



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

Gerardo Andrés Libreros Zúñiga

**L,D-transpeptidases de *Mycobacterium tuberculosis*:
Estudo das interações com antibióticos β -lactâmicos e
triagem de fragmentos**

**São Jose do Rio Preto
2018**

Gerardo Andrés Libreros Zúñiga

**L,D-transpeptidases de *Mycobacterium tuberculosis*:
Estudo das interações com antibióticos β -lactâmicos e
triagem de fragmentos**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadoras: FAPESP 2015/09188-8 e 2010/15971-3. PAEDEX-AUIP 2014

Orientador: Prof. Dr. Marcio Vinicius Bertacine Dias

**São Jose do Rio Preto
2018**

Libreros-Zúñiga, Gerardo Andrés.

L,D-transpeptidases de Mycobacterium tuberculosis: Estudo das interações com antibióticos β -lactâmicos e triagem de fragmentos / Gerardo Andrés Libreros Zúñiga . – São José do Rio Preto, 2018
159 f. : il. , tabs.

Orientador: Marcio Vinicius Bertacine Dias

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Antibióticos.. 2. Cristalografia de raio x. 3. Mycobacterium tuberculosis. 4. Antibióticos beta-lactâmicos. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 576.8

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Gerardo Andrés Libreros Zúñiga

**L,D-transpeptidases de *Mycobacterium tuberculosis*:
Estudo das interações com antibióticos β -lactâmicos e
triagem de fragmentos**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadoras: FAPESP 2015/09188-8 e 2010/15971-3. PAEDEX-AUIP 2014.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Marcio Vinicius Bertacine Dias
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Iolanda Midea Cuccovia
USP- Câmpus capital

Prof. Dr. Frederico José Gueiros Filho
USP- Câmpus capital

Prof^a. Dr^a. Cristiane Guzzo Carvalho
USP- Câmpus capital

Prof. Dr. Gustavo Fernando Mercaldi
LNBio-CNPEM-Campinas

São José do Rio Preto
26 de julho de 2018

DEDICATORIA

À memória de meu tio Manuel António Zúñiga

AGRADECIMENTOS

- À minha família e especialmente aos meus pais Gerardo Libreros e María Josefa Zúñiga pela minha existência e por sempre estarem presentes em todas as etapas de minha vida.
- Ao meu orientador, Professor Doutor Marcio Vinicius Bertacine Dias, pela concepção deste projeto e pela confiança que depositou em mim para desenvolvê-lo. Adicionalmente, lhe agradeço por sua amizade e pelo apoio que me brindou durante estes quatro anos de trabalho.
- Aos membros da banca examinadora por dedicar seu tempo e experiência para fazer aportes neste trabalho.
- Aos meus amigos Hans Kalil Ortega e Douglas Zacarias Da Silva pelo suporte emocional que me brindaram para afrontar com sucesso cada uma das etapas deste doutorado. À Diana Jurado pelo apoio para a obtenção de minha comissão de estudos e ao Rogerio Yamamoto por sua hospitalidade e as orientações que me brindou no início do doutorado.
- A todos meus companheiros da pós-graduação no Laboratório de Biologia Estrutural Aplicada (LBEA) divisão de fármacos e transportadores, especialmente à Larissa Antelo de Sá, João Augusto Ribeiro e Priscila dos Santos Bury por compartilhar comigo, desinteressadamente, seus conhecimentos sobre clonagem, manipulação de proteínas e cristalografia. Aos que chegaram logo depois: Sair Chávez, Catarina dos Santos, Natalia Cerrone, Tábata Peres Cardoso, Fernanda Paiva e João Pimenta porque através de seus diferentes saberes, formas de ser e de pensar, conseguiram fazer aportes neste trabalho e na minha vida pessoal. À Cristiane Tambascia por todas as dicas em biologia molecular e pelos momentos de descontração durante o almoço. À Sindy Carbarca e à Lilia Duarte por sua amizade e pelos momentos de “colombianismo” que compartilhamos nestes anos.
- Aos técnicos do laboratório LBEA Adolfo Tadeu Barbosa e Renata Paulo que contribuíram fazendo compras de reagentes ou preparando meios de cultura usados neste estudo.
- Ao professor Fernando Pavan da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP)-Araraquara por ceder gentilmente o DNA genômico de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.
- À Ana Carolina Zeri e o pessoal técnico da linha MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS)-Campinas e linha P13 de PETRAIII em Hamburgo-Alemanha, pelo suporte e tempo oferecido nos respectivos síncrotrons.
- Ao Professor Cristiano Oliveira e Fernando Batalioto do Instituto de Física da Universidade de São Paulo por facilitar o uso do equipamento de calorimetria.

- À Professora Rafaela Salgado Ferreira e ao Dr. Saulo Fehelberg Pinto Braga do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais pelo suporte nos experimentos de *docking* molecular.
- Ao pessoal do Laboratório de Biofísica do Instituto de Física de São Carlos, especialmente à Dra. Natalia Mesquita, por seu apoio durante a padronização dos experimentos de termoforese em microescala.
- À Adriana Paes Leme e o pessoal técnico do laboratório de espectrometria de massas do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) Campinas e ao Professor Giuseppe Palmisano do CEFAP-USP pelo suporte nas análises de espectrometria de massas.
- À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento deste trabalho (2015/09188-8 e 2010/15971-3), ao Programa de Apoio a Estudantes de Doutorado do Exterior (PAEDEx) e à Associação Ibero-americana de Pós-graduação (AUIP) pela bolsa de estudos de quatro anos.
- Ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, onde foi desenvolvido a maior parte desta pesquisa, por me acolher como membro de sua comunidade durante estes anos.
- Ao Departamento de Microbiologia da Faculdade de Saúde da Universidade do Valle, Cali-Colômbia, por aprovar e facilitar a renovação de minha comissão de estudos.

RESUMO

O reposicionamento de antibióticos e a busca novos fármacos constituem duas estratégias para abordar a resistência de *Mycobacterium tuberculosis* aos antimicrobianos. A parede celular de *M. tuberculosis* contém peptidoglicano (PG), estrutura essencial para a viabilidade celular e, portanto, um alvo farmacológico. O PG micobacteriano apresenta resíduos de açúcares altamente interconectados por ligações 3→3 catalisadas por L,D-transpeptidases (Ldts_{Mt}), enzimas sensíveis aos carbapenêmicos, que são reguladas positivamente durante a latência. *M. tuberculosis* codifica cinco Ldts_{Mt} (Ldt_{Mt1}→Ldt_{Mt5}), algumas delas sendo consideradas essenciais para estabilidade da parede micobacteriana, entretanto a Ldt_{Mt3} e Ldt_{Mt4} permanecem menos compreendidas. Uma vez que as Ldts_{Mt} podem ser inibidas por alguns β-lactâmicos, este trabalho busca conhecer seus mecanismos de interação com estes antibióticos. Adicionalmente, através da triagem de fragmentos, espera-se identificar compostos que possam servir como ponto de partida para a síntese de novos inibidores contra estas enzimas. Ldt_{Mt2}, Ldt_{Mt3} e Ldt_{Mt5} foram produzidas em *E. coli*, purificadas e cristalizadas. Suas estruturas foram resolvidas a 1,8, 1,3 e 2,6 Å de resolução respectivamente. A estrutura de Ldt_{Mt3} é conservada com outras Ldts_{Mt}, embora diferenças no volume, topologia e carga da cavidade catalítica. Ldt_{Mt3} interage preferencialmente com faropenem e carbapenêmicos com diferentes afinidades e perfis termodinâmicos. A massa intacta da Ldt_{Mt3} na presença de carbapenêmicos indica que estes antibióticos permanecem covalentemente ligados a enzima sem alterações, enquanto que faropenem sofre degradação, possivelmente até um fragmento de acetila que fica covalentemente ligado à Cys246, como demonstrado pela estrutura cristalográfica a 1.8 Å de resolução. Ensaio de *docking* revelaram os resíduos de Ldt_{Mt3} que provavelmente interagem com os β-lactâmicos intactos. Por outro lado, não foi possível identificar a afinidade de interação entre Ldt_{Mt5} e os β-lactâmicos testados. A triagem de 365 fragmentos confirmou dezoito que interagem com às Ldt_{Mt2}, Ldt_{Mt3} e Ldt_{Mt5} com afinidades entre 10 e 3300 μM. Um conjunto de seis aminoácidos em cada enzima parece participar nas interações com esses fragmentos. Este trabalho proporciona novas informações sobre a estrutura de Ldt_{Mt3} e suas interações com antibióticos β-lactâmicos, assim como o possível mecanismo de degradação de faropenem posterior à acilação, o qual pode ser útil no melhoramento dos β-lactâmicos para tratamento da

tuberculose. Adicionalmente, este é o primeiro estudo que identifica fragmentos que ligam às Ldts_{Mt}, informação relevante para a síntese de novos inibidores não β -lactâmicos das L,D-transpeptidases de *M. tuberculosis*.

Palavras-chave: Mycobacterium tuberculosis. L,D-transpeptidases. β -lactâmicos. Faropenem. Cristalografia de raios X. Triagem de fragmentos.

ABSTRACT

The repositioning of antibiotics and the search for new drugs are two strategies to address the antibiotic resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. The cell wall of *M. tuberculosis* contains peptidoglycan (PG), a structure essential for cell viability and therefore is considered a pharmacological target. Mycobacterial PG presents highly interconnected sugars by 3→3 bonds catalyzed by L, D-transpeptidases (Ldts_{Mt}). Ldts_{Mt} are a group of carbapenems sensitive enzymes, which are upregulated during latency. *M. tuberculosis* encodes five Ldts_{Mt} (Ldt_{Mt1}→Ldt_{Mt5}) and most of them are considered essential for mycobacterial wall stability; however, Ldt_{Mt3} and Ldt_{Mt4} remain less understood. Since Ldts_{Mt} can be inhibited by some β-lactams, this work seeks to know its mechanisms of interaction with these antibiotics. Additionally, by screening of fragments, it is expected to identify novel compounds that may serve as a starting point for the synthesis of new inhibitors against Ldts_{Mt}. Ldt_{Mt2}, Ldt_{Mt3} and Ldt_{Mt5} were produced in *E. coli*, purified and crystallized. Their structures were solved at 1.8, 1.3 and 2.6 Å resolution, respectively. The structure of Ldt_{Mt3} is similar to other Ldts_{Mt}, despite differences in volume, topology and charge of the catalytic cavity. Ldt_{Mt3} interacts preferentially with faropenem and carbapenems with different affinities and thermodynamic profiles. The intact mass of Ldt_{Mt3} in the presence of carbapenems indicates that these antibiotics remain unaltered after Ldt_{Mt3} acylation, whereas faropenem undergoes degradation, possibly even an acetyl fragment which is covalently bound to Cys246 as demonstrated by the crystallographic structure at 1.8 Å resolution. Docking calculations revealed Ldt_{Mt3} residues that probably interact with the intact β-lactams. On the other hand, we could not identify interaction affinity between Ldt_{Mt5} and any tested β-lactams. Screening of 365 fragments confirmed eighteen compounds that bind to Ldt_{Mt2}, Ldt_{Mt3} and Ldt_{Mt5} with affinities between 10 and 3300 μM. A set of six amino acids in each enzyme appears to participate in interactions with these fragments. This work provides novel information on the structure of Ldt_{Mt3} and its interactions with β-lactam antibiotics, as well as the possible mechanism of faropenem degradation after acylation. These information are useful to the improvement of β-lactams for tuberculosis treatment. Additionally, this is the first study identifying fragments binding to Ldts_{Mt}, providing relevant information for the synthesis of novel non-β-lactam inhibitors against L, D-transpeptidases from *M. tuberculosis*.

Keywords: Mycobacterium tuberculosis. L,D-transpeptidases. β -lactams. Faropenem. X-ray crystallography. Fragment screening.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidência mundial de tuberculose pulmonar estimada para o ano	
2016	21
Figura 2. Fisiopatologia da tuberculose pulmonar	23
Figura 3. Modelo de envoltório em <i>Mycobacterium sp.</i>	28
Figura 4. Formação de ligações peptídicas no peptídeo glicano de <i>M.</i>	
<i>tuberculosis</i>	31
Figura 5. Alinhamento de sequência para cinco L,D-transpeptidases de	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	34
Figura 6. Organização de domínios e estrutura de três L,D-transpeptidases de	
<i>M. tuberculosis</i>	36
Figura 7. Estrutura química de algumas classes de β -lactâmicos.....	39
Figura 8. Mecanismo de acilação e degradação de faropenem por Ldt _{Mt2}	40
Figura 9. Estrutura química dos β -lactâmicos usados neste estúdio	49
Figura 10. Esquema da placa de 96 poços com os tampões usados nos	
ensaios de DSF	56
Figura 11. Purificação por cromatografia de exclusão por peso molecular de	
três Ldts _{Mt}	62
Figura 12. Teste de expressão para Ldt _{Mt1} e Ldt _{Mt4}	63
Figura 13. Cristalização de três L,D-transpeptidases de <i>M. tuberculosis</i>	65
Figura 14. Estrutura e comparação entre duas L,D- transpeptidases de <i>M.</i>	
<i>tuberculosis</i>	67
Figura 15. Estrutura geral de L,D-transpeptidase 3 de <i>M. tuberculosis</i>	69

Figura 16. O cálcio na estrutura de Ldt _{Mt3}	70
Figura 17. O Domínio catalítico e sitio ativo da L,D- transpeptidase 3 de <i>M. tuberculosis</i>	72
Figura 18. Comparação entre L,D- transpeptidases de <i>M. tuberculosis</i>	74
Figura 19. Comparação da superfície de potencial eletrostático das cavidades catalíticas de L,D- transpeptidases de <i>M. tuberculosis</i>	76
Figura 20. Estudos de interação de Ldt _{Mt3} e Ldt _{Mt5} com antibióticos β -lactâmicos por DSF	78
Figura 21. Estudos calorimétricos de L,D-transpeptidase 3 de <i>M. tuberculosis</i> e dez antibióticos β -lactâmicos.....	80
Figura 22. Perfis termodinâmicos de interação entre antibióticos β -lactâmicos e Ldt _{Mt3}	82
Figura 23. Estudos calorimétricos de L,D-transpeptidase 5 de <i>M. tuberculosis</i> com antibióticos β -lactâmicos	83
Figura 24. Diferentes modos de ligação dos β -lactâmicos à Ldt _{Mt3}	86
Figura 25. Degradação de faropenem depois da acilação de Ldt _{Mt3}	88
Figura 26. Análises de espectrometria de massa de Ldt _{Mt3} em presença de antibióticos β -lactâmicos.	90
Figura 27. Mecanismo proposto de acilação e degradação de faropenem durante a interação com Ldt _{Mt3}	93
Figura 28. Distribuição dos <i>hits</i> de fragmentos identificados para três L,D- transpeptidases de <i>M. tuberculosis</i> por DSF	95
Figura 29. Estruturas de oito fragmentos comuns entre Ldt _{Mt2} , Ldt _{Mt3} e Ldt _{Mt5}	96

Figura 30. Determinação da afinidade de fragmentos sob três Ldts _{Mt} por termoforese em microescala (MST)	97
Figura 31. Distribuição de fragmentos na cavidade catalítica de três L,D- transpeptidases de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	101
Figura 32. Possíveis modos de ligação de quinze fragmentos à Ldt _{Mt2}	103
Figura 33. Possíveis modos de ligação de quatro fragmentos à Ldt _{Mt3}	104
Figura 34. Possíveis modos de ligação de quatro fragmentos à Ldt _{Mt5}	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fármacos usados no tratamento da tuberculose, seus mecanismos de ação e de resistência antimicrobiana	24
Tabela 2. Oligonucleotídeos usados na amplificação dos genes para Ldts _{Mt}	50
Tabela 3. Características das cepas de <i>Escherichia coli</i> utilizadas neste estudo.....	52
Tabela 4. Condições de produção e características físico-químicas das Ldts _{Mt}	52
Tabela 5. Composição dos tampões usados na purificação das Ldts _{Mt} por cromatografia de exclusão por peso molecular	53
Tabela 6. Estatísticas de processamento de dados e refinamento para três L,D-transpeptidases de <i>M. tuberculosis</i> em sua forma apo	66
Tabela 7. Temperaturas de desenovelamento de Ldt _{Mt3} e Ldt _{Mt5} em presença de Diferentes antibióticos β -lactâmicos	77
Tabela 8. Parâmetros termodinâmicos obtidos para seis antibióticos β -lactâmicos que interagem com Ldt _{Mt3}	79
Tabela 9. <i>Ligand Efficiency Lipophilic Price</i> (LELP) para antibióticos β -lactâmicos que interagem com L,D-transpeptidases de <i>M. tuberculosis</i>	84
Tabela 10. Estatísticas de processamento de dados e refinamento de Ldt _{Mt3} acilada por faropenem.....	87
Tabela 11. Análises por espectrometria de massas dos adutos covalentes formados entre Ldt _{Mt3} e antibióticos β -lactâmicos.....	89

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

Å	Ångström
ΔG	Variação da energia livre de Gibbs
ΔH	Variação da entalpia
ΔT_m	Variação da T_m
ΔS	Variação da entropia
σ	Desvio padrão
AF	Cromatografia de afinidade
DNA	Ácido desoxirribonucleico
AM	Ácidos micólicos
AG	Arabinogalactano
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
Big	Domínio bacteriano de imunoglobulina
cLogP	Log calculado do coeficiente de partição entre octanol e água
CV	Volume de coluna (<i>Column volume</i>)
CD	Domínio catalítico
CTSD	Subdomínio C-terminal
Da	Dalton
DHPI	Dehidropeptidase I
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSF	Fluorimetria de varredura diferencial
dNTPs	Desoxirribonucleótidos fosfatados
FBDD	Desenvolvimento de fármacos baseado em triagem de fragmentos
HTS	Triagem automatizada em larga escala
IFD	Docking por ajuste induzido (<i>Induced fit docking</i>)
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
ITC	Calorimetria de titulação isotérmica
K_D	Constante de dissociação
K_{D_ap}	Constante de dissociação aparente
L_B	Alça B (<i>Loop B</i>)
LB	Caldo LB (<i>Lysogeny Broth-Miller</i>)
Ldts _{Mt}	L,D-transpeptidases de <i>M. tuberculosis</i>

LE	Eficiência de ligação (Ligand efficiency)
LELP	<i>Ligand Efficiency Lipophilic Price</i>
<i>m</i> -DAP	Ácido <i>meso</i> -diaminopimérico
MIC	Concentração inibitória mínima
MDR	<i>Multi-drug-resistant</i>
MST	Termoforese em microescala
NAG	N-acetil glucosamina
NAM	N-acetil murâmico
NMR	Ressonância magnética nuclear
PDB	Banco de dados de proteínas (<i>Protein Data Bank</i>)
PBP	Proteína ligadora de penicilina (<i>Penicillin Binding Protein</i>)
PEG	Polietilenoglicol
PG	Peptideoglicano
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonilo
PRR	Região rica em prolina
RO3	Régua dos três
RMSD	Desvio médio quadrático (<i>Root-mean-square deviation</i>)
SEC	Cromatografia de exclusão por peso molecular
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio
STD-NMR	<i>Saturation-Transfer Difference - Nuclear Magnetic Resonance</i>
TB	Tuberculose
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
XDR	<i>Extensively drug-resistant</i>

LISTA DE PUBLICAÇÕES

1. **Libreros-Zúñiga GA**, Silva CDS, Ferreira RS, and Dias MVB. Structural basis for the interaction and processing of β -lactam antibiotics by L,D-transpeptidase 3 (Ldt_{MT3}) from *Mycobacterium tuberculosis*. Submetido ao *Journal of Biological Chemistry*. Junho de 2018. (ANEXO 1).
2. **Libreros-Zúñiga GA**, Mesquita NCMR, Braga SFP, Chávez-Pacheco S, Ishida K, Oliva G, Ferreira RS and Dias MVB. A fragment-based screening for L,D-transpeptidases from *Mycobacterium tuberculosis*. Manuscrito em preparação.

PUBLICAÇÕES NÃO RELACIONADAS COM ESTA TESE

Dias MVB, Santos JC, **Libreros-Zúñiga GA**, Ribeiro JA, and Chávez-Pacheco S. Folate biosynthesis pathway: mechanisms and insights into drug design for infectious diseases. *Future Medicinal Chemistry*. Vol 10. No.8. 2018. p. 935-959.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. A tuberculose como problema mundial.....	21
1.2. Mecanismos de transmissão e infecção por <i>M. tuberculosis</i>	22
1.3. Tratamento e mecanismo de ação dos fármacos anti-tuberculose	23
1.4. Estrutura geral do envelope das micobactérias	27
1.5. Estrutura e biossíntese de peptideoglicano micobacteriano	29
1.6 Relevância biológica das ligações 3→3	32
1.7. L,D-transpeptidases: Estrutura e função	33
1.8. Estrutura e características dos antibióticos β-lactâmicos	37
1.9. Inibição de L,D-transpeptidases por antibióticos β-lactâmicos	39
1.10. Estudos clínicos com β-lactâmicos para o tratamento da tuberculose	41
1.11. Desenvolvimento de fármacos baseado em triagem de fragmentos.....	42
2. JUSTIFICATIVA	45
3. OBJETIVOS	47
3.1. Objetivos geral.....	47
3.2. Objetivos específicos.....	49
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
4.1. Compostos químicos	48
4.1.1. Antibióticos	48
4.1.2. Fragmentos.....	48
4.2. Clonagem de L,D-transpeptidases de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	50
4.3. Produção de L,D-transpeptidases recombinantes	51
4.4. Purificação de L,D-transpeptidases recombinantes.....	53
4.5. Cristalização de L,D- transpeptidases de <i>M. tuberculosis</i>	54
4.6. Co-cristalização e absorção (<i>soaking</i>) de ligantes.....	55

4.7. Difração de raios X e determinação de estruturas cristalográficas	55
4.8. Fluorimetria de varredura diferencial (DSF).....	56
4.9. Calorimetria de titulação isotérmica (ITC).....	57
4.10. Estudos de <i>docking</i>	58
4.10.1. <i>Docking</i> de β -lactâmicos.....	58
4.10.2. <i>Docking</i> de fragmentos	59
4.11. Espectrometria de massas	59
4.12 Termoforese em microescala (MST)	60
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1. Produção e purificação de L,D- transpeptidases de <i>M. tuberculosis</i> recombinantes	62
5.2. Cristalização de L,D- transpeptidases de <i>M. tuberculosis</i>	64
5.3. Estrutura de L,D- transpeptidases 2 e 5 de <i>M. tuberculosis</i> (Ldt _{Mt2} e Ldt _{Mt5})	65
5.4. Estrutura de L,D- transpeptidase 3 de <i>M. tuberculosis</i> (Ldt _{Mt3})	68
5.4.1. Estrutura geral de Ldt _{Mt3}	68
5.4.2. O sítio ativo de Ldt _{Mt3}	71
5.4.3. Comparação entre Ldt _{Mt3} e seus parálogos	72
5.5. Interações de L,D- transpeptidases de <i>M. tuberculosis</i> com antibióticos β -lactâmicos.....	76
5.5.1. Os β -lactâmicos que interagem com Ldt _{Mt2} e Ldt _{Mt5} induzem estabilização e desestabilização enzimática	76
5.5.2. Os β -lactâmicos exibem diferentes afinidades e perfis termodinâmicos de interação com Ldt _{Mt3}	78
5.5.3. Seleção de líderes β -lactâmicos para Ldt _{Mt}	83
5.5.4. Os β -lactâmicos que ligam no sitio ativo de Ldt _{Mt3} interagem possivelmente com resíduos conservados da enzima..	84
5.5.5. Faropenem é degradado até um fragmento de acetila depois da acilação da Cys246	87
5.5.6. Mecanismo proposto de degradação de faropenem depois da acilação de Ldt _{Mt3}	91
5.6. Triagem de fragmentos com L,D- transpeptidases de <i>M. tuberculosis</i>	94
5.6.1. Identificação de <i>hits</i> por ensaios de fluorimetria de varredura diferencial (DSF).....	94

5.6.2. Validação de <i>hits</i> e determinação da afinidade por termoforese em microescala (MST).....	96
5.6.3. <i>Docking</i> de fragmentos.....	101
6. CONCLUSÕES.....	106
7. PERSPECTIVAS.....	107
REFERÊNCIAS.....	108
ANEXO A.....	122

1. INTRODUÇÃO

1.1. A TUBERCULOSE COMO PROBLEMA MUNDIAL

Mycobacterium tuberculosis é um bacilo ácido-álcool resistente e altamente patogênico que causa a tuberculose (TB) em humanos, uma doença crônica da qual se tem registro desde a antiguidade, mas que ainda apresenta elevada incidência mundial, constituindo-se em um problema de saúde pública. Estima-se que aproximadamente dois bilhões de pessoas padecem de infecção assintomática por *M. tuberculosis* e só em 2016 foram reportados 10,4 milhões de novos casos de TB no mundo, a maioria dos quais aconteceram no sudeste asiático, África e na região do oeste do Pacífico (Fig. 1). Para esse mesmo ano, estimou-se 1,7 milhões de mortes por TB no mundo, incluindo indivíduos HIV positivos e negativos. Assim, a TB é considerada a nona causa de morte no mundo e a principal causa de morte ocasionada por um patógeno, inclusive superando a mortalidade por HIV/AIDS (WHO, 2017a).

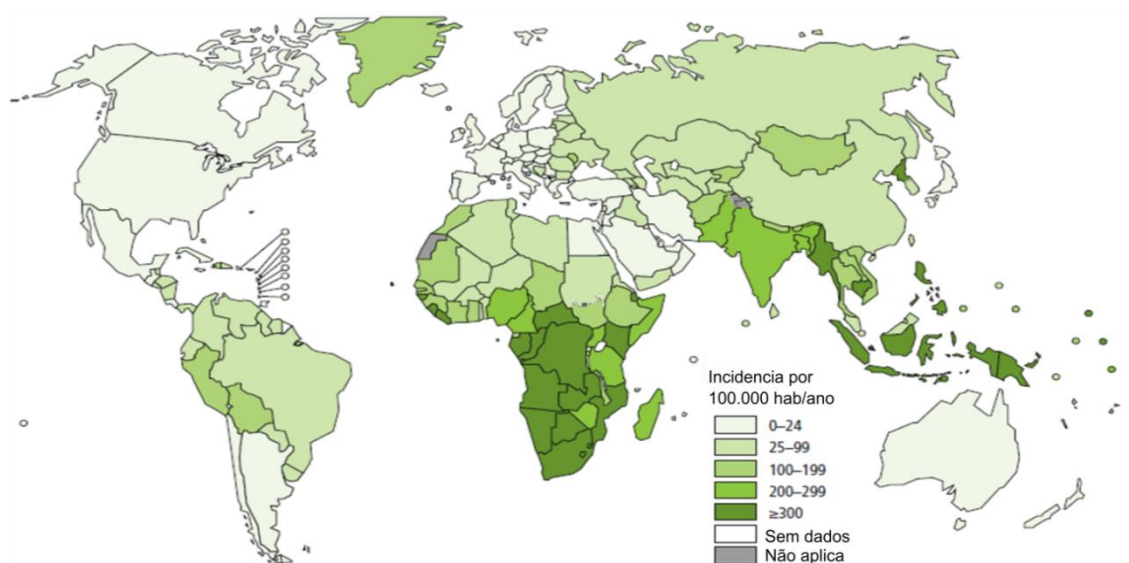


Figura 1. Incidência mundial de tuberculose pulmonar estimada para o ano 2016. Adaptado de WHO, 2017a.

Embora a TB seja considerada uma doença curável, uma vez estabelecido o adequado tratamento antimicrobiano, a natureza crônica da infecção dificulta seu diagnóstico e o tratamento. Adicionalmente, o surgimento, de cepas resistentes aos medicamentos em uso, principalmente em países em desenvolvimento, tem piorado o panorama global da doença. As cepas de *M. tuberculosis* resistentes aos

antimicrobianos, conhecidas como *Multi-drug-resistant* (MDR) possuem resistência a isoniazida (INH) e a rifampicina (RIF), dois dos principais antibióticos usados no tratamento da TB. Em 2016, estimou-se que 4,1% dos novos casos de TB e 19% dos casos previamente tratados corresponderam a MDR-TB (WHO, 2017a). A TB causada por cepas MDR geralmente leva a complicações clínicas e os pacientes requerem de um maior tempo de tratamento.

Para complicar o panorama da TB, têm sido reportadas cepas de *M. tuberculosis Extensively drug-resistant* (XDR), que são MDR com resistência adicional a fluoroquinolonas e pelo menos um dos antibióticos injetáveis (amicacina, capreomicina ou canamicina). Assim, as infecções causadas por *M. tuberculosis* resistente aos antimicrobianos, associam-se a um aumento na morbimortalidade, custos de hospitalização e cuidado dos pacientes (GANDHI *et al.*, 2006). Por estas razões, a busca de novos medicamentos e esquemas de tratamento têm se tornado em uma prioridade para muitos países (NGUYEN e THOMPSON, 2006).

1.2 MECANISMOS DE TRANSMISSÃO E INFECÇÃO POR *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

A transmissão de *M. tuberculosis* acontece através do contato com secreções respiratórias que contém micobactérias viáveis a partir de um paciente com infecção pulmonar ativa. Uma vez que o bacilo atinge o trato respiratório de um novo hospedeiro, infecta principalmente os macrófagos alveolares (GROSSET, 2003). Estas bactérias são rapidamente fagocitadas pelos macrófagos, mas conseguem evadir a resposta imune mediada por estas células, a tal ponto que chegam a sobreviver e se replicar dentro dos macrófagos. Posteriormente, *M. tuberculosis* pode infectar e persistir em outras áreas dos pulmões, assim como, outros órgãos (MONACK *et al.*, 2004). A disseminação dos bacilos aos tecidos linfoides extrapulmonares ativa os linfócitos T, os principais atores da imunidade adquirida mediada por células. A maior parte das infecções por *M. tuberculosis* são resolvidas pela resposta dos linfócitos T, embora, uma população residual de bactérias viáveis consegue sobreviver por longos períodos, levando aos pacientes a um estado conhecido como latência clínica, caracterizada pela ausência de sintomas da doença (KAUFMANN *et al.*, 2005). Durante a latência, as micobactérias estão em “dormência”, um estado reversível de baixa atividade metabólica que facilita a persistência por longos períodos sem divisão celular.

Em indivíduos imunocompetentes, *M. tuberculosis* é sequestrado dentro de uma estrutura conhecida como granuloma, constituída principalmente por macrófagos ativados rodeados por linfócitos e componentes fibróticos (FLYNN e CHAN, 2001). Os bacilos conseguem persistir dentro dos macrófagos ou extracelularmente em uma área central de necrose caseosa (GROSSET, 2003). Em aproximadamente 90% dos indivíduos infectados, a imunidade celular ocasiona a morte das micobactérias dentro das áreas de calcificação; embora entre 5-10% dos indivíduos infectados, os granulomas não conseguem manter isoladas as bactérias, as quais podem ser liberadas em regiões do pulmão ricas em oxigênio, o que resulta na progressão das manifestações clínicas da tuberculose pulmonar (Fig. 2).

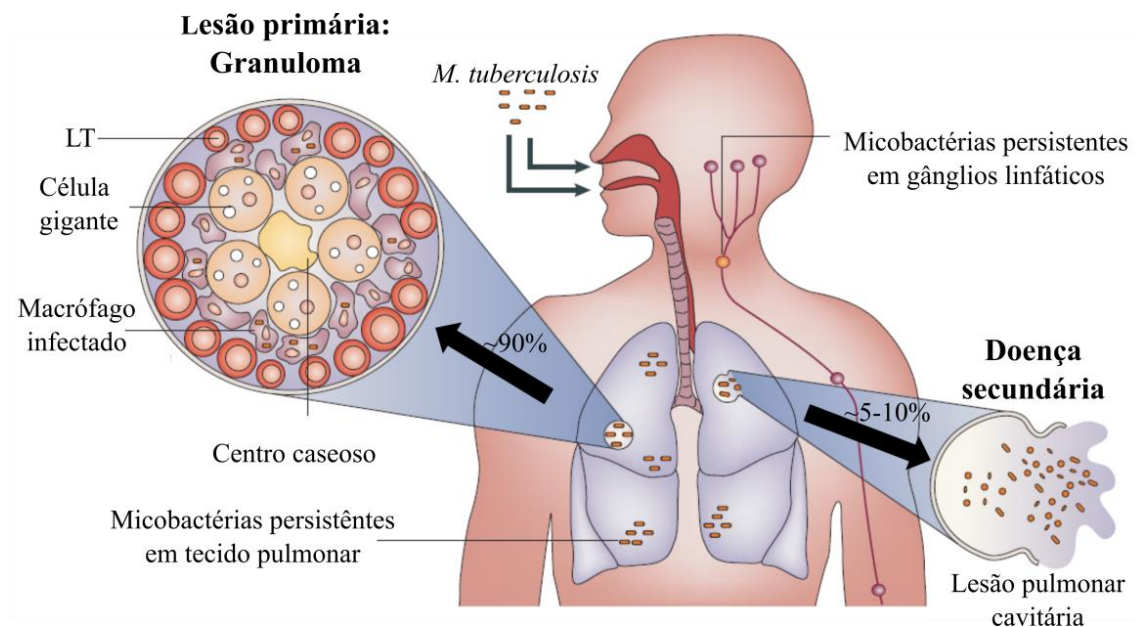


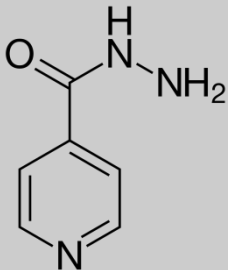
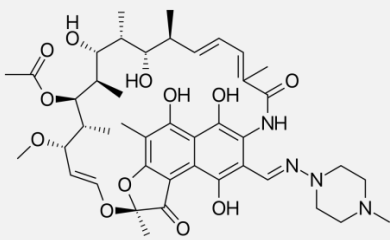
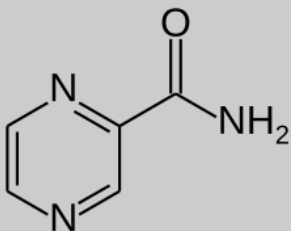
Figura 2. Fisiopatologia da tuberculose pulmonar. *Mycobacterium tuberculosis* penetra no sistema respiratório através da inalação de aerossóis infectados. Os macrófagos são o principal alvo do *M. tuberculosis* e é dentro destas células que as micobactérias conseguem sobreviver e ainda se replicar. Os Linfócitos T específicos contra *M. tuberculosis* conseguem bloquear a divisão bacteriana dentro de uma estrutura conhecida como granuloma, mas é incapaz de eliminar completamente as micobactérias. *M. tuberculosis* persiste em estado de latência por longos períodos no tecido pulmonar e extrapulmonar. Uma reduzida proporção de indivíduos que não consegue controlar a replicação da bactéria desenvolve as manifestações clínicas da tuberculose pulmonar (doença secundária). Adaptado de STEWART *et al.*, 2003.

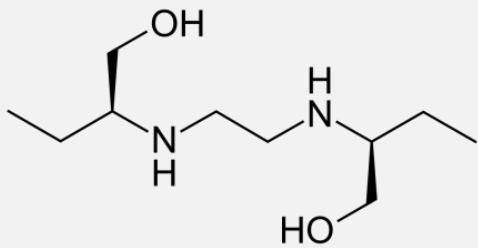
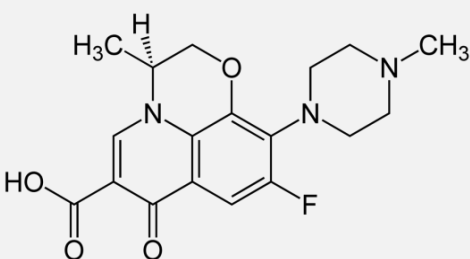
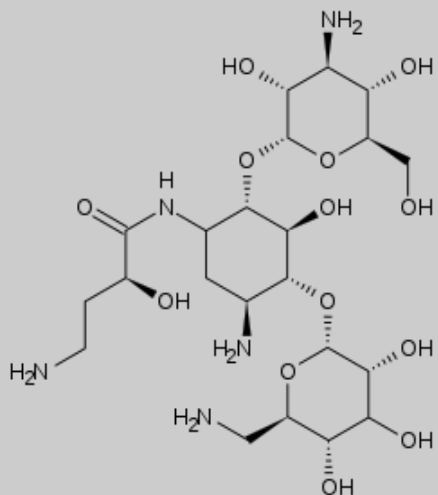
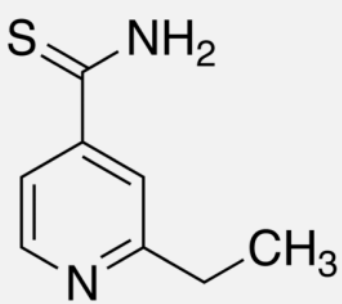
1.3 TRATAMENTO E MECANISMO DE AÇÃO DOS FÁRMACOS ANTI-TUBERCULOSE

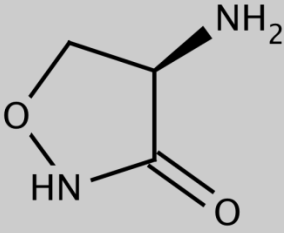
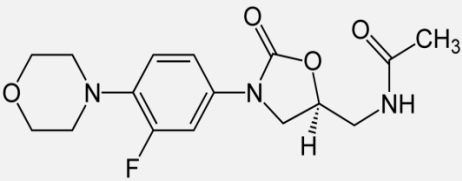
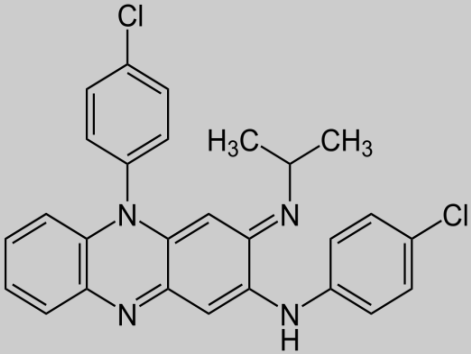
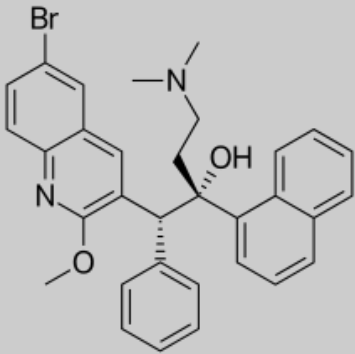
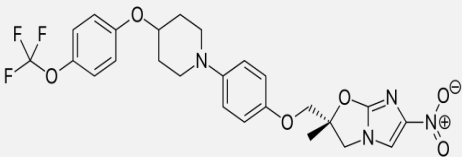
O propósito do tratamento contra TB consiste em erradicar todas as micobactérias viáveis, incluindo aquelas que estão em divisão e em latência. Este objetivo somente pode ser atingido quando o paciente está infectado com uma cepa

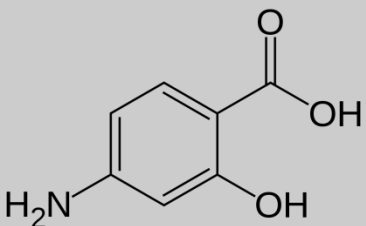
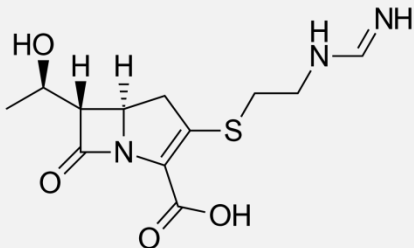
sensível aos antimicrobianos e segue o esquema de tratamento durante seis meses. O tratamento da TB sensível com antimicrobianos requer o uso combinado dos fármacos isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA) e etambutol (EMB) durante os primeiros dois meses, seguido por quatro meses com RIF e INH (WHO, 2017b). Entretanto, os pacientes com infecção por cepas MDR, requerem pelo menos 12 meses de tratamento (FALZON *et al.*, 2017), o qual resulta ser mais custoso para os serviços de saúde e deriva em maiores efeitos adversos. Dependendo da gravidade dos casos, estes pacientes requerem ser tratados com outros medicamentos anti-tuberculose, conhecidos como de segunda ou terceira linha (Tabela 1).

Tabela 1. Fármacos usados no tratamento da tuberculose, seus mecanismos de ação e de resistência antimicrobiana.

Fármaco / estrutura química	Mecanismo de ação	Mecanismo de resistência comumente descrito
Primeira linha: Antimicrobianos usados no tratamento de infecções por <i>M. tuberculosis</i> sensível.		
Isoniazida 	Inibição da síntese de ácidos micólicos (WINDER e COLLINS, 1970)	Supressão de <i>katG</i> que diminui a ativação do pró-fármaco. Mutação na região promotora de <i>inhA</i> que aumenta a expressão de <i>InhA</i> . (ZHANG <i>et al.</i> , 1992)
Rifampicina 	Inibição da síntese de mRNA bacterianos (MCCLURE e CECH, 1978)	Mutação em <i>rpoB</i> que induz mudança conformacional na subunidade β da RNA polimerase diminuindo a afinidade de união ao antibiótico. (TELENTI <i>et al.</i> , 1993)
Pirazinamida 	Induz acidificação do citoplasma bacteriano, bloqueia o transporte de elétrons e a produção de energia. (ZHANG <i>et al.</i> , 2003)	Mutações em <i>pncA</i> que reduzem a conversão do antimicrobiano na sua forma ácida ativa. (MIOTTO <i>et al.</i> , 2014)

Etambutol 	Inibição da síntese de arabinogalactanos. (TAKAYAMA e KILBURN, 1989)	Mutações no operon <i>embCAB</i> que codifica por arabinosil transferases associadas a membrana. (SREEVATSAN <i>et al.</i>, 1997)
Segunda Linha: Antimicrobianos usados no tratamento de infecções por cepas de <i>M. tuberculosis</i> MDR ou XDR.		
Fluoroquinolonas: (Levo/Moxi/Gatifloxacina) 	Inibição do complexo DNA girase. (DRLICA <i>et al.</i>, 1996)	Mutações em <i>gyrA</i> e <i>gyrB</i> que altera o sítio de união do antimicrobiano a enzima. (CAMBAU <i>et al.</i>, 1994)
Aminoglicosídeos: (Estreptomicina, Amicacina, Canamicina) 	União ao rRNA 16S da subunidade 30S do ribossomo causando erros na leitura do mRNA durante a tradução. (DAVIES <i>et al.</i>, 1965)	Modificação do sítio de união do antibiótico no rRNA 16S. Inativação do antibiótico através da acetilação catalisada pela Eis (<i>Enhanced intracellular survival protein</i>). (CHEN <i>et al.</i>, 2012)
Etionamida 	Síntese de ácidos micólicos. (WINDER <i>et al.</i>, 1971)	Mutações em <i>ethA</i> e <i>inhA</i> diminuem a ativação da pro-droga e sobre expressão de <i>InhA</i> (Resistencia cruzada com Isoniazida). (VILCHÈZE e JACOBS, 2014)

Cicloserina 	Bloqueia a síntese de peptidoglicano, inibindo a ação das enzimas D-alanina racemase e D-alanina:alanina sintase. (CÁCERES <i>et al.</i>, 1997)	Mutações em <i>alrA</i> (Rv3423c) que aumenta a expressão do gene e diminui a eficácia do antimicrobiano. (CHEN <i>et al.</i>, 2017)
Linezolid 	União ao rRNA 23S da subunidade 50S do ribossomo causando bloqueio da síntese de proteínas. (IPPOLITO <i>et al.</i>, 2008)	Mutação T460C no <i>rplC</i> que codifica pela proteína L3 da subunidade 50S do ribossomo. (BECKERT <i>et al.</i>, 2012)
Clofazimina 	Não está bem estabelecido. Possivelmente compete com a menaquinona pelos elétrons transportados por FAD desde NADH-2 reduzida. (LECHARTIER e COLE, 2015)	Mutação de Rv0678 que codifica por um repressor da transcrição da bomba de fluxo MmpL5, aumentando sua expressão. (Resistência cruzada com Bedaquilina). (ZHANG <i>et al.</i>, 2015)
Outras opções terapêuticas: (Antimicrobianos de terceira linha). Usados em combinação com outros medicamentos anti-TB em casos severos de TB resistente ou quando não existe mais opção terapêutica.		
Bedaquilina 	Bloqueio na produção de energia por inibição da enzima ATP sintase. (ANDRIES <i>et al.</i>, 2005)	Mutações em <i>atpE</i> modifica o sítio de união do antimicrobiano. (PETRELLA <i>et al.</i>, 2006)
Delamanida 	Inibição da síntese de ácidos micólicos. (GLER <i>et al.</i>, 2012)	Mutação no gene Rv3547 que opera como ativador da redução. (FUJIWARA <i>et al.</i>, 2018)

Ácido <i>p</i>-aminosalicílico 	Não está bem estabelecido. Possivelmente causa interferência com a síntese de folato e inibição da obtenção de ferro. (RENGARAJAN <i>et al.</i>, 2004; RATLEDGE, 2004)	Mutações nos genes <i>thyA</i>, <i>dfrA</i>, <i>folC</i>, <i>folP1</i>, e <i>folP2</i> que codificam por enzimas da via da biossíntese de folato. (MATHYS <i>et al.</i>, 2009)
Beta-lactâmicos: (Imipenem-cilastina, meropenem, amoxicilina-clavulanato) 	Bloqueiam a síntese de peptideoglicano, inibindo a ação das enzimas que catalisam reações de transpeptidação (KISHIDA <i>et al.</i>, 2006; KIM <i>et al.</i>, 2013; LI <i>et al.</i>, 2013; STEINER <i>et al.</i>, 2017).	Aumento da expressão de β-lactamases (BlaC) (FLORES <i>et al.</i>, 2005).

Vários dos antimicrobianos usados no tratamento da TB, como INH, EMB, Etionamida, delamamida, agem sobre o envoltório celular de *M. tuberculosis*, indicando a importância desta estrutura como alvo farmacológico. Da mesma maneira, a cicloserina e os antibióticos β -lactâmicos têm sido reconhecidos também como fármacos com atividade anti-TB porque inibem enzimas relacionadas com a biossíntese do peptideoglicano (PG), uma estrutura única em bactérias, também essencial para a viabilidade celular.

1.4 ESTRUTURA GERAL DO ENVELOPE DAS MICOBACTÉRIAS

O envoltório das micobactérias serve como uma barreira externa que as protege do estresse ambiental e adicionalmente confere baixa permeabilidade aos solutos, proteção osmótica, mecanismos de transporte para íons e nutrientes. Nas micobactérias patogênicas, o envelope também é fonte de fatores de virulência que são importantes durante o processo de infecção. Estudos de tomografia crioelétrica mostram que o envoltório das micobactérias é constituído por três estruturas covalentemente unidas entre si, que difere dos modelos de envoltório propostos para bactérias Gram positivas e Gram negativas (VOLLMER e SELIGMAN, 2010) (Fig. 3a).

Na região mais externa, encontra-se uma bicamada lipídica constituída principalmente por ácidos micólicos, que em *M. smegmatis* contém adicionalmente

porinas, como MspA (MAHFOUD *et al.*, 2006), e servem como canais para o transporte de solutos hidrofílicos. Localizadas no periplasma, encontram-se duas camadas, que parecem corresponder ao complexo formado pelo arabinogalactano (AG) e o peptideoglicano (PG) (HOFFMANN *et al.*, 2008). Esses três elementos constituem o cerne da parede celular das micobactérias, uma estrutura essencial para a sobrevivência destes microrganismos, constituindo-se em alvos de vários dos atuais fármacos anti-TB e dos novos medicamentos desenvolvidos contra micobactérias patogênicas (Fig. 3b).

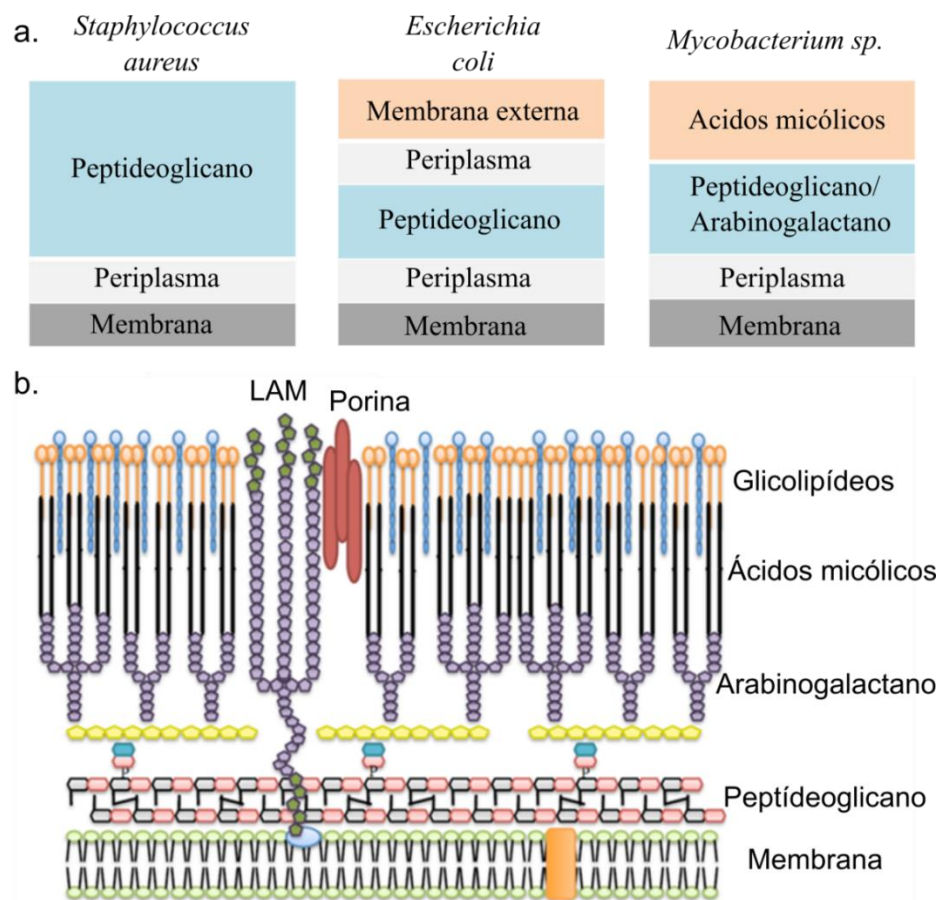


Figura 3. Modelo do envoltório celular de *Mycobacterium sp.* (a) O envelope das micobactérias difere em arquitetura e composição da estrutura homóloga presente em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. (b) O envelope de *Mycobacterium sp.* está conformado pela membrana celular que rodeia o citoplasma. Contidos no periplasma encontram-se o peptideoglicano e arabinogalactanos unidos entre si covalentemente. Na camada mais externa do envoltório predominam os ácidos micólicos acompanhados dos glicolipídios, porinas e lipoarabinomananos (LAM). Painel a: Adaptado de VOLLMER e SELIGMAN, 2010. Painel b: Adaptado de SANDERS, 2014b.

1.5 ESTRUTURA E BIOSÍNTESE DO PEPTIDEOGLICANO MICOBACTERIANO

O envoltório celular das micobactérias contem PG, um polímero complexo e altamente regulado que forma uma camada rígida por fora da membrana celular que também participa em funções como, transporte de solutos, manutenção da forma bacteriana e a divisão celular. O PG micobacteriano está formado por fitas de N-acetil- α -D-glucosamina (NAG) e ácido N-acetilmurâmico (NAM), unidos entre si por ligações glicosídicas β -1,4. Os resíduos de NAM estão modificados por peptídeos altamente interconectados (Fig. 4a). O nível de interconexão destes peptídeos é estimado em ser de 70-80% em *Mycobacterium sp.*, diferente do que ocorre em *E. coli*, em que o nível de interconexão chega ser de 50% (VOLLMER e HÖLTJE, 2004).

A síntese do PG inicia-se no citoplasma com a participação de diferentes enzimas que catalisam a formação de um pentapeptídeo-dissacarídeo-lipídeo conhecido como o Lipídeo II. O lipídeo II é trasladado através da membrana celular por um mecanismo possivelmente mediado por flipases (SHAM *et al.*, 2014). As últimas etapas na formação do PG acontecem no periplasma onde se encontram as enzimas bifuncionais PonA1 e PonA2, com atividade transglicosilase, que catalisam as ligações glicosídicas β -1,4 entre os motivos de NAG e NAM presentes no lipídeo II (HETT *et al.*, 2010). PonA1, possui também domínios *Penicillin Binding Protein* (PBP) que catalisam a interconexão dos peptídeos através de reações de transpeptidação. Os domínios PBP usam como substratos os pentapeptídeos (L-Ala¹-D-Glu²-*m*-DAP³-D-Ala⁴-Dala⁵) presentes também no lipídeo II. As reações de transpeptidação catalisadas pelas PBP produzem ligações D-D, também conhecidas como 4 $\rightarrow$ 3, presentes no peptideoglicano micobacteriano (CHANG *et al.*, 1990) (Fig. 4a).

A primeira etapa da transpeptidação leva à liberação do último resíduo de D-Ala⁵ do pentapeptídeo da cadeia doadora de acila e à formação de um aduto covalente formado entre o penúltimo resíduo (D-Ala⁴) e a serina catalítica conservada nas PBP (YOCUM *et al.*, 1979) (Fig. 4b). Os antibióticos β -lactâmicos, como a penicilina e ampicilina são estruturalmente análogos do motivo terminal D-Ala⁴-D-Ala⁵ presente no precursor do PG, e podem agir como substratos irreversíveis em uma reação de acilação similar (GHUYSEN, 1994). A segunda etapa da transpeptidação resulta na formação da ligação interpeptídica 4 $\rightarrow$ 3 e a

liberação da enzima, contrário ao que acontece durante a acilação das D,D-transpeptidases por β -lactâmicos, que é irreversível. Desta forma, as PBP são alvo dos β -lactâmicos que conseguem matar as bactérias inibindo as reações de transpeptidação 4 $\rightarrow$ 3, um mecanismo essencial para manutenção da integridade da parede celular.

Embora as ligações 4 $\rightarrow$ 3 estão presentes no PG de *M. tuberculosis* (WIETZERBIN *et al.*, 1974), a maior proporção das ligações inter-peptídicas são L-D ou 3 $\rightarrow$ 3 (LAVOLLAY *et al.*, 2008). Estas ligações são catalisadas pelas L,D-transpeptidases, e *M. tuberculosis* H37Rv contém cinco genes codificando por estas enzimas (COLE *et al.*, 1998).

As L,D-transpeptidases de *M. tuberculosis* (Ldts_{Mt}) são enzimas monofuncionais, que por analogia com as PBP clivam o último resíduo de D-Ala⁴ de um tetrapeptídeo presente em uma cadeia peptídica doadora, para depois ligar o grupo L-carboxila de um resíduo de *m*-DAP³ ao grupo D-amino de outro resíduo de *m*-DAP³ presente em uma cadeia peptídica aceptora (MAINARDI *et al.*, 2005) (Fig. 4c). As Ldts_{Mt} não estão relacionadas estruturalmente com as PBP, e similar as L,D-carboxipeptidases de *E. coli* (TEMPLIN *et al.*, 1999), as Ldts_{Mt} não são aciladas por penicilina ou ampicilina; pelo contrário, estas enzimas são inibidas por um reduzido número de β -lactâmicos pertencentes as classes dos penêmicos (DHAR *et al.*, 2015) e carbapenêmicos (CORDILLOT *et al.*, 2013). Esses antibióticos, também agem como inibidores suicidas, formando um aduto covalente com a cisteína catalítica conservada das Ldts_{Mt} (ERDEMLI *et al.*, 2012).

Durante a fase estacionária do crescimento de *M. tuberculosis* tem sido reportado um aumento na expressão de alguns dos genes que codificam pelas Ldts_{Mt} (BETTS *et al.*, 2002). Assim, acredita-se que estas enzimas podem contribuir com a manutenção do PG nos períodos de deficiência de nutrientes, usando como substratos derivados tetrapeptídeos. Em *Corynebacterium sp.* o controle da L,D transpeptidação e da formação das ligações 3 $\rightarrow$ 3 envolve inicialmente a clivagem do último resíduo de D-Ala⁵ de um pentapeptídeo, reação catalisada pela D,D-carboxipeptidase PBP4 que gera o substrato tetrapeptídeo das L,D-transpeptidases (LAVOLLAY *et al.*, 2009). Em *M. tuberculosis*, esta função poderia ser realizada pelas D,D carboxipeptidases DacB1 e DacB2 (KUMAR *et al.*, 2012) (Fig. 4c).

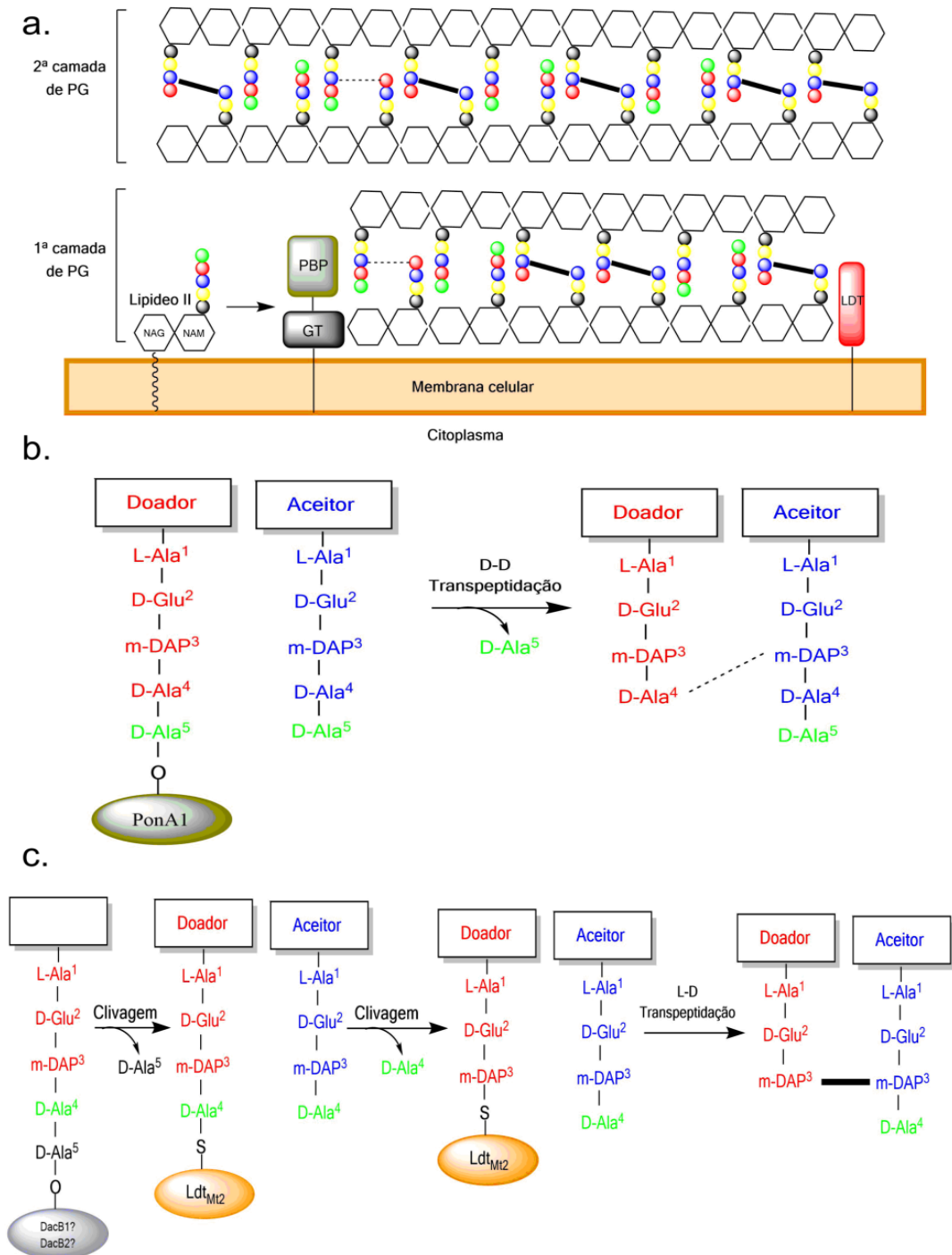


Figura 4. Formação de ligações peptídicas no peptideoglicano de *M. tuberculosis*. (a) O lipídeo II, uma vez que é translocado através da membrana celular, serve como substrato do domínio transglicosilase (GT) de PonA1 que catalisa as ligações glicosídicas entre resíduos de NAG e NAM. As ligações peptídicas 4→3 (linhas pretas descontinuas) são catalisadas pelo domínio PBP de PonA1, entretanto as ligações 3→3 (linhas pretas contínuas) são catalisadas pelas L,D-transpeptidases. (b) O domínio PBP de PonA1 contém um resíduo de serina catalítico que interage covalentemente com seu substrato pentapeptídeo. A ligação peptídica 4→3 (linha descontinua) ocorre entre os resíduos de *m*-DAP³ e D-Ala⁴ das cadeias doadora e aceitadora de acila. Esta reação leva à clivagem do último resíduo D-Ala⁵ na cadeia doadora de acila. (c) As D,D-carboxipeptidases DacB1 e DacB2 de *M. tuberculosis* possivelmente clivam o resíduo D-Ala⁵ na cadeia doadora de acila gerando o tetrapeptídeo, substrato das L,D-transpeptidases. As Ldts_{Mt} possuem uma cisteína catalítica que interage covalentemente com o tetrapeptídeo e catalisam as reações de transpeptidação 3→3 entre dois resíduos de *m*-DAP³ presentes nas cadeias aceitadora e doadora de grupos acila, respectivamente. Esta reação leva a clivagem de D-Ala⁴ da cadeia doadora.

1.6 RELEVÂNCIA BIOLÓGICA DAS LIGAÇÕES 3→3

A função biológica das ligações 3→3 na parede celular bacteriana ainda não é completamente entendida, embora existam várias hipóteses sobre a sua importância biológica. Acredita-se que as *Ldts_{Mt}* conferem resistência às penicilinas proporcionando uma rota alternativa à transpeptidação 4→3 catalisada pelas PBP que são sensíveis à inibição por esta classe de β -lactâmicos (MAINARDI *et al.*, 2000). Entretanto, a função das *Ldts_{Mt}* como uma estratégia de resistência aos β -lactâmicos não se cumpre completamente devido a estas enzimas também serem inibidas covalentemente pelo faropenem (KUMAR *et al.*, 2017; STEINER *et al.*, 2017) e pelos carbapenêmicos (CORREALE *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2013; BRAMMER BASTA *et al.*, 2015).

Tem-se sugerido que as ligações 3→3 podem proporcionar uma maior rigidez à parede celular e proteger a bactéria frente a condições extremas, como por exemplo, limitação de nutrientes, elevada osmolaridade ou altas temperaturas (GLAUNER *et al.*, 1988). Acredita-se ainda que as ligações 3→3 podem ser um mecanismo de estabilização da parede celular quando a síntese *de novo* do precursor pentapeptídico é limitada (LAVOLLAY *et al.*, 2008). Por exemplo, em vários organismos tem sido sugerido que este tipo de ligação é mais frequente durante a fase estacionária, etapa do crescimento bacteriano na qual quase todos os precursores pentapeptídicos têm sido convertidos a tetrapeptídicos pela ação das PBP e D,D-carboxipeptidases. Um mecanismo similar parece acontecer em *M. tuberculosis*, que mostrou uma maior expressão dos genes das *Ldts_{Mt}* em um modelo de persistência *in vitro* (BETTS *et al.*, 2002) e durante a fase estacionária. Isso faz que mais de 80% das ligações peptídicas na parede celular sejam do tipo 3→3 (LAVOLLAY *et al.*, 2008). Finalmente, as ligações 3→3 poderiam estar ainda relacionadas com a sobrevivência de alguns patógenos intracelulares como *Salmonella sp.*, principalmente nas condições em que as bactérias não estão em divisão celular (QUINTELA *et al.*, 1997).

Em *M. tuberculosis*, as ligações 3→3 parecem ser essenciais para a virulência. Estudos com cepas com deleção de *ldt_{mt2}* mostraram perda da capacidade de infecção em um modelo animal de TB (GUPTA *et al.*, 2010). Adicionalmente, esses mesmos mutantes e outros com deleção de *ldt_{mt1}*, e *ldt_{mt5}* apresentaram alterações morfológicas e aumento na susceptibilidade a amoxicilina

(GUPTA *et al.*, 2010; SCHOONMAKER *et al.*, 2014; BRAMMER BASTA *et al.*, 2015), um β -lactâmico que por si só não tem atividade contra *M. tuberculosis*, uma vez que ele é rapidamente hidrolisado pela BlaC, uma β -lactamase que é expressa constitutivamente nesta bactéria (WANG *et al.*, 2006). Estas informações sugerem que as ligações (3→3) produzidas pelas Ldts_{Mt}, são essenciais para a correta função do PG de *M. tuberculosis* e consequentemente para sua virulência.

1.7 L,D- TRANSPEPTIDASES: ESTRUTURA E FUNÇÃO

A presença de ligações 3→3 na parede celular das micobactérias foi descrita inicialmente por WIETZERBIN *et al.*, 1974. Mas as enzimas com atividade L,D-transpeptidase só foram identificadas anos mais tarde em uma cepa de *Enterococcus faecium* que apresentava um fenótipo de elevada resistência à ampicilina e uma parede celular exclusivamente formada por ligações 3→3 (MAINARDI *et al.*, 2000). Posteriormente, foram descritos genes que codificam por L,D- transpeptidases em outros gêneros, tanto de bactérias Gram positivas e Gram negativas (MAGNET *et al.*, 2008; SÜTTERLIN *et al.*, 2018).

M. tuberculosis (H37Rv) codifica cinco parálogos de L,D-transpeptidases [Rv0116c (Ldt_{Mt1}), Rv2518c (Ldt_{Mt2}), Rv1433 (Ldt_{Mt3}), Rv0192 (Ldt_{Mt4}) e Rv0483 (Ldt_{Mt5})] (COLE *et al.*, 1998) com uma porcentagem de identidade de sequência na faixa de 37-50% (Fig. 5a-b). As Ldts_{Mt} variam em seu número de resíduos, o qual reflete em suas diferenças de tamanho e número de domínios. Desta maneira, as Ldts_{Mt} menores (Ldt_{Mt1}, Ldt_{Mt3} e Ldt_{Mt4}) contêm só dois domínios, porém as maiores (Ldt_{Mt2} e Ldt_{Mt5}) possuem três (Fig. 6a).

Uma característica conservada entre as Ldts_{Mt} é a presença de um Domínio Catalítico (CD) do tipo ErfK/YbiS/YhnG no extremo C-terminal (BIARROTTE-SORIN *et al.*, 2006; BIELNICKI *et al.*, 2006). O sítio ativo das Ldts_{Mt} apresenta um motivo conservado de HXXP14-17[S/T]HGChN, onde h representa um resíduo hidrofóbico (BIELNICKI *et al.*, 2006; ERDEMLI *et al.*, 2012; LECOQ *et al.*, 2012). Além da cisteína, a histidina na posição 1 e um resíduo variável na posição 2 (representado por X) completam a tríade catalítica, descrita inicialmente para cisteína-proteases (ERDEMLI *et al.*, 2012; CORREALE *et al.*, 2013; BRAMMER BASTA *et al.*, 2015).

a.

LDT3_MYCTU

```

LDT3_MYCTU .....
LDT1_MYCTU .....
LDT4_MYCTU .....MPHWAEERHRESNYVALEAGLDEGESIRREHSRSGCGA
LDT2_MYCTU .....MPKVGIAAQAGRTRVRRALMTALMMTAVMIGAVACSGRGPAPIKVIADKGTFFA
LDT5_MYCTU MVIRVLFRRPVSILPVNNSSTPQSQGPISRRRLALTALGFGVLAPNVLVACAGKVTKLAEKR

```

LDT3_MYCTU

```

LDT3_MYCTU .....1RAVFGCAIAVVGIAGSVVAAGPADIHILVAAKQS
LDT1_MYCTU .....MRRVVRYLSVVVAITLMLTAESVSIATAAVPPL
LDT4_MYCTU DAGCWCRCRGGPGRGSRSSRRSRGPGGTAGPVDPPAVDLLAPPDPLALFPALDPLAPPPP
LDT2_MYCTU DLLVPKLTASVTDGAVGVTVDAVSVTAADGVLAAVTMVNDNGRPVAAGRLSPDGLRWSTT
LDT5_MYCTU PPPAPRLTFRPADSAADVPIAPISVEVGDGWFRVLTNSAGKVVAAGAYSRRRTIYTIT

```

LDT3_MYCTU TT

$\xrightarrow{\beta_1}$ $\xrightarrow{\beta_2}$ $\xrightarrow{\beta_3}$
 40 50

```

LDT3_MYCTU YGFA.....VASVLPTRGQVVGVAHPVVVTF
LDT1_MYCTU QPIPG.....VASVS PANCAVVGVAHPVVVTF
LDT4_MYCTU DPLAPPPDPLAVPVA..AGPVAGQD.PTSFVGPPFRPPTFN PVDGAMVVGVAHPVIVNF
LDT2_MYCTU EQLGYNRRYTLNATALGLGGAATROL.TFQTSSPAHLTMPYVM PGDGEVVGVEPVAIRF
LDT5_MYCTU EELGYDTTYTWSGSAVGHGKAVPVAGKFTTVAPVKTINAGFQLADGQTVGIAAPVVIQF

```

LDT3_MYCTU

η_1 α_1 β_4 β_5 β_6 β_7
 60 70 80 90 100 110

```

LDT3_MYCTU SAPIINPANHAAERAVEVKSTPAMTKKFEWLDNDV...VQWVDRFWPAHSTVELSVG
LDT1_MYCTU TTPVT...DRRAVERSIRISTPHNTTGHFEWVASNV...VVRVPHRYWPPHTRVSVGVQ
LDT4_MYCTU AVPIA...DRAMAESAIIHISIPVPCKFYWMSPQT...VVRWRPFEFWPAHSTVAVNIDAA
LDT2_MYCTU DENIA...DRGAAEKAIKITTNPPVEGAFYWLNNRE...VVRWRPEHFWKPGTAVDVAVN
LDT5_MYCTU DSEIS...DKAAVERALTVTDPVEGGAWLDPDEAQQARVHWREREYYPAGTIVDVDAK

```

LDT3_MYCTU T=

β_8 β_9 β_{10} β_{11}
 120 130 140 150 160

```

LDT3_MYCTU SL.....SSDFKTCGPAVVGVAISI SQHTFTVSIDGVFE GPPPLPAPHHRVH
LDT1_MYCTU EL.....TEGFETGDA LIGVASI SAHTFTVSRNGEVLRL
LDT4_MYCTU GT.....KSSFRTGDSLVATADDA THQM TITRN GVVQK
LDT2_MYCTU TYGVDLGE GFMFGEDNV QTHFTIGDEVIATADD NTKILT VVRVNGEVVK
LDT5_MYCTU LYGLPFGDGAYGAQDM SLHFQICGRQVVKAEVSSHRIQVVTDA GIMD

```

LDT3_MYCTU

β_{12} β_{13} β_{14} β_{15}
 170 180 190 200 210

```

LDT3_MYCTU FGEDGVMEASMG RPE...YPTPVGSYTVLSKERSVIMDS SVGIPVDDPDGYRLSVDYAV
LDT1_MYCTU .....TMPASLGKPS...RPTPIGSEFHAMS KERTVVMDSRTIIGIPLNSSDGYLLTAHYAV
LDT4_MYCTU .....TFPMSMG MVSGG.HQTPNGTYVYVLEKFATVVMDSSTYGVVNSAQGYKLTVSDAV
LDT2_MYCTU .....SMPTSMG KDS...TPTANGIYIVGSR YKHIIMDSSTYGVVNSPNGYRTD VDWAT
LDT5_MYCTU .....FPCS YGEADLARNV TRNGIHVTEKYSD EYMSNPAAGYSHIHER...WAV

```

LDT3_MYCTU

β_{16} η_2 β_{17} α_2 β_{18}
 220 230 240 250 260 270

```

LDT3_MYCTU RITSRGLYVHSAPWALPALCLENVSHGCI SLSDREDAEWYNAVDIGDPVIVQE.....
LDT1_MYCTU RVTWSGVYVHSAPWSVNSQCYANVSHGCI NLSPDNAAWYF DAVTVGDP IIVVG.....
LDT4_MYCTU RIDNSGNFVHSAPWSVADQGRNVSHGCI NLS PANAKWYFDNFGSGDPVIVVKN SVG.TYN
LDT2_MYCTU QISYSGV FVHSAPWSVGAQCHTNTSHGCI NLS PSNAQWYFDHVKRGDIVEV VNTVGGTLP
LDT5_MYCTU RISNNGEFIHANPMSAGAQCNSNVTNGCI NLS TENAEQYYS AVYGDPEVETGSSIQLSY

```

★ ★ ★ ★

LDT3_MYCTU

```

LDT3_MYCTU .....
LDT1_MYCTU .....
LDT4_MYCTU KNDGAQDWQI.....
LDT2_MYCTU GIDGLGDWNIPWDQWRAGNAKA.....
LDT5_MYCTU ADGDIWDWAVDGTWVSMSALPPPAAKPAATQIPVTAPVTPSDAPTSGTPTTNGPGG

```

b.

	Ldt _{Mt1}	Ldt _{Mt2}	Ldt _{Mt3}	Ldt _{Mt4}	Ldt _{Mt5}
Ldt _{Mt1}	-	43	50	45	30
Ldt _{Mt2}	-	-	39	47	34
Ldt _{Mt3}	-	-	-	39	31
Ldt _{Mt4}	-	-	-	-	35

Figura 5. Alinhamento de sequência para as cinco L,D-transpeptidases de *Mycobacterium tuberculosis*. (a) Os resíduos idênticos se apresentam em letras brancas com fundo vermelho; as regiões com mais de 70% de similaridade estão representadas por letras vermelhas dentro dos retângulos. Os elementos de estrutura secundária estão representados acima dos correspondentes resíduos. Os resíduos catalíticos estão indicados por estrelas amarelas abaixo dos correspondentes aminoácidos. O alinhamento foi realizado com o programa ESPript 3.x. (ROBERT e GOUET, 2014); (b) Porcentagem de identidade de sequência entre cinco L,D-transpeptidases de *Mycobacterium tuberculosis*.

Os CDs das Ldts_{Mt} são precedidos de um ou dois domínios bacterianos de imunoglobulina-1 (BigA e BigB) no N-terminal, os quais foram descritos inicialmente em proteínas de adesão de *E. coli* (KELLY *et al.*, 1999), e posteriormente em enzimas e chaperonas (HALABY e MORRON, 1998). Os domínios Big estão estruturalmente relacionados com as cadeias leves das regiões Fab dos anticorpos (KIM *et al.*, 2013).

Todas as Ldts_{Mt}, exceto Ldt_{Mt4}, tem predita uma pequena região citoplásmica, seguida de uma região transmembrânica. Portanto, a maior proporção dos resíduos das Ldts_{Mt} estão expostos ao periplasma (Fig. 6a). Atualmente, existem descrições na literatura para as estruturas cristalográficas de Ldt_{Mt1} (CORREALE *et al.*, 2013), Ldt_{Mt2} (ERDEMLI *et al.*, 2012; BÖTH *et al.*, 2013) e Ldt_{Mt5} (BRAMMER BASTA *et al.*, 2015) (Fig. 6b). Desta forma, Ldt_{Mt3} e Ldt_{Mt4} são as duas L,D-transpeptidases menos estudadas do ponto de vista estrutural.

Além da já descrita função das L,D transpeptidases na formação de ligações peptídicas (3→3), em alguns organismos, incluindo *M. tuberculosis*, tem sido reportado que estas enzimas podem unir proteínas ou outras macromoléculas covalentemente à parede celular. Por exemplo, em *E. coli*, sabe-se que a principal lipoproteína da membrana externa, a lipoproteína de Braun, é ancorada covalentemente no peptidoglicano pela ação das L,D-transpeptidases (MAGNET *et al.*, 2007). A parede celular de *M. tuberculosis* expressa diferentes antígenos e fatores de virulência, muitos dos quais são de natureza polipeptídica e estão ancorados covalentemente no peptidoglicano (Hirschfield *et al.*, 1990); embora, não se conhece com exatidão qual o mecanismo de fixação destes polipeptídios na

parede celular, mas acredita-se que assim como em *E. coli*, as Ldts_{Mt} poderiam auxiliar nesta função. Adicionalmente, em *Vibrio cholerae*, L,D transpeptidases estão relacionadas com a incorporação de D-aminoácidos no PG, uma função que parece ser importante para sinalizar a entrada da fase estacionária nesta bactéria (CAVA *et al.*, 2011). Em um ensaio de transpeptidação *in vitro* com as Ldts_{Mt}, todos os parálogos conseguiram catalisar reações de transpeptidação, com exceção de Ldt_{Mt3}, pelo qual acredita-se que esta enzima pode desempenhar alguma outra função para a manutenção do PG (CORDILLOT *et al.*, 2013; SANDERS *et al.*, 2014a).

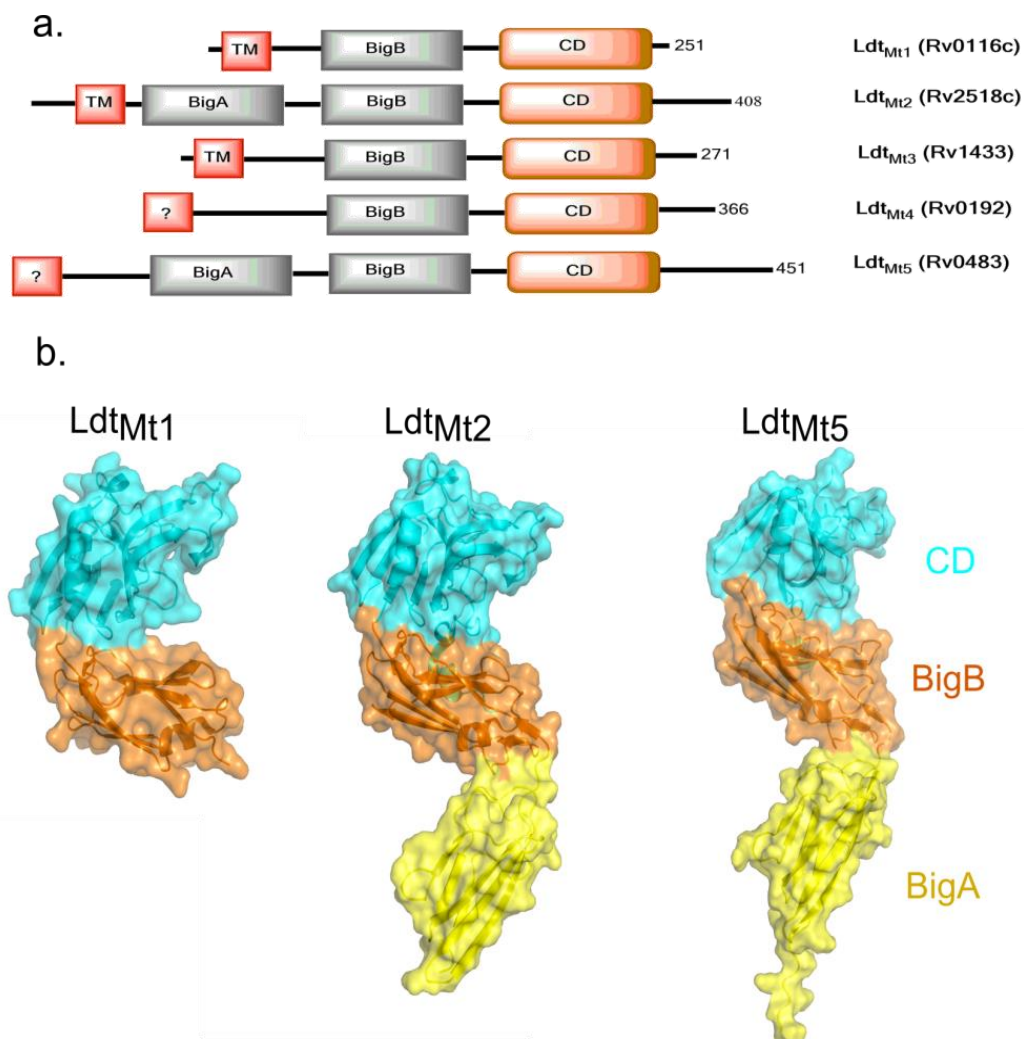


Figura 6. Organização de domínios e estrutura de três L,D-transpeptidases de *M. tuberculosis*. (a) As cinco Ldts_{Mt} diferem em extensão e número de domínios. Ldt_{Mt1}, Ldt_{Mt3} e Ldt_{Mt4} possuem um domínio catalítico (CD) (retângulos laranjas) e um domínio bacteriano de imunoglobulina (BigB) (retângulos cinzas). Entretanto, Ldt_{Mt2} e Ldt_{Mt5} possuem, além do CD, dois domínios de imunoglobulina (BigA e BigB). De acordo com o servidor TMPred (https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html), Ldt_{Mt4} e Ldt_{Mt5} não têm definida uma região transmembrânica, diferente das outras Ldts_{Mt} homólogas. (b) Representação de superfície e distribuição dos domínios para a Ldt_{Mt1} (PDB 4JMN) (CORREALE *et al.*, 2013) 50% de identidade, Ldt_{Mt2} (PDB 5DU7) (KUMAR *et al.*, 2017) 39% de identidade e Ldt_{Mt5} (PDB 4Z7A) (BRAMMER BASTA *et al.*, 2015) 31% de identidade. BigA em amarelo, BigB em laranja e o CD em turquesa.

1.8 ESTRUTURA E CARACTERÍSTICAS DOS ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS

Os antibióticos β -lactâmicos foram descobertos em 1928 pelo pesquisador escocês Alexander Fleming a partir de culturas de *Penicillium notatum*. Embora a produção a grande escala e a comercialização da penicilina, o primeiro β -lactâmico de uso terapêutico em humanos, só teve lugar em 1946 quando começou usar-se no tratamento de doenças por bactérias Gram positivas, especialmente as causadas por *Staphylococcus aureus* (KONG *et al.*, 2010). Posteriormente, com a identificação da estrutura química da penicilina, o ácido 6-aminopenicílico (6-APA) (Fig. 7a), deu-se início a síntese de novos derivados de β -lactâmicos através de modificações químicas no núcleo do 6-APA. Algumas dessas modificações conferiam aos novos antibióticos resistência às recentemente descritas penicilinases, enzimas bacterianas que inativavam a penicilina.

Entre as décadas dos 50s e 60s foi descoberta e desenvolvida uma nova classe de β -lactâmicos, as cefalosporinas, a partir de uma cepa de *Cephalosporium acremonium* (ABRAHAM *et al.*, 1953). As cefalosporinas, diferente das penicilinas, contêm um núcleo de ácido 7-amino cefalospôrinico (7-ACA) (Fig. 7b), que foi usado como ponto de partida para a síntese de várias gerações de cefalosporinas, com espectro contra bactérias Gram positivas e Gram negativas.

Ao final dos anos 60s, com a descoberta das β -lactamases, enzimas que degradam o anel β -lactâmico e inativam a função destes antibióticos, existia uma necessidade por pesquisar novos compostos com atividade antimicrobiana. Assim, em 1976 foi descoberto o primeiro inibidor de β -lactamases de uso clínico, o ácido clavulânico derivado de *Streptomyces clavuligerus* (BROWN *et al.*, 1976). Este composto possui um núcleo carbapenêmico e age como um β -lactâmico de amplo espectro. Os carbapenêmicos contêm dois anéis fusionados de 4 e 5 carbonos, com dupla ligação entre C-2 e C-3 e a substituição de carbono por enxofre na posição C-1. A configuração *trans* do núcleo β -lactâmico entre C-5 e C-6 somado a presença do grupo hidroxietila em configuração *R* na posição C-6 incrementam a potência e resistência dos carbapenêmicos a ação das β -lactamases (Fig. 7c) (PAPP-WALLACE *et al.*, 2011).

Em 1985, o imipenem foi disponibilizado para o tratamento de infecções bacterianas complexas; mas somente poderia ser coadministrado por via endovenosa com cilastina, um inibidor da enzima renal Dehidropeptidase-I (DHP-I),

que inativa e diminui a meia-vida do imipenem (HIKIDA *et al.*, 1992). Os carbapenêmicos derivados do imipenem (meropenem, ertapenem, biapenem), além de conter modificações únicas no substituinte R1 na posição C-2, possuem uma metila em C-1 que diminui sua degradação pela DHP-I e, portanto, adiam o uso cilastina ou de outros de inibidores da DHP-I.

Por outro lado, os penêmicos pertencem a uma classe estrutural distinta de β -lactâmicos, embora sejam confundidos comumente com os carbapenêmicos. Os penêmicos possuem um anel tiazolina com uma dupla ligação entre C-2 e C-3 e um átomo de enxofre ocupa a posição C-1 no anel heterocíclico. Os penêmicos conservam a configuração *trans* do núcleo β -lactâmico e o grupo hidroxietila em configuração *R* na posição C-6 (Fig. 7d). Adicionalmente, os penêmicos podem ter modificações na cadeia lateral R1 de C-2 que serve como base para sua subclassificação como tiopenêmicos, oxipenêmicos, aminopenêmicos, alquilpenêmicos e arilpenêmicos (HAMILTON-MILLER, 2003). Uma possível consequência das diferenças na estrutura química dos penêmicos com outros β -lactâmicos, pode ser sua reduzida imunogenicidade e reatividade cruzada, além de ser pobres substratos para β -lactamases bacterianas e da DHP-I. O faropenem, o principal penêmico de uso clínico, diferencia-se dos carbapenêmicos, com exceção de tebipenem, por possuir boa biodisponibilidade oral (70-80%), principalmente na forma do pro-fármaco éster de daloxato.

Embora os β -lactâmicos apresentam baixa penetrabilidade na parede celular bacteriana, estes antibióticos conseguem inibir sua síntese, acilando irreversivelmente as enzimas que participam das últimas etapas da biossíntese do PG, como as PBP (KISHIDA *et al.*, 2006), carboxipeptidases (KUMAR *et al.*, 2012) e as L,D-transpeptidases (KIM *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2013; STEINER *et al.*, 2017).

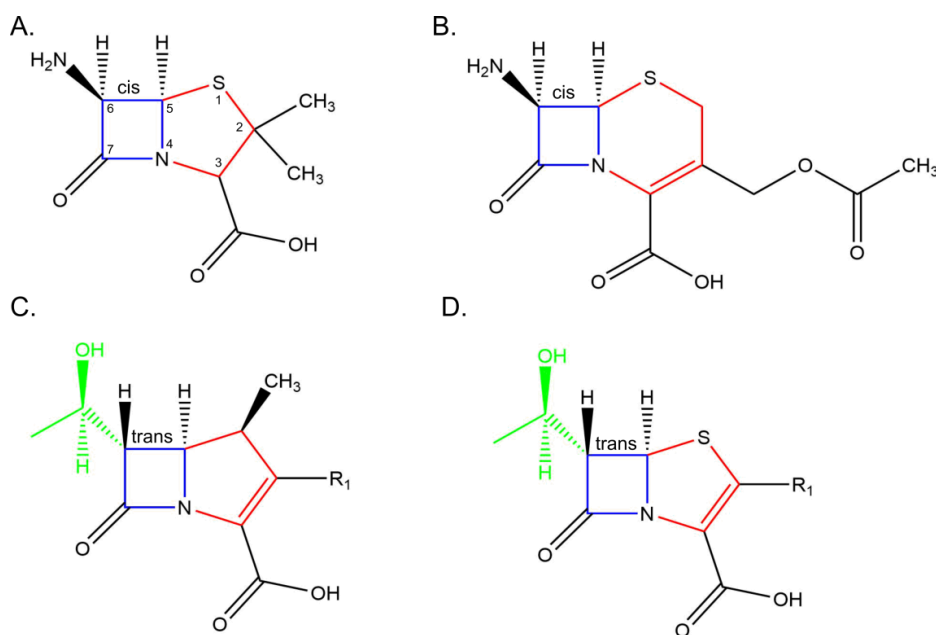


Figura 7. Estrutura química de algumas classes de β -lactâmicos. Em azul destaca-se o anel de quatro membros (β -lactâmico) comum para esta família de antibióticos. Em vermelho ressaltam-se os anéis tiazolidina, dihidrotiazina, pirrolina e tiazolina presentes nas estruturas de (a) Ácido 6-aminopenicilínico (6-APA), (b) Ácido 7-aminocefalosporínico (7-ACA), (c) Carbapenêmicos e (d) Penêmicos, respectivamente. Em verde apresenta-se o grupo hidroxietila em configuração *R*, presente no substituinte R_2 da posição C-6 dos carbapenêmicos e penêmicos. Os hidrogênios em configuração *cis* nas posições C-5 e C-6 do 6-APA e 7-ACA contrastam com a configuração *trans* encontrada nas estruturas dos carbapenêmicos e penêmicos. As variações químicas em R_1 conferem diferentes propriedades físico-químicas e biológicas aos carbapenêmicos e penêmicos.

1.9 INIBIÇÃO DE L,D-TRANSPEPTIDASES POR ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS

A cinética de inativação das $Ldts_{Mt}$ por penêmicos e carbapenêmicos ocorre em duas etapas. A primeira corresponde à formação reversível de um intermediário tetraédrico ou “*oxyanion*”, seguido pela ruptura irreversível do anel β -lactâmico que leva à formação de um complexo acil-enzima estável (CORDILLOT *et al.*, 2013). Todas as $Ldts_{Mt}$ são inativadas por carbapenêmicos e faropenem *in vitro*, com exceção de Ldt_{Mt5} . (DUBÉE *et al.*, 2012; CORDILLOT *et al.*, 2013; DHAR *et al.*, 2014). Em geral, as velocidades de formação do intermediário tetraédrico e do complexo acil-enzima apresentam variações de acordo com cada β -lactâmico, sugerindo que as diferenças estruturais entre estes antibióticos afeta as velocidades de inativação das enzimas. Portanto, modificações químicas nas cadeias laterais dos β -lactâmicos podem ser usadas para obter uma maior atividade inibitória das $Ldts_{Mt}$ e possivelmente, maior atividade antimicrobiana (CORDILLOT *et al.*, 2013).

A acilação de $Ldts_{Mt1}$ e Ldt_{Mt2} por diferentes β -lactâmicos foi também estudada por espectrometria de massas. Os resultados confirmam que a interação entre as

Ldt_{Mt} e os β -lactâmicos leva a formação de um complexo covalente. Entretanto, alguns carbapenêmicos são decarboxilados durante sua interação com as Ldt_{Mt} (STEINER *et al.*, 2017), como se constata pela perda de aproximadamente 44 Da com referência a massa intacta do antibiótico esperada. Um comportamento similar foi reportado durante a interação das β -lactamases com carbapenêmicos (DRAWZ *et al.*, 2010).

Interessantemente, o caso mais significativo acontece com o faropenem. Este antibiótico parece sofrer degradações sucessivas que levam à detecção de um pequeno fragmento de β -hidroxibutirato (ou β -hidroxibutirila) covalentemente unido a Ldt_{Mt2} (KUMAR *et al.*, 2017; STEINER *et al.*, 2017). Estas informações foram também confirmadas por cristalografia de raios X, que revelou uma densidade eletrônica não correspondente ao antibiótico original no complexo acil-enzima, sugerindo que o faropenem poderia ser sujeito a um processamento enzimático após sua união às Ldt_{Mt} (KUMAR *et al.*, 2017; STEINER *et al.*, 2017). Mecanismos de degradação parcial dos β -lactâmicos tem sido reportado para a eliminação do grupo hidroxietila do clavulanato pela BlaC de *M. tuberculosis* e de imipenem pela carbapenemase associada a *Acinetobacter sp.* (ADC), baseado em uma reação retroaldólica que libera este grupo do antibiótico (HUGONNET *et al.*, 2009; DRAWZ *et al.*, 2010) (Fig. 8).

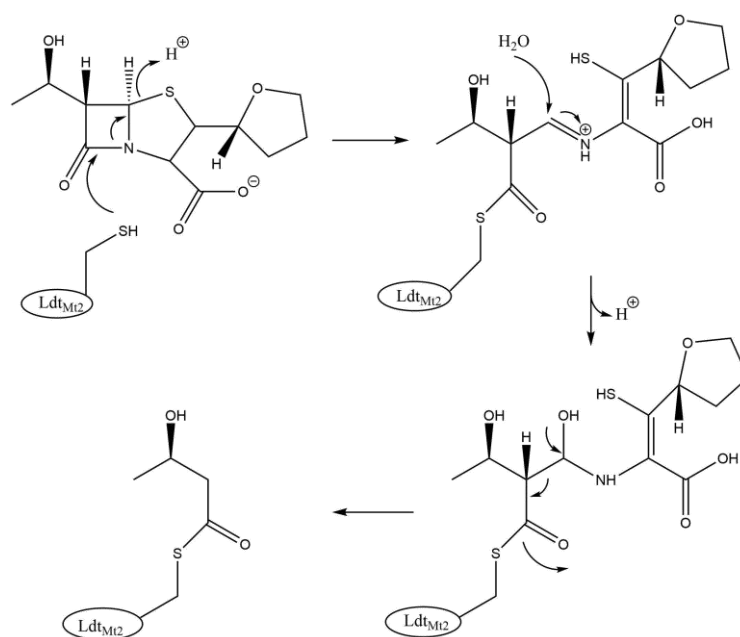


Figura 8. Mecanismo de acilação e degradação de faropenem por Ldt_{Mt2}. Posterior ao ataque nucleofílico do carbono carbonila no anel β -lactâmico, o faropenem é processado até um fragmento de (R)-3-hidroxibutirila que fica covalentemente ligado à cisteína catalítica. Adaptado de KUMAR *et al.*, 2017

1.10 ESTUDOS CLÍNICOS COM β -LACTÂMICOS PARA O TRATAMENTO DA TUBERCULOSE

Os primeiros estudos clínicos com β -lactâmicos em pacientes com TB pulmonar iniciaram no final da década de noventa com a inclusão de um tratamento experimental de amoxicilina e ácido clavulânico em pacientes com baciloscopia de expectoração positiva (CHAMBERS *et al.*, 1998; DONALD *et al.*, 2001). Ambos os estudos coincidiram na rápida atividade bactericida de amoxicilina/clavulanato durante os primeiros dois dias do tratamento, embora depois do terceiro dia, se determinou uma baixa redução no número de bactérias. Isto possivelmente ocorreu devido à amoxicilina/clavulanato agir inicialmente sobre as bactérias extracelulares em divisão, com pouco efeito nas populações bacterianas latentes (CHAMBERS *et al.*, 1998). Finalmente, recomendaram-se novos estudos para ajustar as doses terapêuticas e se advertiu que este tratamento só poderia ser usado como uma alternativa quando não existissem outros fármacos para o tratamento nos casos graves de TB-MDR (DONALD *et al.*, 2001).

Estudos multicêntricos mais recentes avaliaram e compararam a eficácia e segurança do tratamento endovenoso com meropenem/clavulanato (TIBERI, PAYEN, *et al.*, 2016) e imipenem/clavulanato em pacientes com TB pulmonar MDR e XDR (TIBERI, SOTGIU, *et al.*, 2016). Em geral a combinação meropenem/clavulanato é mais efetiva do que imipenem/clavulanato para o tratamento da TB causada por cepas resistentes e adicionalmente, recomenda-se o seu uso em combinação com amoxicilina/clavulanato em casos de doença severa (TIBERI, SOTGIU, *et al.*, 2016). Atualmente não existem estudos clínicos publicados que avaliem o uso de faropenem no tratamento de TB; mas alguns grupos têm colocado esforços em aplicar diversas estratégias baseadas em simulações de Monte Carlo (SRIVASTAVA *et al.*, 2016) ou *Hollow fiber system* (DESHPANDE *et al.*, 2016) para calcular a dosagem requerida de faropenem em casos pediátricos de TB disseminada. A Organização Mundial da Saúde inclui dentro de seus guias mais recentes para o tratamento de TB resistente o uso de imipenem/cilastina, meropenem ou amoxicilina/clavulanato por via endovenosa para os casos em que não seja possível usar outros fármacos (FALZON *et al.*, 2017).

1.11 DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS BASEADO EM TRIAGEM DE FRAGMENTOS

O desenvolvimento de fármacos baseado em triagem de fragmentos ou FBDD (da sigla do inglês *Fragment Based Drug Discovery*) (JENCKS, 1981) consiste na triagem de compostos de baixo peso molecular e baixa afinidade contra macromoléculas, geralmente proteínas, de importância biomédica. Esses fragmentos atuam como pontos de partida para o crescimento e otimização dos novos fármacos. Nos últimos anos, FBDD tem gerado 30 compostos de alta afinidade como candidatos a fármacos, principalmente para doenças crônicas não transmissíveis, sendo que dois já foram aprovados pela *U.S Food and Drug Administration* (FDA) e vários outros estão em fases finais de testes clínicos (ERLANSON *et al.*, 2016).

FBDD difere da triagem automatizada em larga escala ou HTS (da sigla do inglês *High Throughput Screening*), em vários aspectos: A diversidade de grupos funcionais que podem ser testados relacionados com o universo químico é maior para os fragmentos, o que proporciona uma maior frequência de acertos (*hits*). Portanto, quanto mais complexos são os compostos, a probabilidade de identificar as interações relevantes diminui consideravelmente para uma determinada biblioteca (HANN *et al.*, 2001). Como consequência da maior diversidade química e número de *hits*, as bibliotecas de fragmentos são de pequeno tamanho ($\sim 10^3$ compostos) comparadas com as bibliotecas usadas para HTS ($\sim 10^6$ compostos). Isso proporciona uma diminuição drástica de custos, o que possibilita as universidades ter condições de aplicar esta estratégia dentro de suas linhas de pesquisa (CHILINGARYAN *et al.*, 2012).

Os fragmentos tendem a ter baixa afinidade pelos seus alvos, portanto, as técnicas usadas para estudar as interações devem ser suficientemente sensíveis para detectar compostos com K_D na faixa de mM ou elevado μM . Esta baixa afinidade em parte é causada pela barreira entrópica de corpo rígido do composto que deve ser superada e que é estimada em aproximadamente 15-20 kJ/mol (três ordens de magnitude em K_D) a 25°C (MURRAY e VERDONK, 2002). Este efeito é independente do peso molecular, portanto os fragmentos devem superar esta barreira formando interações de alta qualidade (interações energeticamente favoráveis que supere o custo entrópico da interação). Desta maneira, os

fragmentos geralmente apresentam melhores valores de eficiência de ligação (LE) do que os *hits* obtidos por HTS (HOPKINS *et al.*, 2004).

Durante a triagem de fragmentos usa-se uma série de técnicas biofísicas e/ou *in silico* que combinadas permitem selecionar aqueles compostos com interações de alta qualidade. A triagem inicial da biblioteca pode ser realizada por fluorimetria de varredura diferencial (DSF) que permite identificar *hits* em larga escala e um curto tempo (KRANZ e SCHALK-HIHI, 2011). Posteriormente, estes *hits* podem ser validados por *Saturation-Transfer Difference - Nuclear Magnetic Resonance* (STD-NMR) (VENKITAKRISHNAN *et al.*, 2012) e finalmente as interações podem ser caracterizadas por calorimetria de titulação isotérmica (ITC) (GESCHWINDNER *et al.*, 2015), cristalografia de raios X (SCHIEBEL *et al.*, 2016) ou outras técnicas.

Utilizando um raciocínio similar ao feito por LIPINSKI, 2004, para os fármacos com biodisponibilidade oral, CONGREVE *et al* 2003, analisaram um grupo de *hits* de fragmentos obtidos contra diferentes alvos e foi proposta a chamada regra dos três (RO3) “*rule of three*”. A maior proporção desses *hits* apresentou massa molecular < 300 Da, o logaritmo calculado do coeficiente de partição entre octanol e água (cLogP) < 3, e número de átomos doadores e aceptores de hidrogênio ≤ 3 (CONGREVE *et al.*, 2003). As bibliotecas de fragmentos geralmente são criadas baseados na RO3 e a diversidade de grupos químicos, excluindo aqueles grupos reativos e potencialmente tóxicos que são indesejados para os futuros líderes a fármacos (WILDE e LINK, 2013).

Outro requerimento para FBDD é que os alvos sejam cristalizáveis e que esses cristais permitam à determinação de estruturas a alta resolução. Preferencialmente, os cristais devem ser robustos, estáveis para os experimentos de absorção de ligantes “*soaking*” e devem difratar com uma resolução mais alta que 2,5 Å para a identificação dos fragmentos sem ambiguidades. Durante a triagem de fragmentos, os cristais podem ser expostos a uma mistura (“*cocktail*”) de fragmentos, geralmente 3-10 compostos por cristal, mas a composição dessa mistura deve conter distintas estruturas químicas que permitam diferenciar a densidade eletrônica de cada fragmento (CIULLI e ABELL, 2007).

Em geral, durante as etapas iniciais do desenvolvimento de fármacos, devem-se identificar compostos líderes sob os quais, ainda há necessidade de melhoramento para potenciar a atividade antimicrobiana e reduzir a toxicidade. Os compostos líderes além de ter afinidade pelo alvo devem reunir propriedades físico-

químicas e farmacodinâmicas similares às drogas (“*drug-like*”). As principais propriedades dos fármacos com alta biodisponibilidade oral baseia-se atualmente na regra dos cinco (“*rule of five*”) descrita por LIPINSKI, 2004. Essas características consistem em: Massa molecular < 500 Da; cLogP < 5; número de átomos doadores de hidrogênio ≤ 5; número de átomos aceptores de hidrogênio ≤ 10.

Para a seleção de líderes podem ser utilizados alguns indicadores, como por exemplo, a eficiência de ligação (LE) do inglês *Ligand efficiency*, definido por: $\Delta g = \Delta G / NHA$; onde Δg é a eficiência de ligação e ΔG a energia livre de ligação em kcal/mol e NHA é o número de átomos diferentes de hidrogênio. Usando este indicador, o valor de LE esperado para selecionar um potencial líder deveria ser superior a 0,3 (HOPKINS *et al.*, 2004).

Além da LE, KESERÜ e MAKARA, 2009 recomendam o uso do LELP do inglês (*Ligand Efficiency Lipophilic Price*) para a seleção de líderes com biodisponibilidade oral. O LELP considera tanto a lipofilicidade, como a massa molecular dos compostos e é definido por: $LELP = \log P / LE$; sendo $\log P$ o logaritmo do coeficiente de partição entre água e octanol e LE a eficiência de ligação. O valor de LELP esperado para selecionar um potencial líder deveria ser $-10 \leq LELP \leq 10$, sendo que o melhor composto líder será aquele com LELP mais próximo de zero e com sinal positivo.

Estudos comparativos entre LELP e vários outros indicadores, incluindo o LE, demonstraram uma vantagem do LELP devido a sua maior capacidade para discriminar compostos com propriedades farmacocinéticas e de segurança aceitável, do que aqueles que poderiam ser tóxicos e com baixa biodisponibilidade oral. Desta maneira, o LELP teria a capacidade de selecionar melhor os compostos líderes com as características desejadas para serem candidatos a fármacos (KESERÜ e MAKARA, 2009; TARCSAY *et al.*, 2012).

Finalmente, durante a busca de novos fármacos contra TB, os compostos líderes devem cumprir critérios específicos, por exemplo, ter atividade antimicrobiana *in vitro* contra *M. tuberculosis* (H37Rv) definido por MIC < 1 µM em culturas aeróbicas ou < 10 µM em anaerobiose; demonstrar um novo mecanismo de ação aos já conhecidos; ter biodisponibilidade e eficácia oral em um modelo animal de infecção aguda; e não devem ser tóxicos para as células eucariotas (ZUMLA *et al.*, 2013; KATSUNO *et al.*, 2015).

2. JUSTIFICATIVA

A emergência de cepas de *M. tuberculosis* resistentes aos antimicrobianos gerou a necessidade de buscar novas moléculas com diferentes mecanismos de ação para o tratamento da tuberculose. *M. tuberculosis* apresenta um envoltório celular complexo, constituído principalmente por ácidos micólicos, arabinogalactano e PG que são essenciais para sua viabilidade e, portanto, várias das enzimas que regulam a biossíntese do envoltório, são potenciais alvos de inibição farmacológica.

Atualmente sabe-se que o PG de *M. tuberculosis* é rico em ligações peptídicas 3→3 que são catalisadas pelas L,D transpeptidases (Ldts_{Mt}). Algumas dessas Ldts_{Mt} têm demonstrado serem essenciais para a estabilidade do PG e foram validadas como alvos farmacológicos; porém, algumas outras como Ldt_{Mt3} e Ldt_{Mt4} permanecem ainda pouco estudadas.

As Ldts_{Mt} são inibidas irreversivelmente por β-lactâmicos das classes dos carbapenêmicos e penêmicos; embora, os antibióticos β-lactâmicos não foram considerados por muitos anos como opção terapêutica contra a TB, devido a maioria deles serem degradados pela β-lactamase cromossômica de *M. tuberculosis* BlaC (Wang *et al.*, 2006). Tem sido reportado que a combinação de clavulanato, que inibe irreversivelmente BlaC, com os carbapenêmicos (imipenem ou meropenem) ou penêmicos (faropenem), conseguem eliminar *M. tuberculosis* MDR e XDR, ainda em macrófagos infectados (HUGONNET e BLANCHARD, 2007; HUGONNET *et al.*, 2009; DHAR *et al.*, 2015).

Portanto, o uso dos β-lactâmicos, que atingem simultaneamente, as Ldts_{Mt} e as PBP, inibindo respectivamente os processos de transpeptidação 3→3 e 4→3, e bloqueando as etapas finais da biossíntese do PG, pode representar uma alternativa terapêutica para a TB multirresistente. A utilização dos β-lactâmicos disponíveis no mercado diminuiria o tempo que normalmente leva a pesquisa de novos fármacos. Entretanto, o conhecimento dos mecanismos de interação entre estes antibióticos e as Ldts_{Mt} permitirá planejar e otimizar novos β-lactâmicos com maior especificidade, biodisponibilidade e possivelmente maior atividade antimicrobiana.

O conhecimento das estruturas das L,D transpeptidases de *M. tuberculosis* tanto em sua forma apo como em complexo com ligantes, pode aportar ideias sobre sua função além de ser ferramenta chave no desenvolvimento racional de fármacos baseado em estrutura. Lamentavelmente, vários trabalhos referente às estruturas de Ldt_{Mt2} (KUMAR *et al.*, 2017; STEINER *et al.*, 2017) e Ldt_{Mt5} (BRAMMER BASTA *et*

al., 2015) foram publicados durante a execução deste projeto de doutorado, uma vez que entre nossos objetivos estava a caracterização, pela primeira vez, das interações entre Ldt_{Mt2} com diferentes β -lactâmicos, assim como a resolução da primeira estrutura para Ldt_{Mt5}. Porém, como um segundo propósito deste projeto também era a triagem de fragmentos, esse objetivo não foi inviabilizado. Assim, a exploração do espaço químico na busca de inibidores não β -lactâmicos das Ldts_{Mt} através da triagem de fragmentos (FBDD) constitui-se em uma estratégia interessante para a identificação de moléculas estruturalmente diferentes aos β -lactâmicos que possam ser pontos de partida para o desenho racional de novos inibidores contra estas enzimas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Identificar e caracterizar as interações entre L,D- transpeptidases de *M. tuberculosis* com antibióticos β -lactâmicos e fragmentos.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar estruturalmente as L,D-transpeptidases de *Mycobacterium tuberculosis* com ênfase em aquelas que ainda são pouco estudadas (Ldt_{Mt3} e Ldt_{Mt4}).
- Conhecer o mecanismo de interação entre as L,D-transpeptidases de *M. tuberculosis* e os antibióticos β - lactâmicos.
- Identificar fragmentos e caracterizar suas interações com as L,D-transpeptidases de *M. tuberculosis* que possam ser ponto de partida no desenvolvimento de novos inibidores para esta classe de enzimas

4. MATERIAL E MÉTODOS

A maior parte dos experimentos apresentados neste trabalho foram executados pelo autor no Laboratório de Biologia Estrutural Aplicada (LBEA) do Departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo. Na seção correspondente a cada técnica se dará crédito às pessoas e instituições que colaboraram com procedimentos específicos.

4.1. Compostos químicos

4.1.1 Antibióticos

Os dez antibióticos β -lactâmicos usados neste estudo pertencem a quatro classes de β -lactâmicos (Fig. 9): Penicilinas (ampicilina e carbenicilina) Sigma-Aldrich; cefalosporinas (cefalexina e ceftazidima) Sigma-Aldrich; penêmicos (faropenem) AKSci; e carbapenêmicos (biapenem e doripenem) AKSci, (ertapenem) Melford, (meropenem) TOKU-E e (imipenem) OXCHEM.

4.1.2 Fragmentos

Um total de 365 fragmentos, que cumpriam com a regra dos três (RO3) (Congreve *et al.*, 2003) e que fazem parte da biblioteca de fragmentos do Laboratório de Biologia Estrutural Aplicada (LBEA) da Universidade de São Paulo, foram testados contra as L,D-transpeptidases. Estes químicos foram adquiridos comercialmente das empresas AKScientific, Enamime e Sigma-Aldrich para serem testados em qualquer tipo de alvo farmacológico. Todos os fragmentos permaneceram estocados a -20°C a concentrações entre 500 e 250 mM em DMSO de acordo com a solubilidade. Foram preparadas alíquotas de trabalho para minimizar o deterioro no processo repetido de congelamento-descongelamento.

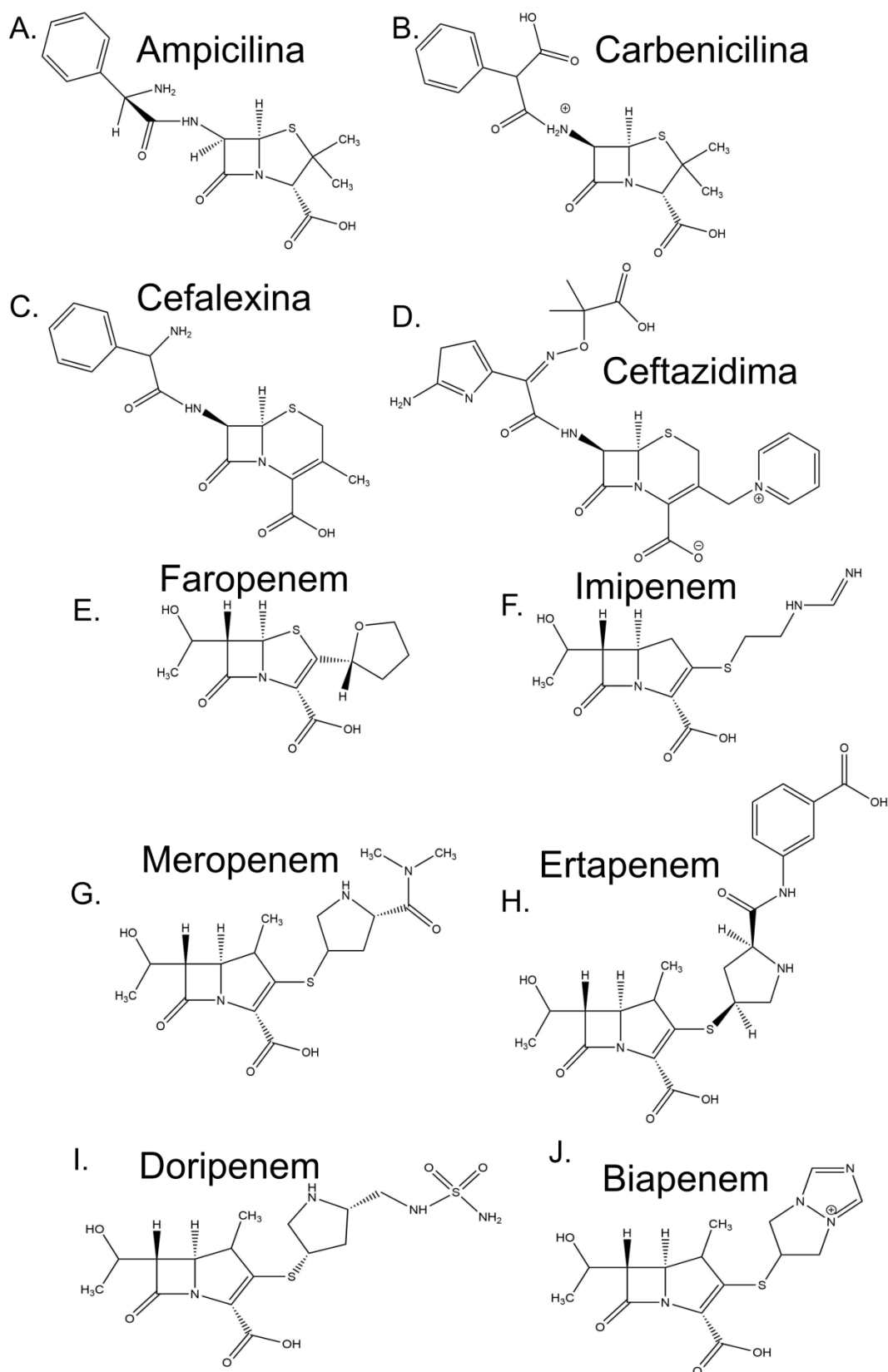


Figura 9. Estrutura química dos β -lactâmicos usados no estudo. Penicilinas (a) Ampicilina e (b) Carbenicilina; Cefalosporinas (c) Cefalexina e (d) Ceftazidima; Penêmicos (e) Faropenem; e, Carbapenêmicos (f) Imipenem, (g) Meropenem, (h) Ertapenem, (i) Doripenem, e (j) Biapenem. As estruturas foram desenhadas com ChemDraw of PelkinElmer Informatics.

4.2 Clonagem de L,D-transpeptidases de *Mycobacterium tuberculosis*.

Os fragmentos gênicos que codificam pelas cinco Ldts_{Mt} foram amplificados por PCR a partir de DNA genômico de *M. tuberculosis* H37Rv (cedido pelo Prof. Fernando Pavan da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, Araraquara) usando Q5 DNA polimerase de alta fidelidade 0,02 U/μL (NEB), Q5 buffer (1X) com potenciador para regiões ricas em GC (1X), mistura dos quatro dNTPs 200 μM e 0,5 μM de cada iniciador (Tabela 2). As condições da PCR incluíram um ciclo de 95°C por 3 min, seguido de 30 ciclos de 95°C por 45 s, 65°C por 1 min, 72°C por 1,5 min e um ciclo de extensão final de 72°C por 7 min. A amplificação dos insertos foi conferida por eletroforese em gel de agarose 2% (m/v), sob tensão de 7 V/cm por 45 min.

Tabela 2. Oligonucleotídeos usados na amplificação dos genes para Ldts_{Mt}

Gene	Construção	Iniciador (5' - 3')	Sítio de restrição	Referência
Rv0110c	Ldt _{Mt1} Δ31 (P32-G251)	TTCATATGCGCCACTCCAACCGATCCCA	NdeI	(CORREALE et al., 2013)
		CCCAAGCTTACTAGCCGACCACCTCAATG GGA	HindIII	
Rv2518c	Ldt _{Mt2} Δ119 (Y120-A408)	CTTCATATGAACAGGCGCTACACGCTGAA C	NdeI	(ERDEMLI et al., 2012)
		CTTAAGCTTTTACGCCTTGGCGTTACCGG	HindIII	
Rv1433	Ldt _{Mt3} Δ31 (Q32-E271)	CGCCATATGCAGTCTTACGGGTTCGCCG T	NdeI	(CORDILLOT et al., 2013)
		CGCCTCGAGCTATTCTGCACAATGACC G	XhoI	
Rv0192	Ldt _{Mt4} (M1-I366)	CGCCATATGCCCACTGGGCTGAAGAAC G	NdeI	(CORDILLOT et al., 2013)
		ATTCTCGAGTTAGATCTGCCAGTCCTGGG CA	XhoI	
Rv0483	Ldt _{Mt5} Δ49 (A50-G451)	CGCCATATG GCCGGCAAAGTGACCAAGCT	NdeI	(CORDILLOT et al., 2013)
		CGCCTCGAGTTACCCACCCGGTCCGTTA G	XhoI	

Os produtos de PCR foram clonados inicialmente no vetor pJET 1.2/blunt do kit Clone Jet PCR cloning (Thermo Scientific) e transformados em *E. coli* DH5α (Invitrogen). Posteriormente, os plasmídeos foram extraídos e purificados com o kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific) e os insertos digeridos por mais de 6h a 37°C com as respectivas enzimas de restrição seguindo as instruções do fabricante (New England Biolabs, NEB). A presença dos insertos foi analisada por eletroforese em gel de agarose 2%. Posteriormente os fragmentos gênicos de interesse foram extraídos com o kit PCR clean-up Gel extraction (Macherey-Nagel) e

ligados em plasmídeos pET20b(+) e pET28a(+) (Novagen) previamente digeridos e desfosforilados por fosfatase alcalina (NEB). Para a reação de ligação, foi utilizada T4 ligase (NEB) suplementada com ATP e uma relação inserto-vetor de 5:1 ou 10:1. As reações foram incubadas a 16°C durante 18h. Os vetores pET usados neste estudo codificam por uma cauda de seis histidinas carboxi [pET20b(+)] e amino terminal [pET28a(+)]. Todas as construções foram enviadas para sequenciamento pelo método Sanger ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

4.3 Produção de L,D-transpeptidases recombinantes

Os plasmídeos que continham os insertos foram transformados nas cepas de *Escherichia coli* BL-21(DE3) (NEB), *E. coli* BL-21(DE3)/pGro7 (Takara Bio Inc.) ou *E. coli* BL-21(DE3)/Rosetta (Novagen) (Tabela 3). Aproximadamente 50-100 ng/μL dos plasmídeos foram incubados com 50 μL de células quimicamente competentes durante 20 min no gelo. Posteriormente foi realizado choque térmico a 42°C ± 1 °C por 45s seguida de uma nova incubação no gelo por 3 min. A cada tubo se adicionaram 200 μL de caldo Lysogeny Broth-Miller (LB) e as células foram incubadas a 37°C ± 1°C por 1 h e 200 rpm. As suspensões celulares foram centrifugadas a 47 g por 8 min e os precipitados plaqueados na superfície de ágar LB com ampicilina (100 μg/mL), canamicina (50 μg/mL) ou cloranfenicol (33 μg/mL) para a seleção de colônias. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37°C ± 1 °C por 18h e as colônias que continham os plasmídeos foram conferidas por PCR e criopreservadas a -80°C em caldo LB com glicerol 30% v/v. Para algumas construções realizaram-se testes de expressão a 37°C e 18°C durante quatro e 18 horas respectivamente, e com a indução com 0,5 mM de Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG).

Uma vez que foram padronizadas as condições para a produção de cada proteína, fizeram-se culturas em 4 litros de caldo LB com antibiótico e se incubaram a 37°C ± 1°C a 200 rpm até obter-se uma OD₆₀₀ de ~0,8-0,9. Posteriormente, a cultura foi induzida com IPTG (0,1 a 0,5 mM) e continuou-se com a incubação por mais 18h a 18°C ± 1°C. As células foram coletadas por centrifugação a 7500 g por 15 min a 4°C, congeladas rapidamente em nitrogênio líquido e criopreservadas a -80°C. A tabela 4 resume as condições de produção e alguns parâmetros físico-químicos para as cinco L,D-transpeptidases de *M. tuberculosis*.

Tabela 3. Características das cepas de *Escherichia coli* utilizadas neste estudo

Cepa de <i>E. coli</i>	Genótipo	Características	Aplicações	Referência
DH-5 α	F ⁻ Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ(<i>lacZ</i> Y ^A - <i>argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK ⁻ ,mK ⁺) <i>phoA supE44</i> λ - <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Mutações em <i>endA1</i> e <i>recA1</i> conferem baixa degradação do inserto e de recombinação homóloga.	Clonagem	(HANAHAN, 1983)
BL21 (DE3)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal</i> (λ DE3) [<i>dcm</i>] Δ <i>hsdS</i> λ DE3 = λ <i>sBamHlo</i> Δ <i>EcoRI-B int::</i> (<i>lacI::PlacUV5::T7 gene1</i>) <i>i21</i> Δ <i>nin5</i>	Expressa o gene T7 RNA polimerase sob o controle do promotor <i>lacUV5</i> . Induzido por IPTG.	Produção heteróloga de proteínas	(STUDIER e MOFFATT, 1986)
BL21 (DE3) / pGro7	<i>E. coli</i> BL21: F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> .	Expressa as chaperonas <i>groES-groEL</i> sob o controle do promotor <i>araB</i> . Induzido por L-Arabinose. Resistência a cloranfenicol.	Produção heteróloga de proteínas	(NISHIHARA <i>et al.</i> , 1998)
BL21 (DE3) / Rosetta	<i>E. coli</i> BL21: F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> .	Contém o plasmídeo pRARE que expressa tRNAs para os códons AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, e GGA. Resistência a cloranfenicol.	Produção heteróloga de proteínas.	(NOVY <i>et al.</i> , 2001)

Tabela 4. Condições de produção e características físico-químicas das Ldt_{MT}

Construção	Condições de produção padronizadas	Número de resíduos	Tamanho (kDa)	Coefficiente de extinção (M ⁻¹ cm ⁻¹)	PI teórico
Ldt _{MT1} Δ31	<i>E. coli</i> BL21(DE3)/Rosetta. LB(Amp+Clo), 18°C $\pm$ 1°C, 18h, IPTG 0,1mM	220	26,9	41940	7,6
Ldt _{MT2} Δ119	<i>E. coli</i> BL21(DE3). LB (Can), 18°C $\pm$ 1°C, 18h, IPTG 0,5mM	289	31,0	65890	5,4
Ldt _{MT3} Δ31	<i>E. coli</i> BL21(DE3). LB (Can), 18°C $\pm$ 1°C, 18h, IPTG 0,5mM	240	25,7	39420	5,0
Ldt _{MT4}	Não determinado	366	38,9	56170	6,7
Ldt _{MT5} Δ49	<i>E. coli</i> BL21(DE3). LB (Can), 18°C $\pm$ 1°C, 18h, IPTG 0,5mM	402	42,7	78965	5,2

4.4 Purificação de L,D-transpeptidases recombinantes

As células foram descongeladas e ressuspensas em tampão de lise (NaH_2PO_4 25 mM pH 7,0, NaCl 300 mM, glicerol 5% (v/v); Fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 5 μM , Lisozioma 5 $\mu\text{g/mL}$ e DNase 5 $\mu\text{g/mL}$), posteriormente as bactérias foram lisadas por sonicação usando 12-15 ciclos com 30% de amplitude e 30 s de intervalos *on* e *off*. A fração solúvel foi extraída por centrifugação a 33250 *g* a 4°C durante 1h e posteriormente os sobrenadantes filtrados em membranas de 0,45 μM .

Uma vez que todas as Ldt_{MT} recombinantes expressavam uma cauda de seis histidinas, estas foram purificadas por cromatografia de afinidade (AF) por íons níquel imobilizados, seguida de uma etapa de cromatografia por exclusão molecular (SEC). Os sobrenadantes aplicaram-se a um fluxo de 1 mL/min na coluna Ni-NTA Hi-Trap HP de 5 mL (GE Healthcare) previamente equilibrada com 5 volumes de coluna (CV) de tampão A (NaH_2PO_4 25 mM pH 7,0, NaCl 150 mM, glicerol 5% (v/v), imidazol 10mM). As proteínas eluídas com gradiente linear de 0 a 100% de imidazol no tampão B (NaH_2PO_4 25 mM, pH 7,0, NaCl 150 mM, glicerol 5% (v/v), imidazol 500mM). As frações que continham as proteínas foram coletadas e concentradas por centrifugação a 2355 *g* a 4°C em filtros Amicon 10K (Merck-Millipore). Realizou-se uma etapa final de purificação por SEC usando uma coluna Superdex 200 16/60 (GE Healthcare) previamente equilibrada com um CV de tampão de acordo com o propósito do experimento final como representado na tabela 5.

Tabela 5. Composição dos tampões para a purificação das Ldt_{MT} recombinantes por SEC

Propósito	Proteína	Tampão
Cristalografia	Ldt _{MT2}	Tris-HCl 25 mM pH 8,0, NaCl 150 mM
	Ldt _{MT3}	Ácido cítrico/citrato de sódio 100mM pH 5,5, NaCl 150 mM, glicerol 5% (v/v)
	Ldt _{MT5}	
Ensaio calorimétricos	Ldt _{MT2}	NaH ₂ PO ₄ 100 mM pH 7,0, NaCl 150 mM
	Ldt _{MT3}	NaH ₂ PO ₄ 100 mM pH 7,0, NaCl 150 mM NaH ₂ PO ₄ 100 mM pH 6,0, NaCl 150 mM
	Ldt _{MT5}	
Termoforese em microescala	Ldt _{MT2}	NaH ₂ PO ₄ 50 mM pH 7,8, NaCl 150 mM, 5% glicerol.
	Ldt _{MT3}	
	Ldt _{MT5}	

As cromatografias realizaram-se a um fluxo entre 0,5 e 1,0 mL/min e finalmente as frações de interesse foram concentradas entre 10 a 20 mg/mL. Para a determinação da concentração das proteínas, determinou-se A_{280} utilizando um equipamento BioDrop μ Lite. As amostras foram congeladas rapidamente em nitrogênio líquido e criopreservadas a -80°C até seu uso. Durante todos os passos da purificação, a pureza das proteínas foi verificada por eletroforese em gel de SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie.

4.5 Cristalização de L,D- transpeptidases de *M. tuberculosis*

Ldt_{Mt3} e Ldt_{Mt5} com concentrações entre 10-20 mg/mL foram inicialmente testadas para cristalização pelo método de difusão de vapor e gota sentada (*Sitting drop*) utilizando os kits JBS Classic, Basic e JSCG++ (Jena Bioscience). Os ensaios de cristalização foram realizados com o robô Oryx6 (Douglas Instruments) em placas de 96 x 3 poços Swissci (Hampton Research) e gotas de 0,6 μL a uma proporção 1:1 de proteína e precipitante e 30 μL de reservatório. As placas foram incubadas a temperatura controlada de 18°C e revisadas diariamente durante a primeira semana e posteriormente com uma frequência semanal usando um microscópio estereoscópio Leica M125 adaptado com a câmara digital Leica IC80 HD. Os cristais destas Ldts_{Mt} foram otimizados manualmente através do método de difusão de vapor e gota suspensa (*hanging drop*) variando as proporções de proteína e precipitante em 400 μL de solução de reservatório. Para obtenção de cristais da Ldt_{Mt3} foi utilizada ainda a técnica de *micro-seeding*. Para isto, os cristais foram quebrados com microesferas de vidro em um tubo de 1,5 mL (Hampton Research) e convertidos em partículas cristalinas. Posteriormente, realizaram-se diluições logarítmicas do estoque de *seeding* na faixa de 10^{-1} até 10^{-11} utilizando a própria solução de reservatório. Realizaram-se gotas variando as proporções de proteína e precipitante e adicionando 0,5 μL de cada uma das diluições de *seeding*. Assim, foi determinada experimentalmente a diluição que produzia o número ótimo de pontos de nucleação.

A cristalização e otimização dos cristais de Ldt_{Mt2} foi realizada manualmente a partir de uma das condições já reportadas para esta enzima (Böth *et al.*, 2013), utilizando o método de difusão de vapor e gota suspensa como se descreveu acima.

4.6 Co-cristalização e absorção (*soaking*) de ligantes

As proteínas com concentrações entre 10-20 mg/mL foram incubadas por 2 h a 4°C em presença de antibióticos β -lactâmicos (1- 20 mM) ou fragmentos (10-50 mM). Posteriormente, foram cristalizadas usando as mesmas condições estabelecidas para as proteínas sem ligantes. Para os ensaios de *soaking*, adicionou-se 1 μ L de cada estoque de ligante (500-250 mM) sobre as gotas que continham os cristais e foram incubadas durante as 24 horas prévias à coleta. Devido à baixa afinidade esperada para os fragmentos, os ensaios de co-cristalização foram realizados pré-incubando a proteína durante 24 h com os diferentes fragmentos a 40 mM e depois realizou-se a cristalização usando as mesmas condições da proteína sem ligante.

4.7 Difração de raios X e determinação de estruturas cristalográficas

A coleta dos dados de difração de raios X foi realizada a -173°C com comprimento de onda de 1,458 Å e 1,00 Å nas linha MX2 do Síncrotron LNLS, Campinas, Brasil (GUIMARÃES *et al.*, 2009) ou P13 do PETRAIII, Hamburgo, Alemanha (CIANCI *et al.*, 2017), respectivamente. Inicialmente todos os cristais foram testados para verificar sua difração, condição criogênica e estabelecer a estratégia de coleta. Assim, os cristais de Ldt_{Mt2} Ldt_{Mt3e} Ldt_{Mt5} foram coletados usando solução criogênica de glicerol 30% (v/v); PEG400 30% (v/v) e polietilenglicol 30% (v/v), respectivamente. Em geral foram coletadas entre 1200 a 1800 imagens por cristal com tempo de exposição de 1-2 s e ângulo de rotação de 0,2°. Os dados foram analisados e processados através do programa XDS (KABSCH, 2010) e as reflexões foram escalonadas através do Aimless (EVANS e MURSHUDOV, 2013) presente no pacote de programa CCP4 (BAILEY, 1994). As fases foram obtidas por substituição molecular através do Phaser (MCCOY *et al.*, 2007) utilizando como modelos iniciais as entradas do PDB: 3TUR para Ldt_{Mt2}, 4K73 para Ldt_{Mt3} e 5DU7 para Ldt_{Mt5}. O limite de resolução foi determinado baseado em $I/\sigma \geq 2,0$. O refinamento e as inspeções visuais dos modelos foram realizados com Refmac V. 5.0.32 (MURSHUDOV *et al.*, 1997) e Coot (EMSLEY *et al.*, 2010) usando mapas de densidade eletrônica $2Fo-Fc$, respectivamente. As figuras foram preparadas com Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.)

4.8 Fluorimetria de varredura diferencial (DSF)

A Fluorimetria de varredura diferencial (DSF) permite avaliar o desenovelamento térmico de uma proteína através da medida da fluorescência emitida pelo fluoróforo *Sypro Orange* quando entra em contato com as regiões hidrofóbicas da proteína. O incremento sucessivo da temperatura expõe regiões hidrofóbicas, que leva ao aumento da fluorescência que atinge um máximo após o completo desenovelamento da proteína (NIESSEN *et al.*, 2007). A partir destas medidas de fluorescência pode-se determinar a T_m da proteína e a variação deste parâmetro (deslocamento térmico) na presença de diferentes tampões, aditivos ou ligantes (ΔT_m).

Neste trabalho, foram realizados experimentos de DSF com dois propósitos: Primeiro, as proteínas foram testadas contra um conjunto de 95 tampões e aditivos para determinar as melhores condições de estabilização e aumentar a probabilidade de cristalização de acordo com variações em pH (ácido, neutro e básico), tipo de sal (NaCl ou KCl) e agente estabilizante (Glicerol). Estes experimentos foram realizados em placas de 96 poços (Bio-Rad) que continham cada enzima a uma concentração de 10 μ M, SYPRO Orange 5X (Life Science) e os tampões testados de acordo com as condições apresentadas na figura 10.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Tampão	Água	Citrato Sod. pH 4,0	Acetato Sod. pH 4,5	Citrato Sod. pH 5,0	Citrato Sod. pH 5,5	Bis-tris pH 6,0	MES pH 6,2	Fosfato Sod. pH 6,1	Bis-tris propano pH 6,5	ADA pH 6,5	MES pH 6,7	Fosfato Sod. pH 7,0
B	Tampão	MOPS pH 7,0	HEPES pH 7,0	HEPES pH 7,5	Tris pH 7,5	HEPES pH 8,0	Tris pH 8,0	BICINE pH 8,0	Tris pH 8,5	Imidazol pH 9,0	CHES pH 9,0	CHES pH 9,5	CHES pH 10,0
C	Tampão		Citrato Sod. pH 4,0	Acetato Sod. pH 4,5	Citrato Sod. pH 5,0	Citrato Sod. pH 5,5	Bis-tris pH 6,0	MES pH 6,2	Fosfato Sod. pH 6,1	Bis-tris propano pH 6,5	ADA pH 6,5	MES pH 6,7	Fosfato Sod. pH 7,0
	Sal	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl
D	Tampão	MOPS pH 7,0	HEPES pH 7,0	HEPES pH 7,5	Tris pH 7,5	HEPES pH 8,0	Tris pH 8,0	BICINE pH 8,0	Tris pH 8,5	Imidazol pH 9,0	CHES pH 9,0	CHES pH 9,5	CHES pH 10,0
	Sal	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl
E	Tampão		Citrato Sod. pH 4,0	Acetato Sod. pH 4,5	Citrato Sod. pH 5,0	Citrato Sod. pH 5,5	Bis-tris pH 6,0	MES pH 6,2	Fosfato Sod. pH 6,1	Bis-tris propano pH 6,5	ADA pH 6,5	MES pH 6,7	Fosfato Sod. pH 7,0
	Sal	KCl	KCl	KCl	KCl	KCl	KCl	KCl	KCl	KCl	KCl	KCl	KCl
F	Tampão	MOPS pH 7,0	HEPES pH 7,0	HEPES pH 7,5	Tris pH 7,5	HEPES pH 8,0	Tris pH 8,0	BICINE pH 8,0	Tris pH 8,5	Imidazol pH 9,0	CHES pH 9,0	CHES pH 9,5	CHES pH 10,0
	Sal	KCl	KCl	KCl	KCl	KCl	KCl	KCl	KCl	KCl	KCl	KCl	KCl
G	Tampão		Citrato Sod. pH 4,0	Acetato Sod. pH 4,5	Citrato Sod. pH 5,0	Citrato Sod. pH 5,5	Bis-tris pH 6,0	MES pH 6,2	Fosfato Sod. pH 6,1	Bis-tris propano pH 6,5	ADA pH 6,5	MES pH 6,7	Fosfato Sod. pH 7,0
	Aditivo	Glicerol	Glicerol	Glicerol	Glicerol	Glicerol	Glicerol	Glicerol	Glicerol	Glicerol	Glicerol	Glicerol	Glicerol
H	Tampão	MOPS pH 7,0	HEPES pH 7,0	HEPES pH 7,5	Tris pH 7,5	HEPES pH 8,0	Tris pH 8,0	BICINE pH 8,0	Tris pH 8,5	Imidazol pH 9,0	CHES pH 9,0	CHES pH 9,5	CHES pH 10,0
	Aditivo	Glicerol	Glicerol	Glicerol	Glicerol	Glicerol	Glicerol	Glicerol	Glicerol	Glicerol	Glicerol	Glicerol	Glicerol

Figura 10. Esquema da placa de 96 poços com os tampões usados nos ensaios de DSF. As cores representam as faixas de pH ácido (cinza), neutro (azul) e básico (verde) de cada um dos tampões usados no DSF. As concentrações finais dos tampões testados foram: Tampões 100 mM, NaCl ou KCl 150 mM, glicerol 5% (v/v) em um volume final de 25 μ L.

Em segundo lugar, o DSF foi utilizado para determinar as interações das Ldts_{Mt} com ligantes através da determinação do deslocamento térmico induzido pelos ligantes e posteriormente o cálculo do ΔT_m . As proteínas (Ldt_{Mt3} e Ldt_{Mt5}) a 10 μ M foram testadas contra dez β -lactâmicos (5 mM) por triplicata e (Ldt_{Mt2}, Ldt_{Mt3} e Ldt_{Mt5}) a 10 μ M testadas contra a biblioteca de fragmentos (5-8 mM concentração final) em um volume final de 25 μ L. Para os casos em que o ligante estava dissolvido em DMSO, um volume igual de DMSO foi adicionado na proteína alcançando uma concentração final de 8% de DMSO. Finalmente calcularam-se os valores de T_m para cada proteína na ausência e presença de DMSO, assim como na presença dos ligantes. Em todos os experimentos foi utilizada a canamicina como um controle negativo de não interação.

Os ensaios de DSF foram realizados em um termociclador em tempo real (Bio-Rad CFX connect) adaptado com filtros de excitação/emissão entre 450 a 580 nm, uma faixa de temperatura entre 25°C a 95°C e com uma taxa de incremento de 0,5°C/min e 10 s de repouso. Os valores de T_m foram determinados com o programa Bio-Rad CFX Manager usando a primeira derivada da fluorescência vs. temperatura $[-d(RFU)/dT]$. A temperatura de desenovelamento das proteínas em ausência de qualquer ligantes (T_{mRef}) foi subtraído dos valores na presença de ligantes com o propósito de obter os ΔT_m ($\Delta T_m = T_{mLig} - T_{mRef}$). O critério de interação para os β -lactâmicos foi estabelecido como um incremento ou diminuição de três desvios padrões (3σ) em relação de T_{mRef} . Para a seleção dos fragmentos, foram considerados como *hits* somente aqueles que incrementaram o ΔT_m como uma ordem de magnitude de 3σ em relação a T_{mRef} . Este ponto de corte foi selecionado por representar o mínimo erro possível na seleção dos ligantes.

4.9 Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

A afinidade e os mecanismos termodinâmicos de interação entre Ldt_{Mt3} com os β -lactâmicos foram estudados por Calorimetria de titulação isotérmica (ITC) (Chaires, 2008) usando um microcalorímetro (iTC200, Microcal) a 24°C. 100 μ M de Ldt_{Mt3} em tampão constituído de NaH₂PO₄ 100 mM, NaCl 150 mM pH 7,0 na cela, foram titulados contra 1-1,5 mM de β -lactâmicos na seringa. As titulações foram realizadas com 18 injeções de 2,0 μ L de ligante a 320 s de espaçamento e 400 rpm de agitação. Os calores devido à agitação e diluição foram obtidos através de experimentos de água contra água e ligante contra tampões, respectivamente e

posteriormente subtraídos dos dados sem tratar. Os dados foram processados com Origin 7.0 (Microcal iTC200 software) usando o modelo de união de um sítio (*one-set-of-sites*). As equações $\Delta G = RT \ln K_d$ e $\Delta G = \Delta H - T \Delta S$, foram usadas para o cálculo da energia livre de ligação e de entropia, respectivamente.

As titulações de Ldt_{Mt5} foram realizadas usando 150 μ M de proteína no tampão de NaH₂PO₄ 100 mM, NaCl 150 mM pH 6,0 e pH 7,0 e temperaturas de 24°C, 15°C e 35°C. As concentrações dos antibióticos variaram entre 5-10 mM. As titulações para Ldt_{Mt2} não foram realizadas devido que esta enzima já foi amplamente estudada por calorimetria em presença de diferentes β -lactâmicos (ERDEMLI *et al.*, 2012; BIANCHET *et al.*, 2017; KUMAR *et al.*, 2017). Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Fluídos Complexos do Departamento de Física da Universidade de São Paulo.

4.10 Estudos de *docking*

4.10.1 *Docking* de β -lactâmicos

A estrutura de Ldt_{Mt3} (PDB 6D4K) foi usada para os ensaios de *docking* com cinco carbapenêmicos e faropenem. Realizou-se um protocolo de ajuste induzido *Induced fit docking* (IFD) (SHERMAN *et al.*, 2006), seguido de *docking* covalente, usando a interfase Maestro e programas do *Small Molecule Discovery Suite* (Schrodinger). A proteína foi preparada com o *Protein Preparation Wizard* para determinar a ordem das ligações, eliminar todas as águas, e calcular os estados de protonação dos resíduos com o PropKa (pH 7.0). Os β -lactâmicos foram preparados com *LigPrep* 3.5 usando o campo de força OPLS3, e o cálculo dos estados de protonação a pH 7,0 $\pm$ 2,0 com Epik 3.3, mantendo as quiralidades dos compostos. O protocolo IFD consistiu em uma rodada inicial de *docking*, seguida pela geração de conformações da proteína e uma rodada final de *docking*. No *docking* inicial, usou-se Glide SP, os raios de van der Waals do receptor e do ligante foram reduzidos para 0,5, permitindo a aproximação entre eles. A Cys246 foi escolhida como o centro da grade e um máximo de 20 poses por ligante foram calculados. As conformações das proteínas foram então geradas com *Prime*, considerando-se flexíveis todos os resíduos dentro de 5 Å das poses dos ligantes. As conformações cuja energia foi de até 30 kcal mol⁻¹ da melhor estrutura e as classificadas nas primeiras 20 poses foram selecionadas para *docking* e a rodada final do IFD foi

realizada com o *Glide SP*. Finalmente, as coordenadas de proteína com a melhor pose para cada ligante (menor *Glide score*) foram selecionadas para acoplamento covalente. Cada ligante foi acoplado covalentemente a Cys246 usando uma caixa ≤ 20 Å, empregando a reação “adição de β -lactâmicos” e o SMARTS “[O-0X1] = [C] 1 [C] [C] [N] 1” para reconhecimento de grupos reagentes. O docking foi realizado no modo “*Pose Prediction (Thorough)*”, empregando um ponto de corte de $2,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ para reter poses para refinamento adicional e um máximo de 200 poses para refinamento. A pontuação foi calculada usando *Glide* e uma pose foi produzida para cada reação. Estes experimentos foram realizados no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Minas Gerais em colaboração com a professora Dra. Rafaela Salgado Ferreira.

4.10.2 Docking de fragmentos

Os experimentos de *docking* com fragmentos foram realizados usando as estruturas de Ldt_{Mt2}, Ldt_{Mt3} (PDB 6D4K) e Ldt_{Mt5} (6D5A). Foi utilizado um protocolo de *docking* rígido da interfase Maestro e os programas do *Small Molecule Discovery Suite* (Schrodinger). As proteínas e os fragmentos foram preparadas com o *Protein Preparation Wizard* e *LigPrep 3.5*, similar ao descrito em 4.10.1. Para o *docking* usaram-se *Glide SP* e *XP*, mantendo os raios de van der Waals entre o receptor e o ligante em 0,8. A Cys246 foi usada como centro de uma caixa ≤ 18 Å e um máximo de 5 e 10 poses por ligante foram calculados para os protocolos *SP* e *XP*, respectivamente. Um valor de $0,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ foi usado como ponto de corte para a rejeição das poses. Finalmente, foram selecionadas as coordenadas da proteína com a melhor pose para cada ligante, ou com o menor *Glide score*, uma medida empírica que estima a energia livre de interação e que tem varios termos, incluindo contribuições de campo de força (eletrostática, van der Waals) e outros que compensam ou penalizam as interações entre o ligante e a proteína. Estes experimentos foram realizados no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Minas Gerais em colaboração com o Pós-doutorando Dr. Saulo Braga sob a supervisão da professora Dra. Rafaela Salgado Ferreira.

4.11 Espectrometria de massas (MS)

Uma alíquota de $2,0 \mu\text{l}$ de Ldt_{Mt3} previamente incubada com $2,5 \text{ mM}$ de cada antibiótico β -lactâmico a 4°C e contendo ácido fórmico a $0,1\%$ foi injetada em uma

C18 (100 μ m x 100 mm) RP-UPLC (nanoAcquity UPLC, Waters) acoplada ao *nano electrospray tandem mass spectrometry* num espectrômetro de massa Q-ToF Premier (MicroMass / Waters) a um fluxo de 600 nl/min. O gradiente foi de 0-90% de acetonitrila em ácido fórmico a 0,1% durante 45 minutos. O instrumento foi operado no modo *continuum* MS e a aquisição de dados foi de m/z 100–2.000 a uma taxa de varredura de 1 s e um atraso entre varreduras de 0,1 s. A voltagem de *nano electrospray* foi ajustada para 3,5kV, uma voltagem de cone de 30V e a temperatura da fonte foi de 80°C. Os espectros foram acumulados ao longo de 300 *scans* e os múltiplos dados carregados produzidos pelo espectrômetro de massa na escala m/z foram convertidos na escala de massa (peso molecular) utilizando o programa baseado em Máxima entropia (FERRIGE *et al.*, 1992) fornecido com o pacote do programa Masslynx 4.1. Os parâmetros de processamento foram: Faixa de massa de saída de 24.000-30.000 Da a uma “resolução” de 0,1 Da/canal; o modelo padrão isotópico simulado foi usado com o parâmetro de *spectrum blur width* definido para 0,2 Da, e as razões de intensidade mínima entre os picos sucessivos foram de 20% (esquerda e direita). O espectro deconvoluído foi suavizado (2x 4 canais, Savitzky-Golay suave), e os valores do centroide de massa foram obtidos usando 80% do topo do pico e uma largura mínima do pico na metade da altura de quatro canais (GUIMARÃES *et al.*, 2011). Estes experimentos foram realizados pelos integrantes da seção de espectrometria de massas do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Campinas, Brasil coordenados pela pesquisadora Dra. Adriana Paes-Leme.

4.12 Termoforese em microescala (MST)

A termoforese em microescala é o movimento direcionado de partículas em um gradiente microscópico de temperatura que proporciona informação sobre mudanças na camada de hidratação de biomoléculas, conformação estrutural ou carga que acontecem depois da interação proteína e ligante. Estes efeitos resultam da modificação do movimento de moléculas pelo gradiente de temperatura, o que serve para a determinação de valores de afinidade de ligações entre os ligantes e as proteínas previamente marcadas com sondas fluorescentes (WIENKEN *et al.*, 2010). O ensaio permite monitorar o sinal de MST de uma proteína ao longo de uma série de diluições do ligante, a fim de obter a afinidade de ligação (K_D). Usando uma ampla gama de concentrações de ligantes (usualmente 12-16 pontos de uma

diluição seriada 1:1, que muda em várias ordens de magnitude) permite determinar concentrações de ligantes nas quais o alvo está não ligado (linha de base), completamente ligado (saturado) e parcialmente ligado. A concentração de ligante na qual o 50% do alvo está ligado representa o K_D da interação.

95 μ L das proteínas (Ldt_{Mt2}, Ldt_{Mt3} e Ldt_{Mt5}), cada uma a 20 μ M, foram misturadas com 5 μ L de sonda Cy5 mono NHS ester (Cat No. PA15101 de GE) e mantidas em refrigeração e agitação durante duas horas protegidas da luz. Esta reação de marcação manteve uma razão molar corante:proteína de aproximadamente 3:1. A sonda que não reagiu foi removida com uma coluna de desalinização equilibrada previamente com tampão (NaH_2PO_4 50 mM pH 7,8, NaCl 150 mM, 5% glicerol). A concentração de proteína marcada foi determinada por espectrofotometria UV/BIS a 650 e 280 nm e posteriormente ajustada entre 40-200 nM com tampão.

Cada fragmento foi dissolvido usando o mesmo tampão e posteriormente foi preparada uma série de 16 diluições 1:1 com tampão, obtendo concentrações de ligante na faixa de 125 nM a 5 mM. Para a medição, cada diluição de ligante foi misturada com um volume igual de proteína marcada, o que levou a uma concentração final de proteína entre 20 -100 nM e concentrações finais de ligante na faixa de 62,5 nM a 2,5 mM. Após 10 minutos de incubação protegido da luz, as amostras foram carregadas nos capilares tratados Standard Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies) e posteriormente, as medições de MST foram realizadas utilizando o equipamento Monolith NT.115 (NanoTemper technologies) a uma temperatura de 25 °C. Os parâmetros do instrumento foram ajustados para %50LED e 20%MST. Quando possível, os dados de duas medições pipetadas independentemente foram analisados no programa (MO.Affinity Analysis software v. 2.2.6, NanoTemper Technologies) utilizando o sinal de um tempo MST-on de 30 s. Estes experimentos foram realizados no Instituto de Física de São Carlos com a colaboração da Pós-doutoranda Dra. Natalia Mesquita sob a supervisão do Prof. Dr. Glaucius Oliva.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Produção e purificação de L,D-transpeptidases de *M. tuberculosis* recombinantes

Com o propósito de estudar estruturalmente as L,D-transpeptidases de *M. tuberculosis*, cada uma das cinco regiões codificantes foram clonadas em vetores pET e posteriormente transformados em *E. coli* BL21(DE3). Três das cinco L,D-transpeptidases (Ldt_{Mt2}, Ldt_{Mt3} e Ldt_{Mt5}) foram expressas e purificadas com rendimentos estimados de 5,0, 2,5 e 6,5 mg por litro de cultura, respectivamente (Fig. 11).

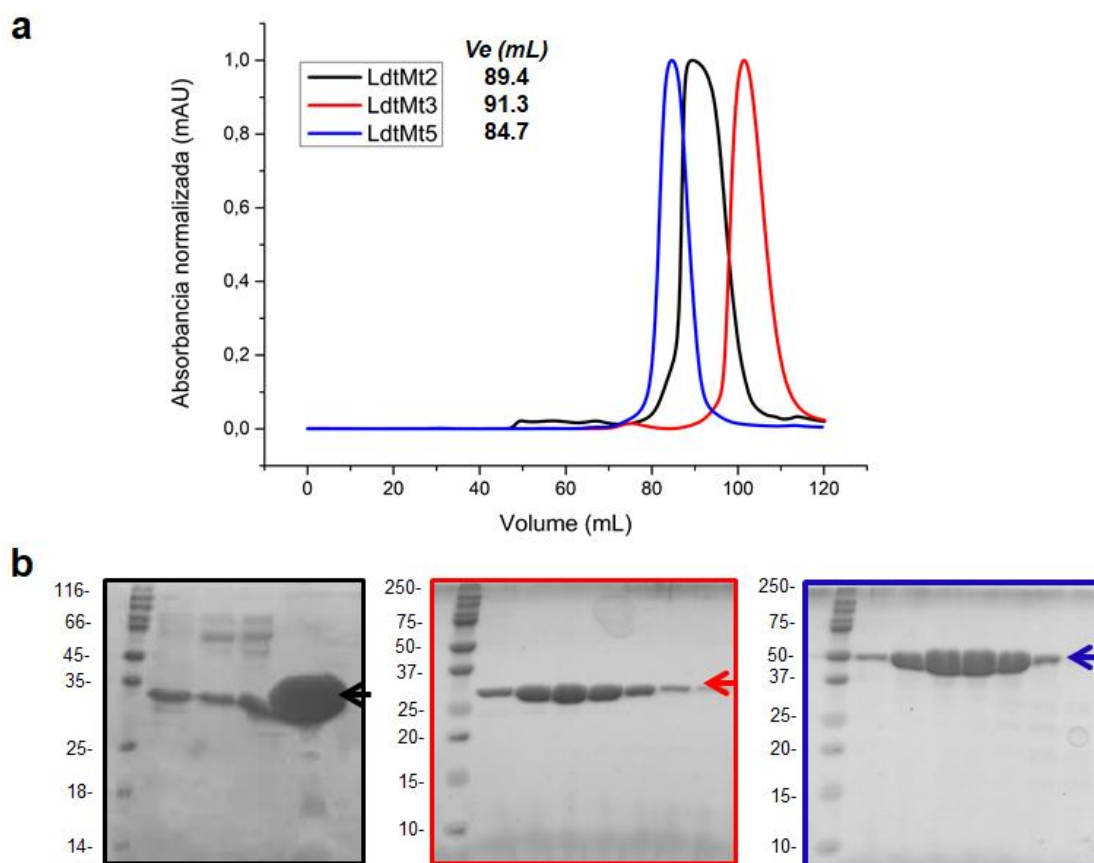


Figura 11. Purificação por cromatografia de exclusão por peso molecular de três Ldts_{Mt}. (a) perfil cromatográfico de Ldt_{Mt2} (linha preta), Ldt_{Mt3} (linha vermelha) e Ldt_{Mt5} (linha azul). O eixo x representa o volume de retenção (mL) e y a absorbância normalizada a 280 nm (mAU). O volume de eluição (Ve) em mL está indicado para cada uma das enzimas analisadas. (b) Géis de SDS/PAGE com frações representativas da cromatografia de exclusão por peso molecular de Ldt_{Mt2}, Ldt_{Mt3} e Ldt_{Mt5}, demarcados em retângulos preto, vermelho e azul, respectivamente. As setas indicam o tamanho aproximado da banda de interesse: Ldt_{Mt2} (~31.0 kDa) Ldt_{Mt3} (~26.0 kDa) e Ldt_{Mt5} (~42.7 kDa).

Por outro lado, não obtivemos resultados satisfatórios para a expressão de Ldt_{Mt4} nem com a purificação de Ldt_{Mt1} nas condições testadas. Os resultados de um teste de expressão usando diferentes cepas de *E. coli* BL21(DE3), tempos e temperaturas de incubação indicaram expressão de Ldt_{Mt1} (~26,9 kDa) na fração solúvel de *E. coli* BL21(DE3) e *E. coli* Rosetta após 18h de incubação a 18°C (Fig. 12a); embora, para Ldt_{Mt4} não se identificou nenhuma banda de expressão correspondente ao peso esperado para esta enzima (~38,9 kDa) em nenhuma das condições testadas (Fig. 12b).

Desta maneira, novas condições de expressão deverão ser testadas ou ainda a clonagem de outras construções para Ldt_{Mt4} serão realizadas. As tentativas posteriores de purificação de Ldt_{Mt1} por cromatografia de afinidade, foram insatisfatórias, indicando que esta proteína não se liga na coluna de níquel, possivelmente devido à pouca exposição da cauda de histidina ou outros fatores não conhecidos. Estes resultados sugerem que as condições de purificação de Ldt_{Mt1} devem ser otimizadas ou, como no caso de Ldt_{Mt4} , seja necessária a clonagem de novas construções.

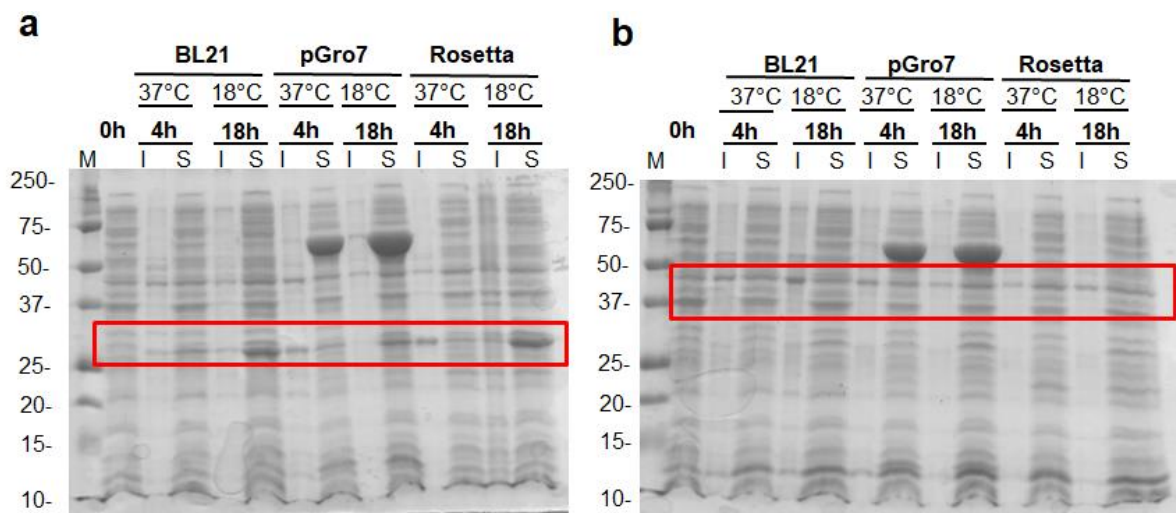


Figura 12. Teste de expressão da Ldt_{Mt1} e Ldt_{Mt4} . Géis de SDS/PAGE com as frações insolúveis (I) e solúveis (S) de (a) Ldt_{Mt1} e (b) Ldt_{Mt4} obtidas antes e depois da indução com 0,5 mM de IPTG em diferentes cepas de *Escherichia coli* durante 4 e 18h a 37°C e 18°C, respectivamente. O tempo 0 representa a fração solúvel sem induzir. O retângulo vermelho ressalta a área correspondente ao peso molecular esperado para Ldt_{Mt1} (26,9 kDa) e Ldt_{Mt4} (38,9 kDa), respectivamente. BL21: *E. coli* BL21(DE3), PGro7: *E. coli* BL21(DE3)/pGro7 e Rosetta: *E. coli* BL21(DE3)/Rosetta. M, marcador de peso molecular.

5.2. Cristalização de L,D- transpeptidases de *M. tuberculosis*

Com o objetivo de obter as estruturas das Ldt_{Mt2}, Ldt_{Mt3} e Ldt_{Mt5}, estas três enzimas foram cristalizadas e otimizadas usando o método de vapor difusão e gota pendurada. Os cristais da Ldt_{Mt2} cresceram durante 48 h a 18°C em gotas de 1 µL de proteína (20 mg/mL) e 1 µL de precipitante contra 400 µL de solução de reservatório de acetato de sódio 1M e bis-tris propano 100 mM pH 6,5 (Böth *et al.*, 2013). Estes cristais apresentaram morfologia hexagonal e tamanho estimado de 0,4 x 0,1 x 0,1 mm (Figura 13a). Os cristais da Ldt_{Mt5} cresceram após um mês a 18°C em gotas de 1 µL de proteína (15 mg/mL) e 1 µL de precipitante contra 400 µL de solução de reservatório de 22% PEG 4000, 100 mM acetato de sódio e 200 mM sulfato de amônio (Fig. 13b).

Devido as tentativas iniciais para cristalizar Ldt_{Mt3} não terem sido satisfatórias, realizou-se uma triagem de DSF para identificar uma condição tampão que aumentasse a estabilidade da enzima e aumentasse sua probabilidade de cristalização (REINHARD *et al.*, 2013). Assim, identificou-se o tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M pH 5,5, NaCl 0,15 M, glicerol 5% (v/v) como aquele que mais estabilizou esta enzima ($\Delta T_m = 4,1$ °C). Posterior a troca de tampão de Tris para citrato, realizou-se uma nova triagem de cristalização para Ldt_{Mt3}. Nesta oportunidade, seis condições de cristalização foram encontradas como *hits*. A condição de 10% PEG 8000, HEPES 100 mM pH 7,5 e acetato de cálcio 200 mM foi reproduzível manualmente, levando a formação de policristais após 24 h a 18°C, o quais ainda foram otimizados por *micro-seeding*. (Fig. 13c).

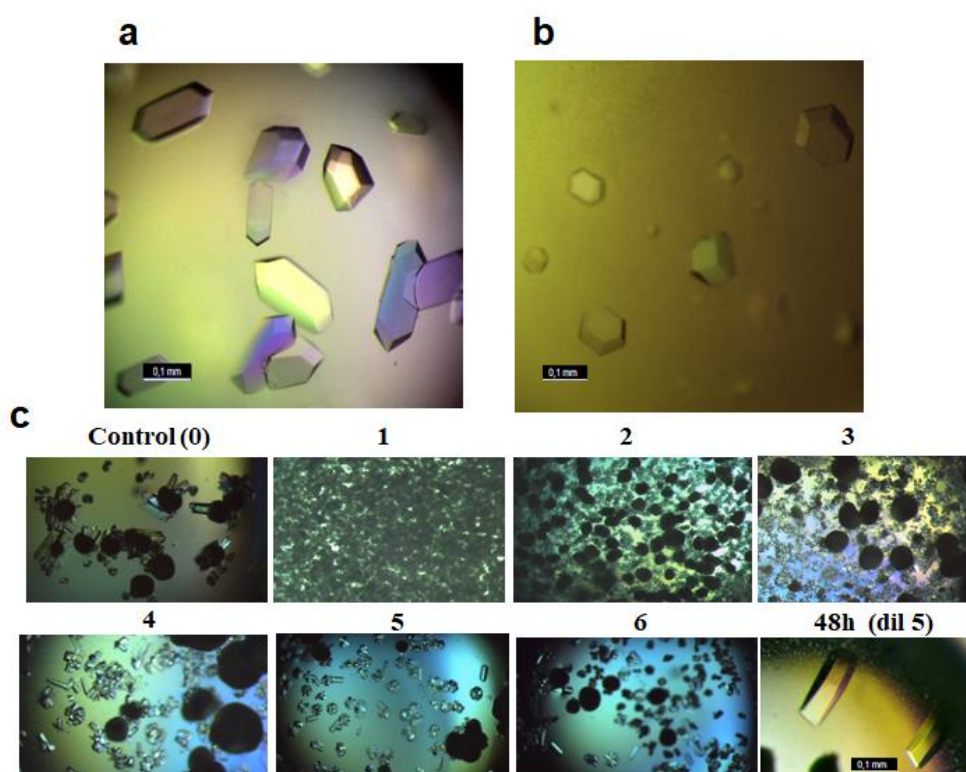


Figura 13. Cristalização das três L,D-transpeptidases de *M. tuberculosis*. Cristais de (a) Ldt_{M12} e (b) Ldt_{M15} formados pelo método de vapor difusão (gota pendurada) a 18°C após dois dias e quatro semanas respectivamente. (c) Otimização da cristalização de Ldt_{M13} por *micro seeding*. O painel Control (0) apresenta os cristais de Ldt_{M13} antes de *seeding*. Os números sobre cada foto da série indicam a diluição do estoque de *seeding* usado em cada experimento. Assim, 1 corresponde à diluição 10⁻¹, 2 a diluição 10⁻² e sucessivamente. A última foto desta série (marcada como 48h, dil 5), representa os monocristais de Ldt_{M13} obtidos após de 48h a 18°C usando a diluição do estoque de *seeding* de 10⁻⁵. Escala aproximada de 0,1 mm.

5.3. Estrutura de L,D- transpeptidase 2 e 5 de *M. tuberculosis* (Ldt_{M12} e Ldt_{M15})

Embora as estruturas cristalográficas de Ldt_{M12} e Ldt_{M15} estejam reportadas na literatura (ERDEMLI *et al.*, 2012; BÖTH *et al.*, 2013; BRAMMER BASTA *et al.*, 2015), neste trabalho conseguiu-se, de maneira independente, resolver as estruturas destas duas enzimas para serem usadas posteriormente nos ensaios de fragmentos (Objetivo específico 3) (Tabela 6). Os cristais de Ldt_{M12} (Ldt_{M12}Δ119) difrataram a 1,8 Å de resolução e pertenceram ao grupo espacial I2₁2₁2₁ com duas moléculas na unidade assimétrica e com dimensões de cela unitária a=117,53, b= 121,05, c= 122,70 Å e α=β=γ=90° (Tabela 6). A construção de Ldt_{M12} reportada neste trabalho (Ldt_{M12}Δ119) continha só dois dos três domínios desta enzima: BigB e CD, e adicionalmente mostrou alta similaridade estrutural quando comparada com a Ldt_{M12} (PDB 3TUR) (ERDEMLI *et al.*, 2012), *Root-mean-square deviations* (RMSD) de 0,157 Å para 256 C^α alinhados (Fig. 14a).

Tabela 6. Estatísticas de processamento de dados e refinamento para três L,D-transpeptidases de *M. tuberculosis* em sua forma apo. (Os dados em parêntesis correspondem à última camada).

Enzimas	Ldt _{Mt2}	Ldt _{Mt3}	Ldt _{Mt5}
Código PDB		6D4K	6D5A
Coleta de dados			
Fonte de raios X	MX2 LNLS Campinas- Brasil	P13 PETRA III Hamburgo- Alemanha	MX2 LNLS Campinas- Brasil
Comprimento de onda (Å)	1,458	1,000	1,458
Resolução (Å)	42,44 - 1,77 (1,83 - 1,77)	41,08- 1,32 (1,36-1,32)	43,54 - 2,62 (2,72 - 2,62)
Grupo espacial	I 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 6 ₂ 2 2
Parâmetros de cela a, b, c (Å) α , β , γ (°)	117,5, 121,05, 122,7 90, 90, 90	44,1, 46,4, 112,6 90, 90, 90	97,4, 97,4, 194,0 90, 90, 120
Multiplicidade	12,3 (9,9)	12,3 (13,5)	5,4 (5,3)
Completeza (%)	99,6 (99,9)	98,1 (96,7)	94,2 (93,8)
I/ σ (I)	15,6 (2,2)	21,72 (2,48)	9,7 (1,4)
Wilson <i>B-factor</i>	22,8	18,1	61,0
R-merge	0,099 (0,981)	0,052 (1,209)	0,106 (0,806)
R-meas	0,108 (1,095)	0,056 (1,304)	0,126 (0,983)
CC1/2	0,999 (0,824)	0,999 (0,828)	0,995 (0,741)
Refinamento			
Reflexões usadas no refinamento	84852 (8453)	53579 (5270)	15879 (1531)
R-work	0,19 (0,2590)	0,19 (0,26)	0,21(0,36)
R-free	0,21 (0,3129)	0,23 (0,30)	0,26 (0,38)
Número de moléculas (proteína)	2	1	1
Número de átomos diferentes do hidrogênio	4882	2010	2631
Proteína	4071	1787	2559
ligantes	0	1	-
Resíduos de aminoácidos	527	235	340
Validação			
RMSD das ligações (Å)	0,006	0,007	0,009
RMSD dos ângulos (°)	0,8	0,8	1,0
Ramachandran favoráveis (%)	97,7	97,0	94,3
Ramachandran permitidas (%)	2,3	2,1	5,1
Ramachandran não permitidas (%)	0,0	0,4	0,6
Rotâmeros não permitidos (%)	0,0	0	0,4
Índice de colisões	4,0	2,0	6,2
<i>B-factor</i> (média) (Å ²)	29,4	34,8	68,5
Proteína (Å ²)	27,2	34,1	68,8
Ligantes (Å ²)	-	19,9	-
Solvente (Å ²)	40,4	41,0	56,9

Os cristais de Ldt_{Mt5} (Ldt_{Mt5}Δ49) difrataram a 2.6 Å de resolução e pertenceram ao grupo espacial P6₂22 com uma molécula na unidade assimétrica e com dimensões de cela unitária de a=97,4, b= 97,4, c= 194,0 Å e α=β=90°, γ=120° (Tabela 6). Como se esperava, Ldt_{Mt5} apresentou dois domínios de imunoglobulina (BIgA e BIgB) além do CD. A sobreposição das estruturas de Ldt_{Mt5}, PDBs 6D5A e 4Z7A mostrou alta similaridade estrutural (RSMD de 0,384 Å sobre 336 C^α alinhados) (Fig.14b).

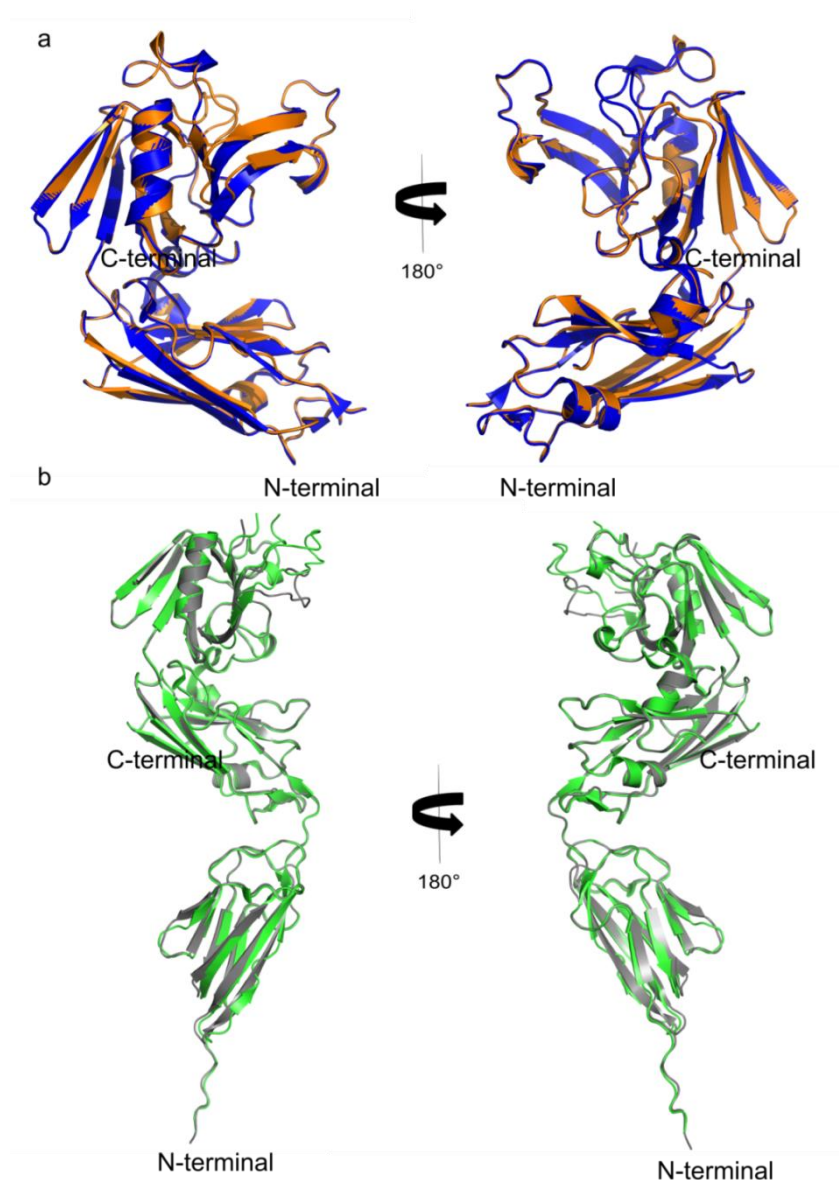


Figura 14. Estrutura e comparação entre duas L,D- transpeptidases de *M. tuberculosis*. Representação em *cartoon* da superposição das estruturas de (a) Ldt_{Mt2}Δ119 (laranja) reportada neste trabalho e PDB 3TUR (azul) (ERDEMLI *et al.*, 2012). (b) Superposição das estruturas cristalográficas de Ldt_{Mt5}: PDBs 6D5A (cinza), reportada neste trabalho, e 4Z7A (verde) (BRAMMER BASTA *et al.*, 2015).

5.4. Estrutura de L,D- transpeptidase 3 de *M. tuberculosis* (Ldt_{Mt3})

5.4.1. Estrutura geral de Ldt_{Mt3}

Com o propósito de determinar a estrutura cristalográfica de Ldt_{Mt3}, construiu-se uma proteína truncada que carecia dos 31 resíduos iniciais da porção amino terminal, os quais foram preditos pertencer à uma região transmembrânica (Fig. 15a). Os cristais da Ldt_{Mt3} cresceram depois de 48 h, difrataram a 1,3 Å de resolução e pertencem ao grupo espacial P2₁2₁2₁ com uma molécula na unidade assimétrica (Tabela 6). A estrutura de Ldt_{Mt3} (Resíduos 32 a 271), como foi descrito para outras Ldts_{Mt}, tem uma forma semicircular e dois domínios conservados: O domínio bacteriano de imunoglobulina (BigB) modelado desde Ser33 a Lys122 e o domínio catalítico de tipo YkuD localizado no C-terminal (Fig. 15b). Esses domínios estão unidos por uma pequena alça (Thr123 a Val127) com baixa mobilidade (Fator B de 18,1 Å²).

O domínio catalítico da Ldt_{Mt3} com uma dimensão aproximada de 35 x 40 Å está localizado no C-terminal e apresenta um enovelamento do tipo ErfK/YbiS/YhnG, descrito previamente em proteínas bacterianas (BIELNICKI *et al.*, 2006). O CD é composto principalmente por um sanduíche β constituído por duas folhas β com cinco fitas β cada e uma dessas fitas β (Gly182-Ser156), atravessa ambas as folhas. Somente uma hélice α encontra-se no CD e as outras restantes correspondem a duas hélices 3₁₀ (η₁ e η₂), que junto com as alças conectam as fitas β do domínio (Fig. 15c).

O CD da Ldt_{Mt3} apresenta uma tampa que se estende desde a Ser197 até a Tyr210 e cobre parcialmente o sítio ativo (Fig. 15b-c). A tampa também está presente nas estruturas de outras Ldts_{Mt} (ERDEMLI *et al.*, 2012; CORREALE *et al.*, 2013; BRAMMER BASTA *et al.*, 2015), embora esteja ausente na estrutura da L,d-transpeptidase de *Bacillus subtilis* (BIELNICKI *et al.*, 2006). A tampa da Ldt_{Mt3} é composta principalmente por resíduos hidrofóbicos e muitos deles com suas cadeias laterais alocadas no interior do centro catalítico, limitando possivelmente o acesso ao solvente na cavidade catalítica. A média do fator B dos resíduos que conformam a tampa de Ldt_{Mt3} é 47,26 Å², sugerindo que, similarmente ao observado com Ldt_{Mt2} (KIM *et al.*, 2013), esta estrutura pode ter flexibilidade e assumir uma conformação aberta e fechada durante o ciclo catalítico; entretanto esta hipótese deve ser confirmada com a determinação da estrutura da Ldt_{Mt3} em complexo com ligantes.

O domínio BigB da Ldt_{Mt3} apresenta uma dimensão aproximada de 40 x 35 Å e é composto por sete fitas β que compõem duas folhas β antiparalelas com três e quatro fitas respectivamente. As folhas β estão empacotadas uma frente à outra formando um barril β unido por uma hélice α (Pro66 a Val76) (Fig. 15d). As regiões de alças são curtas, e, portanto a maioria dos resíduos deste domínio estão concentrados nas duas folhas β. Os aminoácidos que compõem estas duas folhas são principalmente hidrofóbicos e com suas cadeias laterais expostas ao interior das folhas β, sugerindo que as interações hidrofóbicas contribuem significativamente na estabilização deste domínio.

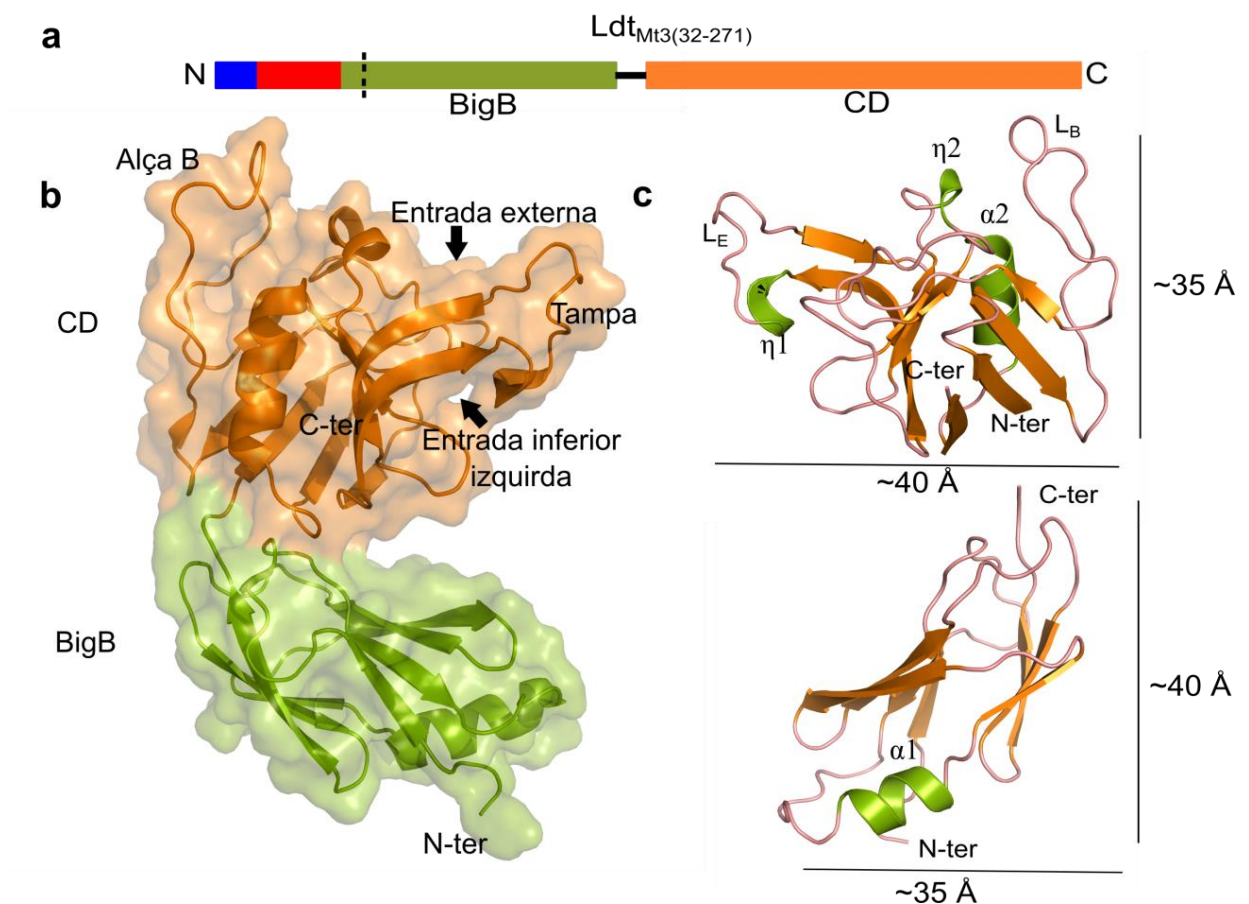


Figura 15. Estrutura geral de L,D-transpeptidase 3 de *M. tuberculosis*. (a) Distribuição de domínios de Ldt_{Mt3}. Uma proteína N-truncada Ldt_{Mt3}(32-271) foi usada neste estudo. Os domínios de Ldt_{Mt3} compreendem uma região citoplasmática (Met1-Gly6) em azul, seguido por uma região transmembrana (Cys7-Ala20) em vermelho e a maior proporção da enzima (Ala30-Glu271) contém o BigB e o CD. (b) Representação de superfície e estruturas secundárias da Ldt_{Mt3}. O domínio similar à imunoglobulina (BigB) (Gly21-Lys122) em verde e o domínio catalítico (CD) carboxi terminal em laranja (Val128-Glu271). A tampa da Ldt_{Mt3} (Ser197-Tyr210) representada em azul e a alça B (loop B) (Asp143-Gly166) ressaltado em cinza. Esta figura apresenta também duas vias de acesso ao centro catalítico: A cavidade externa e uma das cavidades internas. (c) e (d) Estruturas secundárias do domínio catalítico e BigB da Ldt_{Mt3}, respectivamente, indicando as dimensões aproximadas de cada um dos domínios.

Um átomo de cálcio proveniente, possivelmente, da condição de cristalização, poderia ser importante na estabilização inter-domínios de Ldt_{Mt3} durante o processo de cristalização. O cálcio está coordenado pelo átomo de oxigênio da carbonila de Val48, o carboxila do Asp262 na interfase entre BigB e CD, e quatro moléculas de água (Fig. 16). Embora não se conhece uma possível relação biológica entre as L,D-transpeptidases e o cálcio, é importante ressaltar que este átomo foi também reportado na estrutura de Ldt_{Mt2} quando cristalizada na presença deste íon. Em Ldt_{Mt2}, o cálcio estava próximo da alça β6-β7 correspondente ao domínio BigB (KIM *et al.*, 2013). Adicionalmente, as proteínas Lig de *Leptospira* que também possuem domínios bacterianos de imunoglobulina conhecidos como Blg_2 tem sido reportados como domínios de união a cálcio, sugerindo uma possível relação entre o cálcio e a função de proteínas que contêm esses domínios (RAMAN *et al.*, 2010). Entretanto, não há evidências experimentais que os domínios Big presente nas Ldts_{Mt} regulem a função destas enzimas em *M. tuberculosis*.

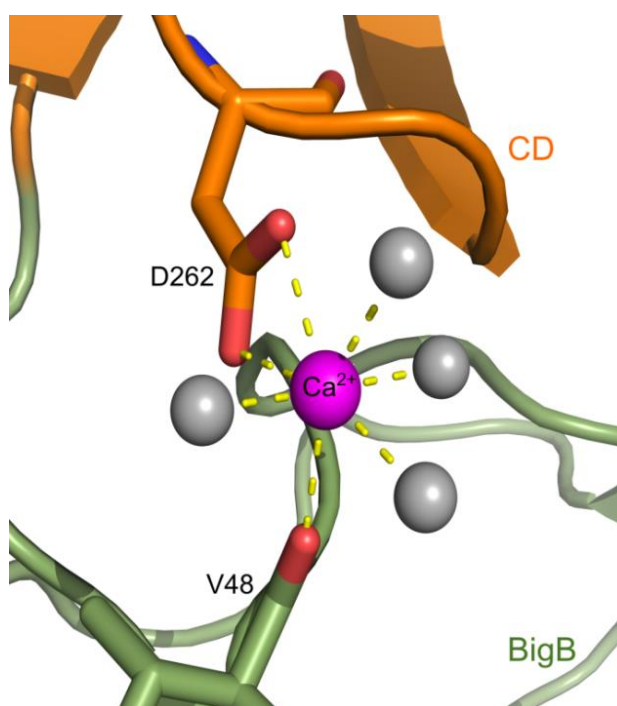


Figura 16. O cálcio na estrutura de Ldt_{Mt3}. Representação em cartoon da interfase entre o domínio catalítico (CD) e o domínio bacteriano similar a imunoglobulina (BigB) de Ldt_{Mt3}. O átomo de cálcio (Esfera magenta) apresenta sete coordenações representadas por linhas descontinúas amarelas: Duas com Asp262, uma com Val48 e mais quatro com moléculas de águas adjacentes (esferas cinza).

5.4.2. O sítio ativo de Ldt_{Mt3}

Três aberturas conectam o exterior de Ldt_{Mt3} com a cavidade catalítica: Uma entrada localizada no extremo C-terminal, chamada de cavidade externa ou “*outer cavity*” (OC) de acordo com a nomenclatura usada inicialmente para Ldt_{Mt2} (ERDEMLI *et al.*, 2012) e duas cavidades internas direita e esquerda “*Right and left inner cavities*” (RC e LC) localizadas perto da interfase entre o CD e BigB (Fig. 17a). Estas mesmas três aberturas observam-se também em Ldt_{Mt1}, embora Ldt_{Mt2} e Ldt_{Mt5} apresentem só duas vias de acesso ao sítio ativo. Estas aberturas são as vias de entrada e posicionamento do substrato que convergem em uma região altamente conservada que contém os resíduos catalíticos (ERDEMLI *et al.*, 2012; BRAMMER BASTA *et al.*, 2015).

Baseados na alta conservação dos aminoácidos no sítio catalítico de Ldt_{Mt3} (Fig. 5a) e a homologia estrutural com outras Ldts_{Mt} (ERDEMLI *et al.*, 2012; BÖTH *et al.*, 2013; CORREALE *et al.*, 2013; BRAMMER BASTA *et al.*, 2015), os resíduos catalíticos de Ldt_{Mt3} são Cys246 e His228. O terceiro resíduo corresponde à Ser229 com seu grupo carbonila localizado a 2,8 Å de distância do N^{δ1} da His228 (Fig. 17b).

A estabilização do intermediário tetraédrico carregado negativamente acontece dentro do “*oxyanion hole*”, uma cavidade carregada positivamente com dois ou três fortes doadores de hidrogênio (ASBÓTH e POLGÁR, 1983). Na estrutura de Ldt_{Mt3}, os átomos de nitrogênio da cadeia central da Cys246, Gly245 e His224 poderiam cumprir esta função formando ligações de hidrogênio com o oxigênio carregado negativamente do intermediário tetraédrico durante as reações enzimáticas de transpeptidação (Fig. 17b).

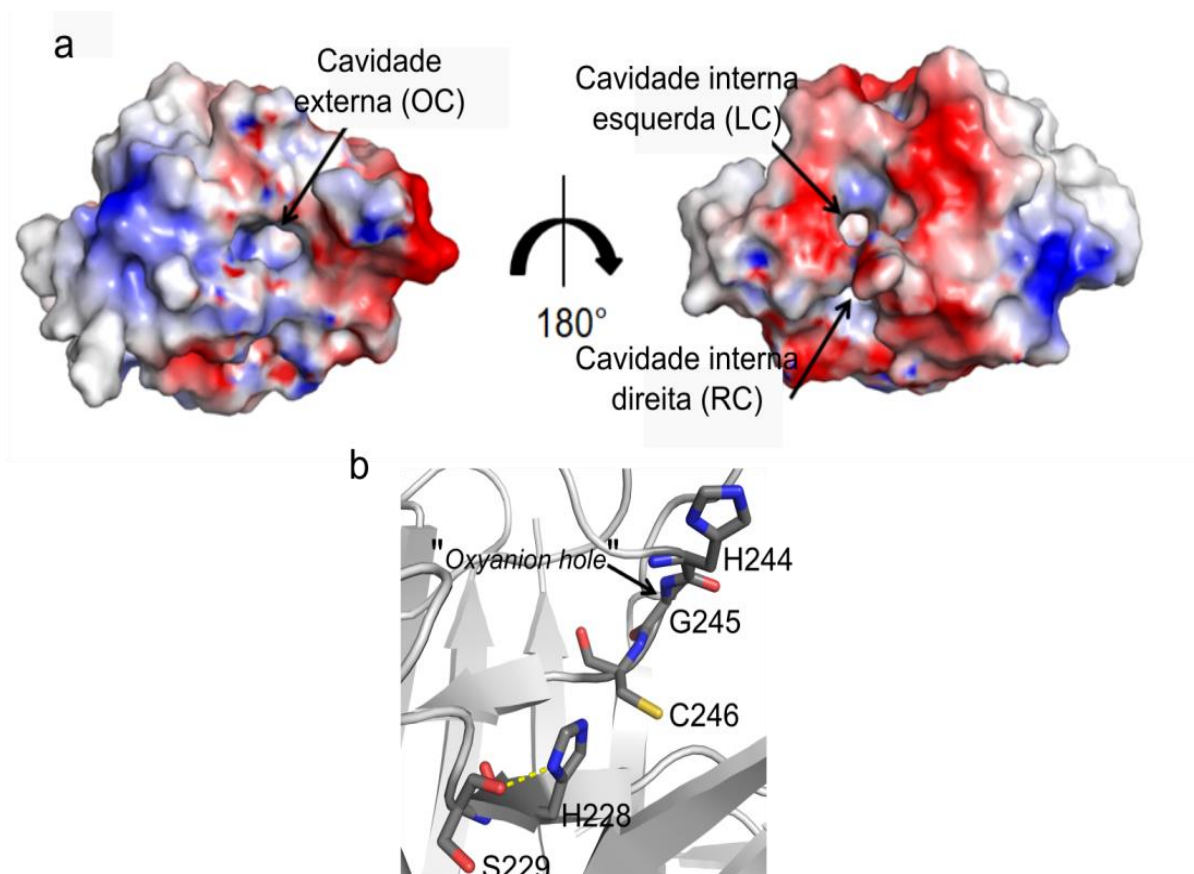


Figura 17. O Domínio catalítico e sítio ativo da L,D- transpeptidase 3 de *M. tuberculosis*. (a) As vias de acesso ao sítio catalítico de Ldt_{Mt3} são a cavidade externa “Outer cavity” (OC) e duas cavidades internas “Left and Right inner cavities” (IC e RC), indicadas com setas pretas (b) a triada catalítica da Ldt_{Mt3} é formada por Cys246, His228 e Ser229. Destaca-se também com seta preta a região de estabilização do intermediário tetraédrico ou “oxyanion hole” quando na presença do substrato ou ligante.

5.4.3 Comparação entre Ldt_{Mt3} e seus parálogos.

O genoma de *M. tuberculosis* contém cinco parálogos de *Ldts* que codificam pelas Ldts_{Mt} (COLE *et al.*, 1998). Essas proteínas possuem uma identidade de sequência entre 31 a 50%. A maior identidade de Ldt_{Mt3} é com Ldt_{Mt1} (50%), seguido de Ldt_{Mt2} e Ldt_{Mt4} (39%) e finalmente, a menor identidade é com Ldt_{Mt5} (30%) (Fig. 5b). Foi realizada uma comparação do comprimento das quatro Ldts_{Mt}, e assim Ldt_{Mt1} (~60 Å) e Ldt_{Mt3} (~75 Å) foram as menores, enquanto que Ldt_{Mt2} (~100 Å) e Ldt_{Mt5} (~120 Å) apresentaram os maiores comprimentos. Essas diferenças no comprimento estão relacionadas com a presença de um domínio de imunoglobulina adicional (BigA) na estrutura de Ldt_{Mt2} e Ldt_{Mt5}. De maneira similar ao proposto para a região C-terminal da PBP3 de *S. pneumoniae* (MORLOT *et al.*, 2005), os domínios Big em *tandem* presentes em algumas Ldts_{Mt} poderiam servir como pedestais para posicionar os sítios ativos destas enzimas em diferentes níveis na parede celular.

Se comparamos a espessura do peptidoglicano de *M. tuberculosis* com o de *S. aureus* (~340 Å) (VOLLMER e SELIGMAN, 2010), e que todas as Ldt_{Mt} com estruturas reportadas no momento apresentam diferentes comprimentos, há evidências que cada uma delas poderia realizar reações de transpeptidação para o remodelamento das diferentes camadas de peptidoglicano, sendo assim, por exemplo, nas camadas externas (Ldt_{Mt5}), nas intermediárias (Ldt_{Mt2}) e nas internas (Ldt_{Mt3} e Ldt_{Mt1}) (Fig. 18a).

A sobreposição da estrutura de quatro Ldt_{Mt} que incluem: Ldt_{Mt1} (PDB 4JMN) (CORREALE *et al.*, 2013), Ldt_{Mt2} (PDB 5DU7) (KUMAR *et al.*, 2017) e Ldt_{Mt5} (PDB 6D5A) mostrou RMSDs para os domínios catalíticos de 0,54 Å para Ldt_{Mt1} (120 C^α alinhados), 0,76 Å para Ldt_{Mt2} (120 C^α alinhados) e 0,85 Å para Ldt_{Mt5} (112 C^α alinhados). Entretanto, a sobreposição dos domínios BigB indicaram maior divergência estrutural com RMSDs de 1,21 Å para Ldt_{Mt1}, 1,84 Å para Ldt_{Mt2} e 2,25 Å to Ldt_{Mt5} com 88 C^α alinhados em todos os casos (Fig. 18b-c). A sobreposição das triadas catalíticas destas quatro enzimas indicaram conservação nas conformações da cisteína e a histidina; embora possam ser observadas diferenças em Ldt_{Mt5}, onde a serina da triade catalítica é substituída por Asn362 ou Glu328 de acordo com BRAMMER BASTA *et al.*, 2015 (Fig. 18d).

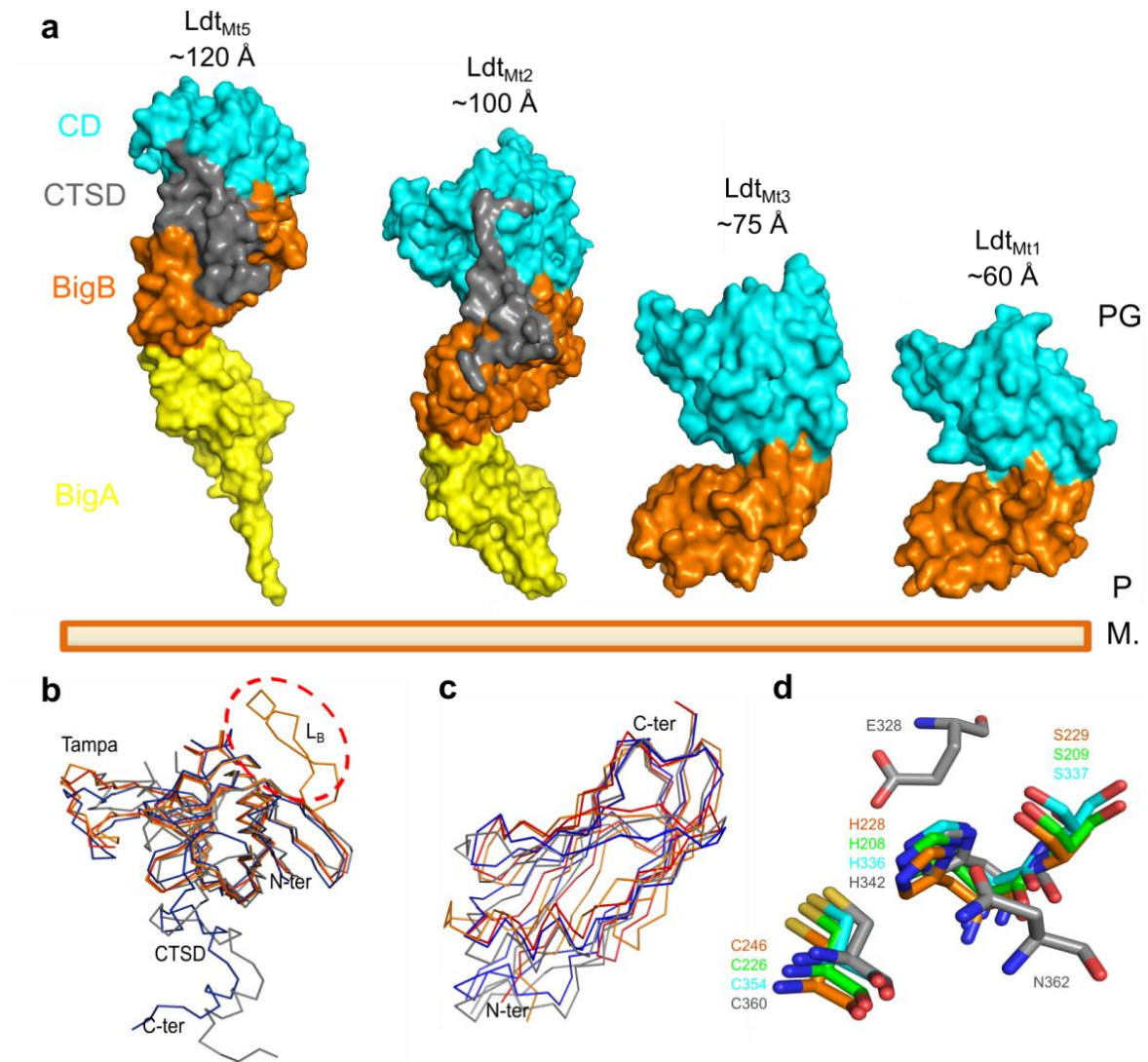


Figura 18 Comparação entre as L,D- transpeptidases de *M. tuberculosis*. (a) Representação de superfície da Ldt_{Mt1} (PDB 4JMN), Ldt_{Mt2} (PDB 5DU7), Ldt_{Mt3} (PDB 6D4K), e Ldt_{Mt5} (PDB 6D5A), mostrando os domínios bacterianos de imunoglobulina: BigA (amarelo), BigB (laranja), os domínios catalíticos CD (ciano) e o subdomínio C-terminal (CTSD) (cinza). M: Membrana celular, P: Periplasma, PG: Peptideoglicano. Representação da sobreposição de carbonos α dos domínios catalíticos (b), domínios similar à imunoglobulina (BigB) (c), e das quatro L,D-transpeptidases de *M. tuberculosis*. Ldt_{Mt3} (laranja) com Ldt_{Mt1} (verde), Ldt_{Mt2} (azul) e Ldt_{Mt5} (vermelho). Em círculo vermelho ressalta-se a posição da alça B de Ldt_{Mt3}. (d) Sobreposição das triades catalíticas das quatro L,D-transpeptidases de *M. tuberculosis*. Ldt_{Mt3} (laranja) com Ldt_{Mt1} (verde), Ldt_{Mt2} (ciano) e Ldt_{Mt5} (cinza).

Uma das principais diferenças estruturais entre Ldt_{Mt3} e suas homólogas está na alça B (L_B) que estende-se do Asp143 até Gly166 e apresenta uma região flexível rica em prolina (PRR) (com média dos fatores B de 39,28 Å²) (Fig. 18b). Como tem sido sugerido previamente para PBP de *M. smegmatis*, essas alças ricas em prolina podem estar envolvidas em interações proteína-proteína ou proteínas-carboidratos (PATRU e PAVELKA, 2010). Adicionalmente, é sabido que várias das enzimas que participam no remodelamento do peptideoglicano de *M. tuberculosis* podem formar complexos (KIESER e RUBIN, 2014), assim, a alça B poderia participar nas

interações com outros componentes do sistema de remodelamento do peptideoglicano. Entretanto ainda é necessário confirmar experimentalmente estas hipóteses.

O CD de Ldt_{Mt3} carece do subdomínio C-terminal (CTSD), uma estrutura que compreende os resíduos (379-407) e (385-416) em Ldt_{Mt2} e Ldt_{Mt5}, respectivamente. O CTSD tem sido associado com interações tipo “zipper” com o domínio de imunoglobulina, permitindo a fixação e a orientação dos dois domínios (ERDEMLI *et al.*, 2012; BRAMMER BASTA *et al.*, 2015) (Fig. 18a-b).

Com o propósito de fazer uma comparação nos volumes das cavidades catalíticas entre L,D-transpeptidases, usou-se o servidor POCASA (YU *et al.*, 2010). Os resultados indicaram que o volume da cavidade catalítica de Ldt_{Mt3} (~196 Å³) é comparável com Ldt_{Mt2} (~174 Å³), apesar de ser topologicamente mais similar à Ldt_{Mt1} com três vias de aceso e volume de 140 Å³ (Fig. 19). Não foi possível determinar o volume da cavidade de Ldt_{Mt5} devido as alças que definem o sítio ativo estarem completamente desordenadas e portanto não apresentavam densidade eletrônica.

Na estrutura de Ldt_{Mt3}, a cavidade externa (OC) está carregada positivamente, uma característica compartilhada com Ldt_{Mt1} e Ldt_{Mt2} (Fig. 19). Por outro lado, na estrutura de Ldt_{Mt5}, OC está negativamente carregada, sugerindo que diferentes substratos possam se ligar ou possivelmente esta enzima poderia realizar outras funções além de transpeptidação. A cavidade

e interna direita de Ldt_{Mt3} está carregada positivamente diferentemente de RC e IC em Ldt_{Mt1} e Ldt_{Mt2}, respectivamente as quais são neutras (Fig. 19 a-c).

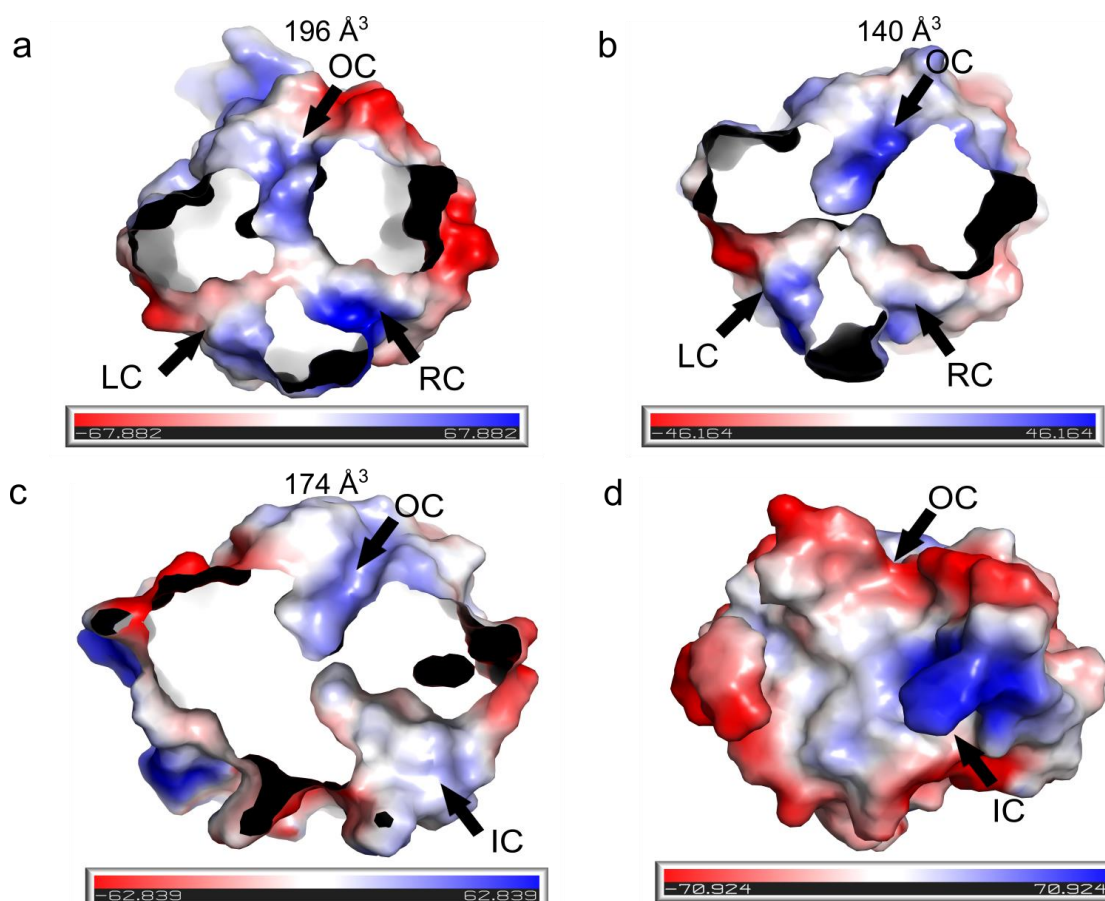


Figura 19. Comparação da superfície de potencial eletrostático das cavidades catalíticas das L,D- transpeptidases de *M. tuberculosis*. (a) Ldt_{Mt3} (PDB 6D4K), (b) Ldt_{Mt1} (PDB 4JMN), (c) Ldt_{Mt2} (PDB 5DU7) e (d) Ldt_{Mt5} (PDB 6D5A). As barras inferiores indicam a escala de carga: Negativo (vermelho), positivo (azul), neutro (branco). As setas pretas indicam as possíveis vias de acesso ao sítio ativo. Cavidade externa: OC, Cavidade interna: IC, Cavidade interna direita: RC, Cavidade interna esquerda: LC

5.5. Interações de L,D- transpeptidases de *M. tuberculosis* com antibióticos β -lactâmicos

5.5.1 Os β -lactâmicos que interagem com Ldt_{Mt3} e Ldt_{Mt5} e induzem estabilização e desestabilização enzimática

Com o propósito de investigar as interações de Ldt_{Mt3} e Ldt_{Mt5} com os antibióticos β -lactâmicos, foi realizada uma triagem por DSF na presença de dez diferentes β -lactâmicos. Para esta parte da análise não se incluiu a Ldt_{Mt2} devido a esta enzima já ter sido amplamente estudada na presença dos β -lactâmicos (BIANCHET *et al.*, 2017; KUMAR *et al.*, 2017; STEINER *et al.*, 2017).

Ldt_{Mt3} teve uma temperatura de desenovelamento (T_m) de $40,9 \pm 0,45^\circ\text{C}$ ($T_{m\text{Ref}}$). Sete dos 10 antibióticos β -lactâmicos testados induziram aumento ou diminuição acima ou abaixo de $1,35^\circ\text{C}$, indicando interação (Tabela 7). A diferença

nos T_{ms} (ΔT_m) induzido pelos β -lactâmicos esteve na faixa de $-6,1^\circ\text{C}$ para biapenem e $2,2^\circ\text{C}$ para faropenem (Tabela 7). Não se determinou mudança significativa no ΔT_m para ampicilina, cefalexina, e ceftazidima, indicando que esses antibióticos não interagem com Ldt_{Mt3} nas concentrações testadas (Fig. 20 a-b).

Tabela 7. Temperaturas de desenovelamento (T_{ms}) de Ldt_{Mt3} e Ldt_{Mt5} em presença de diferentes antibióticos β -lactâmicos

Antibiótico	$T_{m\beta\text{lactâmico}}$	ΔT_m ($T_{m\beta\text{lactâmicos}} - T_{m\text{Ref}}$)
Ldt _{Mt3} $T_{m\text{Ref}} = 40,93 (\pm 0,45)$		
Faropenem	43,17 ($\pm 0,29$)	2,24 ($\pm 0,53$)
Ampicilina	41,25 ($\pm 0,35$)	0,32 ($\pm 0,57$)
Cefalexina	40,50 ($\pm 0,50$)	-0,43 ($\pm 0,67$)
Ceftazidima	40,33 ($\pm 0,29$)	-0,60 ($\pm 0,53$)
Carbenicilina	38,00 ($\pm 0,50$)	-2,93 ($\pm 0,67$)
Imipenem	36,83 ($\pm 0,29$)	-4,10 ($\pm 0,53$)
Ertapenem	36,00 ($\pm 0,50$)	-4,93 ($\pm 0,67$)
Meropenem	36,00 ($\pm 0,50$)	-4,93 ($\pm 0,67$)
Doripenem	35,17 ($\pm 0,29$)	-5,76 ($\pm 0,53$)
Biapenem	34,83 ($\pm 0,29$)	-6,10 ($\pm 0,53$)
Canamicina	40,83 ($\pm 0,76$)	-0,10 ($\pm 0,88$)
Ldt _{Mt5} $T_{m\text{Ref}} = 51,82 (\pm 0,24)$		
Biapenem	49,50 ($\pm 0,50$)	-2,32 ($\pm 0,55$)
Faropenem	50,16 ($\pm 0,28$)	-1,66 ($\pm 0,36$)
Meropenem	51,00 ($\pm 0,50$)	-0,82 ($\pm 0,55$)
Ampicilina	51,00 ($\pm 0,50$)	-0,82 ($\pm 0,55$)
Imipenem	51,50 ($\pm 0,50$)	-0,32 ($\pm 0,55$)
Carbenicilina	51,50 ($\pm 0,50$)	-0,32 ($\pm 0,55$)
Ertapenem	51,83 ($\pm 0,28$)	0,01 ($\pm 0,36$)
Doripenem	51,83 ($\pm 0,28$)	0,01 ($\pm 0,36$)
Cefalexina	51,83 ($\pm 0,28$)	0,01 ($\pm 0,36$)
Ceftazidima	52,00 ($\pm 0,50$)	0,18 ($\pm 0,55$)
Canamicina	51,50 ($\pm 0,50$)	-0,32 ($\pm 0,55$)

De uma maneira similar ao descrito para o domínio Polo-box da proteína humana Plk1 (CIMMPERMAN *et al.*, 2008), na qual diferentes ligantes podem estabilizar ou desestabilizar uma mesma proteína, carbenicilina e todos os demais carbapenêmicos testados interagiram com Ldt_{Mt3} diminuindo a $T_{m\text{ref}}$, sugerindo que esses antibióticos causam a desestabilização da enzima. Por outro lado, faropenem foi o único β -lactâmico que induziu um ΔT_m positivo sobre Ldt_{Mt3}, indicando sua união à Ldt_{Mt3} e promovendo a estabilização da enzima (Fig. 20a-b).

Por outro lado, Ldt_{Mt5} teve uma T_m de $51,82 (\pm 0,24)$ ($T_{m\text{Ref}}$). Quatro dos 10 antibióticos testados por DSF (Biapenem, faropenem, meropenem e ampicilina)

diminuíram a T_{mRef} em $\leq 0,72$ °C, sugerindo interação (Tabela 7). O deslocamento térmico (ΔT_m) induzido pelos β -lactâmicos esteve na faixa de -2,3°C para biapenem e -0,82°C para meropenem e ampicilina (Tabela 7 e Fig. 20 c-d).

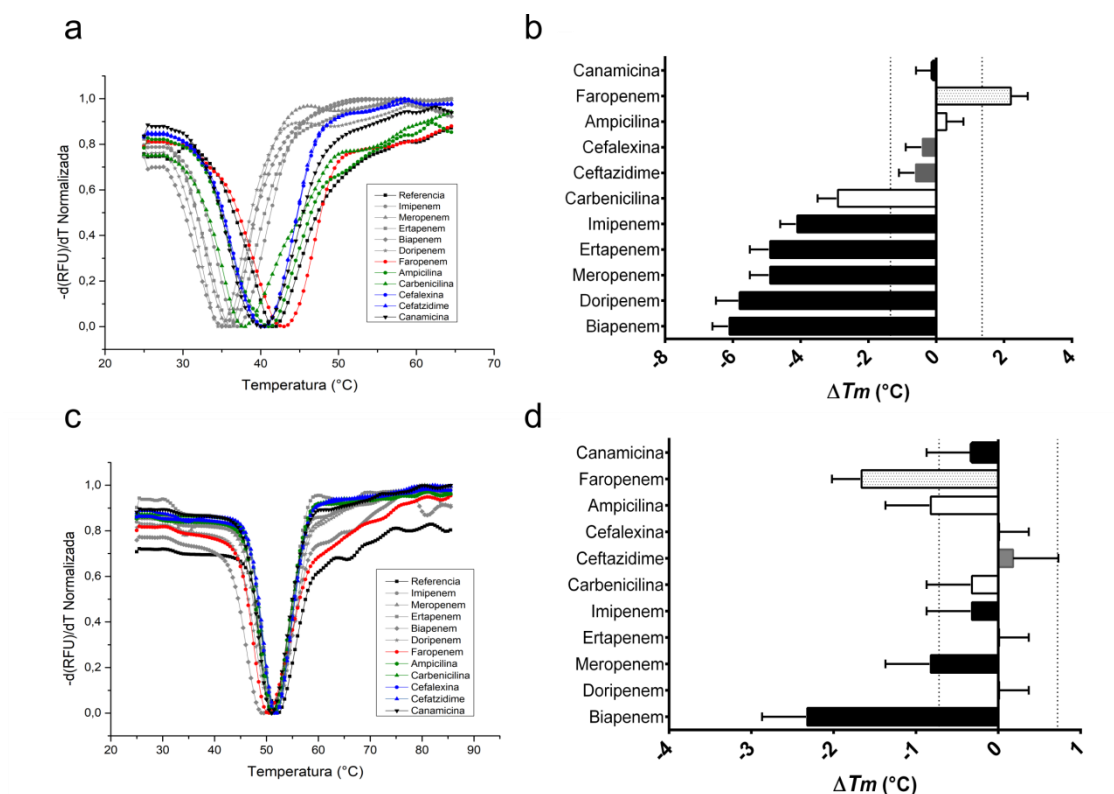


Figura 20. Estudos de interação de Ldt_{M13} e Ldt_{M15} com antibióticos β -lactâmicos por DSF. Curvas representativas de desenovelamento térmico da Ldt_{M13} (a) e Ldt_{M15} (c) a 10 μ M cada, em presença de antibióticos β -lactâmicos (5mM). A curva de referência e o controle negativo de canamicina estão representados por linhas pretas. Os carbapenêmicos em cinza, faropenem em vermelho, as penicilinas em verde e as cefalosporinas estão em azul. A T_m está definida como a temperatura no ponto máximo de inflexão de cada curva de desenovelamento térmico $[-d(RFU)/dT]$ vs. Temperatura. O deslocamento térmico (ΔT_m , °C) induzido pelos antibióticos β -lactâmicos sobre a Ldt_{M13} (b) e Ldt_{M15} (d). As linhas pontilhadas em cada gráfico representam os respectivos pontos de corte da interação de três vezes o desvio padrão com relação de T_{mRef} (3σ): Para Ldt_{M13} o ponto de corte estabelecido foi de $-1,35 \leq \Delta T_m \leq 1,35$ °C, entretanto que para Ldt_{M15} o ponto de corte foi de $-0,72 \leq \Delta T_m \leq 0,72$ °C. Os carbapenêmicos estão representados em barras pretas, as penicilinas em barras brancas, faropenem com barras brancas pontilhadas e as cefalosporinas com barras cinza. As linhas pretas indicam o erro das médias, calculados usando os valores das triplicatas.

5.5.2 Os β -lactâmicos exibem diferentes afinidades e perfis termodinâmicos de interação com Ldt_{M13}

Com o propósito de determinar as afinidades e os mecanismos termodinâmicos de interação de Ldt_{M13} e Ldt_{M15} com os antibióticos β -lactâmicos, foram realizados experimentos de calorimetria de titulação isotérmica usando 100-150 μ M de cada proteína na cela, e 1,0 a 1,5 mM de cada antibiótico na seringa. As

isotermas de interação entre Ldt_{Mt3} com cinco carbapenêmicos e faropenem medidas a 24°C foram exotérmicas (Fig. 21 a-f). Não foi determinado calor de ligação para as penicilinas ou as cefalosporinas avaliadas, indicando que estes β -lactâmicos não interagem com Ldt_{Mt3}, ou sua afinidade é tão baixa que está fora do limite de detecção do equipamento nas concentrações de proteína e antibióticos testados (Fig 21 g-j).

As mais altas constantes de afinidade aparentes (K_{D_ap}) da Ldt_{Mt3} foram identificadas para imipenem e ertapenem, enquanto que biapenem e faropenem mostraram afinidades intermediárias. As mais baixas afinidades foram determinadas para doripenem e meropenem, respectivamente (Tabela 8). Não foi observada correlação entre a magnitude do K_{D_ap} e o ΔT_m obtidos por DSF ($\rho=-0,202$, $p=0,722$).

Tabela 8. Parâmetros termodinâmicos obtidos para seis antibióticos β -lactâmicos que interagiram com Ldt_{Mt3}

Antibiótico	ΔG (kcal mol ⁻¹)	ΔH (kcal mol ⁻¹)	$T\Delta S$ (kcal mol ⁻¹)	K_a (M ⁻¹)	K_{D_ap} (μ M)
Imipenem	-10,5 ($\pm 0,2$)	-9,4 ($\pm 0,1$)	-1,0 ($\pm 0,2$)	(6,1 $\pm 0,4$) $\times 10^7$	0,016 ($\pm 0,001$)
Ertapenem	-10,4 ($\pm 0,6$)	-10,6 ($\pm 0,2$)	0,2 ($\pm 0,6$)	(4,5 $\pm 1,0$) $\times 10^7$	0,022 ($\pm 0,005$)
Biapenem	-8,6 ($\pm 0,2$)	-8,7 ($\pm 0,1$)	0,1 ($\pm 0,2$)	(2,2 $\pm 0,4$) $\times 10^6$	0,45 ($\pm 0,08$)
Faropenem	-8,4 ($\pm 0,2$)	-11,8 ($\pm 0,1$)	3,4 ($\pm 0,2$)	(1,7 $\pm 0,3$) $\times 10^6$	0,59 ($\pm 0,10$)
Doripenem	-7,6 ($\pm 0,8$)	-8,6 ($\pm 0,3$)	1,0 ($\pm 0,8$)	(4,3 $\pm 1,3$) $\times 10^5$	2,3 ($\pm 0,7$)
Meropenem	-7,5 ($\pm 1,0$)	-5,6 ($\pm 0,3$)	-2,0 ($\pm 1,0$)	(3,4 $\pm 1,7$) $\times 10^5$	2,9 ($\pm 1,5$)

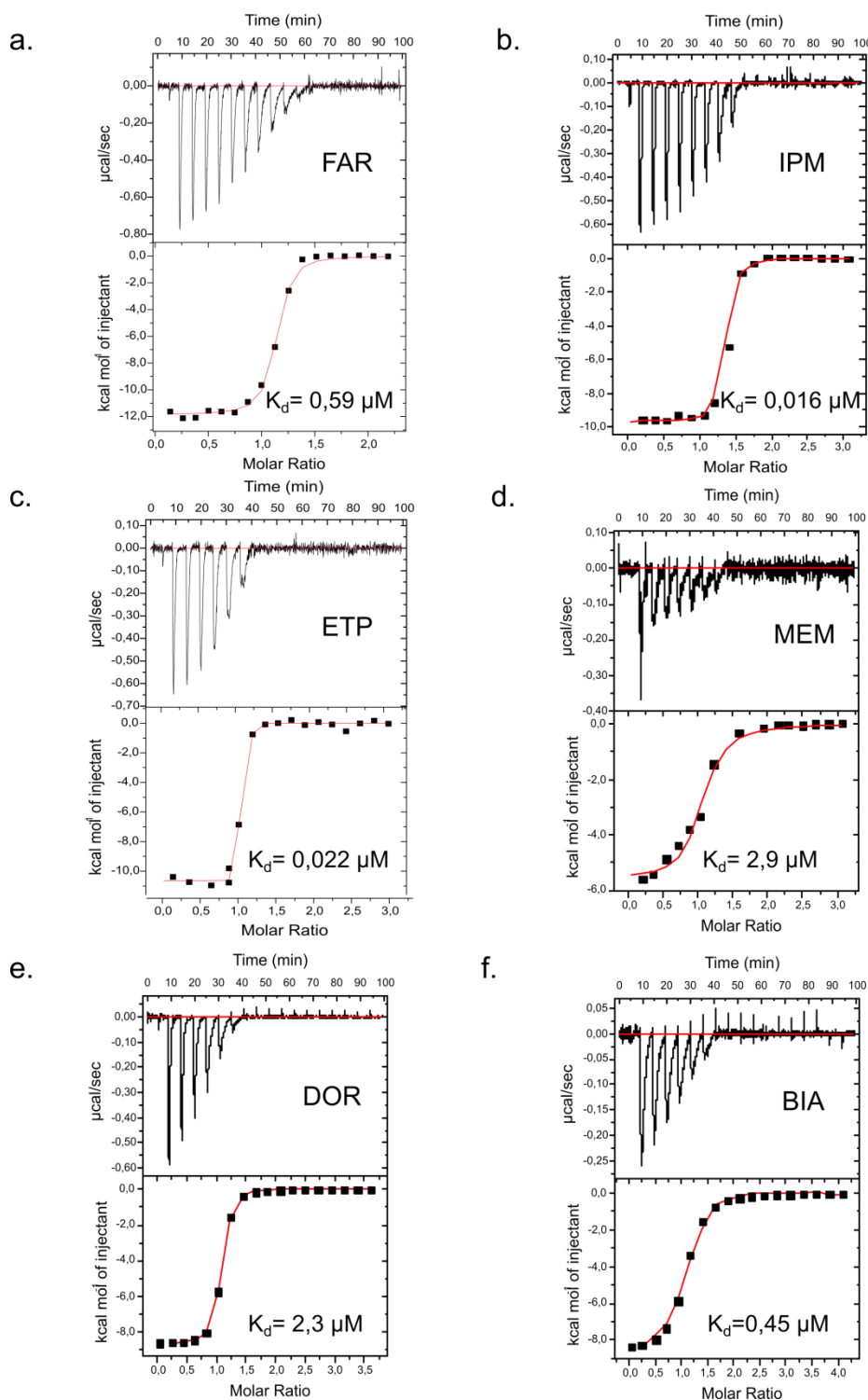


Figura 21. Estudos calorimétricos com a L,D-transpeptidase 3 de *M. tuberculosis* e dez antibióticos β -lactâmicos. (a) Faropenem, (b) Imipenem, (c) Ertapenem, (d) Meropenem, (e) Doripenem, (f) Biapenem, (g) Ampicilina, (h) Carbenicilina, (i) Cefalexina e (j) Ceftazidima. A porção superior de cada painel mostra os dados crus da titulação de Ldt_{MT3} (100 µM) com o correspondente antibiótico (1,0-1,5 mM) a 24°C. Os painéis inferiores apresentam os calores de interação integrados, obtidos a partir dos dados crus depois de subtrair o calor de diluição. As linhas vermelhas indicam a curva fitada para cada dado experimental, usando o modelo de *one-set-of-sites* implementado no Origin 7.0 (MicroCal iTC200 software).

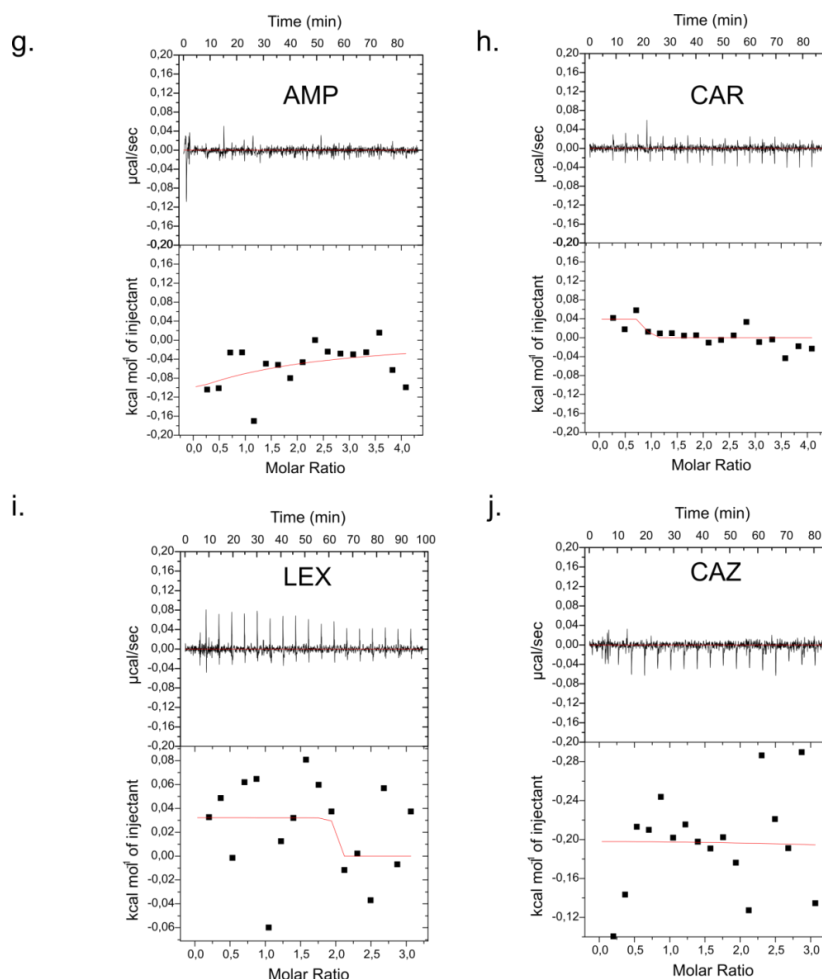


Figura 21 (Continuação). Estudos calorimétricos com a L,D-transpeptidase 3 de *M. tuberculosis* e dez antibióticos β -lactâmicos

As afinidades determinadas aqui para Ldt_{Mt3} em presença de β -lactâmicos estão relacionados com a cinética de inativação por carbapenêmicos previamente reportados por CORDILLOT *et al.*, 2013. Esse autores determinaram altas velocidades para a formação do *oxyanion* e aduto da Ldt_{Mt3} com imipenem e baixas velocidades com meropenem e doripenem. Esse dados suportam que a cinética de inativação da Ldt_{Mt3} está diretamente relacionada com a afinidade por esses β -lactâmicos. A velocidade de acilação da Ldt_{Mt3} por imipenem é cinco vezes maior do que a determinada para Ldt_{Mt1} sugerindo que, apesar da identidade de sequência de 50% entre estas duas enzimas, diferenças no volume, topologia e carga do sítio ativo podem determinar diferenças no reconhecimento dos β -lactâmicos. Por tanto, grupos laterais alifáticos carregados positivamente, como àquela encontrada em imipenem, parecem se ajustar melhor no sítio ativo de Ldt_{Mt3} em relação ao o rígido anel de pirrolidina, encontrado no meropenem.

Para todas as interações entre Ldt_{M13} e os β -lactâmicos estudadas aqui por ITC, as forças da ligação foram predominantemente entálpicas (ΔH), na faixa de -5,6 to -10,6 kcal mol⁻¹. Para imipenem e meropenem as interações foram favorecidas também por contribuições entrópicas ($-T\Delta S$) (Tabela 8 e Fig. 22); Por outro lado, as interações de ertapenem, biapenem, doripenem e faropenem contêm um componente entrópico desfavorável, a qual foi de maior magnitude para o faropenem (3,4 kcal/mol). Esta penalidade entrópica possivelmente pode ser causada pelo ordenamento (sequestro) de moléculas de água na cavidade catalítica de Ldt_{M13} após a formação do complexo enzima-ligante (HOLDGATE *et al.*, 1997) ou pela diminuição da liberdade conformacional tanto do ligante como da proteína resultando em uma compensação entalpia/entropia (WHITESIDES e KRISHNAMURTHY, 2005; BLAAZER e DE ESCH, 2015).

Embora a mais alta entalpia de ligação tenha sido determinada para o faropenem (-11,8 kcal/mol), sua penalidade entrópica de interação contribuiu com uma diminuição de 2 kcal/mol na energia livre de ligação (ΔG -8,4 kcal/mol) quando comparado com as energias de ligação do imipenem e ertapenem ($\Delta G \sim -10,5$ kcal/mol) (Fig. 22). Não foi possível correlacionar os valores de ΔH com o número de doadores ($\rho=0,057$, $p=0,933$) ou aceptores de hidrogênio ($\rho=0,24$, $p=0,711$) presentes nas estruturas dos β -lactâmicos.

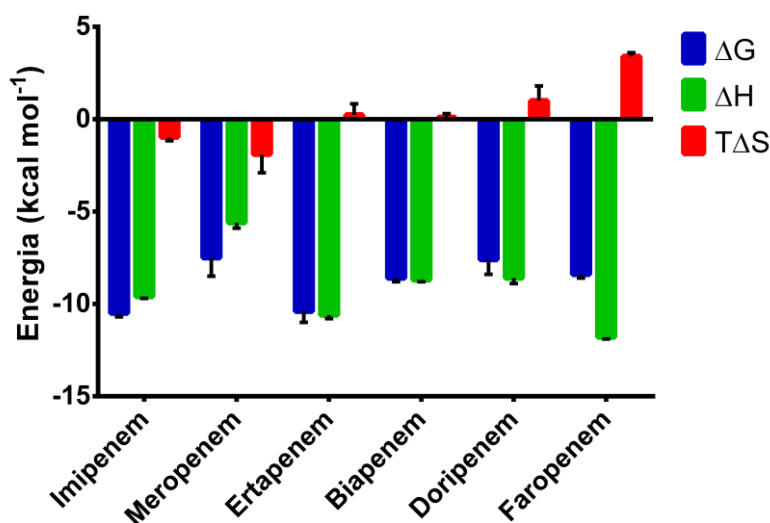


Figura 22. Perfis termodinâmicos de interação entre antibióticos β -lactâmicos e Ldt_{M13}. Análises da energética de interação ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$) obtida por ITC para Ldt_{M13} (100 μ M) na presença de cinco carbapenêmicos (imipenem, meropenem, ertapenem, biapenem e doripenem) e faropenem em uma relação proteína:antibiótico $\sim 1:15$ a 24°C. Nesta figura a energia livre ΔG em kcal/mol está representada por barras azuis, a entalpia ΔH (barras verdes) e a entropia $-T\Delta S$ (barras vermelhas). As linhas pretas representam o erro no ajuste dos dados crus.

Tentativas de determinar interações entre Ldt_{Mt5} e os β -lactâmicos por ITC, incluído experimentos variando a relação proteína-ligante e temperatura (15, 24 e 30°C), não mostraram calor de interação indicando não interação ou baixa afinidade pelos compostos testados (Fig. 23). Estes dados se correlacionam com os reportados previamente para esta enzima em estudos cinéticos e de espectrometria de massas (CORDILLOT *et al.*, 2013) e calorimetria (BRAMMER BASTA *et al.*, 2015). Embora, existe uma estrutura de Ldt_{Mt5} dita ser acilada por meropenem a 2,8 Å (código PDB 4ZFQ), a localização de um átomo de enxofre do ligante está fora da densidade eletrônica, portanto a presença do meropenem no sítio ativo desta enzima é questionável assim que outros métodos são necessários para a validação desta interação (BRAMMER BASTA *et al.*, 2015).

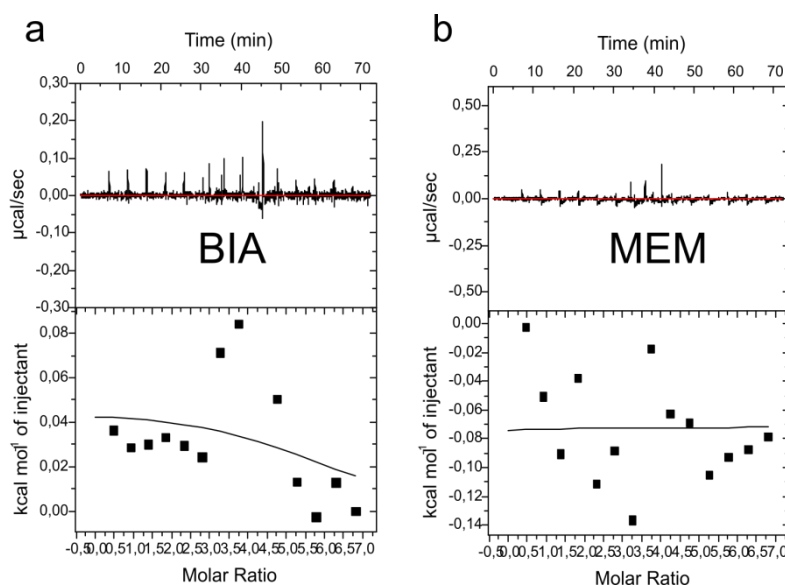


Figura 23. Estudos calorimétricos com L,D-transpeptidase 5 de *M. tuberculosis* com antibióticos β -lactâmicos. A porção superior de cada painel representa os dados crus da titulação da Ldt_{Mt5} (150 μM) com o correspondente antibiótico (a) Biapenem e (b) Meropenem (5 mM) a 15 e 24°C, respectivamente. Os painéis inferiores apresentam os calores de interação liberados durante cada experimento e as linhas pretas indicam a curva ajustada usando o modelo de “one-set-of-sites” implementado no Origin 7,0 (MicroCal iTC200 software).

5.5.3 Seleção de líderes β -lactâmicos para Ldts_{Mt}

Como uma estratégia para a seleção de compostos líderes que possam ser otimizados para o desenvolvimento de fármacos com maior afinidade e potencialmente, melhores atividades antimicrobianas e características farmacodinâmicas, foram determinados e comparados os indicadores LE (HOPKINS

et al., 2004) e LELP (KESERÜ e MAKARA, 2009) para os β -lactâmicos que interagiram com a Ldt_{Mt3}.

A tabela 9 representa indicadores de eficiência de ligação calculados para as interações entre Ldt_{Mt3} e seis β -lactâmicos. O indicador LELP mostra o faropenem (LELP: -1,7), seguido pelo imipenem (LELP:-7,6) e ertapenem (LELP:-10) como os melhores compostos líderes para otimização química. Os valores de LELP determinados neste trabalho para os β -lactâmicos que interagem com Ldt_{Mt3}, foram comparáveis com os valores de LELP calculados para esses mesmos antibióticos durante sua interação com Ldt_{Mt1} e Ldt_{Mt2} (ERDEMLI et al., 2012; CORREALE et al., 2013; BIANCHET et al., 2017; KUMAR et al., 2017) (Tabela 9). Esses resultados sugerem que a síntese de novos β -lactâmicos anti-TB pode ter como base a estrutura do faropenem o qual poderia proporcionar uma maior biodisponibilidade oral do que outros β -lactâmicos.

Tabela 9. *Ligand Efficiency Lipophilic Price* (LELP) para antibióticos β -lactâmicos que interagem com L,D-transpeptidases de *M. tuberculosis*

Enzima	Antibiótico	LELP*	Δg^{E}	K_{D_ap} (μM)	Referências
Ldt _{Mt3}	Faropenem	-1,7**	0,44	0,59 ($\pm 0,10$)	Este estudo
	Imipenem	-7,6	0,50	0,016 ($\pm 0,001$)	Este estudo
	Ertapenem	-10,0	0,32	0,022 ($\pm 0,005$)	Este estudo
	Meropenem	-15	0,29	2,94 ($\pm 1,47$)	Este estudo
	Biapenem	-16,8	0,36	0,45 ($\pm 0,08$)	Este estudo
	Doripenem	-19,8	0,28	2,32 ($\pm 0,70$)	Este estudo
Ldt _{Mt2}	Faropenem	-1,5	0,50	0,24	(KUMAR et al., 2017)
	Imipenem	-8,0	0,47	0,055 ($\pm 0,009$)	(ERDEMLI et al., 2012)
	Meropenem	-15	0,29	0,91 ($\pm 0,15$)	(ERDEMLI et al., 2012)
	Biapenem	-15,9	0,38	0,25 ($\pm 0,047$)	(BIANCHET et al., 2017)
Ldt _{Mt1}	Faropenem	-1,9	0,39	3,98	(KUMAR et al., 2017)
	Imipenem	-8,2&	0,46	0,062 ($\pm 0,01$)	(CORREALE et al., 2013)

*Os antibióticos foram classificados de acordo com o melhor LELP. Os líderes aceitáveis foram definidos pelo $-10 \leq \text{LELP} \leq 10$. ** LELP foi calculado de: $\text{LELP} = \text{LogP} / \Delta g$ (KESERÜ e MAKARA, 2009), $^{\text{E}}\Delta g$ foi calculado de: $\Delta g = \Delta G / \text{No, non} - \text{hydrogen atoms}$ (HOPKINS et al., 2004). & Para este caso, o ΔG não foi reportado pelos autores assim o ΔG foi calculado a partir do K_{D_ap} , aplicando a equação $\Delta G = RT \ln Kd$

5.5.4 Os β -lactâmicos que ligam no sítio ativo de Ldt_{Mt3} interagem possivelmente com resíduos conservados da enzima

Para investigar quais são os resíduos de Ldt_{Mt3} que interagem com os antibióticos β -lactâmicos foram realizadas simulações por *docking*. Para simular as possíveis conformações adquiridas pelo sítio ativo e os antibióticos durante a

interação entre os β -lactâmicos e seus alvos, foram usadas as estratégias de *Induced fit docking* (IFD) seguido por *docking* covalente.

Os resultados indicaram que os grupos aceptores e doadores dos motivos pirrolina presentes na maioria dos β -lactâmicos ligam a His228, His244 e Cys246 no centro catalítico da Ldt_{M13} (Fig. 24). Como esperado, os oxigênios da carbonila dos β -lactâmicos interagiram com os grupos amida de Cys246 e His244, que fazem parte do *oxyanion hole*. A carboxila no substituinte C3 dos carbapenêmicos e faropenem foram preditos interagir por ligações de hidrogênio com diferentes resíduos, que incluem as cadeias principais de His244 e Cys246, assim como as cadeias laterais do Trp232, Ser243 e Ser248 (Fig. 24 a-f). Adicionalmente, a carboxila do ertapenem interagiu com Arg174 através de uma ligação iônica (Fig. 24e). Finalmente, o grupo hidroxietila no substituinte C6 do imipenem e doripenem interagiu com a cadeia principal de Gly224 (Fig. 24a e b); entretanto, esse mesmo grupo do meropenem, biapenem e faropenem interagiu com a cadeia lateral da Ser199 (Fig. 24c, d e f) e só o grupo hidroxietila do ertapenem interagiu com Tyr210 (Fig. 23e).

A cadeia lateral R1 no substituinte C2 do imipenem interagiu com ligações de hidrogênio com o Asp208 e His244 (Fig. 24a). Da mesma forma, R1 do doripenem interagiu com as cadeias principais da His244 e Val242 (Fig. 24b). O grupo pirrolidina do meropenem interagiu com a Tyr210 através de contato *pi-cation* e o grupo tiazol do biapenem estabeleceu contatos *stacking pi-pi* com a Tyr210 e His244 e *pi-cation* com a Arg143 e His244 (Fig. 24c-d). Pelo contrário, nas poses com melhor *Glidescore* para o ertapenem e faropenem não foram preditas ligações de hidrogênio entre as cadeias laterais R1 com qualquer resíduo do sítio ativo (Fig. 24e e 24f). Esses resultados indicam quais aminoácidos da cavidade catalítica da Ldt_{M13} parecem ser os mais relevantes para o reconhecimento de motivos químicos presentes nas moléculas dos β -lactâmicos.

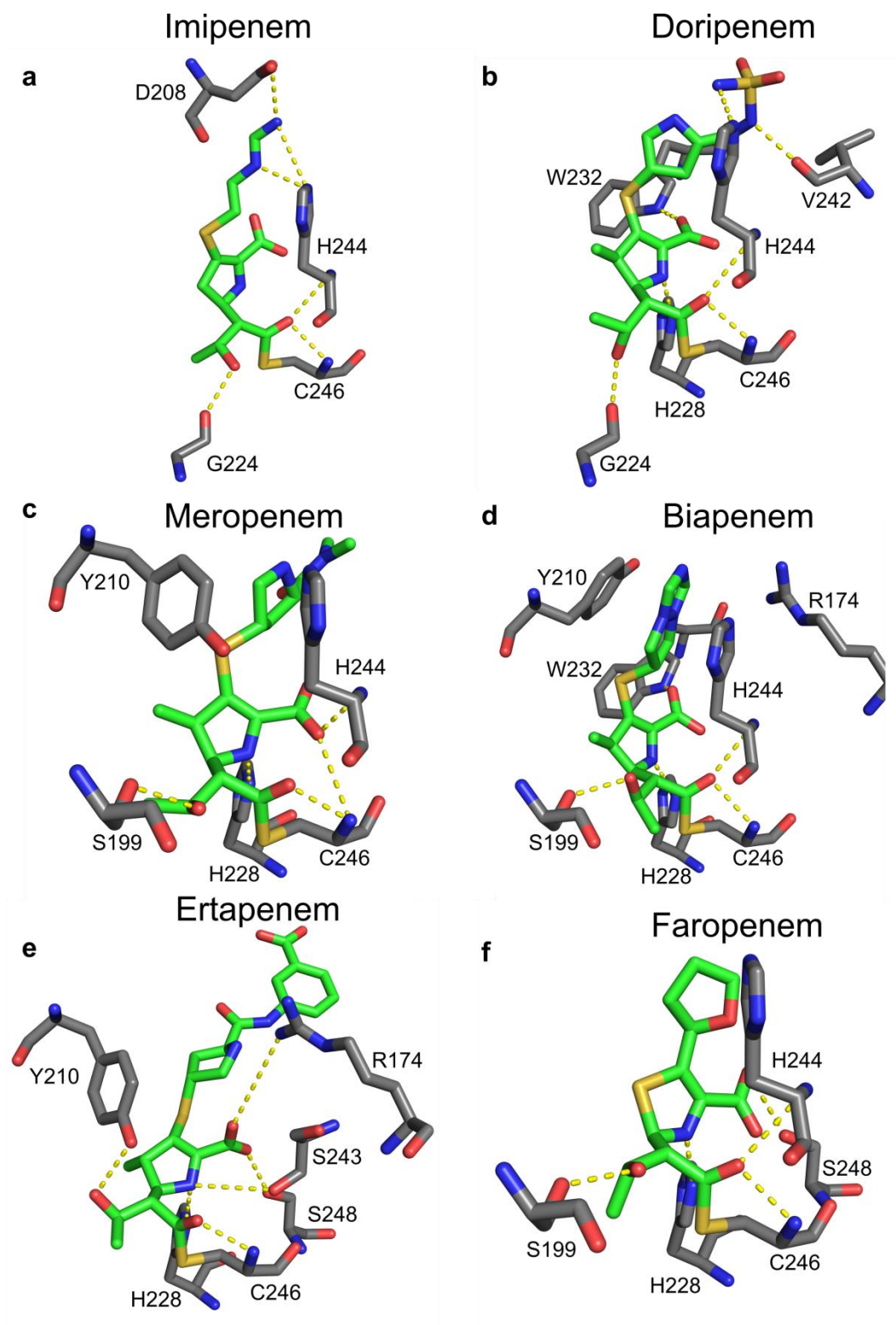


Figura 24. Diferentes modos de ligação dos β -lactâmicos à Ldt_{M13} . Modos de ligação preditas por *Docking* e seus respectivos *GlideScores* da interação de (a) Imipenem (-7,8), (b) Doripenem (-6,7), (c) Meropenem (-6,3), (d) Biapenem (-4,8), (e) Ertapenem (-6,4) e (f), Faropenem (-6,3) com Ldt_{M13} . Os átomos de carbono dos β -lactâmicos são representados em verde, entretanto os resíduos de Ldt_{M13} que participam das interações são representados em cinza. Os átomos de oxigênio, nitrogênio e enxofre estão representados em vermelho, azul e amarelo, respectivamente. As ligações de hidrogênio e as interações iônicas estão representadas por linhas pontilhadas amarelas.

5.5.5 Faropenem é degradado até um fragmento de acetila depois da acilação da Cys246

Com o propósito de compreender as bases estruturais da interação dos β -lactâmicos com Ldt_{Mt3}, foi resolvida a estrutura desta proteína em complexo com faropenem a 1,8 Å de resolução (Tabela 10). Todas as tentativas de obter a estrutura de Ldt_{Mt3} em complexo com outros β -lactâmicos foram insatisfatórias. Entretanto, a estrutura de Ldt_{Mt3} em complexo com faropenem mostrou só uma densidade eletrônica para um grupo acetila (C₂H₃O) covalentemente unido à Cys246. O oxigênio carbonílico da C₂H₃O está fazendo uma ponte de hidrogênio com o nitrogênio da cadeia principal de Cys246. Esta observação indica que o faropenem conseguiu acilar Ldt_{Mt3} e consequentemente inativá-la (Fig. 25a).

Tabela 10. Estatísticas de processamento de dados e refinamento da Ldt_{Mt3} acilada por faropenem

	Ldt_{Mt3} acilada
Código PDB	6D51
Coleta de dados	
Fonte de raios X	MX2 LNLS Campinas- Brasil
Comprimento de onda (Å)	1,458
Resolução (Å)	40,94-1,83 (1,89 - 1,83)
Grupo espacial	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Parâmetros de cela a, b, c (Å) α , β , γ (°)	44,1, 46,2, 110,7 90, 90, 90
Multiplicidade	12,3 (12,4)
Completeza (%)	99,9 (99,4)
I/ σ (I)	20,4 (2,2)
Wilson <i>B-factor</i>	26,72
R-merge	0,076 (1,143)
R-meas	0,079 (1,193)
CC1/2	0,999 (0,793)
Refinamento	
Reflexões usadas no refinamento	20565 (1995)
Reflexões usadas para R-free	1020 (107)
R-work	0,19 (0,348)
R-free	0,24 (0,348)
Número de moléculas (proteína)	1
Número de átomos diferentes de hidrogênio	1986
Macromoléculas	1781
ligantes	3
Resíduos de aminoácidos	235
Validação	
RMSD das ligações	0,007
RMSD dos ângulos	0,82
Ramachandran favoráveis (%)	95,2

Ramachandran permitidas (%)	4,3
Ramachandran não permitidas (%)	0,0
Rotâmeros não permitidos (%)	0
Índice de colisões	3,73
<i>B-factor</i> (média)	37,8
Proteína	37,8
ligantes	43,0
solvente	37,7

Previamente foi reportado que a Ldt_{Mt2} sofre uma mudança conformacional na região da tampa, adotando uma conformação aberta após a acilação com faropenem (STEINER *et al.*, 2017). Com o propósito de evidenciar as possíveis conformações (aberta ou fechada) na tampa de Ldt_{Mt3}, foi realizada uma sobreposição das estruturas apo e acilada por faropenem de Ldt_{Mt3}. Os resultados não indicaram variações na conformação da tampa (RMSD 0,276 Å para o alinhamento de 232 Cα). Enquanto uma sobreposição de formas aciladas da Ldt_{Mt1}, Ldt_{Mt2} e Ldt_{Mt3} apresentaram desvios até ~6 Å na alça B que conforma a tampa (RMSDs 1,3 e 1,9 Å para 184 e 216 Cα alinhados respectivamente) (Fig. 25b).

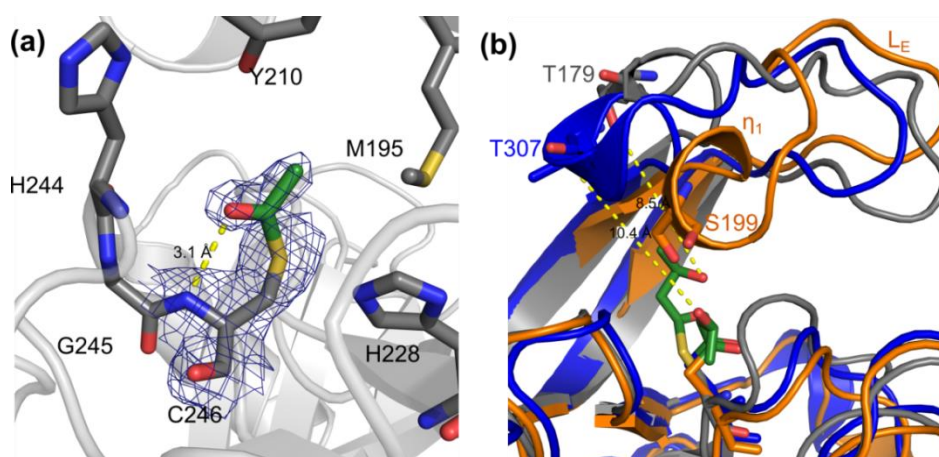


Figura 25. Degradação de faropenem depois da acilação da Ldt_{Mt3}. (a) Estrutura cristalográfica da Ldt_{Mt3} acilada por um grupo acetila derivado de faropenem. Mapa de densidade eletrônica ($2Fo-Fc$) contornado a 1σ para o aduto derivado do faropenem unido a Cys246. As linhas amarelas indicam a interação de hidrogênio entre este grupo acetila com o nitrogênio da Cys246. Alguns resíduos que conformam a cavidade catalítica estão representados em cinza. (b) Representação em cartoon da superposição das estruturas da Ldt_{Mt3} acilada por um grupo acetila PDB 6D51 em laranja, Ldt_{Mt1} PDB 5E51 em cinza e Ldt_{Mt2} PDB 5LBG em azul, aciladas por um fragmento de β -OH-butyrate. Ser199 é substituída por Thr179 e Thr307 nas estruturas da Ldt_{Mt1} e Ldt_{Mt2}, respectivamente. Thr179 está a 8,5 Å e Thr307 a 10,4 Å da função álcool do aduto, respectivamente. Loop E: L_E.

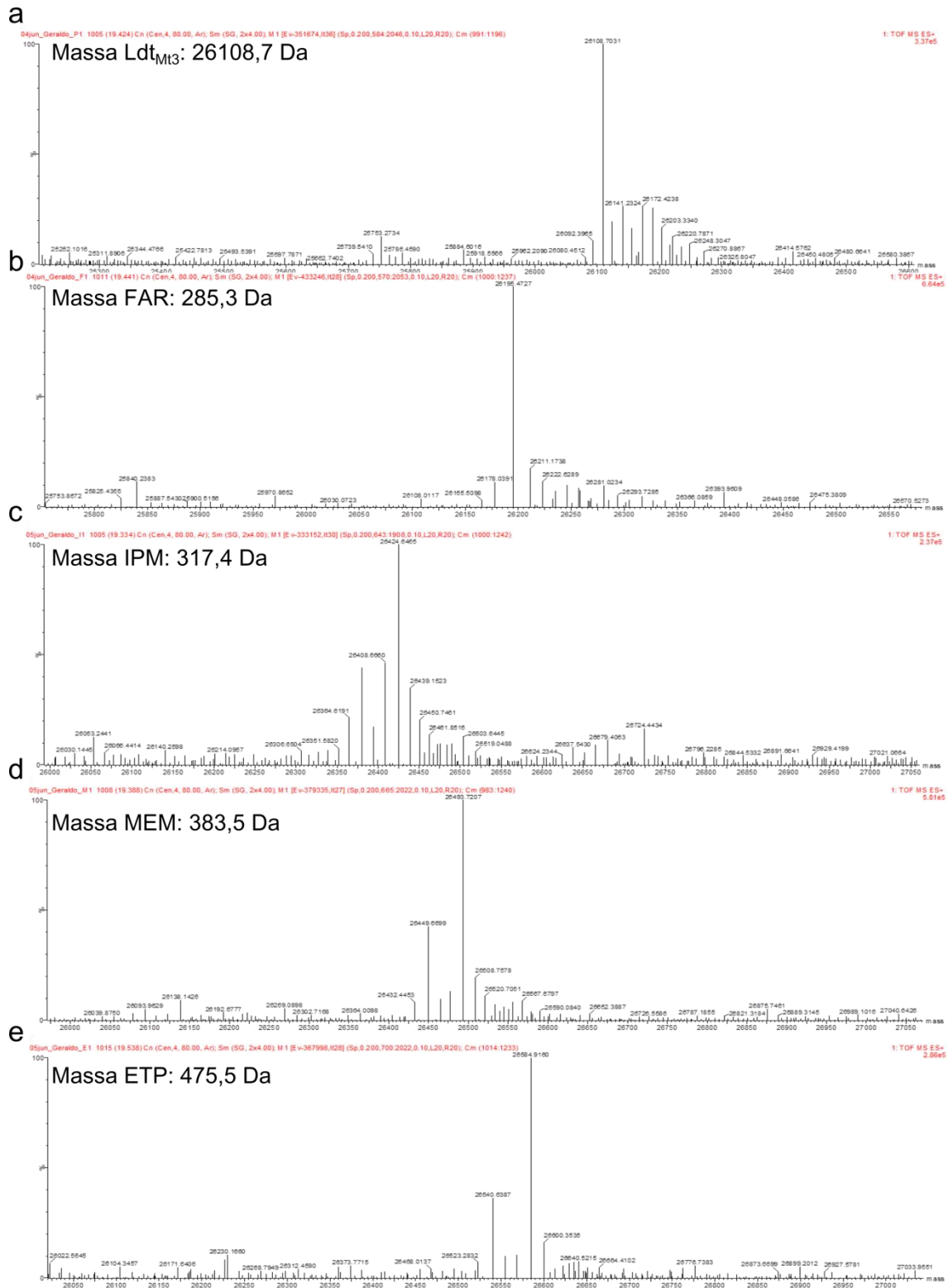
Para confirmar a acilação e a consequente degradação de faropenem depois de sua interação com Ldt_{Mt3}, foi realizado um experimento de espectrometria de

massas com a proteína intacta (Fig. 26 e tabela 11). Os resultados sugerem que nenhum dos carbapenêmicos sofre degradação depois da acilação da Ldt_{Mt3} e desta forma mantêm sua massa intacta. Por outro lado, faropenem sofre uma degradação depois de sua interação com Ldt_{Mt3}, como foi evidenciado pela presença de um fragmento de ~87 Da. Essa observação já tinha sido reportada previamente para as formas aciladas de Ldt_{Mt1} e Ldt_{Mt2} pelo faropenem (KUMAR *et al.*, 2017; STEINER *et al.*, 2017), e que neste caso também pode corresponder a um fragmento de β -OH-butirato. Esses resultados indicam que os mecanismos de ligação e posterior processamento de faropenem depois da acilação pela Ldt_{Mt3} devem ser similares entre as L,D-transpeptidases de *M. tuberculosis*.

A inconsistência entre nossos dados estruturais e os de espectrometria de massas podem ser explicados por uma reação retro-aldólica adicional, que eventualmente esta enzima possa catalizar, diferentemente do observado para a Ldt_{Mt1} and Ldt_{Mt2}. Além disso, esta reação poderia ter ocorrido devido ao prolongado tempo de incubação para cristalização (semanas), diferente do tempo de reação para os experimentos de espectrometria de massas que foram de 72 h.

Tabela 11. Análises por espectrometria de massas dos adutos covalentes formados entre a Ldt_{Mt3} e antibióticos β -lactâmicos

Antibiótico β -lactâmico	massa do β -lactâmico (Da)	Média da massa observada	Diferença da massa ligada	Interpretação
Faropenem	285,31	26195,5	86,8	Fragmento ligado
Imipenem	317,36	26424,6	315,9	Massa completa ligada
Meropenem	383,46	26493,7	385,0	Massa completa ligada
Ertapenem	475,52	26584,9	476,2	Massa completa ligada
Biapenem	350,39	26460,7	352,0	Massa completa ligada
Doripenem	420,50	26530,2	421,5	Massa completa ligada



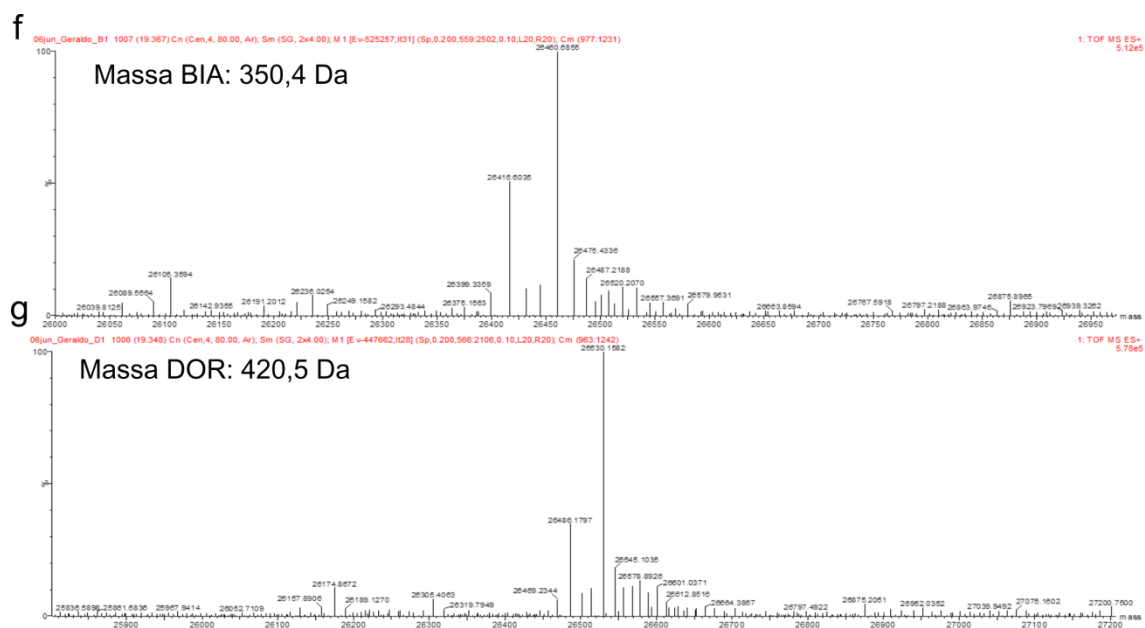


Figura 26. Análises da espectrometria de massa da Ldt_{M13} na presença de antibióticos β -lactâmicos. Ldt_{M13} foi incubada em ausência e presença de seis antibióticos β -lactâmicos (2,5 mM) a 4 ° C durante 72 h. (a) Proteína sem antibiótico. O pico de 26108,7 Da corresponde ao Ldt_{M13} na sua forma apo. (b) Ldt_{M13} na presença de faropenem. O pico com maior intensidade corresponde a Ldt_{M13} acilada por um fragmento derivado do faropenem (26195,4 Da). (c-g) Painéis de Ldt_{M13} incubada com cinco carbapenêmicos. Os picos com maiores intensidades correspondem a Ldt_{M13} mais a massa total de imipenem (26424,6 Da) (c), meropenem (26493,7 Da) (d), ertapenem (26584,9 Da) (e), Biapenem (26460,7 Da) (f), e Doripenem (26530,2 Da) (g).

5.5.6 Mecanismo proposto de degradação de faropenem depois da acilação de Ldt_{M13}

Com o objetivo de obter informações sobre o mecanismo bioquímico de degradação do faropenem após a acilação de Cys246, foram realizadas simulações de *docking* com cada intermediário esperado. Nossa proposta está baseada em mecanismos de degradação do faropenem proposto para L,D-transpeptidases (KUMAR *et al.*, 2017). Além disso, a reação retroaldólica que leva à eliminação da porção β -hidroxicarbonila dos substituintes C6 dos β -lactâmicos propostos para as β -lactamases BlaC (HUGONNET *et al.*, 2009) e carbapenemases derivadas de *Acinetobacter* (ADC) (DRAWZ *et al.*, 2010) também foram consideradas (Fig. 27).

Na etapa 1, representa-se o reconhecimento do faropenem pela enzima, antes da formação da ligação covalente. O faropenem ficou posicionado na cavidade externa (OC) de Ldt_{M13} e foi predita a formação de interações de hidrogênio com Ser199, His228, His244 e Cys246. Neste modo de ligação, o carbono carbonílico do anel β -lactâmico é posicionado próximo ao grupo SH de Cys246 em uma orientação coerente com a formação da ligação covalente. Posteriormente, um H⁺ pode ser transferido do SH da Cys246 para o N^{ε2} da His228 favorecendo o ataque nucleofílico

do carbono carbonílico. A etapa 2 possivelmente envolve uma molécula de água, que é semelhante ao mecanismo de ligação covalente e a hidrólise do meropenem pela serina β -lactamase OXA-23 (SGRIGNANI *et al.*, 2016). Este intermediário é estabilizado por ligações de hidrogênio com a Gly224, His244, Cys246 e Ser248.

Na etapa 3 ocorre uma reação retroaldólica, assim como relatado durante a acilação de Ldt_{Mt1} e Ldt_{Mt2} pelo faropenem, levando a um aduto de β -OH-butirato (KUMAR *et al.*, 2017; STEINER *et al.*, 2017). Este intermediário é estabilizado pela Arg174, Ser248 e Cys246. A etapa 4 indica uma segunda reação retro-aldólica semelhante à descrita para a decomposição do substituinte hidroxietila em C6 dos carbapenêmicos pelas β -lactamases BlaC e ADC (HUGONNET *et al.*, 2009; DRAWZ *et al.*, 2010). Ser199, localizada em η 1 a 2,9 Å do oxigênio do β -OH-butirato, pode atuar como a base para desprotonar a porção β -hidroxicarbonila do substituinte C6. A carga negativa no grupo carbonila poderia ser suportada pelas cadeias laterais da His244 e Cys246 no *oxyanion hole*. Esta reação pode levar à degradação do aduto β -OH-butirato em acetila. Finalmente, na etapa 5, o oxigênio carbonílico do aduto Ldt_{Mt3}-acetil é coordenado pela cadeia principal do nitrogênio da Cys246 e mantém a enzima na forma inativada, uma vez que a taxa de hidrólise de faropenem depois da acilação de Ldt_{Mt3}, é dezessete vezes mais lenta que a taxa de inativação (DHAR *et al.*, 2015).

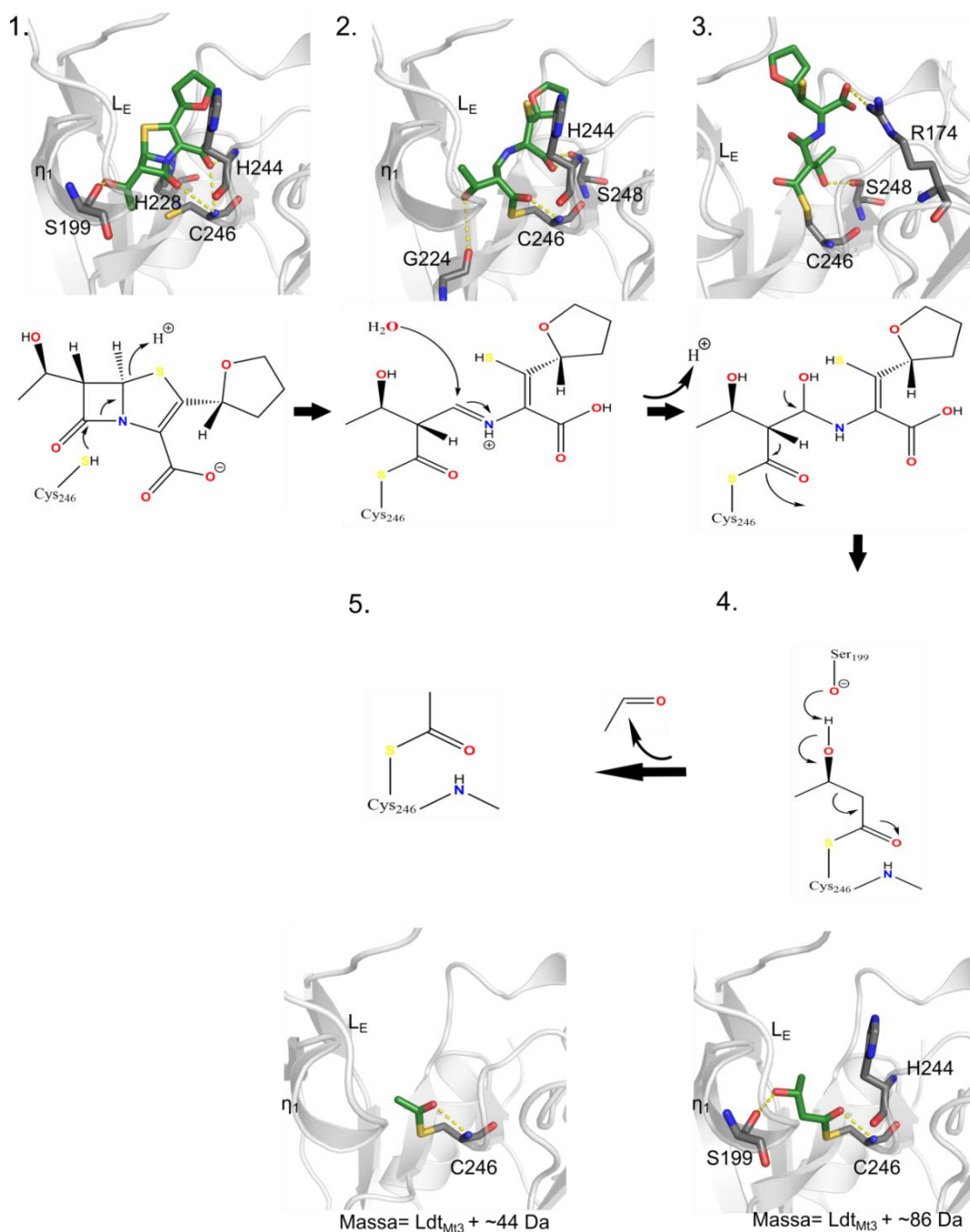


Figura 27. Mecanismo proposto de acilação e degradação de faropenem durante a interação com Ldt_{M13} . Cada etapa está representada por uma imagem tridimensional gerada por *docking* (painéis externos) e as correspondentes reações químicas bidimensionais (painéis internos). Os átomos de carbono dos resíduos da Ldt_{M13} e faropenem e derivados são representados em cinza e verde, respectivamente; enquanto que os resíduos de nitrogênio, oxigênio e enxofre são azuis, vermelhos e amarelos, respectivamente. A massa de $Ldt_{M13} + \sim 86$ Da, na etapa 4, representa o ganho de massa da enzima por um aduto de β -OH-butiato como é evidenciado nos experimentos de espectrometria de massas; entretanto, a massa de $Ldt_{M13} + \sim 44$ Da, na etapa 5, representaria o ganho de massa da enzima por um aduto de acetila, como foi evidenciado por cristalografia de raios X.

5.6. Triagem de fragmentos com L,D- transpeptidases de *M. tuberculosis*

5.6.1 Identificação de *hits* por ensaios de fluorimetria de varredura diferencial (DSF)

Com o objetivo de buscar moléculas diferentes dos β -lactâmicos que se liguem às L,D-transpeptidases e que sirvam de base para a síntese de futuros inibidores destas enzimas, realizou-se uma triagem de fragmentos usando uma biblioteca com cerca 365 moléculas que estão dentro da regra dos três (CONGREVE *et al.*, 2003).

Inicialmente Ldt_{Mt2}, Ldt_{Mt3} e Ldt_{Mt5} a 10 μ M cada, foram usadas para a triagem de fragmentos por DSF, usando concentrações finais de fragmentos entre 5-8 mM. As T_m para Ldt_{Mt2}, Ldt_{Mt3} e Ldt_{Mt5} em presença de 8% de DMSO foram de $38,8 \pm 0,73$ °C, $38,6 \pm 0,63$ °C e $41,8 \pm 0,56$ °C. Estes valores de T_m foram inferiores aos determinados para as enzimas na ausência de DMSO (Tabela 7), sugerindo que na concentração usada de DMSO, as três enzimas foram desestabilizadas. Resultados similares foram reportados para o receptor do hormônio de crescimento humano (hGHbp) e o domínio fosfatase de PFKFB1 (BPase) em presença de baixas concentrações de DMSO (TJERNBERG *et al.*, 2006).

A frequência de *hits* identificados por DSF para cada uma das três L,D-transpeptidases testadas, aqueles que estabilizaram as enzimas, foi de 34/365 (9,3%), 18/365 (4,9%) e 105/365 (28,7%) para Ldt_{Mt2}, Ldt_{Mt3} e Ldt_{Mt5}, respectivamente (Fig. 28). Outros fragmentos da biblioteca que não foram considerados como *hits*, induziram diminuição da T_{mRef} , sugerindo a estabilização do estado desenovelado destas enzimas (CIMMPERMAN *et al.*, 2008) ou foram fragmentos que agregaram e causaram posteriormente a desestabilização e desenovelamento das proteínas (MCDONNELL *et al.*, 2009). Outros fragmentos foram também excluídos porque mostraram curvas de desenovelamento térmico atípicas que não permitiram a determinação da T_m . Por exemplo, compostos que induziram elevada fluorescência a 25°C (MCDONNELL *et al.*, 2009).

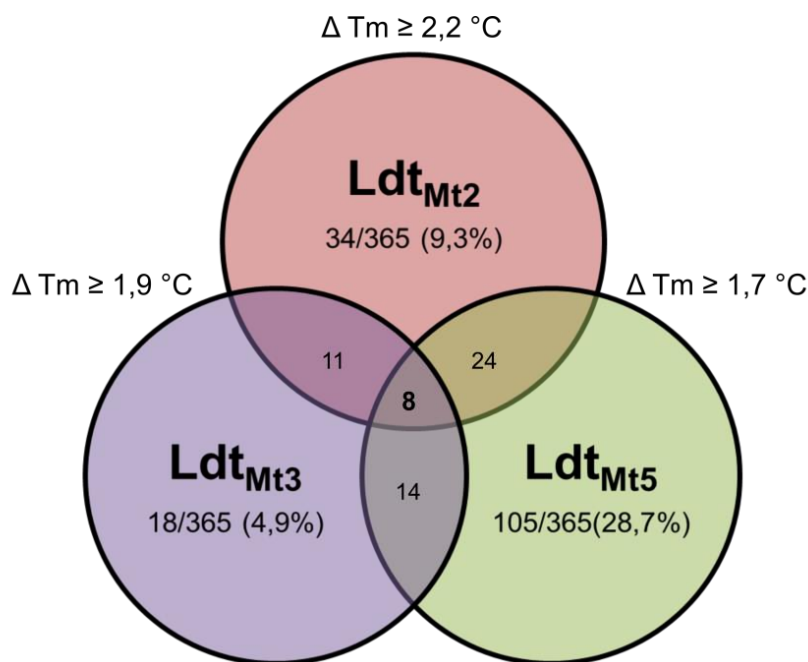


Figura 28. Distribuição dos *hits* de fragmentos identificados para três L,D-transpeptidases de *M. tuberculosis* por DSF.

A frequência de *hits* obtidos para Ldt_{Mt3} por DSF é similar ao reportado para pantotenato sintetase (3,1%) (SILVESTRE *et al.*, 2013), o receptor Notch-1 (3,2%) (ABDEL-RAHMAN *et al.*, 2011) e um mutante de p53 (2,4%) (BASSE *et al.*, 2010) em estudos de triagem de fragmentos por DSF. As frequências obtidas para Ldt_{Mt2} e Ldt_{Mt5} foram significativamente superiores aos reportados em outros estudos de triagem de fragmentos, o qual pode ser devido a falsos positivos que deveriam se confirmar com outros testes biofísicos de interação como a ressonância plasmônica de superfície (SPR), *Saturation Transfer Difference* (STD)-NMR, ou a termoforese em microescala (MST) (SILVESTRE *et al.*, 2013; LINKE *et al.*, 2016).

As faixas de ΔT_m induzidos pelos fragmentos oscilaram entre 2-8°C para Ldt_{Mt2}, 1,9-5,4°C para Ldt_{Mt3} e 1,7-10,7°C para Ldt_{Mt5}. Do total de fragmentos identificados para Ldt_{Mt2}, 11/34 (32,4%) foram comuns entre Ldt_{Mt2} e Ldt_{Mt3} entretanto, 24/34 fragmentos (70,5%) coincidiram entre Ldt_{Mt2} e Ldt_{Mt5}. O 77% dos fragmentos identificados para Ldt_{Mt3} foram identificados também para a Ldt_{Mt5} (14/18) e somente oito (8) fragmentos foram comuns entre as três enzimas testadas (Fig. 28 e 29).

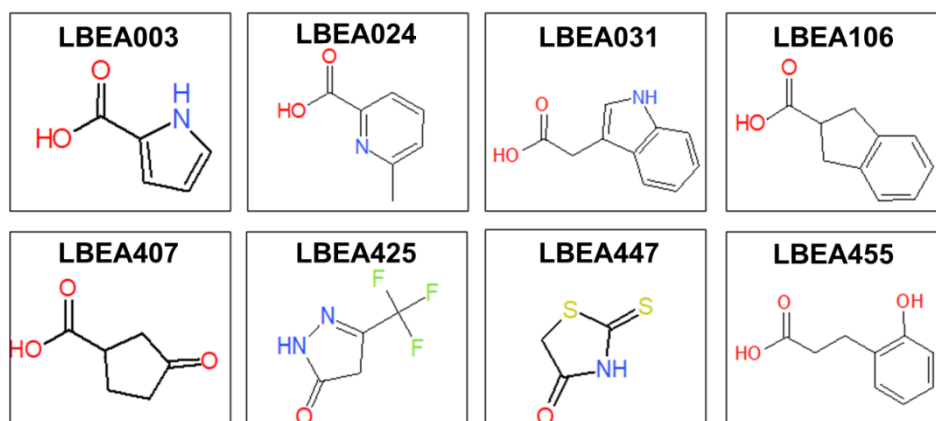


Figura 29. Estruturas de oito fragmentos comuns entre Ldt_{Mt2} , Ldt_{Mt3} e Ldt_{Mt5}

5.6.2 Validação de *hits* e determinação da afinidade por termoforese em microescala (MST)

Com o propósito de validar os *hits* identificados por DSF e adicionalmente determinar as afinidades dos fragmentos pelas L,D-transpeptidases foram realizados ensaios de termoforese em microescala (MST) (Fig. 30). De um total de 34 fragmentos identificados para Ldt_{Mt2} por DSF, dezessete (50%) interagiram com Ldt_{Mt2} por MST, entretanto somente quinze fragmentos (42,8%) mostraram curvas de dose-resposta com estados ligado e não ligado claramente definido que permitem a determinação de K_D , que estiveram entre 10 a 3300 μM (Tabela 12).

Dos dezoito fragmentos testados por MST para Ldt_{Mt3} , cinco (27,7%) interagiram com esta enzima; porem, só quatro fragmentos (22,2%) mostraram curvas de dose-resposta e $K_D \leq 200 \mu\text{M}$ (Tabela 12). A porcentagem de *hits* obtidos por MST para Ldt_{Mt2} e Ldt_{Mt3} foram similares aos reportados para a validação de fragmentos da proteína MEK-1 por MST automatizado (37,8% com afinidades $\leq 200 \mu\text{M}$) (LINKE *et al.*, 2016); embora sejam superiores as frequências de *hits* obtidas na triagem aleatória de bibliotecas de fragmentos por Ressonância Magnética Nuclear (NMR) (5-10% dependendo do alvo). Estes resultados suportam o uso de DSF como uma estratégia inicial de pre-triagem ou enriquecimento de *hits* em estudos de triagem e validação de fragmentos.

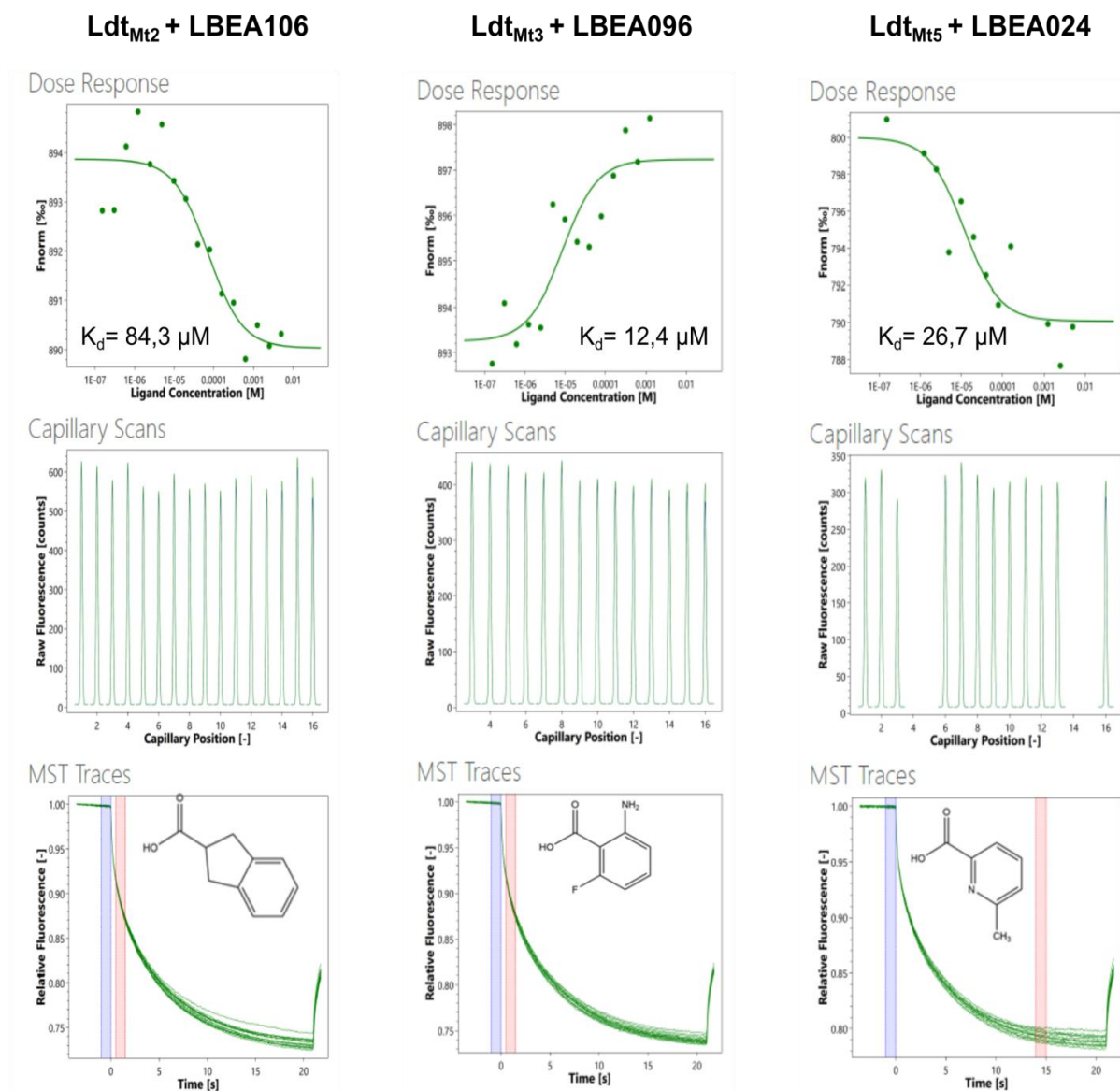


Figura 30. Determinação da afinidade dos fragmentos para as três L,d-transpeptidases de *M. tuberculosis* por termoforese em microescala (MST). As concentrações de Ldt_{Mt2}, Ldt_{Mt3} e Ldt_{Mt5} marcadas com a sonda fluorescente foram mantidas constantes a 30, 60 e 100 nM respectivamente, enquanto a concentração dos ligantes foi variada entre 62,5 nM a 2,5 mM. Nos painéis superiores apresentam-se as curvas de dose resposta para três fragmentos que interagem com as três L,d-transpeptidases testadas. Nessas figuras, o eixo x indicava a concentração (M) de cada ligante e o eixo y a porcentagem da fluorescência (F) normalizada. Nos painéis do meio estão representados a varredura da intensidade de fluorescência dos 16 capilares usados em cada experimento e cuja variação foi menor do que 10%. Nos painéis inferiores, os espectros de MST para cada ligante [Fluorescência relativa vs. tempo]. A barra azul representa o MST no tempo 0 ou tempo frio. Uma vez que a amostra é aquecida pelo laser, os espectros de MST podem ser medidos em um tempo ≥ 5 s (barra rosa) sempre que a relação sinal-ruído seja maior do que 5.

Devido ao elevado número de *hits* obtidos para Ldt_{Mt5} por DSF (105 em total) foi considerado inviável testar todos por MST neste trabalho. Assim, foram selecionados somente os oito fragmentos que foram comuns entre as três enzimas,

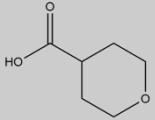
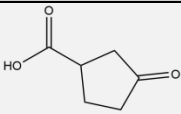
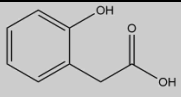
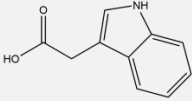
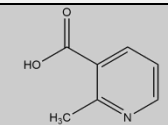
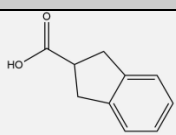
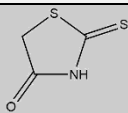
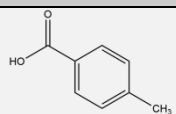
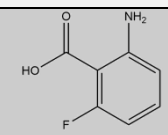
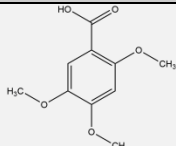
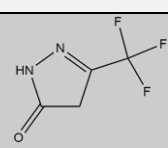
para ser testados contra Ldt_{Mt5} por MST. Desses oito fragmentos, quatro mostraram interação com Ldt_{Mt5} e K_D entre 10 e 420 μ M (Tabela 12).

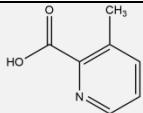
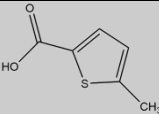
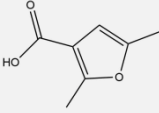
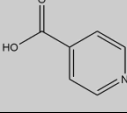
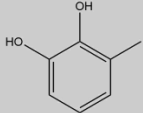
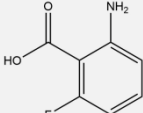
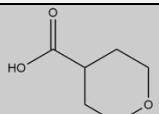
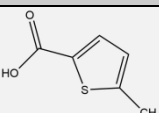
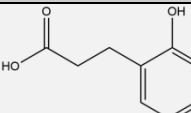
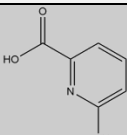
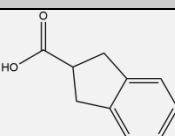
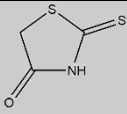
Dezesseis dos dezoito fragmentos identificados por MST para Ldt_{Mt2}, Ldt_{Mt3} e Ldt_{Mt5}, continham um anel de 5 e 6 membros e somente dois fragmentos (Frag 4 e Frag 6) eram anéis heterocíclicos fusionados de 5 e 6 membros (Tabela 12). Uma característica importante da maioria desses *hits* (15/18) foi a presença do grupo carboxila que poderia facilitar a interação desses compostos com resíduos carregados positivamente no sítio ativo das L,D-transpeptidases.

Dos quinze fragmentos identificados para a Ldt_{Mt2}, sete (Frag 1 a Frag 7) mostraram alta afinidade ($\leq 200 \mu$ M); quatro fragmentos (Frag 8 a Frag 11) tiveram afinidade intermediária entre 200 e 800 μ M e outros quatro fragmentos (Frag 12 - Frag 15) apresentaram baixa afinidade ($\geq 800 \mu$ M). As afinidades dos quatro fragmentos identificados para Ldt_{Mt3} (Frag 1, Frag 9, Frag 13 e Frag 16) e dos três fragmentos para Ldt_{Mt5} (Frag 6, Frag 17 e Frag 18) apresentaram uma afinidade menor que 200 μ M. Por outro lado, o Fragmento 7 apresentou uma afinidade intermediária ($K_D = 420 \mu$ M) para a Ldt_{Mt5}.

As faixas de eficiência de ligação (LE) dos fragmentos que ligam a Ldt_{Mt2} oscilaram entre 0,78 (Frag 7) e 0,31 (Frag 10). Enquanto que a LE dos fragmentos da Ldt_{Mt3} estiveram entre 0,77 (Frag 16) e 0,43 (Frag 13). Finalmente a avaliação da LE para os fragmentos de Ldt_{Mt5} estiveram entre 0,43 (Frag 6) e 0,66 (Frag 7). Os valores de LE reportados aqui para as L,D-transpeptidases são superiores aos apresentados em outros estudos de triagem de fragmentos (SILVESTRE *et al.*, 2013). Isso pode ser devido às diferenças estruturais entre os *hits* identificados. Por exemplo, a maioria dos fragmentos identificados para a enzima pantotenato sintetase de *M. tuberculosis* por SILVESTRE *et al.*, 2013 continham dois anéis de 5 e 6 membros, enquanto que os fragmentos identificados para as Ldts_{Mt}, em sua maioria apresentaram somente um anel.

Tabela 12. Caracterização dos fragmentos para três L,d-transpeptidases de *M. tuberculosis* identificados por DSF e MST

Nome	Código da biblioteca	Estrutura	ΔT_m (°C)	K_D (mM)	s^*	ΔG (Kcal/mol)	LE (Kcal/mol)/ NHA
Ldt_{Mt2}							
Frag 1	LBEA435		8,2	0,01 ± 0,001	0,58	-6,7	0,74
Frag 2	LBEA407		8,2	0,01 ± 0,001	0,89	-6,7	0,74
Frag 3	LBEA096		4,2	0,02 ± 0,002	0,84	-6,3	0,57
Frag 4	LBEA031		5,2	0,02 ± 0,002	1,02	-6,4	0,49
Frag 5	LBEA025		7,7	0,03 ± 0,003	0,91	-6,2	0,62
Frag 6	LBEA106		2,2	0,08 ± 0,007	0,60	-5,5	0,46
Frag 7	LBEA447		7,2	0,09 ± 0,01	1,01	-5,5	0,78
Frag 8	LBEA436		2,2	0,22 ± 0,02	1,08	-5,0	0,5
Frag 9	LBEA404		5,2	0,39 ± 0,03	0,46	-4,6	0,42
Frag 10	LBEA060		2,7	0,39 ± 0,04	0,94	-4,6	0,31
Frag 11	LBEA425		7,7	0,43 ± 0,05	1,27	-4,6	0,46

Frag 12	LBEA470		7,2	1,0 ± 0,006	0,87	-4,1	0,41
Frag 13	LBEA120		2,7	1,9 ± 0,2	0,69	-3,7	0,41
Frag 14	LBEA116		6,7	3,0 ± 0,3	0,41	-3,4	0,34
Frag 15	LBEA457		3,7	3,3 ± 0,3	1,15	-3,4	0,37
Ldt_{Mt3}							
Frag 16	LBEA149		5,4	0,007 ± 0,0009	1,36	-7,0	0,77
Frag 9	LBEA096		1,9	0,01 ± 0,001	1,64	-6,7	0,61
Frag 1	LBEA435		1,9	0,13 ± 0,02	1,08	-5,3	0,58
Frag 13	LBEA120		1,9	0,14 ± 0,02	0,54	-5,2	0,43
Ldt_{Mt5}							
Frag 17	LBEA455		10,7	0,01 ± 0,004	1,32	-6,6	0,55
Frag 18	LBEA024		5,2	0,03 ± 0,002	1,3	-6,2	0,62
Frag 6	LBEA106		5,2	0,07 ± 0,007	2,0	-5,6	0,43
Frag 7	LBEA447		8,7	0,42 ± 0,04	0,82	-4,6	0,66

* O valor s corresponde ao erro padrão da regressão.

5.6.3 Docking de fragmentos

Para investigar quais resíduos da Ldt_{Mt2}, Ldt_{Mt3} e Ldt_{Mt5} interagem com os fragmentos identificados pelos testes de MST, foram realizadas simulações por *docking*. Os resultados indicaram que a maioria dos fragmentos com melhor *XPscore* posicionam-se nas cavidades externas (OC) das três enzimas. Este resultado é similar as posições obtidas pela maioria dos carbapenêmicos nas estruturas cristalográficas para Ldt_{Mt2} (BIANCHET *et al.*, 2017; KUMAR *et al.*, 2017) (Fig. 31).

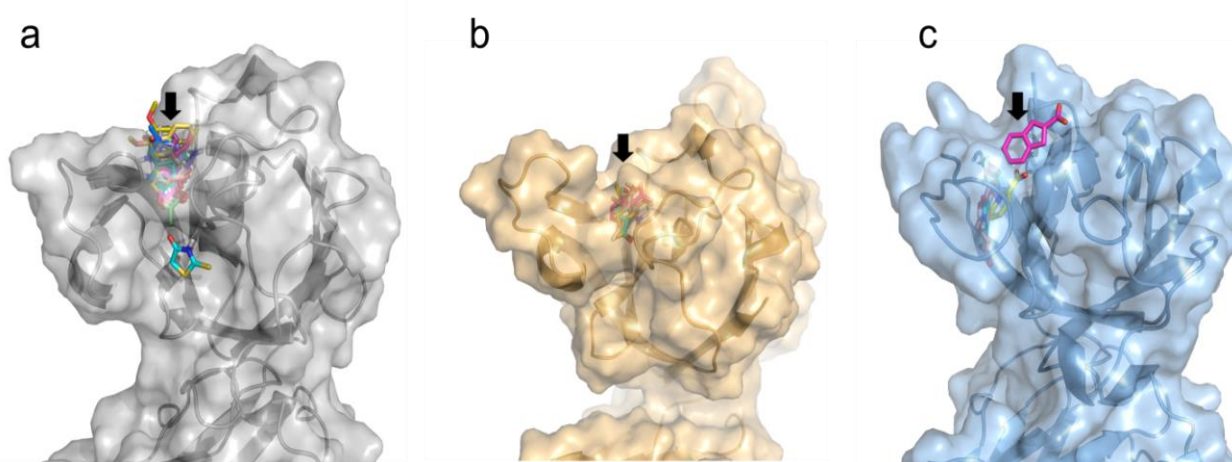


Figura 31. Distribuição de fragmentos na cavidade catalítica das três L,d-transpeptidases de *Mycobacterium tuberculosis*. A maior proporção das poses dos fragmentos localizou-se na cavidade externa (seta preta) de (a) Ldt_{Mt2}, (b) Ldt_{Mt3} e (c) Ldt_{Mt5}.

Com o propósito de explorar se a magnitude do ΔT_m induzido pelos fragmentos sobre a Ldt_{Mt2} estava relacionado com a afinidade da enzima por esses compostos realizou-se um teste correlação de *Spearman* usando um $\alpha=0,05$ e 95% de intervalo de confiança. Entretanto, não se encontrou correlação entre a magnitude do ΔT_m e a afinidade de Ldt_{Mt2} pelos 15 fragmentos testados ($r = -0,27$; $P = 0,29$) nesta análise.

Seis resíduos de Ldt_{Mt2} foram preditos interagir com os quinze fragmentos conferidos por MST: Tyr318, Thr320, Trp340, His352, Cys354 e Asn356 (Fig. 32). O fragmento 1 realizou interações de hidrogênio com as cadeias laterais do Trp340 e Asn356 (Fig. 32a), enquanto o fragmento 2 apresentou interações de hidrogênio com o grupo amida das cadeias centrais da His352 e Cys354 (Fig. 32b). Para os fragmentos 3 e 5 foram preditas ligações de hidrogênio com as cadeias centrais da

His352 e Cys354 e a cadeia lateral da Thr320. Os anéis aromáticos destes dois fragmentos realizaram interações *pi-stacking* com a His352 e Trp340 (Fig. 32c).

Os fragmentos 4, 10 e 12 realizam ligações de hidrogênio com a His352 e Asn356, além de interações *pi-stacking* com o Trp340 e His352 (Fig. 32d). O fragmento 6 interagiu com a His352 e Cys354 através de ligações de hidrogênio e com a His352 fazendo interações *pi-stacking* (Fig. 32e). O fragmento 7 foi o único posicionado na cavidade interna da Ldt_{Mt2}, fazendo interações de hidrogênio com a hidroxila da Tyr318 e a cadeia lateral da His352 (Fig. 32f).

Para os fragmentos 8, 11 e 13 (Fig. 32g), foram preditas interações de hidrogênio com Asn356 e *pi-stacking* com o Trp340 e His352. O fragmento 9 realizou interações de hidrogênio com a Thr320, His352 e Asn356 e *pi-stacking* com Trp340 e His352 (Fig. 32h). Para o fragmento 14 foram preditas interações de hidrogênio com Asn356 e *pi-stacking* com a Tyr318 e His352 (Fig. 32h). Finalmente, o fragmento 15 realizou interações de hidrogênio com as cadeias laterais da His352 e Cys354 e *pi-stacking* com os anéis presentes na Tyr318, Trp340 e His352 (Fig. 32j).

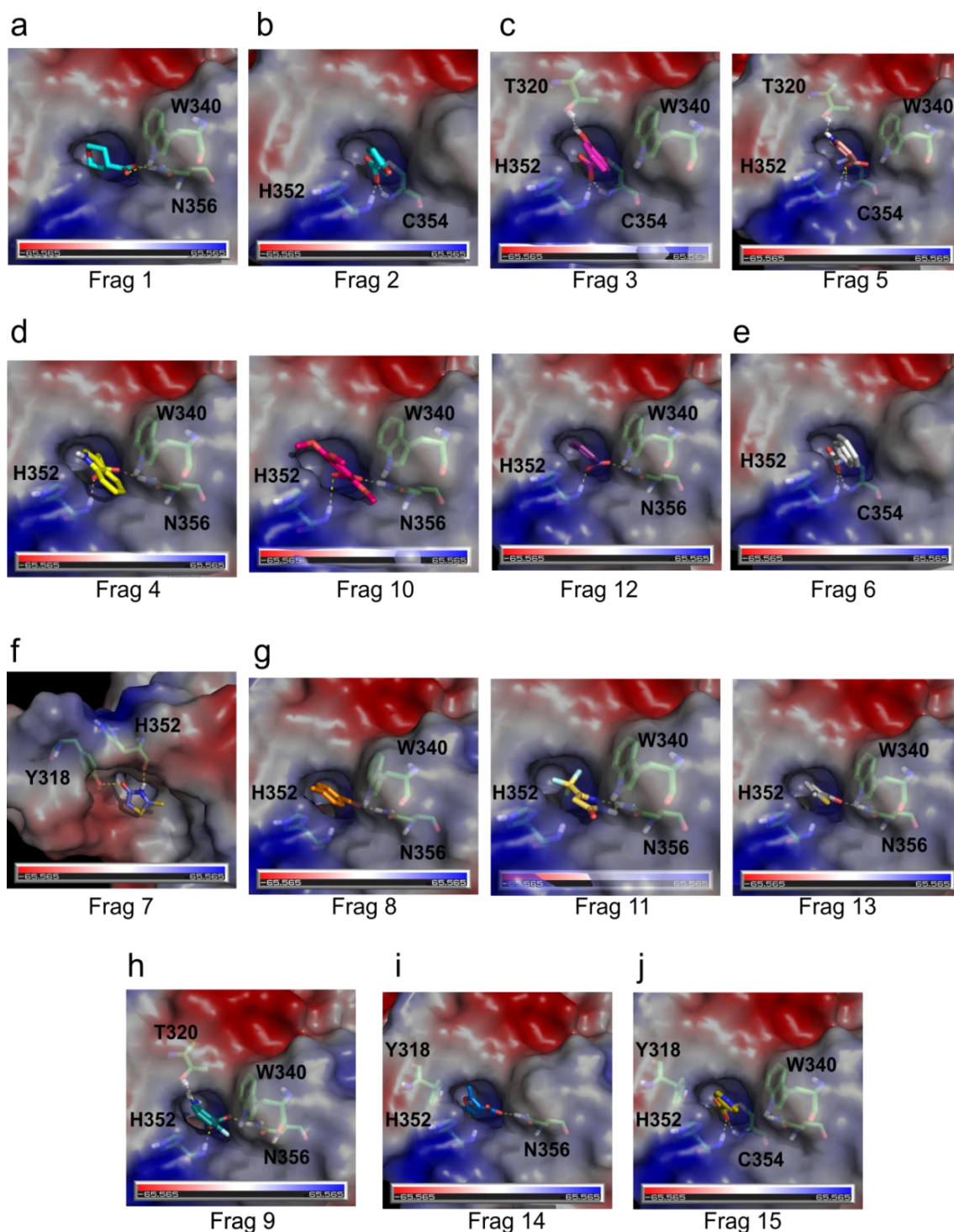


Figura 32. Possíveis poses de ligação dos quinze fragmentos à Ldt_{M12} . Modos de ligação preditas por *Docking* e seus respectivos XPScores em parêntesis para as interações entre Ldt_{M12} e (a) Fragmento 1 (-4,97), (b) Fragmento 2 (-3,27), (c) Fragmentos 3 e 5 (-4,65 e -3,64), (d) Fragmentos 4, 10 e 12 (-3,90; -4,19 e -3,56), (e) Fragmento 6 (-3,67) (f) Fragmento 7 (-3,46), (g) Fragmentos 8, 11 e 13 (-3,35; -6,43; -3,11), (h) Fragmento 9 (-4,31), (i) Fragmento 14 (-3,49), (j) Fragmento 15 (-3,05). Os átomos de carbono dos aminoácidos que participam na interação são representados em verde, entretanto, os átomos de oxigênio, nitrogênio e enxofre estão representados em vermelho, azul e amarelo, respectivamente. As ligações de hidrogênio estão representadas com linhas pontilhadas amarelas.

Tyr210, His228, Trp232, Cys246, Ser248 foram os aminoácidos preditos para as interações entre Ldt_{Mt3} e os quatro fragmentos confirmados por MST (Fig. 33). O fragmento 16 interagiu com as cadeias laterais do Trp232 e Ser248 através de ligações de hidrogênio e com o Trp232 e His 244 através de interações *pi-stacking* (Fig. 33a). O fragmento 9 realizou interações de hidrogênio com a His228 e Trp232 e *pi-stacking* com a Tyr210 (Fig. 33b). O fragmento 1 apresentou ligações de hidrogênio com as cadeias laterais da His244, Cys246 e Trp232 (Fig. 33c). O fragmento 13 realizou ligações de hidrogênio com a His244 e Cys246 e interações *pi-stacking* com a Tyr210 e Trp232 (Fig. 33d).

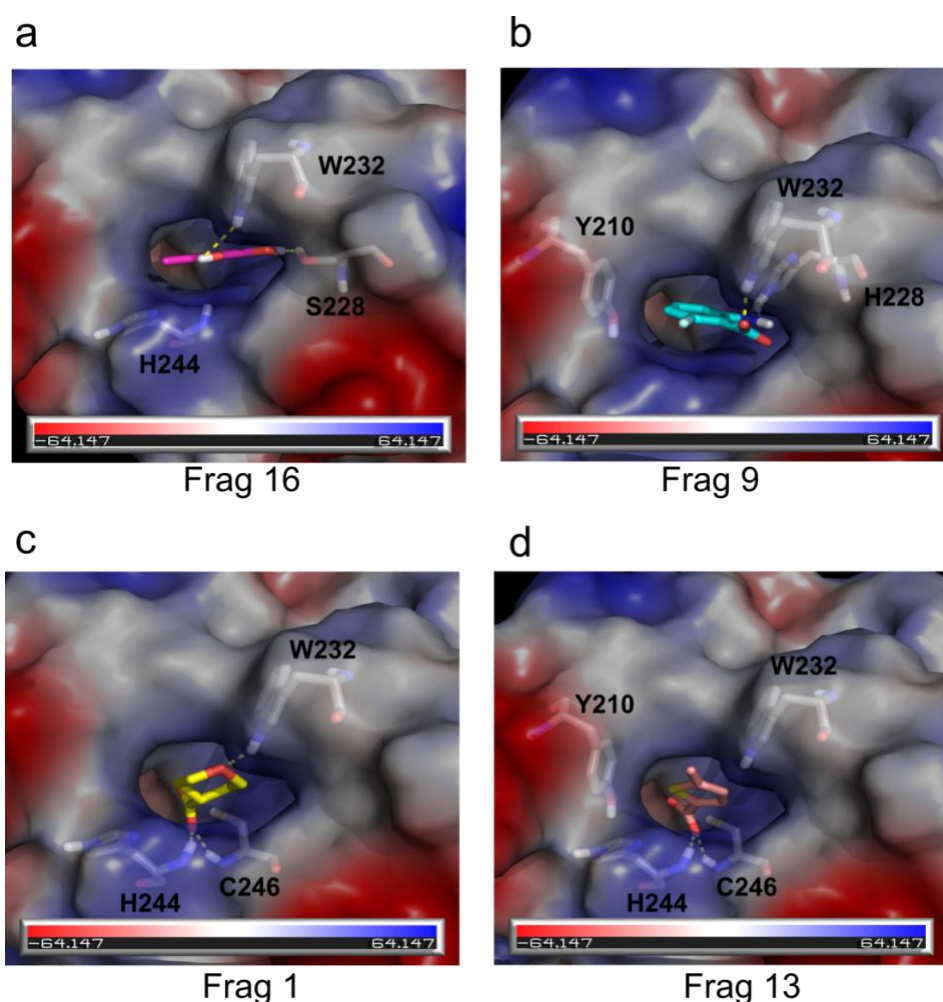


Figura 33. Possíveis modos de ligação de quatro fragmentos à Ldt_{Mt3}. Modos de ligação preditas por *Docking* e seus respectivos XPScores em parêntesis para as interações entre Ldt_{Mt3} e (a) Fragmento 16 (-5,54), (b) Fragmento 9 (-5,00), (c) Fragmento 1 (-4,36) e (d) Fragmento 13 (-3,67). Os átomos de carbono dos aminoácidos que participam nas interações são representados em cinza. Entretanto, os átomos de oxigênio, nitrogênio e enxofre estão representados em vermelho, azul e amarelo, respectivamente. As ligações de hidrogênio estão representadas com linhas pontilhadas amarelas.

Cinco resíduos de Ldt_{M15} foram preditos interagir com os quatro fragmentos que apresentaram afinidade por MST: Ala321, Glu328, Arg333, His342, Asn344 e Asn358 (Fig. 34). O fragmento 17 realizou interações de hidrogênio com a Arg333 e Ala321 (Fig. 34a). O fragmento 18 interagiu com o Glu328 e His342 através de ligação de hidrogênio e iônica, respectivamente (Fig. 34b). O fragmento 6 realizou interações de hidrogênio com Asn344 e Asn358, assim como *pi-stacking* com His342 (Fig. 34c). Finalmente, o fragmento 7 formou uma ponte de hidrogênio com a cadeia lateral de Glu328 (Fig. 34d).

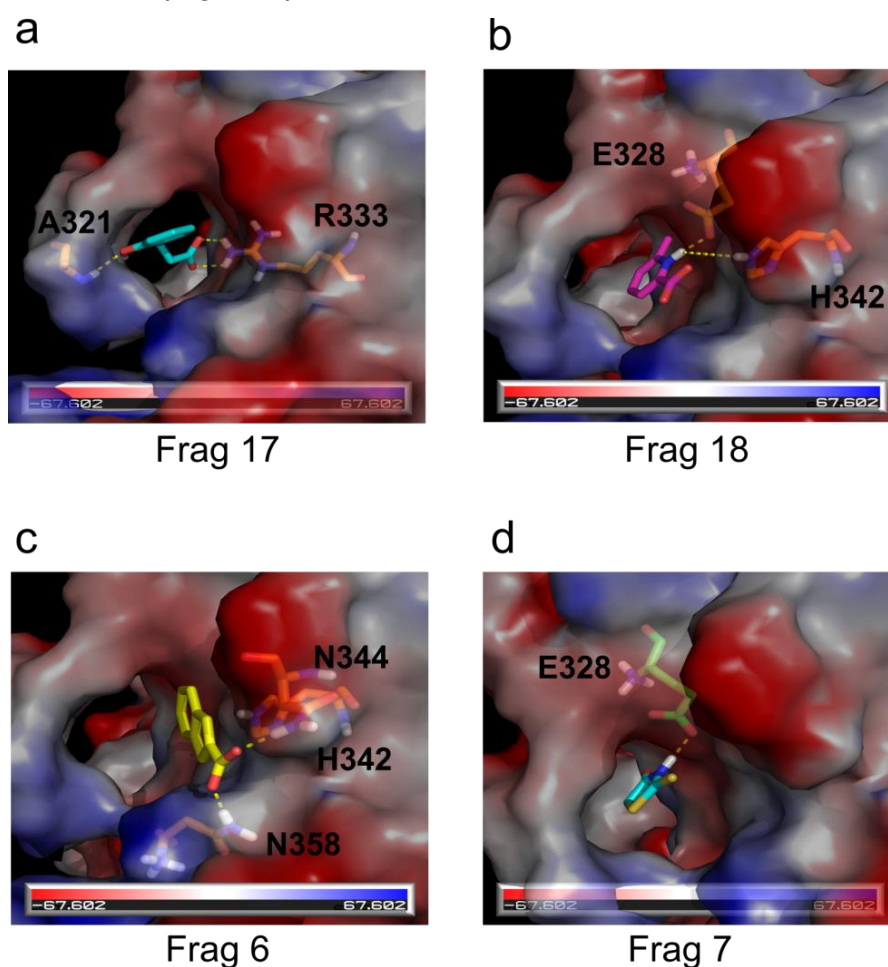


Figura 34. Possíveis modos de ligação de quatro fragmentos à Ldt_{M15}. Modos de ligação preditas por *Docking* e seus respectivos *XPScores* em parêntesis para as interações entre Ldt_{M15} e (a) Fragmento 17 (-3,88), (b) Fragmento 18 (-2,73), (c) Fragmento 6 (-2,91) e (d) Fragmento 7 (-4,55). Os átomos de carbono dos aminoácidos que participam nas interações são representados em cinza; entretanto, os átomos de oxigênio, nitrogênio e enxofre estão representados em vermelho, azul e amarelo respectivamente. As ligações de hidrogênio estão representadas com linhas pontilhadas amarelas.

6. CONCLUSÕES

- Este trabalho permitiu descrever estruturalmente a L,D-transpeptidase 3 de *Mycobacterium tuberculosis*. Esta enzima apresentou dois domínios característicos das Ldts_{Mt}: O domínio bacteriano de imunoglobulina (BigB) e o domínio catalítico (CD). Ldt_{Mt3} mostrou similaridades na triade catalítica e diferenças na topologia, volume e carga da cavidade catalítica quando comparada com suas homólogas em *M. tuberculosis*.
- Os resultados apresentados aqui demonstraram que Ldt_{Mt3} liga-se preferencialmente aos carbapenêmicos e ao faropenem com diferentes afinidades. A diferença dos carbapenêmicos que mantêm sua massa intacta depois da acilação, o faropenem sofre degradação ou processamento, permanecendo-se covalentemente unido à enzima, porém, somente um fragmento de ~87 Da correspondente a β -OH-Butirato ou um fragmento de acetila (C₂H₃O) são observados por espectrometria de massa e cristalografia de raios X, respectivamente.
- Os dados de *docking* apresentados aqui permitiram prever quais são os aminoácidos de Ldt_{Mt3} que interagem com os carbapenêmicos e com faropenem. Esta informação, somada com a determinação de faropenem com o melhor LELP, serve como estratégia para o planejamento das modificações químicas e a seleção de β -lactâmicos líderes. Estes resultados estão baixo revisão em JBC (Anexo 1).
- A L,D-transpeptidase 5 é a mais diferente entre todas suas homólogas em *M. tuberculosis*. Ldt_{Mt5} apresenta diferenças na tríade catalítica e carga do sítio ativo, o qual pode refletir na sua baixa capacidade de interação com os β -lactâmicos. Embora os ensaios de DSF identifiquem alguma interação com quatro β -lactâmicos, a afinidade desta interação foi impossível de ser determinada neste estudo.
- A identificação de 18 fragmentos que ligam Ldt_{Mt2}, Ldt_{Mt3} e Ldt_{Mt5} com afinidades entre 10 e 3300 μ M, assim como suas possíveis interações determinadas por *docking*, pode servir como ponto de partida para a síntese de novos inibidores (não β -lactâmicos) das L,D-transpeptidases de *M. tuberculosis*.

7. PERSPECTIVAS

- Realizar a caracterização estrutural de Ldt_{Mt4}, assim como a descrição de suas interações com antibióticos β -lactâmicos. Para isto, já apresentamos clonadas duas novas construções para a *ldtmt4* em colaboração com a doutoranda Catharina dos Santos Silva. Inicialmente deve-se padronizar as condições de expressão e purificação para estas novas construções.
- Determinar a cinética de inativação de Ldt_{Mt2}, Ldt_{Mt3} e Ldt_{Mt5} pelos dezoito fragmentos identificados usando o teste de inibição com nitrocefina previamente padronizado para L,D-transpeptidases (EDOO *et al.*, 2017).
- Realizar testes de concentração inibitória mínima (MIC) para os dezoito fragmentos identificados para Ldt_{Mt2}, Ldt_{Mt3} e Ldt_{Mt5} contra cultura de *Mycobacterium smegmatis*. Uma vez que esta micobactéria também expressa L,D-transpeptidases com identidade entre 30-40% com as de *M. tuberculosis* (Sanders *et al.*, 2014a). Adicionalmente, *M. smegmatis* tem sido avaliado como marcador substituto para a triagem e seleção de moléculas ativas contra *M. tuberculosis* (CHATURVEDI *et al.*, 2007).

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAHMAN, N.; MARTINEZ-ARIAS, A.; BLUNDELL, T. L. Probing the druggability of protein-protein interactions: targeting the Notch1 receptor ankyrin domain using a fragment-based approach. **Biochem Soc Trans**, v. 39, n. 5, p. 1327-33, Oct 2011.
- ABRAHAM, E. P. et al. Cephalosporin N: a new type of penicillin. **Nature**, v. 171, n. 4347, p. 343, Feb 1953.
- ANDRIES, K. et al. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 307, n. 5707, p. 223-7, Jan 2005.
- ASBÓTH, B.; POLGÁR, L. Transition-state stabilization at the oxyanion binding sites of serine and thiol proteinases: hydrolyses of thiono and oxygen esters. **Biochemistry**, v. 22, n. 1, p. 117-22, Jan 1983.
- BAILEY, S. The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. **Acta. Cryst.**, v. D50, p. 760-763, 1994.
- BASSE, N. et al. Toward the rational design of p53-stabilizing drugs: probing the surface of the oncogenic Y220C mutant. **Chem Biol**, v. 17, n. 1, p. 46-56, Jan 2010.
- BECKERT, P. et al. rplC T460C identified as a dominant mutation in linezolid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 5, p. 2743-5, May 2012.
- BETTS, J. C. et al. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling **Mol. Microbiol.**, v. 43, n. 3, p. 717-731, 2002.
- BIANCHET, M. A. et al. Structural insight into the inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* non-classical transpeptidase LdtMt2 by biapenem and tebipenem. **BMC Biochem**, v. 18, n. 1, p. 8, May 2017.
- BIARROTTE-SORIN, S. et al. Crystal structure of a novel beta-lactam-insensitive peptidoglycan transpeptidase. **J Mol Biol**, v. 359, n. 3, p. 533-8, Jun 2006.
- BIELNICKI, J. et al. B. subtilis ykuD protein at 2.0 Å resolution: insights into the structure and function of a novel, ubiquitous family of bacterial enzymes. **Proteins**, v. 62, n. 1, p. 144-51, Jan 2006.

BLAAZER, A. R.; DE ESCH, I. J. P. **From Molecular Understanding to Structure–Thermodynamic Relationships, the Case of Acetylcholine Binding Proteins** Germany Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2015. 334.

BRAMMER BASTA, L. A. et al. Loss of a functionally and structurally distinct L,D-transpeptidase, LdtMt5, compromises cell wall integrity in *Mycobacterium tuberculosis*. **J Biol Chem**, v. 290, n. 42, p. 25670-85, Oct 2015.

BROWN, A. G. et al. Naturally-occurring beta-lactamase inhibitors with antibacterial activity. **J Antibiot (Tokyo)**, v. 29, n. 6, p. 668-9, Jun 1976.

BÖTH, D. et al. Structure of LdtMt2, an L,D-transpeptidase from *Mycobacterium tuberculosis*. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 69, n. Pt 3, p. 432-41, Mar 2013.

CAMBAU, E.; SOUGAKOFF, W.; JARLIER, V. Amplification and nucleotide sequence of the quinolone resistance-determining region in the gyrA gene of mycobacteria. **FEMS Microbiol Lett**, v. 116, n. 1, p. 49-54, Feb 1994.

CAVA, F. et al. Distinct pathways for modification of the bacterial cell wall by non-canonical D-amino acids **EMBO Journal**, v. 30, n. 16, p. 3442-3453, 2011.

CHAIRES, J. B. Calorimetry and thermodynamics in drug design. **Annu Rev Biophys**, v. 37, p. 135-51, 2008.

CHAMBERS, H. F. et al. Activity of amoxicillin/clavulanate in patients with tuberculosis. **Clin Infect Dis**, v. 26, n. 4, p. 874-7, Apr 1998.

CHANG, Y.; LABGOLD, M.; RICHARDS, J. Altering enzymatic activity: Recruitment of carboxypeptidase activity into an RTEM beta-lactamase/penicillin-binding protein 5 chimera. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, p. 2823–2827, 1990.

CHATURVEDI, V. et al. Evaluation of *Mycobacterium smegmatis* as a possible surrogate screen for selecting molecules active against multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **J Gen Appl Microbiol**, v. 53, n. 6, p. 333-7, Dec 2007.

CHEN, J. et al. Identification of novel mutations associated with cycloserine resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **J Antimicrob Chemother**, v. 72, n. 12, p. 3272-3276, Dec 2017.

CHEN, W.; GREEN, K. D.; GARNEAU-TSODIKOVA, S. Cosubstrate tolerance of the aminoglycoside resistance enzyme Eis from *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 11, p. 5831-8, Nov 2012.

CHILINGARYAN, Z.; YIN, Z.; OAKLEY, A. J. Fragment-based screening by protein crystallography: successes and pitfalls. **Int J Mol Sci**, v. 13, n. 10, p. 12857-79, Oct 2012.

CIANCI, M. et al. P13, the EMBL macromolecular crystallography beamline at the low-emittance PETRA III ring for high- and low-energy phasing with variable beam focusing. **J Synchrotron Radiat**, v. 24, n. Pt 1, p. 323-332, 01 2017.

CIMMPERMAN, P. et al. A quantitative model of thermal stabilization and destabilization of proteins by ligands. **Biophys J**, v. 95, n. 7, p. 3222-31, Oct 2008.

CIULLI, A.; ABELL, C. Fragment-based approaches to enzyme inhibition. **Curr Opin Biotechnol**, v. 18, n. 6, p. 489-96, Dec 2007.

COLE, S. T. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, p. 537-544, 1998.

CONGREVE, M. et al. A 'Rule of Three' for fragment-based lead discovery? **Drug Discov. Today**, v. 8, n. 19, p. 876-877, 2003.

CORDILLOT, M. et al. In vitro cross-linking of *Mycobacterium tuberculosis* peptidoglycan by L,D-transpeptidases and inactivation of these enzymes by carbapenems. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, n. 12, p. 5940-5, Dec 2013.

CORREALE, S. et al. Structures of free and inhibited forms of the L,D-transpeptidase LdtMt1 from *Mycobacterium tuberculosis*. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 69, n. Pt 9, p. 1697-706, Sep 2013.

CÁCERES, N. E. et al. Overexpression of the D-alanine racemase gene confers resistance to D-cycloserine in *Mycobacterium smegmatis*. **J Bacteriol**, v. 179, n. 16, p. 5046-55, Aug 1997.

DAVIES, J.; GORINI, L.; DAVIS, B. D. Misreading of RNA codewords induced by aminoglycoside antibiotics. **Mol Pharmacol**, v. 1, n. 1, p. 93-106, Jul 1965.

DESHPANDE, D. et al. A Faropenem, Linezolid, and Moxifloxacin Regimen for Both Drug-Susceptible and Multidrug-Resistant Tuberculosis in Children: FLAME Path on the Milky Way. **Clin Infect Dis**, v. 63, n. suppl 3, p. S95-S101, Nov 2016.

DHAR, N. et al. Rapid cytolysis of *Mycobacterium tuberculosis* by faropenem, an orally bioavailable β -lactam antibiotic. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 2, p. 1308-19, Feb 2015.

DONALD, P. R. et al. Early bactericidal activity of amoxicillin in combination with clavulanic acid in patients with sputum smear-positive pulmonary tuberculosis. **Scand J Infect Dis**, v. 33, n. 6, p. 466-9, 2001.

DRAWZ, S. M. et al. Inhibition of the class C beta-lactamase from *Acinetobacter spp.*: insights into effective inhibitor design. **Biochemistry**, v. 49, n. 2, p. 329-40, Jan 2010.

DRLICA, K. et al. Fluoroquinolone action in mycobacteria: similarity with effects in *Escherichia coli* and detection by cell lysate viscosity. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 40, n. 7, p. 1594-9, Jul 1996.

DUBÉE, V. et al. Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* L,D-transpeptidase LdtMt1 by carbapenems and cephalosporins. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 8, p. 4189-95, Aug 2012.

EDOO, Z.; ARTHUR, M.; HUGONNET, J. E. Reversible inactivation of a peptidoglycan transpeptidase by a β -lactam antibiotic mediated by β -lactam-ring recyclization in the enzyme active site. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 9136, Aug 2017.

EMSLEY, P. et al. Features and development of Coot. **Act Cryst**, v. D66, p. 486-501, 2010.

ERDEMLI, S. B. et al. Targeting the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*: structure and mechanism of L,D-transpeptidase 2. **Structure**, v. 20, n. 12, p. 2103-15, Dec 2012.

ERLANSON, D. A. et al. Twenty years on: the impact of fragments on drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**, v. 15, n. 9, p. 605-19, 09 2016.

EVANS, P. R.; MURSHUDOV, G. N. How good are my data and what is the resolution? **Acta Cryst.**, v. D69, p. 1204-1214, 2013.

FALZON, D. et al. World Health Organization treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis, 2016 update. **Eur Respir J**, v. 49, n. 3, Mar 2017.

FERRIGE, A. et al. Disentangling electrospray spectra with maximum entropy. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 6, p. 707-711, 1992.

FLORES, A. R.; PARSONS, L. M.; PAVELKA, M. S. Genetic analysis of the beta-lactamases of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis* and susceptibility to beta-lactam antibiotics. **Microbiology**, v. 151, n. Pt 2, p. 521-32, Feb 2005.

FLYNN, J. L.; CHAN, J. Immunology of tuberculosis. **Annu Rev Immunol**, v. 19, p. 93-129, 2001.

FUJIWARA, M. et al. Mechanisms of resistance to delamanid, a drug for *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 108, p. 186-194, Jan 2018.

GANDHI, N. R. et al. Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. **Lancet**, v. 368, n. 9547, p. 1575-80, Nov 2006.

GESCHWINDNER, S.; ULANDER, J.; JOHANSSON, P. Ligand Binding Thermodynamics in Drug Discovery: Still a Hot Tip? **J Med Chem**, v. 58, n. 16, p. 6321-35, Aug 2015.

GHUYSEN, J. M. Molecular structures of penicillin-binding proteins and beta-lactamases. **Trends Microbiol**, v. 2, n. 10, p. 372-80, Oct 1994.

GLAUNER, B.; HOLTJE, J.; SCHWARZ, U. The composition of the murein of *Escherichia coli* **J. Biol. Chem**, v. 263, p. 10088-10095, 1988.

GLER, M. T. et al. Delamanid for multidrug-resistant pulmonary tuberculosis. **N Engl J Med**, v. 366, n. 23, p. 2151-60, Jun 2012.

GROSSET, J. Mycobacterium tuberculosis in the extracellular compartment: an underestimated adversary. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 3, p. 833-6, Mar 2003.

GUIMARÃES, B. G. et al. Plant pathogenic bacteria utilize biofilm growth-associated repressor (BigR), a novel winged-helix redox switch, to control hydrogen sulfide detoxification under hypoxia. **J Biol Chem**, v. 286, n. 29, p. 26148-57, Jul 2011.

GUIMARÃES, B. G. et al. The MX2 macromolecular crystallography beamline: a wiggler X-ray source at the LNLS. **J. Synchrotron Radiat.**, v. 16, p. 69-75, 2009.

GUPTA, R. et al. The *Mycobacterium tuberculosis* protein LdtMt2 is a nonclassical transpeptidase required for virulence and resistance to amoxicillin. **Nat Med**, v. 16, n. 4, p. 466-9, Apr 2010.

HALABY, D. M.; MORNON, J. P. The immunoglobulin superfamily: an insight on its tissular, species, and functional diversity. **J Mol Evol**, v. 46, n. 4, p. 389-400, Apr 1998.

HAMILTON-MILLER, J. M. Chemical and microbiologic aspects of penems, a distinct class of beta-lactams: focus on faropenem. **Pharmacotherapy**, v. 23, n. 11, p. 1497-507, Nov 2003.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J Mol Biol**, v. 166, n. 4, p. 557-80, Jun 1983.

HANN, M. M.; LEACH, A. R.; HARPER, G. Molecular complexity and its impact on the probability of finding leads for drug discovery. **J Chem Inf Comput Sci**, v. 41, n. 3, p. 856-64, 2001 May-Jun 2001.

HETT, E. C.; CHAO, M. C.; RUBIN, E. J. Interaction and modulation of two antagonistic cell wall enzymes of mycobacteria. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 7, p. e1001020, 2010.

HIKIDA, M. et al. Inactivation of new carbapenem antibiotics by dehydropeptidase-I from porcine and human renal cortex. **J Antimicrob Chemother**, v. 30, n. 2, p. 129-34, Aug 1992.

HIRSCHFIELD, G. R.; MCNEIL, M.; BRENNAN, P. J. Peptidoglycan-Associated Polypeptides of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 2, p. 1005-1013, 1990.

HOFFMANN, C. et al. Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 10, p. 3963-7, Mar 2008.

HOLDGATE, G. A. et al. The entropic penalty of ordered water accounts for weaker binding of the antibiotic novobiocin to a resistant mutant of DNA gyrase: a thermodynamic and crystallographic study. **Biochemistry**, v. 36, n. 32, p. 9663-73, Aug 1997.

HOPKINS, A. L.; GROOM, C. R.; ALEX, A. Ligand efficiency: a useful metric for lead selection. **Drug Discov Today**, v. 9, n. 10, p. 430-1, May 2004.

HUGONNET, J. E.; BLANCHARD, J. S. Irreversible inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* beta-lactamase by clavulanate. **Biochemistry**, v. 46, n. 43, p. 11998-2004, Oct 2007.

HUGONNET, J. E. et al. Meropenem-clavulanate is effective against extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 323, n. 5918, p. 1215-8, Feb 2009.

IPPOLITO, J. A. et al. Crystal structure of the oxazolidinone antibiotic linezolid bound to the 50S ribosomal subunit. **J Med Chem**, v. 51, n. 12, p. 3353-6, Jun 2008.

JENCKS, W. P. On the attribution and additivity of binding energies. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 78, n. 7, p. 4046-50, Jul 1981.

KABSCH, W. XDS. **Acta Cryst.**, v. D66, p. 125-132, 2010.

KATSUNO, K. et al. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. **Nat Rev Drug Discov**, v. 14, n. 11, p. 751-8, Nov 2015.

KAUFMANN, S. H. et al. *Mycobacterium tuberculosis* and the host response. **J Exp Med**, v. 201, n. 11, p. 1693-7, Jun 2005.

KELLY, G. et al. Structure of the cell-adhesion fragment of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli*. **Nat Struct Biol**, v. 6, n. 4, p. 313-8, Apr 1999.

KESERÜ, G. M.; MAKARA, G. M. The influence of lead discovery strategies on the properties of drug candidates. **Nat Rev Drug Discov**, v. 8, n. 3, p. 203-12, 03 2009.

KIESER, K. J.; RUBIN, E. J. How sisters grow apart: mycobacterial growth and division **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 12, p. 550-562, 2014.

KIM, H. S. et al. Structural basis for the inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* L,D-transpeptidase by meropenem, a drug effective against extensively drug-resistant strains. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 69, n. Pt 3, p. 420-31, Mar 2013.

KISHIDA, H. et al. Crystal structure of penicillin binding protein 4 (dacB) from *Escherichia coli*, both in the native form and covalently linked to various antibiotics. **Biochemistry**, v. 45, n. 3, p. 783-92, Jan 2006.

KONG, K. F.; SCHNEPER, L.; MATHEE, K. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. **APMIS**, v. 118, n. 1, p. 1-36, Jan 2010.

KRANZ, J. K.; SCHALK-HIHI, C. Protein thermal shifts to identify low molecular weight fragments. **Methods Enzymol**, v. 493, p. 277-98, 2011.

KUMAR, P. et al. Meropenem inhibits D,D-carboxypeptidase activity in *Mycobacterium tuberculosis*. **Mol Microbiol**, v. 86, n. 2, p. 367-81, Oct 2012.

KUMAR, P. et al. Non-classical transpeptidases yield insight into new antibacterials. **Nat Chem Biol**, v. 13, p. 54-61, 2017.

LAVOLLAY, M. et al. The beta-lactam-sensitive D,D-carboxypeptidase activity of Pbp4 controls the L,D and D,D transpeptidation pathways in *Corynebacterium jeikeium*. **Mol Microbiol**, v. 74, n. 3, p. 650-61, Nov 2009.

LAVOLLAY, M. et al. The peptidoglycan of stationary-phase *Mycobacterium tuberculosis* predominantly contains cross-links generated by L,D-transpeptidation. **J Bacteriol**, v. 190, n. 12, p. 4360-6, Jun 2008.

LECHARTIER, B.; COLE, S. T. Mode of Action of Clofazimine and Combination Therapy with Benzothiazinones against *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 8, p. 4457-63, Aug 2015.

LECOQ, L. et al. Dynamics induced by beta-lactam antibiotics in the active site of *Bacillus subtilis* L,D-transpeptidase **Structure**, v. 20, p. 850-861, 2012.

LI, W. et al. Crystal structure of L,D-transpeptidase LdtMt2 in complex with meropenem reveals the mechanism of carbapenem against *Mycobacterium tuberculosis*. **Cell Research**, v. 23, p. 728-731, 2013.

LINKE, P. et al. An Automated Microscale Thermophoresis Screening Approach for Fragment-Based Lead Discovery. **J Biomol Screen**, v. 21, n. 4, p. 414-21, Apr 2016.

LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. **Drug Discov Today Technol**, v. 1, n. 4, p. 337-41, Dec 2004.

MAGNET, S. et al. Identification of the L,D-Transpeptidases Responsible for Attachment of the Braun Lipoprotein to *Escherichia coli* Peptidoglycan **J. Bacteriol**, v. 189, n. 10, p. 3927-3931, 2007.

MAGNET, S. et al. Identification of the L,D-transpeptidases for peptidoglycan cross-linking in *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 190, n. 13, p. 4782-5, Jul 2008.

MAHFOUD, M. et al. Topology of the porin MspA in the outer membrane of *Mycobacterium smegmatis*. **J Biol Chem**, v. 281, n. 9, p. 5908-15, Mar 2006.

MAINARDI, J. L. et al. A novel peptidoglycan cross-linking enzyme for a beta-lactam-resistant transpeptidation pathway. **J Biol Chem**, v. 280, n. 46, p. 38146-52, Nov 2005.

MAINARDI, J. L. et al. Novel mechanism of beta-lactam resistance due to bypass of DD-transpeptidation in *Enterococcus faecium*. **J Biol Chem**, v. 275, n. 22, p. 16490-6, Jun 2000.

MATHYS, V. et al. Molecular genetics of para-aminosalicylic acid resistance in clinical isolates and spontaneous mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 5, p. 2100-9, May 2009.

MCCLURE, W. R.; CECH, C. L. On the mechanism of rifampicin inhibition of RNA synthesis. **J Biol Chem**, v. 253, n. 24, p. 8949-56, Dec 1978.

MCCOY, A. J. et al. Phaser crystallographic software. **J. Appl. Cryst.**, v. 40, p. 658-674, 2007.

MCDONNELL, P. A. et al. Assessing compound binding to the Eg5 motor domain using a thermal shift assay. **Anal Biochem**, v. 392, n. 1, p. 59-69, Sep 2009.

MIOTTO, P. et al. *Mycobacterium tuberculosis* pyrazinamide resistance determinants: a multicenter study. **MBio**, v. 5, n. 5, p. e01819-14, 2014.

MONACK, D. M.; MUELLER, A.; FALKOW, S. Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, n. 9, p. 747-65, Sep 2004.

MORLOT, C. et al. Crystal structure of a peptidoglycan synthesis regulatory factor (PBP3) from *Streptococcus pneumoniae*. **J Biol Chem**, v. 280, n. 16, p. 15984-91, Apr 2005.

MURRAY, C. W.; VERDONK, M. L. The consequences of translational and rotational entropy lost by small molecules on binding to proteins. **J Comput Aided Mol Des**, v. 16, n. 10, p. 741-53, Oct 2002.

MURSHUDOV, G. N.; VAGIN, A. A.; DODSON, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. **Acta Cryst.**, v. D53, p. 240-255, 1997.

NGUYEN, L.; THOMPSON, C. J. Foundations of antibiotic resistance in bacterial physiology: the mycobacterial paradigm **Trends Microbiol.**, v. 14, n. 7, p. 304-312, 2006.

NIESEN, F. H.; BERGLUND, H.; VEDADI, M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. **Nat Protoc**, v. 2, n. 9, p. 2212-21, 2007.

NISHIHARA, K. et al. Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. **Appl Environ Microbiol**, v. 64, n. 5, p. 1694-9, May 1998.

NOVY, R. et al. **Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression**: Innovations: 1-3 p. 2001.

PAPP-WALLACE, K. M. et al. Carbapenems: past, present, and future. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 11, p. 4943-60, Nov 2011.

PATRU, M. M.; PAVELKA, M. S. A role for the class A penicillin-binding protein PonA2 in the survival of *Mycobacterium smegmatis* under conditions of nonreplication. **J Bacteriol**, v. 192, n. 12, p. 3043-54, Jun 2010.

PETRELLA, S. et al. Genetic basis for natural and acquired resistance to the diarylquinoline R207910 in mycobacteria. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 8, p. 2853-6, Aug 2006.

QUINTELA, J. et al. Peptidoglycan structure of *Salmonella thyphimurium* growing within cultured mammalian cells. **Molecular Microbiology**, v. 23, n. 4, p. 693-704, 1997.

RAMAN, R. et al. Big Domains Are Novel Ca²⁺-Binding Modules: Evidences from Big Domains of *Leptospira* Immunoglobulin-Like (Lig) Proteins. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, p. 1-13, 2010.

RATLEDGE, C. Iron, mycobacteria and tuberculosis. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 84, n. 1-2, p. 110-30, 2004.

REINHARD, L. et al. Optimization of protein buffer cocktails using Thermofluor **Acta Cryst.**, v. F69, p. 209-214, 2013.

RENGARAJAN, J. et al. The folate pathway is a target for resistance to the drug para-aminosalicylic acid (PAS) in mycobacteria. **Mol Microbiol**, v. 53, n. 1, p. 275-82, Jul 2004.

ROBERT, X.; GOUET, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. **Nucleic Acids Res**, v. 42, n. Web Server issue, p. W320-4, Jul 2014.

SANDERS, A. N.; WRIGHT, L. F.; PAVELKA, M. S. Genetic characterization of mycobacterial L,D-transpeptidases. **Microbiology**, v. 160, n. Pt 8, p. 1795-806, Aug 2014a.

SANDERS, A. Genetic and Phenotypic Analysis of Bacterial L,D-transpeptidases. New York: University of Rochester, 2014b.121p. These (PhD microbiology and immunology).

SCHIEBEL, J. et al. High-Throughput Crystallography: Reliable and Efficient Identification of Fragment Hits. **Structure**, v. 24, n. 8, p. 1398-409, Aug 2016. ISSN 1878-4186.

SCHOONMAKER, M. K.; BISHAI, W. R.; LAMICHHANE, G. Nonclassical transpeptidases of *Mycobacterium tuberculosis* alter cell size, morphology, the cytosolic matrix, protein localization, virulence, and resistance to β -lactams. **J Bacteriol**, v. 196, n. 7, p. 1394-402, Apr 2014.

SGRIGNANI, J.; GRAZIOSO, G.; DE AMICI, M. Insight into the Mechanism of Hydrolysis of Meropenem by OXA-23 Serine- β -lactamase Gained by Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Calculations. **Biochemistry**, v. 55, n. 36, p. 5191-200, 09 2016.

SHAM, L. B., EK et al. Bacterial cell wall. MurJ is the flippase of lipid-linked precursors for peptidoglycan biogenesis. **Science**, v. 345, p. 220-222, 2014.

SHERMAN, W. et al. Novel procedure for modeling ligand/receptor induced fit effects. **J Med Chem**, v. 49, n. 2, p. 534-53, Jan 2006.

SILVESTRE, H. L. et al. Integrated biophysical approach to fragment screening and validation for fragment-based lead discovery. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 32, p. 12984-9, Aug 2013.

SREEVATSAN, S. et al. Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of embB mutations. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 41, n. 8, p. 1677-81, Aug 1997.

SRIVASTAVA, S. et al. Optimal Clinical Doses of Faropenem, Linezolid, and Moxifloxacin in Children With Disseminated Tuberculosis: Goldilocks. **Clin Infect Dis**, v. 63, n. suppl 3, p. S102-S109, Nov 2016.

STEINER, E. M.; SCHNEIDER, G.; SCHNELL, R. Binding and processing of beta-lactam antibiotics by the transpeptidase LdtMt2 from *Mycobacterium tuberculosis*. **FEBS Journal**, v. 284, p. 725-741, 2017.

STEWART, G. R.; ROBERTSON, B. D.; YOUNG, D. B. Tuberculosis: a problem with persistence. **Nat Rev Microbiol**, v. 1, n. 2, p. 97-105, Nov 2003.

STUDIER, F. W.; MOFFATT, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. **J Mol Biol**, v. 189, n. 1, p. 113-30, May 1986.

SÜTTERLIN, L. et al. Peptidoglycan Cross-Linking Activity of L,D-transpeptidases from *Clostridium difficile* and Inactivation of These Enzymes by β -Lactams. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 62, n. 1, Jan 2018.

TAKAYAMA, K.; KILBURN, J. O. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 33, n. 9, p. 1493-9, Sep 1989.

TARCSAY, A.; NYÍRI, K.; KESERU, G. M. Impact of lipophilic efficiency on compound quality. **J Med Chem**, v. 55, n. 3, p. 1252-60, Feb 2012.

TELENTI, A. et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. **Lancet**, v. 341, n. 8846, p. 647-50, Mar 1993.

TEMPLIN, M. F.; URSINUS, A.; HÖLTJE, J. V. A defect in cell wall recycling triggers autolysis during the stationary growth phase of *Escherichia coli*. **EMBO J**, v. 18, n. 15, p. 4108-17, Aug 1999.

TIBERI, S. et al. Effectiveness and safety of meropenem/clavulanate-containing regimens in the treatment of MDR- and XDR-TB. **Eur Respir J**, v. 47, n. 4, p. 1235-43, Apr 2016.

TIBERI, S. et al. Comparison of effectiveness and safety of imipenem/clavulanate-versus meropenem/clavulanate-containing regimens in the treatment of MDR- and XDR-TB. **Eur Respir J**, v. 47, n. 6, p. 1758-66, 06 2016.

TJERNBERG, A. et al. DMSO-related effects in protein characterization. **J Biomol Screen**, v. 11, n. 2, p. 131-7, Mar 2006.

VENKITAKRISHNAN, R. P. et al. Use of NMR saturation transfer difference spectroscopy to study ligand binding to membrane proteins. **Methods Mol Biol**, v. 914, p. 47-63, 2012.

VILCHÈZE, C.; JACOBS, W. R. Resistance to Isoniazid and Ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*: Genes, Mutations, and Causalities. **Microbiol Spectr**, v. 2, n. 4, p. MGM2-0014-2013, Aug 2014.

VOLLMER, W.; HÖLTJE, J. V. The architecture of the murein (peptidoglycan) in gram-negative bacteria: vertical scaffold or horizontal layer(s)? **J Bacteriol**, v. 186, n. 18, p. 5978-87, Sep 2004.

VOLLMER, W.; SELIGMAN, S. J. Architecture of peptidoglycan: more data and more models. **Trends Microbiol**, v. 18, n. 2, p. 59-66, Feb 2010.

WANG, F.; CASSIDY, C.; SACCHETTINI, J. C. Crystal structure and activity studies of the *Mycobacterium tuberculosis* beta-lactamase reveal its critical role in resistance to beta-lactam antibiotics. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 8, p. 2762-71, Aug 2006.

WHITESIDES, G. M.; KRISHNAMURTHY, V. M. Designing ligands to bind proteins. **Q Rev Biophys**, v. 38, n. 4, p. 385-95, Nov 2005.

WHO. **Global Tuberculosis Report 2017**. World Health Organization. Geneva, p.147. 2017a

WHO. **Treatment of tuberculosis: Guidelines for treatment of drug-susceptible tuberculosis and patient care**. World Health Organization. Geneva, p.56. 2017b

WIENKEN, C. J. et al. Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. **Nat Commun**, v. 1, p. 100, Oct 2010.

WIETZERBIN, J. et al. Occurrence of D-alanyl-(D)-meso-diaminopimelic acid and meso-diaminopimelyl-meso-diaminopimelic acid interpeptide linkages in the peptidoglycan of *Mycobacteria*. **Biochemistry**, v. 13, n. 17, p. 3471-6, Aug 1974.

WILDE, F.; LINK, A. Advances in the design of a multipurpose fragment screening library. **Expert Opin Drug Discov**, v. 8, n. 5, p. 597-606, May 2013.

WINDER, F. G.; COLLINS, P. B. Inhibition by isoniazid of synthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. **J Gen Microbiol**, v. 63, n. 1, p. 41-8, Sep 1970.

WINDER, F. G.; COLLINS, P. B.; WHELAN, D. Effects of ethionamide and isoxyl on mycolic acid synthesis in *Mycobacterium tuberculosis* BCG. **J Gen Microbiol**, v. 66, n. 3, p. 379-80, Jun 1971.

YOCUM, R. R. et al. Mechanism of penicillin action: penicillin and substrate bind covalently to the same active site serine in two bacterial D-alanine carboxypeptidases. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 76, n. 6, p. 2730-4, Jun 1979.

YU, J. et al. Roll: a new algorithm for the detection of protein pockets and cavities with a rolling probe sphere. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 46-52, Jan 2010.

ZHANG, S. et al. Identification of novel mutations associated with clofazimine resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **J Antimicrob Chemother**, v. 70, n. 9, p. 2507-10, Sep 2015.

ZHANG, Y. et al. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature**, v. 358, n. 6387, p. 591-3, Aug 1992

ZHANG, Y. et al. Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. **J Antimicrob Chemother**, v. 52, n. 5, p. 790-5, Nov 2003.

ZUMLA, A.; NAHID, P.; COLE, S. T. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. **Nat Rev Drug Discov**, v. 12, n. 5, p. 388-404, May 2013.

ANEXO A

Structural basis for the interaction and processing of β -lactam antibiotics by L,D-transpeptidase 3 (Ldt_{Mt3}) from *Mycobacterium tuberculosis*

Gerardo A. Libreros^{1,2,3}, Catharina dos Santos Silva¹, Rafaela Salgado Ferreira⁴, and Marcio Vinicius Bertacine Dias^{1,2*}

From the ¹ Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Avenida Prof. Lineu Prestes 1374, São Paulo, Brasil; ² Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rua Cristóvão Colombo, 2265, São José do Rio Preto, Brasil; ³ Departamento de Microbiología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Calle 4B 36-00. Cali, Colombia; ⁴ Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, Brasil.

Running title: *β -lactam interactions with Ldt_{Mt3} from *M. tuberculosis**

* To whom correspondence should be addressed: Marcio Vinicius Bertacine Dias: Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Avenida Prof. Lineu Prestes 1374, 05508-900, São Paulo, Brasil; mvbdias@usp.br; Tel/Fax: +55 11 3091 7420.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, L,D-transpeptidases, β -lactam antibiotics, faropenem, X-ray structure, antibacterial, antibiotic resistance, tuberculosis, multidrug resistance.

ABSTRACT

Targeting *Mycobacterium tuberculosis* peptidoglycans with β -lactam antibiotics represents a strategy to address increasing resistance to other anti-tubercular drugs. β -Lactams inhibit peptidoglycan synthases such as L,D-transpeptidases, a group of carbapenem-sensitive enzymes that stabilize peptidoglycans through 3→3 cross-links. *M. tuberculosis* encodes five L,D-transpeptidases (Ldt_{Mt1-5}) of which Ldt_{Mt3} is one of the least understood. Herein, we structurally characterized the apo and faropenem-acylated forms of Ldt_{Mt3} at 1.3 and 1.8 Å resolutions, respectively. These structures revealed a fold and catalytic triad similar to those of other Ldt_{Mt} enzymes, supporting its involvement in transpeptidation reactions despite divergences in active site size and charges. The Ldt_{Mt3}–faropenem structure indicated that faropenem is degraded after Cys-246 acylation and that only an acetyl group (C₂H₃O) covalently

attached to the enzyme remains, an observation that strongly supports the notion that Ldt_{Mt3} is inactivated by β -lactams. Docking simulations with intact β -lactams predicted key Ldt_{Mt3} residues that interact with these antibiotics. We also thermodynamically characterized Ldt_{Mt3} in the presence of 10 β -lactams belonging to four different classes. Carbapenems and faropenem interacted with Ldt_{Mt3} with different affinities; imipenem had a nanomolar affinity ($K_D = 16 \pm 1$ nM) with favorable enthalpy and entropy energetics, whereas faropenem ($K_D = 590 \pm 100$ nM) exhibited the highest entropic penalty and the best ligand-efficiency lipophilic price among all β -lactams tested. This work provides key insights into the structure, binding mechanisms, and degradation of β -lactams by Ldt_{Mt3} and their thermodynamic signatures, which may be useful for the development of additional β -lactams with potential anti-tubercular activity

Mycobacterium tuberculosis is an intracellular pathogenic bacterium that causes tuberculosis (TB), a life-threatening illness in humans. TB is an infectious disease of worldwide distribution with a higher incidence in South-East Asia, Africa, and Western Pacific, and causes more than 1.5 million deaths annually (1). TB is a preventable and curable disease as long as being properly diagnosed and treated; however, the emergence of resistant strains has become a global issue, especially in developing countries. In the past years, efforts toward the development of novel anti-TB drugs have delivered new therapeutics. Recently, bedaquiline (2) and delamanid (3) emerged as new drugs with proven efficacy against TB, and have been included in multi-drug resistant treatment regimens. Since the processes of drug discovery may last for decades and have a high budget, the repurposing of existing antibiotics, such as β -lactams, for TB treatment is an alternative to decrease timeline and cost of drug development (4). In addition, it could also provide an alternative to treat multi-resistant TB cases as the combinations of β -lactams and β -lactamase inhibitors which are effective against *M. tuberculosis* (5,6).

β -lactam antibiotics consist of a four-membered β -lactam ring fused to five or six-membered heterocyclic rings containing additional modifications that provide unique chemical and biological properties (7). These antibiotics are classified into different classes according to their structural characteristics. Some classes of β -lactams include penams, cepheids, carbapenems, and penems (Fig. S1). β -lactams are widely used to treat bacterial infections and they inhibit peptidoglycan (PG) biosynthesis (8), an essential cell wall structure for bacterial viability. PG is a polymer of glycan strands cross-linked by short peptides (9). In *M. tuberculosis*, PG is heavily cross-linked from the terminal D-Ala to the D-center of meso-diaminopimelic acid (*m*-DAP), forming the 4 $\rightarrow$ 3 or D,D-cross-links (10). Moreover, 80% of mycobacterial cross-linkages occur between the carboxyl group of the L-center of one *m*-DAP residue and the amino group of the D-center of another *m*-DAP residue, therefore, forming the 3 $\rightarrow$ 3 or L,D-cross-links (11). These connections are uncommon in most bacteria, although they have been reported for the PG of *Enterococcus*

faecium (12), *Salmonella typhimurium* (13), *Escherichia coli* (14), and *Clostridium difficile* (15). These L,D-cross-links are catalyzed by L,D-transpeptidases (Ldts), a group of monofunctional carbapenem sensitive enzymes, which are upregulated during the stationary phase of growth or dormancy in *M. tuberculosis* (11,16). Ldts have been related to act in several other functions besides 3 $\rightarrow$ 3 cross-link formation. In *E. coli*, Ldts might catalyze the covalent binding of Braun's lipoprotein to PG (17); while in *Vibrio cholerae*, they participate in the incorporation of non-canonical amino acids to PG (18).

M. tuberculosis encodes five L,D-transpeptidases (Ldt_{Mt1}, Ldt_{Mt2}, Ldt_{Mt3}, Ldt_{Mt4}, and Ldt_{Mt5}) (19), with a sequence identity ranged between 30 and 50%. Mutants with disruption in *ldt*_{Mt1}, *ldt*_{Mt2}, or *ldt*_{Mt5} reveal morphology alterations and an increased antimicrobial susceptibility *in vitro*, including to β -lactams (20-23). This suggests that those enzymes are essential to the PG homeostasis and could be used as targets for anti-TB drug development. Several studies aiming to target Ldts_{Mt} with known and novel β -lactams have been performed in the last years (24,25). Ldt_{Mt1}, Ldt_{Mt2}, and Ldt_{Mt5} are structural and functionally well characterized (22,26,27), whereas Ldt_{Mt3} and Ldt_{Mt4} are yet poorly understood. In general, the structure of Ldts_{Mt} has one or two Bacterial Immunoglobulin Domains (Big) (28) and a conserved catalytic domain (CD) composed by an ErfK/Ybis/YhnG fold (29). Kinetic studies indicate that Ldts_{Mt} are quickly inactivated by carbapenems (24) and penems (6), and structural evidence demonstrates that such inhibition is due to the formation of a covalent adduct through a catalytic cysteine (22,26,30). Mechanisms of β -lactams binding and degradation after acylation have been proposed for Ldt_{Mt1} and Ldt_{Mt2}, and seem to differ between penems and carbapenems (25,30). Thus, while faropenem can be processed to a small fragment of β -OH-butyrate, most carbapenems retain a large part of their mass connected to the enzymes (25,30). Ldt_{Mt3} is the unique paralog in *M. tuberculosis* that is unclear about its ability to form 3 $\rightarrow$ 3 cross-links *in vitro*, in spite of its acylation by β -lactams (24) and therefore it has been proposed that Ldt_{Mt3} may have a role in the covalent attachment of proteins to PG (23,24), which

still might be a key function for cell viability or mycobacterial pathogenesis.

In order to achieve insights into the interaction with β -lactams, we have determined Ldt_{Mt3} crystal structures in apo form and in complex with faropenem, as well as performed a thermodynamical and structural analysis of the binding mechanisms of ten different β -lactam antibiotics. To our knowledge, this is the first report on the description of the Ldt_{Mt3} structure, which includes so far the highest resolution for any Ldt_{Mt} (1.3 Å resolution). In addition, we provided a detailed analysis of the thermodynamic profiles of Ldt_{Mt3} binding to those antibiotics, contributing for further β -lactam lead selection. Finally, we have proposed a biochemical mechanism of faropenem degradation to an acetyl group after Ldt_{Mt3} acylation and an extensive docking analysis of the β -lactam binding modes to Ldt_{Mt3} that provide key findings for the development of novel β -lactams to treat tuberculosis.

Results and Discussion

The overall structure of Ldt_{Mt3}

In order to determine the crystal structure of Ldt_{Mt3}, we constructed a truncated protein lacking the first 31 residues, which were predicted to be a transmembrane region (Fig. 1A). Ldt_{Mt3} was crystallized by hanging drop vapor diffusion at 18°C and optimized by micro-seeding. Crystals grew after 48 h, diffracted up to 1.3 Å resolution and belong to the space group P2₁2₁2₁ with one protomer in the asymmetric unit. We have solved two three-dimensional structures of Ldt_{Mt3} by molecular replacement, including Ldt_{Mt3} in the apo and in the acylated form with faropenem. Data collection, refinement statistics, and stereochemistry quality for both structures are in Table S1.

The structure of Ldt_{Mt3} (Residues 32 to 271), as described to other Ldts_{Mt}, has a semicircular shape and two conserved domains, an N-end Bacterial Ig-like domain 1 (BigB) (28) modeled from Ser33 to Lys122, and an C-end YkuD L,D-transpeptidase catalytic domain (29) extended from Val128 to Glu271 (Fig. 1B). These domains are linked by a short loop (Thr123 to Val127) with little mobility (*B*-factor average of 18.1 Å²). The catalytic domain (CD), with dimensions (h ×

w) of 35 × 40 Å, is located at the C-end and has an ErfK/YbiS/YhnG fold constituted by a β -sandwich containing two five-stranded β sheets, an α -helix (α 2), and two 3.10 helix (η ₁ and η ₂) (Fig. 1C). The CD from Ldt_{Mt3}, as well as reported to other Ldts (27,31), show a lid extending from Ser197 to Tyr210 that partially covers the catalytic center. The BigB domain, with dimensions of 40 × 35 Å, and placed at the N-end of Ldt_{Mt3}, is composed by two antiparallel β sheets, a three and another four-stranded, respectively. The β -sheets are packaged facing one each other forming a β -barrel (Fig. 1D).

Structure determination of Ldt_{Mt5}

In order to perform a comparison of Ldt_{Mt3} to other Ldts_{Mt}, we have independently solved the structure of Ldt_{Mt5}. The crystals of Ldt_{Mt5} diffracted up to 2.6 Å resolution, belong to the space group P6₂ 2 2, and have a protomer in the asymmetric unit. Although we have solved the structure of Ldt_{Mt5} in lower resolution than the previously reported (1.98 Å resolution, PDB entry 4Z7A) (22), the crystallographic statistic of our model seems to be more acceptable, including values of R-work/R-free, and B-factor of atoms of backbone and side chain (Table S1). The superposition of our structure with the previously reported did not indicate significant differences and has an RMSD (Root-mean-square deviations) of 0.384 Å over the 336 C α aligned (Fig. S2).

Structural comparison between Ldt_{Mt3} and other Ldts_{Mt}

M. tuberculosis encodes five Ldts_{Mt} (19) with a sequence identity percentage ranging from 31 to 50% (Fig. S3). Ldt_{Mt3} has the highest sequence identity to Ldt_{Mt1} (50%), followed by Ldt_{Mt2} and Ldt_{Mt4} (39%) and Ldt_{Mt5} (31%). We have performed a comparison in length including the four Ldts_{Mt}: Ldt_{Mt1} (~60 Å) and Ldt_{Mt3} (~75 Å) were the smallest ones while Ldt_{Mt2} (~100 Å) and Ldt_{Mt5} (~120 Å) were the largest ones (Fig. 2A). These differences in length are associated with an extra BigA domain present in Ldt_{Mt2} and Ldt_{Mt5}. Additionally, the presence of Big domains *in tandem*, could play a role as pedestals to approximate the Ldts_{Mt} CDs to their substrates located in different layers of the PG (32). On the other hand, similar to the expression of several PBPs in *E. coli* (33) and *Bacillus*

subtilis (34), which have different sizes and functions, some Ldt_{Mt} could co-localize in different areas of the cell wall and play specific functions to the PG maintenance.

Structural superpositions of all four Ldt_{Mt}, including Ldt_{Mt1} (PDB entry 4JMN) (26), Ldt_{Mt2} (PDB entry 5DU7) (25) and Ldt_{Mt5} (PDB entry 6D5A) (described in this work) (Fig. 2B and C) indicated an RMSDs for the CDs of 0.54 Å to Ldt_{Mt1} (120 C^α aligned), 0.76 Å to Ldt_{Mt2} (120 C^α aligned), and 0.85 Å to Ldt_{Mt5} (112 C^α aligned). By contrast, RMSDs for the BigB domains were about 1.21 Å to Ldt_{Mt1}, 1.84 Å to Ldt_{Mt2}, and 2.25 Å to Ldt_{Mt5} with 88 C^α aligned in all cases. These data suggest that the BigB domains are structurally more divergent than the CDs among all compared Ldt_{Mt} and, as expected, Ldt_{Mt3} is more similar to Ldt_{Mt1} since their amino acid sequences are also more conserved (Fig. 2B and C).

The largest structural difference of Ldt_{Mt3} in comparison to other Ldt_{Mt} is the Loop B (L_B), which extends from Asp143 to Gly166 and is only observed in Ldt_{Mt3} (Fig. 2B). It is constituted by a long Proline-Rich Region (PRR), which have already been described in Penicillin Binding Proteins (PBPs) as in *M. smegmatis*. PRR seems to be involved in protein-protein or protein-carbohydrate interactions (35). Since it is known that enzymes involved in the cell wall remodeling in *M. tuberculosis* are implicated in the formation of various complexes (36), this region of Ldt_{Mt3} might be also participating in interactions with other components of the PG remodeling system. However, experiments still need to be performed to prove this hypothesis.

The lid of Ldt_{Mt3}, (Residues Ser192 to Val214), have notable differences mainly when compared to Ldt_{Mt5} since the lid of Ldt_{Mt3} is more extended and seems to cover a greater extension of the catalytic center (Fig. 2B). Furthermore, Ldt_{Mt3} lacks the C-terminal subdomain (CTSD) identified to make a zipper-like interaction with the immunoglobulin domain (BigB) in Ldt_{Mt2} and Ldt_{Mt5} (Fig. 2A) (22,27).

The active site of Ldt_{Mt3}

The active site of Ldt_{Mt3} is placed buried in a deep point of CD domain and it seems to have

three possible routes for its access. The outer entry (OE) at C-end, and two inner entries, right and left facing the BigB domain (Fig 1B and Fig. S4). In order to perform a comparison of the Ldt_{Mt} catalytic cavities, we have used the POCASA server (37) to estimate their sizes. The size of Ldt_{Mt3} catalytic cavity is ~196 Å³, which is a comparable size to Ldt_{Mt2} (~174 Å³), while it is topologically more similar to Ldt_{Mt1}, which has a size of ~140 Å³ (Fig. S4). However, we were not able to calculate the volume of the Ldt_{Mt5} catalytic cavity since the loops that define it were completely disordered.

In the structure of Ldt_{Mt3}, the OE should be the main entrance to the active site, as observed in Ldt_{Mt2} (27). This entry is formed by Arg174, Met195, Ser199, Asp208, Tyr210, Gly224, His228, Trp232, Val242, His244, Cys246 and Ser248 (Fig. 3A). The OE is positively charged, a common feature shared with Ldt_{Mt1} and Ldt_{Mt2} (Fig. S4) suggesting the entry of similar substrates for these three enzymes.

Based on a sequence alignment of Ldt_{Mt3} to their homologs in *M. tuberculosis* (Fig. S3), the catalytic triad of Ldt_{Mt3} is formed by Cys246, His228, and Ser229 (Fig. 3B). The thiol group of Cys246 is placed at ~4 Å from N^{ε2} of His228 and the N^{δ1} of His 228 is located at 2.9 Å from the carbonyl group of Ser229. The superposition of the CDs of Ldt_{Mt3}, Ldt_{Mt1}, and Ldt_{Mt2} indicated the conservation of the catalytic triades (Fig. 3C). However, key differences can be observed in Ldt_{Mt5} since the serine is substituted by Asn362 or Glu328 according to Brammer Basta *et. al.* 2015 (22). The oxyanion hole of Ldt_{Mt3} is formed by the nitrogen backbone atoms from Cys246, Gly245, and His244. These residues could establish hydrogen bonds with the negatively charged oxygen of the tetrahedral intermediate during the catalysis (Fig. 3B).

Calorimetric characterization of Ldt_{Mt3}

Aiming to investigate the range of interaction and consequently the affinity of β-lactams for Ldt_{Mt3}, we screened Ldt_{Mt3} against ten different antibiotics by Differential Scanning Fluorimetry (DSF) (Fig. 4A). Ldt_{Mt3} had an average thermal unfolding value of 40.9 ± 0.45°C (*T_m*_{Ref}) (Table S2). Seven of the ten tested β-lactams shifted the *T_m* higher than 1.35 °C or lower than -1.35°C, indicating interaction. The thermal shift (Δ*T_m*) induced

by β -lactams ranged from -6.1°C for biapenem to 2.2°C for faropenem (Table S2). No significant ΔT_m was observed to ampicillin, cephalexin, and ceftazidime, strongly indicating that these β -lactams did not interact with Ldt_{Mt3} at tested antibiotic concentrations (Fig. 4B).

Similar to that described for the human Polo-box domain of Plk1(38), in which different ligands can stabilize or destabilize the same protein, carbenicillin and all carbapenems assayed here indicated an interaction with Ldt_{Mt3} but by decreasing the $T_{m_{\text{ref}}}$, suggesting that these antibiotics might bind preferentially to the unfolded state of Ldt_{Mt3} and consequently cause a destabilization of the enzyme (38). On the other hand, faropenem was the unique β -lactam that induced a positive ΔT_m , indicating binding to the native form of Ldt_{Mt3} and promoting the enzyme stabilization (38) (Fig. 4).

To determine the affinity and thermodynamic mechanisms governing the interaction between Ldt_{Mt3} and β -lactams, we evaluated the same ten β -lactam antibiotics by isothermal titration calorimetry (ITC). Isotherms for the titration of Ldt_{Mt3} with five carbapenems and faropenem indicated an exothermic binding (Fig. S5A-F). No heat of binding was detected for any of the penams or cephalosporins assayed (Fig. S5G-J). The highest affinity dissociation constants (K_d) were identified for imipenem and ertapenem, whereas biapenem and faropenem displayed intermediate affinities. The lowest affinities were detected for doripenem and meropenem respectively (Table 1). We did not observe any correlation between the magnitude of the K_d and ΔT_m obtained by DSF ($\rho = -0.202$, $p = 0.722$).

Our data are in correlation with the kinetics of inactivation by carbapenems previously reported by Cordillot *et al.* 2013 (24). These authors determined a high rate constant of oxyanion and adduct formation for Ldt_{Mt3} with imipenem and low rate constants with meropenem and doripenem. These data strongly support that the inactivation kinetics of Ldt_{Mt3} is directly related to the affinity of these β -lactams. Moreover, the rate of acylation of Ldt_{Mt3} by imipenem is fivefold higher than Ldt_{Mt1} and interestingly, the K_d of Ldt_{Mt3} for imipenem was four times lower than

reported for Ldt_{Mt1} (26), indicating higher affinity to Ldt_{Mt3} than Ldt_{Mt1} by this antibiotic. Therefore, in spite of 50% sequence identity between Ldt_{Mt3} and Ldt_{Mt1} , the differences in volume, topology and possibly the charge in their catalytic cavities could determine differences in the affinity by β -lactams. Thus, positively charged aliphatic side chains, as that one of imipenem, seem to accommodate better in the Ldt_{Mt3} catalytic cavity than the rigid pyrrolidine ring side chain as that of meropenem.

For all Ldt_{Mt3} interactions with β -lactams studied here by ITC, the driving force of binding seems to be the enthalpy change (ΔH), ranging from -5.6 to $-10.6 \text{ kcal mol}^{-1}$. Binding of imipenem and meropenem were also driving by favorable contributions from entropy ($-T\Delta S$) (Fig. 5 and Table 1). Differently, the binding of ertapenem, doripenem, biapenem, and faropenem indicated an unfavorable entropic component, which was more significant for faropenem, possibly because of the loss of conformational freedom of protein and ligand after acylation (39) or due to water molecules sequestering in the active site after binding (40). We could not identify any correlation between the binding enthalpy and the number of hydrogen bond donors ($\rho = 0.057$, $p = 0.933$) or hydrogen bond acceptors ($\rho = 0.24$, $p = 0.711$).

Since some β -lactams are partially degraded after the acylation of L,D-transpeptidases (25,30), the selection and optimization of lead β -lactams based on structure, might be challenging. Alternatively, we could use the thermodynamic profiles of binding (41) or indicators as Ligand Efficiency Lipophilic Price (LELP) (42) to achieve this purpose. LELP is recommended to be used to the lead selection during early stages of drug discovery because it considers both ligand efficiency (Δg) and lipophilicity (cLogP), two important characteristics that determine the specificity and bioavailability of future drug candidates. LELP was determined for the six β -lactams that interact with Ldt_{Mt3} , which allowed us to rank, in the first place, faropenem (LELP: -1.7), followed by imipenem (LELP: -7.6), and in third, ertapenem (LELP: -10) as the best leads for further chemical optimization. LELP scores determined here to Ldt_{Mt3} were comparable to the LELPs calculated for β -lactams interacting

with Ldt_{Mt1} and Ldt_{Mt2}, using the thermodynamic data reported in the literature (25-27) (Table S3). These results suggest that the synthesis of new anti-TB β -lactams targeting Ldts_{Mt} could be based on the faropenem scaffold that additionally might provide better oral bioavailability than the other β -lactams.

β -lactams docking at the active site suggests interaction with conserved amino acids of Ldt_{Mt3}

To investigate the key residues of Ldt_{Mt3} that interact with intact β -lactams, we carried out docking simulations. To simulate the possible conformations acquired by the active site and ligand during the binding and the known covalent attachment between β -lactams and their targets, we employed induced fit and covalent docking strategies. Our results indicated that acceptor and donor groups of the most of β -lactam-pyrroline moieties bind to His228, His244, and Cys246 of the catalytic center of Ldt_{Mt3} (Fig. 6; Table S4). As expected, the carbonyl oxygen of the β -lactams interact with the backbone amide groups of Cys246 and His244, which constitute the oxyanion hole. The carboxyl group in the substituent C3 of the carbapenems and faropenem were predicted to hydrogen bond with different residues, including with the backbone of His244 and Cys246 and the sidechains of Trp232, Ser243, and Ser248 (Fig. 6A-F). Additionally, the carboxyl group of ertapenem interacted with Arg174 via a salt bridge (Fig. 6E). Finally, the hydroxyethyl substituent at C6 for imipenem and doripenem interacted with the backbone of Gly224 (Fig. 6A and B), while this same group of meropenem, biapenem and faropenem interacted with the side chain of Ser199 (Fig. 6C, D and F), and only the hydroxyethyl substituent at C6 of ertapenem interacted with Tyr210 (Fig. 6E).

The R1 substituent at C2 of imipenem interacted by hydrogen bonds with Asp208 and His244 (Fig. 6A). In the same way, R1 of doripenem interacted with the backbones of His244 and Val242 (Fig. 6B). The pyrrolidine group of meropenem interacted with Tyr210 by *pi*-cation contact and the triazole group of biapenem established a *pi*-*pi* stacking with Tyr210 and His244 and additionally, *pi*-cation contacts with Arg143 and His244 (Fig. 6C and

6D). By contrast, in the best-scoring ertapenem and faropenem poses, no hydrogen bond interaction was predicted between the R1 sidechains and any residues of the active site (Fig. 6E and 6F). These results indicated which specific amino acids of the Ldt_{Mt3} catalytic cavity are likely the most relevant for the recognition of chemical moieties in the β -lactam-pyrroline core and the R1 side chain of the β -lactams.

Faropenem degrades into a small fragment of acetyl after acylation of Cys246

Aiming to understand the structural basis of β -lactams interaction with Ldt_{Mt3}, we solved the structure of this protein in complex with faropenem at 1.8 Å resolution (Table S1). All our attempts to obtain the structure of Ldt_{Mt3} in complex with other β -lactams were unsuccessful. Actually, our structural data for Ldt_{Mt3} in complex with faropenem shows only an electron density for a covalent bound acetyl group (C₂H₃O) attached to the Cys246. The carbonyl oxygen of the C₂H₃O is further coordinated by the nitrogen main chain of Cys246. This observation indicates, as expected, that faropenem was able to acylate this enzyme and strongly supports its inactivation (43) (Fig. 7A). It has been reported that Ldt_{Mt2} undergoes a conformational change in the region of the lid, adopting an open conformation after acylation with faropenem (30). In contrast, the superimposition of the *apo*- and the acylated form of Ldt_{Mt3} did not indicate any significant conformational change (RMSD 0.276 Å for the 232 C α aligned), while an overlay of acylated forms of Ldt_{Mt3} with Ldt_{Mt2} and Ldt_{Mt2} indicated deviations up to ~6 Å on this lid (RMSDs 1.3 and 1.9 Å for 184 and 216 C α aligned respectively) (Fig. 7B).

In order to confirm the acylation of Ldt_{Mt3} with β -lactams, we performed a mass spectroscopy experiment with intact protein (Table 2 and Fig. S6). Our data confirmed that Ldt_{Mt3} was acylated by carbapenems and they remain attached to the enzyme without showing any sign of degradation. However, the presence of a fragment of ~87 Da derived from faropenem, strongly suggest the degradation or processing of faropenem after its interaction with Ldt_{Mt3}. A mass of 87 Da corresponding probably to β -OH-butyrate, which has been previously reported for the acylated form of Ldt_{Mt1} and Ldt_{Mt2} with faropenem (25,30).

These results suggested that the mechanism of binding and processing of faropenem after acylation of Ldt_{M3} should be similar to other Ldts_{Mt}. The inconsistency of our structural data with the MS spectra could be explained by a further step of retro aldol hydrolysis that eventually Ldt_{M3} is able to perform during the process of crystallization in contrast to Ldt_{M1} and Ldt_{M2} (Fig 7B).

The putative mechanism of degradation of faropenem after acylation of Ldt_{M3}

Aiming to obtain insights on the biochemical mechanism of faropenem degradation after acylation of Cys246, we performed docking simulations with each expected intermediate. Our proposal is based on mechanisms of degradation of faropenem proposed to L,D-transpeptidases (25), and then, on the retro-aldol reaction that leads to the elimination of the β -hydroxy carbonyl moiety of the β -lactam C6 substituents proposed to the β -lactamases BlaC (5) and *Acinetobacter* derivate carbapenemases (ADC) (44) (Fig. 8).

In step 1, we represent the recognition of faropenem by the enzyme, before the covalent bond formation. Faropenem was docked into the outer cavity and was predicted to form hydrogen bond interactions with Ser199, His228, His244 and Cys246. In this binding mode, the carbonyl carbon of the β -lactam ring is positioned close to SH group from Cys246, in an orientation coherent with the covalent bond formation. Later, an H⁺ is transferred from Cys246 SH to N^{e2} of His228, favoring the nucleophilic attack of the carbonyl carbon. The step 2 possibly involves a water molecule, resembling the mechanism of covalent binding and hydrolysis of meropenem by OXA-23 serine- β -lactamase (45). This intermediate is stabilized by hydrogen bonds with Gly224, His244, Cys246 and Ser248.

In step 3 occurs a retro-aldol reaction as reported during the acylation of Ldt_{M1} and Ldt_{M2} by faropenem, leading to a β -OH-butyrate adduct (25,30). This intermediate is stabilized by Arg174, Ser248 and Cys246. The step 4 indicates a further retro-aldol reaction similar to the described for the decomposition of the hydroxyethyl C6 substituent of carbapenems by BlaC and ADC (5,44). Ser199, placed on η 1 at 2.9 Å from the β -hydroxy oxygen of β -OH-butyrate adduct, may act as the general base to deprotonate the β -

hydroxy carbonyl moiety of the C6 substituent. The negative charge on the carbonyl group could be supported by His244 and Cys246 sidechains in the oxyanion hole. This reaction could lead to the degradation of the β -OH-butyrate adduct into acetyl. Finally, in the step 5, the carbonyl oxygen from the Ldt_{M3}-acetyl adduct is coordinated by the nitrogen main chain of Cys246 and maintain the enzyme in the inactivated form since the hydrolysis rate of Ldt_{M3} by faropenem is seventeen times slower than its inactivation rate (6).

In summary, the structural and calorimetric analyses showed in this work contribute to the understanding of the structure, function and interaction mechanisms of Ldt_{M3} with β -lactam antibiotics. Our structural data of Ldt_{M3} in complex with faropenem demonstrated that this class of enzyme is able to perform to steep of retro-aldol reactions after the acylation to provide an acetyl group covalently bond to the enzyme. In addition, the structure of Ldt_{M3}, although has similarities with other Ldts_{Mt}, also indicated important differences, including a different size of active cavity and charges that explain its different affinity to β -lactam in comparison to other Ldts_{Mt}. These differences also could give insights into the possible role Ldt_{M3} on the mycobacterial peptidoglycan. Additionally, our thermodynamical analysis together with our structural characterization could be useful to guide in the synthesis of novel β -lactam derivatives targeting *M. tuberculosis* L,D-transpeptidases.

Experimental Procedures

Antibiotics

The β -lactams used in this study belong to four classes: Penams [ampicillin sodium (AMP) and carbenicillin disodium (CAR)]; Cephalosporins [cephalexin hydrate (LEX) and ceftazidime hydrate (CAZ)] from Sigma-Aldrich; Penems [faropenem sodium (FAR)]; and, Carbapenems [biapenem hydrate (BIA) and doripenem hydrate (DOR) from AKSci, ertapenem sodium (ETP) from Melford, meropenem (MEM) from TOKU-E, and imipenem hydrate (IPM) from OXCHEM].

Protein production and purification

Ldt_{Mt3}: A truncated construct for Ldt_{Mt3} (encoding residues Q32 to E271) was amplified by PCR from *M. tuberculosis* H37Rv genomic DNA using the primers *ldt_{Mt3}-for*

5'CGCCATATGCAGTCTTACGGGTTCGCC GT3' and *ldt_{Mt3}-rev* 5'CGCCTCGAGCTATTCCTGCACAATGAC CG3' with restriction sites for *NdeI* and *XhoI* in subscript. PCR product was cloned into pET28a(+) expression plasmid (Novagen) containing an N-terminal 6X His tag. *E. coli* BL21 (DE3) harboring the recombinant plasmids were grown in lysogenic broth with kanamycin (50 µg L⁻¹) at 37°C until A₆₀₀ ~ 0.8. Then, protein expression was induced by adding 0.5 mM of Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) to the culture, which was incubated at 18°C for further 18 h. Cells were resuspended in lysis buffer (50 mM sodium phosphate pH 6.4, 300 mM NaCl, 5% (v/v) glycerol, 5 µM phenylmethylsulfonyl fluoride - PMSF, 5 µg mL⁻¹ lysozyme, and 5 µg mL⁻¹ DNase), lysed by ultrasonication, and cell debris were removed by centrifugation. The supernatant was loaded into a Ni-NTA column (GE Healthcare) connected to an AKTA Purifier FPLC system (GE Healthcare), and protein elution was carried out in a linear gradient of imidazole. A second purification step was conducted by using a Superdex 16/600 200 pg column (GE Healthcare) previously equilibrated with 50 mM sodium phosphate pH 6.4, 150 mM NaCl, for the protein to be used in calorimetric experiments, or 100 mM citrate/ citric acid pH 5.5, 150 mM NaCl, 5% v/v glycerol for the protein to be used in crystallization assays. Fractions containing Ldt_{Mt3} were concentrated up to 10 mg mL⁻¹. The protein purity was assessed by SDS-PAGE.

Ldt_{Mt5}: *ldt_{Mt5}* was amplified from *M. tuberculosis* H37Rv genomic DNA by using a primer set of *ldt_{Mt5}-for* 5'CGCCATATG GCCGGCAAAGTGACCAAGCT3' and *ldt_{Mt5}-rev* 5'CGCCTCGAGTTACCCACCCGGTCCGTT AG3' to generate a truncated Ldt_{Mt5} construct encoding the residues from A50 to G451. The PCR product was cloned into a pET28a(+) expression vector (Novagen) containing an N-

terminal 6X His tag. The protein was expressed and purified following the same protocol described above for Ldt_{Mt3}.

Protein crystallization, X-ray data collection and structure determination

Crystallization screening was performed with a robot Oryx6 (Douglas Instruments) to identify optimal crystallization conditions from commercial kits (classic, basic, JCSG++, and Pi-minimal from Jena Bioscience). Ldt_{Mt3} crystals were optimized by hanging drop vapor diffusion method and micro-seeding. Suitable crystals of Ldt_{Mt3} grown in drops containing 1 µL of protein (10 mg mL⁻¹), 1 µL of reservoir solution, and 0.5 µL of seeding that was equilibrated against a reservoir containing 500 µL of 10% w/v PEG 8000, 100 mM Hepes pH 7.5, 200 mM calcium acetate. For co-crystallization assays, Ldt_{Mt3} was incubated with each antibiotic (5-20 mM) during 1h prior to the crystallization experiment also conducted as above. For soaking experiments, Ldt_{Mt3} crystals were harvested into drops containing the same reservoir solution and soaked against increasing concentrations of each β-lactam at up to 20 mM and incubated for 24 h at 18°C before data collection. Crystals of Ldt_{Mt5} grown at 18°C in drops made up of 1 µL of protein at 15 mg mL⁻¹, 1 µL of reservoir solution equilibrated in 500 µL of 22% w/v PEG 4000, 100 mM sodium acetate pH 6.5, and 200 mM ammonium sulphate. Crystals were flash-frozen in a cryogenic solution containing 30% (v/v) of PEG 400 (for Ldt_{Mt3} crystals); and 30% (v/v) of ethylene glycol (for Ldt_{Mt5} crystals). Data were collected at 100 K at the synchrotron beamline MX2 on LNLS, Campinas, Brazil, or at P13 on PETRA III, Hamburg, Germany. The data sets were analyzed with XDS (46) and the reflections were scaled using Aimless (47). The phases were obtained by molecular replacement with Phaser (48) from CCP4 suite (49), adopting the PDB entries 4K73 and 5DU7 (25) as models for Ldt_{Mt3} and Ldt_{Mt5} structures, respectively. Structure refinement was performed employing Phenix.refine (50) and model inspection was conducted with the software Coot (51), utilizing the electronic density maps *Fo-Fc* and *2Fo-Fc*. The figures were prepared with PyMol (52).

Differential Scanning Fluorimetry (DSF)

DSF assays were carried out in triplicate and utilizing optical 96 well plates (Bio-Rad). Ldt_{Mt3} (10 μ M) was mixed with each β -lactam antibiotic (5mM), plus SYPRO Orange (5X) (Invitrogen) as a probe, to a final reaction volume of 25 μ L per well. DSF was measured in a real-time thermocycler (Bio-Rad CFX connect) with filters of excitation/detection from 450 to 580 nm and a temperature range from 25 to 95°C with a linear increment of 0.5°C by one minute and ten seconds of dwell. The Melting temperature (T_m) of Ldt_{Mt3} was determined by Bio-Rad CFX Manager software applying $-d(RFU)/dT$. Ldt_{Mt3} reference unfolding temperature in the absence of any ligand (T_{mRef}) was subtracted from the values in the presence of β -lactams in order to obtain thermal shifts ($\Delta T_m = T_{m\beta lactam} - T_{mRef}$). Molecules were considered to interact with when $-1.35 \leq \Delta T_m \leq 1.35^\circ\text{C}$. The choice of this cutoff was based on the selection of ligands that induced a three-fold increase or decrease on the standard deviation T_m related to the T_{mRef} , thus representing the possible minimal error.

Isothermal Titration Calorimetry (ITC)

Affinity constants (K_d) and thermodynamic profiles of binding were determined using an ITC microcalorimeter (iTC200, Microcal) at 24°C. Into the equipment cell, 100 μ M of protein in a buffer containing 50 mM sodium phosphate pH 6.4 and 150 mM NaCl was titrated against β -lactams in a concentration range from 1.0 to 1.5 mM in the syringe. Titrations were carried out with 18 injections of 2.0 μ L of each antibiotic with 320 s of spacing and 400 rpm of stirring. Stirring and dilution heats were obtained from control titrations of water against water and ligand against the buffer, respectively, and then subtracted from the raw data. The data were fitted using Origin 7.0 (MicroCal iTC200 software) with 'one-set-of-sites' binding model. Thermodynamic relationships were used to calculate respectively Gibb's free energy and binding entropy: $\Delta G = -RT \ln K_a$ and $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$. Ligand efficiency (Δg) and Ligand Efficiency Lipophilic Price (LELP) were calculated applying $\Delta g = \Delta G / \text{No. non-}$

hydrogen atoms and $\text{LELP} = \text{LogP} / \Delta g$, accordingly.

Docking of β -lactams

Apo-Ldt_{Mt3} (PDB entry 6D4K) was used to perform docking simulations with five carbapenems and faropenem. We adopted the *Induced Fit Docking* (IFD) protocol (53) followed by *covalent docking* using the Maestro interface and programs from the Small Molecule Discovery Suite (Schrodinger). Protein was prepared using the *Protein Preparation Wizard* to assign bond orders, create disulfide bonds, delete all waters, and calculate residue protonation states with PropKa (pH 7.0). Ligands were prepared in *LigPrep 3.5*, employing the OPLS3 force field, with calculation of protonation states at pH 7.0 $\pm$ 2.0 using Epik 3.3, and maintaining specified chiralities. The IFD protocol consisted of an initial docking round, followed by generation of protein conformations and a final docking round. In the initial docking, using *Glide SP*, ligand van der Waals radii of both receptor and ligand were scaled to 0.5, allowing a closer approach between them. Cys246 was chosen as the grid center and a maximum of 20 poses per ligand were calculated. Protein conformations were then generated with Prime, considering as flexible all residues within 5 Å from ligand poses, and the conformations whose energy was up to 30 kcal/mol from the best structure and classified within the first 20 poses were selected for docking. The final IFD docking round was then performed with *Glide SP*. Finally, protein coordinates with the best pose for each ligand (lowest *Glide score*) were selected for covalent docking. Each ligand was covalently docked at Cys246 using a box size $\leq$ 20 Å, employing the reaction " β -lactam addition" and the SMARTS "[O-0X1]=[C]1[C][C][N]1" for recognition of reacting groups. Docking was performed in the "Pose Prediction (Thorough)" mode, employing a cutoff of 2.5 kcal mol⁻¹ to retain poses for further refinement, and a maximum of 200 poses for refinement. Scoring was calculated using Glide and one pose were output per reaction site.

Intact mass spectrometry (MS)

An aliquot of 2.0 μ L of Ldt_{Mt3} previously incubated with 2.5 mM of each β -lactam antibiotic at 4°C and containing formic

acid 0.1% final was injected by C18 (100 μ m x 100 mm) RP-UPLC (nanoAcquity UPLC, Waters) coupled with nanoelectrospray tandem mass spectrometry on a Q-ToF Premier mass spectrometer (MicroMass/Waters) at a flow rate of 600 nl/min. The gradient was 0-90% acetonitrile in 0.1% formic acid over 45 minutes. The instrument was operated in MS continuum mode and the data acquisition was from m/z 100–2,000 at a scan rate of 1 s and an interscan delay of 0.1 s. The nanoelectrospray voltage was set to 3.5kV, a cone voltage of 30 V and the source temperature was 80°C. The spectra were accumulated over about 300 scans and the multiple charged data produced by the mass spectrometer on the m/z scale were converted to the mass (molecular weight) scale using Maximum Entropy-based software (54) supplied with Masslynx 4.1 software package. The processing parameters were: Output mass range 24,000-30,000 Da at a “resolution” of 0.1 Da/channel; the simulated isotope pattern model was used with the spectrum blur width parameter set to 0.2 Da, and the minimum intensity ratios between successive peaks were 20% (left and right). The deconvoluted spectrum was smoothed (2x 4 channels, Savitzky-Golay smooth), and the mass centroid values were obtained using 80% of the peak top and a minimum peak width at half-height of four channels (55).

Accession numbers

The coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank (PDB) under the accession numbers 6D4K, 6D51, and 6D5A for Ldt_{Mt3} apo form, Ldt_{Mt3} in complex with an acetyl group derived from faropenem, and Ldt_{Mt5} apo form, respectively.

Acknowledgments

This study was supported by Foundation for Research Support of the State of São Paulo (FAPESP) grant 2015/09188-8 and 2010/15971-3 to MVBD and fellowship 2016/18721-4 to CDS. GALZ receives a fellowship from the Support Program for Foreign PhD Students and Ibero-American Graduate Association (PAEDEX/AUIP 2014). RSF and MVBD receive a CNPq research fellowship (Bolsa de Produtividade em Pesquisa, level 2). We thank to F. R. Pavan from Faculty of Pharmaceutical Sciences of the São Paulo State University (UNESP- Araraquara) to provide us with *M. tuberculosis* genomic DNA. Also, to acknowledge to the LNLS in Campinas and PETRA III in Hamburg, to allow us to use the beamlines MX2 and P13, respectively; to C. Oliveira from Institute of Physics of University of São Paulo (IFUSP) for the calorimetry facility; and, to the Mass Spectrometry Laboratory at Brazilian Biosciences National Laboratory, CNPEM, Campinas, Brazil for their support with the mass spectrometry analysis.

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

Author Contributions: GALZ.: Design of experiments, acquisition, analysis and interpretation of data, drafting and revising the manuscript; CDS and RSF.: Acquisition and analysis of data, drafting and revising the manuscript; MVBD.: Conception and design, interpretation of the data, drafting and revising the manuscript.

References

1. Anonymous. (2017) Global Tuberculosis Report 2017. World Health Organization, Geneva. pp.1-147
2. Andries, K., Verhasselt, P., Guillemont, J., Göhlmann, H. W., Neefs, J. M., Winkler, H., Van Gestel, J., Timmerman, P., Zhu, M., Lee, E., Williams, P., de Chaffoy, D., Huitric, E., Hoffner, S., Cambau, E., Truffot-Pernot, C., Lounis, N., and Jarlier, V. (2005) A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **307**, 223-227
3. Gler, M. T., Skripconoka, V., Sanchez-Garavito, E., Xiao, H., Cabrera-Rivero, J. L., Vargas-Vasquez, D. E., Gao, M., Awad, M., Park, S. K., Shim, T. S., Suh, G. Y., Danilovits, M., Ogata, H., Kurve, A., Chang, J., Suzuki, K., Tupasi, T., Koh, W. J., Seaworth, B., Geiter, L. J., and Wells, C. D. (2012) Delamanid for multidrug-resistant pulmonary tuberculosis. *N Engl J Med* **366**, 2151-2160
4. Kurz, S. G., and Bonomo, R. A. (2012) Reappraising the use of β -lactams to treat tuberculosis. *Expert Rev Anti Infect Ther* **10**, 999-1006
5. Hugonnet, J. E., Tremblay, L. W., Boshoff, H. I., Barry, C. E., and Blanchard, J. S. (2009) Meropenem-clavulanate is effective against extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **323**, 1215-1218
6. Dhar, N., Dubée, V., Ballell, L., Cuinet, G., Hugonnet, J. E., Signorino-Gelo, F., Barros, D., Arthur, M., and McKinney, J. D. (2015) Rapid cytolysis of *Mycobacterium tuberculosis* by faropenem, an orally bioavailable β -lactam antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother* **59**, 1308-1319
7. Sheehan, J. C. (1967) The chemistry of synthetic and semisynthetic penicillins. *Ann N Y Acad Sci* **145**, 216-223
8. Park, J. T., and Strominger, J. L. (1957) Mode of action of penicillin. *Science* **125**, 99-101
9. Vollmer, W., Blanot, D., and de Pedro, M. A. (2008) Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev* **32**, 149-167
10. Wietzerbin, J., Das, B. C., Petit, J. F., Lederer, E., Leyh-Bouille, M., and Ghuysen, J. M. (1974) Occurrence of D-alanyl-(D)-meso-diaminopimelic acid and meso-diaminopimelyl-meso-diaminopimelic acid interpeptide linkages in the peptidoglycan of *Mycobacteria*. *Biochemistry* **13**, 3471-3476
11. Lavollay, M., Arthur, M., Fourgeaud, M., Dubost, L., Marie, A., Veziris, N., Blanot, D., Gutmann, L., and Mainardi, J. L. (2008) The peptidoglycan of stationary-phase *Mycobacterium tuberculosis* predominantly contains cross-links generated by L,D-transpeptidation. *J Bacteriol* **190**, 4360-4366
12. Mainardi, J. L., Legrand, R., Arthur, M., Schoot, B., van Heijenoort, J., and Gutmann, L. (2000) Novel mechanism of beta-lactam resistance due to bypass of DD-transpeptidation in *Enterococcus faecium*. *J Biol Chem* **275**, 16490-16496
13. Quintela, J., de Pedro, M., Zollner, P., Allmaier, G., and Garcia-del Portillo, F. (1997) Peptidoglycan structure of *Salmonella typhimurium* growing within cultured mammalian cells. *Molecular Microbiology* **23**, 693-704
14. Templin, M. F., Ursinus, A., and Höltje, J. V. (1999) A defect in cell wall recycling triggers autolysis during the stationary growth phase of *Escherichia coli*. *EMBO J* **18**, 4108-4117
15. Sütterlin, L., Edoo, Z., Hugonnet, J. E., Mainardi, J. L., and Arthur, M. (2018) Peptidoglycan Cross-Linking Activity of L,d-Transpeptidases from *Clostridium difficile* and Inactivation of These Enzymes by β -Lactams. *Antimicrob Agents Chemother* **62**

16. Betts, J. C., Lukey, P. T., Robb, L. C., McAdam, R. A., and Duncan, K. (2002) Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Mol Microbiol* **43**, 717-731
17. Magnet, S., Bellais, S., Dubost, L., Fourgeaud, M., Mainardi, J. L., Petit-Frere, S., Marie, A., Mengin-Lecreulx, D., Arthur, M., and Gutmann, L. (2007) Identification of the L,D-Transpeptidases Responsible for Attachment of the Braun Lipoprotein to *Escherichia coli* Peptidoglycan. *J. Bacteriol* **189**, 3927-3931
18. Cava, F., de Pedro, M. A., Lam, H., Davis, B. M., and Waldor, M. K. (2011) Distinct pathways for modification of the bacterial cell wall by non-canonical D-amino acids. *EMBO J* **30**, 3442-3453
19. Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. E., Tekaiia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J. E., Taylor, K., Whitehead, S., and Barrell, B. G. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**, 537-544
20. Gupta, R., Lavollay, M., Mainardi, J. L., Arthur, M., Bishai, W. R., and Lamichhane, G. (2010) The *Mycobacterium tuberculosis* protein LdtMt2 is a nonclassical transpeptidase required for virulence and resistance to amoxicillin. *Nat Med* **16**, 466-469
21. Schoonmaker, M. K., Bishai, W. R., and Lamichhane, G. (2014) Nonclassical transpeptidases of *Mycobacterium tuberculosis* alter cell size, morphology, the cytosolic matrix, protein localization, virulence, and resistance to β -lactams. *J Bacteriol* **196**, 1394-1402
22. Brammer Basta, L. A., Ghosh, A., Pan, Y., Jakoncic, J., Lloyd, E. P., Townsend, C. A., Lamichhane, G., and Bianchet, M. A. (2015) Loss of a Functionally and Structurally Distinct Ld-Transpeptidase, LdtMt5, Compromises Cell Wall Integrity in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **290**, 25670-25685
23. Sanders, A. N., Wright, L. F., and Pavelka, M. S. (2014) Genetic characterization of mycobacterial L,D-transpeptidases. *Microbiology* **160**, 1795-1806
24. Cordillot, M., Dubée, V., Triboulet, S., Dubost, L., Marie, A., Hugonnet, J. E., Arthur, M., and Mainardi, J. L. (2013) In vitro cross-linking of *Mycobacterium tuberculosis* peptidoglycan by L,D-transpeptidases and inactivation of these enzymes by carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* **57**, 5940-5945
25. Kumar, P., Kaushik, A., Lloyd, E. P., Li, S. G., Mattoo, R., Ammerman, N. C., Bell, D. T., Perryman, A. L., Zandi, T. A., Ekins, S., Ginell, S. L., Townsend, C. A., Freundlich, J. S., and Lamichhane, G. (2017) Non-classical transpeptidases yield insight into new antibacterials. *Nat Chem Biol* **13**, 54-61
26. Correale, S., Ruggiero, A., Capparelli, R., Pedone, E., and Berisio, R. (2013) Structures of free and inhibited forms of the L,D-transpeptidase LdtMt1 from *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **69**, 1697-1706
27. Erdemli, S. B., Gupta, R., Bishai, W. R., Lamichhane, G., Amzel, L. M., and Bianchet, M. A. (2012) Targeting the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*: structure and mechanism of L,D-transpeptidase 2. *Structure* **20**, 2103-2115
28. Kelly, G., Prasannan, S., Daniell, S., Fleming, K., Frankel, G., Dougan, G., Connerton, I., and Matthews, S. (1999) Structure of the cell-adhesion fragment of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Nat Struct Biol* **6**, 313-318

29. Bielnicki, J., Devedjiev, Y., Derewenda, U., Dauter, Z., Joachimiak, A., and Derewenda, Z. S. (2006) *B. subtilis* ykuD protein at 2.0 Å resolution: insights into the structure and function of a novel, ubiquitous family of bacterial enzymes. *Proteins* **62**, 144-151
30. Steiner, E. M., Schneider, G., and Schnell, R. (2017) Binding and processing of beta-lactam antibiotics by the transpeptidase LdtMt2 from *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS Journal* **284**, 725-741
31. Biarrotte-Sorin, S., Hugonnet, J. E., Delfosse, V., Mainardi, J. L., Gutmann, L., Arthur, M., and Mayer, C. (2006) Crystal structure of a novel beta-lactam-insensitive peptidoglycan transpeptidase. *J Mol Biol* **359**, 533-538
32. Morlot, C., Pernot, L., Le Gouellec, A., Di Guilmi, A. M., Vernet, T., Dideberg, O., and Dessen, A. (2005) Crystal structure of a peptidoglycan synthesis regulatory factor (PBP3) from *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* **280**, 15984-15991
33. van der Ploeg, R., Verheul, J., Vischer, N. O., Alexeeva, S., Hoogendoorn, E., Postma, M., Banzhaf, M., Vollmer, W., and den Blaauwen, T. (2013) Colocalization and interaction between elongasome and divisome during a preparative cell division phase in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **87**, 1074-1087
34. Daniel, R. A., Harry, E. J., and Errington, J. (2000) Role of penicillin-binding protein PBP 2B in assembly and functioning of the division machinery of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **35**, 299-311
35. Patru, M. M., and Pavelka, M. S. (2010) A role for the class A penicillin-binding protein PonA2 in the survival of *Mycobacterium smegmatis* under conditions of nonreplication. *J Bacteriol* **192**, 3043-3054
36. Kieser, K. J., and Rubin, E. J. (2014) How sisters grow apart: mycobacterial growth and division *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 550-562
37. Yu, J., Zhou, Y., Tanaka, I., and Yao, M. (2010) Roll: a new algorithm for the detection of protein pockets and cavities with a rolling probe sphere. *Bioinformatics* **26**, 46-52
38. Cimperman, P., Baranauskienė, L., Jachimovičiūtė, S., Jachno, J., Torresan, J., Michailovienė, V., Matulienė, J., Sereikaite, J., Bumelis, V., and Matulis, D. (2008) A quantitative model of thermal stabilization and destabilization of proteins by ligands. *Biophys J* **95**, 3222-3231
39. Whitesides, G. M., and Krishnamurthy, V. M. (2005) Designing ligands to bind proteins. *Q Rev Biophys* **38**, 385-395
40. Holdgate, G. A., Tunnicliffe, A., Ward, W. H., Weston, S. A., Rosenbrock, G., Barth, P. T., Taylor, I. W., Pauptit, R. A., and Timms, D. (1997) The entropic penalty of ordered water accounts for weaker binding of the antibiotic novobiocin to a resistant mutant of DNA gyrase: a thermodynamic and crystallographic study. *Biochemistry* **36**, 9663-9673
41. Velazquez-Campoy, A., Todd, M. J., and Freire, E. (2000) HIV-1 protease inhibitors: enthalpic versus entropic optimization of the binding affinity. *Biochemistry* **39**, 2201-2207
42. Keserü, G. M., and Makara, G. M. (2009) The influence of lead discovery strategies on the properties of drug candidates. *Nat Rev Drug Discov* **8**, 203-212
43. Dubée, V., Triboulet, S., Mainardi, J. L., Ethève-Quelquejeu, M., Gutmann, L., Marie, A., Dubost, L., Hugonnet, J. E., and Arthur, M. (2012) Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* l,d-transpeptidase LdtMt₁ by carbapenems and cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 4189-4195

44. Drawz, S. M., Babic, M., Bethel, C. R., Taracila, M., Distler, A. M., Ori, C., Caselli, E., Prati, F., and Bonomo, R. A. (2010) Inhibition of the class C beta-lactamase from *Acinetobacter spp.*: insights into effective inhibitor design. *Biochemistry* **49**, 329-340
45. Sgrignani, J., Grazioso, G., and De Amici, M. (2016) Insight into the Mechanism of Hydrolysis of Meropenem by OXA-23 Serine- β -lactamase Gained by Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Calculations. *Biochemistry* **55**, 5191-5200
46. Kabsch, W. (2010) XDS. *Acta Cryst.* **D66**, 125-132
47. Evans, P. R., and Murshudov, G. N. (2013) How good are my data and what is the resolution? *Acta Cryst.* **D69**, 1204-1214
48. McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storonia, L. C., and Read, R. J. (2007) Phaser crystallographic software. *J. Appl. Cryst.* **40**, 658-674
49. Bailey, S. (1994) The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta. Cryst.* **D50**, 760-763
50. Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkoczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C., and Zwart, P. H. (2010) PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Cryst* **D66**, 213-221
51. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, G., and Cowtan, K. (2010) Features and development of Coot. *Act Cryst* **D66**, 486-501
52. DeLano, W. (2002) The PyMOL Molecular Graphics System. in *Delano Scientific*, San Carlos. California. USA
53. Sherman, W., Day, T., Jacobson, M. P., Friesner, R. A., and Farid, R. (2006) Novel procedure for modeling ligand/receptor induced fit effects. *J Med Chem* **49**, 534-553
54. Ferrige, A., Seddon, M., Green, B., Jarvis, S., and Skilling, J. (1992) Disentangling electrospray spectra with maximum entropy. *Rapid Commun Mass Spectrom* **6**, 707-711
55. Guimarães, B. G., Barbosa, R. L., Soprano, A. S., Campos, B. M., de Souza, T. A., Tonoli, C. C., Leme, A. F., Murakami, M. T., and Benedetti, C. E. (2011) Plant pathogenic bacteria utilize biofilm growth-associated repressor (BigR), a novel winged-helix redox switch, to control hydrogen sulfide detoxification under hypoxia. *J Biol Chem* **286**, 26148-26157

TABLES

Antibiotic	ΔG (kcal mol ⁻¹)	ΔH (kcal mol ⁻¹)	$T\Delta S$ (kcal mol ⁻¹)	K_a (M ⁻¹)	K_d (μ M)
Imipenem	-10.5 ($\pm$ 0.2)	-9.4 ($\pm$ 0.1)	-1.0 ($\pm$ 0.2)	(6.1 $\pm$ 0.4) x 10 ⁷	0.016 ($\pm$ 0.001)
Ertapenem	-10.4 ($\pm$ 0.6)	-10.6 ($\pm$ 0.2)	0.2 ($\pm$ 0.6)	(4.5 $\pm$ 1.0) x 10 ⁷	0.022 ($\pm$ 0.005)
Biapenem	-8.6 ($\pm$ 0.2)	-8.7 ($\pm$ 0.1)	0.1 ($\pm$ 0.2)	(2.2 $\pm$ 0.4) x 10 ⁶	0.45 ($\pm$ 0.08)
Faropenem	-8.4 ($\pm$ 0.2)	-11.8 ($\pm$ 0.1)	3.4 ($\pm$ 0.2)	(1.7 $\pm$ 0.3) x 10 ⁶	0.59 ($\pm$ 0.10)
Doripenem	-7.6 ($\pm$ 0.8)	-8.6 ($\pm$ 0.3)	1.0 ($\pm$ 0.8)	(4.3 $\pm$ 1.3) x 10 ⁵	2.3 ($\pm$ 0.7)
Meropenem	-7.5 ($\pm$ 1.0)	-5.6 ($\pm$ 0.3)	-2.0 ($\pm$ 1.0)	(3.4 $\pm$ 1.7) x 10 ⁵	2.9 ($\pm$ 1.5)

Table 1. Thermodynamic parameters obtained for six β -lactam antibiotics that interact with Ldt_{M13}.

β -lactam antibiotics	β -lactam mass (Da)	Average mass observed	Average mass bound	Interpretation
Faropenem	285.31	26,195.5	86.8	Fragment bound
Imipenem	317.36	26,424.6	315.9	Full mass bound
Meropenem	383.46	26,493.7	385.0	Full mass bound
Ertapenem	475.52	26,584.9	476.2	Full mass bound
Biapenem	350.39	26,460.7	352.0	Full mass bound
Doripenem	420.50	26,530.2	421.5	Full mass bound

Table 2. Mass spectrometry analysis for covalent adduct formation of Ldt_{M13} with β -lactam antibiotics.

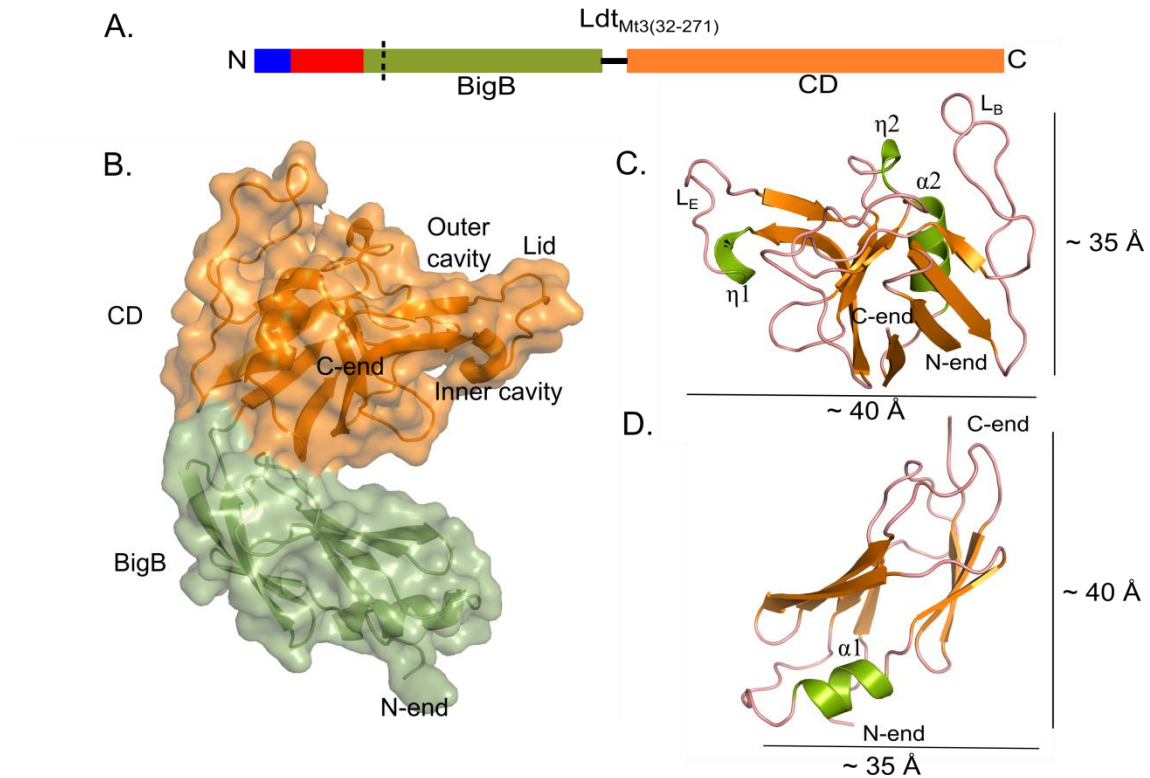


Figure 1. The Overall structure of Ldt_{Mt3} from *M. tuberculosis*. (A). Domain distribution of Ldt_{Mt3}. Cytoplasmic (blue), transmembrane (red), N-end Bacterial Ig-like domain 1 (BigB) in green and the catalytic domain (CD) in orange. Dashed black line cutting the BigB domain indicates the start of the protein construct used in this study Ldt_{Mt3}(32-271), BigB and CD are linked by a short loop (continuous black line). (B). Surface and cartoon representations of the overall structure of Ldt_{Mt3} indicating elements of secondary structure, BigB is represented in green and CD in orange. (C). and (D). show a cartoon representation with elements of secondary structure of CD and BigB domains of Ldt_{Mt3}, respectively. The lines are representing the approximate dimensions of each domain.

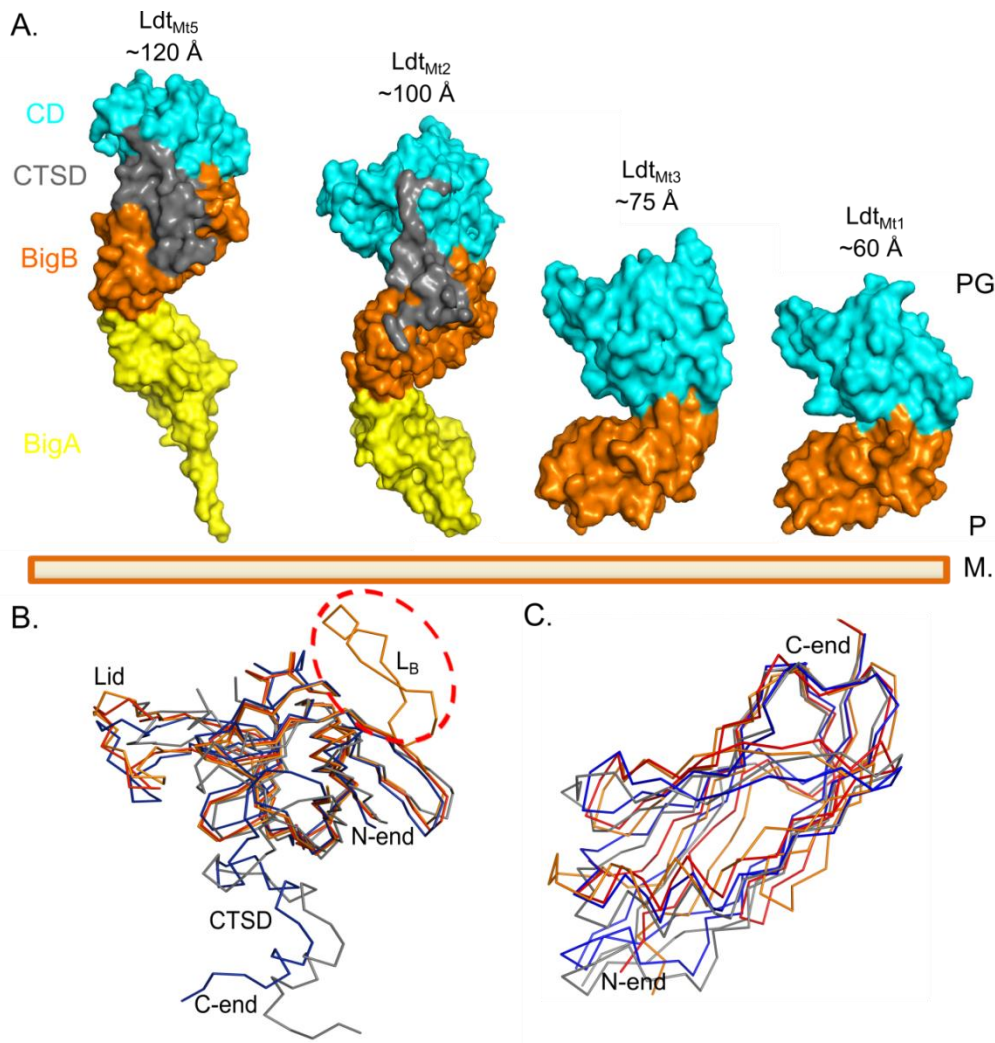


Figure 2. Structural comparison between L,D-transpeptidases from *M. tuberculosis*. (A) Surface representation of Ldt_{Mt1} PDB entry 4JMN (26), Ldt_{Mt2} PDB entry 5DU7 (25), Ldt_{Mt3} PDB entry 6D4K, and Ldt_{Mt5} PDB entry 6D5A showing the Bacterial Ig-like domains: BigA (yellow), BigB (orange), and catalytic domains: CD (cyan). C-terminal subdomains (CTSD) in gray. M: Membrane, P: Periplasm, and PG: Peptidoglycan. Ribbon representation of the overlay of the CDs (B) and BigB domains (C) of four L,D-transpeptidases from *M. tuberculosis*. Ldt_{Mt3} (orange), Ldt_{Mt1} (red), Ldt_{Mt2} (blue) and Ldt_{Mt5} (gray). Loop B: L_B and Loop E: L_E.

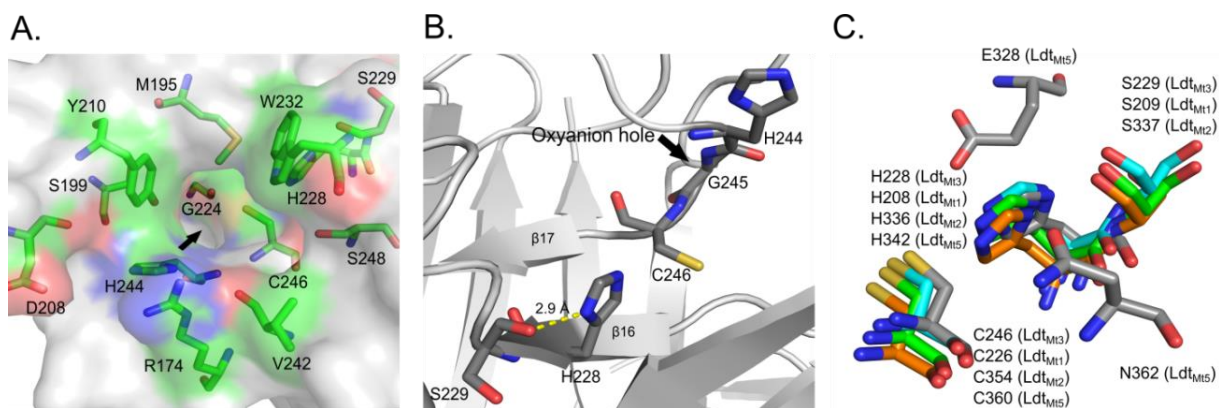


Figure 3. The active site of Ldt_{Mt3}. (A) Surface representation of the active site of Ldt_{Mt3}. Residues that form the outer cavity (black arrow) are represented as green sticks. (B) The catalytic triad of Ldt_{Mt3}. Carbon atoms in gray sticks and the distance between N^{δ1} of His 228 and the carbonyl oxygen of Ser229 are in yellow dash line. (C) Superimposition of the catalytic residues of Ldt_{Mt3} (orange), Ldt_{Mt1} PDB entry 4JMN (26) (green), Ldt_{Mt2} PDB entry 5DU7 (25) (cyan), and Ldt_{Mt5} PDB entry 6D5A (gray) sticks.

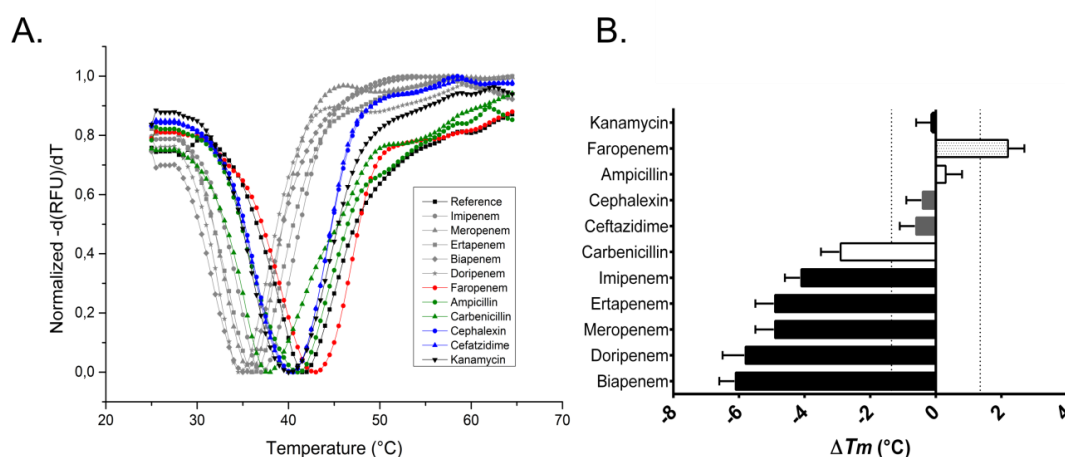


Figure 4. Interaction studies of Ldt_{Mt3} with β-lactam antibiotics. (A) Thermal unfolding curves of Ldt_{Mt3} (10 μM) in presence or absence of β-lactam antibiotics (5 mM). Reference and the non-interaction control of kanamycin are represented in black lines, carbapenems (gray), faropenem (red), penams (green), and cephalosporins (blue) lines. T_m value is defined as the temperature at the maximum point of inflection of each thermal unfolding curve [$-d(RFU)/dT$ vs. Temperature]. (B) The thermal shift (ΔT_m , °C) induced by β-lactam antibiotics on Ldt_{Mt3}. Dash lines indicate the cut-off of interaction: ($-1.35 \leq \Delta T_m \leq 1.35$ °C). Carbapenems (black), penams (white), faropenem (white dotted), cephalosporins (gray bars). Experiments were conducted in triplicate. Error bars indicated standard errors of the means, calculated using the resulting three values.

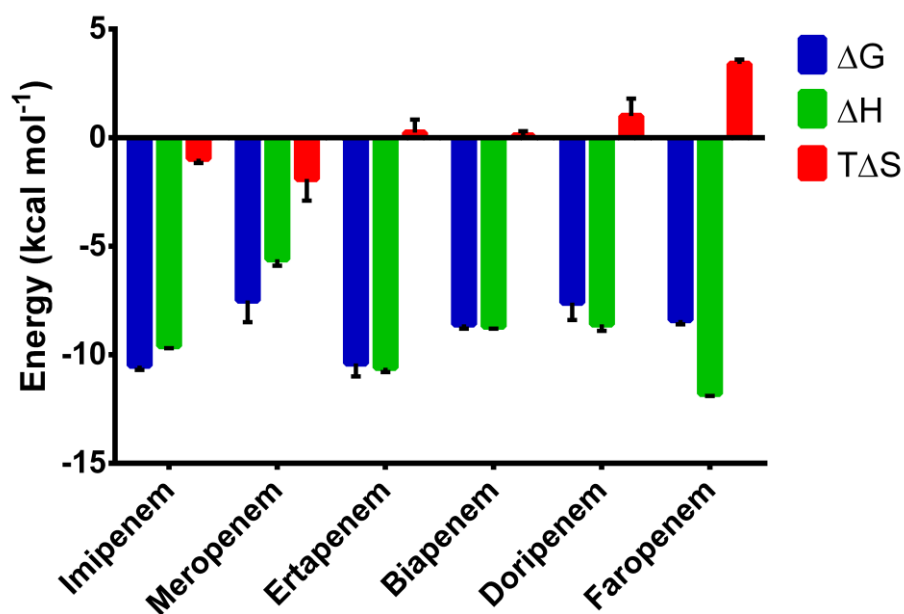


Figure 5. Thermodynamic profiles of β -lactam antibiotics binding to Ldt_{M13} obtained by ITC at 24 °C. Binding energetics analysis ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$) of Ldt_{M13} interaction with five carbapenems (imipenem, meropenem, ertapenem, biapenem, and doripenem) and faropenem in a protein-antibiotic ratio $\sim 1:15$. In this figure, free energy (ΔG) in blue, enthalpy (ΔH) in green, and entropy ($-T\Delta S$) in red bars. The error bars represent the error from the fitting of the raw data.

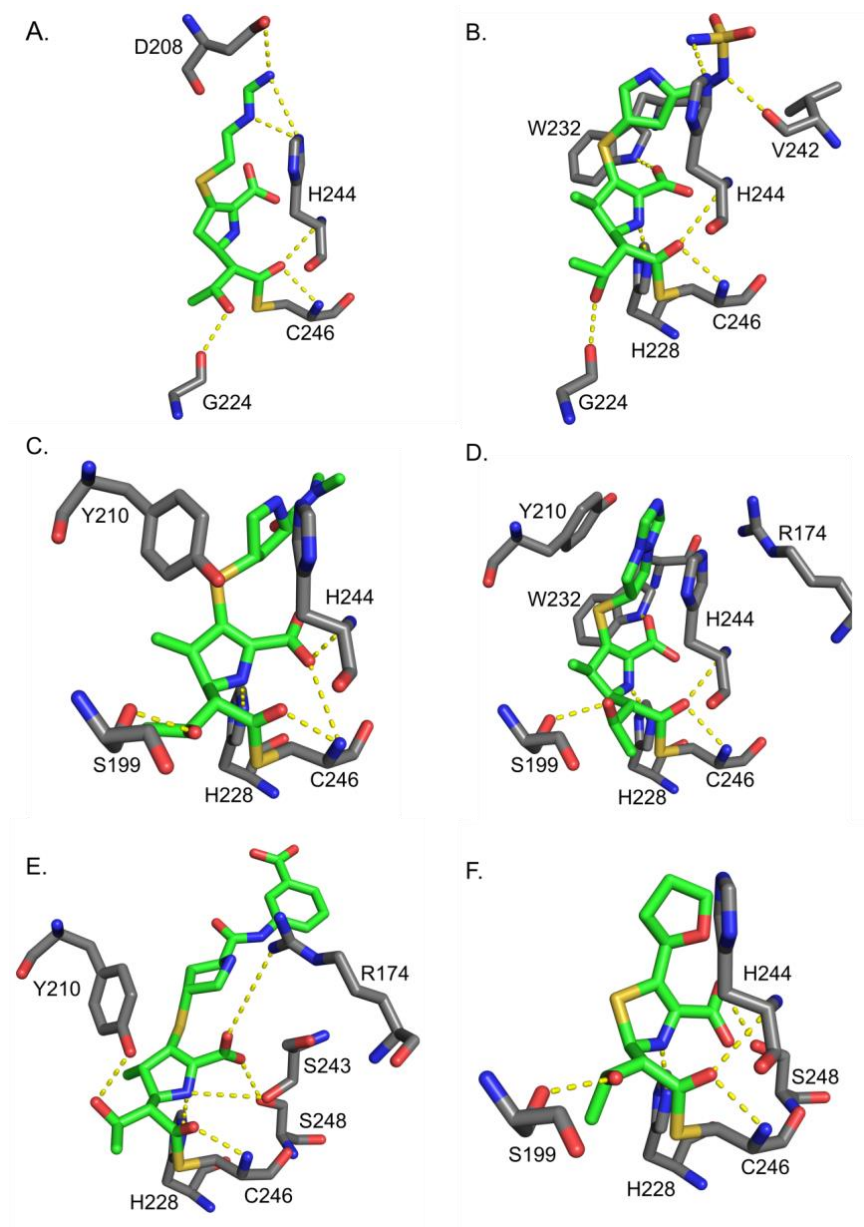


Figure 6. Binding modes of β -lactam antibiotics to Ldt_{Mt3}. Docking predicted binding modes and Glide scores, in parenthesis, of the interaction of (A) Imipenem (-7.8), (B) Doripenem (-6.7), (C) Meropenem (-6.3), (D) Biapenem (-4.8), (E) Ertapenem (-6.4) and (F) Faropenem (-6.3) to Ldt_{Mt3}. The β -lactam carbon atoms are represented in green, whereas Ldt_{Mt3} residues that participate in the interaction are shown as gray sticks. Oxygen, nitrogen, and sulfur atoms are respectively shown in red, blue and yellow. Hydrogen bonds and salt bridges are represented as yellow dashed lines.

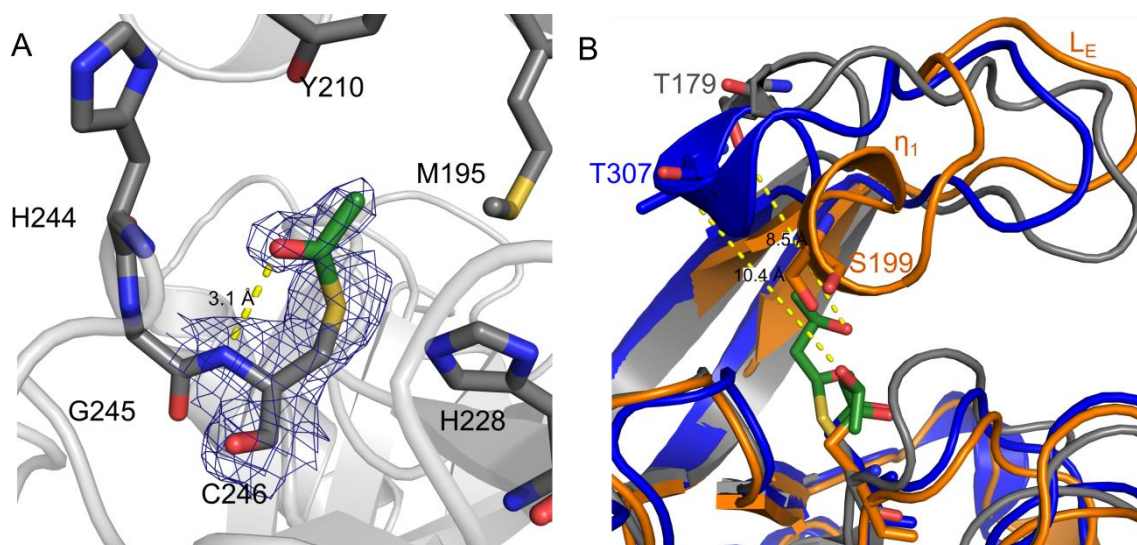


Figure 7. Crystal structure of Ldt_{M13} in complex with an acetyl group derived from faropenem. (A) (2*Fo*-*Fc*) electron-density map contour at 1σ for faropenem derived adduct attached to Cys246. Dash yellow line is showing the interaction of the acetyl group with the N from Cys246. Residues near to the catalytic site are shown in gray sticks. (B) Cartoon representation of superimposition of the complex Ldt_{M13}-acetyl group (orange) PDB entry 6D51, and the adduct of β-OH-butyrate-Ldt_{M12} (blue). Ser199 is replaced by Thr179 and Thr307 in structures of Ldt_{M11} and Ldt_{M12}, respectively. Thr179 is placed at 8.5 Å and Thr307 at 10.4 Å from the alcohol function of the β-OH-butyrate adduct respectively. β-OH-butyrate-Ldt_{M12} adduct PDB entry 5LBG (30), and β-OH-butyryl-Ldt_{M11} adduct (gray) PDB entry 5E51 (25). Loop E: L_E.

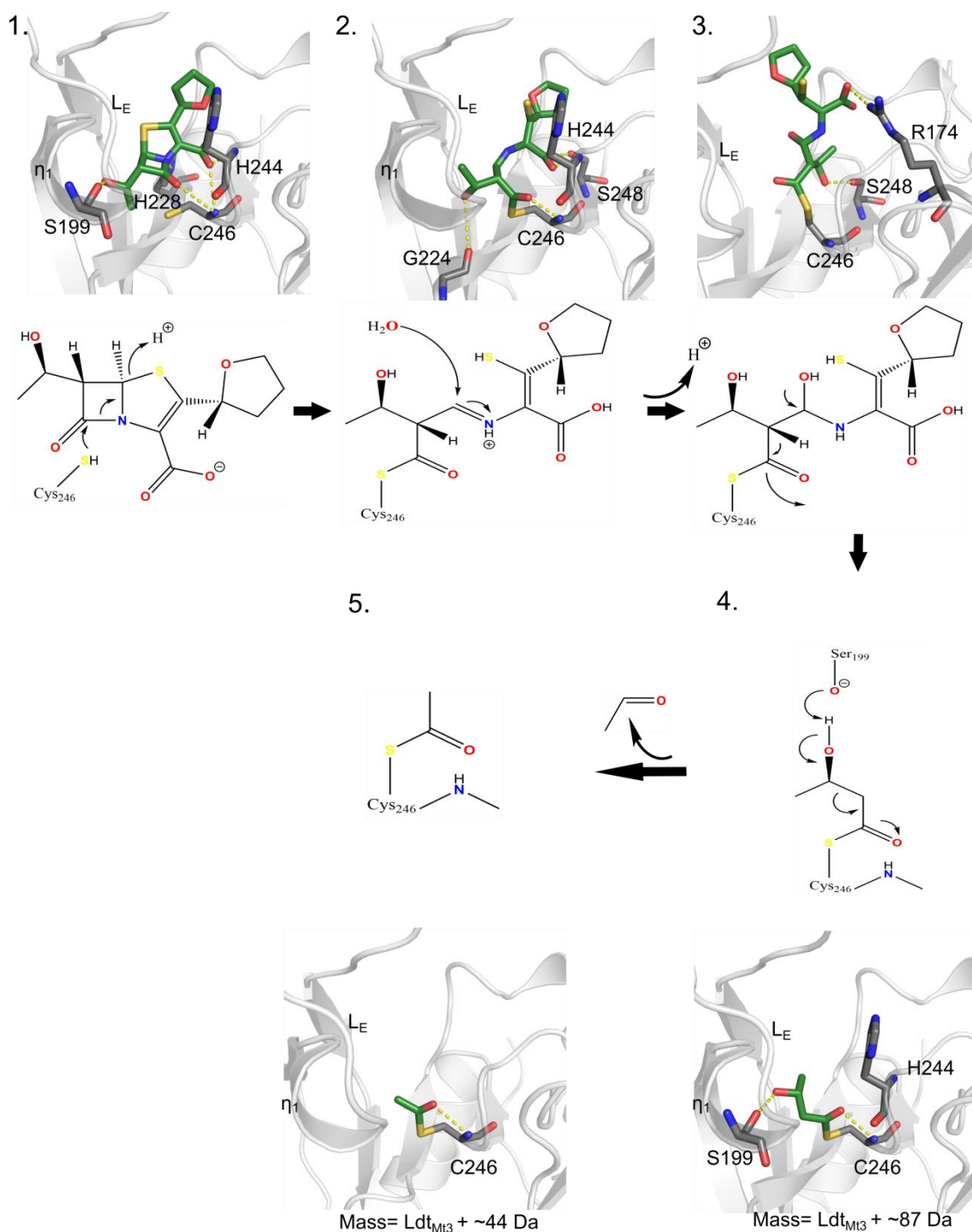


Figure 8. A proposed mechanism of binding and degradation of faropenem after acylation of Ldt_{M13} . Each step shows a three-dimensional representation generated by docking (outer panels) and the corresponding two-dimensional chemical reaction (inner panels). Carbon atoms from protein residues and faropenem are represented as gray and green sticks, respectively. Mass of Ldt_{M13} plus 87 Da, in step 4, represents the gain in the enzyme mass by a β -OH-butyrate adduct as evidenced by mass spectrometry; whereas the mass of Ldt_{M13} plus $\sim 44 \text{ Da}$, in step 5, represents the gain in the enzyme mass by an acetyl adduct as evidenced by X-ray crystallography.

Supporting Information

Structural basis for the interaction and processing of β -lactam antibiotics by L,D-transpeptidase 3 (Ldt_{Mt3}) from *Mycobacterium tuberculosis*

Gerardo A. Libreros^{1,2,3}, Catharina dos Santos Silva¹, Rafaela Salgado Ferreira⁴, and Marcio Vinicius Bertacine Dias^{1,2*}

From the ¹ Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Avenida Prof. Lineu Prestes 1374, São Paulo, Brasil; ² Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rua Cristóvão Colombo, 2265, São José do Rio Preto, Brasil; ³ Departamento de Microbiología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Calle 4B 36-00. Cali, Colombia; ⁴ Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, Brasil.

* To whom correspondence should be addressed: Marcio Vinicius Bertacine Dias: Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Avenida Prof. Lineu Prestes 1374, 05508-900, São Paulo, Brasil; mvbdias@usp.br; Tel/Fax: +55 11 3091 7420.

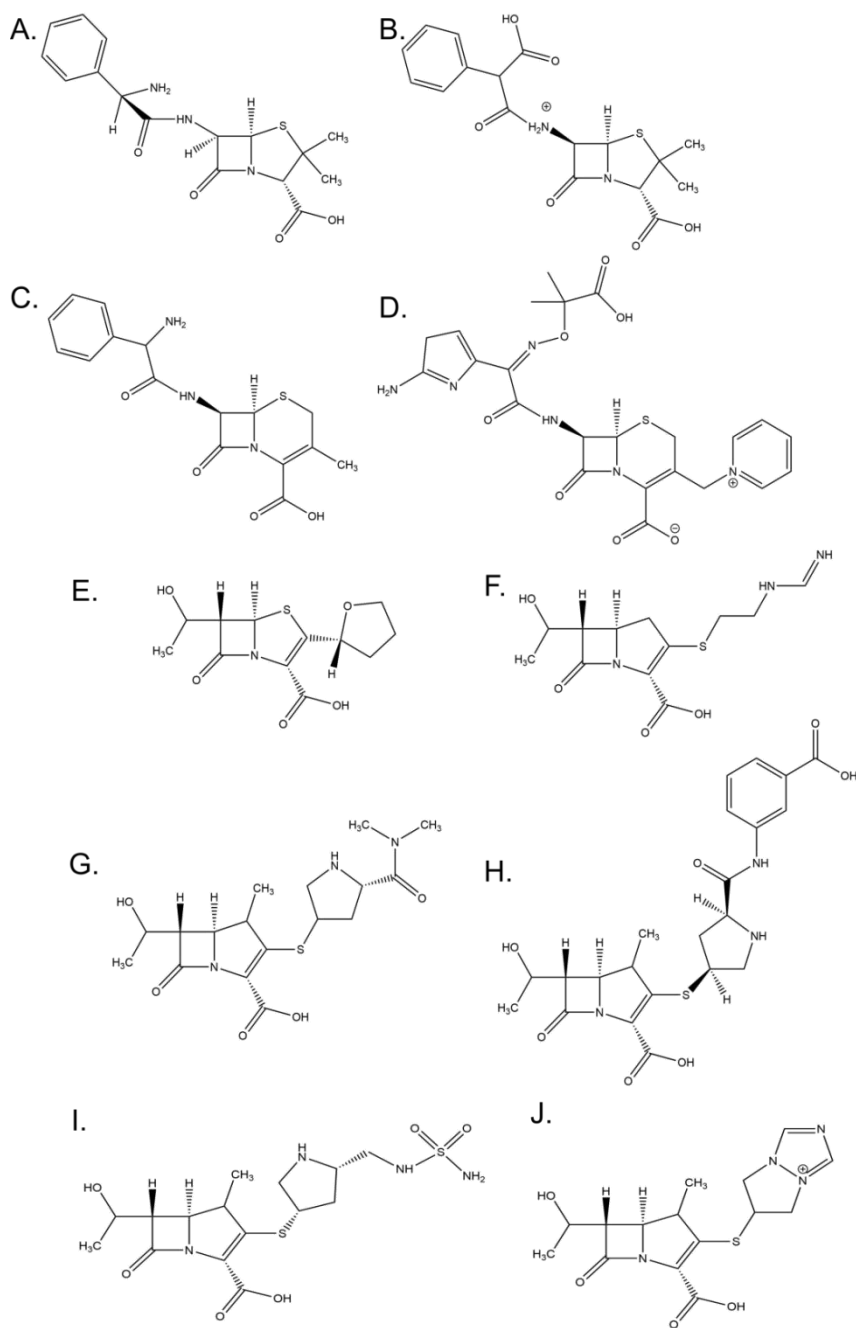


Figure S1 Chemical structures of β -lactam antibiotics used in this study. Penicillins (A) Ampicillin and (B) Carbenicillin; Cephalosporins (C) Cephalexin and (D) Ceftazidime; Penem (E) Faropenem; and, Carbapenems (F) Imipenem, (G) Meropenem, (H) Ertapenem, (I) Doripenem, and (J) Biapenem. Structures were drawn with ChemDraw of PelkinElmer Informatics.

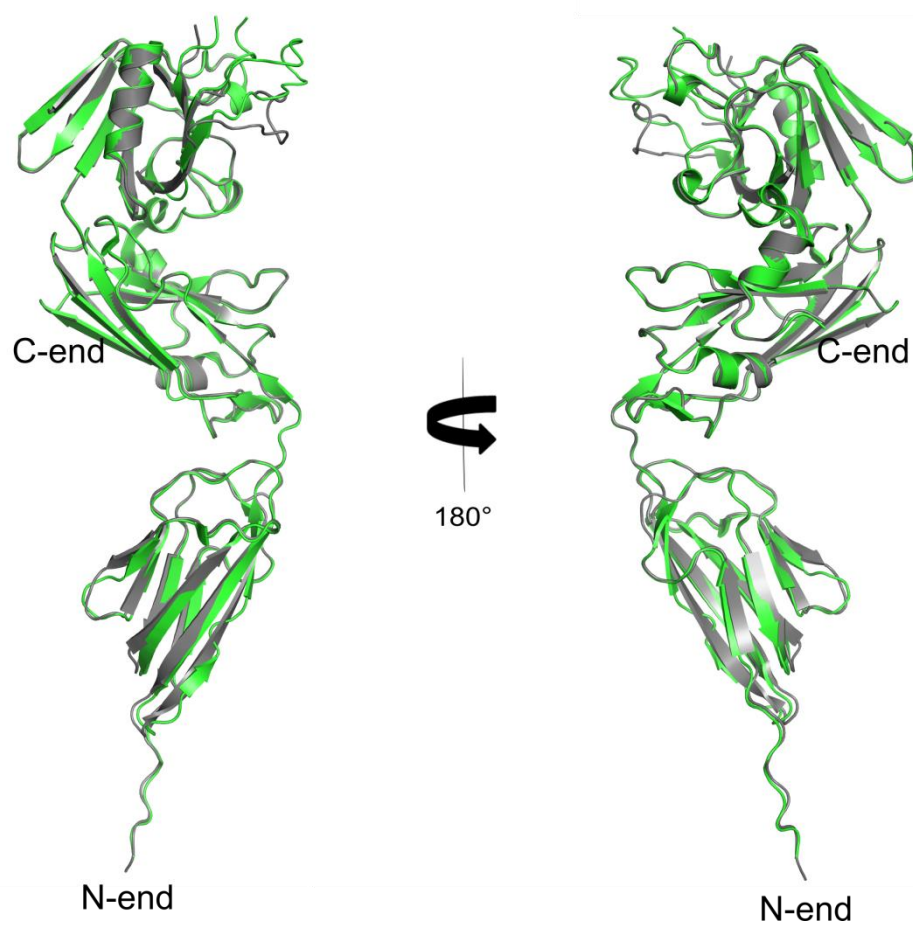


Figure S2 Comparison between two structures of Ldt_{Mt5}. Cartoon representation of the superposition of two X-ray structures of Ldt_{Mt5}. PDB entry 6D5A (gray) (from this work) and PDB entry 4Z7A (green) from Brammer Basta et al., (2015) (1).

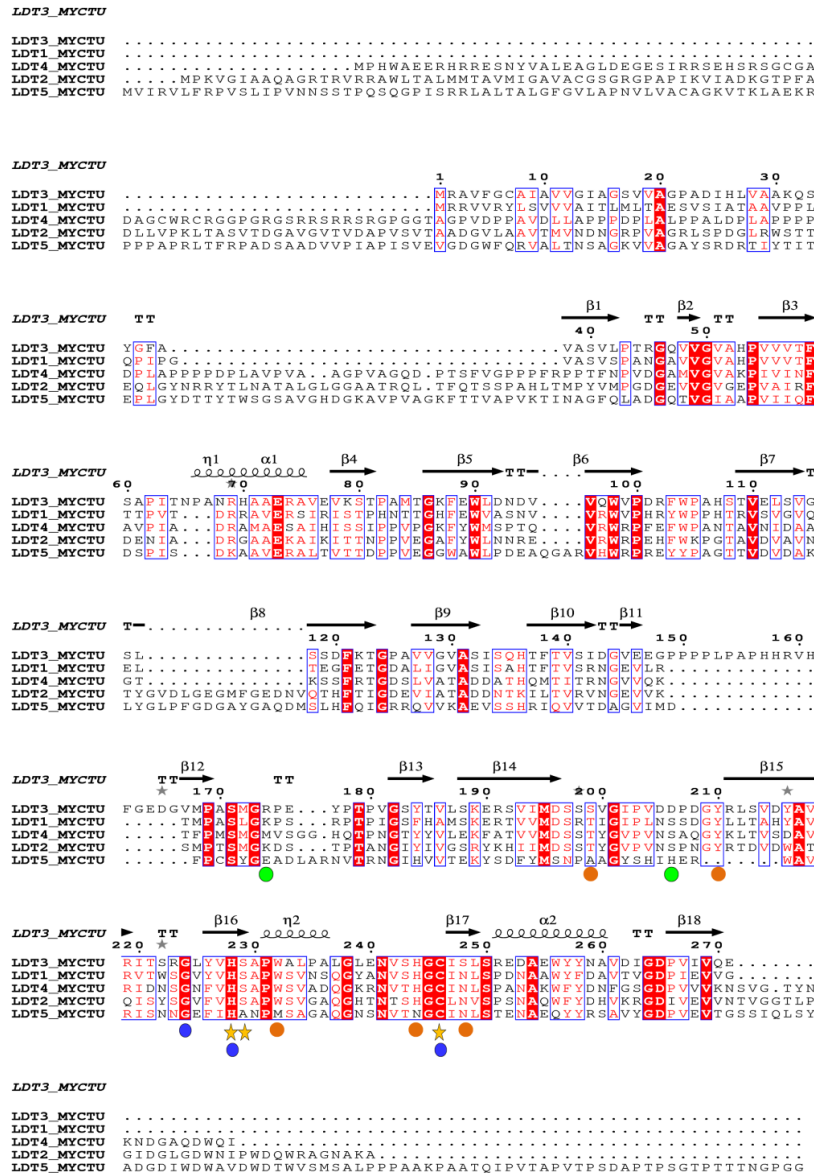


Figure S3 Sequence alignment of five L,D-transpeptidases from *M. tuberculosis*. Identical residues are in white with red background; regions scoring higher than 70% similarity are boxed with red letters. Elements of secondary structure are indicated above the corresponding residues. Catalytic triad of Ldt_{M3} is highlighted with yellow stars. Identical (blue circles), similar (orange circles), and non-conserved residues (green circles) that participate in the interaction with β -lactams. Alignment was performed by using ESPript 3.x (2).

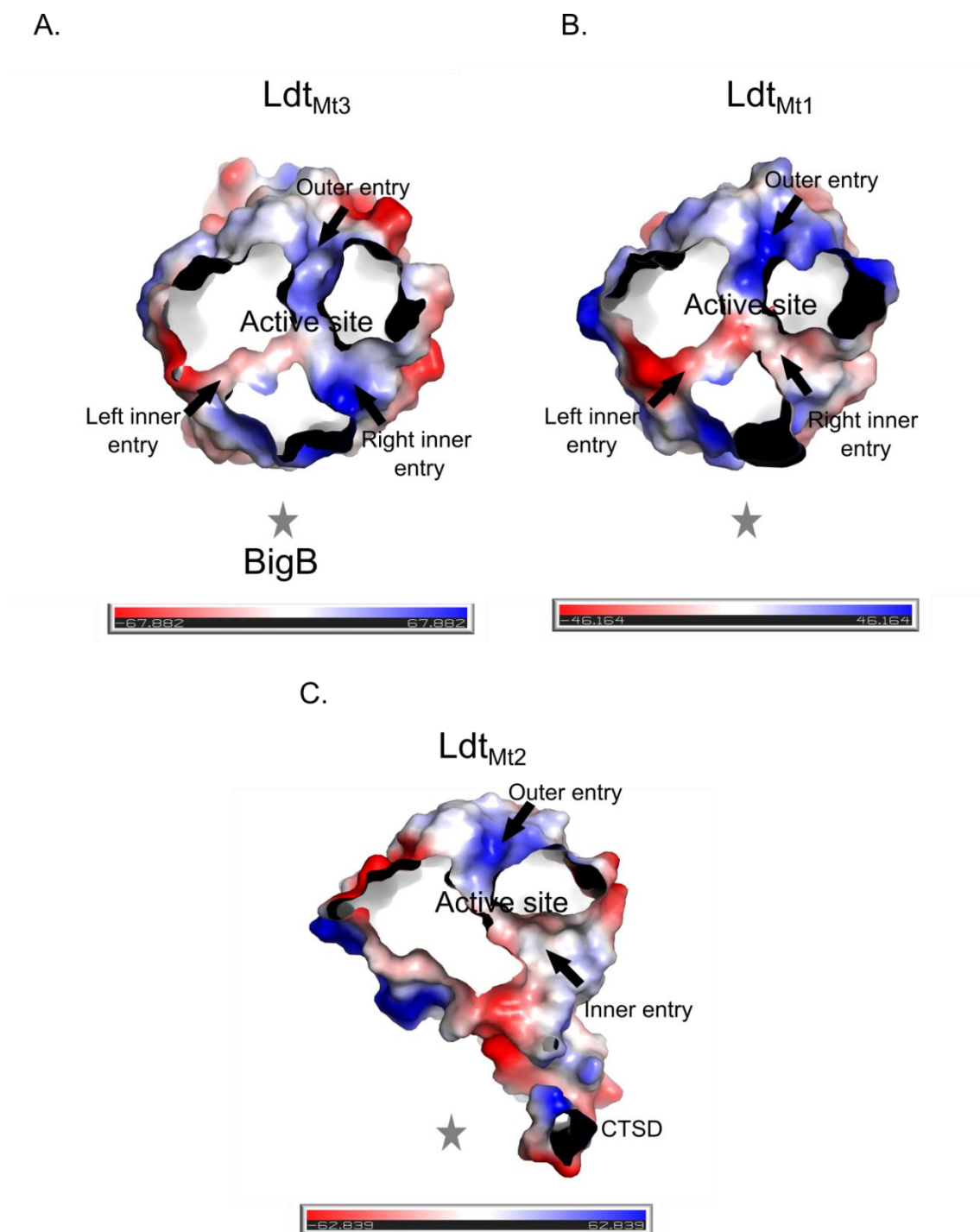
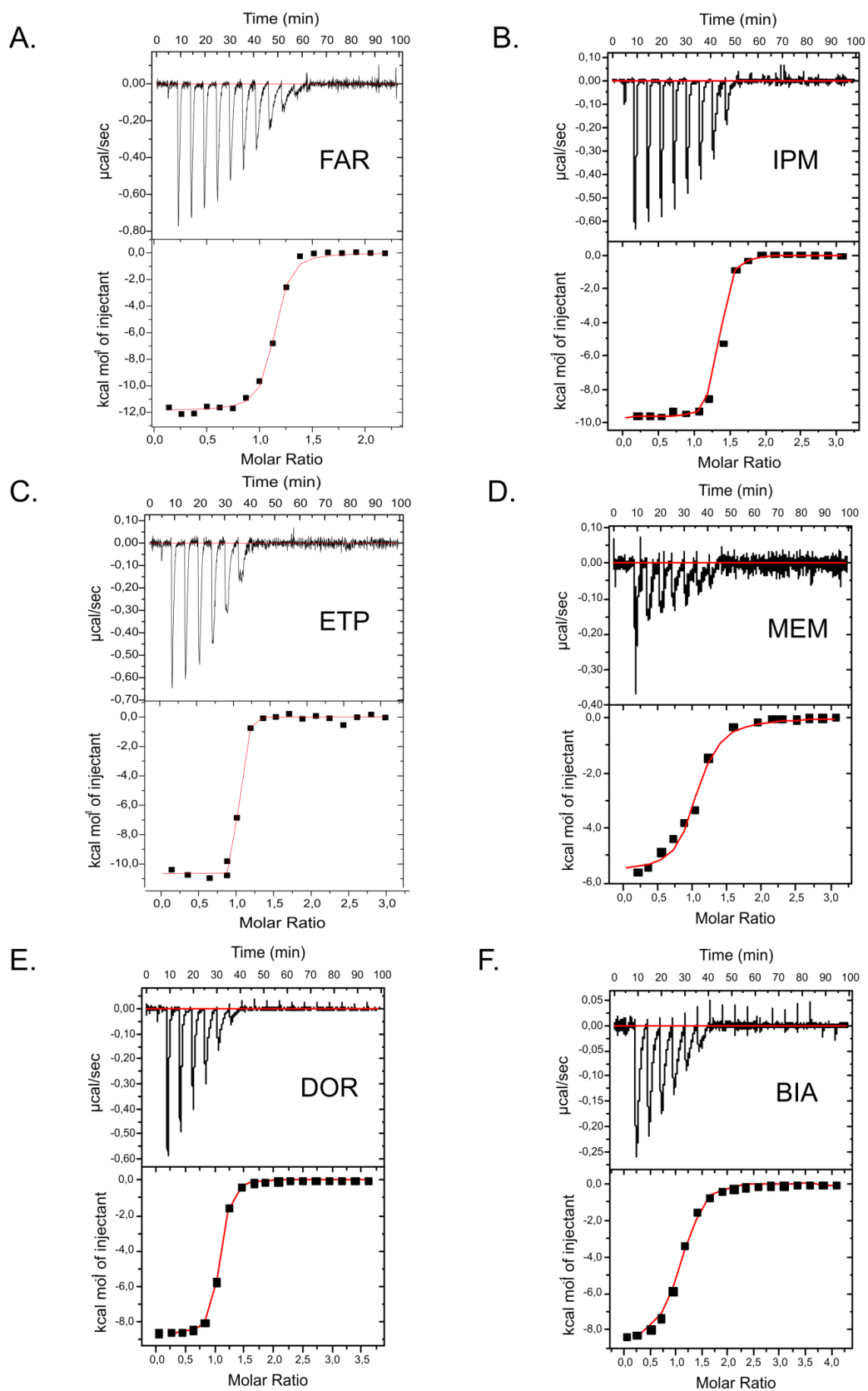


Figure S4 Electrostatic surface potential representation of the catalytic domains of L,D-transpeptidases from *M. tuberculosis*. (A) Ldt_{Mt3} (PDB entry 6D4K), (B) Ldt_{Mt1} (PDB entry 4JMN) (3), and (C) Ldt_{Mt2} (PDB entry 5DU7) (4). CTSD: Carboxi terminal subdomain. Negative (red), positive (blue) and neutral (white) charges. Black arrows indicate the possible access routes to the active site and the gray stars show the BigB location relative to each CD. All the structures are oriented at -90° relative to the structure in the Fig1B.



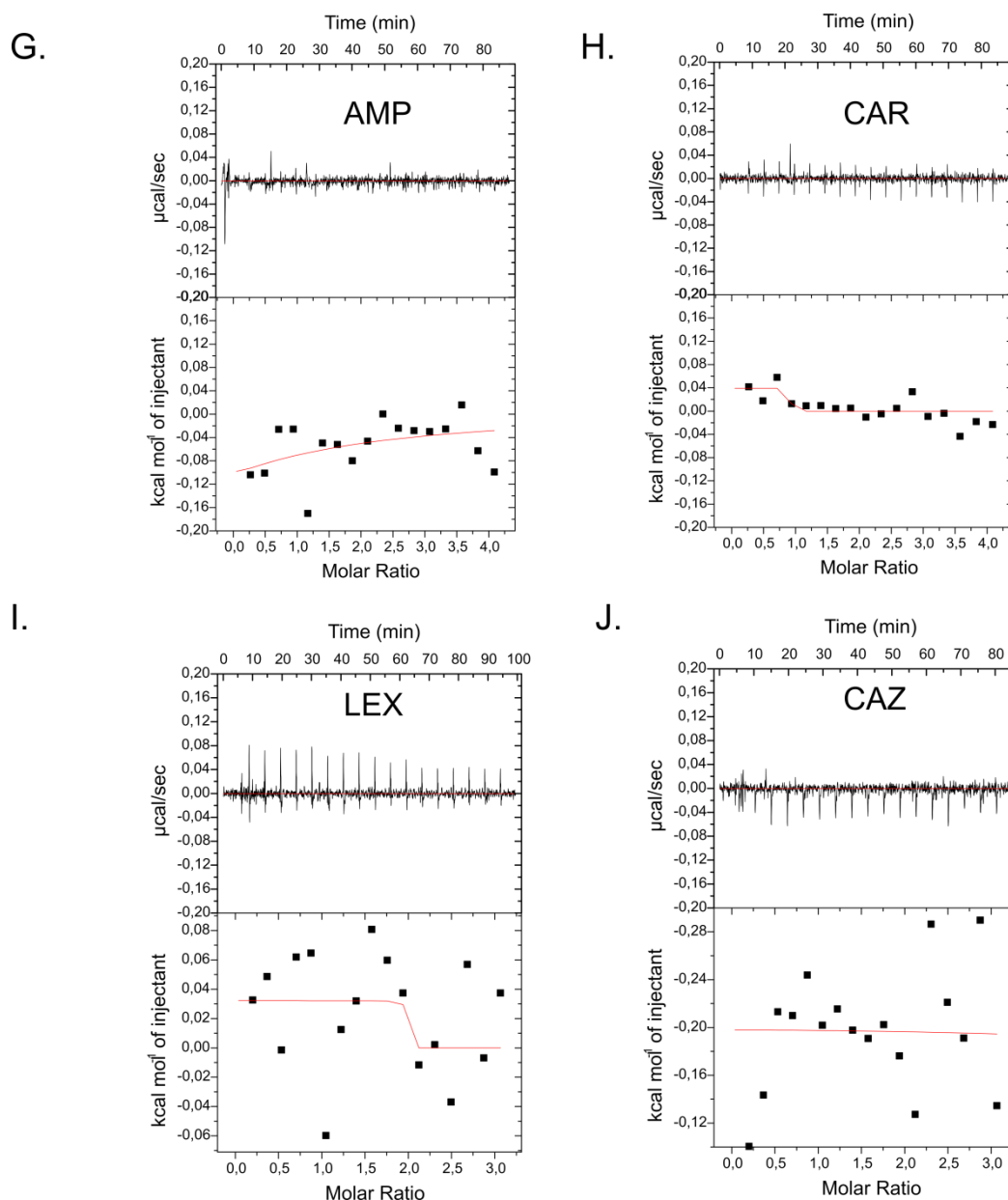
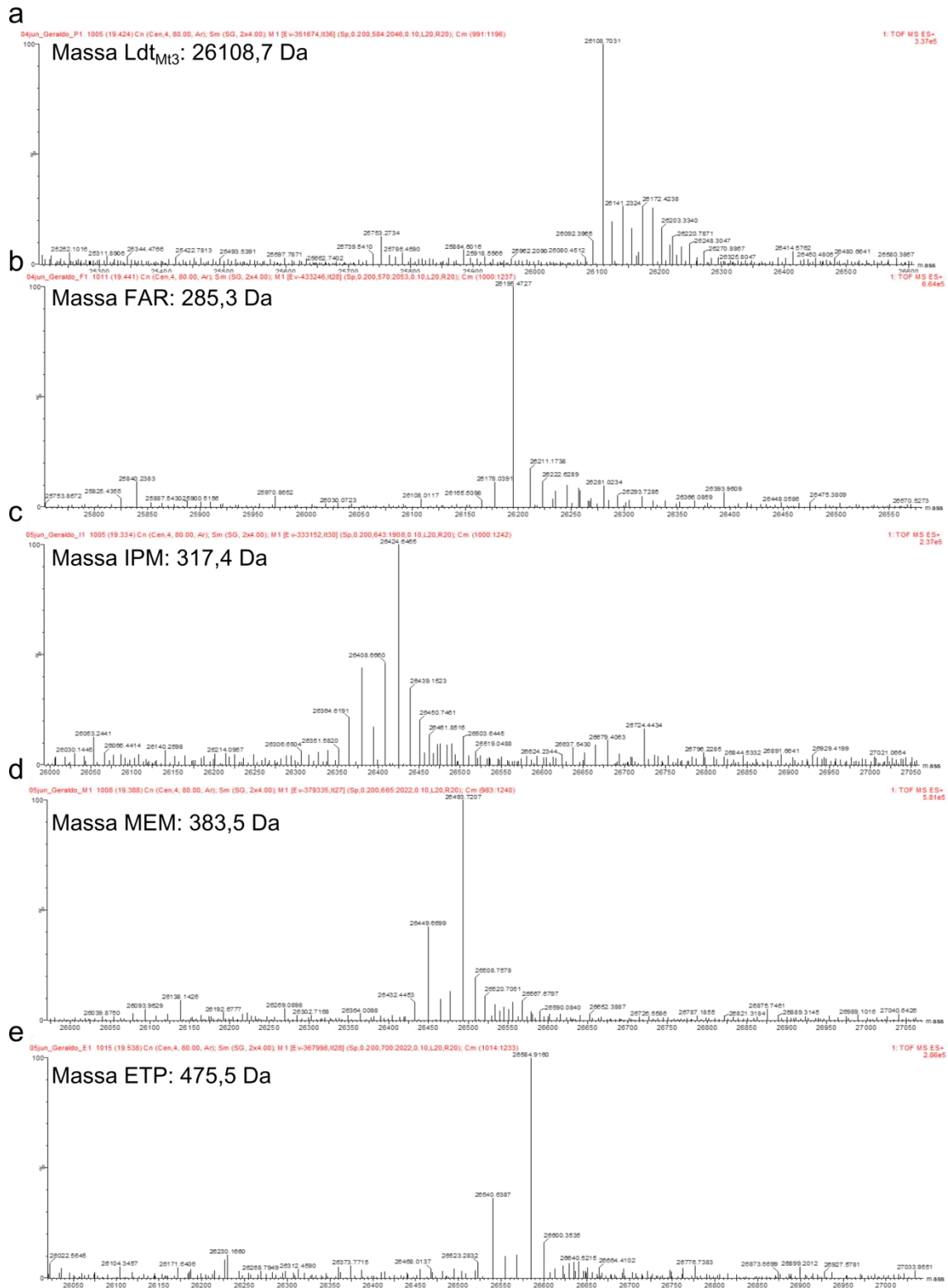


Figure S5 Interaction studies of Ldt_{M3} and ten β -lactam antibiotics using isothermal titration calorimetry. (A) Faropenem, (B) Imipenem, (C) Ertapenem, (D) Meropenem, (E) Biapenem, (F) Doripenem, (G) Ampicillin, (H) Carbenicillin, (I) Cephalexin, and (J) Ceftazidime. The top portion of each panel indicates the raw data for the titration of Ldt_{M3} (100 μ M) with the corresponding antibiotic (1.5 mM) at 24°C. The bottom of the panels show the integrated heats of interaction obtained from the raw data after subtracting the heat of dilution. The red line represents the fitting curve for the experimental data using the 'one-set-of-sites' model implemented in Origin 7.0 (MicroCal iTC200 software).



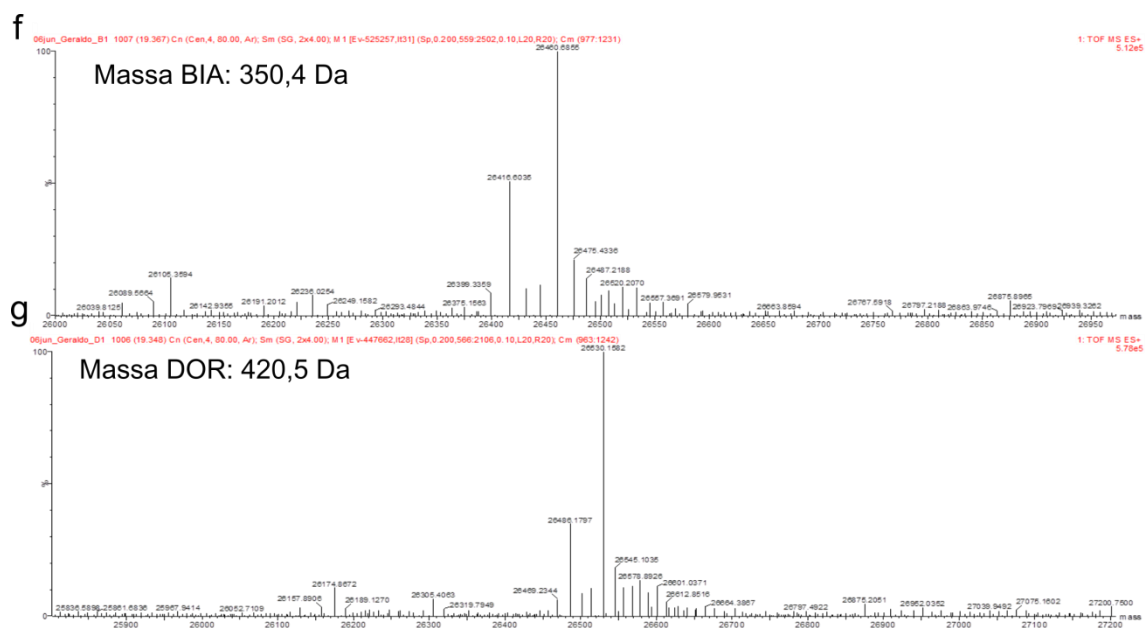


Figure S6 Mass spectrometry analyses of Ldt_{Mt3} incubated with 2.5 mM of β -lactam antibiotics at 4°C during 72h. (A) Incubation in the absence of β -lactams. The peak of 26,108.7 Da corresponds to the Ldt_{Mt3} in its apo form. (B) Ldt_{Mt3} in the presence of faropenem. The peak with higher intensity corresponds to Ldt_{Mt3} acylated by a fragment derived from faropenem (26,195.4 Da). (C-G) Panels of Ldt_{Mt3} incubated with five carbapenems. The peaks with higher intensities correspond to Ldt_{Mt3} plus the full mass of (C) imipenem (26,424.6 Da), (D) meropenem (26,493.7 Da), (E) Ertapenem (26,584.9 Da), (F) Biapenem (26,460.7 Da), and (G) Doripenem (26,530.2 Da).

Crystal	<i>apo</i> -Ldt _{Mt3}	acylated Ldt _{Mt3}	<i>apo</i> -Ldt _{Mt5}
PDB ID	6D4K	6D51	6D5A
Data collection statistics			
X-ray source	P13 PETRA III Hamburg- Germany (5)	MX2 LNLS Campinas- Brazil (6)	MX2 LNLS Campinas- Brazil
X-ray Detector	Pilatus 6M	Pilatus 2M	Pilatus 2M
Wavelength (Å)	1.000	1.458	1.458
Space group	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P6 ₂ 2 2
a, b, c (Å)	44.1, 46.4, 112.6	44.1, 46.2, 110.7	97.45, 97.45, 193.97
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 120
Resolution range (last shell) (Å)	41.08- 1.32 (1.36-1.32)	40.9 – 1.83 (1.89-1.83)	43.54 - 2.62 (2.72 - 2.62)
Molecules in asymmetric unit cell	1	1	1
Completeness (%)	98.1 (96.7)	99.9 (99.4)	94.2 (93.8)
Redundancy	12.3 (13.5)	12.3 (12.4)	5.4 (5.3)
Wilson B-factor (Å ²)	18.07	26.72	60.69
I/ σ (I)	21.8 (2.2)	20.4 (2.2)	9.7 (1.4)
R-merge	0.052 (1.209)	0.076 (1.143)	0.106 (0.806)
R-meas	0.056 (1.304)	0.079 (1.193)	0.126 (0.983)
CC1/2	0.999 (0.828)	0.999 (0.793)	0.995 (0.741)
Refinement statistics			
No. of reflections	53579 (5270)	20565 (1995)	15879 (1531)
R _{work} /R _{free}	0.19/0.23 (0.26/0.30)	0.19/0.24 (0.35/0.35)	0.21/0.26 (0.36/0.38)
No. of non-hydrogen atoms	2010	1986	2631
Protein	1787	1781	2559
Ligand	1	3	-
Amino acid residues	235	235	340
Validation statistics			
B-factors (Å ²)	34.82	37.81	68.51
Protein	34.06	37.81	68.83
Ligand	19.94	42.99	-
Solvent	41.02	37.71	56.94
Rmsd bond lengths (Å)	0.009	0.007	0.009
Rmsd bond angles (°)	0.88	0.82	1.00
Ramachandran favored region (%)	98.0	96.0	94.3
Ramachandran allowed regions (%)	2.0	4.0	5.1
Ramachandran outliers (%)	0.0	0.0	0.60
Rotamer outliers (%)	0.0	0.0	0.38
Clashscore	2.00	3.73	6.24

Table S1 Data collection and refinement statistics. Statistics for the highest-resolution shell are shown in parentheses.

Antibiotic	T_{mRef}	$T_{m\beta lactam}$	ΔT_m ($T_{m\beta lactam} - T_{mRef}$)
Faropenem	40.93 (± 0.45)	43.17 (± 0.29)	2.24 (± 0.53)
Ampicillin	40.93 (± 0.45)	41.25 (± 0.35)	0.32 (± 0.57)
Cephalexin	40.93 (± 0.45)	40.50 (± 0.50)	-0.43 (± 0.67)
Ceftazidime	40.93 (± 0.45)	40.33 (± 0.29)	-0.60 (± 0.53)
Carbenicillin	40.93 (± 0.45)	38.00 (± 0.50)	-2.93 (± 0.67)
Imipenem	40.93 (± 0.45)	36.83 (± 0.29)	-4.10 (± 0.53)
Ertapenem	40.93 (± 0.45)	36.00 (± 0.50)	-4.93 (± 0.67)
Meropenem	40.93 (± 0.45)	36.00 (± 0.50)	-4.93 (± 0.67)
Doripenem	40.93 (± 0.45)	35.17 (± 0.29)	-5.76 (± 0.53)
Biapenem	40.93 (± 0.45)	34.83 (± 0.29)	-6.10 (± 0.53)
Kanamycin	40.93 (± 0.45)	40.83 (± 0.76)	-0.10 (± 0.88)

Table S2 Melting temperatures of Ldt_{Mt3} in the presence of different β -lactams

Enzyme	Antibiotic	LELP*	$\Delta g^{\text{£}}$	Kd (μM)	Reference
Ldt _{Mt3}	Faropenem	-1.7**	0.44	0.59 (± 0.10)	This study
	Imipenem	-7.6	0.50	0.016 (± 0.001)	This study
	Ertapenem	-10.0	0.32	0.022 (± 0.005)	This study
	Meropenem	-15	0.29	2.94 (± 1.47)	This study
	Biapenem	-16.8	0.36	0.45 (± 0.08)	This study
	Doripenem	-19.8	0.28	2.32 (± 0.70)	This study
Ldt _{Mt2}	Faropenem	-1.5	0.50	0.24	(4)
	Imipenem	8.0	0.47	0.055 (± 0.009)	(7)
	Meropenem	-15	0.29	0.91 (± 0.15)	(7)
	Biapenem	-15.9	0.38	0.25 (± 0.047)	(8)
Ldt _{Mt1}	Faropenem	-1.9	0.39	3.98	(4)
	Imipenem	8.2 ^{&}	0.46	0.062 (± 0.01)	(3)

Table S3 Ligand Efficiency Lipophilic Price (LELP) for β -lactams that interact with L,D-transpeptidases from *M. tuberculosis*.

*Antibiotics were ranked according to the best LELP score. Acceptable leads are defined as $-10 \leq \text{LELP} \leq 10$

** LELP calculated from $\text{LELP} = \text{LogP} / \Delta g$ (9)

[£] Δg calculated from $\Delta g = \Delta G / \text{No. non-hydrogen atoms}$ (10)

[&] For this case, ΔG was not reported by authors, therefore, ΔG was calculated from the K_D , applying the equation $\Delta G = -RT \ln K_D$

Antibiotic	Residue	Atom	Distance (Å) *
Imipenem	Asp208	O ^{δ1}	3.2
	Gly224	O	2.8
	His244	N	3.2
	His244	N ^{ε2}	2.8
	His244	N ^{ε2}	3.5
	Cys246	N	2.8
Meropenem	Ser199	O ^γ	2.7
	His228	N ^{ε2}	2.7
	His244	N	2.8
	Cys246	N	2.8
	Cys246	N	3.4
Ertapenem	Tyr210	OH	3.0
	His228	N ^{ε2}	2.9
	His244	N	2.7
	Cys246	N	2.8
	Ser248	O ^γ	2.7
Biapenem	Ser199	O ^γ	2.7
	His228	N ^{ε2}	3.0
	Trp232	N ^{ε1}	3.3
	His244	N	3.1
	Cys246	N	2.8
Doripenem	Gly224	O	2.8
	His228	N ^{ε2}	2.7
	Trp232	N ^{ε1}	2.9
	Val242	O	2.7
	His244	N ^{ε2}	2.9
	His244	N	3.5
	Cys246	N	2.7
Faropenem	Ser199	O ^γ	2.8
	His228	N ^{ε2}	2.7
	His244	N	3.4
	Cys246	N	2.8
	Ser248	O ^γ	3.3

Table S4 List of hydrogen bonds between Ldt_{Mt3} and β- lactam antibiotics according to docking simulations. *All distances were measure between the donor and acceptor atoms.

Supporting References

1. Brammer Basta, L. A., Ghosh, A., Pan, Y., Jakoncic, J., Lloyd, E. P., Townsend, C. A., Lamichhane, G., and Bianchet, M. A. (2015) Loss of a Functionally and Structurally Distinct Ldt-Transpeptidase, LdtMt5, Compromises Cell Wall Integrity in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **290**, 25670-25685
2. Robert, X., and Gouet, P. (2014) Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res* **42**, W320-324
3. Correale, S., Ruggiero, A., Capparelli, R., Pedone, E., and Berisio, R. (2013) Structures of free and inhibited forms of the L,D-transpeptidase LdtMt1 from *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **69**, 1697-1706
4. Kumar, P., Kaushik, A., Lloyd, E. P., Li, S. G., Mattoo, R., Ammerman, N. C., Bell, D. T., Perryman, A. L., Zandi, T. A., Ekins, S., Ginell, S. L., Townsend, C. A., Freundlich, J. S., and Lamichhane, G. (2017) Non-classical transpeptidases yield insight into new antibacterials. *Nature Chemical Biology* **13**, 54-61
5. Ciani, M., Bourenkov, G., Pompidor, G., Karpics, I., Kallio, J., Bento, I., Roessle, M., Cipriani, F., Fiedler, S., and Schneider, T. R. (2017) P13, the EMBL macromolecular crystallography beamline at the low-emittance PETRA III ring for high- and low-energy phasing with variable beam focusing. *J Synchrotron Radiat* **24**, 323-332
6. Guimarães, B. G., Sanfelici, L., Neuenschwander, R. T., Rodrigues, F., Grizolli, W. C., Raulik, M. A., Piton, J. R., Meyer, B. C., Nascimento, A. S., and Polikarpov, I. (2009) The MX2 macromolecular crystallography beamline: a wiggler X-ray source at the LNLS. *J Synchrotron Radiat*. **16**, 69-75
7. Erdemli, S. B., Gupta, R., Bishai, W. R., Lamichhane, G., Amzel, L. M., and Bianchet, M. A. (2012) Targeting the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*: structure and mechanism of L,D-transpeptidase 2. *Structure* **20**, 2103-2115
8. Bianchet, M. A., Pan, Y. H., Basta, L. A. B., Saavedra, H., Lloyd, E. P., Kumar, P., Mattoo, R., Townsend, C. A., and Lamichhane, G. (2017) Structural insight into the inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* non-classical transpeptidase LdtMt2 by biapenem and tebipenem. *BMC Biochem* **18**, 8
9. Keserü, G. M., and Makara, G. M. (2009) The influence of lead discovery strategies on the properties of drug candidates. *Nat Rev Drug Discov* **8**, 203-212
10. Congreve, M., Carr, R., Murray, C., and Jhoti, H. (2003) A 'Rule of Three' for fragment-based lead discovery? *Drug Discov. Today* **8**, 876-877