

**THAIS AZEVEDO BENITES**

**PEPTÍDEOS SINTÉTICOS NO ESTUDO DO SISTEMA TOXINA-ANTITOXINA  
ParE/ParD.**

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

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto

ARARAQUARA  
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

B467p Benites, Thais Azevedo  
Peptídeos sintéticos no estudo do sistema toxina-  
antitoxina ParE/ParD / Thais Azevedo Benites. –  
Araraquara : [s.n.], 2017  
93 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Química  
Orientador: Reinaldo Marchetto

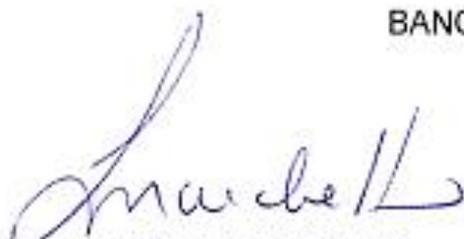
1. Peptídeos-Síntese. 2. Antídotos. 3. Toxinas  
bacterianas. 4. Proteínas recombinantes. 5. Peptídeos.  
I. Título.

THAIS AZEVEDO BENITES

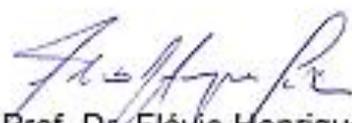
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Araraquara, 27 de junho de 2017.

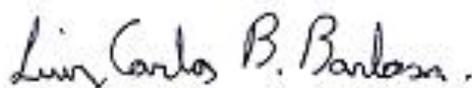
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Reinaldo Marchetto  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva  
Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, São Carlos – SP



Prof. Dr. Luiz Carlos Bertucci Barbosa  
Universidade Federal de Itajubá – UNIFEI, Itajubá – MG

## **DADOS CURRICULARES**

**Nome:** Thais Azevedo Benites

**Nome em citação Bibliográfica:** Azevedo, T. B.

**Filiação:** Francisco José Benites Enciso e Edna Maria Lima de Azevedo

**Data de nascimento:** 31/01/1992

**Estado civil:** Solteira

**Telefone:** (16) 98145-1332

**E-mail:** [thaisbenites41@gmail.com](mailto:thaisbenites41@gmail.com)

**Resumo das Qualificações:** Mestranda em Biotecnologia pela Universidade Estadual Paulista – Júlio de Mesquita Filho- UNESP, na área de síntese de peptídeos com ênfase em peptídeos antimicrobianos. Bacharel em Biomedicina pela Escola Superior da Amazônia- (2012).

## **FORMAÇÃO ACADÊMICA**

Mestrado em Biotecnologia.

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

Título: Síntese de Peptídeos no Estudo do Sistema TA ParE/ParD.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto.

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

### **2009-2012**

Graduação em Biomedicina Escola Superior da Amazônia- ESAMAZ, PA.

## **ATUAÇÃO PROFISSIONAL**

### **2013-2015**

Analista clínica em Laboratório de Análises Clínicas Paulo Azevedo, março de 2013 à março de 2015.

### **2012**

Estágio Voluntário em Hospital das Clínicas (Ananindeua)- fevereiro de 2012 à julho de 2012.

Estágio voluntário em Laboratório de Análises Clínicas Paulo Azevedo, agosto de 2012 à dezembro de 2012.

## **2011**

Estágio voluntário no Instituto Médico Legal- IML Renato Chaves (Castanhal-PA), março de 2011 à maio de 2011.

## **Produção Científica**

### **Trabalhos apresentados em Eventos**

New Inhibitors of Bacterial Type II Topoisomerases Derived From WRWYCRCK OCTAPEPTIDE (Rocha, C. A., SANCHES, P.R.S., CRUSCA, E., AZEVEDO, T.B., MARCHETTO, R.); SBBQ, junho 2016.

### **Participação em eventos científicos**

Workshop de caracterização de macromoléculas com foco em estabilidade estrutural e afinidade de interações, com uso de nanoDSF e termoforese em microescala- LNBio-Campinas (SP) 21 de setembro 2016.

## **1. Outros**

Allcrom- Seminário Técnico de cromatografia: HPLC-GC-PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS - Araraquara 25 de novembro de 2015.

SCIENTIFIC INSTRUMENTS CO. Treinamento em Operação e Manutenção Básica do sistema HPLC composto por: Bomba LC-20AT, Detector SPD-20<sup>a</sup>, Controlador CBM-20<sup>a</sup> Lite, Válvula LPGE Kit, Desgaseificador DGU-20A5R, Injetor 7725i e Software LC Solutions LCMS- Shimadzu- Araraquara 05 de maio de 2016.

Semana de Pesquisa e Extensão da Esamaz (SEPEX)- Colesterol e Triglicerídeos. 2012.

Atendimento a Comunidade no Município de Santa Izabel do Pará, 2011.  
(Campanha de Vacinação do Idoso, Gripe H1N1, Infantil 1° e 2° Etapa e contra Raiva de Cães e Gatos)

Curso Pré-Congresso O HEMOGRAMA, 2011

Apresentação de Poster / Painel no(a) III Congresso Pan-Amazônico de Hematologia e Hemoterapia, 2011.  
EXAME DE HEMOGRAMA COMO AUXILIAR NO DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS NA FASE AGUDA

Apresentação de Poster / Painel no(a) III Congresso Pan-Amazônico de Hematologia e Hemoterapia, 2011. (Congresso) EXAME DE HEMOGRAMA COMO AUXILIAR NO DIAGNÓSTICO DA ANEMIA FALCIFORME OU DREPANOCITOSE.

III Semana Acadêmica do Curso de Biomedicina da ESAMAZ, 2011. Abordagem sobre Banco de Sangue em Casos de Meningite

Jornada de Urgência e Emergência, 2011.

V Semana de Enfermagem e do III Encontro Acadêmico da ESAMAZ, 2011.

Atendimento a Comunidade no Município de Santa Izabel do Pará, 2010.  
Campanha de Vacinação do Idoso, Gripe H1N1, Infantil 1º e 2º Etapa e contra Raiva de Cães e Gatos.

Curso de Biossegurança e suas Aplicações na NR-32, 2010.

O SISTEMA IMUNOLÓGICO NAS DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS,  
2010 XV Congresso Médico Amazônico, 2010  
1º Semana Acadêmica de Biomedicina da Escola Superior da Amazônia, 2009

É com muito amor que dedico este trabalho,

A Deus.

Aos meus pais, Edna Azevedo e Francisco Benites.

Ao meu amado irmão Tiago Azevedo Benites.

Aos meus familiares e amigos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pois em todos os momentos que achei que iria fraquejar, busquei Nele forças para continuar traçando essa jornada.

Agradeço imensamente a minha mãe Edna Maria Lima de Azevedo, que mesmo com o coração partido em ver seus filhos criando asas, apoiou inteiramente em minha decisão, mesmo com lágrimas nos olhos, havia um sorriso no rosto de ter cumprido com excelência seu papel.

Ao meu querido pai Francisco José Benites Enciso, que em todos os momentos me deu forças e palavras de apoio, que teve fé que tudo daria certo e que me ensinou sempre a ser uma pessoa melhor.

Ao meu irmão Tiago Azevedo Benites, não tenho palavras para descrever o quanto sou grata, se não fosse por ele, não teria almejado e alcançado este título.

Aos meus familiares que me incentivaram e apoiaram imensamente.

Ao meu querido orientador Reinaldo Marchetto, pela paciência, credibilidade, ensinamentos, alegria, amizade, e pela oportunidade que me concedestes.

Aos meus companheiros de laboratório Alini, Crusca, Carol, Jessileine pela convivência diária e por todos os ensinamentos compartilhados.

Aos meus amigos queridos Milena, Rodolfo, Lierge, Camila, Bia e Célio que proporcionaram inúmeros momentos felizes ao qual levarei para a vida inteira.

A um amigo importante Lacy de Brito Júnior, que esteve presente em todos os momentos, pelo carinho e paciência que sempre tivestes, por me fazer ser uma pessoa melhor.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, em especial Wennia, Célia e Paula pela atenção.

Aos funcionários da biblioteca, em especial à Izabel pela paciência e ajuda na elaboração das referências.

Aos funcionários do Instituto em especial Rogério e Albertinho que proporcionaram dias mais felizes.

À Capes pelo apoio financeiro concedido.

Meu bom Jesus crucificado, filho da virgem Maria,  
Me guardai por toda noite e amanhã por todo dia,  
Que meu corpo não seja preso nem minha alma perdida,  
Nem meu sangue derramado nas mãos dos meus inimigos.  
Meu bom Jesus que vós sois, meu bom Jesus que vos chamo,  
Meu bom Jesus me proteja de todos os meus a vexames.  
(Maria Azevedo)

## RESUMO

O sistema ParE-ParD é um sistema Toxina-Antitoxina (TA) do tipo II (composto por duas proteínas) encontrado no plasmídeo RK2 de uma gama de bactérias. A antitoxina ParD (9kDa) é capaz de neutralizar a citotoxicidade da toxina ParE, pela formação de um complexo estável, e também é eficaz na auto-repressão do operon *parDE*. A toxina (12kDa) apresenta atividade citotóxica no processo de replicação do DNA por interferir diretamente na ação da DNA girase. Estudos prévios sugeriram que a região C-terminal da antitoxina é responsável pelo processo de interação com ParE. Embora esta toxina possa ser encontrada em um grande número de microrganismos, ainda apresenta mecanismos de citotoxicidade e funções celulares a serem elucidadas. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo a tentativa de expressão das duas proteínas ParE e ParD, bem como o design e a síntese de peptídeos análogos da antitoxina, para a realização de estudos de interação molecular, a fim de encontrar uma estrutura mínima de ParD capaz de inativar a função tóxica de ParE. Com base nas informações estruturais, obtidas por modelagem e dinâmica molecular, quatro sequências peptídicas análogas de ParD foram projetadas e sintetizadas pela metodologia da fase sólida. As sequências foram analisadas e purificadas por cromatografia líquida de alta eficiência e caracterizadas por espectrometria de massas. Os estudos de interação foram realizados através de ensaios de cromatografia de afinidade e supressão de fluorescência. A fluorescência intrínseca de ParEAC2 foi suprimida pelos análogos de ParD (ParDTB1, ParDTB3, ParDTB5 e ParDTB6), evidenciando a formação de complexos estáveis entre as espécies, resultados confirmados pelos ensaios de cromatografia de afinidade. Resultados semelhantes foram obtidos empregando a proteína ParD obtida por expressão heteróloga. Com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que o análogo ParDTB1 representa uma estrutura peptídica mínima com potencial para neutralizar o efeito da toxina ParE.

**Palavras-chave:** Peptídeos. DNA girase. Sistema TA. Toxina ParE.

## ABSTRACT

The ParE-ParD system is a toxin-antitoxin (TA) type II module (composed of two proteins) of the plasmid RK2 of a range of bacteria. The ParD antitoxin (9 kDa) is able to neutralize the cytotoxicity of the ParE toxin by forming a stable complex and is effective in the auto repression of the *parDE* operon. The toxin (12 kDa) exhibits cytotoxic activity by blocking DNA replication, acting directly in the DNA gyrase action. Previous studies have been suggest that the C-terminal region of the antitoxin is responsible for the interaction process with ParE. Although this toxin can be find in a large number of microorganisms, still have cytotoxicity mechanisms and cellular functions to be elucidate. In this context, this work aimed at the expression of ParE and ParD proteins, as well as the design and synthesis of antitoxin analog peptides, to perform molecular interaction studies in order to find a minimum ParD structure able to inactivate the toxic function of ParE. Based on the structural information obtained by modeling and molecular dynamics, four analogous peptide sequences of ParD were designed and synthesized by the solid phase methodology. The peptide sequences were analyzed and purified by high performance liquid chromatography and characterized by mass spectrometry. Interaction studies were performed by affinity chromatography and fluorescence suppression assays. The intrinsic fluorescence of ParEAC2 was suppressed by ParD analogs (ParDTB1, ParDTB3, ParDTB5 and ParDTB6) addition, evidencing the formation of stable complexes between the species, results confirmed by the affinity chromatography assays. Similar results were obtained using ParD protein obtained by heterologous expression. Based on the results obtained, it was possible to conclude that the ParDTB1 analog represents a minimal peptide structure with potential to neutralize the effect of the ParE toxin.

Keywords: Peptides. DNA gyrase. TA system. ParE toxin.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Número de ligações LK.....	20
<b>Figura 2-</b> Representação esquemática da DNA Girase.....	21
<b>Figura 3-</b> Modelo esquemático de mecanismo de ação da DNA Girase .....	22
<b>Figura 4-</b> Representação do sistema de morte celular programada.....	24
<b>Figura 5-</b> Sistemas Toxina Antitoxina .....	25
<b>Figura 6-</b> Estrutura primária de ParE e de ParD de <i>Escherichia coli</i> .....	26
<b>Figura 7-</b> Representação esquemática de um processo típico de modelagem via alinhamento ( <i>Threading</i> ). .....	30
<b>Figura 8-</b> Representação esquemática de ligação peptídica .....	31
<b>Figura 9-</b> Visualização esquemática progressiva de uma resina.....	33
<b>Figura 10-</b> Protetores temporários usuais utilizados na SPFS .....	34
<b>Figura 11-</b> Ligação peptídica empregando carbodiimidas .....	35
<b>Figura 12-</b> Esquema da reação de ninidrina (teste de Kaiser) .....	36
<b>Figura 13-</b> Representação esquemática da SPFS pela estratégia Fmoc/tBu.....	37
<b>Figura 14-</b> Estrutura primária da região C-terminal da proteína ParD e análogos....	44
<b>Figura 15-</b> Estrutura primária dos derivados sintéticos ParEAC2 e ParEAC2C .....	46
<b>Figura 16-</b> Representação de Dicroísmo Circular.....	47
<b>Figura 17-</b> Mapa do vetor pET28A e pETDuet-1 .....	51
<b>Figura 18-</b> Mapa dos vetores pPICZA e pGAPZA .....	55
<b>Figura 19-</b> Sequencias de aminoácidos de análogos a ParD.....	63
<b>Figura 20-</b> Perfis de diferença de variação da energia livre Gibbs ( $\Delta\Delta G$ ). .....	64
<b>Figura 21-</b> Perfis cromatográfico do peptídeo ParDTB1.....	66
<b>Figura 22-</b> Perfis cromatográficos do peptídeo ParDTB6 .....	67
<b>Figura 23-</b> Perfis cromatográficos do peptídeo ParDTB3.....	67
<b>Figura 24-</b> Perfis cromatográficos do peptídeo ParDTB5 .....	68
<b>Figura 25-</b> Perfis cromatográficos do peptídeo ParEAC2.....	70
<b>Figura 26-</b> Perfis cromatográficos do peptídeo ParEAC2C .....	70
<b>Figura 27-</b> Espectro de Dicroísmo Circular.....	72
<b>Figura 28-</b> Espectros de CD de análogos de ParD.....	73
<b>Figura 29-</b> Produtos da PCR .....	75
<b>Figura 30-</b> Análise da expressão de ParD.....	76

<b>Figura 31-</b> Análise de purificação de ParD recombinante..	76
<b>Figura 32-</b> Imobilização de ParEAC2C em resina Sepharose.	79
<b>Figura 33-</b> Ensaio de Cromatografia de afinidade com ParEAC2 imobilizado.	80
<b>Figura 34-</b> Representação gráfica de Stern-Volmer:.	81
<b>Figura 35-</b> Efeito da temperatura na interação do ParD com ParEAC2.).	83

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Protocolo sintético padrão utilizando DIC/HOBt (estratégia Fmoc-tBu) ....	45
<b>Tabela 2-</b> Oligonucleotídeos sintetizados para expressão de ParD.....	49
<b>Tabela 3-</b> Oligonucleotídeos sintetizados para expressão de ParE.....	49
<b>Tabela 4-</b> Resultado das análises de espectrometria de massas. ....	71
<b>Tabela 5-</b> Valores de constante de associação comparativo <sup>a</sup> .....	84

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

### **Aminoácidos**

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

### **Outras**

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

DIEA – N-Diisopropiletilamina  
DMF – N, N-Dimetilformamida  
dNTP - Desoxinucleotídeo trifosfato  
DTT – 1,4 Ditioneitol  
D.O - Densidade óptica  
EDT – 1, 2-Etanoditol  
EDTA – Ácido Etilenodiaminotetraacético  
Fmoc – 9-Fluorenilmetiloxycarbonila  
FW - *Foward*  
HOBt – N-Hidroxibenzotriazol  
HEPES – Ácido 4-(2-Hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfônico)  
IPTG - Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo  
LB - Lurian Bertani  
LC-MS – Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas  
NMP – N-metilpirrolidona  
PA – Persulfato de Amônio  
PCR- Reação em Cadeia da Polimerase  
PDB – Protein Data Bank  
PM - Peso Molecular  
RCF- Força Centrifuga Relativa  
RHH - Ribbon-Helix-Helix  
RPM - Rotação por Minuto  
RV- *Reverse*  
SASA- Área de Superfície Acessível ao Solvente  
SDS-Page - *Sodium Dodecyl Sulfate- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*  
SPFS – Síntese de Peptídeos em Fase Sólida  
TA – Sistema Toxina-Antitoxina  
TEMED - Tetrametiletilenodiamina  
TFA – Ácido Trifluoroacético  
TFE – Trifluoroetanol  
TIS – Triisopropilsilano  
UV- Ultra-Violeta  
YPD – *Yeast extract- Peptone- Dextrose*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>1.1</b>	<b>Topoisomerases</b> .....	19
<b>1.2</b>	<b>DNA Girase</b> .....	20
<b>1.3</b>	<b>Sistemas Toxina-Antitoxina</b> .....	23
<b>1.4</b>	<b>Predição de Estrutura Molecular</b> .....	28
<b>1.5</b>	<b>Química dos Peptídeos</b> .....	31
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	38
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	39
<b>3.1</b>	<b>Reagentes e Solventes</b> .....	39
<b>3.2</b>	<b>Materiais utilizados para produção de proteínas recombinantes</b> .	40
<b>3.3</b>	<b>Equipamentos</b> .....	41
<b>3.4</b>	<b>Estudos Computacionais</b> .....	42
<b>3.5</b>	<b>Síntese de peptídeos</b> .....	44
<b>3.6</b>	<b>Purificação e caracterização</b> .....	46
<b>3.7</b>	<b>Dicroísmo Circular</b> .....	47
<b>3.8</b>	<b>Produção de Proteínas recombinantes ParD e ParE</b> .....	48
3.8.1	Clonagem .....	48
3.8.3	Mini preparação plasmidal (Miniprep) .....	52
3.8.4	Transformação de <i>parD</i> -pET28A em <i>Rosetta</i> .....	52
3.8.5	Produção de proteínas em <i>E. coli</i> .....	53
3.8.6	Purificação de proteínas em <i>E. coli</i> .....	54
3.8.7	Subclonagem de <i>parE</i> em pPICZ $\alpha$ A e pGAPZ $\alpha$ A .....	54
3.8.9	Produção de células competentes de <i>P. pastoris</i> .....	56
3.8.10	Transformação de <i>P. pastoris</i> por eletroporação .....	56
3.8.11	Produção e purificação de proteínas recombinantes .....	57
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	62
<b>4.1</b>	<b>Estudos Computacionais</b> .....	62
<b>4.2</b>	<b>Síntese e purificação dos peptídeos</b> .....	65
<b>4.3</b>	<b>Espectrometria de massas</b> .....	71
<b>4.4</b>	<b>Dicroísmo Circular</b> .....	71
<b>4.5</b>	<b>Produção de ParD e ParE</b> .....	74
<b>4.6</b>	<b>Cromatografia de Afinidade</b> .....	79
<b>4.7</b>	<b>Ensaio de Supressão de Fluorescência</b> .....	81
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	86
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	87

## 1 INTRODUÇÃO

Nos dias atuais, as doenças infecciosas estão entre as principais causas de mortalidade da população humana, o que pode ser explicado, em grande parte, pelo surgimento de microrganismos multirresistentes aos medicamentos existentes no mercado.

O inevitável surgimento de resistência está relacionado, na maioria dos casos, ao uso intensivo ou inadequado desses compostos, o que resulta na seleção de patógenos resistentes e tem gerado um grande problema relacionado à saúde pública.

Esses fatores têm motivado a busca por drogas cada vez mais potentes no combate às doenças infecciosas (LOHNER; STAUDEGGER, 2001) e principalmente estáveis aos mecanismos de resistência bacteriana. Assim, é de vital importância, a busca por substâncias naturais ou sintéticas que exibam atividades antimicrobianas específicas e, acima de tudo, que as exerçam através de mecanismos de ação alternativos aos antibióticos disponíveis.

Neste contexto, as toxinas encontradas em organismos vivos são uma grande promessa para alcançar estes objetivos. Dentre estas toxinas, a proteína bacteriana ParE (JOHNSON et al.,1996), a qual exerce sua função citotóxica sobre um grupo de enzimas denominado topoisomerasas, constituiu um exemplo importante da riqueza química e biológica, potencial ao desenvolvimento de novas estratégias no desenho de agentes antimicrobianos.

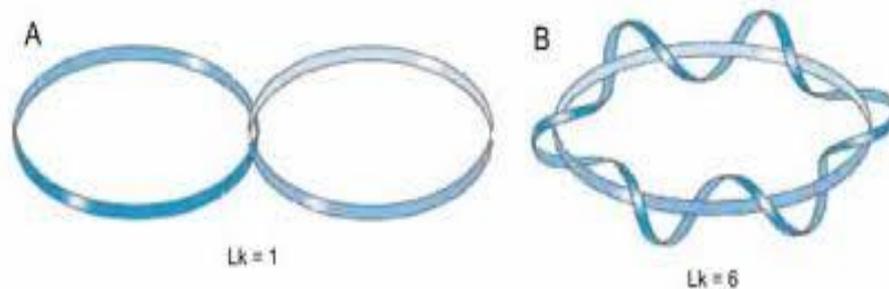
### 1.1 Topoisomerasas

As topoisomerasas constituem um grupo de enzimas que se tornou alvo efetivo para vários agentes terapêuticos. Tais enzimas estão presentes em todos os tipos de células (REECE; MAXWELL, 1991). Estas enzimas catalisam mudanças topológicas no DNA, imprescindíveis ao metabolismo e, portanto, para a viabilidade celular (WANG,1985).

Estas enzimas, com base em seus mecanismos de ação, podem ser divididas em subfamílias. As topoisomerasas do tipo I, que agem catalisando a quebra transitória de uma das fitas do DNA, girando uma das extremidades sobre a fita não quebrada e reunindo as extremidades quebradas, aumentando em uma unidade o

número de ligação das fitas (Lk). As do tipo II catalisam a quebra simultânea das duas fitas do DNA, reunindo-as posteriormente, aumentando o número de ligação das fitas em duas unidades (Figura 1). DNA girase e topoisomerase IV (Topo IV) são exemplos de topoisomerasas do tipo II, que compartilham considerável similaridade na sequência de aminoácidos e atuam essencialmente do mesmo modo (CHAMPOUX, 2001; NELSON; COX, 2011).

**Figura 1-** Número de ligações, Lk. Em (A), observa-se apenas um ponto de ligação entre as duas fitas sendo Lk=1, enquanto que em (B), nota-se a existência de seis pontos de ligação entre as fitas gerando Lk=6



**Fonte:** Nelson; Cox (2011).

## 1.2 DNA Girase

A DNA girase é um clássico representante das topoisomerasas do tipo II, descoberta por GELLERT e colaboradores em 1976, em *Escherichia coli*. Além de compartilhar do mecanismo geral das topoisomerasas, a DNA girase possui características especiais, que determinam sua habilidade única em introduzir super-hélices negativas no DNA (MARCHETTO, 2006). Esta reação de superenrolamento do DNA (torção da dupla hélice sobre seu próprio eixo) requer além de ATP, um cátion bivalente, tal como  $Mg^{2+}$  (GELLERT et al., 1976; MAXWELL, 1992) e pode ser estimulada pela presença de espermidina (BELLON et al., 2004).

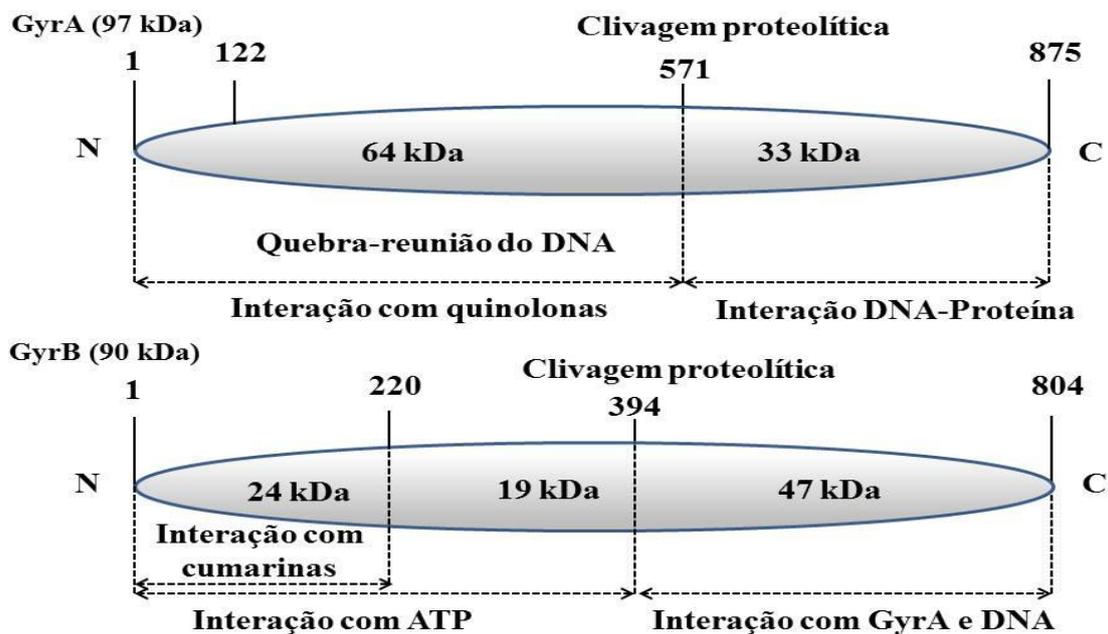
Estruturalmente, a DNA girase consiste de duas subunidades proteicas GyrA e GyrB. Duas subunidades GyrA e duas subunidades GyrB formam um heterotetrâmero do tipo  $GyrA_2GyrB_2$ , que constitui a forma ativa da enzima (MAXWELL, 1993; WIGLEY, 1995; TRETTER; BERGER, 2012).

GyrA apresenta massa molecular de 97 kDa e pode ser dividida em dois domínios (Figura 2), um N-terminal (64kDa), responsável pela quebra e união das fitas do DNA e interação com quinolonas, e um domínio C-terminal (33kDa)

responsável pela ligação da enzima ao DNA (MAXWELL, 1992; MAXWELL, 1997; NOLLMANN *et al.*, 2007 TRETTER; BERGER, 2012).

GyrB tem massa molecular de 90 kDa e também apresenta dois domínios (Figura 2). O sítio de interação e hidrólise do ATP encontra-se no domínio N-terminal (43kDa), enquanto que o domínio C-terminal está envolvido no processo de interação com a subunidade A e com o DNA. (MAXWELL, 1997; NOLLMANN *et al.*, 2007).

**Figura 2** - Representação esquemática dos domínios estruturais de GyrA e GyrB.



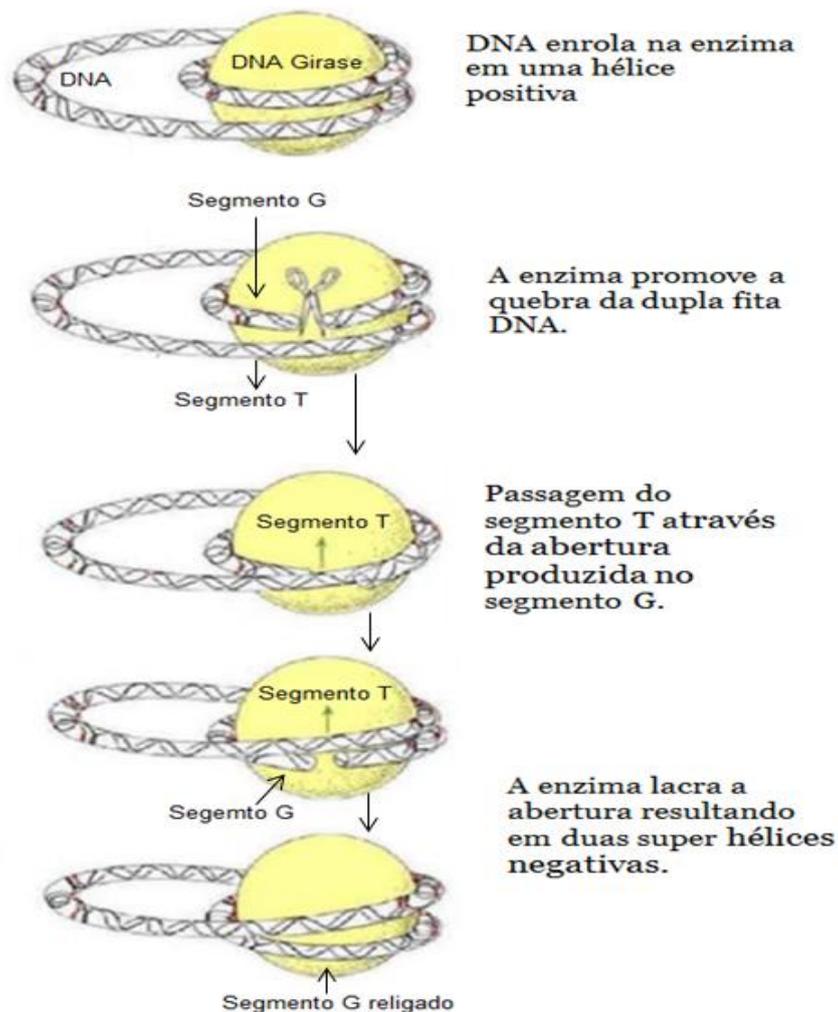
**Fonte:** Adaptado de Garcia (2010).

A girase atua catalisando a quebra simultânea da dupla fita em uma molécula de DNA, ocorrendo à passagem de outro segmento da mesma molécula através da abertura e posteriormente a religação das fitas aumentando em duas super-hélices negativas (Figura 3).

Esse processo é iniciado quando a girase envolve-se a um pequeno segmento de DNA formando uma super-hélice positiva. Posteriormente uma molécula de ATP liga-se a subunidade B, produzindo mudanças conformacionais na enzima e rotacionando-a. GyrB dimeriza e captura um segmento de DNA denominado T. A subunidade A simultaneamente catalisa a quebra nas duas fitas de

outro segmento denominado G. A ligação da enzima no DNA forma um complexo clivável, de forma que, o DNA está ligado à enzima covalentemente por uma ligação na região 5' do DNA clivado no resíduo de tirosina 122 da GyrA. O segmento T é transportado pela abertura produzida no segmento G, após esse processo as fitas são religadas. O segmento T que antes estava ligado a enzima é então liberado por uma abertura transitória na GyrA. A girase retorna a sua conformação original através da hidrólise da molécula de ATP. (ROCA; WANG, 1992, SMITH; MAXWELL, 1998, GARCIA, 2010, BARBOSA et al., 2012).

**Figura 3-** Modelo esquemático de mecanismo de ação da DNA Girase



**Fonte:** Adaptado de Marchetto (2006).

Um número considerável de compostos tem demonstrado efeito inibitório sobre a DNA girase, dentre eles, as famílias das quinolonas e das cumarinas tem grande destaque (MAXWELL, 1992, 1993 e 1997), além de proteínas bacterianas

CcdB e ParE (COUTURIER *et al.*, 1998; JIAN *et al.* 2002), e de seus peptídeo-derivados (TROVATTI *et al.*, 2008; BARBOSA *et al.*, 2012).

As perspectivas para o desenvolvimento de novos fármacos com ação antibacteriana e antitumoral incluem o estudo aprofundado da ação das proteínas naturais produzidas por microrganismos, incluindo as que têm como alvo as topoisomerasas bacterianas, dentre as quais se encontra a toxina ParE, que conjuntamente à antitoxina ParD, constitui o denominado sistema toxina-antitoxina bacteriano ParD-ParE.

### 1.3 Sistemas Toxina-Antitoxina

Sistemas toxina-antitoxina (TA) são importantes módulos genéticos formados, basicamente, por dois elementos, sendo uma toxina e uma antitoxina. Em células que exibem crescimento normal, a toxina é neutralizada pela antitoxina. Contudo, em várias condições as antitoxinas são rapidamente degradadas por proteases ou RNases, dependendo da sua natureza, deixando, dessa forma, as toxinas livres para agir sobre seus alvos com resultante efeito tóxico para a célula (BARBOSA *et al.*, 2014; HAYES, 2003).

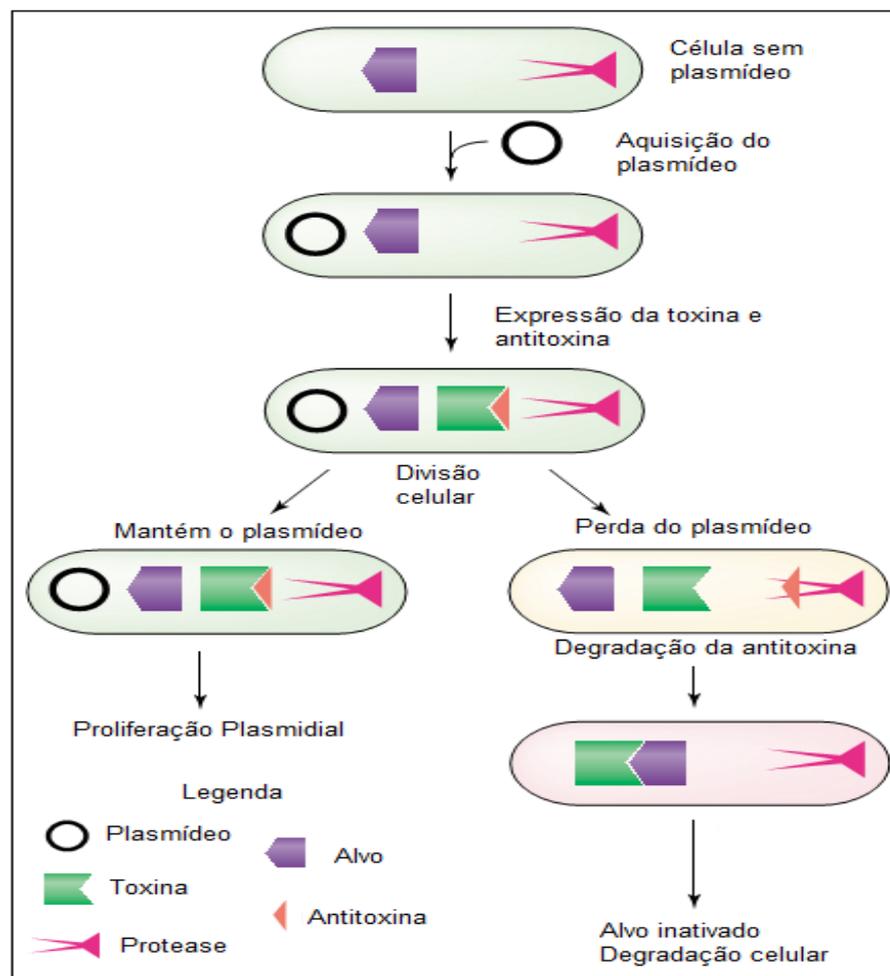
Amplamente difundidos em organismos procarióticos, os sistemas TA foram descobertos inicialmente em plasmídeos como um mecanismo de manutenção destes fragmentos de DNA extracromossomais. Posteriormente, também foram encontrados nos cromossomos de bactérias e arqueobactérias, atuando em outros eventos celulares importantes, tais como a morte celular programada, formação de biofilmes, proteção contra bacteriófagos, reparação do DNA cromossomal e resposta a condições de estresse (PAGE; PETI, 2016; PANDEY; GERDES, 2005).

No caso do processo de morte celular programada, os sistemas TA exercem uma função essencial na manutenção dos plasmídeos, em virtude da sua capacidade em matar ou inibir o crescimento de uma célula filha que não recebe uma cópia do plasmídeo durante o processo de divisão celular (PANDEY; GERDES, 2005). Após a divisão celular, cada célula filha deverá herdar alguns dos complexos toxina-antitoxina do citoplasma. Se uma célula filha não herda uma cópia do plasmídeo, a síntese da antitoxina não é mais possível (WILBAUX *et al.*, 2007). Por ser menos estável, a antitoxina é degradada, resultando na liberação da toxina, que

ficará livre para agir no seu alvo e exercer a sua função, inibindo um determinado processo celular, consequentemente levando a célula à morte (Figura 4).

Assim, os módulos TA são entidades genéticas que estão diretamente envolvidas na regulação do crescimento celular em procariotos.

**Figura 4** - Representação do sistema de morte celular programada

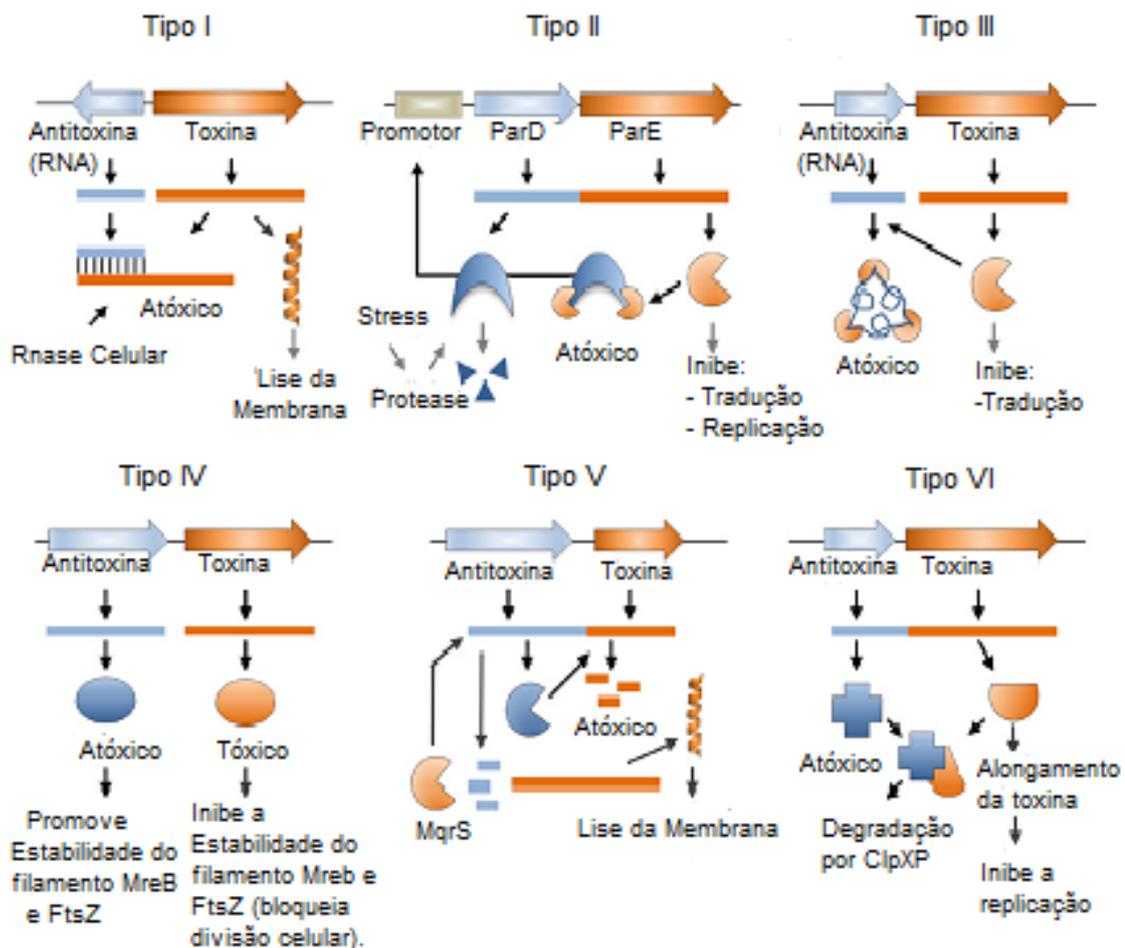


**Fonte:** Adaptado de Buts et al. (2005).

Em termos classificatórios, de acordo com a natureza da antitoxina e do seu modo de interação com a toxina, os sistemas TA estão distribuídos em 6 tipos (PAGE; PETI 2016), sendo que, os tipos II, IV, V e VI, a toxina e a antitoxina são duas proteínas (tipos I e III, a antitoxina é um RNA). Nestes casos, a antitoxina é uma proteína instável degradada por uma protease ATP-dependente, enquanto a toxina é uma proteína estável que inibe um processo celular essencial, tal como a

replicação do DNA ou a síntese proteica (Figura 5). Essa diferença de estabilidade, e a meia vida *in vivo* das duas proteínas é a chave para a funcionalidade dos sistemas TA (DAO-THI et al., 2000).

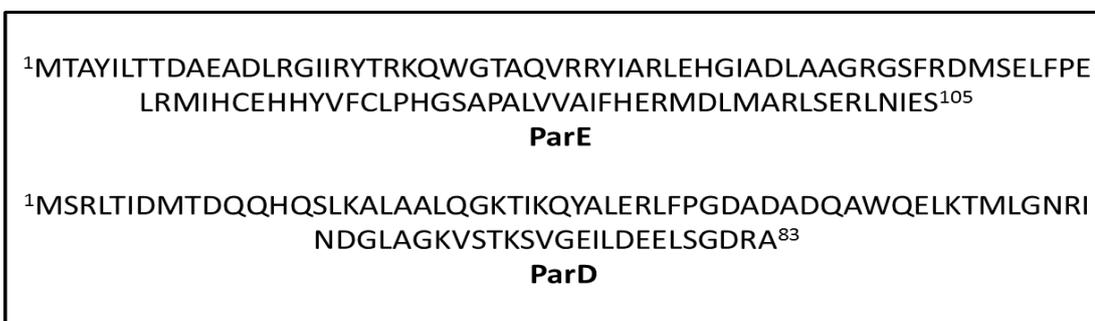
**Figura 5** - Sistemas TA. As toxinas estão representadas em laranja e as antitoxinas em azul. No sistema TA tipo I a antitoxina é um RNA capaz de se ligar ao mRNA da toxina, resultando na inibição da tradução via Rnase III ou pela ocultação da sequência Shine-Dalgarno. No tipo II, tanto a antitoxina como a toxina são proteínas, neste caso, a antitoxina se liga a toxina inibindo a sua atividade; neste sistema a antitoxina sozinha assim como a formação do complexo pode ligar-se ao operon e reprimir a transcrição. Em caso de stress celular, proteases são liberadas e clivam as antitoxinas, deixando as toxinas livres para inibir a tradução ou replicação. Tipo III: assim como no I a antitoxina é um RNA, no entanto, ela forma pseudos “nós” que se ligam diretamente à toxina e inibem a tradução. No tipo IV a antitoxina estabiliza os filamentos bacterianos, na sua ausência a toxina desestabiliza-os inibindo a divisão celular. No tipo V a antitoxina é uma Rnase específica para o RNA mensageiro da toxina; sob condições de stress a antitoxina é degradada por uma toxina do tipo II resultando na tradução da toxina do tipo V, que leva a lise da membrana. Tipo VI: A antitoxina forma o complexo com a toxina e são degradadas por ClpXp, em caso de stress a antitoxina é degradada e a toxina inibe a replicação do DNA



Fonte: Adaptado de Page; Peti (2016).

Um exemplo de sistema TA do tipo II, é o sistema ParE/ParD, identificado no plasmídeo RK2 de uma gama de procariotos, sendo ParE (103 aminoácidos) a toxina e ParD (83 aminoácidos) a antitoxina (Figura 6). ParD é capaz de neutralizar a ação de ParE pela formação de um complexo estável. Em contraste com a maioria dos sistemas TA, que requerem o complexo para a regulação negativa completa, ParD sozinho é suficiente para a auto-repressão (DAVIS, et al., 1992). ParE, apresenta atividade citotóxica no processo de replicação do DNA, por interferir na ação da DNA girase, possivelmente interagindo com uma das subunidades da enzima, estabilizando o denominado “complexo clivável” (JIANG et al., 2002).

**Figura 6** - Estrutura primária de ParE e de ParD de *Escherichia coli* (plasmídeo RK2)



Estudos sobre ParD mostraram que esta proteína existe como um dímero em solução, e que ParD exibe uma elevada estabilidade térmica e excelente capacidade de reestruturação após desnaturação induzida pelo calor. Espectroscopia de dicroísmo circular e caracterização preliminar por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) indicaram que a proteína é composta por  $\alpha$ -hélices e estruturas  $\beta$  (OBERER et al., 2002). Outros estudos químicos mostraram que ParD consiste de duas regiões estruturalmente distintas: uma N-terminal, bem ordenada e outra C-terminal, não estruturada (OBERER et al., 2002). Para outros sistemas TA, estudos de mutação e estruturais confirmaram esta separação em regiões, sendo a região N-terminal responsável principalmente pelo processo de auto-regulação, e a C-terminal que funciona na neutralização da toxina (BERNARD; COUTURIER, 1991; KAMADA et al., 2003; TAKAGI et al., 2005).

Estudos de RMN heteronuclear multidimensional esclareceram a estrutura homodimérica da antitoxina ParD do plasmídeo RK2 de *E. coli* (OBERER et al., 2007). Estes estudos confirmaram resultados anteriores de que ParD está

organizado em pelo menos duas regiões estrutural e funcionalmente distintas. A estruturação do domínio N-terminal resulta em uma dobra RHH (do inglês: ribbon-helix-helix), um motivo de ligação de DNA encontrado em diferentes repressores procarióticos com estruturas 3D conhecidas, obtidas por cristalografia de raios-X e espectroscopia de RMN (PHILLIPS, 1994; del SOLAR *et al.*, 2002). Por outro lado, a região C-terminal permanece altamente flexível em solução, porém podendo se estruturar quando interage com ParE, seguindo um modelo atual de reconhecimento. Este modelo, mandatório para sistemas TA em geral, invoca uma transição de estrutura desordenada para ordenada na antitoxina. Especificamente, a região desordenada da antitoxina quando na forma livre organiza-se numa estrutura secundária bem definida após ligação com a sua respectiva toxina (OBERER *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2008).

Estudos envolvendo a estrutura cristalina de um complexo ParE-ParD codificado cromossomicamente de *Caulobacter crescentus* evidenciaram que a antitoxina ParD livre não é nativamente desestruturada como a proteína ParD do plasmídeo RK2, o que contradiz o modelo de transição de fases compulsório para a maioria dos sistemas TA (DALTON; CROSSON, 2010).

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

Diferentemente do sistema TA CcdA-CcdB em que, uma forma truncada mutante da antitoxina CcdA (41 resíduos de aminoácidos C-terminal) continuou neutralizando a atividade do CcdB (BERNARD; COUTURIER, 1991), nenhum estudo tem relacionado o número mínimo de aminoácidos da parte C-terminal de ParD com a manutenção da atividade de antídoto. Também não existem evidências da existência de algum segmento de ParE, que atue como provável sítio de reconhecimento para o ParD, a exemplo do loop formado pelos resíduos R40 – L50 de CcdB (VAN MELDEREN *et al.*, 1996).

Existem, entretanto, evidências de um modelo em que interações interfaciais carga-carga são importantes para interação toxina-antitoxina, as quais podem servir para guiar a antitoxina para uma fenda hidrofóbica conservada em ParE (DALTON; CROSSON, 2010).

Como pode ser observado, existem poucas informações relacionadas com o complexo ParD-ParE e as poucas que existem são contraditórias. Neste sentido, um estudo alternativo empregando peptídeos derivados de ParD, bem como de ParE, poderá fornecer um novo caminho para estudar e melhor entender os contatos chave existentes entre as duas proteínas, o que é especialmente importante para o desenho racional de novos inibidores peptídicos de topoisomerasas bacterianas, cuja ação antitóxica do ParD seja desprezível.

#### 1.4 Predição de Estrutura Molecular

A modelagem molecular consiste em uma investigação de estruturas químicas de acordo com suas propriedades moleculares utilizando-se de ferramentas computacionais para editar, analisar, melhorar e armazenar sistemas moleculares complexos (BARREIRO; RODRIGUES, 1996). Estas ferramentas podem ser aplicadas em estratégias de modelagem de novos fármacos. A disponibilidade de programas computacionais de química e os bancos de dados em rede são, atualmente, ferramentas fundamentais para a descoberta e planejamento de fármacos. Novos agentes terapêuticos podem ser desenvolvidos pela análise de dados teóricos de estrutura-atividade de forma tridimensional, obtidos por técnicas recentes de modelagem molecular (KUMAR et al., 2012).

Os métodos de predição podem ser classificados de três formas: *de novo*, que pode ser aplicada em todos os tipos de proteínas, inclusive as que ainda não estão disponíveis modelos adequados, a modelagem por homologia ou comparativa, no qual a sequência alvo é predita de acordo com uma estrutura de modelo evolutivo relacionada e experimentalmente desenvolvida (BUJNICKI, 2003) e métodos de reconhecimento de motivos estruturais via alinhamento ou *threading* que utilizam potenciais estatísticos derivados da análise de padrões de enovelamento de proteínas com estruturas 3D conhecidas e armazenadas em uma base de dados de estruturas.

A abordagem *de novo* pode ainda ser subdividida em *ab initio*, método teórico baseado na equação de Schrödinger de forma que, as soluções são obtidas sem referências experimentais através da mecânica quântica e, em semi-empíricos que pretendem encontrar soluções para a equação de Schrödinger através de parâmetros empíricos e restrições matemáticas. É denominado como semi-empírico

já que, parte da sua composição envolve o método de *ab initio* e a outra parte provém de conhecimento empírico. (LASCHUK, 2005)

A modelagem *ab initio*, ou primeiros princípios, consiste em prever a estrutura tridimensional de uma proteína partindo de sua sequência de aminoácidos. Para isso, realiza-se uma busca no espaço conformacional a fim de encontrar as estruturas mais apropriadas, as quais são assumidas como sendo as que possuem menor energia livre.

Os métodos *ab initio* são fundamentados na termodinâmica e baseiam-se no fato de que a estrutura nativa de uma proteína corresponde ao mínimo global de sua energia livre (TRAMONTANO; LESK, 2006). Esta metodologia simula o espaço conformacional da proteína utilizando uma função de energia potencial, a qual descreve a energia interna da proteína e suas interações com o meio em que está inserida. O objetivo é encontrar um mínimo global de energia livre que corresponda ao estado nativo ou funcional da proteína (OSGUTHORPE, 2000; TRAMONTANO; LESK, 2006).

A modelagem por homologia ou comparativa é baseada no conceito de evolução celular. Neste contexto, as proteínas evolutivamente relacionadas possuem similaridade de estrutura primária, a qual é chamada homologia. Segundo (KACZANOWSKI; ZIELENKIEWICZ, 2010), proteínas homólogas quase sempre possuem estruturas tridimensionais semelhantes. Quando a homologia é detectada, geralmente com mais de 30% de identidade, a modelagem pode proceder realizando a cópia das coordenadas 3D de um molde ou obtendo a média entre múltiplos moldes e substituindo estas na proteína-alvo (KOLINSKI, 2004; BUJNICKI, 2003).

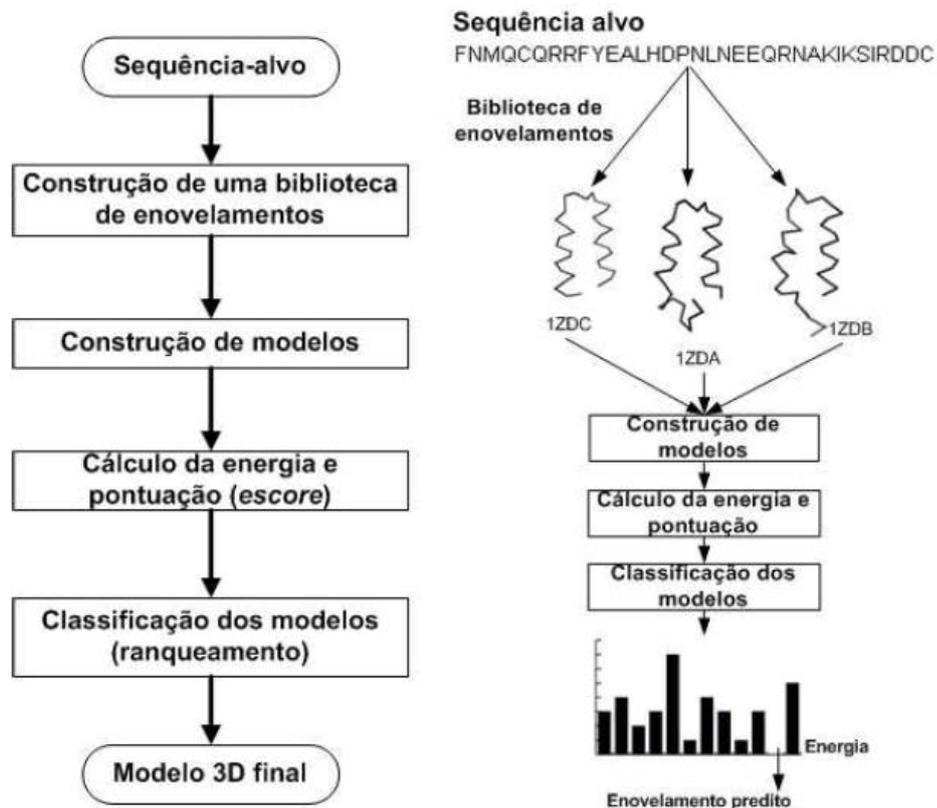
Na modelagem comparativa por homologia uma sequência de resíduos de aminoácidos de uma proteína (sequência alvo) é alinhada contra a sequência de aminoácidos de outra proteína com estrutura conhecida e armazenada no PDB (sequência e estrutura-molde).

Métodos de reconhecimento de motivos estruturais via alinhamento ou *threading* se baseiam na observação de que uma larga porcentagem de proteínas adota um número limitado de formas de enovelamento. Existem aproximadamente dez diferentes formas de enovelamento em 50% das estruturas conhecidas (RUSSELL; BARTON, 1994). Através da detecção de similaridades estruturais, as quais não podem ser detectadas unicamente pela similaridade entre as sequências de aminoácidos, são construídos os modelos 3D. A Figura 7 esquematiza um

método genérico de predição de estruturas baseado no reconhecimento de padrões de enovelamento.

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

**Figura 7-** Representação esquemática de um processo típico de modelagem baseada no reconhecimento de padrões de enovelamento via alinhamento (*Threading*).

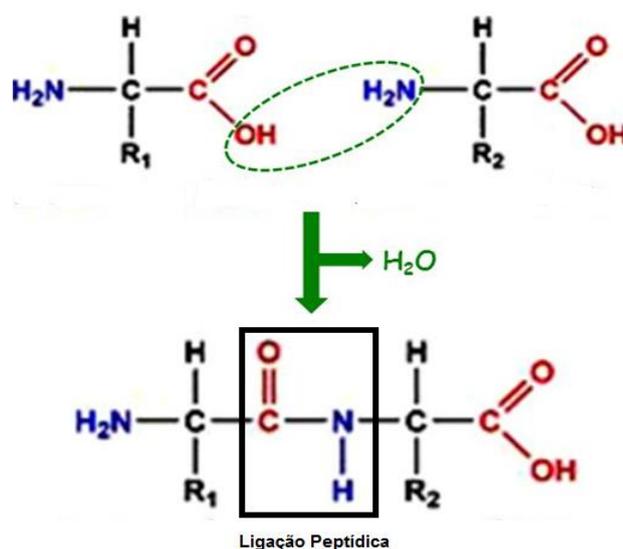


**Fonte:** HIGGINS et al., (1994)

## 1.5 Química dos Peptídeos

Peptídeos são compostos formados pela união entre dois ou mais resíduos de aminoácidos. Esta união ocorre por uma reação de condensação envolvendo um grupo  $\alpha$ -carboxílico de um aminoácido e um grupo  $\alpha$ -amínico de outro, formando a denominada ligação peptídica (Figura 8).

**Figura 8** - Representação esquemática da formação de uma ligação peptídica entre dois aminoácidos



**Fonte:** Elaborado pela autora

Peptídeos podem ser produzidos de forma natural, por diferentes metodologias sintéticas, tais como síntese enzimática e síntese química, ou por produção heteróloga via clonagem gênica.

O processo de síntese química dos peptídeos pode ser realizado ou em solução (FISCHER; FOURNEAU, 1901; CURTIUS 1902) ou pela metodologia de síntese em fase sólida (MERRIFIELD, 1963; MERRIFIELD, 1985). Esta última veio revolucionar a síntese orgânica por suas características peculiares, uma vez que abandonou a tradicional rotina, própria da síntese em solução, e introduziu o uso de polímeros insolúveis como suporte.

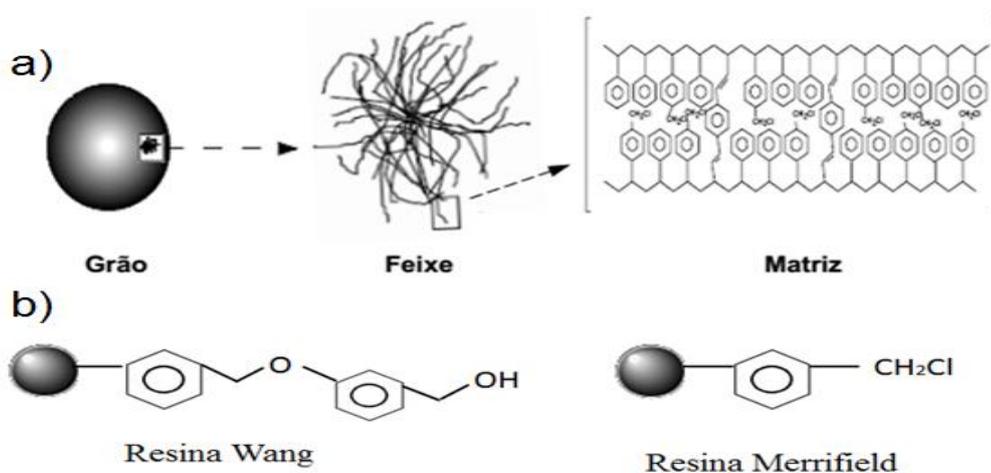
Este método, denominado síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS), tem como base o fato do grupo carboxílico do aminoácido C-terminal de uma cadeia peptídica, se encontrar unido covalentemente a um polímero e, portanto, o componente que contém esta extremidade é insolúvel nos solventes utilizados no processo de síntese (ANDREU; RIVAS, 1997). Assim, o excesso de reagentes e a maioria dos produtos secundários podem ser eliminados por simples filtração e lavagens do polímero que contém o peptídeo em crescimento. Este fato influencia favoravelmente a síntese e proporciona excelentes rendimentos, além de minimizar as perdas por manipulação e permitir a automatização de todo processo sintético.

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

Pode-se descrever uma resina, como uma estrutura complexa, formada por polímeros constituídos por unidades monoméricas constantes formando uma espécie de rede. Apresentam feixes interligados transversalmente através de um monômero bifuncional (*cross-linking*, ligações cruzadas) formando na maioria delas um grão de tamanho padronizado (Figura 9). Em intervalos mais ou menos regulares surgem estruturas químicas diferenciadas (*linkers*, ligantes), constituídas por apenas um átomo ou moléculas contendo diferentes grupos funcionais (MARQUARDT; LIMA, 2001; MARCHETTO, 2006).

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

**Figura 9** - a) Visualização esquemática progressiva de uma resina, a partir de uma unidade macroscópica e as cadeias poliméricas que compõe um polímero; b) Exemplo de polímeros funcionalizados.



**Fonte:** Adaptado de Marquardt; Lima (2001)

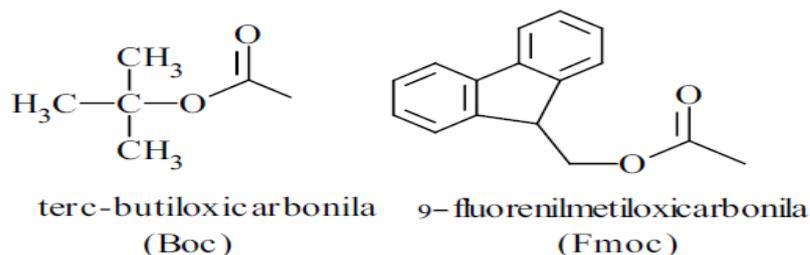
Na síntese, a formação controlada de uma ligação peptídica requer que todos os grupos funcionais presentes nos resíduos de aminoácidos, exceto os dois que vão participar da formação da ligação peptídica ( $\alpha$ -carboxílico de um aminoácido e  $\alpha$ -amínico de outro), estejam protegidos. Uma vez formada a ligação e antes da incorporação do seguinte aminoácido, deve-se eliminar o protetor do grupo funcional que irá permitir o crescimento da cadeia peptídica. Por último e ao final do processo sintético, os protetores de todos os grupos funcionais devem ser eliminados. Assim, pode-se concluir que o esquema de proteção é crucial para concluir com êxito a síntese de um peptídeo.

Para o processo de síntese existem dois tipos diferentes de protetores. Por um lado, está aquele tipo que protege o grupo funcional que irá participar da nova ligação peptídica e, portanto, deve ser eliminado a cada ciclo sintético, denominado “protetor temporário”. Como normalmente a síntese é executada na direção  $C \rightarrow N$ , este tipo de protetor é aquele que normalmente protege o grupo  $\alpha$ -amínico. Por outro, estão os “protetores permanentes”, que são os que devem permanecer estáveis e que são eliminados no final do processo sintético. Neste tipo podem-se diferenciar aqueles da função carboxílica do aminoácido C-terminal daqueles que protegem as funções laterais dos aminoácidos trifuncionais.

A natureza química do grupo protetor do grupo  $\alpha$ -amínico marca, de certa forma a estratégia de síntese, uma vez que os protetores permanentes devem ser estáveis às condições utilizadas para eliminar repetidas vezes o protetor temporário. Por sua vez, os protetores permanentes devem ser eliminados eficazmente na última etapa (AMBLARD, 2005, KIMMERLIN; SEEBACH, 2005).

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

**Figura 10-** Protetores temporários usuais utilizados na SPFS



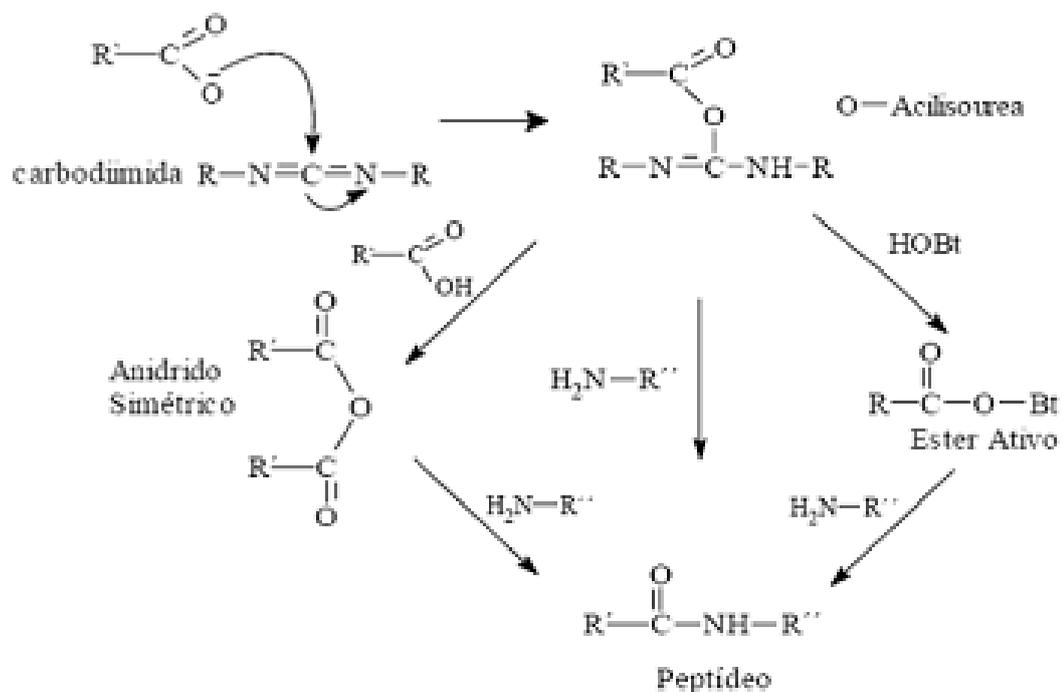
**Fonte:** Elaborado pela autora

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

No processo de síntese, para que ocorra a formação da ligação peptídica entre os aminoácidos adjacentes, é necessário que eletrófilo (C carbonílico do ácido) esteja ativado. Desta forma, ele poderá sofrer ataque do nucleófilo (grupo  $\alpha$ -amínico do aminoácido que permanece ligado à resina) e, assim, formar uma ligação amida (peptídica).

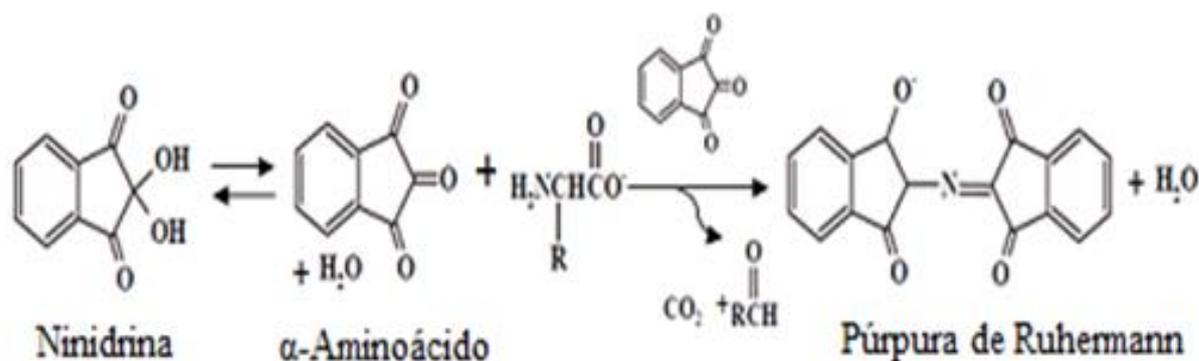
Os reagentes de acoplamento ou de condensação têm a função de reagir com o grupo carboxila livre de um aminoácido e gerar espécies reativas. As carbodiimidas são os reagentes de acoplamento mais utilizados. O mecanismo envolve a formação da *O*-acilisouréia, que sofre aminólise por parte da amina, para produzir a ligação amida. Se for empregado um segundo equivalente de ácido carboxílico, será formado o anidrido simétrico. Do mesmo modo, na presença de hidroxilaminas (p.ex. Hidroxibenzotriazol - HOBt ou 7-aza-1-hidroxibenzotriazol - HOAt), será obtido um éster. Qualquer uma das três espécies reativas, *O*-acilisouréia, anidrido simétrico ou éster ativo, são eficazes no processo de acilação (Figura 11).

**Figura 11** - Representação esquemática do mecanismo de ligação peptídica empregando carbodiimidas



Todas as reações de condensação ou acoplamento são monitoradas pelo teste qualitativo da ninidrina (KAISER *et al.*, 1970), utilizado para a detecção de aminas primárias livres. A ninidrina ao reagir com uma amina primária leva a formação de um produto de coloração violeta ou púrpura de Ruhemann (Figura 12). A cada novo reacoplamento, a resina deve-se apresentar com coloração amarela, já que os grupos funcionais ainda se encontram protegidos e conseqüentemente não apresentam nenhuma amina primária livre para reagir com a ninidrina. Após o processo de desproteção, o grupo amina perde seu grupo protetor, fazendo com que a resina assumira novamente a coloração violeta.

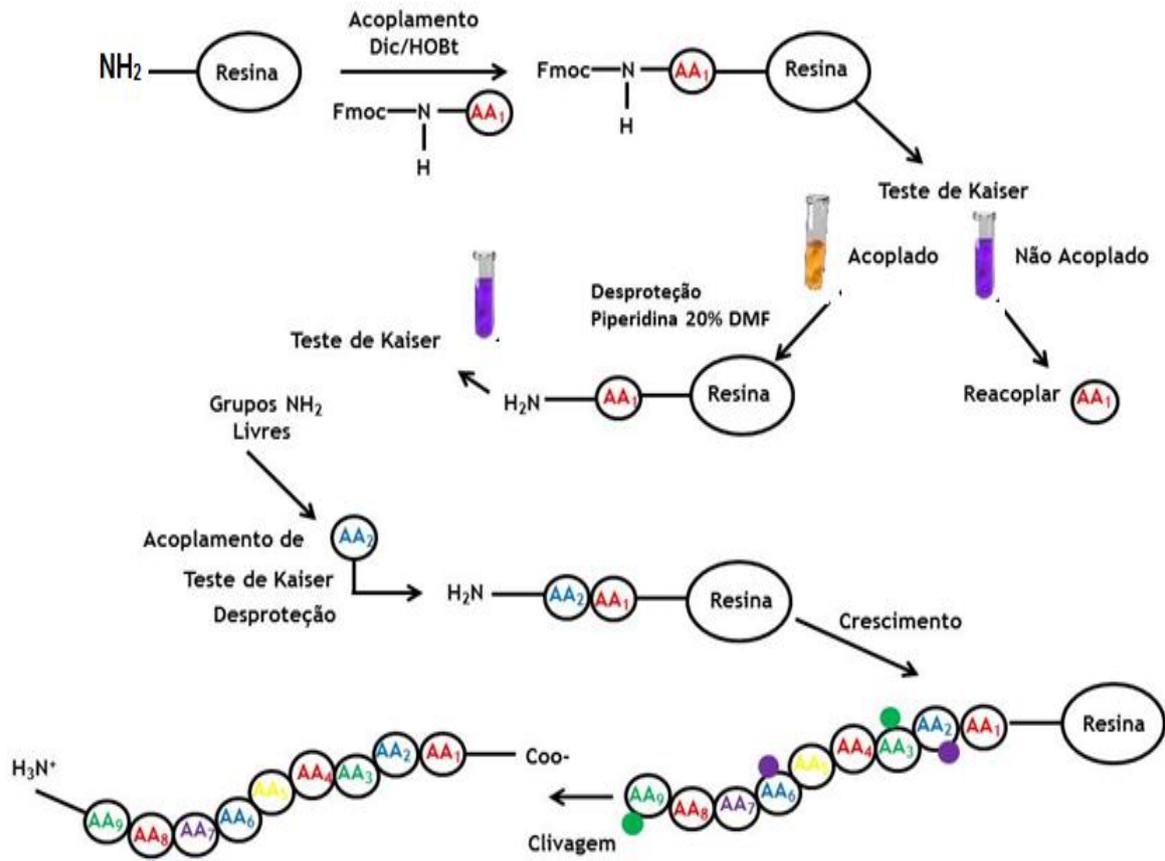
**Figura 12** - Esquema da reação de ninidrina (teste de Kaiser)



**Fonte:** Caires (2014).

A Figura 13, ilustra um processo de síntese de peptídeos em fase sólida, empregando a estratégia Fmoc/tBu, utilizada na síntese dos diversos fragmentos peptídicos deste trabalho. Este processo consiste de uma sequência de etapas sequenciais e repetitivas de acoplamento e desproteção, além de uma etapa final de clivagem. O andamento da síntese é acompanhado pelo teste de Kaiser (ninidrina), de tal forma que o prosseguimento das etapas sequenciais de acoplamento depende do resultado deste teste, como mostrado na figura.

**Figura 13** - Representação esquemática da SPFS pela estratégia Fmoc/tBu



Fonte: Elaborado pela autora.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho está centrado na busca de uma estrutura mínima da antitoxina ParD, com capacidade de manter os parâmetros de interação com a toxina ParE.

De maneira específica objetivou-se:

- 1) Projetar e sintetizar quimicamente sequências peptídicas derivadas de ParD e ParE, previamente selecionadas por estudos computacionais;
- 2) Obter a toxina ParE e a antitoxina ParD de *Escherichia coli* por técnicas de expressão heteróloga;
- 3) Empregar a técnica cromatografia de afinidade e de fluorescência no estado estacionário, a fim de identificar a possibilidade de interação entre um derivado de ParE e os análogos de ParD, além de quantificar a associação entre os mesmos;
- 4) Realizar análises de bioinformática para levantamento de dados estruturais das sequências peptídicas e comparar com os dados de dicroísmo circular.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Reagentes e Solventes

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

- Suporte polimérico para síntese peptídica em fase sólida (SPFS): Fmoc-Asn(trt)-Wang resina de 0,62 mmol/g e Rink-amida com grau de substituição de 0,59 mmol/g e 0,52 mmol/g, da marca Novabiochem®.
- Aminoácidos: Os L- $\alpha$ -aminoácidos utilizados na síntese apresentavam a extremidade amino-terminal protegida com o grupo base-lábil Fmoc e grupos t-butílicos ou derivados para a proteção das cadeias laterais dos aminoácidos trifuncionais;
- Os agentes de condensação utilizados na síntese dos peptídeos e cromatografia de afinidade foram: Diisopropilcarbodiimida (DIC), N-Hidroxibenzotriazol (HOBt), N-Hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt), O-Benzotriazolil-N,N,N',N'-tetrametiluronio-hexafluorofosfato (HBTU) e N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimida (EDC).
- Como reagente de desproteção do grupo Fmoc, foi utilizada uma solução 20% (v/v) de 4-metilpiperidina, da marca Merck®, em DMF.
- O reagente utilizado para a clivagem ácida final dos peptídeos foi o ácido trifluoracético (TFA), adquirido da Fluka®.
- Etanoditiol (EDT) e triisopropilsilano (TIS), substâncias responsáveis pela captura de espécies responsáveis por alquilação eletrofílica e liberadas no meio reacional durante o processo de clivagem ácida, foram adquiridos ou da Sigma® e ou da Acros®;
- Os eluentes cromatográficos utilizados foram acetonitrila (ACN) da marca J.T.Baker® e água ultrapura, obtida através de um sistema de filtração Barnstead, equipado com cartuchos para retenção de sais e de compostos orgânicos;

- Demais reagentes e solventes como ácido acético glacial, anidrido acético, diclorometano (DCM), diisopropiletilamina (DIEA), dimetilformamida (DMF), hexafluoroisopropanol, N-metilpirrolidona (NMP) e ácido  $\epsilon$ -maleimidocapróico foram adquiridos da Merck®, Aldrich®, Mallinckrodt®, Baker® e Fluka®.

### 3.2 Materiais utilizados para produção de proteínas recombinantes

- Vetores: pPICzαA, pGAPzαA, pETDuet I, pET28A, pTZ57R/T.
- Enzimas: Enzimas de restrição *EcoRI*, *XhoI*, *SalI*, *NotI*, *NdeI*, *HindIII* adquiridas da empresa Fermentas®, XMAJ1 (AvrII) da empresa ThermoScientific™; DNA-polimerase adquiridas das empresas Biolase™, ThermoScientific™, ACTGene™, Neotaq®, Phusion® *High-Fidelity*; T4ligase da empresa Invitrogen®
- Tampões: Tango, Orange adquiridas da empresa Fermentas®; Para os procedimentos de PCR foram utilizados tampões da Biolase™, ThermoScientific™, ACTGene™, Neotaq®. Tampão de lise sem imidazol (TrisHCl 10 mmol.L<sup>-1</sup>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mmol.L<sup>-1</sup>, NaCl 100 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 8,0); tampão de lise com imidazol (Tris.HCl 10 mmol.L<sup>-1</sup>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mmol.L<sup>-1</sup>, NaCl 100 mmol.L<sup>-1</sup>, Imidazol 250 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 8,0).
- Kit's para purificação e Mini preparação plasmidial e quantificação de proteínas pelo método BCA das empresas Promega®, Qiagen® e ThermoScientific™ respectivamente.
- As sequencias foram buscadas no banco de dados de proteínas com estruturas resolvidas disponível em RCSB-PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) e otimizadas para expressão em *Escherichia coli* K12 e *Pichia pastoris*. Os Genes foram sintetizados pela empresa GenOne ([www.genone.com.br/](http://www.genone.com.br/)) com sítios de restrição 5'*EcoRI*/3'*SalI* e arremetido em vetor pBlueScriptKS(-) sem otimização de códon.

- As sequências de Oligonucleotídeos (*Forward-Fw* e *Reverse-Rv*) foram desenhadas de acordo com cada sequência gênica e adquiridos da Exxtend (<https://www.exxtend.com.br/site/>).
- Soluções para expressão em *Picchia pastoris*: DTT 1 mol.L<sup>-1</sup> (3,09 g de DTT, 10 mmol.L<sup>-1</sup> de acetato de sódio pH 5,2); HEPES 1 mol.L<sup>-1</sup> pH 7,8 (5,2 g de HEPES em 20 mL de água); Sorbitol 1 mol.L<sup>-1</sup> (3,4g de sorbitol em 20 mL de água).
- Meios de cultura: LB: Triptona 1%, Extrato de Levedura 0,5% e NaCl 1%  
YPD: Extrato de Levedura 1%, Peptona 2% e Dextrose 2%
- Preparo de Géis: *Gel de poliacrilamida (SDS-Page)*: EDTA 0,2 mol.L<sup>-1</sup>; SDS 10% e 12%; Tris.HCl 2 mol.L<sup>-1</sup> pH 8,8, Acrilamida Bisacrilamida (30:0,8), TEMED, Persulfato de Amônia 10% e água; *Gel de empilhamento*: SDS 10 e 12%, água, Tris.HCl 2 mol.L<sup>-1</sup> pH 6,8, Acrilamida Bisacrilamida (30:0,8), Persulfato de amônia 10%, TEMED.

### 3.3 Equipamentos

- Sistema de Cromatografia Líquida em modo analítico: Cromatógrafo Shimadzu LC-10A/C-47A equipado com três bombas LC 10AT, injetor automático SIL 10AF e detectores de UV SPD 10A e fluorescência RF 10A.
- LC/ESI-MS constituído por um UFLC Shimadzu composto por duas bombas LC 20AD, detector "UV-visível" modelo SPD 20A, injetor automático modelo SIL 20AHT e um espectrômetro de massas Bruker modelo Amazon SL. O sistema é controlado por uma Workstation empregando o Software LCSolution.
- Espectrofotômetro UV-Visível Shimadzu UV 1601PC;
- Espectrofluorímetro Cary Eclipse da Varian.
- Shaker New Brunswick Scientific
- Bloco de aquecimento Thermo Stat plus
- Centrifuga Eppendorf 5424

- Centrifuga Sorvall RC-5C
- Espectofotometro NanoDrop
- Fotodocumentador ChemiDoc XRS System (Biorad)

### 3.4 Estudos Computacionais

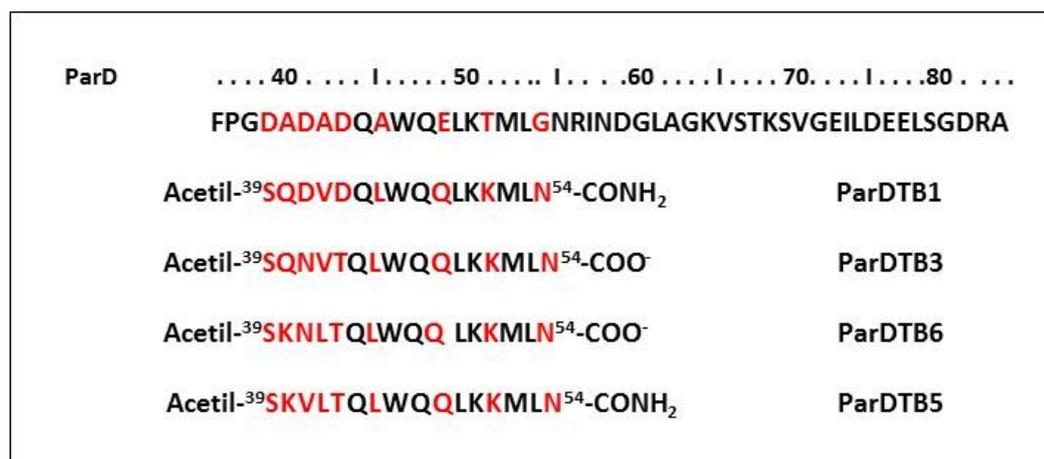
A abordagem utilizada para definir as sequências peptídicas a serem sintetizadas consistiu inicialmente em uma predição estrutural da toxina e de uma sequência peptídica (D39 – G54) da antitoxina, caracterizada por ser responsável pela interação com a toxina (CAIRES, 2014). Para isso foi utilizado o servidor I-TASSER (ROY et al., 2010), para gerar os modelos estruturais de ambas, baseando-se na sequência de seus resíduos de aminoácidos. Através de uma inspeção visual do melhor modelo tanto para ParE quanto para o derivado de ParD, foi verificado que, devido ao número considerável de resíduos hidrofóbicos, estes poderiam exercer um papel importante na interação intramolecular, favorecendo o processo de enovelamento. Posteriormente, estes modelos foram submetidos a um procedimento de docking peptídeo-peptídeo utilizando o servidor GRAMM-X (TOVCHIGRECHKO; VAKSER, 2006), com o objetivo de identificar possíveis modos de interação entre estas sequências. Em seguida, foi realizada uma seleção dos melhores complexos, proteína-peptídeo, gerados através do docking, a partir da análise de área de superfície acessível ao solvente (SASA) usando o servidor GETAREA (FRACZKIEWICZ; BRAUN, 1998). A finalidade deste procedimento foi avaliar quão expostos estavam os resíduos hidrofóbicos nos complexos gerados pelo docking. Uma vez que tais resíduos tendem a ficarem menos expostos ao solvente, complexos que apresentam a menor superfície de acessibilidade ao solvente possuem, por conseguinte, maior probabilidade de serem formados durante o processo de interação molecular. Como os valores de pontuação do docking também possuem erros associados, através desta etapa, procura-se ampliar a capacidade preditiva do docking. Os complexos com menor SASA foram selecionados para estudo de dinâmica molecular com GROMACS (PRONK *et al.*, 2013). Resumidamente, este programa foi utilizado para avaliar o processo de interação de forma dinâmica, ou seja, ao longo de um tempo pré-definido e

configurado pelo usuário. Enquanto o procedimento de docking avalia como podem ocorrer as interações intermoleculares, o procedimento de dinâmica molecular considera a mobilidade dos resíduos no complexo quando este encontra-se envolvido por um sistema solvente, neste caso a água com íons de cloreto e sódio em concentração semelhante à encontrada no meio biológico, ou seja, 150 mmol.L<sup>-1</sup>.

Através de uma análise da trajetória, isto é, das conformações obtidas durante a dinâmica molecular, é possível entender melhor como o ambiente bioquímico pode interferir no processo de interação. Quando as diferentes conformações obtidas pela dinâmica do complexo ao longo da trajetória de simulação são obtidas, torna-se possível classificá-las em clusters. Cada cluster contém conformações que diferem entre si por um RMSD (Root Mean Square Deviation) de 2 Å. Esta trajetória de simulação foi analisada e cada grupo de clusters foi gerado utilizando o software CHIMERA (PETTERSEN et al., 2004). A utilização de clusters conformacionais para o estudo posterior visa estabelecer uma amostragem representativa do sistema submetido à simulação. Os clusters que apresentaram o maior número de conformações foram selecionados e, para cada um, foi escolhida uma estrutura representativa. Este conjunto, por sua vez, foi utilizado para um estudo de alanina (*alanine scanning*, ou AS). Neste procedimento, os resíduos da interface ParE-ParD são automaticamente mutados por resíduos de alanina e, para cada substituição é realizada uma avaliação da diferença de variação da energia livre de interação, ou  $\Delta\Delta G$ . Quando este valor é negativo, o resíduo em questão pode, a princípio, ser mutado, pois interfere de modo desfavorável na interação intermolecular. Esta mutação pode ser realizada *in silico*, ou seja, através do programa computacional. Em seguida, a sequência contendo o resíduo mutado é submetida a um estudo de dinâmica molecular com arrefecimento simulado (*simulated annealing*), porém, sem o complexo formado. Isto tem por objetivo avaliar se a mutação não resultará em perda da sua estrutura. Caso apresente desestruturação durante a dinâmica, não é possível continuar com o estudo do complexo, porque a sequência tende a não formar o complexo como predito pela etapa de docking e a mutação deve ser reavaliada. Se não for observada desestruturação do peptídeo durante sua simulação na ausência do complexo, este é submetido novamente, na forma de complexo, a outra etapa de simulação de dinâmica molecular, avaliação da trajetória, identificação de clusters e estudo de AS. Se o valor de  $\Delta\Delta G$  resultante for positivo, nesta última etapa, indicará, a princípio,

que a mutação resultante será mais favorável para obter um complexo de interação mais estável. A partir deste estudo foram obtidos perfis de variação de interação da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) para cada resíduo, resultando nas sequências peptídicas representadas na Figura 14.

**Figura 14** - Estrutura primária da região C-terminal da proteína ParD e sequências peptídicas selecionadas por estudos computacionais para síntese.



### 3.5 Síntese de peptídeos

Os peptídeos projetados a partir dos ensaios de *docking* e dinâmica molecular, foram sintetizados manualmente pelo método da fase sólida (AMBLARD *et al.*, 2005), de acordo com o protocolo padrão (Tabela 1) que emprega o grupamento base-lábil Fmoc como protetor dos  $\alpha$ -amino grupos, e derivados t-butilicos (t-Bu) para a proteção das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos trifuncionais (CHAN; WHITE, 2000).

Os peptídeos ParDTB3 e ParDTB6, foram sintetizados a partir de uma resina Fmoc-Asn(trt)-Wang, com um grau de substituição de 0,62 mmol/g e os peptídeos ParDTB1 e ParDTB5 a partir de uma Rink-amida de grau de substituição de 0,52 mmol/g.

Para o acoplamento de cada aminoácido, empregou-se o excesso molar de 3 equivalentes para o Fmoc-aminoácido e 3 equivalentes para os agentes de condensação DIC/HOBt, em relação à escala de síntese, em DMF:DCM (1:1), por aproximadamente 2 horas. A desproteção dos grupos  $\alpha$ -amínicos (remoção do grupo Fmoc), após a entrada de cada aminoácido, foi realizada empregando-se uma solução de 4-metil-piperidina 20% (v/v) em DMF (Tabela 1). O monitoramento das

etapas de acoplamento foi realizado pelo teste de ninidrina (KAISER *et al.*, 1970) e quando positivo (acoplamentos incompletos), o processo era repetido com 50% dos reagentes. Acetilação, quando necessária, foi feita com anidrido acético e diisopropiletilamina (10 equivalentes cada) em DMF, por 30 minutos ao final do acoplamento ou ao final da síntese.

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

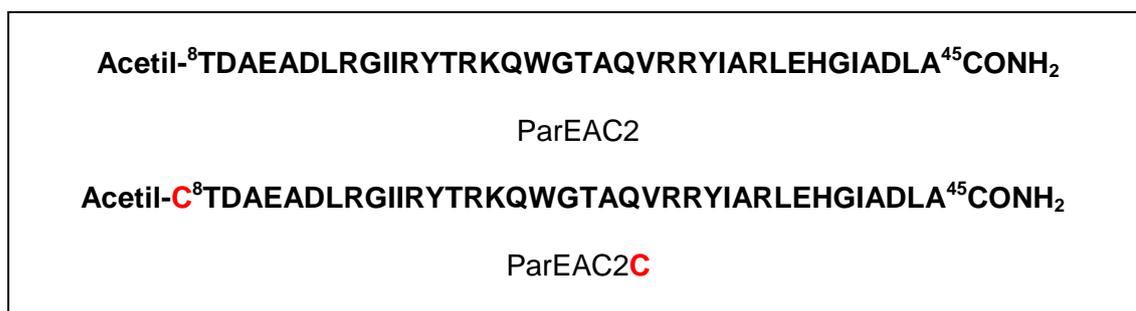
Reagente/Solventes	Operação	Tempo (min)	Ciclos
DMF	Lavagem	1	4
4-metil-Piperidina 20% em DMF	Lavagem	1	1
4-metil-Piperidina 20% em DMF	Desproteção	20	1
DCM/DMF	Lavagem	1	6
Fmoc-AA-OH (3eq) +DIC/HOBt (3eq) em DCM/DMF (1:1)	Acoplamento	120	1
DCM/DMF	Lavagem	1	6

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

Na síntese do derivado de ParE (CAIRES, 2014), empregou-se as mesmas condições de acoplamento e clivagem, descritas para os análogos do ParD, porém partindo-se de uma resina RinK Amida MBHA, com grau de substituição de 0,59 mmol/g. O processo de clivagem também seguiu o mesmo protocolo descrito para os análogos de ParD.

Após a síntese deste derivado, e antes da acetilação da extremidade N-terminal, separou-se uma parte de cada peptidil-resina, nas quais foi dada continuidade à síntese, pelo acoplamento de um resíduo de cisteína (Cys), utilizando a mesma metodologia já descrita, tendo sido obtido o peptídeo denominado ParEAC2C (Figura 15).

**Figura 15** - Estrutura primária dos derivados sintéticos ParEAC2 e ParEAC2C



### 3.6 Purificação e caracterização

A purificação dos peptídeos foi realizada empregando-se Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em um cromatógrafo Shimadzu LC-20AT/DGU-2A/SPD-20A, usando uma coluna de fase reversa Nucleosil C18 (250 x 10mm; 10µm; 300 Å) com um gradiente linear de componente orgânico (acetonitrila 0,036% TFA) variável de acordo com a sequência peptídica, fluxo de 3,0 mL/min e detecção a 220 nm. As análises das frações puras foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu LC-10A/C-47A, empregando uma coluna de fase reversa Shimadzu C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å), com um gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.

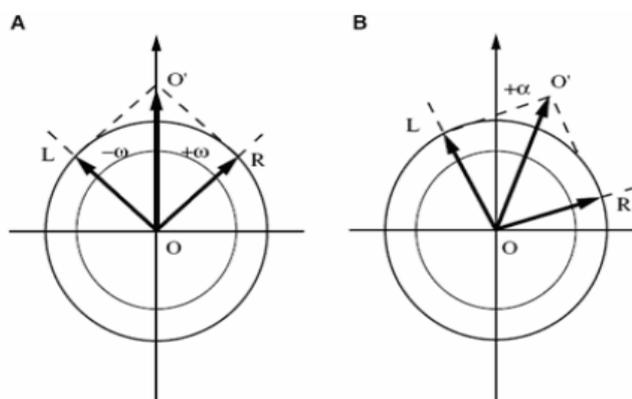
A caracterização dos produtos foi realizada a partir do material bruto, por determinação da massa molecular, utilizando um espectrômetro de massas Bruker Amazon SL acoplado a um cromatógrafo líquido Shimadzu (LC-MS) no modo de ionização positivo (ES-MS positivo), tendo como resultado final a razão massa molar/carga (MM/z).

### 3.7 Dicroísmo Circular

A técnica de dicroísmo circular se baseia na absorção diferenciada da luz circularmente polarizada incidente em compostos quirais. A luz circularmente polarizada é gerada quando a fonte de luz oscila em duas direções perpendiculares entre si, com amplitudes iguais, mas com uma diferença de fase ( $\pi/2$ ). Com isso, a trajetória do vetor resultante de propagação de luz é helicoidal. Devido a isso, a onda resultante será circularmente polarizada à direita ou à esquerda, conforme a diferença de fase for  $+\pi/2$  ou  $-\pi/2$ .

Para uma molécula quiral apresentando o fenômeno de dicroísmo circular, o componente circularmente polarizado à direita é absorvido em diferente intensidade em relação ao polarizado à esquerda. Assim, a combinação das duas ondas transmitidas resulta em uma luz elipticamente polarizada como exemplificado na Figura 16 (PURDIE, 2007).

**Figura 16-** Representação da luz circularmente polarizada à direita e à esquerda incidente “a” e transmitida após interagir com a molécula dicroica “b”.



**Fonte:** Purdie (2007).

Em peptídeos e proteínas existem duas ligações cuja rotação é permitida:  $C_{\alpha}$ -NH, cujo ângulo de rotação é  $\Phi$  e  $C_{\alpha}$ -CO, cujo ângulo de rotação é  $\Psi$ . Os ângulos específicos  $\Phi$  e  $\Psi$  são os responsáveis pelo espectro de CD característico das estruturas secundárias,  $\alpha$ -hélice, folha- $\beta$  e estrutura randômica (MICSONAI et al., 2015).

Estruturas secundárias do tipo  $\alpha$ -hélice apresentam três bandas características: com transição  $n-\pi^*$  que resulta em uma banda negativa com absorção entre 220-222 nm, transição  $\pi-\pi^*$  paralela, resultando em outra banda

negativa com absorção entre 207- 209 nm e  $\pi$ - $\pi^*$  perpendicular que forma uma banda positiva com absorção entre 195-200 nm. Estruturas secundárias do tipo folha- $\beta$  apresentam duas bandas espectrais, uma positiva com transição  $\pi$ - $\pi^*$  e absorção em 196 nm e uma banda negativa com transição  $n$ - $\pi^*$  absorção em 218 nm. Espectros de estruturas desordenadas apresentam a formação de uma banda negativa, com transição  $\pi$ - $\pi^*$  absorvendo em 200 nm. Assim, de acordo com a conformação estrutural adquirida pelas proteínas é possível caracterizar a estrutura secundária destas macromoléculas devido ao perfil espectral de CD particular destes arranjos (WHITMORE; WALLACE, 2007).

A análise da estrutura secundária de cada peptídeo foi feita pela técnica de dicroísmo circular, em um espectropolarímetro JASCO J-815. As amostras utilizadas apresentavam concentração de 65  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , para um volume final de 250  $\mu\text{L}$ . Os espectros de CD foram realizados com acúmulo de 6 varreduras de 190 a 280 nm em tampão PBS (*phosphate buffered saline*), pH 7,4 e também em 50% de TFE (trifluoroetanol) à 25°C, em uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 mm.

Para cada medida, realizou-se um branco utilizando tampão PBS, o qual apresentou sinal desprezível, sendo subtraído de todas as curvas.

### 3.8 Produção de Proteínas recombinantes ParD e ParE

#### 3.8.1 Clonagem

Para a expressão heteróloga das ORF's (*Open Reading Frame*) de *parE* e *parD* em *E.coli*, foram escolhidos o vetor pET28A e pETDuet-1. As enzimas de restrição utilizadas na clonagem dos genes de interesse foram *EcoRI* e *XhoI* para *parD* e *EcoRI* e *Sall* para *parE*. Para a expressão em *P. pastoris* utilizou-se o vetor pGAPZ $\alpha$ A com as enzimas de restrição *EcoRI* e *Sall*.

De acordo com as sequências de nucleotídeos de ParE e ParD, foram desenhados e sintetizados *primers* complementares às extremidades da ORF (*Open Reading Frame*) de cada gene, os quais se ligam aos mesmos, servindo de ancoragem para as enzimas *Taq* polimerase, responsável pela polimerização do DNA. As sequências oligonucleotídicas utilizadas tanto para expressão em *Pichia pastoris* quanto em *Escherichia coli* e suas respectivas enzimas de restrição estão descritas nas Tabelas 2 e 3 para ParD e ParE respectivamente.

**Tabela 2** - Oligonucleotídeos sintetizados para expressão de ParD em *Pichia pastoris* e *Escherichia coli* Em negrito estão representados os sítios de restrição; em negrito sublinhado, o códon de iniciação; em azul as sequências de primers que apresentam His-Tag (para posterior purificação por cromatografia de afinidade).

ParD	Oligonucleotídeos	Enzimas de Restrição
<i>Pichia pastoris</i> com His-tag <Forward>	5'AAAG <b>GAATTCCATCATCATCATCATCAT</b> <u>ATG</u> AGCCGCCTGACA ATTGAC-3'	EcoRI
<i>Pichia pastoris</i> <Reverse>	5'- AAAG <b>T<b>CGACT</b>CA</b> CTCGCGATCTCCGCTCA-3'	Sall
<i>E. coli</i> (pETDuet1) <Forward>	5'- AAAG <b>GAATT<b>CG</b>ATG</b> AGCCGCCTGACAATTGA-3'	EcoRI
<i>E. coli</i> (pETDuet1) <Reverse>	5'- AAAG <b>CGG<b>CGCT</b>CA</b> CTCGCGATCTCCGCTCA-3'	NotI

**Tabela 3** - Oligonucleotídeos sintetizados para expressão de ParE em *Pichia pastoris* e *Escherichia coli* Em negrito estão representados os sítios de restrição; em negrito sublinhado, o códon de iniciação

ParE	Oligonucleotídeos	Enzimas de Restrição
<i>Pichia pastoris</i> <Forward>	5'-AAAG <b>GAATTCATG</b> ACCGCCTATATACTTAC-3'	EcoRI
<i>Pichia pastoris</i> com His-tag <Reverse>	5'-AAAG <b>T<b>CGAC</b>ACT</b> TTTCGATGTTGAGCCTCT-3'	Sall
<i>Pichia pastoris</i> sem His-tag <Reverse>	5'- AAAG <b>T<b>CGACT</b>TA</b> ACTTTTCGATGTTGAGCC-3'	Sall
<i>E. coli</i> (pETDuet1) <Forward>	5'-AAAC <b>CAT<b>ATG</b></b> ACCGCCTATATACTTACAAC-3'	NdeI
<i>E. coli</i> (pETDuet1) <Reverse>	5'-AA <b>ACT<b>CGAG</b>TTA</b> ACTTTTCGATGTTGAGCC-3'	XhoI

A sequência dos genes de ParE e ParD foram obtidas pela empresa GO (GenOne), isoladas e amplificadas por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a partir do DNA genômico de *E. coli* O157. As reações de desnaturação foram realizadas em

Termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf) na condição inicial de desnaturação a 96°C por dois minutos, posteriormente 29 ciclos de 96°C por um minuto, 55°C por um minuto e 68°C por três minutos. Os produtos foram purificados utilizando o kit *GeneClean*® II (Bio 101), e posteriormente subclonados em vetor pTZ57R/T, e submetidos a sequenciamento gênico para a confirmação da sequência correta.

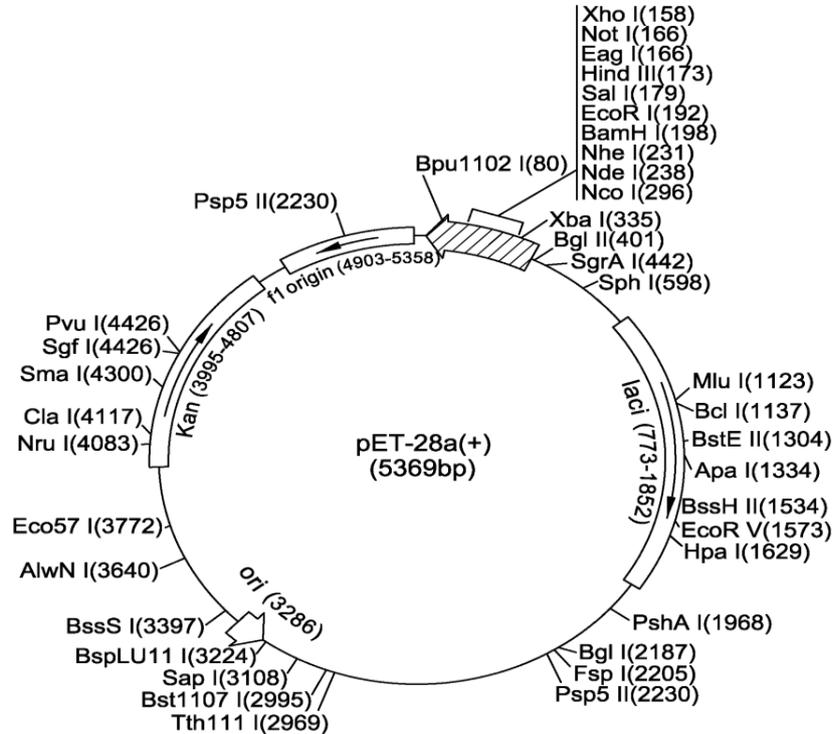
O produto da PCR foi purificado utilizando o kit *GeneClean*® II. Pipetou-se 45 µL do tampão SAM® e 10 µL da resina de precipitação de DNA sobre 10 µL da reação de PCR. Agitou-se em um Vortex por 30 minutos a temperatura ambiente e centrifugou-se por 2 minutos a 1000 g. Durante todo o procedimento, as amostras foram protegidas da luz. As amostras purificadas foram aplicadas no aparelho 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

Os insertos foram retirados do vetor pTZ57R/T por digestão com enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI* para a *parD* e *EcoRI* e *SalI* para *parE* em Buffer Tango 2x e Orange respectivamente. Assegurando assim, as condições reacionais das enzimas purificadas e ligadas ao vetor de expressão pET28A e pETDuet-1 (Figura 17) previamente digeridos com as mesmas enzimas para cada inserto correspondente. Para a ligação de *parD* em pET28a utilizou-se 7,1ng/µL de *parD*, 15,1ng/µL de pET28a, 3 µL de buffer Invitrogen®, 1 unidade (U) de enzima ligase T4 Invitrogen® e 1 µL de água totalizando 15 µL de solução final, a qual foi resfriada por 3 horas. Para *parE*, o mesmo procedimento foi adotado. Para a ligação de *parD* em pETDuet-1 utilizou-se 111 ng/µL do vetor e 7,1 ng/µL de *parD*, previamente digeridos com as enzimas citadas anteriormente.

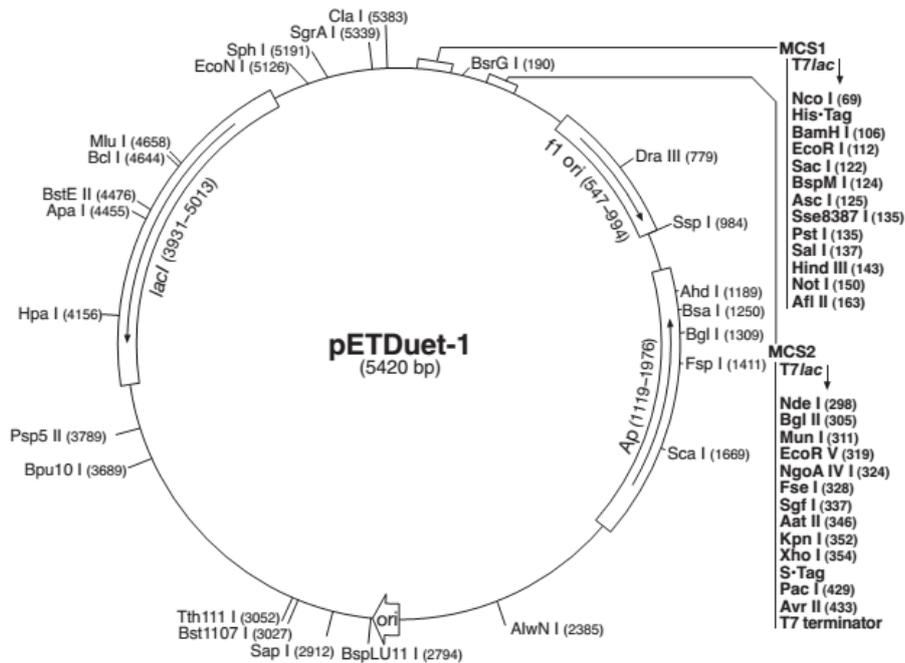
Foi realizada a transformação da construção de *parD*-pET28A, *parE*-pET28A e *parD*-pETDuet-1, adicionando-se 200 µL de células de *E.coli* DH5α e 15 µL de cada solução de ligação, homogeneizando-se lentamente. Posteriormente, cada uma das soluções foi colocada em banho de gelo por 10 minutos. Após o período, cada solução foi incubada por exatamente 90 segundos à 42°C e novamente colocadas em banho de gelo por 2 minutos. Acrescentou-se então, 800 µL de meio LB às soluções e as mesmas foram incubadas a 37°C por uma hora. As soluções contendo *parD* e *parE* em pET28a foram plaqueadas em meio contendo Kanamicina (25 ng/µL) e incubadas a 37°C *over night*.

**Figura 17-** A) Mapa do vetor pET28a utilizado para clonagem de ParD e ParE; B) Mapa do vetor pETDuet-1 utilizado para clonagem de ParD e ParE.

(A)



(B)



Fonte: Novagen (2003)

### 3.8.2 Inóculo de células

Para cada vetor utilizou-se 3 tubos com 10 mL de meio líquido LB autoclavado contendo 10 µL (25ng/L) de Kanamicina, cada. Foi retirada uma colônia de cada placa contendo os genes subclonados em pET28A e colocada em cada um dos 3 tubos. Os tubos foram agitados em um Shaker (*New Brunswick Scientific*) a 37°C *over night*.

### 3.8.3 Mini preparação plasmidal (Miniprep)

Os tubos obtidos anteriormente, foram centrifugados por 6 minutos a 4.000 rpm (Eppendorf-Centrifuge 5810R). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 500 µL do Buffer 1 do kit QIAprep® Spin Miniprep (250) e transferido para tubos tipo eppendorf. Posteriormente adicionou-se a cada tubo, 250 µL do Buffer 2, homogeneizando-os, e 350 µL do Buffer N3, repetindo o procedimento de homogeneização. Centrifugou-se a solução obtida (Eppendorf Centrifuge 5424) por 10 minutos a 13.000 rpm. Posteriormente o sobrenadante foi aplicado em uma coluna QIAprep Spin® do kit e o *pellet* desprezado. A coluna contendo a solução foi centrifugada por 1 minuto, e o filtrado desprezado. Adicionou-se 750 µL do Buffer Pe e centrifugou-se novamente desprezando-se sempre filtrado, até a retirada do excesso residual do Buffer Pe. O DNA presente na coluna foi eluído então, com 40 µL de água. Após este procedimento, realizou-se o preparo do gel de agarose para confirmar a ligação de *parD* e *parE* em pET28A.

### 3.8.4 Transformação de *parD*-pET28A em *Rosetta*

O mesmo procedimento de transformação de células competentes de *E. coli* utilizando a construção *parD*-pET28A, por choque térmico, foi utilizado para transformar as células competentes de *E. coli* da cepa *Rosetta* (DE3) pLysS.

Esta cepa é utilizada por conter lambda DE3, responsável por carregar o gene T7 RNA polimerase sob controle do promotor *lacUV5*, sendo este induzido na presença de IPTG. A presença do plasmídeo pLysS nestas linhagens aumentam a tolerância das mesmas a presença de plasmídeos contendo genes tóxicos, deixando-as mais estáveis, de forma que sejam mantidos e expressos. Este fato se

dá pela sua capacidade de inibir a expressão basal através da produção de T7 lisozima (inibidor natural de T7 RNA polimerase), o qual pode conduzir a expressão do gene mesmo na ausência do indutor. Desta forma pode-se obter maior controle sobre a expressão dos genes de interesse.

As células transformadas foram incubadas em banho a 37°C por uma hora em meio LB líquido e posteriormente plaqueadas e incubadas a 37°C *over night*.

### 3.8.5 Produção de proteínas em *E. coli*

Preparou-se, 10 mL de meio líquido LB autoclavado, contendo 25 ng/mL de Kanamicina assim como de cloranfenicol, onde foi adicionado uma colônia de células de *parD* em pET28a transformado em *Rosetta*. Posteriormente, parte deste inóculo foi transformado com a construção plasmidial *parD*-pET28A inserido em 500mL de meio LB autoclavado, e mantido sob agitação a 200 rpm a 37°C (*Shaker-New Brunswick Scientific*) até a solução atingir uma Densidade Óptica (D.O) de 0,6.

Foi coletado 200 µL desta amostra não induzida e ao restante, adicionou-se IPTG em uma concentração final de 0,4 mmol.L<sup>-1</sup> para a indução. Alíquotas de 1mL foram coletadas a cada hora (total de 4 horas) e posteriormente a solução foi incubada por 24 horas. Ao final, a solução foi centrifugada (SORVALL RC5C) a 10.000 rpm por 5 minutos a 4°C.

Ao final, retirou-se o sobrenadante, e o pellet foi ressuspensão em 25 mL de tampão de lise sem imidazol pH 8,0 (NaCl 100 mmol.L<sup>-1</sup>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mmol.L<sup>-1</sup>, Tris 10 mmol.L<sup>-1</sup>). Posteriormente, estas células foram lisadas em sonicador em 8 repetições de 59,9 segundos, com intervalos de 30 segundos à uma amplitude de 14%, utilizando o sonicador Sonic Desmembrator 500 (Fisher Scientific).

Em seguida, o produto de lise celular foi novamente centrifugado a 10.000 rpm a 4°C por 15 minutos em centrífuga Sorvall RC-5C Plus para separação das frações solúveis e insolúveis de proteínas, sendo coletados 500 µL de sobrenadante e 500 µL do precipitado ressuspensão em 5 mL de tampão de lise pH 8,0, os quais foram utilizados para posterior análise em um teste de solubilidade em SDS-PAGE 15%.

### 3.8.6 Purificação de proteínas em *E. coli*.

A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade utilizando uma coluna com resina de níquel “Ni-NTA Superflow” (Qiagen). O processo de purificação por afinidade nesta coluna se baseia na ligação entre a proteína alvo e o ligante imobilizado na resina. A proteína ParD recombinante expressa em pET28a possui em sua região N-terminal uma cauda com 6 histidinas, as quais possuem um anel de imidazol com afinidade pelo ligante imobilizado na coluna, o Ni-NTA (níquel – ácidonitrilacético).

Este procedimento implica em uma forte ligação da proteína recombinante na coluna e que permite a sua purificação em uma única etapa. Para a eluição da proteína foi utilizado tampão de lise pH 8,0 com crescentes concentrações de imidazol (10, 25, 50, 75, 100 e 250 mmol.L<sup>-1</sup>), o qual compete com a proteína pela ligação ao ligante na coluna, liberando a proteína na forma pura. Em seguida estas frações foram analisadas em SDS-PAGE 15% e as correspondentes à proteína pura foram submetidas à diálise em membranas de celulose (Pierce SnakeSkin™ 3,500 MWCO) em tampão PBS pH 8,0 (NaCl 137 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl 2,7 mmol.L<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mmol.L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mmol.L<sup>-1</sup>), sendo realizadas 3 trocas de tampão em uma proporção de proteína – tampão de 1:1000 (V/V). O processo ocorreu sob agitação suave a 4 °C por aproximadamente 20 horas. Após o processo de diálise a proteína foi filtrada em filtros com porosidade de 0,22 µmol.L<sup>-1</sup> (Milipore) e quantificada pelo método do ácido bicinônico (BCA) (WALKER, 1994) utilizando o kit BCA protein assay reagent (Thermo Scientific).

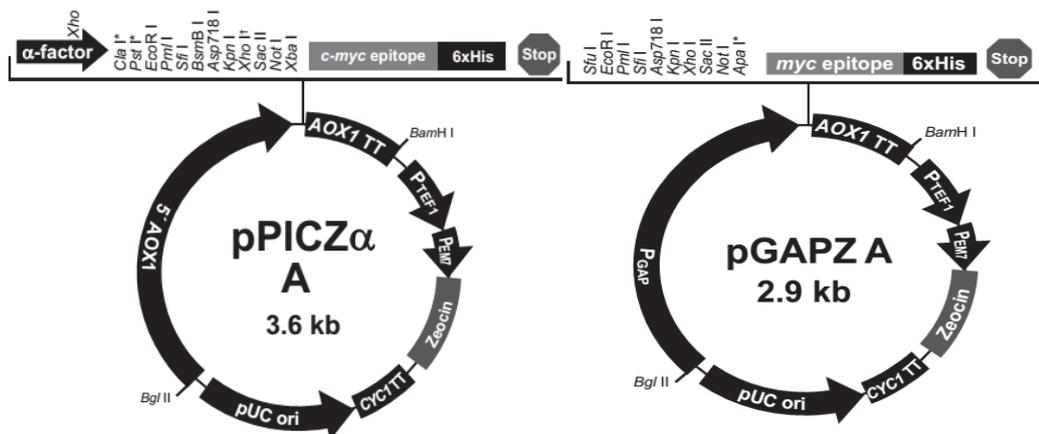
### 3.8.7 Subclonagem de *parE* em pPICZαA e pGAPZαA

Os insertos foram retirados do vetor pTZ57R/T por digestão com enzimas de restrição EcoR1 e Sall em Buffer Orange (Fermentas®), assegurando as condições reacionais das enzimas purificadas e ligadas ao vetor de expressão pPICZαA e pGAPZαA (Figura 18) previamente digeridos com as mesmas enzimas. Utilizou-se 2 µL de *parE* (20 ng/ µL), 1,5 µL de pPICZαA (150 ng/ µL), assim como para pGAPZαA (170ng/ µL), 2 µL de buffer Invitrogen®, 1,5 U de enzima ligase T4 Invitrogen® e 3 µL de água totalizando 10 µL de solução final, a qual foi incubada *over night*.

Foi realizada a transformação das construções *parE*-pPICZ $\alpha$ A e *parE*-pGAPZ $\alpha$ A, adicionando-se 200  $\mu$ L de células de *E.coli* DH5 $\alpha$  e aproximadamente 90 ng de cada um dos plasmídeos, homogeneizando-se lentamente. Posteriormente, cada uma das soluções foi colocada em banho de gelo por 10 minutos. Após o período, cada solução foi incubada por exatamente 90 segundos à 42°C e novamente colocadas em banho de gelo por 2 minutos. Acrescentou-se então, 800  $\mu$ L de meio LB às soluções e as mesmas foram incubadas a 37°C por uma hora. As soluções foram plaqueadas em meio contendo Zeocina e incubadas a 37°C *over night*.

Os processos de inóculo de células e mini preparação plasmidial e PCR (para confirmar a presença do inserto no plasmídeo) já mencionados anteriormente foram realizados, utilizando, no entanto, Zeocina como antibiótico no primeiro processo.

**Figura 18** - Mapa dos vetores pPICZA e pGAPZA utilizados para clonagem de ParE



Fonte: INVITROGEN 2010.

### 3.8.8 Preparação do DNA para transformação em *P. pastoris*

Aproximadamente 70 ng do plasmídeo pGAPZ $\alpha$ A contendo o gene de *parE* foi linearizado por digestão com a enzima XMI (AVRII). Este processo foi confirmado por eletroforese em gel de agarose.

Após a confirmação da linearização realizou-se precipitação da solução utilizando 5  $\mu$ L de acetato de sódio à 3 mol.L<sup>-1</sup> pH 5,2 e 125  $\mu$ L de etanol 100%. A solução foi homogeneizada e incubada à -80°C em um período de 15 minutos

subsequentemente centrifugada a 16.000 RCF por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi lavado com 500 µL de etanol 80% e novamente centrifugado nas condições anteriores. O sobrenadante foi desprezado e o pellet, após secar em temperatura ambiente, foi ressuspenso em 10 µL de água.

### 3.8.9 Produção de células competentes de *P. pastoris*

Células competentes de *P. pastoris* cepa KM71H foram produzidas de acordo com a metodologia de Cregg e colaboradores (1993). Foi realizado um pré-inóculo com esta cepa em 5 mL de meio YPD em um erlenmeyer de 250 mL e incubado a 30°C sob agitação de 250 rpm. Após 8 horas foi adicionado 50 µL do pré-inóculo em 50 mL de YPD e novamente incubado às condições anteriores (*over night*). A densidade óptica foi medida a 600 nm podendo variar entre 1 e 1,5.

A solução foi dividida em dois frascos, cada um contendo 25 mL, e as células foram então centrifugadas (Sorvall) a 1.500 RCF durante 5 minutos à 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em 5 mL de uma solução contendo YPD e HEPES 1 mol.L<sup>-1</sup>, posteriormente foi adicionado 125 µL de DTT 1 mol.L<sup>-1</sup>, homogeneizado e incubado à 30°C por 15 minutos. Adicionou-se a cada tubo Falcon, 25 mL de água gelada repetindo o processo de centrifugação citado anteriormente neste protocolo. Posteriormente, este processo foi repetido utilizando 12,5 mL de água seguidos do processo centrifugação. As etapas posteriores consistiram no mesmo procedimento anterior, no entanto, utilizou-se 1 mL de sorbitol 1 mol.L<sup>-1</sup> gelado e novamente com 50 µL de sorbitol 1 mol.L<sup>-1</sup> gelado. Ao final desta etapa foram feitas alíquotas de 40 µL de células para a transformação.

### 3.8.10 Transformação de *P. pastoris* por eletroporação

O DNA linearizado (20 µg) foi adicionado às células competentes, homogeneizados suavemente e incubados por 5 minutos no gelo. As células foram eletroporadas nas seguintes condições: cubetas de 0,2 cm (BioRad) capacitância de 25 µF, resistência mínima de 200Ω, resistência máxima de 600Ω e voltagem de 1,5KV. Adicionou-se às células 1 mL de sorbitol 1 mol.L<sup>-1</sup> (JT Baker), a qual, foram incubadas por 2 horas a 25°C sem agitação.

As células recombinantes foram selecionadas em 3 placas de YPDS contendo antibiótico Zeocina<sup>TM</sup> em diferentes concentrações (1% e extrato de levedura, 2% de peptona, 2% dextrose, 1 mol.L<sup>-1</sup> de sorbitol, 2 % de ágar, 100 µg/mL; 300 µg/mL; 500 µg/mL de Zeocina). Após 4 dias de incubação, as colônias com os supostos recombinantes foram isoladas e submetidas a análise de PCR.

Para a análise do fenótipo das colônias crescidas, selecionaram-se colônias de cada placa e realizou-se uma PCR com os *primers* 3'AOX1 com  $\alpha$ -factor e 5'AOX1 para a confirmação do inserto. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose e corados com brometo de etídeo.

Dentre as colônias recombinantes, 23 foram avaliadas através de um processo de indução da expressão em pequena escala em uma placa de 24 poços (*screening*) contendo 2 mL de YPD sob agitação (250 rpm) à 29°C. E um dos poços foi inoculado um clone como controle positivo. Foram coletadas alíquotas de 200 µL a cada 24 horas até serem completadas 96 horas de indução. Os intervalos foram analisados em gel de SDS-Page, e o clone selecionado para produção em maior escala, foi o que aparentemente apresentou maior produção.

#### 3.8.11 Produção e purificação de proteínas recombinantes

Para a tentativa de produção de ParE em maior escala, retirou-se uma pequena quantidade de massa celular da placa a qual a colônia foi selecionada e crescida em 10 mL de meio YPD, sob agitação de 250 rpm à 29°C. Posteriormente, utilizou-se 200 µL desta solução para inocular em 200 mL de meio YPD, por 96 horas a 29°C, sob agitação de 250 rpm.

Após o processo de indução, a cultura foi centrifugada a 20°C por 5 minutos a 3000 g, o sobrenadante foi retirado e filtrado em membrana de nitrocelulose 0,45 µm (Millipore) e purificada por cromatografia de afinidade utilizando uma coluna carregada com 3 mL de resina *Ni-NTA Superflow* (Qiagen).

### 3.9 Cromatografia de Afinidade

A coluna utilizada para os ensaios de cromatografia de afinidade foi preparada através da imobilização da sequência ParEAC2C, em uma resina EAH-Sepharose, seguindo as especificações do fabricante e previamente preparada pela

introdução do espaçador ácido  $\epsilon$ -maleimidocapróico (MARCHETTO et al., 2001). Resumidamente, 2 mL de EAH-Sepharose 4B foram colocadas para reagir com 80 mg do ácido  $\epsilon$ -maleimido-capróico e 70 mg da carbodiimida hidrossolúvel EDC, em 3 mL de uma mistura contendo água:etanol (2,5:1,5), ajustando o pH para 4,5, por um período de 20 horas à temperatura ambiente. Após este período, a resina foi recolhida em uma seringa de polipropileno, contendo um filtro de polietileno poroso, e lavada sucessivamente (6 X 10 mL cada) com: mistura água:etanol (1:1); água; tampão acetato pH 4,0; água; tampão Tris.HCl 10 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 8,0 (NaCl 50 mmol.L<sup>-1</sup>); água; etanol e novamente água. A resina foi então acetilada, adicionando-se 2 mL de ácido acético 1 mol.L<sup>-1</sup> e 190 mg de EDC, por um período de 2 horas, ou até teste de ninidrina se apresentar negativo e confirmar a ausência de grupos aminas primárias livres. A resina assim obtida foi dividida em frações para o preparo de duas colunas (1mL cada), sendo uma delas utilizada como controle negativo.

Assim, uma coluna, foi empacotada com 1 mL de resina, lavada e equilibrada em tampão fosfato pH 7,8. Adicionou-se cerca de 3 mg do peptídeo ParEAC2C (Figura 15) dissolvido em tampão fosfato pH 7,8. Deixou-se sob agitação por um período de 20 horas. Após esse período, lavou-se exaustivamente a resina com tampão fosfato, água e finalmente tampão Tris.HCl 10 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,2 (20 mmol.L<sup>-1</sup> de NaCl). Repetiu-se o procedimento por 3 vezes, reutilizando os peptídeos recuperados no processo de filtração. Uma alíquota de cada uma das amostras foi retirada e liofilizada, para análise de aminoácidos.

Uma solução de ParDTB1 536  $\mu$ mol.L<sup>-1</sup> (500  $\mu$ L), foi inserida na coluna e após 1 hora de contato à temperatura ambiente, foi eluído da coluna através de lavagens sucessivas com tampão de eluição (Tris.HCl 10 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0), até que as frações recolhidas não apresentassem mais emissão de fluorescência a 360 nm (excitação a 280 nm). A eluição de ParDTB1 retido na coluna, foi realizada com NaCl (soluções tamponadas 0,4 e 4 mol.L<sup>-1</sup>), sendo feita a troca de soluções somente após a estabilização das leituras de fluorescência (excitação a 280 nm e emissão a 360 nm). Ao final a coluna foi reequilibrada com o tampão de eluição.

Este procedimento foi repetido para as demais soluções de ParDTB3 (690  $\mu$ mol.L<sup>-1</sup>), ParDTB5 (445  $\mu$ mol.L<sup>-1</sup>) e ParDTB6 (458  $\mu$ mol.L<sup>-1</sup>). Para estudos envolvendo a antitoxina ParD, uma solução estoque da proteína, a 34 mmol.L<sup>-1</sup> foi utilizada.

### 3.10 Estudos de Fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é uma das principais técnicas aplicadas em estudos com proteínas e peptídeos, mais especificamente em análises estruturais, conformacionais e de interações com outros tipos de estruturas moleculares. Isto se deve à sensibilidade da técnica e da favorável escala de tempo do fenômeno da fluorescência. Essa técnica baseia-se na propriedade de certos grupos químicos, denominados cromóforos, de absorver e emitir radiação eletromagnética (CAIRES, 2014).

A fluorescência de peptídeos e proteínas deve-se a presença de fluoróforos naturais, mais especificamente os resíduos de aminoácidos aromáticos triptofano (W) e tirosina (Y), que absorvem luz na faixa espectral de ultravioleta. A fenilalanina (F) também apresenta fluorescência, mas possui um rendimento quântico muito baixo e, por isso, sua emissão é raramente observada. Os espectros de emissão de proteínas e peptídeos são sensíveis à interação com substratos, reações de associação e desnaturação. Geralmente são excitados a 280 nm, devido à absorção dos resíduos de triptofano e tirosina, entretanto, a emissão de cada um dos aminoácidos ocorre em comprimentos de onda diferenciados, como por exemplo, 303-305 nm para o resíduo de Tyr e 345-360 nm para o resíduo de Trp. Pequenas variações nestes valores máximos podem ser observadas em razão da variação das propriedades de transmissão dos componentes ópticos dos diferentes instrumentos empregados na análise (CAIRES, 2014).

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

O fenômeno de supressão intermolecular da fluorescência está relacionado a qualquer processo que resulte na diminuição da intensidade de fluorescência da substância analisada (fluoróforo). Esta diminuição pode estar relacionada com a ocorrência de dois tipos de processos, dinâmico ou estático, ambos dependentes do

contato molecular entre o fluoróforo e o agente supressor. No caso do processo dinâmico, também conhecido como supressão colisional, o supressor deve colidir com o fluoróforo durante o tempo de vida do estado excitado. Com o contato, o fluoróforo volta ao estado padrão, sem a emissão de fóton. Já no processo estático, um complexo é formado entre o fluoróforo e o supressor, e o mesmo não apresenta fluorescência e o tempo de vida no estado excitado não é afetado (HOLLER *et al.*, 2009). A ocorrência de supressão depende do mecanismo envolvido, que por sua vez depende da estrutura das moléculas individuais.

Neste contexto, a supressão de fluorescência do peptídeo sintético derivado da toxina ParE (ParEAC2), pelos peptídeos análogos ParDTB1, ParDTB3, ParDTB5 e ParDTB6 foi determinada como uma função da concentração de cada um deles.

Para este procedimento, alíquotas (2 – 30  $\mu\text{L}$ ) de uma solução estoque de ParDTB1 (536  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), ParDTB3 (690  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), ParDTB5 (445  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) ou ParDTB6 (458  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), foram adicionadas a uma solução 25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de ParEAC2 (400  $\mu\text{L}$ ) em tampão padrão (Tris.HCl 10  $\text{mmol.L}^{-1}$ , pH 7,2 / NaCl 20  $\text{mmol.L}^{-1}$  /  $\text{MgCl}_2$  5  $\text{mmol.L}^{-1}$ ), à 25°C. Antes da medida da fluorescência, as amostras foram homogeneizadas e equilibradas no suporte de cubeta com o obturador de excitação fechado. O comprimento de onda de excitação foi de 280 nm, com a emissão medida a 360 nm.

No intuito de se evitar a contribuição dos análogos de ParD, que apresentam igualmente um resíduo de triptofano, nas medidas de fluorescência de ParEAC2, ensaios paralelos foram executados, nas mesmas condições anteriores, porém na ausência de ParEAC2. Os valores de emissão intrínseca de cada análogo de ParD, na região de análise, foram então utilizados na correção da emissão de fluorescência de ParEAC2, subtraindo a fluorescência obtida na ausência dos análogos peptídicos dos valores de fluorescência na presença dos mesmos, obtidos após a adição de cada alíquota.

Nos estudos envolvendo a antitoxina ParD, uma solução estoque da proteína, a 34  $\text{mmol.L}^{-1}$  foi utilizada. Alíquotas (2 a 30  $\mu\text{L}$ ) de ParEAC2 (314  $\text{mmol.L}^{-1}$ ) foram então adicionadas e a fluorescência medida a 350 nm, com excitação a 280 nm.

A intensidade de fluorescência observada, em todas as condições, foi corrigida para perda de sinal devido ao efeito de diluição e por efeito de filtro óptico (BORISSEVITCH, 1999).

Os dados extraídos das análises de fluorescência foram representados em gráficos de Stern-Volmer, de forma que a variação da fluorescência relativa de ParEAC2 ( $F_0/F$ ) foi avaliada em função da concentração de cada um dos análogos de ParD (Q). No caso da proteína ParD, a variação da fluorescência relativa da proteína foi avaliada em função da concentração de ParEAC2.

As constantes de supressão para cada ensaio foram determinadas a partir do coeficiente angular da curva descrita pela equação abaixo.

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

Nesta equação,  $F_0$  e  $F$  representam a intensidade de fluorescência do peptídeo ParEAC2 ou da antitoxina ParD, na ausência e na presença dos análogos de ParD ou ParEAC2, respectivamente,  $K_{sv}$  representa a constante de supressão e  $Q$  a concentração dos peptídeos adicionados (LAKOWICZ, 2006).

## 4 Resultados e Discussão

### 4.1 Estudos Computacionais

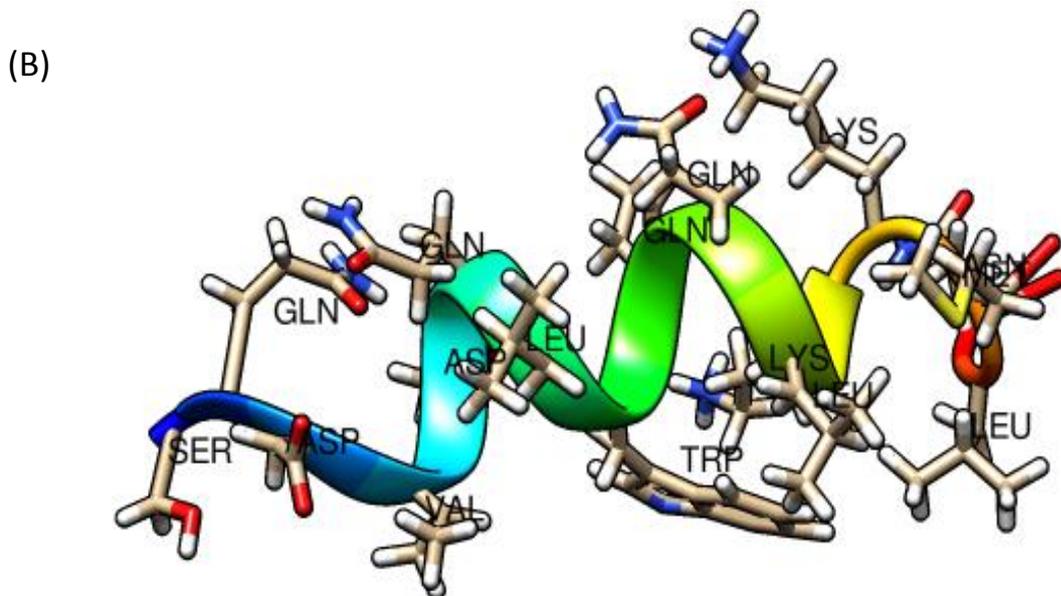
Através de estudos computacionais, foram realizadas na sequência de ParD um estudo *in silico*, investigando modelos estruturais para analisar as interações e, a partir disto, propor mutações para a obtenção de novas sequências de resíduos de aminoácidos. Desta forma, foram realizadas etapas de geração de modelos estruturais, docking entre os modelos de ParE e ParD, avaliação dos complexos através de análise da superfície acessível ao solvente, dinâmica molecular com arrefecimento simulado (*simulated annealing*) e estudo de escaneamento de alanina (*alanine scanning*). Estes sucessivos estudos sugeriram que as interações entre ParD e ParE podem ocorrer principalmente através de suas interfaces hidrofóbicas. Desta forma, foram identificadas sequências de novos análogos da antitoxina (sequências mutadas) capazes de apresentar interações mais favoráveis com ParE do que a proteína nativa.

A modelagem molecular destes peptídeos foi realizada inicialmente pelo servidor, I-TASSER (ROY et al., 2010), que faz parte dos melhores servidores para geração de modelos de proteína segundo o CASP (Critical Assessment of Protein Structure Prediction (MOULT et al., 2014). Foram geradas mutações na sequência de aminoácidos (D39 – G54) produzindo as sequências peptídicas ilustradas na Figura 19. Os melhores complexos com ParE, foram submetidos a simulações de dinâmica molecular, avaliando os clusters de conformações e submetendo os melhores a estudos de AS.

**Figura 19** A) Sequências de aminoácidos de análogos da antitoxina ParD obtidas por modelagem molecular. B) Estrutura de peptídeo análogo da proteína ParD predito por modelagem molecular (ParDTB1 - sequência em destaque).

(A)

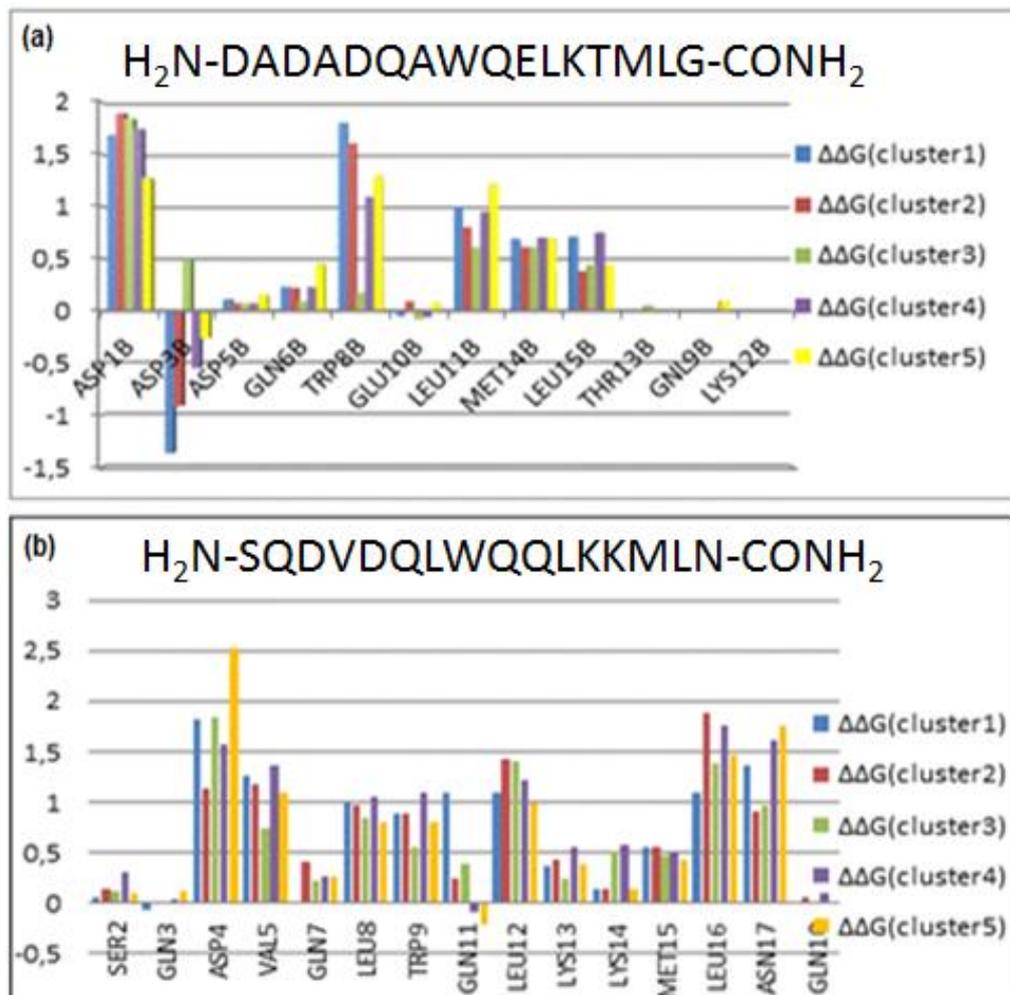
<b>ParDTB1</b>	<b>SQDVDQLWQQLKKMLN</b>	<b>ParDTB5</b>	SKVLTQLWQQLKKMLN
<b>ParDTB2</b>	SQDVTELWQQLKKMLN	<b>ParDTB6</b>	SKNLTQLWQQLKKMLN
<b>ParDTB3</b>	SQNVTQLWQQLKKMLN	<b>ParDTB7</b>	SHDLTQLWQQLKKMLN
<b>ParDTB4</b>	SHDLTQLWQQLKKMLN	<b>Original</b>	DADADQAWQELKTMGLG



**Fonte:** Elaborado pela autora.

As interações resultantes do processo de simulação de dinâmica molecular podem ser analisadas através dos perfis de variação da diferença de energia livre de Gibbs ( $\Delta\Delta G$ ) obtidos para cada resíduo, através do estudo de AS. Na Figura 20 são apresentados os resultados de um estudo de AS para a região original de ParD (a) e do análogo ParDTB1 (b). Os resíduos localizados na interface do complexo gerado através do procedimento de docking foram avaliados utilizando o servidor DrugScorePPI. A mesma abordagem foi realizada para as demais sequências.

**Figura 20** - Perfis de diferença de variação da energia livre Gibbs ( $\Delta\Delta G$ ) obtidos para os resíduos da interface localizados na região 39-54 de (a) ParD original docada com ParE e (b) do peptídeo ParDTB1 mutado *in silico* e submetido ao mesmo estudo (complexo com ParE). Variações negativas indicam que o resíduo influencia de forma desfavorável no processo de interação e, portanto, constituem sítios apropriados para introduzir mutações que podem melhorar o processo de interação na interface das proteínas. Variações positivas indicam que o resíduo é importante para a interação observada no complexo formado.



**Fonte:** Elaborado pela autora

Estes resultados sugerem que haveria uma energia maior de interação entre as sequências peptídicas mutadas, propostas através deste estudo de modelagem molecular, do que a sequência nativa da proteína ParD. Desta forma, estas sequências foram escolhidas para serem sintetizadas e submetidas aos ensaios experimentais.

## 4.2 Síntese e purificação dos peptídeos

Após a etapa de planejamento e desenho da estrutura primária dos peptídeos análogos de ParD, os mesmos foram sintetizados manualmente pela metodologia da fase sólida de acordo com o protocolo padrão da estratégia Fmoc/tBu, seguindo as etapas descritas em Materiais e Métodos. As sequências ParDTB1 e ParDTB5 (Figura 14), foram sintetizadas utilizando como suporte, uma resina Rink amida, a qual resulta em peptídeos com um grupamento amida na extremidade C-terminal após a clivagem final, e mimetizar uma ligação peptídica nesta região.

Deste modo, partindo-se de 1g da resina Rink-amida (0,52 mmol/g), iniciou-se a síntese das sequências ParDTB1 e ParDTB5, pelo acoplamento dos 11 primeiros resíduos, comuns às duas sequências. Após a síntese do hendecapeptídeo, interrompeu-se o processo de síntese, realizou-se a desproteção e procedeu-se com a lavagem e secagem da peptidil-resina, obtendo-se ao final 2,230 g.

Em seguida, esta massa de peptidil-resina, foi dividida em duas partes aproximadamente iguais, prosseguindo-se com a síntese dos respectivos peptídeos, obtendo-se ao final 1,268 g de ParDTB1-resina e 1,332 g ParDTB5-resina.

Para os peptídeos ParDTB3 e ParDTB6, cujas sequências foram planejadas de modo a manter o resíduo de asparagina C-terminal com o grupo carboxílico livre, utilizou-se como suporte de partida, uma resina de Wang contendo Fmoc-Asn(trt) pré-incorporado.

Neste caso, partindo-se de 1g de Fmoc-Asn(trt)-Wang resina (0,62 mmol/g), iniciou-se a síntese, até o acoplamento dos 12 primeiros resíduos comuns às duas sequências. Interrompeu-se o processo de síntese, realizou-se a desproteção, seguida da lavagem e secagem da peptidil-resina, obtendo-se ao final 2,532 g.

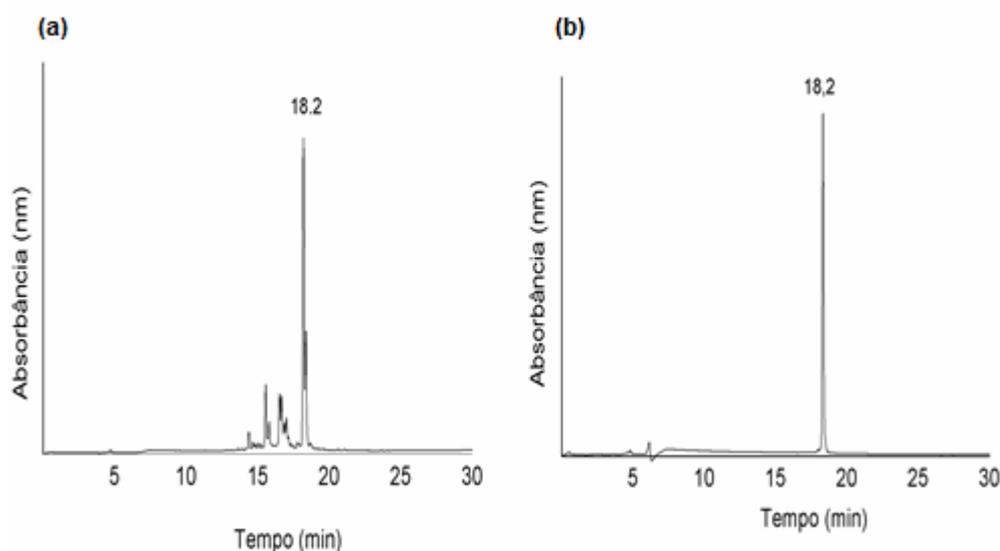
Em seguida esta massa foi dividida em duas partes de massa aproximadamente iguais, prosseguindo com a síntese, pelo acoplamento dos resíduos de aminoácidos específicos de cada sequência, tendo sido obtido ao final, 1,652 g de ParDTB3-resina e 1,549 g ParDTB6-resina.

Em todos os peptídeos, a região N-terminal foi acetilada empregando anidrido acético após o término da síntese. Isto foi necessário para mimetizar a ligação peptídica na região, visto que em todos os peptídeos, o resíduo da extremidade N-terminal corresponde a um resíduo interno da sequência da antitoxina.

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

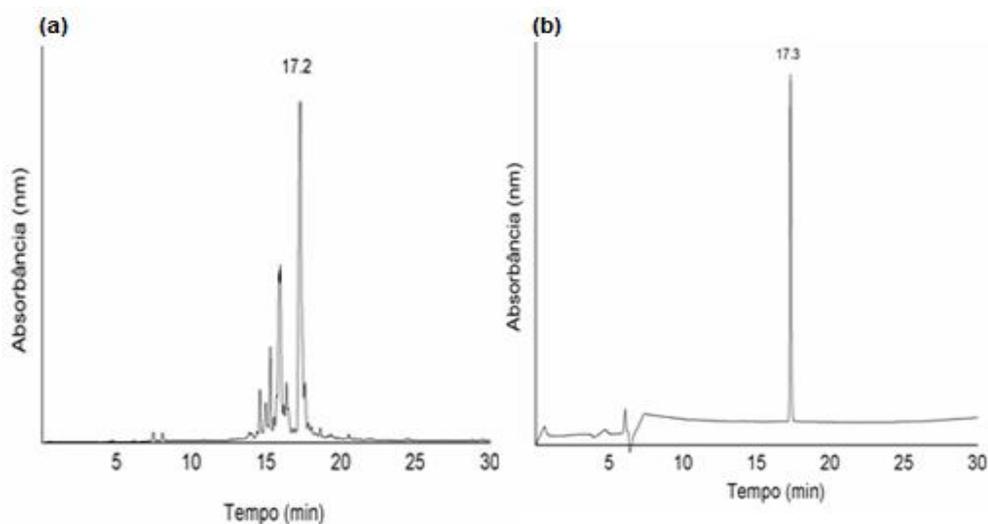
Após as etapas de síntese, clivagem e liofilização, uma pequena quantidade de cada peptídeo liofilizado (aproximadamente 1 mg) foi dissolvida em 1 mL de água ultrapura, filtrada e submetida à análise qualitativa por CLAE, como descrito em Materiais e Métodos. De acordo com os resultados encontrados a partir desta análise, obteve-se o tempo de retenção e a porcentagem de solvente para cada peptídeo, assim foram definidas as condições relativas e as concentrações de solvente para cada purificação em escala semi-preparativa. As frações provenientes do processo de purificação foram submetidas novamente a análises por CLAE em modo analítico. O conteúdo dos tubos denominados puros foi reunido e liofilizado. Posteriormente foram analisados por CLAE em modo analítico para confirmação da pureza. O perfil de cada peptídeo análogo de ParD bruto e puro estão representados de forma comparativa, nas Figuras de 21 a 24.

**Figura 21-** Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo **ParDTB1** antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa C18 Shimadzu (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5-95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1 ml/min e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter C18 (250 x 10 mm; 10µm; 300 Å) com um gradiente linear de 30 – 60% de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,036% TFA), em 120 minutos, fluxo de 3,0 mL/min e detecção a 220 nm.



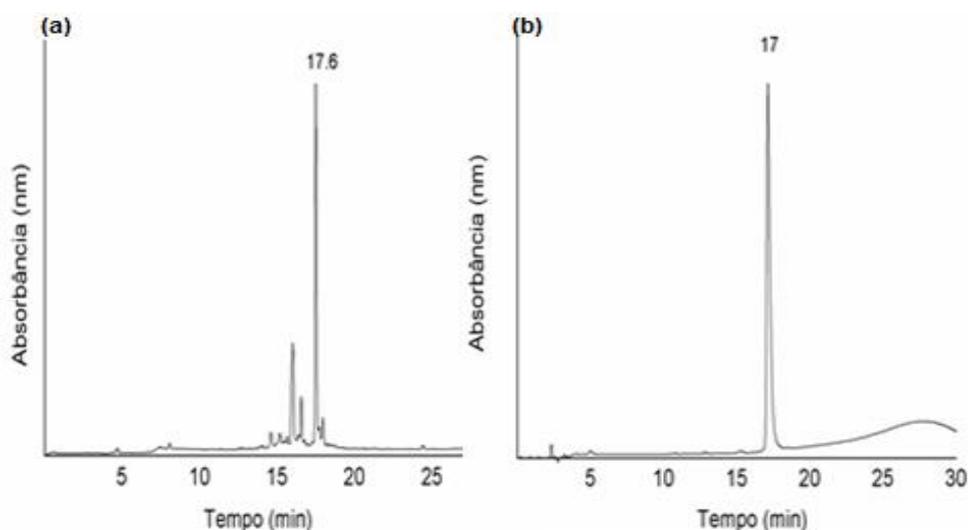
**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Figura 22** - Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo **ParDTB6** antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa C18 Shimadzu (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5-95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1 ml/min e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter C18 (250 x 10 mm; 10µm; 300 Å) com um gradiente linear de 30 – 60% de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,036% TFA), em 120 minutos, fluxo de 3,0 mL/min e detecção a 220 nm.



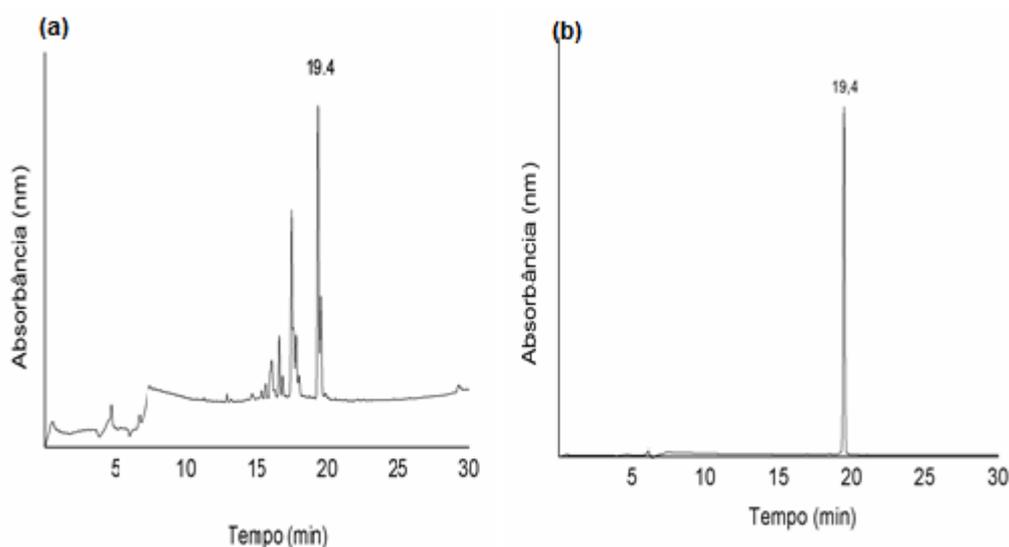
**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Figura 23** - Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo **ParDTB3** antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa C18 Shimadzu (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5-95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1 ml/min e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter C18 (250 x 10 mm; 10µm; 300 Å) com um gradiente linear de 30 – 60% de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,036% TFA), em 120 minutos, fluxo de 3,0 mL/min e detecção a 220 nm.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Figura 24-** Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo **ParDTB5** antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa C18 Shimadzu (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5-95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1 ml/min e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter C18 (250 x 10 mm; 10µm; 300 Å) com um gradiente linear de 30 – 60% de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,036% TFA), em 140 minutos, fluxo de 3,0 mL/min e detecção a 220 nm; posteriormente, Coluna de fase reversa C18 Shimadzu (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å), com um gradiente linear de 30-60% de componente orgânico, em 60 min, fluxo de 1 mL/min e detecção a 220 nm.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

Pode-se observar que os perfis cromatográficos dos peptídeos puros apresentaram um único pico em relação aos perfis cromatográficos dos peptídeos brutos. O parâmetro tempo de retenção dos peptídeos puros foi praticamente mantido em relação ao pico correspondente no extrato bruto, e a pureza relativa demonstra que os métodos utilizados foram adequados.

Na síntese do peptídeo ParEAC2 (Figura 15) foi utilizado o mesmo protocolo utilizado para os análogos de ParD, diferenciando-se na resina de partida que foi uma Rink Amida MBHA com grau de substituição de 0,59 mmol/g. O uso desta resina, resulta em peptídeos com um grupamento amida na extremidade C-terminal após a clivagem final. Isso foi necessário para mimetizar a ligação peptídica nesta região, pois nestes peptídeos o resíduo da extremidade C-terminal corresponde a

um resíduo interno da sequência da toxina. Neste peptídeo, assim como para os análogos de ParD, a região N-terminal foi acetilada com o anidrido acético após o término da síntese. Este procedimento foi necessário também para mimetizar a ligação peptídica na região, visto que em todos os peptídeos o resíduo da extremidade N-terminal corresponde a um resíduo interno da sequência da toxina.

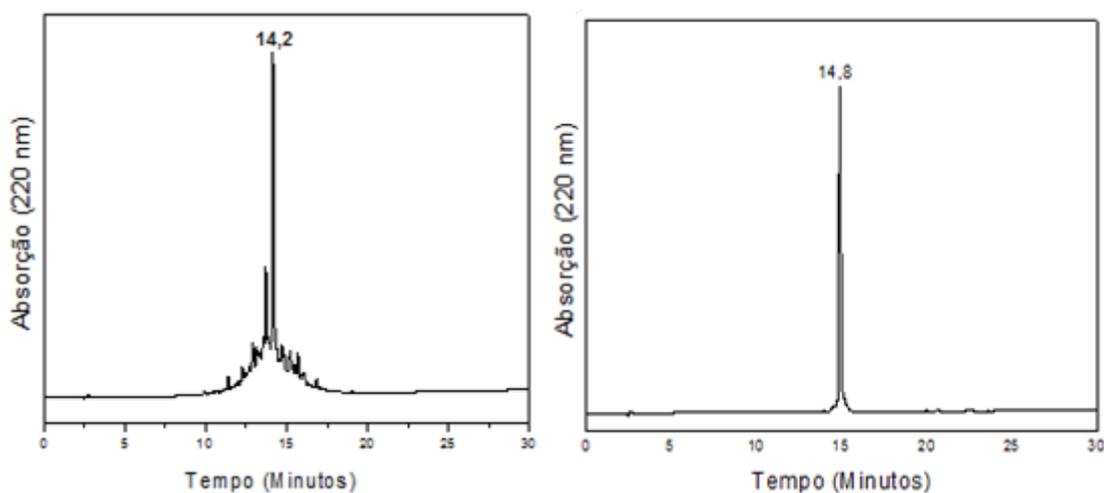
Assim, empregando-se 400 mg desta resina, partiu-se para síntese da sequência ParEAC2, obtendo-se ao final, 850 mg da respectiva peptidil-resina.

Uma porção de aproximadamente 350 mg da peptidil-resina obtida, foi utilizada, para acoplamento de um resíduo de cisteína na extremidade N-terminal, de forma a obter a sequência ParEAC2C (Figura 15), para ser empregada nos ensaios de cromatografia de afinidade.

Após a etapa de síntese, clivagem e liofilização, assim como no caso dos análogos de ParD, uma pequena quantidade de cada peptídeo liofilizado (aproximadamente 1 mg) foi dissolvida em 1 mL de água ultrapura, filtrada e submetida à análise qualitativa por CLAE, como descrito em Materiais e Métodos. A partir dos resultados de tempo de retenção e porcentagem de solvente obtidos nestas análises, foram definidas as condições relativas à concentração de solvente para purificação dos peptídeos em escala semi-preparativa. As frações provenientes do processo de purificação foram analisadas por CLAE em modo analítico. O conteúdo de cada tubo que apresentou o perfil desejado, foi unido e liofilizado. Posteriormente, uma amostra foi submetida novamente à análise em CLAE para confirmar sua pureza. Os perfis cromatográficos de ParEAC2 e ParEAC2C, antes e após a purificação estão representados nas Figuras 25 e 26, respectivamente.

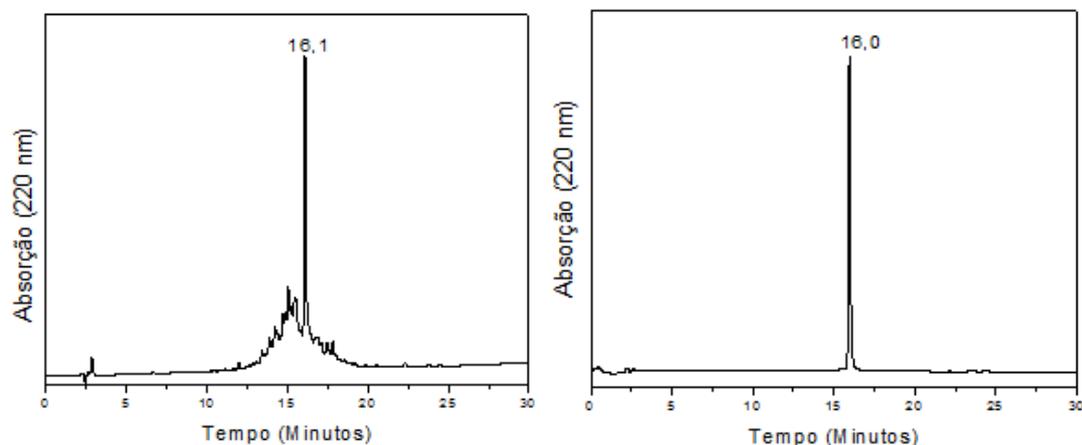
Para ParEAC2 e ParEAC2C também é possível observar que os perfis cromatográficos das frações puras apresentaram um único pico em relação ao perfil cromatográfico do peptídeo bruto. Novamente, o parâmetro tempo de retenção do peptídeo puro foi praticamente mantido em relação ao pico correspondente no extrato bruto, e a pureza relativa demonstra que os métodos utilizados foram adequados.

**Figura 25** - Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo ParEAC2 antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa C18 Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5-95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1 ml/min e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter C18 (250 x 10 mm; 10 µm; 300 Å) com um gradiente linear de 20-60% de componente orgânico (acetoneitrila; água; 0,036% TFA), fluxo de 3,0 mL/min e detecção a 220 nm.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Figura 26** - Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo ParEAC2C antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa C18 Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5-95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1 ml/min e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter C18 (250 x 10 mm; 10 µm; 300 Å) com um gradiente linear de 20-60% de componente orgânico (acetoneitrila; água; 0,036% TFA), fluxo de 3,0 mL/min e detecção a 220 nm.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

### 4.3 Espectrometria de massas

A caracterização dos peptídeos sintetizados foi realizada através de ensaios de espectrometria de massas. Os valores de massa molecular obtidos no modo electrospray positivo [ES m/z: (M + H)<sup>+</sup>], estão apresentados na Tabela 4.

Os resultados foram coincidentes com o teórico esperado, confirmando a identidade das estruturas peptídicas sintetizadas. O conjunto de resultados, permite concluir que os procedimentos utilizados para síntese, clivagem de peptidil-resina e metodologias de purificação desenvolvidas foram adequados, levando à obtenção das sequencias desejadas.

**Tabela 4** - Resultado das análises de espectrometria de massas.

Peptídeo	Massa Molecular (g/mol)	ES+	ES m/z (MM)
ParDTB1	2.015,30	+2 +3	1009,1 673,0
ParDTB3	2.001,31	+2 +3	1001,5 668,0
ParDTB5	1.999,43	+2 +3	1000,6 667,4
ParDTB6	2.015,38	+2 +3	1008,5 672,7
ParEAC2	4.426,03	+6 +5 +4	738,5 886,0 1.107,2
ParEAC2C	4.529,11	+6 +5 +4	755,9 906,9 1.133,3

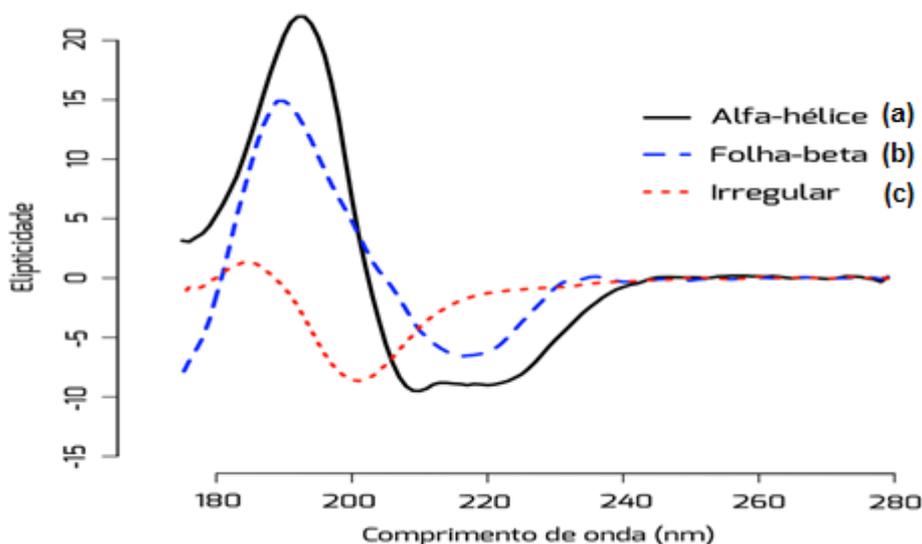
### 4.4 Dicroísmo Circular

Os resultados das análises de CD correspondem às únicas informações sobre estrutura secundária para os peptídeos sintetizados e foram utilizados para correlacionar com os dados obtidos por métodos computacionais.

As análises foram realizadas conforme descrito na metodologia. Utilizou-se como referência para a análise dos espectros, a Figura 27, que mostra as diferentes

formas de espectros de CD, que são referentes às possíveis estruturas secundárias de proteínas. A curva (a) representa o espectro característico de estrutura tipo alfa-hélice, apresentando duas bandas negativas, uma em torno de 208 nm e outra em torno de 222 nm e, uma banda positiva em torno de 198 nm. A curva (b) representa o espectro característico de estrutura tipo folha- $\beta$  e apresenta uma banda positiva em torno de 196 nm e outra negativa em torno de 218 nm. Já a curva (c) representa o espectro característico de estrutura desordenada, apresentando uma banda negativa com mínimo em torno de 200 nm.

**Figura 27** - Espectro de Dicroísmo Circular de estruturas secundárias de proteínas

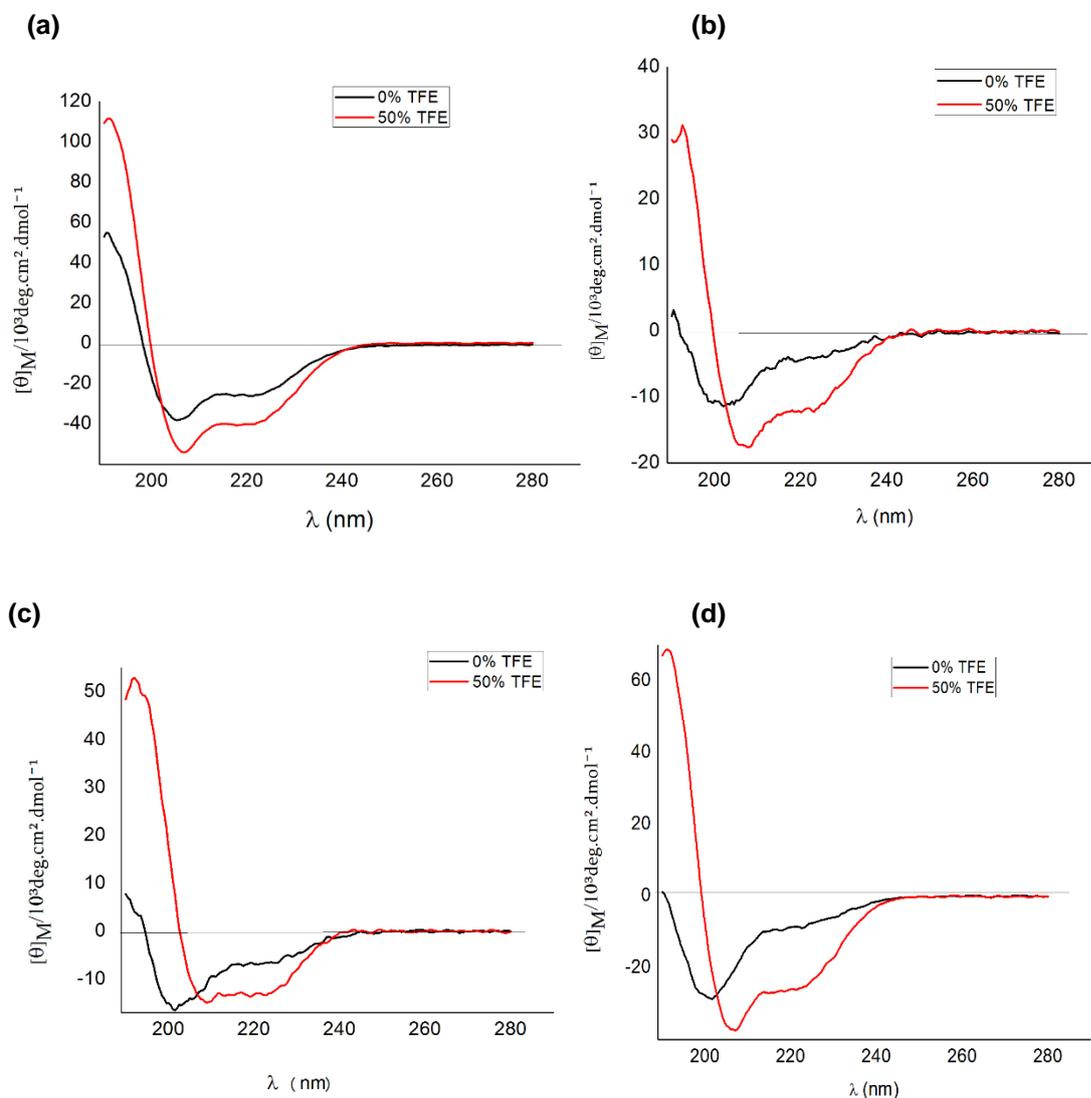


**Fonte:** Verli (2014)

Os espectros de dicroísmo circular de todos os peptídeos análogos de ParD foram realizados em tampão fosfato na ausência e na presença de 50% de indutor de estrutura secundária (TFE), e estão representados na Figura 28.

Os estudos de modelagem molecular já direcionavam para a predominância de  $\alpha$ -hélice, como estrutura secundária dos peptídeos análogos de ParD. A técnica de dicroísmo circular confirmou estes resultados, ao menos quando induzidos à estruturação. Com exceção de ParDTB1, os demais peptídeos, em solução, mostraram-se desestruturados, passando a adquirir maior ou menor estruturação em TFE, sugerindo em todos os casos uma estrutura em  $\alpha$ -hélice.

**Figura 28** - Espectros de CD de (a) ParDTB1, (b) ParDTB3, (c) ParDTB5 e (d) ParDTB6 na ausência e presença de 50% TFE



**Fonte:** Elaborado pela autora.

O TFE é um solvente eficiente utilizado no estudo de peptídeos e fragmentos proteicos, desde que foi descoberto para promover a formação de hélice, podendo, assim, ser aplicado para avaliar o potencial de formação deste tipo de estrutura. Contudo, a origem do efeito do TFE tem sido um assunto de debate considerável. Acredita-se que o TFE aumenta a desidratação de resíduos específicos no interior de uma hélice, promovendo assim, a estabilidade da hélice. No caso de ParDTB1, a presença de uma banda positiva em 190 nm e bandas negativas entre 207 e 222

nm, caracteriza uma  $\alpha$ -hélice, mesmo na ausência de TFE. Esta estrutura foi mantida quando TFE foi adicionado ao meio.

Estes resultados estão de acordo com aqueles previamente descritos para a estrutura de ParD (OBERER, et al., 2007), que é formada em sua porção C-terminal, por uma estrutura em  $\alpha$ -hélice (resíduos D39 a K50).

#### 4.5 Produção de ParD e ParE

As sequências codificadoras das proteínas ParE e ParD foram obtidas da empresa GenOne e entregues em vetor de clonagem clássico (pBlueScriptKS-), e em seguida realizada a subclonagem em vetores de expressão.

A proteína ParE apresenta atividade citotóxica à bactéria, dessa forma, foram empregadas três estratégias para as tentativas de expressão das duas proteínas. A primeira consistiu em subclonar (separadamente) cada gene com suas respectivas enzimas em pET28A (Figura 17A), de modo que, o fragmento que apresenta a ORF de cada gene, foi amplificada utilizando os *primers* já descritos (Tabelas 2 e 3), com a sequência complementar a extremidade 3' do gene *parD* (*forward*) e 5' (*reverse*), assim como, *forward* e *reverse* para *parE*. Como ParE tem ação tóxica sob a bactéria, essa estratégia foi baseada em baixo nível de expressão para que quantidades suficientes da proteína pudessem ser obtidas, antes que a toxina apresentasse sua atividade tóxica.

A segunda estratégia consistiu na tentativa de subclonar as duas ORFs correspondente aos dois genes em um mesmo vetor de expressão (pETDuet-1), utilizando para amplificação os *primers* com suas respectivas sequências complementares as extremidades 3' (*forward*) e 5' (*reverse*), de *parD* e *parE* (Tabelas 2 e 3).

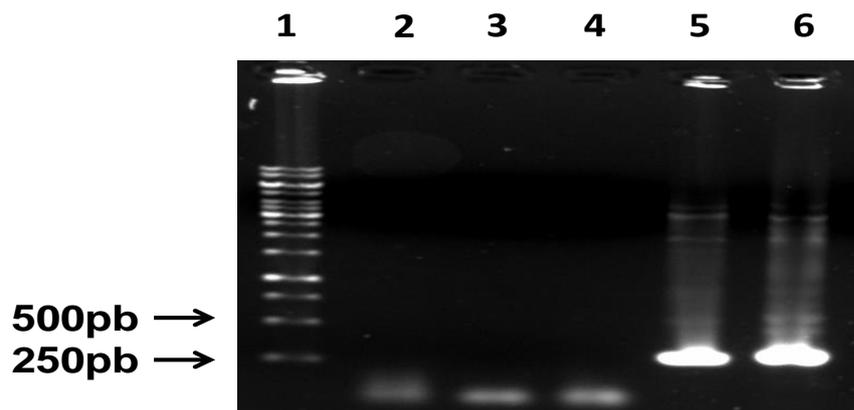
Por fim, a terceira estratégia, foi a tentativa de clonar unicamente a ORF correspondente ao gene de *parE*, em dois vetores de expressão para eucarioto (*Pichia pastoris*) sendo eles pPICz $\alpha$ A e pGAPz $\alpha$ A (Figura 18) utilizando também para amplificação cada *primer* correspondente para região 3' e 5' descritos na Tabela 3.

Os produtos da amplificação de *parD* e *parE* foram ligados ao plasmídeo de propagação pTZ57R/T e posteriormente transformados em células de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Dentre as colônias obtidas selecionaram-se algumas, ao qual foram submetidas a

uma análise de PCR para confirmação do inserto. As colônias que apresentaram a massa molecular correspondente ao inserto, foram submetidas a uma mini-extração para obtenção do DNA plasmidial (dados não apresentados). Uma das colônias transformadas tanto para pTZ-*parD* como para pTZ-*parE* (confirmadas a presença do inserto por PCR) foi utilizada como molde para nova amplificação utilizando os respectivos *primers* citados anteriormente para cada vector.

O produto da PCR apresentou tamanho equivalente ao esperado para *parD* (252 pares de base) digerido em *EcoRI* e *Sall* para pET28A e *EcoRI* e *NotI* para pETDuet-1 quando analisados em gel de agarose. Já os produtos de *parE* não amplificaram, como pode ser observado na Figura 29.

**Figura 29** - Produtos da PCR em gel de agarose, 1- marcador de peso molecular 1kb; 2- *parE* não amplificado; 3- *parE* não amplificado; 4- *parD* restringido com *EcoRI* e *NotI*; 5- *parD* restringido com *EcoRI* e *Sall* (vetor pET28a).



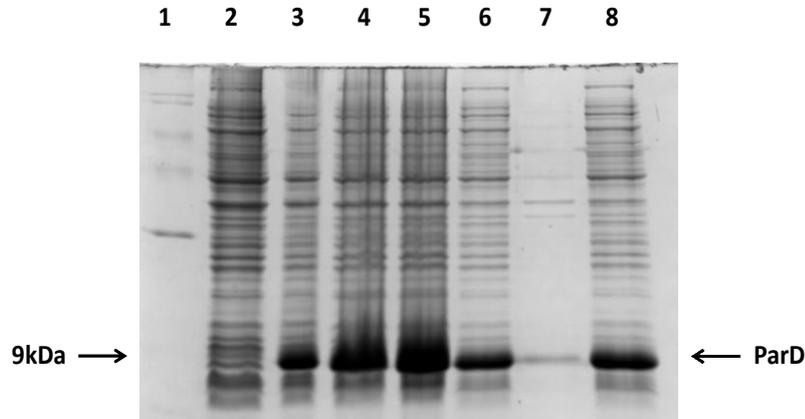
**Fonte:** Elaborado pela autora.

Ao realizar a restrição com suas respectivas enzimas, montou-se uma reação de ligação com os produtos amplificados de *parD* e o vetor pET28a quantificado em *Spectrophotometer NanoDrop* obtendo-se uma concentração de 118,5 ng/μL.

A ligação foi transformada em células competentes de *E. coli* DH5α e dentre as colônias obtidas, cinco foram selecionadas realizando uma análise de restrição (com *EcoRI* e *XhoI*) das mesmas para confirmar a presença do inserto em gel de agarose (resultados não apresentados).

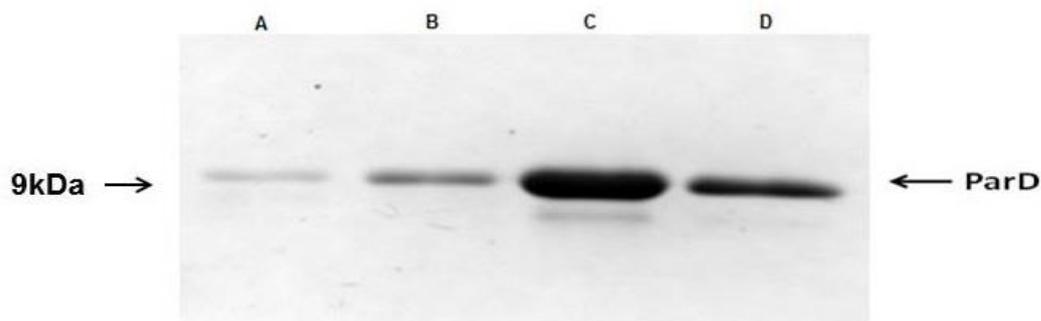
Uma das colônias que apresentava o inserto foi selecionada e utilizada no ensaio de expressão em Rosetta (DE3). O processo de produção e purificação de proteínas foi realizado de acordo ao descrito em metodologia e posteriormente confirmado em gel de poli-acrilamida (SDS-Page; Figuras 30 e 31 respectivamente).

**Figura 30** - Análise de expressão. 1-Marcador molecular 1kb 2- *parD* não induzido; 3- Produção de *parD* em *E. coli* após 1 hora de indução com IPTG; 4- Produção de *parD* em *E. coli* após 2 horas de indução com IPTG; 5- Produção de *parD* em *E. coli* após 3 horas de indução com IPTG; 6- Produção de *parD* em *E. coli* após 4 horas de indução com IPTG; 7- precipitado; 8- sobrenadante em SDS-PAGE 15 %.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Figura 31-** Análise de purificação de ParD recombinante. SDS-PAGE 15% purificação de ParD. A - Proteína ParD purificada em gradiente de lise com imidazol 100 mmol.L<sup>-1</sup>; B - Proteína ParD purificada em gradiente de tampão de lise com imidazol 250 mmol.L<sup>-1</sup>: extração 1; C - Proteína ParD purificada em gradiente de tampão de lise com imidazol 250 mmol.L<sup>-1</sup>: extração 2; D - Proteína ParD purificada em gradiente de tampão de lise com imidazol de 250 mmol.L<sup>-1</sup>: extração 3.



**Fonte:** Elaborado pela autora

O processo de indução ocorreu à 37°C e nota-se que a maior expressão se deu em torno de três horas de indução. O fragmento de *parD*-pET28A foi purificado (Figura 30) através de cromatografia de afinidade utilizando a fração solúvel da expressão, com uma coluna de níquel, sendo eluída utilizando gradientes de tampão de lise com imidazol observando em SDS-Page uma banda correspondente a massa

molecular de ParD. Posteriormente retirou-se o imidazol através do processo de diálise.

A quantificação da proteína se faz necessária, e pode ser realizada através de métodos tradicionais tais como a absorvância em UV a 280 nm, ensaios de ácido bicinconínico (BCA) em 562 nm, método de Bradford em 470 nm e de Lowry em 750 nm (SMITH et. al. 1987; WALKER 1994).

O método utilizado foi o BCA, de forma que a absorvância de ParD foi equivalente a 0,398, valor utilizado para calcular a concentração. Este método foi criado em 1985 por Paul K. Smith na *Pierce Chemical Company*, e é baseado na conversão de  $\text{Cu}^{2+}$  em  $\text{Cu}^+$  em condições básicas, denominado de Reação de Biureto, podendo ser influenciado por ligações peptídicas e por quatro resíduos de aminoácidos (cisteína, tirosina, cistina e triptofano). A redução de Cobre pelo BCA é a concentração direta da proteína que pode ser medida por absorvância em 562 nm através da mudança de cor da amostra para roxo (SMITH, et al. 1985). Utiliza-se a curva de albumina como padrão, já que a mesma é conhecida, desta forma obteve-se uma concentração final de 302 ng/ $\mu\text{L}$  de ParD.

Em paralelo à expressão de ParD, foi realizada a amplificação da sequência codificante de ParE. O produto da PCR apresentou tamanho equivalente ao esperado para *parE* (315 pares de base) posteriormente digeridas em *EcoRI* e *Sall* para os vetores pET28A, pETDuet-1 de *E. coli*, pPICZ $\alpha$ A e pGAPZ $\alpha$ A de *P. pastoris*.

A construção do vetor parE-pET28A foi utilizado para expressão em *E.coli*, transformado em Rosetta, e parE-pGAPz $\alpha$ A foi submetido ao processo de linearização do DNA.

A primeira tentativa de expressão foi em pET28a, na presença de glicose, visto que em protocolos anteriores para expressão de uma toxina a adição de glicose no meio auxiliava a diminuição da citotoxicidade (SAIDA, 2006).

Sabe-se que a expressão basal (antes do processo de indução-adição de IPTG) pode tornar as bactérias incapazes de produzir altos níveis de proteínas (PAN; MALCOLM, 2000), e como ParE naturalmente já apresenta atividade citotóxica, esse processo deve ser evitado. Por conseguinte, medidas para evitar o processo de expressão basal, tal como a adição de glicose ao meio de cultura, diminuem a expressão de proteínas recombinantes.

A expressão realizada a 30°C leva a uma diminuição na produção de proteínas recombinantes pelo fato de deixar mais lento o processo de expressão,

além de torna-la mais controlada. Isso favorece o processo de expressão de proteínas tóxicas, já que aumenta a estabilidade e a manutenção do plasmídeo na célula e diminuindo a concentração de proteínas no citoplasma. Como ParE é uma toxina que proporciona a morte da bactéria essa estratégia foi adotada.

Apesar de todos esses processos terem sido adotados na tentativa de expressão da toxina ParE, ao analisar o gel de poliacrilamida (resultado não apresentado), não foi constatada a presença de nenhuma banda, sugerindo-se que com isso, a atividade citotóxica de ParE acarretou a morte da bactéria.

A segunda tentativa de expressão foi baseada na subclonagem das duas sequências de interesse em um único vetor de expressão (pETDuet-1). O vetor foi submetido primeiramente a digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* para realizar a ligação com *parD*. Realizou-se a transformação da construção de *parD*-pETDuet-1 em DH5 $\alpha$  e novamente submetidas a restrição, no entanto com enzimas de restrição utilizadas para *parE* (*NdeI* e *XhoI*), não obtendo-se êxito na ligação deste.

Como a expressão de ParE em *E. coli* não foi satisfatória, partiu-se para a terceira tentativa de expressão, agora em *P. pastoris*. Após a confirmação do inserto em pGAPZ $\alpha$ A, o plasmídeo foi submetido a um processo de linearização com a enzima de digestão XMAI (*AVR11-[Thermo Fisher Scientific](#)*) e o material linearizado, foi precipitado (descrito em métodos 3.8.9) resultando em uma concentração de 20 ng/ $\mu$ L para posterior transformação em células de leveduras.

Para essa transformação, foram preparadas células competentes (descrito na seção de materiais e métodos 3.8.9) adicionando o DNA precipitado e promovendo a eletroporação. As colônias obtidas foram repicadas em uma placa maior, dentre as quais, 17 colônias foram selecionadas para realização de um *screening*<sup>1</sup> (crescidas por 96 horas, coletando alíquotas a cada 24 horas).

Após a indução e expressão em pequena escala, uma entre as 17 colônias foi selecionada (posterior análise em SDS-Page) para produção em grande escala. A análise do gel de SDS-Page do extrato bruto de levedura submetidas a 96 horas de indução demonstrou que não houve a presença da banda estimada correspondente a proteína ParE.

---

<sup>1</sup> Procedimento adotado para verificar qual colônia apresenta maior atividade de expressão proteica (produção em menor escala).

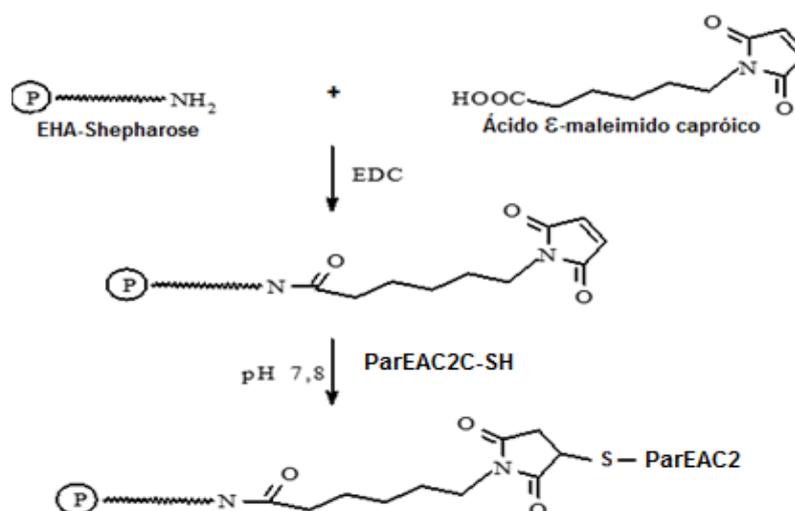
## 4.6 Cromatografia de Afinidade

Para se avaliar a possibilidade de interação entre os peptídeos análogos de ParD e um derivado de ParE, decidiu-se pela técnica de cromatografia de afinidade, que permite analisar a capacidade de retenção dos análogos de ParD frente às colunas contendo ParEAC2 imobilizado.

Inicialmente, uma resina tipo Sepharose foi funcionalizada pela reação com ácido  $\epsilon$ -maleimidocaprílico (Figura 32). Posteriormente, o peptídeo ParEAC2C foi acoplado ao suporte polimérico obtido, por adição nucleofílica do grupo tiol da cadeia lateral da cisteína à dupla ligação da função maleimido do ácido (MARCHETTO et al., 2001). A eficiência do acoplamento foi testada por análise de aminoácidos, que se mostrou satisfatória quando comparada com a sepharose sem o peptídeo incorporado.

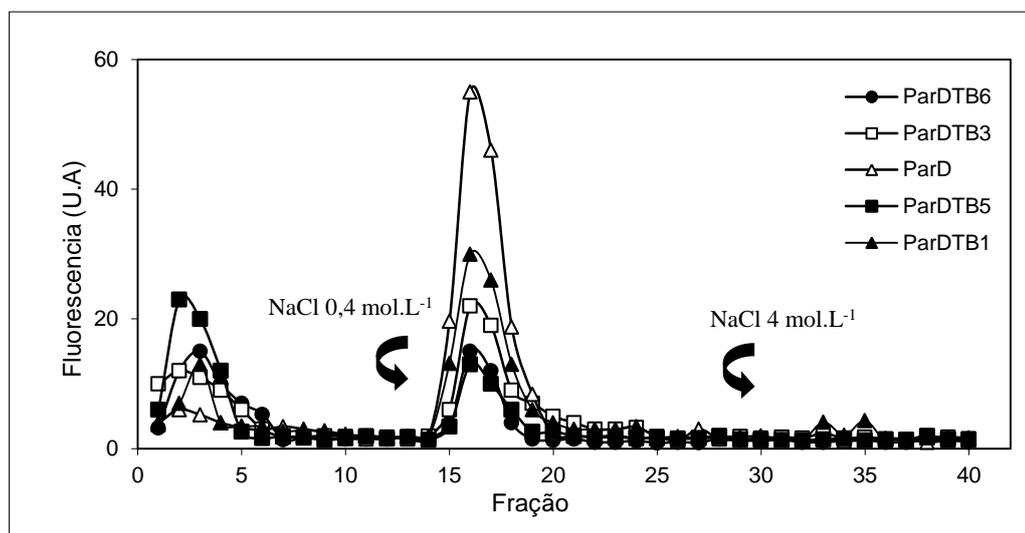
Para prosseguir com os estudos de afinidade, soluções contendo os análogos ParDTB1, ParDTB3, ParDTB5 e ParDTB6, além da proteína ParD, foram inseridos um a um à coluna de ParEAC2 e analisados como descrito em Materiais e Métodos, medindo-se a fluorescência intrínseca de cada peptídeo. O comportamento cromatográfico de ParD e de cada um dos seus análogos, frente à coluna contendo ParEAC2 imobilizado, está representado nas Figura 33.

**Figura 32** - Imobilização de ParEAC2C em resina Sepharose.



**Fonte:** Adaptado de: Caires (2014).

**Figura 33** - Ensaio de Cromatografia de afinidade com ParEAC2 imobilizado. Amostras: ParD ( $\Delta$ ), ParDTB1 ( $\blacktriangle$ ), ParDTB3 ( $\square$ ), ParDTB6 ( $\bullet$ ) e ParDTB5 ( $\blacksquare$ ). As colunas foram equilibradas com tampão Tris.HCl 10 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0. Eluição da coluna foi feita com o mesmo tampão contendo NaCl 0,4 ou 4 mol.L<sup>-1</sup> como indicado pelas setas. A eluição dos peptídeos foi monitorada pela fluorescência intrínseca dos respectivos análogos peptídicos de ParD (excitação a 280 nm e emissão a 360 nm) ou da proteína ParD (excitação a 280 nm e emissão a 350 nm); U.A = Unidade arbitrária.



**Fonte:** Elaborado pela autora

A proteína ParD foi a que apresentou maior afinidade para com a coluna contendo ParEAC2 imobilizado, sendo eluída após adição de uma solução de NaCl 0,4 mol.L<sup>-1</sup>. A eluição da proteína da coluna sob condições suaves sugere que ligações de hidrogênio e não interações iônicas, são determinantes na interação entre a antitoxina ParD e ParEAC2. Qualitativamente é possível concluir que a interação de ParD é mais efetiva, comparada aos peptídeos, haja vista a intensidade de fluorescência das frações eluídas contendo esta proteína após o tratamento da coluna com solução contendo NaCl 0,4 mol.L<sup>-1</sup>. A ausência de fluorescência significativa, nas frações iniciais de lavagem das colunas, corrobora esta conclusão.

Efeito parecido foi observado para ParDTB1, porém em menor intensidade comparado à proteína. As frações iniciais, correspondente à lavagem com tampão, mostraram pequena emissão de fluorescência intrínseca do peptídeo, indicando, juntamente com a menor intensidade após eluição com NaCl 0,4 mol.L<sup>-1</sup>, uma interação inferior ao observado para a proteína ParD.

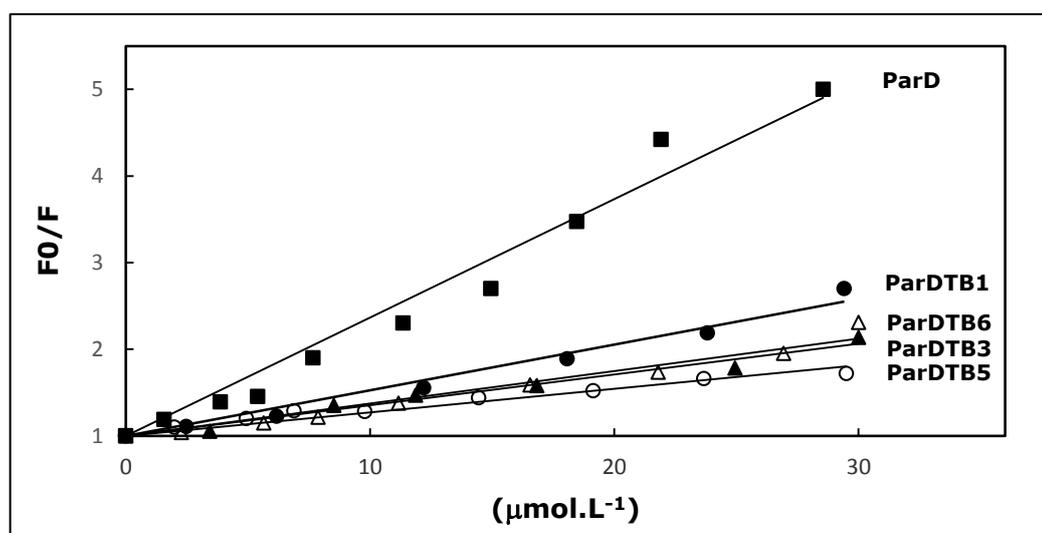
Este efeito foi aparentemente gradual, tendo o peptídeo ParDTB5 identificado como aquele com menor interação com ParEAC2.

#### 4.7 Ensaios de Supressão de Fluorescência

Estudos qualitativos de cromatografia de afinidade apontaram para interação entre o peptídeo derivado de ParE e a proteína ParD, bem como com os seus análogos sintéticos sendo, aparentemente mais efetiva com a proteína e com o análogo ParDTB1. Assim sendo, os parâmetros de interação foram estudados através da análise de supressão de fluorescência intrínseca do derivado ParEAC2 resultante da possível interação com os análogos de ParD. Do mesmo modo, os mesmos parâmetros foram avaliados pela supressão da fluorescência relativa da proteína ParD, resultante de uma possível interação com ParEAC2.

A variação da intensidade de fluorescência relativa de ParEAC2, no comprimento de onda de emissão de 350 nm ( $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ ) em função da concentração de cada um dos análogos de ParD, bem como da fluorescência de ParD ( $\lambda_{\text{emis}} = 360 \text{ nm}$ ) em função de ParEAC2, está representada na Figura 34.

**Figura 34** - Representação gráfica de Stern-Volmer: 25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (400  $\mu\text{L}$ ) de ParEAC2 e (●) ParDTB1 (2,48-29,41  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), ( $\Delta$ ) ParDTB6 (2,27-30,86  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), ( $\blacktriangle$ ) ParDTB3 (3,43-30,55) ou ( $\circ$ ) ParDTB5 (1,99–29,86  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ). A fluorescência foi medida a 25°C (excitação: 280 nm; emissão: 360 nm) após a adição das respectivas alíquotas de cada análogo de ParD. Para a antitoxina ParD: 34  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de ParD e ( $\blacksquare$ ) ParEAC2 (1,56-28,55  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e fluorescência medida a 25°C (excitação: 280 nm; emissão: 350 nm) após adição das respectivas alíquotas de ParEAC2.



Fonte: Elaborado pela autora.

Dados de supressão geralmente são apresentados como uma variação de  $F_0/F$  em função da concentração de um agente supressor, no caso um dos peptídeos análogos de ParD ou o próprio ParEAC2, no caso do estudo com a antitoxina, de acordo com a equação 1. Uma linearidade, como observada na Figura 34, para ParD e todos os peptídeos sintéticos, é um indicativo da existência de uma única classe de fluoróforos, em ParEAC2, como também em ParD, todos igualmente acessíveis aos supressores.

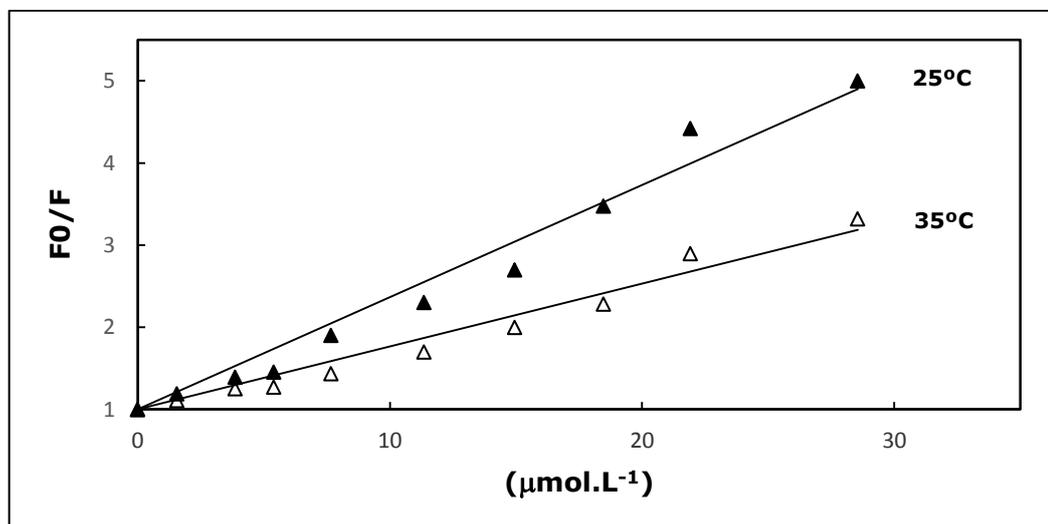
Por outro lado, essa linearidade na representação gráfica de Stern-Volmer, pode indicar tanto uma supressão dinâmica (colisional) como uma supressão estática (formação de complexo). Ambas podem ser diferenciadas através de uma avaliação comparativa em diferentes temperaturas. A supressão dinâmica depende da difusão molecular. Como a elevação de temperatura resulta em coeficientes de difusão maiores, um aumento da constante de supressão bimolecular é esperado, com o aumento da temperatura. Em contraste, é provável que o aumento da temperatura resulte em uma diminuição da estabilidade de complexos, e conseqüentemente valores mais baixos para as constantes obtidas para uma supressão estática. Desta forma, uma diminuição na constante de supressão, com a elevação da temperatura é esperada, no caso de supressão estática, e o inverso no caso de uma supressão dinâmica ou colisional (LAKOWICZ, 2006). Para ambas, a dependência de  $F_0/F$  em relação a  $[Q]$  (Equação 1) é idêntica, exceto que a constante de supressão ( $K_{sv}$ ), para uma supressão estática, corresponde à constante de associação ( $K_a$ ) do complexo formado (LAKOWICZ, 2006).

Neste sentido, experimentos de supressão a 35°C foram executados, com o intuito de se identificar o tipo de processo envolvido na supressão de fluorescência de ParEAC2 ou de ParD.

Na Figura 35, estão representados os gráficos de Stern-Volmer obtidos a 25 e 35°C, para a antitoxina ParD. Como pode ser observado, o aumento da temperatura resultou em uma queda no coeficiente angular da reta, refletindo em uma diminuição da constante de supressão, característico de uma supressão do tipo estática.

O valor da constante de associação ( $K_a = 13,67 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}$ ) para o complexo ParD-ParEAC2 a 25°C foi obtido a partir da inclinação da curva de Stern-Volmer, para a identificada supressão estática.

**Figura 35** - Efeito da temperatura na interação do ParD com ParEAC2. O peptídeo ParEAC2 ( $1,56$  a  $28,56 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) foi adicionado a uma solução  $34 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de ParD ( $400 \mu\text{L}$ ) e a fluorescência medida após cada adição, ( $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$  e ( $\lambda_{\text{emis}} = 350 \text{ nm}$ ), a  $25^\circ\text{C}$  ( $\blacktriangle$ ) e  $35^\circ\text{C}$  ( $\triangle$ ).



**Fonte:** Elaborado pela autora.

O valor da constante de associação ( $K_a = 13,67 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}$ ) para o complexo ParD-ParEAC2 a  $25^\circ\text{C}$  foi obtido a partir da inclinação da curva de Stern-Volmer, para a identificada supressão estática.

O valor da constante obtida a  $35^\circ\text{C}$  ( $K_a = 7,48 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}$ ) corresponde a uma diminuição de 45% em relação ao valor obtido a  $25^\circ\text{C}$ . Valores nesta faixa já haviam sido obtidos para diferentes complexos incluindo aqueles obtidos com proteínas, tais como a soroalbumina humana ou bovina, justificados basicamente pelas diferenças de estabilidade térmica dos diferentes complexos formados (CUI *et al.*, 2004).

O mesmo efeito foi observado para os peptídeos análogos de ParD (Tabela 5). Como pode ser observado, os valores de  $K_a$  obtidos a  $35^\circ\text{C}$ , foram ligeiramente inferiores comparativamente àqueles obtidos a  $25^\circ\text{C}$ . A elevação da temperatura resulta em uma diminuição da estabilidade dos complexos e, portanto, valores mais baixos na constante de supressão estática, o que explica a diminuição na inclinação da curva de Stern-Volmer observada para ParD (Figura 34) e conseqüentemente no valor da constante de associação (Tabela 5).

**Tabela 5** - Valores de constante de associação comparativo<sup>a</sup>

Amostra	$K_a$ ( $10^4$ L.mol <sup>-1</sup> ) (25°C)	$K_a$ ( $10^4$ L.mol <sup>-1</sup> ) (35°C)
ParD	13,67	7,48
ParDTB1	5,27	3,93
ParDTB3	3,42	1,54
ParDTB5	2,74	1,46
ParDTB6	3,40	1,68

<sup>a</sup> Ensaios de fluorescência executados como descrito em Materiais e Métodos. Misturas de reação contendo ParEAC2 25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  ou ParD 34  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e quantidade variável de peptídeo ligante. A constante de associação ( $K_a$ ) foi determinada pelo coeficiente angular da curva de Stern-Volmer (LAKOWICZ, 2006).

Estudos anteriores (CAIRES, 2014) já apontavam para uma interação, dependente da extensão da cadeia peptídica, entre derivados de ParD com ParEAC2. Nestes estudos, derivados contendo 26 (N58 – A83), 33 (T51 – A83) e 45 (D39 – A83) resíduos de aminoácidos, obtidos a partir da extremidade C-terminal de ParD, formaram complexos estáveis com ParEAC2, com valores de  $K_a$  crescentes (0,28, 0,57 e 3,45  $\times 10^4$  L.mol<sup>-1</sup>, respectivamente) de acordo com o crescimento da cadeia peptídica. Assim, já era esperado que a antitoxina ParD, por conter 83 resíduos de aminoácidos, formaria um complexo com maior estabilidade e conseqüentemente com maior valor de constante de associação, evidenciando que a melhor estruturação da proteína em solução, disponibiliza pontos adicionais para o processo de interação, favorecendo a formação de um complexo mais estável com ParEAC2.

Comparativamente, os valores de  $K_a$  descritos na Tabela 6, mostram que a dimensão da cadeia polipeptídica não é um fator condicional para o processo de interação. Peptídeos contendo 16 resíduos de aminoácidos, como ParDTB1, ParDTB3, ParDTB5 e ParDTB6, apresentaram grande capacidade de interação com ParEAC2. Destaque para ParDTB1, que apresentou uma constante de associação

superior àquela obtida para o maior análogo de ParD já sintetizado (45 resíduos de aminoácidos).

Uma avaliação estrutural dos peptídeos análogos propostos por modelagem molecular e sintetizados neste trabalho, sinaliza para a importância da estruturação em  $\alpha$ -hélice do peptídeo na interação com ParEAC2. De fato, o análogo ParDTB1, único a apresentar estrutura deste tipo em solução aquosa, prevista por modelagem molecular e confirmada por dicroísmo circular (Figuras 20b e 29a), foi o que formou um produto com maior estabilidade com ParEAC2. Estes resultados estão de acordo com aqueles previamente descritos para a estrutura da antitoxina ParD (OBERER, *et al.*, 2007), que é formada em sua porção C-terminal, por uma estrutura em  $\alpha$ -hélice (resíduos 39 a 50). Estes autores, consideram esta região, como de grande probabilidade de interação com a toxina ParE.

ParDTB1 apesar de apresentar a menor hidrofobicidade (0,297) entre os análogos sintéticos e não ter carga efetiva em pH 7,0, é o único que apresenta carga negativa (-2), na região que diferencia os quatro análogos (resíduos 39 – 43). A presença desta carga, resultante da presença de dois resíduos de ácido aspártico, deve favorecer ainda mais a interação com ParEAC2, positivamente carregado neste valor de pH.

Estes resultados confirmam que as interações avaliadas pelo processo de simulação de dinâmica molecular e analisadas através de perfis de variação da diferença de energia livre de Gibbs ( $\Delta\Delta G$ ) obtidos por AS, são válidas e permitem a predição de estruturas peptídicas com interações moleculares crescentes.

## 5 CONCLUSÕES

- A síntese, purificação e caracterização dos peptídeos utilizando a metodologia de fase sólida e LC-MS respectivamente mostraram-se satisfatórias para a produção das sequencias propostas.
- As estruturas secundárias formadas pelos peptídeos propostos por *design in silico* foram confirmadas através dos ensaios de dicroísmo circular.
- A expressão da proteína ParD em *E. coli* mostrou-se adequada.
- O sistema de expressão heteróloga da toxina ParE não se mostrou eficiente.
- Os análogos de ParD suprimiram a fluorescência do peptídeo ParEAC2, de modo estático, caracterizando a formação de complexos estáveis.
- ParEAC2 suprimiu a fluorescência da antitoxina ParD, resultado da formação de um complexo com uma constante de associação elevada, caracterizado pela melhor estruturação da proteína em solução.
- ParDTB1, foi o peptídeo que apresentou maior interação com um derivado de ParE, possivelmente devido a característica aniônica da sua extremidade N-terminal, que promove a interação eletrostática com ParEAC2 de natureza catiônica.
- O análogo ParDTB1, representa, até o momento, a estrutura peptídica mínima necessária para a manutenção dos parâmetros de interação e formação do complexo toxina-antitoxina e, possivelmente, na atividade antídoto da proteína ParD.

## REFERÊNCIAS

- ALBERÍCIO, F.; LLOYD-WILLIAMS, P.; GIRALT, E. Métodos de sínteses peptídica. In: ANDREU, D.; RIVAS, L. (Coord.). **Péptidos en biología y biomedicina**. Madrid: CSIC, 1997. Chap. 2, p. 43-90.
- AMBLARD, M.; FEHRENTZ, J. A.; MARTINEZ, J.; SUBRA, G. Fundamentals of modern peptide synthesis. HOWL, J. (Ed.). **Peptide synthesis and applications**. Totowa: Human Press, 2005. Chap. 1, p. 3-24. (Methods in molecular biology, v. 298).
- ANDERSON, G. W.; MCGREGOR, A. C. t-Butyloxycarbonylamino acids and their use in peptide synthesis. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 79, p. 6180-6183, 1957.
- ANDREU, D.; RIVAS, L. Animal antimicrobial peptides: an overview. **Biopolymers**, v. 47, p. 415-433, Jan. 1998.
- BARBOSA, L. C. B.; GARRIDO, S. S.; GARCIA, A.; DELFINO, D. B.; SANTOS, L. N.; MARCHETTO, R. Design and synthesis of peptides from bacterial ParE toxin as inhibitors of topoisomerases. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 54, p. 591-596, 2012.
- BARBOSA, L. C. B.; CANGUSSU, S. R. R.; GARRIDO, S. S.; MARCHETTO, R. Toxin-antitoxin systems and its biotechnological applications. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 13, p. 11-17, 2014.
- BARREIRO, E. J.; RODRIGUES, C. R. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal<sup>1</sup>. **Quím. Nova**, v. 20, n. 3, p. 300-310, 1997.
- BELLON, S.; PARSONS, J. D.; WEI, Y.; HAYAKAWA, K.; SWENSON, L. L.; CHARIFSON, P. S.; LIPPKE, J. A.; ALDAPE, R.; GROSS, C. H. Crystal structure of *Escherichia coli* topoisomerase IV ParE subunit (24 and 43 kilodaltons): a single residue dictates differences in novobiocin potency against topoisomerase IV and DNA gyrase. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, p. 1856-1864, 2004.
- BERNARD, P.; COUTURIER, M. The 41 carboxy-terminal residues of the mini F plasmid CcdA protein are sufficient to antagonize the killer activity of the CcdB protein. **Mol. Gen. Genet.**, v. 226, p. 297-304, 1991.
- BORISSEVITCH, I. E. More about the inner filter effect: corrections of Stern–Volmer fluorescence quenching constants are necessary at very low optical absorption of the quencher. **J. Lumin.**, v. 81, p. 219-224, 1999.
- BRUNGER, A. T.; ADAMS, P. D.; CLORE, G. M.; DELANO, W. L.; GROS, P.; GROSSE-KUNSTLEVE, R. W.; JIANG, J.-S.; KUSZEWSKI, J.; NILGES, M.; PANNU, N. S.; READ, R. J.; RICE, L. M.; SIMONSON, T.; WARREN, G. L. Crystallography & NMR system (CNS): a new software system for macromolecular structure determination. **Acta Cryst. D**, v. 54, p. 905-921, 1998.

BUNJNICKI, J. M. Protein-structure prediction by recombination of fragments. **Quím. Nova**, v. 26, n. 2, p. 19-27, mar./abr. 2003.

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

CAIRES, A. C. **Síntese, estrutura e atividade de peptídeos derivados de ParD, o antídoto do módulo toxina-antitoxina ParDE**. 2014. 114 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

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

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

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

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

CORNILESCU G.; DELAGLIO, F.; BAX, A. Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. **J. Biomol. NMR**, v. 13, p. 289-302, 1999.

CREGG, J. M.; VEDEVICK, T. S.; RASCHKE, W. C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. **Biotecnology**, v. 11 n. 8 p. 905-910, 1993.

CUI, F. L.; FAN, J.; LI, W.; FAN, Y. C.; HU, Z. D. Fluorescence spectroscopy studies on 5-aminosalicylic acid and zinc 5-aminosalicylate interaction with human serum albumin. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 34, p. 189-197, 2004.

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

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

DAO-THI, M.-H.; MESSENS, J.; WYNS, L.; BACKMANN, J. The thermodynamic stability of the proteins of the *ccd* plasmid addiction system. **J. Mol. Biol.**, v. 299, p. 1373-1386, 2000.

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

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

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

FRACZKIEWICZ, R.; BRAUN, W. Exact and efficient analytical calculation of the accessible surface areas and their gradients for macromolecules. **J. Comp. Chem.**, v. 19, p. 319-333, 1998.

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

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

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

GERGELY, A. A review of the application of chiroptical methods to analytical chemistry. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 7, n. 5, p. 523-541, 1989.

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

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

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

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

INVITROGEN. **EasySelect™ Pichia expression kit**: for expression of recombinant proteins using pPICZ and pPICza in *Pichia pastoris*. Carlsbad, 2010. 95 p.

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

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

JOHNSON, B. A.; BLEVINS, R. A. NMR view: a computer program for the visualization and analysis of NMR data. **J. Biomol. NMR**, v. 4, p. 603-614, 1994.

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

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

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

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

KAMADA, K.; HANAOKA, F.; BURLEY, S. K. Crystal structure of the MazE/MazF complex: molecular bases of antidote-toxin recognition. **Mol. Cell**, v. 11, p. 875-884, 2003.

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

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

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

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

KORADI, R.; BILLETER, M.; WÜTHRICH, K. MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. **J. Mol. Graphics**, v. 14, p. 51-55, 1996.

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

KUMAR, A.; VOET, A.; ZHANG, K. Y. Fragment based drug design: from experimental to computational approaches. **Curr. Med. Chem.**, v. 19, p. 5128- 5147, 2012.

LASCHUK, E. F. **Novo formalismo semi-empírico para cálculos químicos-quânticos**. 2005.143 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

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

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

LIMA, M. A.; YATES, E. A.; TERSARIOL, I. L. S.; NADER, H. B. Dicroísmo circular. In: VERLI, H. (Org.). **Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular**. São Paulo: SBBq, 2014. Cap. 10, p. 209-219.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MERRIFIELD, R. B. Solid-phase peptide synthesis (Nobel Lecture). **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 24, p. 799-810, 1985.

MICSONAI, A.; WIEN, F.; KERNYA, L.; LEE, Y.; GOTO, Y.; RÉFRÉGIERS, M.; KARDOS, J. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. **Proc. Natl. Acad. Sc. USA**, v. 112, p. 3095-3103, 2015.

MOULT, J.; FIDELIS, K.; KRYSHTAFOVYCH, A.; SCHWEDE, T.; TRAMONTANO, A. Critical assessment of methods of protein structure prediction (CASP) -round. **Proteins**, v. 82, p. 1-6, 2014. Suppl. S2.

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

NÖLLMANN, M.; STONE, M. D.; BRYANT, Z.; GORE, J.; CRISONA, N. J.; HONG, S. C.; MITELHEISER, S.; MAXWELL, A.; BUSTAMANTE, C.; COZZARELLI, N. R. Multiple modes of *Escherichia coli* DNA gyrase activity revealed by force and torque. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v.14, p. 256-258, 2007.

NOVAGEN®. **pET system manual**. Darmstadt, c 2003. 68 p.

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

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

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

PAGE, R.; PETI, W. Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. **Nat. Chem. Biol.**, v. 12, p. 208-214, 2016.

PAN, S.; MALCOLM, B. A. Reduced background expression and improved plasmid stability with pET vectors in BL21 (DE3). **Biotechniques**, v. 29, p. 1234-1238, 2000.

PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. **J. Comput. Chem.**, v. 25, p. 1605-1612, 2004.

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

PRONK, S.; PÁLL, S.; SCHULZ, R.; LARSSON, P.; BJELKMAR, P.; APOSTOLOV, R.; LINDAHL, E. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. **Bioinformatics**, v. 29, n. 7, p. 845-854, 2013.

PURDIE, N. Chiroptical analytical methods. In: SWARBRICK, J.; BOYLAN, J. C. (Ed.). **Encyclopedia of pharmaceutical technology**. 3rd ed. Pinehurst: PharmaceuTech, 2007. v. 1, p. 445-462.

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

RUSSELL, R. B.; BARTON, G. J. Structural features can be unconserved in proteins with similar folds -- an analysis of side-chain to side-chain contacts secondary structure and accessibility. **J. Mol. Biol.** v. 244, p. 332-350, 1994.

SAIDA, F.; UZAN, M.; ODAERT, B.; BONTEMS, F. Expression of highly toxic genes in *E. coli*: special strategies and genetic tools. **Curr. Protein Pept. Sci.**, v. 7, n. 1, p. 47-56, 2006.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal. Biochem.**, v. 150, p. 76-85, 1987.

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

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

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

TOVCHIGRECHKO, A.; VAKSER, I. A. GRAMM-X public web server for protein-protein docking. **Nucleic Acids Res.**, v. 34, Web Server issue, p. w310-w314, 2016.

TRAMONTANO, A.; LESK, A. M. Ab-initio methods for prediction of protein structures In: \_\_\_\_\_. **Protein structure prediction: concepts and applications**. Weinheim: Wiley-VCH, 2006. Chap. 3, p. 55-70.

TRETTNER, E. M.; BERGER, J. M. Mechanisms for defining supercoiling set point of DNA gyrase orthologs II. The shape of the gyra subunit c-terminal domain (ctd) is not a sole determinant for controlling supercoiling efficiency. **J. Biol. Chem.**, v. 287, p. 18645-18654, May 2012.

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

WALKER J. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. **Methods Mol. Biol.**, v. 32, p. 5-8, 1994.

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

WASZKOWYCZ, B.; CLARK, D. E.; GANCIA, E. Outstanding challenges in protein-ligand docking and structure-based virtual screening. **Wiley Interdiscip. Rev: Comput. Mol. Sci.**, v. 1, p. 229 -259, 2011.

WATANABE, K.; TOH, Y.; SUTO, K.; SHIMIZU, Y.; OKA, N.; WADA, T.; TOMITA, K. Protein-based peptide-bond formation by aminoacyl-tRNA protein transferase. **Nature**, v. 449 p. 867-871, 2007.

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

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

YAMAGUCHI, Y.; PARK, J.; INOUYE, M. Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea. **Annu. Rev. Genet.**, v. 45, p. 61-79, 2011.