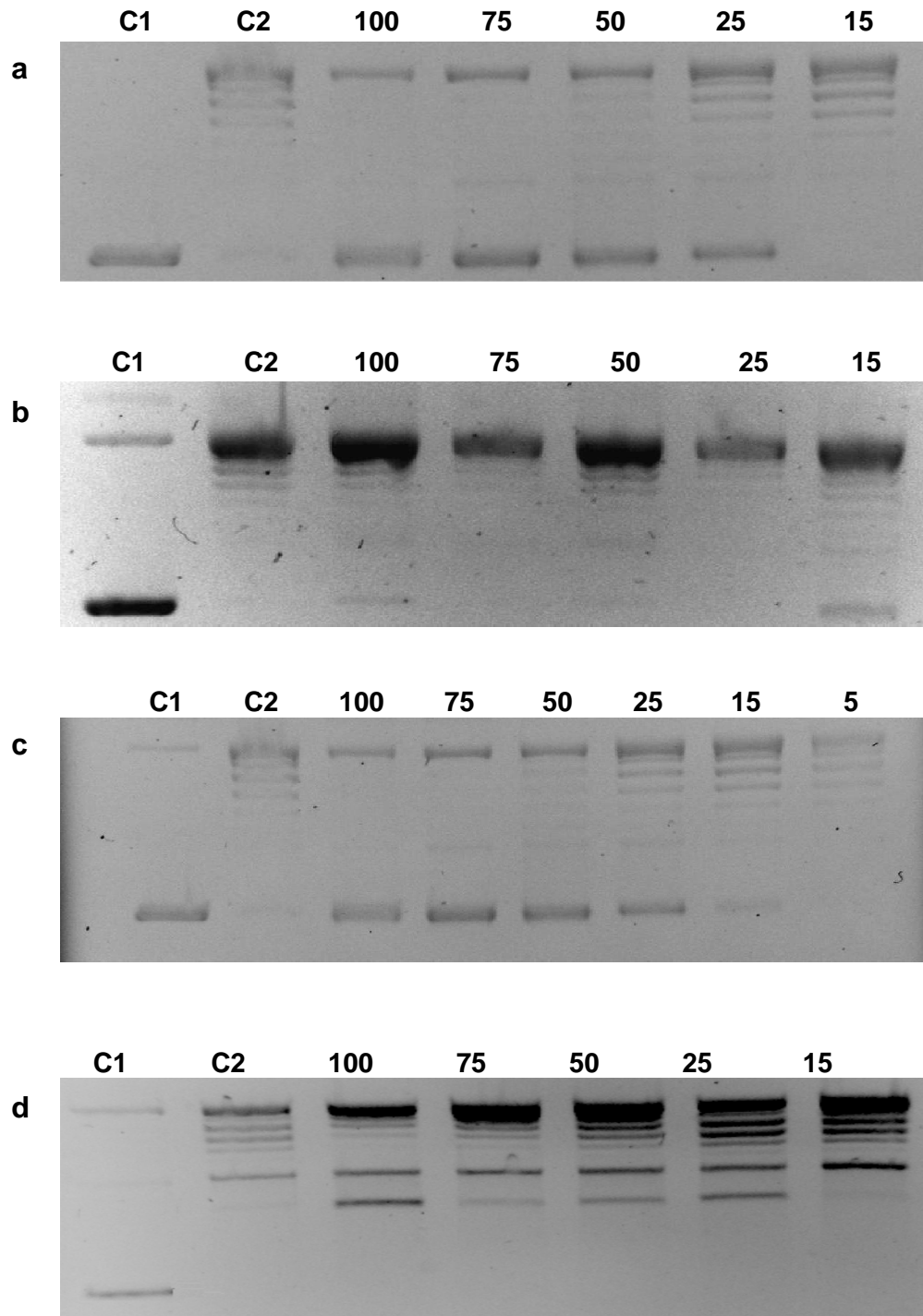
Embora relativamente diversa, a nível molecular, as topoisomerases tipo II bacteriana (DNA-girase e topo IV ) e a topoisomerase II humana demonstram homologia estrutural e funcional suficiente, que é a base molecular para o modo conservado de interacção entre a enzima e o DNA , e também serve como um mecanismo de resposta celular comum para a ação de drogas.

A exemplo das topoisomerases II bacterianas, que é um importante alvo terapêutico para antibióticos naturais e sintéticos, a topoisomerase II humana também é o alvo celular de muitas drogas anticancer (TOPCU, 2001).

Estudos *in vitro* de binding revelaram um domínio comum de interação entre a topoisomerase II humana e os agentes anti-neoplásicos e antimicrobianos (ELSEA et al., 1997). Assim sendo, o efeito dos peptídeos na reação de relaxamento do DNA catalisado pela topoisomerase II humana também foi avaliado por ensaios de eletroforese em gel.

Dentre os peptídeos ensaiados somente ParERM3 e ParE3 (Figura 49) foram capazes de inibir a atividade da topoisomerase II humana, com valores de IC<sub>100</sub> muito próximos daquele obtido para a DNA gyrase (25 e 20 µmol.L<sup>-1</sup>, respectivamente), uma contradição ao fato de que drogas antibacterianas inibem topoisomerases de procariotos em concentrações entre 100 e 1000 vezes menor que no caso de enzimas de eucariotos, os alvos preferenciais das drogas anticâncer (HEISIG, 2009).

**Figura 49.** Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) dos peptídeos ParERM3 (a), ParEC2 (b), ParEC3 (c) e ParEC4 (d) sobre a atividade da topoisomerase II humana. A topoisomerase II (1U) foi incubada com 0,5  $\mu\text{g}$  de plasmídeo pBR322 superenovelado e concentrações decrescentes dos peptídeos a 37 °C por 1 hora. Posteriormente, a mistura foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1%. **C1:** controle positivo (plasmídeo pBR322 superenovelado); **C2:** (plasmídeo pBR322 relaxado e a enzima topo II humana); os números em cada aplicação no gel representam a concentração de cada um dos peptídeos em  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .



**Fonte:** Elaborado pela autora.

De acordo com Barbosa e colaboradores (2012), a atividade de peptídeos derivados de ParE de *E. coli* sobre a topoisomerase II humana aparentemente depende de uma associação entre duas folhas  $\beta$  ( $\beta_2$  e  $\beta_3$ ), uma vez que a presença da terceira folha  $\beta$  ( $\beta_4$ ) reduzia a habilidade dos peptídeos derivados em inibir a atividade da enzima.

Os resultados obtidos com ParERM3 e ParEC3 divergem destes autores quando evidencia que a associação de folhas  $\beta_3$  e  $\beta_4$ , são mais importantes que aquelas descritas, na eficiência de inibição da topoisomerase II humana. De fato, estes dois peptídeos têm em comum, além da hélice  $\alpha_3$ , as duas folhas  $\beta_3$  e  $\beta_4$ .

Esta divergência entre os resultados reside no fato de que estes autores compararam a atividade inibitória de peptídeos contendo a extremidade C-terminal LNIES, sequência que notoriamente reduz a atividade inibitória, quando presente na estrutura peptídica.

Embora, muitos estudos são ainda necessários, incluindo ensaios de genotoxicidade e citotoxicidade, os resultados de inibição da atividade da topoisomerase II humana dão uma ideia da potencialidade dos peptídeos derivados de ParE, especialmente ParERM3 e ParEC3, como futuro agentes anticâncer.

#### **4.7 Avaliação da interação dos peptídeos com a DNA Girase.**

Conforme descrito detalhadamente na introdução, a DNA girase é formada por quatro subunidades proteicas, sendo duas GyrA e duas GyrB. A forma ativa da enzima consiste, portanto em um heterotetrâmero  $A_2B_2$  (MAXWELL, 1993).

Estudos mostram que a toxina ParE é um inibidor da DNA girase (JIANG et al., 2002), entretanto o mecanismo de interação desta toxina com esta enzima permanece desconhecido. Nesse contexto, utilizando a proteína ParE como modelo para a obtenção dos peptídeos em estudo neste trabalho, buscou-se investigar qual(is) a (s) subunidade(s) envolvida (s) na interação com os peptídeos que apresentaram inibição da atividade da DNA girase nos ensaios de eletroforese.

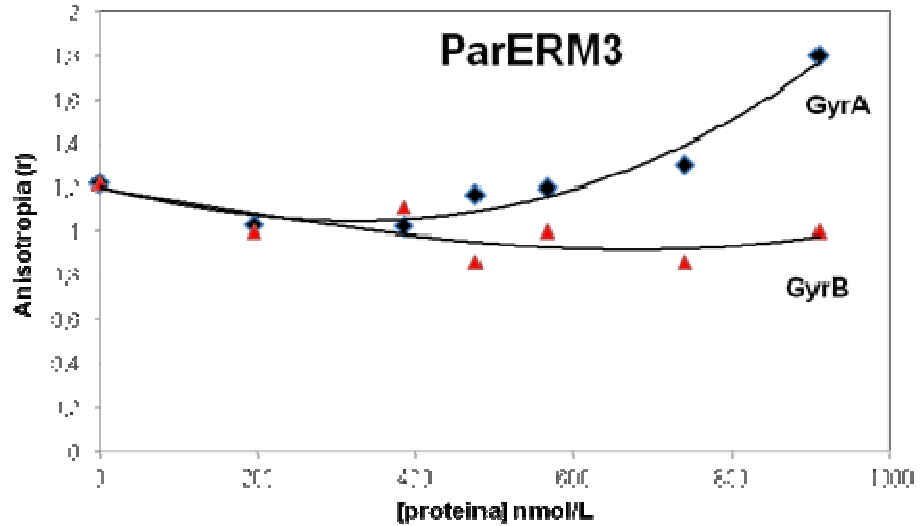
Uma abordagem para avaliar a interação dos peptídeos com a DNA girase é a observação de fluorescência extrínseca por anisotropia de fluorescência. Esta técnica envolve a marcação de proteínas de interesse com um fluoróforo repórter e o monitoramento da polarização da fluorescência das proteínas marcadas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

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

Os peptídeos investigados neste ensaio, ParERM3 e ParEC3, como não possuíam nenhum grupamento amino-livre, foram sintetizados, acoplado a sonda carboxifluoresceína em sua extremidade N-terminal. Os ensaios de anisotropia de fluorescência foram realizados conforme condições descritas na seção de materiais e métodos.

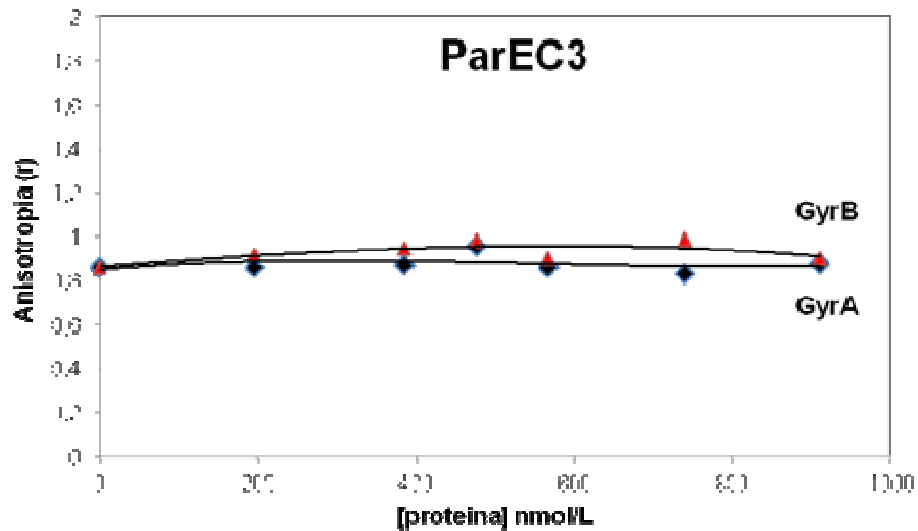
As Figura 50 e 51 mostram que nenhum dos peptídeos apresentou aumento de anisotropia quando colocados em contato com quantidades crescentes de GyrB, ou seja, a anisotropia permaneceu praticamente constante. Apenas o peptídeo ParERM3-CBF apresentou um sutil aumento da anisotropia quando colocado em contato com quantidades crescentes de GyrA. Esperava-se um aumento de anisotropia para alguma das subunidades testadas, visto que os peptídeos ParERM3 e ParEC3 apresentaram os melhores resultados de inibição da atividade da DNA girase nos ensaios de eletroforese. Além disso, resultados anteriores obtidos por BARBOSA (2012), mostraram um aumento de anisotropia para peptídeos miméticos de ParE colocados em contato com concentrações crescentes de GyrA. Buscando esclarecer os resultados obtidos das análises de formação de complexos entre os peptídeos em estudo e as subunidades da DNA girase, realizaram-se ensaios adicionais de eletroforese e de dicroísmo circular. O ensaio de eletroforese em gel de agarose mostrou que os peptídeos ParERM3-CBF e o ParEC3-CBF não promoveram inibição da atividade da DNA girase, conforme pode ser visualizado na Figura 52. A ausência de inibição da atividade da DNA girase apresentada por ambos os peptídeos neste ensaio, pode ser explicada pela simples presença da carboxifluoresceína nestas sequências peptídicas ou ainda, pela posição em que esta molécula foi acoplada ao peptídeo. A carboxifluoresceína provavelmente promoveu uma desestruturação dos peptídeos em questão, conforme pode ser visualizado nas Figura 42 e 44 que pode ter acarretado a perda da interação entre estes peptídeos e a DNA girase e, por conseguinte na ausência de inibição da atividade da enzima.

**Figura 50.** Análise da formação de complexos ParERM3-GyrA e ParERM3-GyrB por anisotropia de fluorescência. Uma amostra de  $500 \text{ nm.L}^{-1}$  de ParERM3-CBF foi titulada com GyrA e GyrB e a anisotropia de fluorescência do sistema foi medida ( $\lambda_{\text{exc}}=495$  e  $\lambda_{\text{em}}=525$  nm).



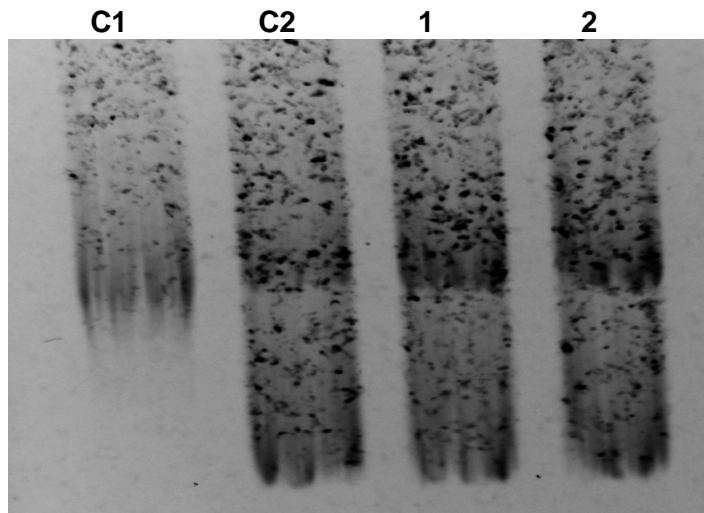
Fonte: Elaborado pela autora.

**Figura 51.** Análise da formação de complexos ParEC3-GyrA e ParEC3-GyrB por anisotropia de fluorescência. Uma amostra de  $500 \text{ nm.L}^{-1}$  de ParEC3-CBF foi titulada com GyrA e GyrB e a anisotropia de fluorescência do sistema foi medida ( $\lambda_{\text{exc}}=495$  e  $\lambda_{\text{em}}=525$  nm).



Fonte: Elaborado pela autora.

**Figura 52.** Ensaio de inibição da atividade da DNA girase pelos peptídeos ParERM3-carboxifluoresceína e ParEC3-carboxifluoresceína. DNA girase (1U) foi incubada com 0,5 µg de plasmídeo pBR322 relaxado e 100 µmol. L<sup>-1</sup> dos peptídeos de interesse a 37 °C por 1 hora. Posteriormente, a mistura foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1%. C1: controle positivo (plasmídeo pBR322 relaxado); C2: (plasmídeo pBR322 relaxado e a enzima DNA girase); os números 1 e 2 em cada aplicação no gel representam os peptídeos ParERM3-CBF e ParEC3-CBF, respectivamente.

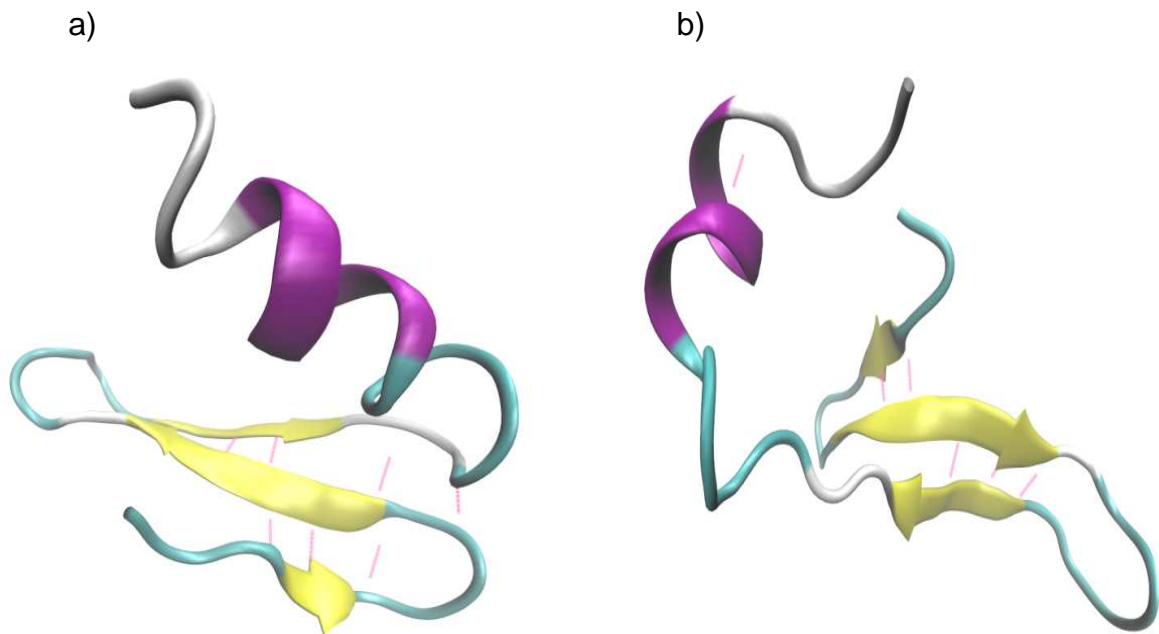


**Fonte:** Elaborado pela autora.

Outra abordagem também utilizada para a análise da interação entre os peptídeos e a DNA girase foi a simulação de dinâmica molecular (DM) aliada ao *docking*. Simulações de DM têm sido rotineiramente utilizadas para investigar a estrutura e função de biomoléculas e seus respectivos complexos, e interações no processo de planejamento racional de fármacos (JOTI et al., 2008; LAVECCHIA et al., 2007). Esta técnica incorpora flexibilidade de ambos, ligante e receptor, melhorando suas interações e reforçando a complementaridade entre eles. Além disso, a habilidade de incorporar moléculas de solvente nas simulações de sistemas receptor-ligante é muito importante para o entendimento do papel da água e seus efeitos sobre a estabilidade de complexos proteína-inibidor (ALONSO, BLIZNYUK & GREARY, 2006). A estrutura tridimensional obtida para a sequência peptídica ParERM3 no início da dinâmica molecular (Figura 53a) apresentou as mesmas características dos modelos moleculares gerados pelos métodos de predição de

estrutura dos peptídeos. Ao final da simulação, a estrutura tridimensional obtida para ParE (Figura 53b) apresentou tendências de desestruturação da alfa-hélice, o que corrobora com os resultados obtidos para este peptídeo nas análises de dicroísmo circular.

**Figura 53.** Representação dos modelos moleculares para o peptídeo ParERM3 gerados no início (a) e final (b) da simulação de dinâmica molecular.



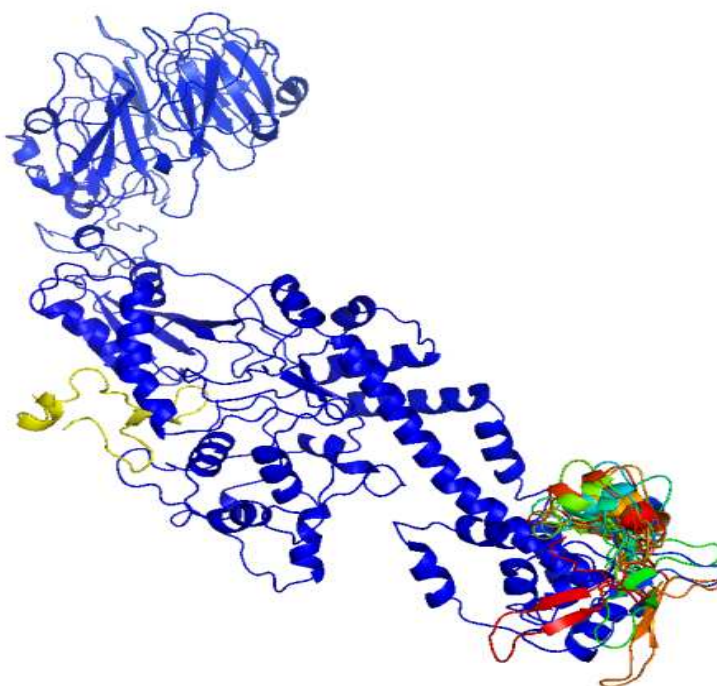
**Fonte:** Elaborado pela autora.

A combinação de DM com outras técnicas, como docagem molecular, é essencial para o entendimento das interações ligante-receptor, direcionando o planejamento racional de novos e potenciais inibidores (NAMBA, SILVA & SILVA, 2008). Nesse contexto, a simulação de dinâmica molecular aliada ao *docking* representou uma estratégia interessante para se avaliar a interação dos peptídeos inibidores com a subunidade A da DNA girase.

Estudos de fluorescência empregando as subunidades GyrA e GyrB de *E. coli*, realizados previamente por Barbosa (2012), mostraram evidências de interação entre peptídeos inibidores e GyrA. Baseando-se nestes resultados, as análises de docagem molecular foram realizadas utilizando a subunidade A da girase e a sequência inibidora ParERM3 (L61-R100), a qual compreende a outra sequência

inibidora ParEC3 (H69-R100). A Figura 54 representa uma docagem molecular utilizando GyrA e o peptídeo ParERM3, onde se observa que dos dez melhores modelos gerados, nove deles (90%) apresentaram tendência de interação na mesma região da GyrA, o que confirma os resultados de interação peptídeo inibidor-GyrA, obtidos por Barbosa (2012).

**Figura 54** Representação dos modelos de docagem molecular realizada para o peptídeo ParERM3 e GyrA. Em azul está representado a estruturação de GyrA e em colorido os modelos de interação do peptídeo com a subunidade A da enzima.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

## 5. CONCLUSÕES

- A síntese dos peptídeos em fase sólida mostrou-se uma técnica eficaz para a produção das sequências peptídicas estudadas.
- Os dados de modelagem molecular mostraram resultados mais consisos utilizando a metodologia *ab initio* e *de novo*.
- Os dados de CD apresentaram equivalência em relação à maioria dos dados da modelagem molecular gerados para cada peptídeo.
- A comparação entre os espectros de CD gerados para as sequências peptídicas com e sem carboxifluoresceína mostrou que esse marcador provavelmente desestrutura as sequências peptídicas marcadas.
- As sequências peptídicas com carboxifluoresceína não foram capazes de inibir a atividade das topoisomerases, devido provavelmente à desestruturação das mesmas.
- A técnica de anisotropia de fluorescência, utilizada como abordagem para avaliar a interação dos peptídeos marcados com as subunidades GyrA e GyrB da DNA girase, embora tenha apresentado indícios de interação peptídeo-GyrA, não apresentou resultados consistentes em consequência da provável desestruturação das sequências peptídicas por influência da carboxifluoresceína.
- A simulação de dinâmica molecular aliada ao docking representaram ferramentas computacionais úteis para a obtenção de um modelo de estrutura 3D mais realístico para os peptídeos inibidores e apontaram para a possibilidade de interação dos peptídeos miméticos com a subunidade A da girase.

- A sequência de aminoácidos “LNIES” quando presentes nos peptídeos atenuou a toxicidade dos mesmos frente a todas as topoisomerasas testadas, evidenciando que esta sequência desordenada provavelmente interfere na interação peptídeo-enzima.
- Os melhores resultados de determinação da concentração inibitória mínima dos peptídeos análogos de ParE sobre as topoisomerasas foram obtidos para a topoisomerase IV, embora a enzima DNA girase seja o alvo conhecido para a toxina ParE.
- Os peptídeos ParERM3 e ParEC3 apresentaram os melhores resultados de inibição da atividade de todas as topoisomerasas testadas, o que representa uma possibilidade de utilização dessas sequências peptídicas como protótipos para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos e antitumorais.

## REFERÊNCIAS

- ALBERICIO, F. Developments in peptide and amide synthesis. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 8, p. 211-221, 2004.
- ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREARY, 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. **Methods Mol. Biol.**, v. 298, p. 3-24, 2005.
- ANANTHARAMAN, V.; ARAVIND, L. New connections in the procaryotic toxin-antitoxin network: relationship with the eukaryotic nonsense-mediated RNA decay system. **Genome Biol.**, v. 4, n. 12, p. 8.1-8.15, 2003.
- ANDERSON, G. W.; MCGREGOR, A. C. t-Butyloxycarbonylamino acids and their use in peptide synthesis. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 79, p. 6180-6183, 1957.
- BARBOSA, L. C. B. **Peptídeos derivados da toxina bacteriana ParE: síntese, estrutura e ação inibitória sobre a atividade de topoisomerasas.** 2012. 90 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 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.
- BARBOSA, L. C. B.; GARRIDO, S. S.; GARCIA, A.; DELFINO, D. B.; MARCHETTO, R. Function inferences from a molecular structural model of bacterial ParE toxin. **Bioinformatics**, v. 4, p. 438-440, 2010.
- 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.
- 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.
- BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BATH, T. N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E. The protein data bank. **Nucleic Acids Res.**, v. 28, n. 1, p. 235-242, 2000.
- BOMAN, H. G. Peptides antibiotics and their role in innate immunity. **Annu. Ver. Immunol.**, v. 13, p. 61-92, 1995.
- BRIGHTY, K. E.; GOOTZ, T. D. Chemistry and mechanism of action of the quinolone antibacterials. In: ANDRIOLE, V. T. **The quinolones.** 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2000. Cap. 2, p. 33-97.

BUJNICKI, J. M. Protein structure prediction by recombination of fragments. **Chembiochem**, v. 7, n. 1, p. 19-27, 2006.

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

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

CAREY, F. A. **Organic chemistry**. 3rd ed. New York: MacGraw-Hill, 1996.

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

CARVALHO, I.; PUPO, M. T.; BORGES, A. D. L.; BERNARDES, L. S. C. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Quim. Nova**, v. 26, n. 3, p. 428-438, 2003.

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

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.

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

CREIGHTON, T. E. Protein folding. **Biochem. J.**, v. 270, p. 1-16, 1990.

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

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

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

DORN, M. **Uma proposta para a predição computacional da estrutura 3D aproximada de polipeptídeos com redução do espaço conformacional utilizando análise de intervalos**. 2008. 149 f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Computação) - Faculdade de Informática, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

ELSEA, S. H.; WESTERGAARD, M.; BURDEN, D. A.; LOMENICK, J. P.; OSHEROFF, N. Quinolones share a common interaction domain on topoisomerase II with other DNA cleavage-enhancing antineoplastic drugs. **Biochemistry**, v. 36, p. 2919-2924, 1997.

FIEBIG, A.; CASTRO ROJAS, C. M.; SIEGAL, G., D.; CROSSON, S. Interaction specificity, toxicity and regulation of a paralogous set of ParE/RelE- family toxin-antitoxin systems. **Mol. Microbiol.**, v. 77, n. 1, p. 236-251, 2010.

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

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

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

GARRIDO, S. S. **Novos inibidores peptídicos de topoisomerasas bacterianas estruturalmente derivados da proteína CcdB**. 2007. 114 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

GELLERT, M.; MIZUUCHI, K.; O'DEA, M. H.; NASH, H. A. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 73, n. 11, p. 3872-3876, 1976.

GERDES, K.; LARSEN, J. E. L.; MOLIN, S. Stable inheritance of plasmid R1 requires two different loci. **J. Bacteriol.**, v. 161, p. 292-298, 1985.

GOPAL, S. M.; KLENIN, K.; WENZEL, W. Template-free protein structure prediction and quality assessment with an all atom free- energy model. **Proteins**, v. 77, p. 330-342, 2009.

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.

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

HEISIG, P. Type II topoisomerases-inhibitors, repair mechanisms and mutations. **Mutagenesis**, v. 24, n. 6, p. 465-469, 2009.

HIGGINS, D.; THOMPSON, J.; GIBSON, T.; THOMPSON, J. D.; HIGGINS, T. J.; GIBSON, D. G.; CLUSTAL W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

HOLDEN, J. A. DNA topoisomerases as anticancer drug targets: from the laboratory to the clinic. **Curr. Med. Chem.**, v. 1, n. 1, p. 1-25, 2001.

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

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

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

JASIR, A.; KASPRZYKOWSKI, F.; KASPRZYKOWSKA, R.; LINDSTROM, V.; SCHALEN, C.; GRUBB, A. New antimicrobial cystatin C-based peptide active against gram-positive bacterial pathogens, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multiresistant coagulase-negative staphylococci. **APMIS**, v. 11, p. 1004-1010, 2003.

JENSEN, R. B.; GERDES, K. Programmed cell death in bacteria: proteic plasmid stabilization systems. **Mol. Microbiol.**, v. 17, n. 2, p. 205-210, 1995.

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, n. 4, 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, n. 5, p. 1420-1429, 1996.

JOTI, Y.; NAKAGAWA, H.; KATAOKA, M.; KITAO, A. Hydration-dependent protein dynamics revealed by molecular dynamics simulation of crystalline staphylococcal nuclease. **J. Phys. Chem. B.**, v. 112, n. 11, p. 3522-3528, 2008.

KACZANOWSKI, S.; ZIELENKIEWICZ, P. Why similar protein sequences encode similar three-dimensional structures? **Theor. Chem. Acc.**, v. 125, p. 643-650, 2010.

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, n. 2, p. 595-598, 1970.

KARPLUS, M. The Levinthal paradox: yesterday and today. **Fold. Des.**, v. 2, n. 1, p. 69-75, 1997.

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.

KELLEY, L. A.; STERNBERG, M. J. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. **Nature Protoc.**, v. 4, n. 3, p. 363-371, 2009.

KIMMERLIN, T.; SEEBACH, D. 100 years of peptide synthesis: ligation methods for peptide and protein synthesis with applications to beta-peptide assemblies. **J. Pept. Res.**, v. 65, n. 2, p. 229-260, 2005.

KOLINSKI, A. Protein modelling and structure prediction with a reduced representation. **Acta Biochim. Pol.**, v. 51, p. 349-371, 2004.

KREUZER, K. N.; COZZARELLI, N. R. Formation and resolution of DNA catenanes by DNA gyrase. **Cell**, v. 20, n. 1, p. 245-254, 1980.

KRYSHTAFOVYCH, A.; FIDELIS, K.; MOULT, J. Progress from CASP6 to CASP7. **Proteins**, v. 69, p. 194-207, 2007.

LAVECCHIA, A.; COSCONATI, S.; NOVELLINO, E.; CALLERI, E.; TEMPORINI, C.; MASSOLINI, G.; CARBONARA, G.; FRACCHIOLLA, G.; LOIODICE, F. Exploring the molecular basis of the enantioselective binding of penicillin G acylase towards a series of 2-aryloxyalkanoic acids: a docking and molecular dynamics study. **J. Mol. Graph. Model.**, v. 25, n. 6, p. 773-783, 2007.

LEPLAE, R.; GEERAERTS, D.; HALLEZ, R.; GUGLIELMINI, J.; DRÈZE, P.; VAN MELDEREN, L. Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families. **Nucleic Acids**, v. 39, n. 13, p. 5513-5525, 2011.

LEVINTHAL, C. Are the pathways for protein folding? **J. Chem. Phys.**, v. 65, p. 44-45, 1997.

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

LOHNER, K.; STAUDEGGER, E. Are we on the threshold of the post-antibiotic era? In: LOHNER, K. (Ed.). **Development of novel antimicrobial agents: emerging strategies**. Wymondham: Horizon Scientific, 2001. Cap. 1, p. 149-165.

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

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

MARIANS, K. J. DNA gyrase-catalyzed decatenation of multiply linked DNA dimers. **J. Biol. Chem.**, v. 262, n. 21, p. 10362-10368, 1987.

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

MARTIM-REMON, M. A.; STUART, A.; FISER, A.; SÁNCHEZ, R.; MELLO, F.; SALI, A. Comparative protein structure modelling of genes and genomes. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, v. 29, n. 16, p. 291-235, 2000.

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.

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.; ROST, B.; TRAMONTANO, A. Critical assessment of methods of protein structure prediction round viii. **Proteins**, v. 77, p. 1-4, 2009.

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.

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

NEUMAN, K. C. Evolutionary twist on topoisomerases: conversion of gyrase to topoisomerase IV. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 107, n. 52, p. 22363-22364, 2008.

NOLLMANN, 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, n. 4, p. 256-258, 2007.

OSGUTHORPE, D. J. Ab *initio* protein folding. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 10, n. 2, p. 146-152, 2000.

PENG, H.; MARIANS, K. J. *Escherichia coli* Topoisomerase IV. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 32, p. 24481-24490, 1993.

PENG, H.; MARIANS, K. J. The interaction of *Escherichia coli* Topoisomerase IV with DNA. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 42, p. 25286-25290, 1995.

PIERCE, B. G.; HOURAI, Y.; WENG, Z. Accelerating protein docking in ZDOCK using an advanced 3D convolution library. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e2465/1-e2465/7, 2011.

PINILLA, C.; APPEL, J.; BLONDELLE, S. E.; DOOLEY, C. T.; DORNER, B.; EICHLER, J.; OSTRESH, J.; HOUGHTEN, R. A. A review of the utility of soluble peptide combinatorial libraries. **Biopolymers**, v. 37, p. 221-240, 1995.

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. The C-terminal domain of the *Escherichia coli* DNA gyrase A subunit is a DNA-binding protein. **Nucleic Acids Res.**, v. 19, n. 7, p. 1399-1405, 1991.

ROBERTS, R. C.; HELINSKI, D. R. Definition of a minimal plasmid stabilization system from the broad-host-range plasmid RK2. **J. Bacteriol.**, v. 174, n. 24, p. 8119-8132, 1992.

ROHL, C. A.; STRAUSS, C. E.; MISURA, K. M.; BAKER, D. Protein structure prediction using rosetta. **Methods in Enzymology**, v. 383, p. 66-93, 2004.

SALI, A.; SHAKHNOVICH, E.; KARPLUS, M. How does a protein fold? **Nature**, v. 369, p. 248-251, 1994.

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

SKERLAVAJ, B.; BENINCASA, M.; RISSO, A.; ZANETTI, M.; GENNARO, R. SMAP-29: a potent antibacterial and antifungal peptide from sheep leukocytes. **FEBS Lett.**, v. 463, p. 58-62, 1999.

SMITH, A. B.; MAXWELL, A. A strand-passage conformation of DNA gyrase is required to allow the bacterial toxin, CcdB, to access its binding site. **Nucleic Acids Res.**, v. 34, n. 17, p. 4667-4676, 2006.

SRINIVASAN, R.; ROSE, G. D. LINUS - a hierarchic procedure to predict the fold of a protein. **Proteins**, v. 22, p. 81-99, 1995.

STERNBERG, M. **Protein structure prediction: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 1997.

THOMAS, C. M.; HELINSKI, D. R. Vegetative replication and stable inheritance of IncP1 plasmids of gram-negative bacteria. In: THOMAS, C. M. **Promiscuous plasmids of gram negative bacteria**. London: Academic Press, 1989. p. 1-25.

TOPCU, Z. DNA topoisomerases as targets for anticancer drugs. **J. Clin. Pharm. Therap.**, v. 26, p. 405-416, 2001.

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

TSE-DINH, Y. C. Bacterial topoisomerase I as a target for discovery of antibacterial compounds. **Nucleic Acids Res.**, v. 37, n. 3, p. 731-737, 2009.

VLIEGHE, P.; LISOWSKI, V.; MARTINEZ, J.; KHRESTCHITSKY, M. Synthetic therapeutic peptides: science and market. **Drug Disc. Today**, v. 15, n. 1,2, p. 40-56, 2010.

WANG, J. C. DNA topoisomerases. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 54, p. 665-697, 1985.

WANG, J. C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. **Nature**, v. 3, p. 430-440, 2002.

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.

WILBAUX, M.; MINE, N.; GUEROUT, A. M.; MAZEL, D.; VAN MELDEREN, L.; Functional interactions between coexisting toxin-antitoxin systems of the ccd family in *Escherichia coli* O157:H7. **J. Bacteriol.**, v. 189, n. 7, p. 2712 - 2719, 2007.

ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 40, 2008.