JOÃO HENRIQUE PIMENTA GIUDICE

**Estudo estrutural e biofísico de três enzimas da via do folato
de microrganismos patogênicos**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia do
Instituto de ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Marcio Vinicius
Bertacine Dias

Versão Corrigida. A versão original
eletrônica, encontra-se disponível na
Secretaria de Pós-graduação que aloja
o Programa

São Paulo
2017

RESUMO

GIUDICE, J. H. P. **Estudo estrutural e biofísico de três enzimas da via do folato de microrganismos patogênicos**. 2017. 84p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017

Em 2015, de acordo com a Organização Mundial da Saúde, o total de mortes na população humana foi de 52,5 milhões de pessoas, em que as doenças infecciosas – mais especificamente, infecções respiratórias – aparecem em terceiro lugar no ranking de causas de morte. No total foram 3,5 milhões de mortes ou 6,7% do total, demonstrando um aumento significativo quando comparado com a pesquisa anterior, realizada em 2011, na qual as doenças infecciosas foram responsáveis por 3,2 milhões ou 5,9% do total. Das doenças infecciosas, podemos destacar a Malária, HIV/AIDS, Hepatite, Tuberculose – que aparece em 8º lugar neste mesmo ranking, e a Hanseníase – que é uma importante preocupação no Brasil. A tuberculose, causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* sendo uma das principais causas de morte por doenças infecciosas na população humana, já apresenta cepas resistentes ao tratamento – denominadas Cepas multirresistentes (MDR) e Cepas extremamente resistentes (XDR). Enquanto que a hanseníase, causada pelo *Mycobacterium leprae*, apesar de não ser letal, causa a invalidez dos portadores e o Brasil possui o segundo maior número de casos desta doença. Outro patógeno de importância médica é a *Pseudomonas aeruginosa* que causa sérias doenças em pacientes com baixa imunidade, principalmente aqueles em hospitais – em especial, pacientes com queimaduras. A via do Folato tem despertado a atenção das indústrias farmacêuticas para o desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que esta via oferece seletividade para estes novos inibidores. Isso se deve ao fato de que o tetrahidrofolato é um componente essencial para os organismos procariotos, e apenas eles, precisam realizar a produção *de novo* desta substância, enquanto que os eucariotos, o adquirem através da alimentação. Entretanto, o surgimento de cepas resistentes não só reforça a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos, mas também a compreensão dos mecanismos de resistências destas cepas. O presente trabalho tem como objetivo obter informações biofísicas e estruturais de três enzimas da via do folato, a 7,8 dihidroneopterina aldolase, dihidropteroato sintase e dihidrofolato redutase. Além disso, esse trabalho teve como objetivo a compreensão do mecanismo de resistência através da indução de mutações nos códons 53 e 55 na enzima dihidropteroato sintase (DHPS), caracterização estrutural preliminar da enzima DHNA e estudos estruturais da enzima DHFR em complexo com cicloguanil. Assim, neste trabalho foi realizado a clonagem gênica da região codificando do gene para a enzima DHNA e expressão da proteína recombinante, purificada e utilizada em ensaios biofísicos. Além disso a mutagênese sítio dirigida foi feita com o intuito de se produzir DHPSs mutantes (T70S e P72R), na qual foram utilizadas nos ensaios de ITC, fluorescência, e cristalização, o que possibilitou demonstrar que a resistência de *M. leprae* às sulfas pode ser devido a troca de uma prolina por uma arginina na posição 72. Por fim, para DHFR, foi possível obter sua estrutura em complexo com cicloguanil que possibilitou avaliar as diferenças estruturais entre a forma aberta e fechada desta enzima. Além disso, confirmamos que o grupo nicotidamida tem essencial importância para a interação com os ligantes.

Palavras-chaves: Microrganismos patogênicos. Resistência. Folato.

ABSTRACT

GIUDICE, J. H. P. **Structural and Biophysical Studies of Three Folate Pathway Enzymes of Pathogenic Microorganisms**. 2017 84p. Master thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017

In 2015, according to the World Health Organization, the total number of deaths in the human population was 52.5 million people, in which infectious diseases - specifically, respiratory infections - appear third in the ranking of causes of death. In total, 3.5 million deaths or 6.7% of the total occurred, showing a significant increase when compared to the previous survey conducted in 2011, in which infectious diseases accounted for 3.2 million or 5.9% of the total total. Of the infectious diseases, we can highlight Malaria, HIV / AIDS, Hepatitis, Tuberculosis - which appears in 8th place in this same ranking, and Leprosy - which is an important concern in Brazil. Tuberculosis, caused by *Mycobacterium tuberculosis* is one of the main causes of death due to infectious diseases in the human population, and already presents resistant strains to the treatment - denominated multiresistant strains (MDR) and extremely resistant strains (XDR). While leprosy, caused by *Mycobacterium leprae*, despite not lethal, causes the invalidity of patients and Brazil has the second largest number of cases for this disease. Another pathogen of medical importance is *Pseudomonas aeruginosa*, which causes serious illness in patients with low immunity, especially those in hospitals - especially patients with burns. The Folate pathway has brought the attention of the pharmaceutical industries to the development of new drugs, since this pathway offers selectivity for these new inhibitors. This is since Tetrahydrofolate is an essential component for prokaryote organisms, and only they, need to perform the new production of this cofactor, while Eukaryotes acquire it through food. However, the emergence of resistant strains, not only reinforces the need for the development of new drugs, but also the understanding of the mechanisms of resistance of these strains. The aim of the present work was to obtain biophysical and structural information of three folate pathway enzymes, 7,8 dihydroneopterin aldolase, Dihydropteroate synthase and Dihydrofolate reductase. In addition, this work aimed to understand the mechanism of resistance through the induction of mutations at the codons 53 and 55 in the enzyme dihydropteroate synthase (DHPS), preliminary structurally characterize the DHNA enzyme and structurally study the enzyme DHFR in complex with cycloguanil. Thus, the cloning of the coding region of the gene for DHNA and the expression of the recombinant protein, purification and biophysical characterization were performed in this work. In addition, site-directed mutagenesis was performed aiming of producing mutant DHPSs (T70S and P72R), which were used in ITC, fluorescence, and crystallization tests to demonstrate that *M. lepreae* resistance to sulfas may be due to the exchange of a proline to an arginine at position 72. Finally, for DHFR, it was possible to obtain its structure in complex with cycloguanil which made it possible to evaluate the structural differences between the open and closed conformation of this enzyme. In addition, we have confirmed that the nicotidamide group has a crucial importance for interaction with the ligands.

Keywords: Pathogenic Microorganism. Resistance. Folate

INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas são uma das principais causas de morte da população humana, sendo responsáveis pelo sofrimento de centenas de milhões de pessoas, especialmente em áreas tropicais e subtropicais do mundo, local onde ocorre cerca de 90% das mortes causadas por esse tipo de enfermidade (FEHN; THURMANN; RAZUM, 2006). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 14 milhões de pessoas morrem a cada ano devido a esses tipos de doenças, destacando-se entre elas AIDS/HIV, infecções respiratórias, malária e tuberculose (Figura 1), que lideram as causas de morte, principalmente nos países da África, Ásia e América do Sul – regiões nas quais estão presentes oitenta por cento de toda a população mundial (TROUILLER et al., 2001).

Figura 1 - Exemplos de doenças emergentes e re-emergentes em um âmbito global. É importante destacar a Tuberculose multirresistente, HIV e o bioterrorismo com *Bacillus anthracis*. Fonte: Organização Mundial da Saúde. Figura modificada

Em 2015, 1,6 bilhão de pessoas em todo o globo receberam tratamento contra doenças infecciosas e apesar disso, em 2016, apenas 1% de todo o investimento na saúde foi alocado para combater tais enfermidades (WORLD HEALTH STATISTIC 2017, 2017). Apesar da grande preocupação mundial a respeito destas doenças, esse descaso no desenvolvimento de novas terapias se deve a possibilidade de baixo retorno lucrativo, uma

vez que estas doenças se concentram principalmente nos países mais pobres do mundo (FEHN; THURMANN; RAZUM, 2006).

A tuberculose (TB) apesar de ser uma doença tratável e curável, permanece sendo o maior problema de saúde pública mundial. Só em 2016 foram estimados 6,3 milhões de novos casos de tuberculose, sendo que 10% dos casos, são de tuberculose resistente a algum tipo de fármaco (GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT, 2017). Apesar de ter havido um declínio rápido de TB no início do século vinte, devido a melhores condições sanitárias e a introdução da vacinação BCG, além dos antibióticos estreptomicina, ácido *p*-aminosalicílico, isoniazida e rifampicina, hoje há um ressurgência dos casos devido justamente ao surgimento de bactérias multi-resistentes e a co-infecção com HIV (Figura 2) (DUNCAN, 2003).

A OMS estima que para o controle da TB são necessários 8 bilhões de dólares anuais, contudo o investimento atual é de apenas 2 bilhões por ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). Desta forma, a pesquisa acadêmica, representada pelo setor público, em associação com as grandes companhias farmacêuticas têm um importante papel no entendimento e desenvolvimento de novas terapias (CROFT, 2005).

Figura 2 - Mapa ilustrando geograficamente os locais com maior incidência da tuberculose em 2016. Fonte: Global Tuberculosis Report 2016. Figura Modificada

Além de TB, outra micobactéria de importância médica é *Mycobacterium leprae* (ML) que causa a hanseníase, inclusa no grupo de doenças infecciosas negligenciadas, ou

seja, aquelas causadas por agentes infecciosos ou parasitas que são endêmicas em populações de baixa renda e por isso possuem indicadores inaceitáveis e investimento reduzido em seu controle (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2013). As células de Schwanns são o principal alvo da infecção, que levam a injúria do nervo, desmielinização e consequentemente a perda da condutividade axonal (CDC, 2002). A principal característica da doença é a formação de máculas hipopigmentadas com uma superfície lisa ou escamosa com até 10^9 microorganismos por grama de tecido (MADIGAN, 2010). Apesar de também ser uma doença tratável e curável, o principal agravante da doença é o profundo impacto social e psicológico no paciente, além da perda da capacidade sensomotora e deformidade severa dos tecidos quando não tratada nos primeiros estágios da doença (WHO, 2013).

O Brasil possui o segundo maior número de novos casos de hanseníase em todo o mundo, atrás apenas da Índia (Figura 3). De acordo com o Ministério da Saúde, não é eticamente aceitável o uso de qualquer tratamento monoterápico para tuberculose e hanseníase, pois são agentes infecciosos extremamente resistentes. Atualmente, as drogas mais utilizadas são rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol para TB e rifampicina, dapsona e clofazimina para hanseníase (MINISTÉRIO DA SAÚDE – DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS, 2010).

Figura 3 - Mapa ilustrando geograficamente os locais com maior número de novos casos de hanseníase em 2016. Fonte: World Health Organization, 2016. Figura modificada.

As infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa* (PA) também possuem grande importância médica devido ao fato de ser a principal causa de morte em infecções hospitalares. *P. aeruginosa* é patógeno gram-negativo oportunista e por isso, causa sérias doenças em pacientes com baixa imunidade, principalmente aqueles em hospitais. Entretanto, pessoas saudáveis também podem ser infectadas por esta bactéria principalmente quando expostas à água contaminada, causando infecções de ouvido, olhos e na pele (CDC, 2014).

A atenção médica para este organismo se torna especial quando se trata de pacientes acometidos por queimaduras, na qual 57% das infecções nestes pacientes são causadas pela *P. aeruginosa*. Nestes casos o tratamento se torna extremamente complicado devido a sua resistência à antibióticos – sendo, inclusive, citado na lista “Public Health Importance of Antimicrobial Resistance”. Estima-se que a taxa de mortalidade nestes casos sobe para 40-50% (ESTAHBANATI, 2002).

Todos esses três organismos – TB, ML e PA – necessitam produzir o folato através de sua via. Isso se deve ao fato da ausência de um sistema de transporte na membrana celular procariótica capaz de transportar esta molécula para dentro da célula (BOURNE, 2014). Entretanto o folato é uma molécula de vital importância para o crescimento celular tanto em procariotos quanto eucariotos. Isso porque o folato é utilizado pelas células como aceptores ou doadores de uma unidade de carbono em diversas vias biosintéticas, como por exemplo, na formação de metioninas e purinas. Além disso, o folato também participa na replicação, reparo e metilação do DNA (ROSSI, 2011). Enquanto que eucariotos obtém o folato através da alimentação, justamente por possuírem um sistema de transporte capaz de transportar o folato para dentro da célula (DESMOULIN, 2012), plantas e bactérias precisam sintetizar o folato através *de novo* (Figura 4) (BERMINGHAM, 2002). É justamente por esse motivo que muitos fármacos têm como intuito inibir enzimas desta via, como por exemplo a Dapsona e Sulfanilamida que irão inibir a Dihidropteroato sintase. Por outro lado, embora humanos tenham a enzima dihidrofolato redutase, ela é pouco conservada com a de procariotos e portanto, moléculas como o Trimetopim, que tem como alvo a dihidrofolato redutase de microorganismos.

Figura 4 - Biossíntese de folato para bactérias em geral. As estruturas mostradas são para as enzimas que apresenta estruturas resolvidas para TB

O presente trabalho terá como foco o estudo de três enzimas da via do folato, a 7,8 Dihidroneopterina aldolase (DHNA), figura 5, Dihidropteroato sintase (DHPS) e a Dihidrofolato redutase (DHFR). As inibições de DHPS e DHFR acarretam a supressão da produção do tetrahidrofolato e por isso são muito utilizadas como alvo de diversos fármacos, como por exemplo a dapsona e as sulfonamidas. No caso da DHNA, apesar de ainda não ser utilizada como alvo de fármacos, esta enzima pode representar uma nova alternativa neste quesito (FALCÃO, 2017).

DHNA é uma aldolase que catalisa a conversão do 7,8 dihidroneopterina (DHNP) em 2-amino-4-hidroxi-6-hidroximetil-7,8-hidropteridina (HP), entretanto esta enzima também é capaz de catalisar uma segunda reação pela epimerização do carbono 2' de seu substrato, formando DHMP, apesar da função biológica desta reação ainda ser desconhecida (FALCÃO et al., 2017)

MtDHNA geralmente adota a conformação de um octâmero na presença de seu produto (HP), entretanto, em sua forma apo, a enzima é frequentemente observada como tetramérica. É importante destacar que a conformação octamérica é formada pela união de duas subunidades tetraméricas como demonstra a figura 5 (FALCÃO et al., 2017). Esta

união é mantida e estabilizada por interações hidrofóbicas entre as cadeias laterais. Cada subunidade tetramérica é mantida quase que exclusivamente por ligações de hidrogênio e é formada por dezesseis fitas antiparalelas que se arranjam de maneira muito similar a um anel circular ou *donut*. (HENNIG et al., 1998). Por já existirem dezenas de relatos na literatura sobre a resistência de organismos à fármacos que tem como alvo a DHPS e DHFR - a DHNA pode ser uma opção atrativa para o desenvolvimento de novos fármacos, apesar de que estudos estruturais e do mecanismo de catálise desta enzima ainda são precários na literatura.

Figura 5 - Estrutura da MtDHNA (Adaptado de GOULDING et al., 2005). A figura ilustra uma visão superior (esquerda) que possibilita a observação das porções monoméricas (cada monômero foi colorido diferentemente), que formam a subunidade tetramérica. E a direita, uma visão lateral da enzima onde é possível visualizar a união das duas subunidades tetraméricas, aonde o sítio ativo se localiza na interface das duas subunidades.

Por outro lado, a DHPS é vastamente descrita na literatura e bem caracterizada. Esta enzima catalisa o ataque nucleofílico do grupo amino da molécula de PABA (ácido *p*-aminobenzoico) para deslocar o grupo pirofosfato da molécula de 6-hidroximetil-7,8-dihidropterina fosfato formando o dihidropteroato. DHPS possui muitas porções flexíveis no sítio ativo que tem crucial importância no mecanismo catalítico. Podemos destacar as alças 1 e 2, enquanto que o primeiro serve como uma “tampa” no sítio ativo que permite a entrada apenas do PABA ou moléculas estruturalmente semelhantes, como as sulfonamidas. A alça 2 é responsável por posicionar o PABA corretamente, de modo a permitir interação com Lys220 (YUN, 2012). Ambas as alças são estabilizadas pelo cofator da enzima, o Mg^{2+} .

Algumas estruturas cristalográficas para esta enzima foram obtidas, entre elas para *M. tuberculosis* (MTB) (BACA et al., 2000), *E. coli* (ACHARI et al., 1997) e *S. aureus* (HAMPELE et al., 1997). Com relação à ligação da molécula de PABA, apenas recentemente foram obtidas informações sobre o mecanismo de ligação desse substrato

(YUN et al., 2012). Apesar de existirem diversos fármacos que tem como alvo a DHPS, como por exemplo a dapsona, já são descritos muitos organismos que possuem mutações nesta enzima, aumentando a resistência a estas substâncias.

Em 1940, Woods e Fildes descobriram que o ácido p-aminobenzoico (PABA) é um potente antagonista das sulfas, devido a sua semelhança estrutural (Figura 6), e que, portanto, iriam competir com o PABA pela ligação da Dihidropteroato sintase (DHPS), suprimindo a produção do tetraidrofolato, o produto final da via, demonstrando assim, que as sulfonamidas e a dapsona, podem ser utilizadas para o tratamento de diversas doenças, como hanseníase (RENGARAJAN, 2004)

Figura 6 - Da esquerda para direita, estrutura do PABA, sulfanilamida e dapsona. É possível observar a semelhança das estruturas das sulfas, principalmente o grupo amino ligado ao grupo fenil, que mimetizam a estrutura do PABA

A estrutura para a enzima DHPS de *M. tuberculosis* (MtDHPS) foi obtida por Baca et al., 2000, em complexo com 6-hidroxi metilpterina monofosfato abrindo oportunidades para o desenho racional de inibidores para esta enzima, uma vez que ela é essencial para o crescimento de MTB. Entretanto, tentativas de se obter a estrutura em complexo com PABA ou sulfonamidas também foram efetuadas, mas sem sucesso (BACA et al., 2000).

Assim, tanto a conformação da 7,8-dihidropterina pirofosfato e do PABA para a MtDHPS ainda não são conhecidas, muito menos informações a respeito da ligação aos fármacos sulfonamidas, tal como a dapsona. Além disso, MtDHPS é resistente à ação das sulfonamidas e dapsona entretanto estes mesmo inibidores são capazes de inibir MIDHPS apesar de sua alta identidade sequencial com a enzima de MtDHPS

Em adição, quando é realizado o alinhamento das sequências de aminoácidos da MtDHPS e MIDHPS observa-se que estas enzimas apresentam identidade superior a 80% (Figura 7), e assim seria esperado que as sulfonamidas, como a dapsona, atuassem com mecanismo similar em ambas as enzimas, entretanto, este evento não ocorre.

Outro microorganismo que possui uma DHPS com alta similaridade sequencial à MIDHPS é *Bacillus anthracis* (BA). O uso deste último em guerras biológicas e bioterrorismo foi primeiramente reconhecido em 2001, durante a série de ataques terroristas contra os Estados Unidos quando endósporos do microorganismo foram misturados com talco e enviados, via correspondências, a órgãos de imprensa e governamentais (MADIGAN, 2010). Departamentos Federais Americanos como o Departamento de Serviços Humanos e Saúde (HHS), Departamento Americano de Agricultura (USDA) e o Centro de Controle de Doenças (CDC) classificam o BA com o nível máximo de potencial risco de ataque terrorista, Tier 1, por ter capacidade de causar severa ameaça à saúde pública com consequências econômicas e infraestruturais devastadoras (CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2017), além de ser naturalmente resistente ao tratamento convencional (VALDERAS et al, 2008).

Como a DHPS de *Bacillus anthracis* (BaDHPS) já possui várias estruturas no banco de dados, apenas uma foi obtida em complexo com uma sulfa por Hammoudeh e colaboradores em 2014. Entretanto, a sua alta similaridade sequencial em relação a MIDHPS (Figura 7) faz se possível utilizar a BaDHPS como modelo para as realizações das mutagêneses sítio dirigida com o intuito de se estudar a possível relação dos resíduos que não são conservados no alinhamento das sequências, mas que interagem com a molécula de *pABA*, como a T53 em MIDHPS ou BaDHPS e S53 em MtDHPS, com mecanismo de sensibilidade a sulfonamidas.

Figura 7 - Alinhamento sequencial das enzimas BaDHPS, MtDHPS e MIDHPS. Os resíduos em vermelhos mostram aqueles que são conservados entre todos os organismos. A seta em verde demonstra a região que é descrita em casos de resistência de MIDHPS à dapsona, posições 53 e 55. Além disso, é possível observar também as regiões codificadoras de cada fita β e α -hélice. Fonte: Figura gerada pelo programa **ESPrict**, disponível em: <http://esprict.ibcp.fr>

Muitos trabalhos, como o de Nakata et al., 2010, Williams et al., 2000 e Chaitanya et al., 2015, têm reunido esforços para estudar as mutações desta enzima e, com isso, tentar elucidar o processo de resistência. Apesar de nenhum dos autores ter tido sucesso em conseguir estruturas das enzimas mutantes, foi possível demonstrar através de outros métodos, que os códons com maior relação a resistência são: 53 e 55. Ao mesmo tempo que

esses códons são muito importantes devido ao fato de causarem alterações muito próximas ao sítio ativo, estudos mais detalhados envolvendo essas mutações ainda necessitam ser realizados (NAKATA, 2010).

Em estudo realizado por Willians et al., 2000, foi possível demonstrar que a troca na posição 53 de uma treonina por uma isoleucina eleva o MIC (Concentração Mínima Inibitória) em cerca de 10 vezes e o IC₅₀ (Metade da Concentração Inibitória Máxima) torna-se 2 vezes maior quando comparado com a cepa selvagem. Enquanto que a troca na posição 55 de uma Prolina por uma arginina na cepa mutante eleva em 64 vezes o MIC e 68 vezes o IC₅₀ em relação a cepa selvagem.

Em um estudo teórico, outros mutantes também foram relacionados com o aumento de resistência a dapsona, como por exemplo a troca da treonina 53 por alanina, isoleucina ou valina. No caso desses mutantes, T53A, T53I e T53V, todos trouxeram uma alteração no tamanho do sítio de ligação da DHPS alterando, assim, o mecanismo de ligação da dapsona com a enzima (CHAITAINYA, 2015). Desta maneira, seria muito interessante um estudo experimental que confirme ou refute a alteração da ligação da dapsona como descrito acima.

Por outro lado, Nakata et al, 2010, demonstrou um mutante mais suscetível a ação da dapsona (quando comparado ao selvagem) em DHPS de *M. smegmatis*, organismo que pode ser utilizado como modelo de *M. leprae*, uma vez que ambas as DHPSs possuem alta similaridade sequencial. A troca de uma treonina 53 por serina (T53S) resultou em um MIC de 0,25ug/ml, enquanto que o selvagem foi de 0,5ug/ml. É importante frisar que apesar desta diminuição do MIC, o mecanismo de suscetibilidade ainda é desconhecido. Os resíduos 53 e 55 estão localizados em uma alça flexível 2, muito próximo do sítio ativo, como pode ser visualizado na figura 8. Yun e colaboradores, em 2012, demonstraram que a alça 2 da DHPS de *Yersinia pestis* tem como função estabilizar e posicionar o PABA no sítio ativo. Além disso, a prolina 72 e a treonina 70 são altamente conservadas pois fazem parte do sítio catalítico do PABA na enzima. A alça 1, também destacado na figura 8, funciona como uma “tampa”, permitindo apenas a entrada do PABA ou moléculas semelhantes no sítio ativo, como as sulfas.

Figura 8 - Sobreposição das enzimas BaDHPS (Laranja) e MtDHPS (Azul). É nítida a alta semelhança entre ambas as enzimas, entretanto podemos observar em A que em BaDHPS há duas folhas- β (destacada em amarela) que funcionam como o “fundo” do barril. A estrutura em verde indica a alça 2, região na qual estão localizadas as mutações realizadas no presente projeto. Como a MIDHPS tem alta similaridade com BaDHPS espera-se que a estrutura de MIDHPS siga o mesmo padrão que estas duas enzimas. A direita, uma visualização lateral das estruturas. Estrutura de BaDHPS obtida por BABA OGLU et al, 2004 e MtDHPS obtida por BACA et al, 2000

Por fim, a última etapa da via de folato é realizada pela DHFR, que é responsável por catalisar reação de redução dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) da 7,8 dihidrofolato para tetrahidrofolato, na qual será utilizada pela célula na biossíntese de diversos componentes vitais, segundo CAPASSO, 2013. De acordo com esse mesmo autor, diferentemente da DHPS que não possui uma forma equivalente em humanos, a DHFR é encontrada expressa em quase todos os organismos sendo eles procariotos ou eucariotos. A sequência da enzima humana é 30% similar com a de *Escherichia coli*. Quando um alinhamento estrutural é realizado é possível observar essa semelhança (Figura 9).

Em 1960, a trimetopina (TMP) foi introduzida para o combate de diversas doenças infecciosas, uma vez que este fármaco tem como alvo a DHFR de bactérias, fungos e protozoários. O cicloguanil é uma outra substância com ação inibitória da DHFR e

atualmente é utilizado no tratamento da malária, além disso este inibidor possui uma estrutura semelhante de TMP.

A DHFR é uma enzima pequena, de aproximadamente 20kDa e apresenta-se na forma monomérica, sendo que é dividida em dois subdomínios, o domínio de ligação à adenosina, na qual a porção adenosina do NADPH é ligada, e o domínio loop, onde se encontram três alças que se movem para regular o sítio ativo (CAPASSO, 2013). Apesar do TMP ter papel fundamental no combate de diversas doenças, este fármaco não tem ação sobre a DHFR de tuberculose (MtDHFR).

Figura 9 - Sobreposição estrutural das DHFRs de *Homo sapiens*, em verde, e de *Mycobacterium tuberculosis*, em magenta. É possível observar que apesar de serem espécie distantes, há uma grande similaridade entre as duas enzimas. Fonte: DHFR de *Homo sapiens* por CODY, V. 2009 e DHFR de *M. tuberculosis* por Li, R. 2000

O domínio loop é extensamente estudado devido ao fato de ter fundamental importância na catálise e na formação de microambientes no sítio ativo. São três os principais alças: MET20 (L1), F-G (L4) e G-H (L5) (DIAS et al., 2014). Além disso, estudos indicam que os movimentos destas alças variam de organismos para organismos, sendo muito flexíveis. Dias et al., 2018, descrevem que em MtDHFR os movimentos das alças são muito restritos, quase que rígidos, resultando em dois estados: aberto e fechado.

Em MtDHFR, observou-se que a porção nicotinamida do NADPH realiza interações com compostos ligados no sítio ativo (SCHENELL et al., 2014) e isso pode resultar em mudanças conformacionais na enzima, permitindo que as alças se fechem sobre o sítio ativo, posicionando o dihidrofolato no sítio ativo (DIAS et al., 2014). Além disso, é descrito que na conformação aberta Tyr100 realiza-se uma fraca ligação com a

TMP interferindo estericamente com o grupo nicotinamida do NADPH. Entretanto, quando a enzima adota a conformação fechada, espera-se que este mesmo aminoácido se posicione ainda mais perto do grupo nicotinamida, o que resultaria na rotação do grupo pirofosfato. Contudo, como estruturas em complexo na conformação fechada com inibidores que apresentem uma estrutura rígida, como a pirimetamina ou cicloguanil ainda não foram obtidas é impossível saber se o engatamento do grupo nicotinamida causaria uma mudança na conformação desses ligantes.

CONCLUSÃO

Apesar dos experimentos de DLS para a PaDHNA terem sido realizados com sucesso, o equipamento possui uma limitação para identificar moléculas com peso molecular abaixo de 60kDa e raio inferior a 1 μ m, sendo assim, as amostras sem seu substrato 7,8 dihidroneopterina, não podem ser analisados com confiabilidade, uma vez que seria esperado um tamanho de 50kDa. Contudo o DLS demonstrou que quando há a presença do substrato na amostra, a enzima adotou um enovelamento hexamérico com peso molecular de 75kDa. Isso demonstra que provavelmente PaDHNA pode adotar um tipo diferente de estado oligomérico daquele normalmente descrito na literatura, ou seja, tetramérico e octamérico. Os dados de centrifugação analítica ainda estão sendo analisados pela nossa colaboradora Juliana Fattori, e devem confirmar se esta enzima possui um estado oligomérico diferente do descrito uma vez que esta técnica não possui limitação de peso molecular.

Para os estudos de DHPS, devido ao fato da alta similaridade sequencial entre as enzimas de MTB, Ml e Ba (modelo de Ml), seria esperado que as drogas sulfonamidas, como a dapsona atuassem de maneira similar em ambas as enzimas. Entretanto, este evento que não ocorre. Para se estudar o porquê disso, é possível utilizar estudo estrutural e biofísico. Como não foi possível de obter a estrutura de BaDHPS em complexo com ligantes, pôde-se concluir, utilizando apenas as análises de ITC, que a troca do resíduo não conservado treonina (encontrado Ba e Ml) por serina (encontrado em MTB) pode não ser a responsável pela insensibilidade de MTB à dapsona.

Por outro lado, a mutação do resíduo conservado prolina (encontrado em todos os três organismos) foi suficiente para trazer uma menor afinidade de ligação do ácido pteórico a BaDHPS. Com isso, é possível concluir que apenas a troca desse resíduo por uma arginina pode ser responsável pela resistência das MIDHPS mutantes às drogas sulfonamidas. É importante destacar que a resistência de MtDHPS e sensibilidade de MIDHPS e BaDHPS a essas drogas podem ser um conjunto fatores, sendo assim, estes resíduos podem ou não estar envolvidos nesses mecanismos de resistência quando acompanhados de outras diferenças entre ambas as enzimas.

Com a obtenção da estrutura fechada de MtDHFR:NADPH:Cicloguanil foi possível complementar os resultados obtidos por DIAS et al., 2014. A análise da estrutura obtida neste trabalho permite avaliar as diferenças estruturais em ambas as conformações,

principalmente nos movimentos de L1 e L4 e as mudanças no sítio ativo, como por exemplo a leve rotação da Tyr100. Confirmamos também que o grupo nicotinamida de NADPH tem fundamental importância no sítio ativo da enzima, e que, quando não sofre impedimento estérico da Tyr100, realiza uma interação edge- π com o grupo clorobenzil de maneira a alterar em cerca de 15° a posição do cicloguanil.

Em adição a isso, com o correto posicionamento do grupo nicotinamida, foi possível verificar a aproximação de alguns resíduos do cicloguanil, sendo eles Ser49, Thr46 e Leu50 e a mudança conformacional da Glu28.

REFERENCIAS*

- ACHARI, A. et al. Crystal structure of the anti-bacterial sulfonamide drug target dihydropteroate synthase. **Nat Struct Biol**, v. 4, p. 490-497, 1997.
- BABAOGLU, K. et al. Crystal Structure of 7,8 Dihydropteroate Synthase from *Bacillus anthracis*: Mechanism and Novel Inhibitor Design. **Structure**, vol. 12. 2004
- BACA, A.M. et al. Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropteroate synthase in complex with pterin monophosphate: New insight into the enzymatic mechanism and sulfa-drug action. **J Mol Bio**, v. 302, 1193-1212, 2000.
- BERMINGHAM, A.; DERRICK, J.P. The folic acid biosynthesis pathway in bacteria: evaluation of potential for antibacterial drug discovery. **BioEssays**, v. 24, p. 637-648, 2002.
- BOURNE, C. Utility of the biosynthetic folate pathway for target in antimicrobial discovery. **Antibiotics**. 2014
- CAPASSO, C; SUPURAN, C. Sulfa and trimethoprim-like Drugs – Antimetabolites Acting as Carbonic Anhydrase, Dihydropteroate Synthase and Dihydrofolate Reductase Inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medical Chemistry**. 2013
- Center of Disease Control and Prevention. Anthrax. 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov anthrax/index.html>
- Center of Disease Control and Prevention. *Pseudomonas aeruginosa* in Healthcare Settings. 2014. Disponível em: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/pseudomonas.html>
- CHAITANYA, S.V. et al. Computational Modeling of Dapsone Interaction With Dihydropteroate Synthase in *Mycobacterium leprae*; Insights Into Molecular Basis of Dapsone Resistance in Leprosy. **Journal of Cellular Biochemistry**, 2015
- CIMPERMAN, P; MATULIS, D. Proteina Thermal Denaturation Measurements via a Fluorescent Dye. In: PODJARNY, A. Biophysical Approaches Determining Ligand Binding to Biomolecular Targets: Detection, Measurement, and Modelling. 1 ed: Royal Society of Chemistry, 2011. Cap.8, p. 247-273
- CODY, V. et al. The Z isomer of 2,4-diaminofuro[2,3-d]pyrimidine antifolate promotes unusual crystal packing in a human dihydrofolate reductase ternary complex. **Acta Crystallography**. 2009
- COLE, J. et al. Analytical Ultracentrifugation: Sedimentation Velocity and Sedimentation Equilibrium. **Methods in Cellular Biology**. 2008
- CROFT, S.L. Public-private partnership: from there to here. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, suppl 1, S9-14, 2005.
- DESMOULIN, S. et al. The human proton-coupled folate transporter. **Cancer Biology and therapy**. 2012
- DIAS, M.V. et al. *Mycobacterium tuberculosis* dihydrofolate reductase reveals two conformational states and a possible low affinity mechanism to antifolate drugs. **Structure**. 2013

DUNCAN, K. Progress in TB drug development and what is still needed? **Tuberculosis**, v. 83, p. 201-207, 2003.

DUTTA, A; ROSGEN, J; RAJARATHMAN, K. Using isothermal titration calorimetry to determine thermodynamic parameters of protein-glycosaminoglycan interactions. **Methods Molecular Biology**. 2015

EDWIN, A.; MURPHY, K. Isothermal Titration Calorimetry, In: NIENHAUS, G. Protein-Ligand Interactions. Ed 1. 2005

ESTAHBANATI, H. et al., Frequency of *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics. 2001

FALCÃO, V; VILLELA, A. Validation of *Mycobacterium tuberculosis* dihydroneopterin aldolase as a molecular target for anti-tuberculosis drug development. **Biochemical and Biophysical Research Communication**. 2017

FEHN, A.; THURMANN, P.; RAZUM, O. Editorial: Drug development for neglected diseases: a public health challenge. **Trop Med Int Health**, v. 11, p. 1335-1338, 2006.

FIOCRUZ, Doenças Negligenciadas. 2013. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas>

GAO, L; ROCHE, H. The ITC Experiment. 2015. <https://www.cif.iastate.edu/other-insts/vp-itc>. Acesso em: 20/12/2017.

GHISAIDOOBE, A; CHUNG, S. Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins: A Focus on Förster Resonance Energy Transfer Techniques. **Internation Journal of Molecular Sciences**. 2014

GOLDBURG, W. Dynamic Light Scattering. **American Journal of Physics**. 1999

GOULDING, C.W., et al. Regulation by oligomerization in a mycobacterial folate biosynthetic enzyme. **J.Mol.Biol.** 349: 61-72. 2005

HAMPELE, I.C. et al. Structure and function of the dihydropteroate synthase from *Staphylococcus aureus*. **J. Mol Biol**, v.268, p. 21-30, 1997.

HENNIG, M, et al. Crystal Structure and Reaction Mechanism of 7,8Dihydroneopterin Aldolase from *Staphylococcus aureus*. **Nature Structure and Molecular Biology**, 357-362. 1998

KURSHID, S. et al. Porous Nucleating Agents for Protein Crystallization. **Nature America**. 2014

LAKOWICZ, J. Quenching of Fluorescence. **In: Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Springer. 1983

LI, R. et al. Three-dimensional structure of *M. tuberculosis* dihydrofolate reductase reveals opportunities for the design of novel tuberculosis drugs. **Journal of Molecular Biology**. 2000

MADIGAN, M; MARTINKO, J. Brock Biology of Microorganisms. 12 ed. Artmed. 2010

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doenças Infecciosas e Parasitárias – 8º Edição do Guia de Bolso. 2010

NAKATA, N.; KAI, M.; MAKINO, M. Mutation analysis of the *Mycobacterium leprae* *folP1* gene and dapsone resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, p. 762-766, 2011.

NIESEN, H; BERGLUND, Helena; VEDADI, M. The use of Differential Scanning Fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. **Structural Genomics Consortium**, 2007

NOPPONPUNTH, VANIDA, et al. "Cloning and expression of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae* dihydropteroate synthase in *Escherichia coli*." **Journal of bacteriology** 181.21 (1999): 6814-6821.

PECORA, R. Dynamic light scattering. **Plenum Press**. v. 1, p. 394, 1985.

PRIVÉ, GILBERT. Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins. ScienceDirect. 2007

RAMBUKKANA, A. et al., Contact-dependet demyelination by *Mycobacterium leprae* in the absence of immune cells. **Science**, v. 296, p. 927-931, 2002.

RENGARAJAN, J; SASSETTI, C, et al. The Folate Pathway is a Target for Resistance to the Drug Para-Aminosalicylic Acid (PAS) in Mycobacteria. **Molecular Microbiology**. v.53. 2004

ROBERT, X., GOUET, P. (2014) "Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server". *Nucl. Acids Res.* **42**(W1), W320-W324. doi: 10.1093/nar/gku316

ROSSI, M; AMARETTI, A; RAIMONDI, S. Folate Production by Probiotic Bacteria. **Nutrients** 118-134. 2011

SEYDEL, J.; BUTTE, W. p-Aminobenzoic Acid Derivatives. Mode of Action and Structure-Activity Relationships in a Cell-Free System (*Escherichia coli*). **Journal of Medical Chemistry**. 1977

TROUILLER, P. et al., Drugs for neglected diseases: a failure of the market and a public health failure? **Trop Med Int Health**, v. 6, p.945-951, 2001.

VALDERAS, M.W. et al. Genetic Basis for Sulfonamide Resistance in *Bacillus anthracis*. **Microbial Drug Resistance**, v.13, 2008

VELÁZQUEZ-CAMPOY, A; OHTAKA, H. et al. Isothermal titration calorimetry. **Currente Protocols in Cell Biology**. Unit 17.8. 2004

WILLIAMS, D.L. et al., Dihydropteroate synthase of *Mycobacterium leprae* and dapsone resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, p. 1530-1537, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Statistics** 2014, 2014. Global Tuberculosis Report, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Statistics** 2015, 2016

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Statistics** 2016, 2017

YUN, M.-K. et al., Catalysis and sulfa drug resistance in dihydropteroate synthase: crystal structures reveal the catalytic mechanism of DHPS and the structural basis of sulfa drug action and resistance. **Science**, v. 335, p. 1110-1114, 2012.

ZHENG, L. et al. An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. **Nucleic Acid Research**, v.32, no14, 200