UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo do mecanismo e inibição da enzima diidroorotato
desidrogenase de *Leishmania major***

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Química e Física
Biológica.

Orientada: Renata Almeida Garcia Reis
Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina
Nonato Costa

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas em 05/07/2016. A versão original encontra-se disponível na
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Almeida Garcia Reis, Renata

Estudo do mecanismo e inibição da enzima diidroorotato desidrogenase de *Leishmania major*. Ribeirão Preto, 2016. 184p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química e Física Biológica.

Orientadora: Nonato, Maria Cristina

1. Diidroorotato desidrogenases classe 1A. 2. Mecanismo. 3. Inibição.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Renata Almeida Garcia Reis

Estudo do mecanismo e inibição da enzima diidroorotato desidrogenase de *Leishmania major*

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Química e Física
Biológica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina
Nonato Costa

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Cláudio e Izilda, agradeço pelo apoio incondicional e por terem me ensinado a estudar.

À minha orientadora, Cris Nonato, por esses anos de convivência. Agradeço pela orientação, dedicação e pelo estímulo constante. Agradeço pelas nossas muitas discussões e por tudo o que me foi ensinado da maneira mais generosa e paciente.

Ao Bill Hunter, pela orientação ao longo do período em que estive em Dundee. Agradeço pela receptividade, pela confiança, pela alegria em todas as discussões e pelas recomendações sobre os lugares mais bonitos da Escócia.

Ao time de *screening* do *Drug Discovery Unit* - DDU, pela colaboração e em especial à Leah Torrie, pela imensa ajuda no processo de otimização do ensaio de HTS.

À Milagros Medina e Patrícia Ferreira pelo período em que estive em Zaragoza. Agradeço por terem me apresentado o universo das flavoproteínas com tanta dedicação e seriedade.

Ao Professor Caliri, meu orientador durante a iniciação científica e mestrado, por todos os ensinamentos sobre os primeiros princípios em estrutura de proteínas e pelas conversas sobre ciência.

A todos os meus professores, desde os anos do colégio, agradeço por compartilharem suas perspectivas acerca de tantos assuntos.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho do LCP, de Zaragoza e de Dundee, agradeço por compartilharem comigo tantos conhecimentos, por me ajudarem no dia a dia no laboratório e por me ensinarem sobre suas culturas.

Às minhas amigas Pam, Carol e Elaine, pela presença constante.

Aos amigos de Ribeirão pela alegria da convivência.

Ao meu irmão Vitor e aos meus sobrinhos, Caio e Ju, pela paciência, compreensão e carinho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e ao programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade da realização deste projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

“... todos os homens são seres alados por nascimento, e que só se esquecem da vocação pelas alturas quando enfeitiçados pelo conhecimento das coisas já sabidas” - Rubem Alves (A alegria de ensinar).

RESUMO

ALMEIDA GARCIA REIS, R. **Estudo do mecanismo e inibição da enzima diidroorotato desidrogenase de *Leishmania major***. 2016. 184f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Diidroorotato desidrogenases (DHODHs) catalisam a quarta e única reação de oxidorredução na via de síntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina, que envolve a oxidação do diidroorotato (DHO) a orotato (ORO) em um mecanismo dependente do cofator FMN e de aceptores de elétrons. A relevância de pirimidinas para a proliferação e manutenção celular determina a DHODH como um potencial alvo terapêutico. DHODHs são divididas em duas classes baseado em comparações estruturais e na sequência de resíduos: classe 1, a qual é subdividida em classe 1A e 1B, e classe 2. A proteína utilizada como modelo em nosso estudo sobre as DHODHs de tripanosomatídeos classe 1A é a enzima de *Leishmania major* (*LmDHODH*). As metas principais desse trabalho foram de contribuir para a compreensão sobre o mecanismo de ação das DHODHs de classe 1A e propor estratégias de inibição seletiva. Inicialmente, ensaios no estado estacionário e pré-estacionário foram realizados para caracterização do ciclo catalítico da *LmDHODH* e permitiram a análise das etapas redutivas e oxidativa de forma independente e sua comparação com o ciclo global. Foi também analisada a interação da *LmDHODH* com os produtos da reação por meio de ensaios de cinética, titulação espectral e titulação isotérmica calorimétrica. Após análises topológicas baseadas na estrutura cristalográfica da *LmDHODH*, diferentes mutantes foram construídos e caracterizados estruturalmente e cineticamente a fim de investigar a importância de alguns sítios na conformação protéica. Durante a etapa de busca de inibidores, bibliotecas químicas de compostos foram analisadas por meio de interferometria de biocamada e ensaio enzimático. Considerando os resultados obtidos, foi possível pela primeira vez identificar um mecanismo cinético cooperativamente positivo frente à ligação do DHO com coeficiente de Hill (*h*) próximo a 2. Além disso, nossos resultados mostram que o grau da cooperatividade na ligação do DHO é afetado pelo ORO. A comparação entre os parâmetros obtidos para o estado estacionário e pré-estacionário aliada aos estudos da interação da *LmDHODH* com os produtos da reação, sugerem que a liberação do ORO é a etapa limitante na velocidade global da reação, o que não é verdade para a enzima humana (DHODH classe 2). A partir das análises dos mutantes, foi possível correlacionar o comportamento cooperativo da enzima *LmDHODH* com a conversa cruzada entre os sítios-ativos mediada pela interface dimérica. Além disso, foi possível observar que a dinâmica conformacional do *loop* catalítico é extremamente relevante no mecanismo global da reação e existe uma correlação entre os rearranjos do *loop* catalítico e a interface dimérica. Nossos resultados fornecem uma importante contribuição para o entendimento dos detalhes do mecanismo catalítico adotado pelas DHODHs de classe 1A. Eles também revelam diferenças chave no mecanismo adotado pelas enzimas de classe 1A e classe 2, os quais podem ser explorados no desenvolvimento de inibidores potentes e seletivos contra a *LmDHODH*. No que se refere à busca por inibidores, alguns *hits* foram obtidos por meio da varredura da biblioteca de fragmentos do *Drug Discovery Unit* (DDU) utilizando interferometria de biocamadas. Além disso, um ensaio enzimático de larga escala (*highthroughput*) foi desenvolvido para a *LmDHODH* e permitiu a triagem de alto desempenho nas bibliotecas de fragmentos e diversidade química. Hits foram validados por meio de ensaio de potência e bons inibidores foram encontrados em ambas as bibliotecas. As varreduras identificaram diferentes séries de compostos como pontos de partida para química medicinal e investigações estruturais. Dois hits identificados a partir da biblioteca de diversidade química apresentam excelentes valores de IC₅₀, 260 nM e 1,07 µM.

Palavras-chave: Diidroorotato desidrogenases classe 1A, mecanismo, inibição.

ABSTRACT

ALMEIDA GARCIA REIS, R. **Studies of the mechanism and inhibition of dihydroorotate dehydrogenase from *Leishmania major***. 2016. 184f. Thesis of Doctoral. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Dihydroorotate dehydrogenases (DHODHs) catalyze the fourth and only redox reaction in the *de novo* pyrimidine biosynthetic pathway, the oxidation of dihydroorotate (DHO) to orotate (ORO) through a mechanism dependent on the FMN cofactor and electron acceptors. The significance of pyrimidine for cell proliferation and maintenance determine DHODH as potential therapeutic target. DHODHs have been distinguished in two major classes based on sequence and structural comparisons: class 1, which is further divided into subclasses 1A and 1B, and class 2. The model protein in our studies on trypanosomatid class 1A DHODHs is the enzyme from *Leishmania major* (*LmDHODH*). The essential question in this study was to contribute for the understanding about the catalytic and inhibition mechanisms of class 1A DHODHs. First, steady-state and pre-steady state kinetic approaches have been used to characterize the catalytic cycle of *LmDHODH* and have allowed the comparison between the global cycle and each independent half-reaction. Also, the interaction of *LmDHODH* with the products of the reaction was analyzed by kinetic, spectral titration and *isothermal titration calorimetry assays*. After topographical analysis based on the *LmDHODH* crystallographic structure, different mutants were constructed and structurally and kinetically *characterized*. For inhibitor search, chemical libraries of compounds were screened by using biolayer interferometry binding and enzymatic assays. Based on our results, for the first time, steady-state kinetics analysis of class 1A allowed the observation of a positive cooperativity for DHO binding with a Hill coefficient (*h*) value close to 2. Moreover, our results show that the degree of cooperativity in DHO binding is affected by ORO. Comparison between steady and pre-steady-state parameters together with studies of interaction for *LmDHODH* with both products, suggests that ORO release is the rate-limiting step in overall catalysis with is not true to the human enzyme (class 2 DHODH). The hybrid approach used to characterize *LmDHODH* mutants allowed us to propose that the cooperative behavior is related with the cross-talk between the two active sites mediated by the dimer interface. Also, the conformational dynamics of the catalytic *loop* is very relevant in the global mechanism of the reaction and there is a correlation between catalytic loop rearrangement and dimer interface. Our results bring an important contribution for a better understanding of the detailed catalytic mechanism adopted by class 1A DHODHs. They also reveal key differences in the enzymatic mechanism adopted by class 1A and class 2 DHODHs, to be exploited in the development of potent and selective *LmDHODH* inhibitors. Regarding to inhibitors search, few hits were obtained by using screening of Drug Discovery Unit (DDU) fragment library with biolayer interferometry binding assay. Also, an end-point enzymatic assay was developed for *LmDHODH* and the optimisation carried out at the DDU provided a reliable HTP assay using both DDU's fragment library and small diversity set. Hits were validated using a potency assay with good inhibitors found using both libraries. The screens identified a number of series as starting points for medicinal chemistry and structural investigations. Two hits identified from small diversity set exhibit great IC₅₀ values, 260 nM and 1.07 μM.

Keywords: Dihydroorotate dehydrogenases class 1A, mechanism, inhibition

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Diagrama de reação. A energia livre do sistema é mostrada na coordenada vertical, e o progresso da reação é mostrado no eixo horizontal. A. Energia Livre para uma reação não catalisada. B. Perfil de energia livre para uma reação catalisada. C. Perfil de energia livre para uma reação catalisada por enzima, com um intermediário. O pico na energia livre no centro da reação representa o estado de transição (*TS*) que é formado entre substrato (*S*) e produto (*P*). A velocidade da reação depende da diferença na energia livre entre o substrato e o estado de transição (*EA*). Modificado de [26] 12
- Figura 2. Representação esquemática do metabolismo em *Leishmania donovani*. A linha dupla curvada representa a membrana plasmática do parasita, enquanto as setas indicam a função bioquímica ou a atividade de transportador de: CPS (1), ACT (2), DHO (3), DHODH (4), UMPS (5 e 6), transportador de nucleosídeo 1 (7), transportador de uracil (8), citidina desanimase (9), uridina fosforilase (10), nucleosídeo hidrolase (11), e UPRT (12). Modificado de [40]..... 19
- Figura 3. Flavina mononucleotídeo (FMN) nas formas oxidada (A) e reduzida (B). Em C é possível observar o espectro de varredura para FMN e FMN reduzido. A flavina oxidada apresenta dois picos característicos de absorção (~ 360 nm e ~ 450 nm), sendo que estes picos são perdidos quando a flavina é reduzida..... 22
- Figura 4. Quadro geral da reação catalisada pela *LmDHODH*. Nesse processo a enzima complexada ao FMN em sua forma oxidada (E-Flox) é reduzida pelo primeiro substrato, diidroorotato (DHO). O produto da primeira reação, orotato (ORO), é liberado antes que o segundo substrato se ligue ao sítio ativo. Na segunda etapa da reação, a enzima complexada ao FMN reduzido (E-Flred) é reoxidada pelo fumarato (FUM) e o segundo produto, succinato (SUC), é liberado [50] 23
- Figura 5. Representação em *cartoon* dos monômeros da (A) *HsDHODH* – DHODH classe 2 e (B) *LmDHODH* – DHODH classe 1A. (PDB ID: 2BOM e 3TQ0, respectivamente). Em ambos os casos o sítio ativo é localizado no topo do barril α/β , e contém uma molécula de FMN. A entrada do sítio ativo é protegida por um *loop* catalítico, representado em ciano. Na

*Hs*DHODH em A, é possível observar na região N-terminal o domínio de membrana, colorido em verde 26

Figura 6. Interações entre DHODH e o produto da reação, ORO. Resíduos presentes na enzima humana estão representados em fonte negrito e da enzima *Lm*DHODH em fonte itálico. Modelo baseado nas estruturas tridimensionais das enzimas complexadas com o produto da catálise, PDB ID: 2FPV (humana) e 3GZ3 (*L. major*). Figura adaptada de [73]... 27

Figura 7. Regiões independentes na DHODH classe 1A, em destaque no dímero. O sítio ativo (S1), uma extensão da região S1 (S2), a região atrás do *loop* catalítico (S3), uma extensão da região S3 (S4) e a região localizada na interface dimérica (S5) estão indicadas em rosa, azul, laranja, verde e vermelho, respectivamente [73] 28

Figura 8. Fluxo experimental implementado durante os estudos do mecanismo de reação da enzima *Lm*DHODH 36

Figura 9. Esquema do equipamento de *stopped-flow*. Os reagentes são lançados para uma câmara de mistura por duas seringas e a reação é monitorada em um intervalo de tempo muito curto, ordem de milissegundos. Modificado de [94] 39

Figura 10. A. Tonômetros B. Aparato de anaerobiose C. Equipamento de *stopped-flow*..... 40

Figura 11. Biblioteca de mutantes da *Lm*DHODH. A. Mutantes da interface dimérica Q139A, Y142A, F170A, D171A e H174A. B. Mutantes do sítio S2, L72F e C150A; e mutante do sítio S3, K215F 45

Figura 12. Fluxo experimental implementado durante os estudos com os mutantes para a *Lm*DHODH..... 46

Figura 13. Representação esquemática da técnica de *overlap extension* [96] 47

Figura 14. Representação esquemática de um poço da placa *Cryschem* utilizada nos experimentos de cristalização 51

Figura 15. Representação esquemática de um poço da placa <i>Cryschem</i> utilizada nos experimentos de cristalização	54
Figura 16. Esquema da detecção do sinal no BLI[109]. A. A luz refletida é recebida pelo instrumento. B. Perfil de interferometria na ausência de composto (azul) e na presença de composto que se liga a proteína (vermelho) C. Resultado final do ensaio dado em termos da variação no comprimento de onda ($\Delta\lambda$) em nm contra tempo (segundos)	55
Figura 17. Ensaio enzimático alternativo utilizando DCIP (2,6 - dicloroindofenol). A redução do DCIP a DCIPH ₂ é monitorada pelo decaimento da absorção a 610 nm.....	59
Figura 18. <i>Multidrop dispenser</i> (Thermo Scientific) e <i>small tube dispensing cassettes</i> (Thermo Scientific) utilizados para dispensar as soluções durante o <i>HTS</i>	62
Figura 19. Leitor de placas para <i>HTS PHERAstar</i> (BMGLabtech)	63
Figura 20. Plataforma inicial para o <i>HTS</i> com <i>LmDHODH</i> . Os quadrados destacados em lilás representam os pontos que foram trabalhados durante a otimização	63
Figura 21. Plataforma desenvolvida para o <i>HTS</i> com <i>LmDHODH</i> após otimização. A plataforma foi testada em um ensaio piloto prévio à realização do <i>HTS</i>	65
Figura 22. Placa utilizada no ensaio piloto no processo de otimização o <i>HTS</i> utilizando como alvo a <i>LmDHODH</i>	65
Figura 23. Placa utilizada no ensaio de dose-resposta dos <i>hits</i> obtidos na varredura das bibliotecas <i>EasySet</i> e <i>FragSet</i> tendo como alvo a <i>LmDHODH</i>	68
Figura 24. Espectro de absorção UV/Visível para <i>LmDHODH</i> (~20 μ M). O ambiente químico do FMN afeta o pico máximo de absorbância em cada flavoproteína. Para a <i>LmDHODH</i> o pico foi observado a 458 nm, de forma que o coeficiente de extinção molar para esta enzima foi determinado neste comprimento de onda ($\epsilon_{458\text{nm}} = 11722 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).....	70

Figura 25. Caracterização da cinética do estado estacionário para a enzima *LmDHODH*. (A) Taxas iniciais foram obtidas a concentrações fixas de fumarato (15,63 (●), 31,25 (+), 62,5 (▲), 90 (◇), 125 (■), 250 (○), 300 (★), 375 (×), 500 (▼), 600 (□) μM) e a variadas concentrações de DHO. As linhas mostram o ajuste dos dados à equação de Hill (Equação 7). (B) As taxas iniciais de reação foram medidas a concentrações fixas de DHO (15 (●), 20 (□), 25 (▲), 30 (◇), 35 (■), 40 (○), 50 (★) and 60 (×) μM) e concentrações variadas de fumarato. As linhas mostram os dados ajustados na equação de Michaelis-Menten (Equação 8)..... 71

Figura 26. Cinética no estado pré-estacionário para a reação de redução no ciclo catalítico da *LmDHODH*. (A) Monitoramento dos espectros de absorção ao longo do tempo para a redução da *LmDHODH* ($\sim 9 \mu\text{M}$) pelo DHO (125 μM) em 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,2, a 12°C sob condições anaeróbicas. O espectro inicial para a *LmDHODH* oxidada é mostrado em linhas tracejadas. A figura mostra espectros obtidos a 0,00384; 0,0166; 0,0294; 0,055; 0,934; 0,1318; 0,1574; 0,1958 e 0,2470 s após mistura enzima-DHO. As setas indicam a direção das mudanças espectroscópicas. A figura em detalhe à direita mostra a evolução da reação em 458 nm (eixo da esquerda, linha) e 547 nm (eixo da direita, linha em negrito). (B) Análise global da evolução dos espectros ao longo do tempo foi melhor ajustada utilizando um modelo de dois passos ($A \rightarrow B \rightarrow C$). O primeiro processo ($A \rightarrow B$) foi mais rápido e representou $\sim 80\%$ da amplitude da reação total. A figura em detalhe à direita mostra as dependências de concentrações simuladas para as três espécies espectrais. (C) Dependência de $k_{obsA \rightarrow B}$ com relação a concentração de DHO para a redução da *LmDHODH* sob condições aeróbicas (●) e sob condições anaeróbicas (Δ)..... 74

Figura 27. Mudanças espectrais ao longo do tempo para a reoxidação da *LmDHODH*. (A) Reação de oxidação da *LmDHODH* ($\sim 9 \mu\text{M}$) com excesso de DHO (18 μM) sob condições aeróbicas. Espectros foram monitorados a 0,65; 13; 27; 53; 106; 158 e 250 s após mistura com tampão. (B) Reação de oxidação da *LmDHODH* ($\sim 9 \mu\text{M}$) com excesso de DHO (18 μM) sob condições aeróbicas e na presença de fumarato (63 μM). Espectros foram monitorados a 0,65; 3,93; 7,208 e 13.76 s após mistura com substrato. As medidas foram feitas em 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,2, a 12°C. O espectro da enzima oxidada e o primeiro espectro da enzima reduzida a 0,65 s estão indicados nas linhas tracejada e pontilhada,

respectivamente. As figuras em detalhe à direita dos itens A e B mostram as reações ao longo do tempo para o comprimento de onda de 458 nm..... 75

Figura 28. Cinética no estado pré-estacionário para a reação de reoxidação da *LmDHODH*. (A) Monitoramento dos espectros de absorção ao longo do tempo para a oxidação da *LmDHODH* reduzida (~ 9 μM) pelo fumarato (500 μM). *LmDHODH* (~ 18 μM) foi previamente reduzida com DHO (36 μM). Setas indicam a direção das mudanças espectroscópicas. Espectro foi monitorado a 0,001; 0,009; 0,062; 0,11; 0,16; 0,21; 0,52; 1,03 e 1.96 s após mistura com substrato. A reação foi analisada em 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,2 a 12°C sob condições anaeróbicas. (B) Análise global da evolução dos espectros ao longo do tempo foi melhor ajustada utilizando um modelo de dois passos ($A \rightarrow B \rightarrow C$). O primeiro processo ($A \rightarrow B$) foi mais rápido e representou ~80 % da amplitude da reação total. O segundo processo ($B \rightarrow C$) foi mais lento e não apresentou dependência com relação à concentração de fumarato. (C) Dependência de $k_{obsA \rightarrow B}$ com relação à concentração de fumarato para a reação de reoxidação da *LmDHODH* 76

Figura 29. (A) Diferenças no espectro observadas após adição de 6,3; 12,6; 18,8; 31,2; 62,6; 106,3; 168,8 e 356,3 μM de ORO em 14 μM *LmDHODH*. (B) Mudanças na absorção mediante titulação de ORO em *LmDHODH* mostram um perfil hiperbólico dependente da concentração de ligante. O aumento observado na absorção a $\Delta A_{516-452 \text{ nm}}$ (●) foi ajustado a uma curva de complexação teórica (Equação 11) 78

Figura 30. Isoterma para formação do complexo *LmDHODH*-ORO obtida no ITC. Perfil termodinâmico para a titulação de ORO (estoque a 950 μM) frente à *LmDHODH* (65 μM). Os dados foram ajustados considerando um modelo de um ligante por sítio 79

Figura 31. Efeito da dependência da concentração de ORO nas velocidades observadas de formação do complexo *LmDHODH*-ORO. Os valores de k_{obs} foram obtidos com base na análise global da evolução spectral para a formação do complexo. A linha sólida foi obtida por análises de regressão linear dos dados experimentais (Equação 13). As reações foram realizadas em 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,2 a 12°C..... 79

Figura 32. (A) Inibição da *LmDHODH* pelo produto da reação ORO. Dados foram obtidos a diferentes concentrações de ORO 0 (▲); 7,8 (○), 15,63 (■); 31,25 (△); 62,5 (●) and 125 (□) μM na presença de fumarato (500 μM) como aceptor de elétrons. A figura em detalhe à direita mostra os diferentes valores do coeficiente de Hill para cada concentração de ORO. As reações foram realizadas em 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,2 a 20 °C 80

Figura 33. Movimento do *loop* catalítico em direção à interface dimérica. Representação da superfície de Van der Waals para a DHODHs de subclasse 1A. *LmDHODH* em complexo com (A.) 4-Nitro-fenilisotiocianato (PDB ID 4EF9), *loop* catalítico em conformação fechada é mostrado em ciano; (B.) fenilisotiocianato (PDB ID 4EF8), *loop* catalítico na conformação aberta é mostrado em roxo; *Streptococcus mutant* DHODH (C.) *loop* catalítico na conformação aberta é mostrado em laranja (PDB ID 3OIX). A interface dimérica é mostrada em verde e o FMN é representado em amarelo 82

Figura 33. Movimento do *loop* catalítico em direção à interface dimérica. Representação da superfície de Van der Waals para a DHODHs de subclasse 1A. *LmDHODH* em complexo com (A.) 4-Nitro-fenilisotiocianato (PDB ID 4EF9), *loop* catalítico em conformação fechada é mostrado em ciano; (B.) fenilisotiocianato (PDB ID 4EF8), *loop* catalítico na conformação aberta é mostrado em roxo; *Streptococcus mutant* DHODH (C.) *loop* catalítico na conformação aberta é mostrado em laranja (PDB ID 3OIX). A interface dimérica é mostrada em verde e o FMN é representado em amarelo 82

Figura 34. Perfil de purificação dos mutantes de *LmDHODH* em coluna de níquel. M – Marcador de peso molecular (kDa). A. *LmDHODH*-L72F: 1) pellet 2) sobrenadante 3) efluente 4) lavagem com tampão sem imidazol 5) lavagem com tampão 25 mM de imidazol 6-8) lavagem com tampão 50 mM de imidazol 9-11) eluição com tampão 100 mM de imidazol 12-15) lavagem com tampão 500 mM de imidazol. B. *LmDHODH*-K215F: 1) pellet 2) sobrenadante 3) efluente 4) lavagem com tampão sem imidazol 5-6) lavagem com tampão 25 mM de imidazol 7-8) lavagem com tampão 50 mM de imidazol 9-16) eluição com tampão 100 mM de imidazol. C. *LmDHODH*-Q139A: 1) pellet 2) sobrenadante 3) efluente 4) lavagem com tampão 25 mM de imidazol 5-8) eluição com tampão 100 mM de imidazol. D. *LmDHODH*-H174A: 1) pellet 2) sobrenadante 3-4) efluente 5) lavagem com tampão sem imidazol 6-7) lavagem com tampão 50 mM de imidazol 8-10) eluição com tampão 100 mM de imidazol 11) lavagem com tampão 500 mM de imidazol. E. *LmDHODH*-F170A: 1) pellet

2) sobrenadante 3) lavagem com tampão sem imidazol 4) lavagem com tampão 25 mM de imidazol 5) lavagem com tampão 50 mM de imidazol 6) eluição com tampão 100 mM de imidazol 7) lavagem com tampão 500 mM de imidazol 85

Figura 35. Espectro de absorção UV/Visível para *LmDHODH* e mutantes (~ 20 μ M). Em todos os casos o pico foi observado a 458 nm, de forma que o coeficiente de extinção molar para cada uma das enzimas foi determinado neste comprimento de onda (Equação 6)..... 86

Figura 36. Perfil de fluorescência para *LmDHODH*-F170A em função do aumento da temperatura no Termofluor..... 88

Figura 37. Perfil da variação de porcentagem de intensidade de espalhamento (A) e de volume (B) em função da distribuição do diâmetro para a *LmDHODH*-F170A obtido no DLS. Proteína foi utilizada a 10 mg/mL em 50 mM HEPES pH 7,2, 150 mM NaCl. 89

Figura 38. Tamanho médio para o dímero da *LmDHODH* (PDB ID 3GYE). Medida realizada com o programa Pymol 90

Figura 39. Cristais das proteínas *LmDHODH*-K215F (A), *LmDHODH*-L72F (B), *LmDHODH*-Q139A (C), *LmDHODH*-H174A em complexo com ORO (D) e *LmDHODH*-F170A (E). Todos os cristais foram obtidos nas condições contendo 1,1-1,3 M de sulfato de lítio, 0,3 -0,45 M de sulfato de amônio, 0,1 M citrato de sódio pH5,6, exceto os cristais da *LmDHODH*-F170A (E) obtidos na condição contendo 0,1 M HEPES pH 7,5, 10% PEG e 8% etilenoglicol 91

Figura 40. Mapa de densidade eletrônica 2mFobs-DFcalc, com σ (nível de contorno) igual a 1,2, representado em azul para *LmDHODH*-L72F. Em destaque é mostrada a densidade eletrônica para o resíduo de fenilalanina 72 nas cadeias A (à esquerda) e B (à direita) do dímero 94

Figura 41. Comparação entre a estrutura obtida para *LmDHODH*-L72F e enzima nativa. (A) Representação em cartoon para a *LmDHODH*-L72F. O resíduo de fenilalanina na posição 72 é mostrado em rosa e o *loop* catalítico é mostrado em roxo. (B) Alinhamento entre *LmDHODH* (PDB ID 3TQ0 – em complexo com fumarato) e *LmDHODH*-L72F. Para a

LmDHODH, o *loop* catalítico é mostrado em azul e encontra-se na conformação fechada. Para a *LmDHODH-L72F*, o *loop* catalítico é mostrado em roxo e encontra-se na conformação aberta. Em (C) e (D) observamos a representação da superfície de Van der Waals para *LmDHODH* (PDB ID 3TQ0 – em complexo com fumarato) e *LmDHODH-L72F*, respectivamente 95

Figura 42. Mapa de densidade eletrônica $2mF_{obs}-DF_{calc}$, com σ (nível de contorno) igual a 1,3, representado em azul para *LmDHODH-K215F*. Em destaque é mostrada a densidade eletrônica para o resíduo de fenilalanina 215 nas cadeias A (à esquerda) e B (à direita) do dímero 96

Figura 43. Mapa de densidade eletrônica $2mF_{obs}-DF_{calc}$, com σ (nível de contorno) igual a 1,5, representado em azul para *LmDHODH-H174A*. Em destaque é mostrada a densidade eletrônica para o resíduo de alanina 174 nas cadeias A (à esquerda) e B (à direita) do dímero 97

Figura 44. Mapa de densidade eletrônica $2mF_{obs}-DF_{calc}$, com σ (nível de contorno) igual a 1,5, representado em azul. Em destaque é mostrada a densidade eletrônica para o ligante ORO no sítio ativo da *LmDHODH-H174A*, nas cadeias A (a cima) e B (abaixo) do dímero 97

Figura 45. Alinhamento das estruturas das enzimas *LmDHODH* em complexo com fumarato (PDB ID 3TQ0), representada em cinza e *LmDHODH-H174A* em complexo com orotato, representada em rosa. Estão destacados os *loops* catalíticos na conformação fechada para as estruturas. *Loop* em ciano, para a enzima nativa e *loop* em azul escuro para o mutante. As cadeias laterais dos resíduos da interface dimerica são também mostradas. No mutante, o resíduo de His174 foi substituído pela Ala. É possível observar uma alteração pontual na posição do Asp171 na ausência da His174. Na estrutura da enzima nativa, o Asp 171 de uma cadeia, estabelece contato com a Gln139 na base do *loop* catalítico da outra cadeia (resíduos em cinza). Este contato é perdido para o mutante (resíduos em rosa) 98

Figura 46. Mapa de densidade eletrônica $2mF_{obs}-DF_{calc}$, com σ (nível de contorno) igual a 1,0, representado em azul para *LmDHODH-Q139A*. Em destaque é mostrada a densidade eletrônica para o resíduo de alanina 139 nas cadeias A (à esquerda) e B (à direita) do dímero 99

Figura 47. Alinhamento das estruturas das enzimas *LmDHODH* em complexo com fumarato (PDB ID 3TQ0), representada em cinza e *LmDHODH-Q139A*, representada em verde. Estão destacados os *loops* catalíticos na conformação fechada para a enzima nativa. Para o mutante não foi possível modelar a região correspondente ao *loop* catalítico com base na densidade eletrônica. Com relação à região da interface dimerica, é possível observar que na ausência do resíduo Gln139, substituído por um resíduo de alanina no mutante, o resíduo Asp171 da cadeia oposta volta-se para a sua própria cadeia e também a His174 é ligeiramente deslocada 100

Figura 48. Isotherma para formação do complexo entre mutantes da *LmDHODH* e ORO obtida no ITC. A. *LmDHODH-L72F*, B. *LmDHODH-Q139A*, C. *LmDHODH-H174A* e D. *LmDHODH-K215F*. Os dados foram mais bem ajustados considerando um modelo de um ligante por sítio, em todos os casos. Os valores de K_d^{ORO} são mostrados na Figura 49 101

Figura 49. Dados termodinâmicos extraídos das isothermas dos ITCs. Os valores de ΔG , ΔH e $-\Delta S$ correspondem à energia livre de Gibbs, entalpia e entropia, respectivamente e são dados em kcal/mol. Os valores de K_d^{ORO} para cada um dos mutantes e enzima nativa também são apresentados..... 102

Figura 50. Caracterização cinética do estado estacionário para a enzima *LmDHODH-L72F*. (A) Taxas iniciais foram obtidas a concentrações fixa de fumarato (600 μM) e a variadas concentrações de DHO. A linha mostra o ajuste dos dados à equação de Hill (Equação 7). (B) Taxas iniciais de reação foram medidas a concentração fixa de DHO (50 μM) e concentrações variadas de fumarato. A linha mostra os dados ajustados na equação de Michaelis-Menten (Equação 8)..... 103

Figura 51. Caracterização cinética do estado estacionário para a enzima *LmDHODH-H174A*. (A) Taxas iniciais foram obtidas a concentrações fixa de fumarato (600 μM) e a variadas concentrações de DHO. A linha mostra o ajuste dos dados à equação de Michaelis-Menten (Equação 8). (B) Taxas iniciais de reação foram medidas a concentração fixa de DHO (60 μM) e concentrações variadas de fumarato. A linha mostra os dados ajustados na equação de Michaelis-Menten (Equação 8) 104

Figura 52. Caracterização cinética do estado estacionário para a enzima *LmDHODH*-F170A. (A) Taxas iniciais foram obtidas a concentrações fixa de fumarato (600 μ M) e a variadas concentrações de DHO. A linha mostra o ajuste dos dados à equação de Michaelis-Menten (Equação 8). (B) Taxas iniciais de reação foram medidas a concentração fixa de DHO (60 μ M) e concentrações variadas de fumarato. A linha mostra os dados ajustados na equação de Michaelis-Menten (Equação 8) 105

Figura 53. Interface dimérica para a estrutura *LmDHODH* (PDB ID 3TQ0). Cadeias A e B são representadas em branco e cinza, respectivamente. Está destacado o *loop* catalítico, em ciano, neste caso na conformação fechada para a estrutura. As cadeias laterais dos resíduos da interface dímica são também mostradas. Observa-se um contato importante entre D171 de uma cadeia e Q139 da cadeia oposta, e sucessivos contatos intracadeia 111

Figura 54. Imobilização das proteínas *LmDHODH* (A) a 0,25 mg/mL e TEV protease (B) a 0,1 mg/mL em sensores contendo ácido tris-nitriloacético (tris-NTA) inicialmente carregados com Ni^{2+} , passo inicial no ensaio de interferometria de biocamada (*BLI*)..... 113

Figura 55. Sinal de complexação do composto 1-[3-(1H-Pirrol-1-yl)fenil]metilamina à *LmDHODH* foi monitorado no BLI. É possível observar alterações em termos de comprimento de onda no padrão da luz refletida pelo sensor ao longo do tempo para as diferentes concentrações utilizadas de composto (666,7; 222,2 μ M; 74,1; 24,7 e 8,2 μ M). Os primeiros 120 s correspondem à etapa de associação, seguidos pelos outros 120 s que correspondem à dissociação. À direita podemos observar os ajustes no estado estacionário baseados nas respostas para concentração do composto 114

Figura 56. Isoterma para formação do complexo *LmDHODH*-1-[3-(1H-Pirrol-1-yl)fenil]metilamina obtida no ITC. Perfil termodinâmico para a titulação do ligante (estoque a 1 mM) frente *LmDHODH* (65 μ M). Os dados foram mais bem ajustados considerando um modelo de um ligante por sítio 114

Figura 57. Isoterma para os diferentes fragmentos testados frente à *LmDHODH* no ITC..... 117

Figura 58. Absorção em 610 nm em função do tempo para a enzima *LmDHODH* em diferentes concentrações. Otimização da concentração da enzima *LmDHODH* a ser utilizada no HTS..... 120

Figura 59. Curva de absorção em função do tempo durante os ensaios de otimização do ensaio enzimático de *LmDHODH* para HTS. Dois volumes finais por poço foram testados, 50 μ L e 100 μ L, baseados em duas adições de 25:25 ou 50:50 μ L dos tampões contendo enzima e substrato..... 121

Figura 60. IC₅₀ estimado para ORO utilizando o método do DCIP. Foram utilizadas diferentes concentrações de ORO (4; 7,8; 15,6; 31,25; 62,5; 125; 250 e 500 μ M) em meio contendo 40 μ M DHO, 60 μ M DCIP, Triton X-100 0,01%, 50 mM HEPES pH 7,2 e 150 mM NaCl..... 122

Figura 61. Tolerância da atividade enzimática da *LmDHODH* frente a diferentes concentrações de DMSO (0; 0,3; 0,6; 1,2 e 2,5%) 123

Figura 62. Valores de *Z'* *prime* robusto para as 46 placas utilizadas para os compostos da biblioteca DDU *EasySet* testados frente à *LmDHODH*..... 124

Figura 63. A. Resultado da varredura na biblioteca DDU *EasySet* representado em termos da distribuição dos compostos ao longo da porcentagem do efeito. B. Resultado da varredura na biblioteca DDU *EasySet* representado como uma porcentagem do efeito inibitório frente a cada composto. *Hits* estão coloridos em vermelho..... 125

Figura 64. Gráfico de dispersão das réplicas dos valores de pIC₅₀ determinados no ensaio de potência, para os *hits* obtidos a partir da varredura na biblioteca DDU *EasySet* 125

Figura 65. Valores de *Z'* *prime* robusto para as quatro placas utilizadas para os compostos da biblioteca DDU *FragSet* testados frente à *LmDHODH* 132

Figura 66. A. Resultado da varredura na biblioteca DDU *FragSet* representado em termos da distribuição dos compostos ao longo da porcentagem do efeito. B. Resultado da varredura na

biblioteca DDU *FragSet* representado como uma porcentagem do efeito inibitório frente a cada composto 132

Figura 67. Gráfico de dispersão das réplicas dos valores de pIC₅₀ determinados no ensaio de potência, para os *hits* obtidos a partir da varredura na biblioteca DDU *FragSet* 133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação das estruturas cristalográficas depositadas no banco de dados PDB das enzimas DHODH das diferentes classes, especificando as diferenças relacionadas às características estruturais, natureza do agente oxidante e cofator utilizado pela enzima de cada organismo	25
Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados nas mutações sítio-dirigidas <i>LmDHODH</i> -K215F, <i>LmDHODH</i> -L72F e <i>LmDHODH</i> -Q139A. As sequências sublinhadas foram adicionadas na síntese dos oligonucleotídeos e correspondem a sítios para enzimas de restrição. As sequências em vermelho correspondem aos códons que foram mutados.....	47
Tabela 3. Protocolo para reação da varredura da biblioteca de fragmentos utilizando a Interferometria de biocamada (<i>BLI</i>)	56
Tabela 4. Protocolo geral do ensaio <i>HTS</i> para <i>LmDHODH</i>	67
Tabela 5. Parâmetros do estado estacionário para as reações catalisadas pela enzima <i>LmDHODH</i> . A) Ambas as reações foram assumidas como seguindo o modelo de Michaelis-Menten (Equação no anexo 1). B) A primeira reação obedece ao modelo de Hill enquanto a segunda reação segue o modelo de Michaelis-Menten model (Equação 9).....	72
Tabela 6. Parâmetros cinéticos do estado pré-estacionário para as reações catalisadas pela enzima <i>LmDHODH</i>	77
Tabela 7. Comparação do coeficiente de extinção para a <i>LmDHODH</i> e mutantes.....	87
Tabela 8. Comparação dos valores das temperaturas de desenovelamento para a enzima <i>LmDHODH</i> e mutantes estudados utilizando Termofluor	88
Tabela 9. Comparação dos valores das temperaturas de desenovelamento para a enzima <i>LmDHODH</i> e <i>LmDHODH</i> -F170A utilizando TermoFMN	89

Tabela 10. Valores obtidos para os picos da distribuição de tamanho das partículas em solução no DLS.....	90
Tabela 11. Dados cristalográficos e estatísticos para os conjuntos coletados no LNLS, W01B-MX2 ($\lambda=1,45$ Å), a 100 K. Os valores relativos à última camada de resolução estão mostrados entre parênteses.....	92
Tabela 12. Dados cristalográficos e estatísticos para os conjuntos coletados no LNLS, W01B-MX2 ($\lambda=1,45$ Å), a 100 K. Os valores relativos à última camada de resolução estão mostrados entre parênteses.....	93
Tabela 13. Concentrações de proteína e estoque de ORO utilizadas em cada experimento de calorimetria de titulação isotérmica para os mutantes da <i>LmDHODH</i>	100
Tabela 14. Parâmetros do estado estacionário para as reações catalisadas pelos mutantes L72F, H174A e F170A construídos para a <i>LmDHODH</i>	106
Tabela 15. Compostos <i>hits</i> obtidos a partir da varredura da biblioteca de fragmentos do DDU via BLI que foram comprados para testes posteriores. Duas curvas são representadas para cada composto, uma em vermelho mostrando o perfil para ligação à <i>LmDHODH</i> e outra mostrando o perfil para ligação à TEV protease	115
Tabela 16. Dados cristalográficos e estatísticos para o conjunto de dado coletado <i>in-house</i> <i>Generator X-ray</i> (Rigaku M007HF com detector Saturn 944HG+ CCD) ($\lambda=1,54$ Å), a 100 K, <i>School of Life Sciences, University of Dundee, UK</i> . Os valores relativos à última camada de resolução estão mostrados entre parênteses, quando apropriado	119
Tabela 17. Resultados obtidos para cada uma das placas utilizadas no ensaio piloto desenvolvido para HTS utilizando a enzima <i>LmDHODH</i> . O inibidor competitivo, ORO, foi utilizado como composto referência neste caso. Os valores de absorbância na presença e ausência de enzima, branco e controle, respectivamente, permitiram calcular os valores de S/B (Equação 17) e <i>Z' prime</i> (Equação 18). Os falsos positivos e negativos referem-se à habilidade do ensaio em identificar os poços nos quais ORO foi previamente adicionado ...	123

Tabela 18. *Hits* obtidos por meio da varredura da biblioteca DDU *EasySet* com IC₅₀ inferiores à 50 μ M estimados no ensaio de potência..... 126

Tabela 19. *Hits* obtidos por meio da varredura da biblioteca DDU *FragSet* com IC₅₀ inferiores a 1 mM estimados no ensaio de potência..... 133

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACT	Aspartato carbamoil transferase
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
BLI	<i>Biolayer interferometry</i>
CPS	Carbamoil fosfato sintetase
DCIP	2,6 – Dicloroindofenol
DDU	<i>Drug Discovery Unit</i>
DHO	Diidroorotato
DLS	<i>Dynamic light scattering</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxiribonucleotídeos
E-Flox	Enzima complexada ao FMN reduzido
E-Flred	Enzima complexada ao FMN em sua forma oxidada
FMN	Flavina mononucleotídeo oxidada
FMNH ₂	Flavina mononucleotídeo reduzida
FUM	Fumarato
GTP	Guanosina trifosfato ativa
<i>h</i>	Coeficiente de Hill
HEPES	Ácido etanosulfônico 4-2 hidroxietil piperazina
<i>Hs</i>	<i>Homo sapiens</i>
HTS	<i>High-throughput screening</i>
IC ₅₀	Concentração da substância que inibe 50% da atividade
IPTG	Isopropiltio-β-D-galactosídeo
ITC	Calorimetria de titulação isotérmica
<i>K_{0,5}</i>	Concentração de substrato que leva a metade da velocidade máxima de reação
<i>k_a</i>	Constante de associação
<i>k_{cat}</i>	<i>Turnover</i> da enzima
<i>K_d</i>	Constante de dissociação

kDa	kiloDalton
k_{for}	Constante de velocidade de formação de um complexo
K_i	Constante de inibição
K_m	Constante de Michaelis-Menten
k_{obs}	Constante de velocidade observada
k_{red}	Constante de velocidade para a etapa redutiva
k_{reox}	Constante de velocidade para a etapa reoxidativa
k_{rev}	Constante de velocidade de dissociação de um complexo
Lb	<i>Leishmania braziliensis</i>
LB	Luria-Bertani
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LI	<i>Lactococcus lactis</i>
Lm	<i>Leishmania major</i>
LMC	Leishmaniose muco-cutânea
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
LV	Leishmaniose visceral
MAD	Desvio absoluto médio
Ni-NTA	Ácido nitrilotriacético
OMPDC	Oridina monofosfato
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPRT	Orotato fosforibosil transferase
ORO	Orotato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDB	<i>Protein data bank</i>
PEG	Polietilenoglicol
Pf	<i>Plasmodium falciparum</i>
RNA	Ácido ribonucléico
SUC	Succinato
Tc	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TEV	Tobacco etch vírus
T _m	Temperatura de desenovelamento
UMP	Uridina 5'-monofosfato
UPRT	Uracil fosforibosiltransferase

USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	xv
Lista de abreviaturas e siglas	xviii
 1.0 Introdução.....	 1
1.1 Como as enzimas funcionam	2
1.1.1 Da força vital à força catalítica.....	2
1.1.2 A importância das enzimas para a vida	5
1.1.3 As bases moleculares da catálise enzimática.....	7
1.1.3.1 O estado estacionário.....	8
1.1.3.2 Enzimas não Michaelianas	9
1.1.3.3 O estado pré-estacionário	10
1.1.3.4 Mecanismos moleculares da catálise enzimática.....	10
1.1.3.5 A ideia de flexibilidade.....	13
1.2 Contexto bioquímico e detalhes estruturais das enzimas diidroorotato desidrogenases (DHODHs).....	17
1.2.1 Quadro geral sobre o metabolismo de nucleotídeos.....	17
1.2.2 Biossíntese de nucleotídeos de pirimidinas em <i>Leishmania</i> e humanos: Algumas evidências relevantes	19
1.2.3 Diidroorotato desidrogenase (DHODH): Uma flavoproteína	21
1.2.3.1 Ciclo catalítico dependente de flavina mononucleotídeo (FMN).....	21
1.2.3.2 Classes de DHODHs	24
1.2.3.3 DHODHs de Classe 1A: Detalhes estruturais e de mecanismo.....	27
1.3 Planejamento de inibidores para as enzimas DHODHs de tripanosomatídeos.....	29
1.3.1 Motivação	29
1.3.2 A necessidade de novos fármacos para o tratamento das Leishmanioses	30
1.3.3 As DHODHs de tripanosomatídeos como possíveis alvos terapêuticos	31
2.0 Objetivos.....	33
3.0 Materiais e Métodos	35
3.1 Estudo do mecanismo de reação para a enzima nativa	36

3.1.1 Produção heteróloga da enzima <i>LmDHODH</i>	36
3.1.2 Caracterização do espectro de absorção e determinação do coeficiente de extinção molar para a <i>LmDHODH</i>	37
3.1.3 Caracterização cinética	37
3.1.3.1 Ensaaios enzimáticos no estado estacionário	37
3.1.3.2 Ensaaios enzimáticos no estado pré-estacionário por <i>stopped-flow</i>	39
3.1.4 Estudo da interação da enzima com os produtos da catálise	41
3.1.4.1 Espectroscopia diferencial com os produtos da reação	41
3.1.4.2 Calorimetria de titulação isotérmica (ITC) com os produtos da reação	42
3.1.4.3 Cinética de complexação do ORO à <i>LmDHODH</i> analisada por <i>stopped-flow</i>	43
3.1.4.4 Ensaaios de inibição da <i>LmDHODH</i> frente ao ORO	44
3.2 Estudo do mecanismo de reação baseado na construção de uma biblioteca de mutantes	44
3.2.1 Construção dos mutantes propostos por mutagêneses sítio-dirigidas	46
3.2.2 Caracterização do espectro de absorção e determinação do coeficiente de extinção molar para os mutantes	49
3.2.3 Avaliação da estabilidade térmica dos mutantes baseada em fluorimetria diferencial de varredura	49
3.2.3.1 Termofluor	49
3.2.3.2 TermoFMN	50
3.2.4 Avaliação do estado de oligomerização por espalhamento dinâmico de luz (DLS)	50
3.2.5 Estudos estruturais	51
3.2.5.1 Cristalização	51
3.2.5.2 Coleta de dados e processamento	52
3.2.5.3 Determinação da estrutura e refinamento	52
3.2.6 Estudo da interação dos mutantes com orotato por calorimetria de titulação isotérmica	53
3.2.7 Caracterização cinética no estado estacionário	53
3.3 Estratégias de busca por compostos com ação inibitória frente à <i>LmDHODH</i>	53
3.3.1 Varredura da biblioteca de fragmentos do “Drug Discovery Unit – DDU” utilizando Interferometria de biocamada (<i>BLI</i>)	54
3.3.1.1 Interferometria de biocamada (<i>BLI</i>)	54
3.3.1.2 <i>BLI</i> - detalhamento experimental	55

3.3.1.3 Varredura da biblioteca de fragmentos do <i>Drug Discovery Unit – DDU</i> utilizando Interferometria de biocamada (<i>BLI</i>)	58
3.3.1.4 Validação dos <i>hits</i> por ensaio enzimático utilizando agente colorimétrico e colorimétrico	58
3.3.1.5 Validação dos <i>hits</i> por calorimetria de titulação isotérmica (<i>ITC</i>).....	59
3.3.1.6 Estudos estruturais com os fragmentos	60
3.3.2 Desenvolvimento de uma plataforma para triagem de alto desempenho (<i>HTS - High-throughput screening</i>) tendo como alvo a enzima <i>LmDHODH</i>	60
3.3.2.1 Estratégias para otimização do ensaio enzimático	61
3.3.2.2 Realização de um ensaio piloto	64
3.3.2.3 Triagem de alto desempenho utilizando biblioteca de fragmentos e biblioteca de diversidade química, tendo como alvo a enzima <i>LmDHODH</i>	66
3.3.2.4 Validação dos <i>hits</i> - Ensaio de potência	67
4.0 Resultados e Discussão.....	69
4.1 Estudo do mecanismo de reação para a enzima nativa	70
4.1.1 Caracterização do espectro de absorção e determinação do coeficiente de extinção molar para a <i>LmDHODH</i>	70
4.1.2 Caracterização cinética	71
4.1.2.1 Ensaio enzimáticos no estado estacionário	71
4.1.2.2 Ensaio enzimáticos no estado pré-estacionário por <i>stopped-flow</i>	72
4.1.3 Estudo da interação da enzima com os produtos da catálise	77
4.1.3.1 Espectroscopia diferencial com os produtos da reação	77
4.1.3.2 Calorimetria de titulação isotérmica (<i>ITC</i>) com os produtos da reação	78
4.1.3.3 Cinética de complexação do ORO à <i>LmDHODH</i> analisada por <i>stopped-flow</i>	79
4.1.3.4 Ensaio de inibição da <i>LmDHODH</i> frente ao ORO.....	80
4.1.4 Contribuições relevantes para a compreensão dos mecanismos moleculares das reações catalisadas pelas DHODHs de classe 1A baseadas nos resultados obtidos nos estudos tendo como modelo a DHODH de <i>Leishmania major</i>	80
4.2 Estudo do mecanismo de reação baseado na construção de uma biblioteca de mutantes	85
4.2.1 Construção e produção heteróloga dos mutantes propostos por mutagêneses sítio-dirigidas	85
4.2.2 Caracterização do espectro de absorção e determinação do coeficiente de extinção molar para os mutantes	86

4.2.3 Avaliação da estabilidade térmica dos mutantes baseada em fluorimetria diferencial de varredura	87
4.2.4 Avaliação do estado de oligomerização por espalhamento dinâmico de luz (DLS)	89
4.2.5 Estudos estruturais dos mutantes	90
4.2.5.1 <i>Lm</i> DHODH-L72F.....	95
4.2.5.2 <i>Lm</i> DHODH-K215F.....	96
4.2.5.3 <i>Lm</i> DHODH-H174A-ORO.....	96
4.2.5.4 <i>Lm</i> DHODH-Q139A	98
4.2.6 Estudo da interação dos mutantes com ORO por calorimetria de titulação isotérmica	100
4.2.7 Caracterização cinética no estado estacionário para os mutantes de <i>Lm</i> DHODH	102
4.2.7.1 <i>Lm</i> DHODH-L72F.....	103
4.2.7.2 <i>Lm</i> DHODH-H174A	104
4.2.7.3 <i>Lm</i> DHODH-F170A	105
4.2.8 Contribuições relevantes para a compreensão dos mecanismos moleculares das reações catalisadas pelas DHODHs de classe 1A baseadas nos resultados obtidos nos estudos tendo como modelos os mutantes L72F, Q139A, F170A, H174A e K215F da DHODH de <i>Leishmania major</i>	106
4.3 Busca de compostos com ação inibitória frente à <i>Lm</i> DHODH	112
4.3.1 Varredura da biblioteca de fragmentos do <i>Drug Discovery Unit</i> (DDU) utilizando Interferometria de biocamada (<i>BLI</i>)	112
4.3.1.1 Ligação da proteína <i>Lm</i> DHODH aos sensores de níquel utilizados no <i>BLI</i>	112
4.3.1.2 Validação de um composto controle para ser utilizado na varredura da biblioteca de fragmentos utilizando o <i>BLI</i>	113
4.3.1.3 Varredura da biblioteca de fragmentos do <i>Drug Discovery Unit</i> (DDU) utilizando Interferometria de biocamada (<i>BLI</i>)	115
4.3.1.4 Validação dos <i>hits</i> por ensaio enzimático utilizando agente colorimétrico	116
4.3.1.5 Validação dos <i>hits</i> por calorimetria de titulação isotérmica (ITC).....	116
4.3.1.6 Estudos estruturais com os fragmentos	118
4.3.2 Desenvolvimento de uma plataforma para triagem de alto desempenho (<i>HTS - High-throughput screening</i>) tendo como alvo a enzima <i>Lm</i> DHODH.....	120
4.3.2.1 Estratégias para otimização do ensaio enzimático	120
4.3.2.2 Realização de um ensaio piloto	121

4.3.2.2 Triagem de alto desempenho utilizando biblioteca de fragmentos e biblioteca de diversidade química, tendo como alvo a enzima <i>LmDHODH</i> ..	124
5.0 Conclusões.....	136
6.0 Referências bibliográficas	140
7.0 APÊNDICE A	147

INTRODUÇÃO

1.0 Introdução

Nesta tese serão apresentadas e discutidas as contribuições relativas à obtenção dos resultados relacionados ao mecanismo catalítico e inibição da flavoenzima diidroorotato desidrogenase (DHODH) de *Leishmania major*. A enzima DHODH participa da biossíntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina, uma importante via metabólica, altamente conservada em eucariotos e procariotos e tem sido considerada um importante alvo para o desenvolvimento de moléculas com ação aniproliferativa e antiparasitária.

A pergunta que orientou este trabalho consiste em última instância em compreender como funcionam as DHODHs e de que forma elas podem ser inibidas. Diferentes ferramentas foram utilizadas na busca por estender nosso conhecimento em termos moleculares e dinâmicos sobre estas enzimas.

No início desta tese serão apresentados conceitos gerais de primeiros princípios a respeito da catálise enzimática imprescindíveis para a descrição dos nossos modelos e interpretação dos resultados.

Adiante serão fornecidas informações específicas a respeito da enzima e do contexto metabólico no qual ela está inserida, assim como sua relevância enquanto possível alvo terapêutico.

1.1 Como as enzimas funcionam?

1.1.1 Da força vital à força catalítica

Desde o início da história, uma das questões mais fundamentais foi a necessidade do homem em diferenciar seres vivos de objetos inanimados. A essência desta questão nos remete, em níveis mais profundos, à busca do homem em compreender a vida.

Especulações a respeito da natureza da vida são encontradas no pensamento de Aristóteles, ou antes, com Tales de Mileto, que buscava um elemento primordial, a matéria primitiva de que seriam compostos todos os seres. Ainda que as proposições iniciais que emergiram do pensamento grego e de sociedades ditas pré-científicas a respeito da matéria, da vida e do que compõe o universo nos pareçam hoje esboços bastante rudimentares quando comparados ao sofisticado conhecimento molecular acumulado ao longo do século XX, é imprescindível considerar que estas primeiras proposições enunciam em si algo sobre a origem das coisas e o fazem sem imagem e fabulação, tendo nisso grande mérito. O pensamento e a ciência experimental são ambos ofícios dos investigadores da natureza que

permeiam todas as sociedades. O caminho do pensamento ao longo das gerações é, por si, o caminho do desenvolvimento de todas as ciências.

Quando o homem se depara com a observação de que coisas vivas são intrinsicamente diferentes de objetos inanimados, algumas vertentes de pensamento são fundadas. Sob uma perspectiva muito simples, a questão básica que desafiava o pensamento no século XVIII e XIX era: Os eventos em organismos vivos poderiam ser explicados pelas mesmas leis que governavam o comportamento de substâncias inorgânicas? [1]

Longe de haver um acordo sobre o caráter da vida, várias correntes debatiam-se entre si para definir o fenômeno vital. Duas maneiras de responder a esse questionamento tornaram-se conhecidas como materialismo e vitalismo e influenciaram o desenvolvimento da química e da biologia ao longo dos anos que se sucederam. Se por um lado o materialismo tinha como objetivo “explicar a vida sem recorrer à vida”, o vitalismo defendia a perspectiva de que “a vida jamais poderia ser completamente explicada pelas leis da química e da física” [2].

Uma ideia inicial do vitalismo utilizada para designar uma entidade física que opera nos sistemas vivos, mas não opera em sistemas não vivos, ficou conhecida como força vital (*Lebenskraft* - “vitalidade” em alemão). Acreditava-se que apenas seres vivos poderiam produzir matéria orgânica. A força vital era vista como a força que atuava em oposição às forças químicas, sendo considerada responsável pela quebra de ligações que mantinham substâncias alimentares em conjunto, e pela formação de novas ligações para recriar tecidos animais, proporcionar crescimento e movimento [3].

A obtenção da ureia no início do século XIX, por meio da síntese de Wöhler, iniciou uma mudança de paradigmas no vitalismo e contribuiu definitivamente para a fundação da química orgânica [4]. Uma vez demonstrado que moléculas orgânicas poderiam ser criadas artificialmente, foi admitido que a essência da força vital não estaria ao nível molecular. Ao contrário, passa-se a considerar que as propriedades vitais deveriam surgir em algum nível mais alto da estrutura biológica, como por exemplo, o modo pelo qual as moléculas orgânicas estavam organizadas dentro dos tecidos vivos. Em meados do século XIX duas estruturas, as células e o protoplasma, foram sugeridos como agentes vitais plausíveis.

Nessa época, as inovações em termos de microscopia permitiram evoluir da observação dos níveis dos tecidos para níveis celulares e subcelulares. Isso produziu dois avanços significativos: a teoria celular e o reconhecimento das leveduras como organismos vivos. Nessa nova perspectiva, o corpo não era mais uma máquina simples, mas uma coleção de pequeninas máquinas cada qual com uma função especializada. A ideia que emergiu destas

observações foi a de que componentes sólidos particulados das células possuíam o poder de alterar quimicamente as substâncias em contato com eles [5].

A teoria celular de Schwann [5] enfatizou a importância destas “partes sólidas” da célula, do núcleo e da membrana na geração e crescimento dos organismos. A ideia relacionada às bases físicas da vida passou, nesse momento histórico, pela existência de um protoplasma no qual todas as propriedades vitais são resultado de forças moleculares atuantes. A físico-química adquire um papel relevante na compreensão da fisiologia, embora os fenômenos vitais ainda não estivessem sendo explicados por uma base física, mas sim relocados para um nível subcelular.

Diversos processos conhecidos há muito tempo passam nesse momento do século XIX a terem suas bases moleculares investigadas. Tendo em vista a evolução do conhecimento em biologia e química orgânica, diversos cientistas sentem-se motivados a estudar as bases químicas dos fenômenos biológicos, o que resultaria no desenvolvimento da bioquímica.

Processos como digestão de alimentos por secreções estomacais, conversão de amido a açúcares pela saliva e extratos vegetais observados muito previamente, levaram o químico Jöns Jacob Berzelius a compor a ideia de força catalítica. Em todos esses processos estavam envolvidas substâncias que foram chamadas fermentos, denominação inicialmente utilizada por Pauster, em uma analogia entre as reações das quais essas substâncias participavam e o já conhecido processo de fermentação alcoólica. Berzelius sugere a ideia de que certas substâncias continham uma “força catalítica” que lhes permitia acelerar determinadas reações químicas. Em 1836, Berzelius cunhou o termo catálise (do grego *kata* + *lusi* = movimento para baixo + ruptura, dando a ideia de decomposição). A característica básica desta força catalítica era a de que esses agentes promoviam as reações químicas sem serem alterados por essas reações [6].

Louis Pauster já estudava o processo de fermentação alcoólica e decomposição orgânica devido à ação de organismos vivos. Pauster concluiu que no processo de transformação do açúcar em álcool por leveduras existia um composto responsável pela conversão que ele chamou de fermento. Contudo, Pauster postulou a ideia de que os fermentos seriam inseparáveis da estrutura das células vivas, estabelecendo o conceito de que a fermentação era uma propriedade intrínseca das células vivas. Na mesma época, o químico alemão Justus von Liebig gerou uma controvérsia com relação a natureza vital da fermentação. Para Liebig o papel da levedura era produzir substâncias químicas que levariam a fermentação [7].

O termo enzima foi utilizado pela primeira vez pelo fisiologista alemão Wilhelm Kühne em 1878. A denominação enzima deriva do grego *énsimo* (*én* = em e *simo* = fermento ou levedura) [8]. Para Kühne, reações enzimáticas eram simples mudanças químicas e poderiam ocorrer sem a presença de organismos vivos e mesmo fora destes organismos. Foi Eduard Buchner em 1897 que, por meio de seus estudos sobre fermentação, levou ao fim a controvérsia entre Pauster e Liebig. Buchner mostrou que a fermentação ocorria na ausência de células vivas, uma vez que extratos de levedura poderiam fermentar o açúcar até álcool e provou que as enzimas envolvidas na fermentação continuavam funcionando mesmo quando removidas das células vivas [8].

A ideia da natureza química das enzimas permite à enzimologia se desenvolver como uma ciência quantitativa ainda que intimamente relacionada à química orgânica e a bioquímica. Durante o século XX todo o conhecimento sobre as bases moleculares destas ciências foi expressivamente ampliado. Contudo, é interessante notar que ainda que diversos avanços tenham sido feitos nessa época, persistia em algum nível vestígios da ideia de que as enzimas possuíam a força vital do organismo do qual elas eram extraídas [9]. Em 1901, Joseph Kastle publicou na *Science* o trabalho intitulado “*On the Vital Activity of the Enzymes*” [10], no qual ele menciona que “as enzimas são ativas da mesma forma que elas retêm certa atividade vital das células vivas”.

O papel das enzimas no metabolismo foi amplamente estudado nos anos seguintes. Detalhes moleculares, no que se refere à estrutura tridimensional e aos mecanismos de catálise foram elucidados e o conhecimento a respeito das bases químicas da vida foi ampliado.

1.1.2 A importância das enzimas para a vida

Uma das propriedades fundamentais para todos os organismos vivos é o processo do metabolismo, por meio do qual compostos orgânicos são sintetizados (anabolismo) e quebrados (catabolismo). Ainda que o metabolismo de uma célula seja um sistema extremamente complexo, é possível fragmentá-lo em subsistemas e rotas bioquímicas, os quais são compostos por reações individuais que transformam um composto em outro.

Reações metabólicas são reações químicas como outras quaisquer, nas quais há consumo de substrato e produto é formado. Cada reação caminha espontaneamente no sentido em que a variação de energia livre (ΔG) é negativa. Isto é formalizado na Equação 1 que

correlaciona a variação de energia livre no estado padrão (ΔG°) com a constante de equilíbrio da reação K , a constante dos gases R e a temperatura absoluta T .

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad \text{Equação 1}$$

Ainda que ΔG determine o sentido global no qual uma reação se processa, a velocidade de uma reação depende da energia de ativação necessária para que a reação aconteça. Se a energia de ativação for muito grande, a reação ocorrerá lentamente ainda que ΔG seja favorável. Isso significa que existe um balanço em termos de termodinâmica e cinética para as reações metabólicas, assim como efetivamente, existe para qualquer outra reação química.

Contudo, deve-se considerar que quando tratamos de reações metabólicas, existe uma cinética necessária para manutenção da dinâmica do metabolismo e consequentemente do organismo, de forma que as reações precisam ocorrer em um tempo viável.

Um exemplo bastante ilustrativo deste fato é a reação de descarboxilação espontânea do ácido orótico. O tempo de meia vida desta reação em solução aquosa neutra na ausência de enzimas em temperatura ambiente é de 78 milhões de anos, isto significa muitas ordens de grandeza mais lenta do que seria útil em um processo biológico. No entanto, essa reação consiste no último passo na síntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina, um metabólito celular essencial. Os organismos podem utilizar reações lentas como essa em seu metabolismo porque eles possuem catalisadores biológicos. Quando a enzima oritidina 5'-fosfato descarboxilase é usada, ela aumenta a velocidade da reação cerca de 10^{17} vezes, de forma que a meia vida da reação catalisada pela enzima é menor do que 1/40 de segundo [11]. As enzimas permitem que as reações ocorram no metabolismo celular, as quais, sem catálise, ocorreriam tão lentamente que não seriam viáveis.

Essa capacidade das enzimas em viabilizar reações metabólicas do ponto de vista termodinâmico e cinético, torna extremamente interessante o estudo das bases moleculares associadas às suas funções celulares. Compreender como isso ocorre nos permite entender melhor o metabolismo como um todo e, portanto, intervir, quando necessário, de maneira racional.

1.1.3 As bases moleculares da catálise enzimática

Um conceito chave para estender o conhecimento em nível molecular sobre a participação das enzimas nas reações químicas foi o reconhecimento de que as enzimas deveriam formar complexos com seus substratos antes da transformação química. Essa ideia inicialmente articulada por Emil Fischer ficou conhecida como modelo da chave e fechadura [12].

Fischer observou que a enzima invertase, a qual ele havia isolado a partir da levedura de cerveja, hidrolisava α -glicosídeos, mas não β -glicosídeos, enquanto que a enzima emulsina hidrolisava β -glicosídeos, mas não α -glicosídeos. Com base nesta observação, Fischer concluiu que a enzima e o glicosídeo deveriam encaixar-se um ao outro como chave e fechadura, a fim de exercer um efeito químico um sobre o outro. Fischer constatou que as enzimas são estereoespecíficas, e mais que isso, ele introduziu uma interpretação da ação das enzimas, na qual um ajuste confortável e íntimo entre enzima e substrato é um requisito necessário para a catálise [12].

Este conceito sobre a formação obrigatória de um complexo enzima:substrato foi muito importante nos estudos do comportamento cinético, realizado por Adrian Brown [13]. Brown propôs que uma molécula de enzima se combina com uma molécula da substância reagente, formando um complexo por um intervalo de tempo, e subsequentemente esse complexo se decompõe em produto e enzima (Equação 2).

E , S , ES e P simbolizam a enzima, o substrato, o complexo enzima-substrato e o produto, respectivamente. De acordo com esse modelo, quando a concentração de substrato for alta o suficiente para converter completamente a enzima na forma ES , a segunda etapa tornar-se-á limitante da velocidade da reação global, passando a ser independente, ou de ordem zero em relação à concentração do substrato. Assim, Brown descreveu o que é hoje chamado de cinética saturante, onde cada reação individual da reação enzimática pode ser descrita por uma constante de velocidade: k_1 e k_{-1} são as constantes de velocidades para a reação direta e a inversa da formação do complexo ES (a primeira reação), e k_2 é a constante de velocidade da decomposição de ES em P (a segunda reação). Nesse modelo, a ligação do

substrato é reversível, mas a liberação do produto não. Para manter a simplicidade matemática, foi considerado que produto não é novamente convertido em substrato [14].

1.1.3.1 O estado estacionário

A ideias de Brown foram retomadas no marcante trabalho de Leonor Michaelis e Maud Menten que introduziram a equação que levava o nome de ambos (Equação 3) em 1913 [15]. Neste trabalho, a cinética enzimática é modelada relacionando a taxa de reação ao: *i.* k_{cat} , constante de primeira ordem para o passo mais lento da reação, representando o número máximo de moléculas de substrato que podem ser consumidas por molécula de enzima por unidade de tempo, *ii.* K_m , a medida da habilidade da enzima em ligar substrato, *iii.* concentração de enzima ($[E]$), *iv.* concentração de substrato ($[S]$) e *v.* velocidade de reação (v).

$$\frac{v}{[E]} = \frac{k_{cat}[S]}{K_m + [S]} \quad \text{Equação 3}$$

Michaelis e Menten postularam inicialmente que durante a reação, a enzima (E) e o seu substrato (S) se encontravam em equilíbrio com o complexo ES assumindo que $k_{-1} \gg k_2$, ou seja, o passo inicial da formação de ES poderia ser tratado com um processo de equilíbrio [16]. Esse postulado frequentemente não está correto, considerando que certos complexos ES não se dissociam em E e S livres, e sim prosseguem para formar o produto [14]. Briggs e Haldane mostraram que não era necessário assumir que E e S estavam em equilíbrio termodinâmico com o complexo ES para derivar a equação 3 [17]. Eles aplicaram o postulado do estado-estacionário a este modelo de ação enzimático. Segundo esse postulado, sob condição fisiológica normal, na qual o substrato está em excesso em relação à enzima, a $[ES]$ permanece praticamente constante até que o substrato seja praticamente todo consumido. Assim, a velocidade de síntese de ES deve se igualar a velocidade de seu consumo durante a reação. ES permanece em estado estacionário [17].

K_m , k_{cat} e k_{cat}/K_m (constante de especificidade que fornece uma medida da eficiência catalítica) permanecem como parâmetros padrão para a descrição das propriedades cinéticas de uma enzima. Isso porque a caracterização cinética do estado estacionário é muito importante para o entendimento do metabolismo, uma vez que fornece dados sobre as taxas de reações catalisadas por enzimas em condições que existem na célula [16]. Contudo, a cinética

no estado estacionário não permite determinar detalhes a respeito do mecanismo de reação sem ambiguidade, uma vez que ela não nos fornece muitas informações sobre a natureza do complexo ES. Medidas no estado estacionário são incapazes de revelar o número de intermediários em uma reação catalisada por uma enzima.

1.1.3.2 Enzimas não Michaelinas

A dependência das velocidades iniciais de reação com relação à concentração de substrato nem sempre segue a cinética de Michaelis-Menten. Por volta de 1977 mais de 800 enzimas já haviam sido reportadas como desvios da cinética Michaeliana. No lugar do comportamento de hipérbole previsto pela equação de Michaelis-Menten (Equação 3), algumas reações enzimáticas dão lugar a curvas do tipo sigmoides quando as velocidades iniciais são plotadas com relação a concentração de substrato [18]. Esse comportamento cooperativo é uma propriedade exclusiva de enzimas multiméricas que se ligam ao substrato em múltiplos sítios [19].

Um modelo de ligação cooperativa ocorre se a fração de sítios de ligação de uma macromolécula que está ocupado por um tipo específico de ligante é uma função não linear da concentração deste ligante. A cooperatividade pode ser positiva, se a complexação com o ligante aumentar a afinidade dos outros sítios da macromolécula, ou pode ser negativa, se a complexação com o ligante reduzir a afinidade do receptor, tornando a ligação de outro ligante menos favorável.

A fração de ocupação $\bar{Y}$ de uma macromolécula com um ligante é definida como na Equação 4.

$$\bar{Y} = \frac{[\text{sítios ligados}]}{[\text{sítios ligados}] + [\text{sítios não ligados}]} = \frac{[\text{sítios ligados}]}{[\text{sítios totais}]} \quad \text{Equação 4}$$

A primeira descrição de cooperatividade para uma proteína com vários sítios foi desenvolvida por Archibald Vivian Hill. Por meio das observações da ligação do oxigênio a hemoglobina, Hill sugeriu uma equação para descrever quantitativamente o fenômeno da cooperatividade (Equação 5).

$$\bar{Y} = \frac{K \cdot [X]^h}{1 + K[X]^h} = \frac{[X]^h}{K_d + [X]^h} \quad \text{Equação 5}$$

h é o coeficiente de Hill, $[X]$ se refere à concentração de ligante, K é a constante de associação aparente, usada na forma original da equação e K_d é a constante de dissociação aparente (usada na forma moderna da equação). Se $h < 1$, o sistema apresenta cooperatividade negativa, enquanto que a cooperatividade é positiva se $h > 1$. O número total de sítios de ligação é um limite superior para h [18].

1.1.3.3 O estado pré-estacionário

Informações bastante relevantes a respeito do mecanismo de reação podem ser obtidas quando dados do estado estacionário são combinados com dados provenientes de experimentos no estado pré-estacionário. O estado pré-estacionário é caracterizado por ser o período imediatamente anterior ao estado estacionário. Estudos dos primeiros milissegundos após a enzima ter sido misturada ao substrato consistem na cinética do estado pré-estacionário. Essa cinética se refere à formação e consumo dos intermediários de enzima:substrato até que as suas concentrações do estado estacionário sejam atingidas [20].

Cinéticas no estado pré-estacionário são mais complexas do ponto de vista experimental, uma vez que requerem uma resolução temporal adequada, na ordem de milissegundos. Contudo, o resultado deste tipo de estudo fornece informações muito úteis no que se refere ao mecanismo de catálise.

A combinação de informações fornecidas por estudos no estado estacionário e no estado pré-estacionário podem contribuir muito na elucidação de mecanismos de reação, sobretudo em reações que envolvem mais de um substrato.

1.1.3.4 Mecanismos moleculares da catálise enzimática

O conceito original de Fischer de que enzima e substrato se ajustavam como chave e fechadura foi sendo modificado ao longo do século XX conforme novas informações estruturais foram sendo obtidas.

Desde 1926, quando o bioquímico americano James Sumner isolou e cristalizou a enzima urease, tornou-se conhecida a natureza proteica das enzimas [21], ainda que muitos cientistas na época não acreditassem que se tratava de fato de cristais de enzima. Deve-se ressaltar que no início dos anos 80, químicos descobriram que certas moléculas de RNA, chamadas ribozimas, também possuíam propriedades catalíticas [22].

Em 1930, Haldane modificou a teoria da chave e fechadura proposta por Fischer sugerindo que a chave não se encaixava perfeitamente a fechadura, mas exercia certa deformação sobre ela. Nesta perspectiva, a enzima distorce o substrato de tal forma que este se torna mais suscetível para reagir e, conseqüentemente, a reação é acelerada [23].

Em meados do século XX, Linus Pauling propôs a ideia de que a atividade catalítica enzimática resulta do fato da região ativa da enzima ser complementar não ao substrato em sua configuração normal, mas sim ao substrato em uma configuração tensionada, que corresponde ao complexo ativado para a reação catalisada pela enzima. A molécula de substrato é atraída para a enzima, e assume um estado tensionado causado por interações químicas. Assim a energia de ativação da reação é diminuída de tal modo que a reação segue com uma velocidade maior do que ocorreria na ausência da enzima [24]. A ideia pioneiramente sugerida por Pauling e posteriormente ampliada por Richard Wolfenden e Gustav Lienhard é a de que as enzimas afetam a catálise uma vez que elas permitem interações de estabilização no estado de transição que estão ausentes no estado fundamental [25].

Uma análise sob a perspectiva termodinâmica nos permite compreender melhor estas ideias. As mudanças de energia livre (ΔG) sofridas ao longo de uma reação são usualmente representadas usando um diagrama, como na Figura 1. A energia livre do sistema todo é mostrada na coordenada vertical, e o progresso da reação é mostrado no eixo horizontal. O pico na energia livre no centro da reação representa o estado de transição (TS) que é formado entre substrato (S) e produto (P). O estado de transição é usualmente altamente instável devido à sua elevada energia livre, mas ele deve ser formado para que a reação prossiga. A velocidade da reação depende da diferença na energia livre entre o substrato e o estado de transição, denominada de energia de ativação (E_A), como mostrado na Figura 1A. Todas as catálises, incluindo catálises enzimáticas, aceleram as reações por meio da redução da energia de ativação, como mostrado na Figura 1B. Contudo, enzimas são mais complexas do que catalisadores químicos, em parte porque elas têm que se complexar ao substrato antes da catálise, mas também porque reações catalisadas por enzimas podem frequentemente ser divididas em passos menores com intermediários estáveis ao longo da coordenada de reação, como mostrado na Figura 1C [14].

Figura 1. Diagrama de reação. A energia livre do sistema é mostrada na coordenada vertical, e o progresso da reação é mostrado no eixo horizontal. A. Energia Livre para uma reação não catalisada. B. Perfil de energia livre para uma reação catalisada. C. Perfil de energia livre para uma reação catalisada por enzima, com um intermediário. O pico na energia livre no centro da reação representa o estado de transição (TS) que é formado entre substrato (S) e produto (P). A velocidade da reação depende da diferença na energia livre entre o substrato e o estado de transição (EA). Modificado de [26].

Ao longo da segunda metade do século XX, a teoria da estabilização do estado de transição foi desenvolvida para tentar explicar completamente os aumentos extraordinários nas velocidades das reações catalisadas pelas enzimas. Contudo, novas ideias foram adicionadas. Já era conhecido então o fato de que a ligação do substrato à enzima resultava na distorção do substrato para a conformação do estado de transição. Novas teorias começaram a propor que a enzima também sofria mudanças conformacionais para ajustar o substrato ao sítio ativo. Assim, a ideia de que o sítio ativo consistia em uma estrutura rígida e similar a uma fechadura, começou a ser modificada [16].

A compreensão das bases moleculares pelas quais as enzimas afetam a catálise foi de extrema importância no desenvolvimento da bioquímica. A teoria que explica que as enzimas se ligam aos estados de transição com maior afinidade do que aos substratos forneceu as bases racionais do planejamento de fármacos fundamentados na compreensão dos mecanismos de reação específicos de enzimas [14].

Essa nova perspectiva de estudo na bioquímica, levando em conta mudanças conformacionais, pequenas e grandes, e a maneira pela qual elas interferem na catálise, permitiu ampliar o que era conhecido a respeito das bases moleculares da atividade enzimática. O desenvolvimento da biologia estrutural na década de 50, quando as estruturas cristalinas de proteínas começaram a ser solucionadas utilizando a cristalografia de raios X, permitiu a obtenção de novas informações e muitas enzimas foram mostradas como sofrendo mudanças conformacionais induzidas pela ligação ao substrato. Nesse momento, a biologia estrutural e os estudos de mecanismos de reação começaram a compor juntos diversos estudos a respeito de proteínas variadas, o que permitiu estender nossa compreensão a respeito de

comportamentos enzimáticos gerais e rotas bioquímicas essenciais para a vida em diferentes organismos.

1.1.3.5 A ideia de flexibilidade

A primeira ideia que considerava a flexibilidade da enzima como um ponto importante na catálise foi proposta por Daniel Koshland, um bioquímico americano. Koshland observou que alguns eventos não eram completamente explicados pelo conceito da chave-fechadura elaborado por Fischer [27].

O primeiro questionamento de Koshland foi sobre o papel da água nas reações biológicas. Ele considerou como modelo neste raciocínio a hexoquinase, uma enzima que catalisa a fosforilação da glicose formando a glicose 6-fosfato. O grupamento OH da água é um nucleófilo, assim como o grupamento OH do açúcar. Se a glicose se ligasse fortemente ao sítio ativo na enzima, segundo o conceito de chave-fechadura, ela poderia excluir as moléculas de água. Contudo, em diversas condições fisiológicas, quando a concentração de glicose poderia estar em níveis bem baixos, a água, a 55 M, poderia também preencher o sítio ativo vazio, segundo a mesma ideia da chave-fechadura, e assim competir com a glicose pelo ataque nucleofílico.

Outra observação de Koshland foi sobre as moléculas que tinham ação inibitória frente determinada enzima, mas que não se ligavam ao sítio ativo, os chamados inibidores não competitivos. O modelo da chave-fechadura não explicava de que forma moléculas que não se ligavam ao sítio ativo poderiam intervir na complexação do substrato ao mesmo.

A terceira observação que motivou Koshland foi em relação aos compostos que se ligam ao sítio ativo, mas não eram substratos, ou seja, os inibidores competitivos. Da mesma forma, o modelo da chave-fechadura não explicava como moléculas que se ajustavam bem ao sítio ativo poderiam não se comportar como substrato.

Baseado nestas observações, Koshland propôs o modelo do ajuste induzido para a complexação do substrato ao sítio ativo, seguindo três ideias básicas: *i.* A ação da enzima requer a orientação precisa dos grupos catalíticos; *ii.* O substrato causa uma mudança na relação tridimensional dos aminoácidos no sítio ativo; *iii.* As mudanças na estrutura da proteína causadas pelo substrato trarão os grupos catalíticos para um alinhamento adequado, enquanto os não substratos não o farão [27].

A teoria de Emil Fischer estava amplamente difundida entre os cientistas nessa época, de forma que houve certa resistência ao modelo do ajuste induzido. Contudo, de acordo com

o próprio Koshland, o ajuste induzido inclui a ideia do encaixe proposta por Fischer e apenas adiciona o conceito de flexibilidade. O conceito de flexibilidade permite compreender questões relativas à regulação enzimática, ao fenômeno da cooperatividade e da especificidade.

A questão que surgiu neste momento foi a respeito do quão amplo seriam estas mudanças conformacionais para serem consideradas relevantes em termos estruturais. Segundo o próprio Koshland, os grandes movimentos eram importantes, mas os pequenos movimentos também eram [27]. Uma característica importante do ajuste induzido é a de que o alinhamento dos grupos catalíticos e dos grupos de ligação devem ser otimizados para o estado de transição, e a realização desse estado é energeticamente desfavorável, sendo compensada pela energia da ligação ao substrato. Outra questão importante que surge com a ideia do ajuste induzido, é de que a conformação da proteína é selecionada ao longo da evolução para otimizar ambos: estado não ligado e estado ligado ao substrato.

Tanto o modelo da chave-fechadura quanto o modelo do ajuste induzido emergem da noção de que as proteínas existem em uma conformação única e dependente da sequência de resíduos de aminoácidos [28]. Essa noção estava contida na hipótese termodinâmica para o enovelamento de proteínas, proposta por Christian Anfinsen na década de 60, segundo a qual a estrutura nativa tridimensional era o estado termodinamicamente mais estável, ou seja, o de menos energia [29].

Contudo, o americano Cyrus Levinthal analisou o processo de enovelamento de proteínas também pelo aspecto cinético, ao considerar que a escala de tempo real envolvida no enovelamento deveria ser bastante pequena, para ser compatível com as necessidades dentro de uma célula. Levinthal questionou o fato de que segundo a hipótese termodinâmica, a busca pelo estado nativo era feita de maneira aleatória, por tentativa e erro. Considerando por exemplo uma proteína de 100 resíduos de aminoácidos contendo 99 ligações peptídicas, com 198 diferentes ângulos phi e psi, se cada um destes ângulos tivesse 3 possibilidades ou orientações favorecidas, a cadeia poderia assumir nessa busca, 3^{198} diferentes conformações em solução. Considerando ainda que a proteína não poderia passar de uma conformação para outra em menos de 1 ps, o processo do enovelamento seria inviável do ponto de vista cinético devido ao imenso tempo necessário para que todas as possibilidades fossem experimentadas. Nisso consiste o que foi chamado de “Paradoxo de Levinthal” [30].

A partir disso, Levinthal propôs a hipótese cinética como tentativa de explicar o processo. Ele sugeriu que a busca pelo estado nativo não envolve a exploração aleatória de todas as conformações possíveis para a cadeia polipeptídica, ao contrário, essa exploração

percorre antes um caminho de enovelamento (dito *folding pathway*) bem definido [31], composto por vários estados intermediários e no final do qual se encontra o estado nativo. Portanto, a rapidez extrema do processo de enovelamento é viabilizada pelo fato de haver um número limite de caminhos a serem percorridos.

Uma combinação das perspectivas termodinâmica e cinética tem sido atualmente aceita para explicar o processo de enovelamento de proteínas e tem sido também útil na compreensão dos eventos que envolvem complexação de proteínas e ligantes.

Essa perspectiva procura tratar a paisagem energética do processo de enovelamento usando a imagem de um funil. Resultados obtidos a partir de modelos de simulação computacional sugerem que inicialmente haveria uma superfície larga, representando o topo do funil, que reflete o conjunto de todas as conformações desnaturadas possíveis para uma proteína no início do processo. Essas conformações seriam as de maior energia livre, portanto de menor estabilidade. À medida que vamos percorrendo estes caminhos em direção ao vértice do funil, a energia das conformações vai diminuindo até atingir o mínimo global na conformação nativa e também o número de conformações é reduzido [32].

O conceito de paisagem energética e funil são importantes não apenas para compreender o processo de enovelamento de uma cadeia polipeptídica, mas também para entender mais sobre uma proteína já enovelada em termos dos eventos de reconhecimento e complexação molecular [28].

A ideia de paisagem de energia somada a uma variedade de resultados de experimentos utilizando técnicas que permitem monitorar movimentos em escalas de tempo variadas, como espectroscopia de fluorescência, ressonância magnética nuclear (RMN) e simulação de dinâmica molecular, levaram a ideia da presença de uma população de confôrmeros ao redor da base do funil de enovelamento, de forma que pudessem existir estados conformacionais de maior energia da proteína enovelada que fossem acessíveis. Segundo o modelo proposto para complexação de substrato, chamado de seleção de confôrmeros, estados conformacionais de alta energia da proteína podem ser selecionados pela complexação ao substrato [33].

Em geral, mudanças conformacionais e eventos de complexação e descomplexação de ligantes são processos ativados termicamente os quais requerem transpor barreiras de energia. Em processos ativados termicamente, o tempo necessário para transpor estas barreiras de energia, chamado tempo de transição, é significativamente menor do que o tempo de permanência em cada um dos estados [33].

Estudos estruturais de conformações de maior energia revelaram que mudanças conformacionais ativadas termicamente são comparáveis a mudanças conformacionais observadas durante a complexação e descomplexação de ligantes ou durante reações químicas catalisadas pelas enzimas, o que demonstrou que estas mudanças conformacionais podem ocorrer na ausência do ligante ou substrato ou mesmo com ligantes já complexados.

A partir desta perspectiva, é possível analisar o modelo do ajuste induzido e da seleção de confôrmeros como dois lados da mesma moeda. Ajuste induzido e seleção de confôrmeros podem ser identificados pela ordem temporal do passo de complexação química e pela mudança conformacional física ao longo do caminho. Se por um lado para o ajuste induzido, a mudança conformacional ocorre após o passo de complexação, para a seleção de confôrmeros, a mudança conformacional ocorre antes do passo de complexação [33].

O estudo e compreensão destes fenômenos e o desenvolvimentos de ferramentas que permitam monitorar estes eventos são passos muito importantes para ampliarmos o conhecimento a respeito dos mecanismos de complexação entre enzimas, substratos e ligantes. Compreender estes mecanismos significa conseguir intervir de maneira mais eficiente, o que pode ser amplamente aplicado ao planejamento de moléculas com ação inibitória ou de ativação de diversos alvos enzimáticos.

Embora a mobilidade intrínseca das proteínas tenha sido por muito tempo desconsiderada no planejamento de fármacos, ainda que se soubesse da sua relevância para a compressão dos eventos complexação de ligantes, ela pode ser explorada e é provável que tenha um papel muito importante na compreensão e no planejamento de novas moléculas [34].

O processo no qual um fármaco interage com uma proteína alvo pode ser imaginado como uma colisão entre objetos flexíveis. O ligante colide com a superfície da proteína e desloca moléculas de água fracamente ligadas da sua superfície, mas não se difunde para longe imediatamente, como aconteceria em uma colisão elástica simples. Ao contrário, o ligante e a proteína rolam um sobre o outro e amostram áreas superficiais e espaço conformacional, com os substratos adequados sendo transportados para o sítio-ativo. Esse processo de correspondência ocorre entre vários confôrmeros da proteína e do ligante [34].

Assim, informações sobre o mecanismo de complexação enzima e substrato, tanto do ponto de vista estrutural quanto cinético, fornecem a base da compreensão do fenômeno que pode ser utilizada na otimização de modelos de busca de moléculas com atividade inibitória ou de ativação de alvos enzimáticos. Por outro lado, a determinação dos mecanismos de inibição ou ativação destes alvos, assim como a obtenção de detalhes estruturais da

complexação, fornecem evidências a respeito dos mecanismos pelos quais as enzimas exercem sua função. É nesse contexto de combinação de informações estruturais, de mecanismo e modulação funcional que se insere o trabalho desenvolvido ao longo desta tese.

1.2 Contexto bioquímico e detalhes estruturais das enzimas diidroorotato desidrogenases (DHODHs)

Iniciaremos agora a apresentação de informações mais específicas com relação às enzimas DHODHs, que participam da biossíntese de nucleotídeos de pirimidina, especialmente no que se refere à enzima DHODH de *Leishmania major* (*LmDHODH*), que foi utilizada como modelo neste estudo. O cenário bioquímico, os detalhes estruturais e do mecanismo, assim como as diferenças relevantes com relação à enzima humana serão discutidos. Por fim, será abordada a relevância das DHODHs como possíveis alvos terapêuticos na busca por agentes tripanocidas e leishmanicidas.

1.2.1 Quadro geral sobre o metabolismo de nucleotídeos

Nucleotídeos são um dos blocos que compõe as moléculas de DNA (ácido desoxirribonucleico) e RNA (ácido ribonucleico) e obviamente, são moléculas vitais para a sobrevivência e para a proliferação das células. Como é conhecido, o metabolismo envolve um conjunto elaborado de rotas dinâmicas e interconectadas, onde diversos intermediários que contribuem consideravelmente para a composição do ambiente químico em uma célula são gerados por passos do anabolismo ou catabolismo celular. Existem importantes exemplos de intermediários que também efetuam um papel importante nos mecanismos de sinalização e regulação relacionados ao estado metabólico da célula. Estes intermediários não são inativos no contexto metabólico, ao contrário, eles participam no conjunto complexo e dinâmico do metabolismo [35].

Considerando a complexidade do metabolismo, é possível compreender a importância dos nucleotídeos não apenas como blocos constituintes das moléculas de ácidos nucleicos, mas também como moléculas indispensáveis para a vida, uma vez que realizam funções vitais para a célula. Por exemplo, AMP desempenha um papel fundamental na transformação de energia; cAMP e cGMP são importantes compostos que atuam como segundos mensageiros; ATP, ADP e AMP funcionam como reguladores alostéricos; formas ativadas de carboidratos e lipídios têm nucleotídeos de purinas e pirimidinas como precursores e nucleotídeos trifosfatos são precursores imediatos para macromoléculas de informação na célula [36].

Existem basicamente dois tipos de bases nitrogenadas que formam os nucleotídeos, chamadas de purinas e pirimidinas. Ambos, purina e pirimidina possuem um anel de 6-membros contendo dois nitrogênios e quatro carbonos, mas estas estruturas não têm correlação em termos de síntese. Em todos os organismos, podem ser encontradas diferentes rotas para biossíntese e degradação de purinas e pirimidinas.

De forma geral, nucleotídeos podem ser sintetizados em um organismo a partir de pequenos precursores, pela síntese *de novo*, e pela conversão de bases purínicas e pirimidínicas livres em nucleotídeos, através das vias de salvação. Durante o processo de catabolismo, purinas livres podem ser convertidas em ácido úrico e pirimidinas livres podem ser degradadas em compostos pequenos como β -aminoácidos [37].

Considerando este amplo quadro inicial a respeito do metabolismo de nucleotídeos, olharemos mais em detalhes para o metabolismo de nucleotídeos em *Leishmania*. A *Leishmania* é um protozoário pertencente à família Trypanosomatidae, parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, com duas formas principais: uma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, e outra aflagelada ou amastigota, observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados [38].

O ponto inicial é analisar as diferenças principais entre o metabolismo de nucleotídeos em *Leishmania* e em humanos.

Leishmania não possui maquinaria para síntese de nucleotídeos de purina a partir de precursores pequenos na síntese *de novo* e, portanto, depende inteiramente dos hospedeiros (insetos e mamíferos) para obter purinas sintetizadas. Isso obviamente faz com que a via de salvação de purinas seja crucial e conseqüentemente, repleta de alvos atrativos para o planejamento de fármacos [36]. Entretanto, ainda que a natureza obrigatória da via de salvação de purina torne esta uma rota crítica no metabolismo de *Leishmania*, nenhuma quimioterapia baseada em purina foi desenvolvida para parasitas cinetoplastídeos. Isso se deve ao fato de existir grande redundância nos transportadores de purinas, de forma que a inibição de um dos transportadores ou de uma enzima não apresenta efeito sobre a sobrevivência do parasito [39].

Por outro lado, *Leishmania* pode sintetizar pirimidina *de novo* e ainda expressa um conteúdo de enzimas da via de salvação [36]. Embora o metabolismo de pirimidinas em *Leishmania* tenha sido considerado menos suscetível a propostas terapêuticas do que a via de salvação de purinas, a organização do metabolismo de pirimidinas é bastante diversa em parasitas protozoários [39]. Algumas evidências têm indicado que a inibição seletiva de

enzimas da biossíntese de pirimidinas em protozoários pode ser uma boa ideia em termos de estratégia terapêutica.

1.2.2 Biossíntese de nucleotídeos de pirimidina em *Leishmania* e humanos: Algumas evidências relevantes

A primeira informação a ser considerada é a de que a demanda por pirimidina depende integralmente da atividade metabólica da célula como um todo, não sendo absolutamente um processo isolado. Por exemplo, muitos patógenos desenvolveram estratégias de redirecionamento do metabolismo de pirimidinas nos organismos nos quais eles infectam para garantir sua própria sobrevivência por meio da criação de ambientes nos quais eles possam encontrar níveis excelentes de metabolitos de pirimidina. Dessa forma, é imprescindível manter uma visão global da dinâmica e versatilidade da biossíntese de pirimidinas nas células [40].

Uma representação esquemática dos transportadores de pirimidina, biossíntese, via de salvação e caminhos de interconversão em *Leishmania* é mostrada adiante na Figura 2.

Figura 2. Representação esquemática do metabolismo em *Leishmania donovani*. A linha dupla curvada representa a membrana plasmática do parasita, enquanto as setas indicam a função bioquímica ou a atividade de transportador de: CPS (1), ACT (2), DHO (3), DHODH (4), UMPS (5 e 6), transportador de nucleosídeo 1 (7), transportador de uracil (8), citidina desanimase (9), uridina fosforilase (10), nucleosídeo hidrolase (11), e UPRT (12). Modificado de [40].

Embora as estruturas primárias das enzimas que compõem a via metabólica de biossíntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina diverjam consideravelmente entre procariotos, protozoários, fungos e animais, a biossíntese *de novo* de pirimidinas representa um dos mais antigos processos metabólicos e todos os seus seis passos têm se mantido intactos durante a evolução [41].

Em ambos, *Leishmania* e humanos, seis enzimas estão envolvidas nesta rota e bicarbonato, glutamina e duas moléculas de ATP são utilizados como precursores. Estas seis enzimas conservadas em todas as espécies são: carbamoil fosfato sintetase (CPS), aspartato carbamoil transferase (ACT), diidroorotase (DHO), diidroorotato desidrogenase (DHODH), orotato fosforibosil transferase (OPRT) e oridina monofosfato descarboxilase (OMPDC).

Ainda que, em termos gerais, ocorram similaridades na atividade das enzimas, são encontradas importantes diferenças entre as enzimas da biossíntese de pirimidinas de *Leishmania* e de humanos no que se refere especialmente à arquitetura dentro de polipeptídios multi-funcionais, regulação alostérica, uso de cofatores e localização celular. Como exemplo, temos o fato de que em humanos, um gene único codifica uma proteína multifuncional composta pelas primeiras três enzimas da via de biossíntese de pirimidina, essa proteína multifuncional é chamada CAD (CPS-ACT-DHO), por outro lado em *Leishmania*, estas enzimas são codificadas por genes separados [36].

De maneira mais geral, uma estratégia típica para desenvolvimento de drogas é buscar a inibição de enzimas que sejam essenciais para a viabilidade do organismo. Baseado nessa proposta, um estudo foi realizado para avaliar as contribuições da biossíntese e via de salvação de pirimidina em *Leishmania* nas formas promastigota e amastigota. Foram construídas linhagens individuais de mutantes deficientes em CPS (carbamoil fosfatossintetase), a primeira enzima da via *de novo*, UPRT (uracil fosforibosiltransferase), uma enzima da via de salvação, e em ambas CPS e UPRT ao mesmo tempo.

O mutante Δcps confere auxotrofia para pirimidina, mas os parasitas Δcps continuam robustos na habilidade para infectar ratos, indicando que a forma amastigota de *Leishmania donovani* dentro de macrófagos, tem acesso ao estoque de pirimidinas. O mutante $\Delta uprt$ não pode obter pirimidinas a partir do hospedeiro, mas manteve-se prototrófico para pirimidinas. E finalmente, para o mutante $\Delta cps/\Delta uprt$ a linhagem foi bastante enfraquecida de forma que não houve persistência dos parasitas após quatro semanas de infecção. Baseado nestes achados, os autores concluíram que tanto a biossíntese *de novo* quanto a via de salvação contribuem para uma infecção robusta pela forma amastigota de *L. donovani* e uma estratégia terapêutica eficiente seria inibir ambas as vias [42].

Outras evidências a respeito da importância da biossíntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina foram encontradas em outros tripanosomatídeos. Uma linhagem mutante deficiente em CPS também foi construída para *T. cruzi* mostrando que a ausência do gene CPS reduz o crescimento do parasito e em particular, o crescimento da forma amastigota foi suprimido [43].

Dois outros estudos investigaram também a importância da biossíntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina utilizando especificamente a enzima DHODH que catalisa a quarta reação nesta rota. No primeiro estudo, o silenciamento gênico por interferência de RNA para enzima DHODH em *T. brucei* somente afetou o crescimento em um meio empobrecido de pirimidina ou na presença de um antagonista da recaptação de pirimidina [44]. No segundo estudo, os autores sugeriram que *T. cruzi* nocaute para DHODH não sobrevive mesmo na presença de nucleotídeos de pirimidina [45]. Estes dois estudos demonstram a importância da via de biossíntese de pirimidina e também sugerem a enzima DHODH com um alvo terapêutico atrativo para o planejamento de moléculas com atividade tripanocida.

Provavelmente devido às similaridades em termos da atividade enzimática para as enzimas da via *de novo* de pirimidinas em *Leishmania* e humanos, nenhum fármaco para tratamento de Leishmaniose tem como alvo uma enzima desta rota. Contudo, algumas propriedades exclusivas da enzima DHODH fazem com que ela seja um alvo bastante promissor. Algumas características exclusivas a cada enzima já puderam ser identificados apenas pela análise da sequência primária das proteínas, como a localização celular, o uso de diferentes substratos e o mecanismo de catálise adotado dependente de diferentes resíduos. O desenvolvimento desse projeto com os estudos de caracterização e busca de inibidores para a enzima DHODH de *Leishmania major* também teve importante papel no sentido de obtermos detalhes acerca da distinção entre as enzimas humana e do parasito.

1.2.3 Diidroorotato desidrogenase (DHODH): uma Flavoproteína

1.2.3.1 Ciclo catalítico dependente de flavina mononucleotídeo (FMN)

Como mencionado, a biossíntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina é uma importante via metabólica, altamente conservada em eucariotos e procariotos. No quarto passo desta via metabólica, atua a enzima diidroorotato desidrogenase (DHODH), responsável pela conversão da molécula L-diidroorotato (DHO) em orotato. Essa reação corresponde à única etapa de oxidação-redução na síntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina [46].

O ciclo catalítico nas DHODHs é dependente do grupo prostético flavina mononucleotídeo (FMN) (Figura 3), de forma que as DHODHs são classificadas como flavoenzimas. Esse cofator essencial para flavoproteínas é derivado da riboflavina e está amplamente distribuído na natureza. A porção relevante em termos mecanísticos no FMN é o sistema anelar da isoaloxazina que serve como catalisador de oxidoredução reversível em muitos processos biológicos. É também este componente estrutural responsável pela absorção da luz na região do ultravioleta e do visível que confere coloração amarela às flavoproteínas. Na forma oxidada (Figura 3A) a flavina apresenta dois picos característicos de absorção, o primeiro ao redor de 360 nm e o segundo ao redor de 450 nm (Figura 3C), sendo que estes picos são perdidos quando a flavina é reduzida (Figura 3B e 3C) [47].

Figura 3. Flavina mononucleotídeo (FMN) nas formas oxidada (A) e reduzida (B). Em C é possível observar o espectro de varredura para FMN e FMN reduzido. A flavina oxidada apresenta dois picos característicos de absorção (~ 360 nm e ~ 450 nm), sendo que estes picos são perdidos quando a flavina é reduzida.

O espectro de absorção do FMN complexado é uma característica particular de cada proteína, uma vez que depende do ambiente químico formado pelos resíduos de aminoácidos do sítio envolvido na complexação da flavina. O FMN é, em geral, fortemente complexado à estrutura proteica, ainda que essa complexação seja não covalente na maioria dos casos. Isso faz com que, salvo em exceções, não ocorra dissociação entre o FMN e a proteína. Essa forte complexação provavelmente evoluiu do fato do FMN ser rapidamente auto-oxidado fora dos microambientes dos sítios ativos das enzimas [48].

As flavoenzimas operam em cada ciclo catalítico por meio de duas reações parciais. Na primeira reação o substrato é oxidado enquanto a flavina complexada é reduzida, essa primeira parte é, em geral, chamada de reação parcial de redução. Em um segundo momento, a flavina reduzida é reoxidada, e esta etapa é chamada de reação parcial de reoxidação. As flavinas atuam verdadeiramente como grupos prostéticos e não como co-substratos e não aparecem na estequiometria da reação [48].

Uma característica importante é a de que durante esse processo redox, um ou dois elétrons são cinética e termodinamicamente acessíveis levando a estados de oxidação distintos. A redução pela transferência de um elétron leva ao estado de semiquinona e por dois elétrons leva ao estado de flavina reduzida, sendo ambos biologicamente relevantes dependendo do mecanismo pelo qual ocorre a transferência eletrônica [48]. Uma característica muito importante das flavoproteínas refere-se ao fato de que é possível monitorar a formação destes estados de oxidação distintos por meio do monitoramento do espectro de absorção na região do visível em determinada resolução temporal, o que permite obter uma ampla quantidade de informação a respeito dos mecanismos envolvidos na catálise.

Especificamente para as DHODHs, durante a catálise, a enzima utiliza a flavina mononucleotídeo como cofator, para, na primeira etapa da reação, promover a oxidação do substrato L-diidroorotato (DHO) enquanto FMN é reduzido. Na segunda etapa da reação, FMN é reoxidado (FMNH_2 convertido em FMN) através do auxílio de um segundo substrato, o agente oxidante, cuja natureza varia entre as enzimas de diferentes origens biológicas. Para a enzima DHODH de tripanossomatídeos como *Leishmania major* (*LmDHODH*) e *Trypanosoma cruzi* (*TcDHODH*), fumarato é o agente oxidante (Figura 4), enquanto para a enzima humana, ubiquinona é o agente oxidante [49].

Figura 4. Quadro geral da reação catalisada pela *LmDHODH*. Nesse processo a enzima complexada ao FMN em sua forma oxidada (E-Flox) é reduzida pelo primeiro substrato, diidroorotato (DHO). O produto da primeira reação, orotato (ORO), é liberado antes que o segundo substrato se ligue ao sítio ativo. Na segunda etapa da reação, a enzima complexada ao FMN reduzido (E-Fred) é reoxidada pelo fumarato (FUM) e o segundo produto, succinato (SUC), é liberado [50].

1.2.3.2 Classes de DHODHs

De acordo com as características estruturais e de localização celular, as enzimas DHODHs são atualmente divididas em duas classes 1 e 2, sendo que as enzimas da família 1 são ainda subdivididas em subclasses 1A e 1B.

DHODHs de classe 1 são proteínas citosólicas que utilizam pequenas moléculas, fumarato ou NAD^+ , como agentes oxidantes no ciclo catalítico. Enzimas desta classe são encontradas, em bactérias do tipo Gram-positivas, fungos anaeróbicos e em eucariotos inferiores, como no caso dos tripanosomatídeos *Leishmania major* [44, 51-56]. Membros da subclasse 1A, como a *LmDHODH*, apresentam-se como dímeros compostos por duas cópias da cadeia polipeptídica codificada pelo gene *PyrD*, enquanto que os membros da subclasse 1B são tetrâmeros, formados como um dímero de heterodímeros, compostos de duas cadeias polipeptídicas codificadas pelos genes *PyrD* e *PyrK*.

As enzimas da classe 2 são monoméricas, codificadas pelo gene *PyrD* e caracterizadas por apresentarem uma extensão na região N-terminal, denominada domínio de membrana (Figura 5A), que permite a interação destas enzimas com a membrana com a membrana interna da mitocôndria em eucariotos [57-59] ou membrana citosólica de alguns procariotos como *Escherichia coli* [60-62]. As enzimas desta classe utilizam como receptores de elétrons, moléculas de caráter hidrofóbico. No caso da enzima humana, pertencente à família 2, ubiquinona é o agente oxidante.

A identidade sequencial entre membros das classes 1 e 2 é de aproximadamente 20%. Membros da classe 2 compartilham a identidade sequencial em torno de 40%, sendo que as maiores diferenças são encontradas ao longo das duas α -hélices que formam o domínio de membrana. A identidade sequencial entre membros da classe 1 é maior que 50%, chegando a mais que 70% quando analisamos apenas as DHODHs de tripanossomatídeos. As DHODHs das diferentes espécies do gênero *Leishmania* compartilham identidade sequencial superior a 85%.

Atualmente, podemos encontrar no banco de dados Protein Data Bank (PDB) a estrutura tridimensional resolvida para enzimas DHODHs pertencentes às duas classes, conforme resumido na Tabela 1. Em particular, as estruturas cristalográficas das enzimas DHODHs de *Leishmania major* (*LmDHODH*), *Trypanosoma cruzi* cepa Y (*TcDHODH-Y*) e *Leishmania braziliensis* (*LbDHODH*) foram resolvidas em nosso laboratório.

Tabela 1: Relação das estruturas cristalográficas depositadas no banco de dados PDB das enzimas DHODH das diferentes classes, especificando as diferenças relacionadas às características estruturais, natureza do agente oxidante e cofator utilizado pela enzima de cada organismo.

Classe DHODH	Organismo	Cofator	Agente oxidante	Estado oligomérico	Código PDB
1A	<i>Trypanosoma cruzi</i> - cepa Y	FMN	Fumarato	Homodímero	3C3N [56]
	<i>Trypanosoma cruzi</i> - cepa Tulahuen (gene2)				2DJX* [63]
	<i>Trypanosoma brucei</i>				2B4G [44]
	<i>Leishmania major</i>				3GYE* [54]
	<i>Leishmania donovani</i>				3C61 [†]
	<i>Leishmania braziliensis</i>				4WZH [64]
	<i>Lactococcus lactis</i>				1DOR* [65]
	<i>Streptococcus mutans</i>				3OIX [66]
1B	<i>Lactococcus lactis</i>	FAD FMN [2Fe-2S]	NAD ⁺	Heterodímero	1EP1* [67]
	<i>Thermotoga maritima</i>				4YLF* [68]
2	<i>Homo sapiens</i>	FMN	Ubiquinona	Monômero	1D3G* [57]
	<i>Plasmodium falciparum</i>				1TV5* [69]
	<i>Rattus Rattus</i>				1UUM* [70]
	<i>Rattus norvegicus</i>				4ORI [71]
	<i>Escherichia coli</i>				1F76 [72]
	<i>Mycobacterium Tuberculosis</i>				4XQ6 [†]

*Há mais de uma estrutura depositada no PDB relacionada à DHODH deste organismo. [†] Dados não publicados.

Do ponto de vista estrutural, ambas as classes se enovelam em um motivo barril α/β (domínio catalítico) que consiste de uma região central formada por oito fitas beta paralelas rodeadas por oito α -hélices. No topo do barril, três fitas β antiparalelas formam uma tampa

que cobre o sítio redox. O fundo do barril é formado um par de fitas β antiparalelas. O sítio de ligação do orotato é localizado na parte superior do barril onde várias fitas formam o bolso de ligação do substrato e do FMN [65] (Figura 5).

Figura 5. Representação em *cartoon* dos monômeros da (A) *HsDHODH* – DHODH classe 2 e (B) *LmDHODH* – DHODH classe 1A. (PDB ID: 2BOM e 3TQ0, respectivamente). Em ambos os casos o sítio ativo é localizado no topo do barril α/β , e contém uma molécula de FMN. A entrada do sítio ativo é protegida por um *loop* catalítico, representado em ciano. Na *HsDHODH* em A, é possível observar na região N-terminal o domínio de membrana, colorido em verde.

A entrada do sítio catalítico é protegida por um *loop* com grande flexibilidade. Tem sido reportado que este *loop* varia entre uma conformação aberta e uma conformação fechada durante a catálise para as enzimas de classe 1A. Nestas enzimas da classe 1A, o *loop* catalítico

é maior e mais flexível (Figura 5), e sabe-se que a movimentação deste *loop* exerce um papel importante na catálise.

Embora a estrutura em barril α/β de membros da família 2 se assemelhe com a estrutura da DHODH de membros da família 1, há algumas diferenças no sítio ativo. Uma grande diferença encontrada entre os membros da família 1 e 2 das DHODHs é com relação ao resíduo que atua como base catalítica na primeira etapa da reação, responsável pela subtração do hidrogênio do carbono C5 da molécula L-diidroorotato, onde a cisteína catalítica da classe 1A das DHODHs é substituída por uma serina na classe 2 [72]. (Figura 6).

Além disso, duas outras importantes mutações são observadas quando comparamos a região do sítio ativo entre as classes 1A e 2, incluindo o resíduo de serina (Ser196) em *LmDHODH* que é substituído por uma treonina (Thr285) na enzima humana, e o resíduo de leucina (Leu72) em *LmDHODH* que é substituído por um resíduo de fenilalanina (Phe149). Estas análises, nos sugerem que embora o modo de atuação das enzimas das famílias 1 e 2 das DHODHs seja semelhante, diferenças químicas, estruturais e dinâmicas podem ser exploradas para introduzir seletividade aos inibidores da classe 1A (Figura 6).

Figura 6. Interações entre DHODH e o produto da reação, ORO. Resíduos presentes na enzima humana estão representados em fonte negrito e da enzima *LmDHODH* em fonte itálico. Modelo baseado nas estruturas tridimensionais das enzimas complexadas com o produto da catálise, PDB ID: 2FPV (humana) e 3GZ3 (*L. major*). Figura adaptada de [73].

1.2.3.3 DHODHs de Classe 1A: detalhes estruturais e de mecanismo

Um aspecto muito importante das enzimas de classe 1A consiste no fato de que ambos os substratos, DHO e fumarato, ocupam o mesmo sítio, o sítio pirimidínico. Por outro lado,

para as enzimas da classe 2, o DHO interage no sítio pirimidínico, enquanto a ligação do segundo substrato, a quinona, é proposto como sendo na região entre as hélices do domínio de membrana, um sítio de caráter hidrofóbico [74]. Essa diferença tem muita relevância em termos do mecanismo das reações para estas enzimas, o que será discutido com base nos resultados apresentados nesta tese.

Estudo utilizando a enzima de *Lactococcus lactus* como modelo demonstrou que a forma dimérica é essencial para a atividade catalítica das enzimas da classe 1A das DHODHs [75]. A enzima *LmDHODH* é dimérica, enquanto a enzima humana (classe 2) é monomérica [65]. Como consequência, a interface do dímero é uma região exclusiva na enzima do parasito [56].

Além do estado oligomérico dimérico, tem sido proposto para enzimas da classe 1A, um modelo de reatividade que envolve o funcionamento de um monômero por vez, refletindo uma assimetria no comportamento catalítico dos monômeros que compõem o dímero [76].

De forma geral, a análise topológica nos permite identificar cinco regiões independentes nas DHODHs da subclasse 1A que apresentam forma, volume e localização definidos e que são relevantes, do ponto de vista estrutural. Nomeadas de acordo com a distância do sítio ativo, estas regiões compreendem: o sítio ativo (S1), uma extensão da região S1 (S2), a região atrás do *loop* catalítico (S3), uma extensão da região S3 (S4) e a região localizada na interface dimérica (S5) (Figura 7).

Figura 7. Regiões independentes na DHODH classe 1A, em destaque no dímero. O sítio ativo (S1), uma extensão da região S1 (S2), a região atrás do *loop* catalítico (S3), uma extensão da região S3 (S4) e a região localizada na interface dimérica (S5) estão indicadas em rosa, azul, laranja, verde e vermelho, respectivamente [73].

Para *LmDHODH*, a abertura do *loop* catalítico permite a abertura de um canal de acesso ao sítio ativo envolvendo os sítios S2 e S3-S4, o que possibilitaria a acomodação de moléculas maiores. Uma vez que estes sítios ao redor do *loop* catalítico apresentam diferenças significativas entre as DHODHs de diferentes classes, ligantes poderiam ser planejados para ocuparem estas regiões. Desta forma, estes sítios mais distantes do sítio ativo podem ser validados como possíveis bolsões a serem explorados nas estratégias de inibição e busca de seletividade.

1.3 Planejamento de inibidores para as enzimas DHODHs de tripanosomatídeos

1.3.1 Motivação

As leishmanioses estão inseridas em um quadro bastante complexo das doenças infecciosas parasitárias, frequentemente chamadas de doenças negligenciadas. Estas doenças afetam milhões de pessoas nas diferentes regiões geográficas mais pobres do planeta e são responsáveis por incapacitar anualmente uma fração significativa da população, o que continua sendo um obstáculo para o desenvolvimento social e econômico dos países mais pobres [77]. Mais do que doenças negligenciadas, tratam-se de pacientes negligenciados para os quais a realidade é bastante cruel [78].

Especificamente a Leishmaniose é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por diferentes espécies do gênero *Leishmania*, que acomete pele e mucosas. A *Leishmania* é um protozoário pertencente à família Trypanosomatidae, parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, com duas formas principais: uma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, e outra aflagelada ou amastigota, observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados [38].

As leishmanioses representam um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica. Aproximadamente vinte e uma espécies são responsáveis pelas diferentes patogenias de leishmaniose. Leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum da doença, que provoca ulcerações na pele deixando cicatrizes permanentes; leishmaniose muco-cutânea (LMC) causa úlceras na pele levando a destruição das membranas mucosas do nariz, boca e garganta; leishmaniose cutânea difusa (LCD), a forma mais difícil de tratar, causa lesões crônicas parecidas com a lepra, que não cicatrizam espontaneamente e voltam após tratamento; e leishmaniose visceral (LV), também chamada

calazar, é a forma mais preocupante da doença, sendo fatal se não tratada, causa hipertrofia do baço e fígado, febre, anemia e perda de peso [79]. Espécies diferentes de *Leishmania* são responsáveis pelas diferentes formas clínicas da doença. Infecções por *L. major* ou *L. tropica* causam LC, as espécies da América do Sul, como *L. braziliensis*, causam LMC e *L. donovani* ou *L. infantum* causam LV. Deve-se destacar que mesmo com a diversidade de espécies de *Leishmania*, a manifestação clínica da doença depende não apenas da espécie envolvida, mas também do estado imunológico do indivíduo infectado. Um espectro de formas clínicas pode se desenvolver na dependência das características da resposta imune mediada por células [38].

Uma questão que deve ser analisada é a alteração no padrão de transmissão das Leishmanioses nas últimas décadas. Inicialmente considerada como zoonose de animais silvestres, que acometia ocasionalmente pessoas em contato com as florestas, a doença começou a ocorrer em zonas rurais já praticamente desmatadas, e em regiões periurbanas. Atividades como exploração desordenada da floresta, derrubada de matas para construção de estradas e extração de madeira tornam o quadro de transmissão ainda mais diverso e de difícil contenção [38].

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano [38]. Especificamente no Brasil, o quadro é bastante complexo. O país lidera as estatísticas com relação à ocorrência das diferentes formas de leishmanioses na América Latina e Caribe e isso reflete a extrema desigualdade existente em nosso país [80]. Nos dados mais recentes divulgados pela OMS, que se referem ao ano de 2013, o número de casos reportados para o Brasil é de 3253 para LV e 18226 para LC [81]. Estes dados refletem o fato de que no Brasil, a Leishmaniose é uma doença com ampla diversidade de agentes, de reservatórios e de vetores, e apresenta padrões de transmissão complexos e um conhecimento ainda limitado sobre alguns aspectos, o que a torna de difícil controle [38].

1.3.2 A necessidade de novos fármacos para o tratamento das Leishmanioses

Segundo a OMS e o Ministério da Saúde, as drogas de primeira escolha no tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}), como N-metilglucamina e estibogluconato de sódio, sendo que este último não é comercializado no Brasil. Estas drogas são consideradas leishmanicidas, pois interferem na bioenergética das formas amastigotas de *Leishmania*. Tanto a glicólise, quanto a oxidação dos ácidos graxos são inibidos, sendo esta

inibição acompanhada de redução na produção de ATP e GTP [38]. Contudo, os mecanismos moleculares envolvidos nesta inibição não são completamente elucidados. Ainda que estes fármacos tenham elevada eficácia, eles apresentam importantes efeitos adversos, dependendo da dose estabelecida. O principal efeito adverso do Sb^{5+} é decorrente de sua ação sobre o aparelho cardiovascular, podendo causar arritmias cardíacas e/ou outras manifestações de cardiotoxicidade.

Não havendo resposta satisfatória com o tratamento pelo antimonial pentavalente, as drogas de segunda escolha são a anfotericina B e as pentamidinas (sulfato de pentamidina e mesilato de pentamidina). A anfotericina B atua nas formas promastigotas *in vitro* e amastigotas *in vivo* de *Leishmania*. Apresenta toxicidade seletiva por sua interferência nos ésteres (episterol precursor do ergosterol) da membrana citoplasmática de *Leishmania*. As pentamidinas são diamidinas aromáticas, contudo poucos estudos foram realizados nas Américas utilizando esta terapêutica. Tanto a anfotericina B quanto as pentamedinas apresentam limitações, como necessidade de tratamentos prolongados, diversos efeitos colaterais e custos elevados [38].

Considerando o complexo quadro fisiopatológico das Leishmanioses, o número reduzido de boas alternativas terapêuticas e a relevância desta doença no cenário brasileiro, é evidente a necessidade de novos estudos que envolvam a busca por novos tratamentos.

1.3.3 As DHODHs de tripanosomatídeos como possíveis alvos terapêuticos

A enzima DHODH é um alvo importante no desenvolvimento de fármacos com atividade anti-inflamatória, imunossupressora, antiproliferativa e antiparasitária [82-86]. O potencial terapêutico da inibição desta via metabólica, através da inibição específica da enzima DHODH, tem sido demonstrado por compostos como a molécula A771726, metabólito ativo da Leflunomida (ARAVA[®]), aprovado para o tratamento de artrite reumática, que inibe a enzima DHODH humana [87]. O composto Brequinar, também inibidor da enzima DHODH humana, tem sido testado como antineoplasmático [88]. Já o composto Atavacona (Malarone[®]), inibidor da enzima DHODH de *Plasmodium falciparum* (PfDHODH) é atualmente prescrito como medicamento anti-malária. Em todos estes exemplos, as DHODHs envolvidas são enzimas da classe 2 e os inibidores destas enzimas foram planejados para interagir no sítio da ubiquinona, na região do domínio de membrana, bloqueando o acesso do agente oxidante ao sítio ativo.

Contudo, este sítio está ausente nas enzimas da classe 1 (Figura 5) e inibidores conhecidos são seletivos para a classe 2 e não inibem as enzimas de tripanosomatídeos. No caso das DHODHs de classe 1A, como já foi dito, os dois substratos se ligam ao mesmo sítio, o chamado sítio pirimidínico.

O primeiro estudo tendo como alvo para inibição a enzima DHODH de classe 1A foi realizado com *Lactococcus lactis* (L/DHODH-A) [89]. Neste trabalho, foram obtidos protótipos de inibidores, que embora não apresentassem excelente atividade inibitória, eram inibidores seletivos para a enzima de *Lactococcus lactis*, uma vez que não inibiam nem a enzima humana, nem a enzima de *E. coli*. Esta busca por inibidores demonstrou a possibilidade da obtenção de inibidores específicos frente às DHODHs de classe 1A interagindo com o sítio pirimidínico, apesar da elevada identidade sequencial mantida neste sítio para as DHODHs de ambas as classes.

Considerando a imensa necessidade de quimioterapias eficientes para as Leishmanioses, bem como a relevância da biossíntese de pirimidina e as peculiaridades das DHODH de tripanosomatídeos, que podem ser exploradas em termos de estrutura e mecanismos, diversos esforços têm sido realizados em nosso laboratório na busca por agente inibidores das DHODHs de classe 1A. Ao longo destes anos, diversas abordagens foram utilizadas e alguns inibidores foram identificados [73] a partir da combinação de ferramentas variadas.

Considerando que não exista ainda nenhuma validação genética que confirme a essencialidade das DHODHs para o crescimento ou sobrevivência da *Leishmania*, métodos químicos podem ser uma abordagem alternativa. Validação química envolve o uso de um composto capaz de se ligar com alta afinidade ao alvo produzindo morte celular ou inibição do crescimento celular dependente da dose. Nesse contexto, compostos com atividade inibitória frente à *LmDHODH* poderiam ser também utilizados como ferramentas em estudos envolvendo o alvo e a via bioquímica [90].

Tendo em vista esse contexto, podemos afirmar que as DHODHs de tripanosomatídeos são enzimas atrativas uma vez que participam de uma rota bioquímica importante, apresentam diferenças estruturais e relacionadas ao mecanismo quando comparamos à enzima humana e possuem diferentes bolsões que podem ser explorados no planejamento de moléculas com atividade inibitória.

OBJETIVOS

2.0 Objetivos

A proposta geral deste trabalho foi ampliar nosso conhecimento a respeito dos detalhes moleculares envolvidos na catálise enzimática promovida pela *LmDHODH* e identificar novos compostos com atividade inibitória frente à enzima.

Informações sobre o mecanismo de complexação enzima e substrato, tanto do ponto de vista estrutural quanto cinético, fornecem a base da compreensão do fenômeno que pode ser utilizada na otimização de modelos de busca de moléculas com atividade inibitória ou de ativação de alvos enzimáticos. Por outro lado, a determinação dos mecanismos de inibição ou ativação destes alvos, assim como a obtenção de detalhes estruturais da complexação, fornecem evidências a respeito dos mecanismos pelos quais as enzimas exercem sua função. É nesse contexto de combinação de informações estruturais, de mecanismo e modulação funcional que se insere o trabalho desenvolvido ao longo desta tese.

Os objetivos específicos foram:

- i. Detalhamento do mecanismo baseado na realização de uma ampla caracterização cinética do estado estacionário e pré-estacionário, assim como o estudo da interação da enzima com os produtos da catálise. A combinação destes dados com informações da literatura nos permitiu estender nosso conhecimento a respeito de como funcionam as DHODHs de classe 1A.
- ii. Construção de novos mutantes de diferentes regiões previamente mapeadas da enzima. Estas novas construções compõem uma biblioteca de mutantes de *LmDHODH* que tem sido ampliada em nosso laboratório. Os mutantes foram utilizados como ferramentas para testar nossas hipóteses a respeito dos detalhes moleculares e dinâmicos da catálise, e para validar sítios estruturais que poderão ser explorados no planejamento e melhorando de compostos com ação inibitória.
- iii. Desenvolvimento de uma plataforma para realização triagem de alto desempenho tendo como alvo a enzima *LmDHODH* utilizando tanto interferometria de biocamada quanto monitoramento da atividade enzimática para a varredura de biblioteca de compostos baseada em diversidade química e biblioteca de fragmentos.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.0 Materiais e Métodos

3.1 Estudo do mecanismo de reação para a enzima nativa

Os experimentos realizados nesta etapa de caracterização do mecanismo de reação para a enzima *LmDHODH* serão apresentados conforme ilustrado no organograma adiante (Figura 8). A seguir os itens serão devidamente detalhados em termos dos métodos aplicados.

Figura 8. Fluxo experimental implementado durante os estudos do mecanismo de reação da enzima *LmDHODH*.

3.1.1 Produção heteróloga da enzima *LmDHODH*

Para a realização dos ensaios propostos a enzima *LmDHODH* foi expressa e purificada seguindo o protocolo implementado previamente em nosso grupo de pesquisa [91]. A expressão heteróloga da enzima foi realizada utilizando a cepa BL21(DE3) de *Escherichia coli*, em meio de cultura LB na presença do antibiótico canamicina ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$). A expressão da enzima *LmDHODH* foi induzida com $0,5 \text{ mM}$ de IPTG por cinco horas a 25°C . A construção utilizada, na qual a proteína se encontra fusionada a um peptídeo contendo seis resíduos de histidina permitiu que o processo de purificação fosse realizado em uma única etapa, que consistiu em uma cromatografia de afinidade através da utilização da resina Ni-NTA Agarose (Qiagen). A resina foi inicialmente equilibrada com tampão $50 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$ em pH 8 e 300 mM NaCl . Para a remoção de contaminantes, a resina de níquel foi lavada com

um gradiente crescente de imidazol (0 mM a 50 mM), e a eluição da enzima foi realizada na presença de 100 mM de imidazol (pH 8, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl e 100 mM imidazol). Em seguida, a enzima purificada foi concentrada utilizando AMICON-10 kDa (Millipore) e dialisada contra o tampão 50 mM Hepes pH 7,2 e 150 mM NaCl.

3.1.2 Caracterização do espectro de absorção e determinação do coeficiente de extinção molar para a LmDHODH

A quantificação da enzima foi realizada por meio da utilização do coeficiente de extinção molar para a DHODH de *Leishmania major* a 458 nm [92]. O coeficiente de extinção foi determinado, segundo a Equação 6, baseado na concentração de FMN livre extraído das amostras de proteína por desnaturação térmica. Amostras de proteína foram inicialmente diluídas em 50 mM HEPES pH 7,2; 150 mM NaCl e um espectro de varredura (800 – 200 nm) foi obtido para determinação do ponto de máximo de absorbância ($Abs_{max_{enz}}$). A solução de proteína foi incubada a 80°C por 5 min. Após centrifugação em temperatura ambiente, a porção do sobrenadante, a qual contém o cofator FMN, foi separada do precipitado e um novo espectro de varredura foi tomado. O máximo da absorbância a 450 nm foi obtido, e a concentração de FMN livre foi estimada pela utilização do $\epsilon_{450nm_{FMN}} = 12250 M^{-1} cm^{-1}$ como referência.

$$\epsilon_{enz} = \frac{Abs_{max_{enz}} \times \epsilon_{450nm_{FMN}}}{Abs_{450nm_{FMN}}} \quad \text{Equação 6}$$

3.1.3 Caracterização cinética

3.1.3.1 Ensaios enzimáticos no estado estacionário

O ensaio de atividade da enzima LmDHODH foi baseado no monitoramento da conversão de DHO em ORO. A concentração de ORO foi estimada a 300 nm, a temperatura de 20°C, utilizando o coeficiente de extinção molar ($\Delta\epsilon_{300} = 2,65 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

A mistura de reação continha 50 mM HEPES pH 7,2, 150 mM NaCl, e ambos os substratos, DHO e fumarato. A reação foi iniciada pela adição de enzima, seguida de rápida etapa de homogeneização e monitoramento de mudanças na absorção utilizando o

espectrofotômetro Hitachi U-2900. As medidas foram realizadas sobre condições aeróbicas e anaeróbicas. Neste último caso, foram realizadas em cubetas de 3,5 mL fechadas com um septo de silicone por meio do qual foi possível borbular argônio em todas as soluções por 15 minutos previamente aos ensaios de cinética.

Os parâmetros cinéticos foram determinados pela variação de DHO (15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 e 60 µM) e fumarato (15,63; 31,25; 62,5; 90, 125, 250, 300, 375, 500 e 600 µM) na mistura de reação. As taxas iniciais aparentes, $v/[E]$, em diferentes concentrações de DHO e fumarato foram determinadas por meio do ajuste dos dados na equação de Hill (Equação 7) e na Equação de Michaelis-Menten (Equação 8), respectivamente:

$$\frac{v}{[E]} = \frac{{}^{app}k_{cat}[DHO]^h}{({}^{app}K_{0.5}^{DHO})^h + [DHO]^h} \quad \text{Equação 7}$$

$$\frac{v}{[E]} = \frac{{}^{app}k_{cat}[FUM]}{{}^{app}K_m^{FUM} + [FUM]} \quad \text{Equação 8}$$

Onde, $[E]$ representa a concentração de enzima, ${}^{app}k_{cat}$ é o *turnover* aparente, $[DHO]$ e $[FUM]$ são as diferentes concentrações dos substratos, DHO e fumarato, respectivamente, ${}^{app}K_m^{FUM}$ é a constante de Michaelis-Menten aparente para o fumarato, ${}^{app}K_{0.5}^{DHO}$ é concentração de DHO na qual metade da velocidade da reação é obtida na equação de Hill e h é o coeficiente de Hill.

Os parâmetros cinéticos globais foram estimados por meio do ajuste dos dados no mecanismo ping-pong, no qual a primeira etapa da reação, etapa de redução, segue a cinética sigmoidal de Hill, enquanto a segunda etapa da reação, reação de reoxidação, obedece à cinética de Michaelis-Menten (Equação 9). A dedução desta equação encontra-se no APÊNDICE 1 desta tese.

$$\frac{v}{[E]} = \frac{k_{cat}[DHO]^h[FUM]}{(K_{0.5}^{DHO})^h[FUM] + K_m^{FUM}[DHO]^h + [DHO]^h[FUM]} \quad \text{Equação 9}$$

Onde, $[E]$ representa a concentração de enzima, k_{cat} é o *turnover* máximo, $[DHO]$ e $[FUM]$ são as concentrações de substratos utilizadas, DHO e fumarato, respectivamente, e K_m é a constante Michaelis-Menten para o fumarato, $K_{0.5}^{DHO}$ concentração de DHO na qual metade

da velocidade da reação é obtida e h é o coeficiente de Hill. O ajuste global foi realizado utilizando o programa Sigmaplot (Systat. Software Inc. Richmond, CA, USA).

3.1.3.2 Ensaios enzimáticos no estado pré-estacionário por *stopped-flow*

A caracterização da cinética no estado pré-estacionário foi realizada por meio de experimento de *stopped-flow*. Os ensaios de *stopped-flow* foram realizados no laboratório da Profa. Dra. Milagros Medina, do departamento de Bioquímica, Biologia Molecular e Celular da Universidade de Zaragoza, em um período total de quatro meses de estágio realizado pela aluna Renata Almeida Garcia Reis neste laboratório.

Na técnica de *stopped-flow*, as soluções, proteica e contendo o meio reacional, são lançadas por seringas para o interior de uma câmara de mistura. Depois de um tempo muito curto, cerca de alguns milissegundos, este fluxo é bruscamente interrompido por um pistão localizado na posição oposta, denominado seringa de parada, que está conectado a célula de detecção, quando uma célula de observação é preenchida. Esse evento aciona um dispositivo de medição (Figura 9). Pequenos volumes de solução são usados e é possível monitorar a reação em um tempo muito curto, da ordem de milissegundos [93].

Figura 9. Esquema do equipamento de *stopped-flow*. Os reagentes são lançados para uma câmara de mistura por duas seringas e a reação é monitorada em um intervalo de tempo muito curto, ordem de milissegundos. Modificado de [94].

Todas as medidas foram feitas usando o espectrofotômetro Photophysics SX17.MV em interface com um computador Acorn usando softwares SX18.MV ou Xscan do equipamento, utilizando tanto comprimento de onda único quanto detector com um arranjo de fotodiodos (em um intervalo de 350-900 nm), respectivamente. As duas etapas da reação foram estudadas sob condições anaeróbicas.

Previamente aos estudos de cinética, tonômetros contendo as soluções de enzima ou substrato foram submetidos a sucessivos ciclos de vácuo (0,001 atm) por 2 - 5 minutos seguido por fluxo de argônio de 2 - 5 minutos que levava a uma pressão positiva (1,6 atm), para prevenir a entrada de oxigênio. O ciclo vácuo - argônio foi repetido por 5 vezes, dependendo do volume da amostra. Esse procedimento foi realizado em um aparato de anaerobiose antes de serem adaptados nas seringas do *stopped-flow* (Figura 10). As reações foram realizadas em condições anaeróbicas também pela eliminação de traços de oxigênio por meio da adição de glicose (10 mM) e glicose oxidase às soluções (10 units·ml⁻¹).

As seringas do equipamento de *stopped-flow*, nas quais as amostras foram adicionadas, foram tratadas com solução de ditionito e tampão 50mM Hepes pH 7,2, 150mM NaCl livre de oxigênio antes da introdução dos reagentes.

Figura 10. A. Tonômetros B. Aparato de anaerobiose C. Equipamento de *stopped-flow*.

Todas as medidas foram realizadas em tampão contendo 50 mM HEPES pH 7,2; 150 mM NaCl a 12 °C. Todas as concentrações mencionadas nos experimentos de *stopped-flow* são aquelas obtidas após a mistura de igual volume de substrato e enzima, isto é, referem-se às concentrações finais e resultam de uma série de análises prévias realizadas para a otimização das concentrações que seriam utilizadas.

A concentração final de enzima *LmDHODH* utilizada foi de ~9 μM e os intervalos de concentrações dos substratos utilizados variaram dependendo da etapa da reação. Para a reação de redução, *LmDHODH* foi submetida a diferentes concentrações de DHO (15,65 μM; 31,25 μM; 62,5 μM; 125 μM, 250 μM, 500 μM e 1 mM). Já na etapa de reoxidação, a enzima foi previamente reduzida com DHO em uma relação 1 Enzima : 2 DHO, sob condições anaeróbicas, e em seguida a enzima reduzida foi submetida ao segundo substrato, fumarato (15,65 μM; 31,25 μM; 62,5 μM; 125 μM, 250 μM, 500 μM, 1 mM e 2 mM). Pelo menos três medidas foram realizadas para cada concentração de substrato.

As mudanças espectrais tempo-dependentes foram avaliadas pelas análises globais e métodos de integração numérica utilizando o programa Pro-K (Applied Photophysics Ltd.). Os dados foram ajustados na Equação 10.

$$k_{obs} = \frac{k_{red/reox}[S]}{K_d + [S]} \quad \text{Equação 10}$$

Onde K_d é a constante de dissociação para o complexo enzima-substrato, $k_{red/reox}$ (ou k_{red} ou k_{reox}) é a constante de velocidade para a redução ou reoxidação da flavina, respectivamente.

Em todos os casos, a reação reversível não foi considerada. Nos casos nos quais k_{obs} foi independente da concentração de substrato, um valor médio obtido foi utilizado como a velocidade limitante para a reação estudada.

3.1.4 Estudo da interação da enzima com os produtos da catálise

3.1.4.1 Espectroscopia diferencial com os produtos da reação

A complexação dos produtos da reação, orotato e succinato, à enzima *LmDHODH*, foi analisada por meio de experimentos de espectroscopia diferencial, monitorando mudanças espectrais resultantes da formação do complexo enzima-produto.

A ligação dos produtos das reações à *LmDHODH* foi avaliada pela exposição da enzima (a concentração de 20 μM) a concentrações crescentes de ORO (entre 0 a 604 μM) e succinato (entre 0 a 4 mM) em 50 mM HEPES pH 7,2, 150 mM NaCl, a 20°C, utilizando cubetas compartimentalizadas.

Mudanças na magnitude do espectro de UV-visível devido à formação de complexo foram observadas como uma função da concentração de ORO e os dados foram ajustados utilizando a Equação 11 para uma estequiometria 1:1.

$$\Delta Abs = \frac{\Delta Abs_{max}[ORO]}{K_d + [ORO]} \quad \text{Equação 11}$$

Onde ΔAbs e $\Delta Abs_{\max}$ são os valores da diferença entre as absorbâncias observadas e máximas para determinado comprimento de onda selecionado, respectivamente, e K_d é a constante de dissociação.

3.1.4.2 Calorimetria de titulação isotérmica (ITC) com os produtos da reação

Um perfil termodinâmico para uma interação pode ser obtido por meio de um simples experimento de calorimetria de titulação isotérmica (ITC). Isso inclui uma medida direta da constante de associação, k_a , da estequiometria da reação, N , e da mudança da entalpia resultante do evento de complexação, ΔH . Contudo, calorimetria não somente permite a obtenção dos valores de entalpia de ligação diretamente, mas de todos os parâmetros termodinâmicos. Os estudos apresentados neste trabalho foram realizados utilizando um calorímetro contendo duas celas mantidas à mesma temperatura durante todo o experimento. Neste caso, uma solução de proteína foi adicionada a cela experimental e sucessivas injeções de pequenos volumes de ligantes foram realizadas.

A interação entre ligante e proteína é acompanhada pela absorção ou liberação de calor, que serão, em qualquer dos casos, compensadas pela resistência que mantém a temperatura da cela experimental igual a da cela de referência. A variação do fluxo de calor em função do tempo é a informação registrada durante o experimento de ITC (tipicamente em $\mu\text{cal}\cdot\text{sec}^{-1}$). Quando cessa o efeito de uma interação, o valor do fluxo de calor retorna ao nível basal e como resultado é obtido um termograma de fluxo de calor em função do tempo [95].

A entalpia calorimétrica e a constante de ligação podem ser determinadas diretamente a partir do experimento de ITC pela medida direta do calor de interação conforme o ligante é titulado. Os outros parâmetros termodinâmicos para a interação são obtidos por meio da Equação 12.

$$-RT\ln K_a = \Delta G_a = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad \text{Equação 12}$$

Onde, R é a constante dos gases, T é a temperatura experimental absoluta, K_a é a constante de associação, ΔH é a entalpia de ligação e ΔS é a entropia de ligação.

De forma geral, todos os experimentos de ITC foram realizados no modelo VP-ITC (MicroCal, GE Heathare) a 25°C, utilizando o Origin5 (OriginLab) na análise dos dados. Todos os experimentos de ITC reportados neste trabalho foram realizados na Universidade de Dundee, na Divisão de Química Biológica e Desenvolvimento de Fármacos (BCDD), School

of Life Sciences, sob supervisão do Prof. William Hunter, onde a aluna Renata realizou o estágio BEPE ao longo de um ano (de Janeiro a Dezembro de 2015).

Foram realizados experimentos titulando ORO e succinato contra a enzima *LmDHODH*. Foi também realizado um experimento titulando fumarato contra a enzima. Em todos os casos foram preparadas soluções estoque de *LmDHODH* à concentração de 65 μM e um estoque do composto à concentração final de 950 μM em 50 mM HEPES pH 7,2 150 mM NaCl. Uma injeção inicial de 1 μL de ligante para remover o ar residual da seringa foi efetuada, seguida por outras 29 injeções de 8 μL de composto em intervalos de 3 minutos (a uma taxa de 0.5 $\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$).

A linha de base foi determinada automaticamente e os picos do termograma foram integrados e ajustados segundo o modelo de um sítio de ligação em todos os casos.

3.1.4.3 Cinética de complexação do ORO à *LmDHODH* analisada por *stopped-flow*

Análises cinéticas da complexação do primeiro produto da reação, ORO, também foram feitas utilizando o *stopped-flow* seguindo os mesmos padrões do experimento utilizando os substratos (item 3.1.3.1). Contudo, nesse caso as análises foram feitas em condições aeróbicas. O monitoramento das mudanças espectroscópicas foi observado pela mistura da enzima *LmDHODH* ($\sim 9 \mu\text{M}$) com diferentes concentrações de ORO (7,8; 15,6; 31,3; 62,5; 125, 250, 375, 500, 600 μM) em solução contendo 50 mM HEPES pH 7,2, 150 mM NaCl a 12 °C.

As mudanças espectrais tempo-dependentes foram avaliadas pelas análises globais e métodos de integração numérica utilizando o programa Pro-K (Applied Photophysics Ltd.). Os dados relacionados à formação do complexo *LmDHODH*-ORO foram ajustados em um modelo de passo único ($A \rightarrow B$) com valores de k_{obs} mostrando uma dependência linear da concentração de ORO (Equação 13).

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{for}} [\text{ORO}] + k_{\text{rev}} \quad \text{Equação 13}$$

Onde k_{for} e k_{rev} são as constantes de velocidade para a formação e dissociação do complexo *LmDHODH*-ORO, respectivamente.

3.1.4.4 Ensaios de inibição da *LmDHODH* frente ao ORO

Ensaios de inibição da enzima *LmDHODH* pelo produto ORO foram realizados pelo monitoramento da atividade enzimática em diferentes concentrações de ORO (0 – 125 μM), variando DHO entre 15 e 50 μM e usando o fumarato como aceptor de elétrons à concentração saturante (500 μM). O ensaio foi realizado em 50 mM HEPES pH 7,2; 150 mM NaCl, a 20°C.

A constante de inibição (K_i) foi determinada para o orotato por meio do ajuste não linear da atividade enzimática na Equação 14, a qual descreve o modelo de inibição competitiva para uma cinética do tipo Hill.

$$K_{obs} = \frac{v}{[E]} = \frac{k_{cat}[S]^h}{(K_{0,5})^h \left[1 + \left(\frac{[I]}{K_i} \right)^h \right] + [S]^h}$$

Equação 14

O coeficiente de Hill para cada concentração de ORO foi estimado por meio do ajuste linear da expressão logarítmica da Equação 14 (Equação 15).

$$\log \left[\frac{k_{obs}}{k_{cat} - k_{obs}} \right] = h \log [S] - \log \left\{ (K_{0,5})^h \left[1 + \left(\frac{[I]}{K_i} \right)^h \right] \right\}$$

Equação 15

3.2 Estudo do mecanismo de reação baseado na construção de uma biblioteca de mutantes

Uma biblioteca de mutantes da *LmDHODH* tem sido construída em nosso laboratório. Com base no mapeamento estrutural da enzima previamente realizado, algumas regiões importantes foram definidas (Figura 7). A partir disso, novos mutantes foram propostos e construídos neste trabalho, a fim de ampliar nossa biblioteca no laboratório. Atualmente nossa biblioteca é composta por oito mutantes. São cinco mutantes da interface dimérica, Q139A, Y142A, F170A, D171A e H174A (Figura 11A), dois mutantes do sítio S2, L72F e C150A (Figura 11B) e um mutante do sítio S3, K215F (Figura 11B).

Figura 11. A. Mutantes da interface dimérica Q139A, Y142A, F170A, D171A e H174A. B. Mutantes do sítio S2, L72F e C150A; e mutante do sítio S3, K215F.

Especificamente neste trabalho foram construídos três dos mutantes que atualmente compõem nossa biblioteca, são eles: L72F, Q139A e K215F. Contudo, todos os mutantes estão sendo analisados a fim de testar nossas hipóteses com relação à investigação do mecanismo catalítico da *LmDHODH* e a fim de validar as diferentes regiões da enzima para serem exploradas no planejamento de moléculas com ação inibitória.

Os estudos com estes mutantes estão em andamento em nosso laboratório, de forma que os resultados apresentados neste trabalho são parciais e motivados por algumas perguntas específicas que apareceram ao longo das discussões. De forma geral, utilizamos cinco mutantes neste estudo, L72F, Q139A, F170A, H174A e K215F, conforme detalhado na Figura 12.

Figura 12. Fluxo experimental implementado durante os estudos com os mutantes para a *LmDHODH*.

3.2.1 Construção dos mutantes propostos por mutagêneses sítio-dirigidas:

O gene que codifica a enzima *LmDHODH* foi anteriormente clonado em nosso laboratório, utilizando o vetor de expressão pET28a (*Novagen*). Esta construção foi utilizada como molde para a realização dos ensaios de mutagênese sítio-dirigida.

Utilizando a técnica de *overlap extension* [96], as mutações foram inseridas nos genes através de uma sequência de três reações em cadeia da polimerase (PCR) (Figura 13, tabela 2). Nas duas primeiras reações de PCR foram utilizados dois oligos externos (a e d) juntamente com dois oligos internos, nos quais a mutação foi inserida (b e c). A amplificação dos fragmentos (AB e CD) foram feitas utilizando 0,4 μM de cada oligonucleotídeo, 0,30 μg de DNA molde, 2 mM de MgCl_2 , 200 μM de dNTP mix (*Eppendorf*), tampão da Taq DNA Polymerase Platinum High Fidelity 1x (*Invitrogen*) e 1,25 unidade de Taq DNA Polymerase Platinum High Fidelity (*Invitrogen*) em um volume final de 50 μL . As reações foram feitas segundo as especificações indicadas no manual da enzima. As condições da PCR foram: 98°C por 2 minutos, seguidos de 25 ciclos de 98°C por 30 segundos, 52°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Após os 30 ciclos a reação permaneceu a 72°C por 10 minutos e foi mantida a 4°C. O produto de PCR foi analisado em gel de agarose 0,8%.

A terceira etapa foi dividida em duas PCRs, a primeira para extensão dos fragmentos incompletos (AB e CD) e a segunda para amplificação, através dos oligos externos, do fragmento completo (AD). As quantidades de material usado nas reações foram as mesmas citadas anteriormente. O ciclo de PCR, no entanto, se repetiu inicialmente apenas 5 vezes, para que houvesse o anelamento dos fragmentos AB com CD e a extensão dos mesmos, resultando no fragmento AD. Já na segunda reação, o fragmento AD, isto é o gene de interesse incluindo a mutação, serviu de molde para o ciclo de PCR que se repetiu 30 vezes

com 1 min e 30 seg de extensão para amplificar o gene de interesse. O produto de PCR foi analisado em gel de agarose 0.8%.

Figura 13. Representação esquemática da técnica de *overlap extension* [96].

Os oligonucleotídeos utilizados na obtenção dos mutantes estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados nas mutações sítio-dirigidas *LmDHODH-K215F*, *LmDHODH-L72F* e *LmDHODH-Q139A*. As sequências sublinhadas foram adicionadas na síntese dos oligonucleotídeos e correspondem a sítios para enzimas de restrição. As sequências em vermelho correspondem aos códons que foram mutados.

Nome	Sequência (5' – 3')
<i>LmBam</i> HI Fow (primer externo a)	GACGAC <u>G</u> GATCCATGAGCCTTCAGGT
<i>LmNot</i> I Rev (primer externo d)	GACGAC <u>G</u> CGGCCGCTTTAGCGCGTG
<i>LmDHODH</i> K215F Fow (primer interno c)	GTGATCAAGCCGTTTCAGGGCTTT
<i>LmDHODH</i> K215F Rev (primer interno b)	AAAGCCCTGAAACGGCTTGATCAC
<i>LmDHODH</i> L72F Fow (primer interno c)	AACTCGATGGGCTTTCCAAACAAC
<i>LmDHODH</i> L72F Rev (primer interno b)	GTTGTTTGGAAAGCCCATCGAGTT
<i>LmDHODH</i> Q139A Fow (primer interno c)	CAAGCCGGCGGTGGCCTACC
<i>LmDHODH</i> Q139A Rev (primer interno b)	GTAGGCCACCGCCGGCTTG

Os fragmentos obtidos nas reações de PCR foram purificados do gel utilizando o QIAquick Gel Extraction Kit (*QIAGEN*) e em seguida foram diretamente clonados no vetor pET28a.

As construções e o vetor pET28a foram digeridos com 1 U das enzimas de restrição *Not I* e *Bam HI*. As digestões foram feitas a 37°C por 2 horas, utilizando aproximadamente 1 µg dos vetores em 20 µl finais. Após a digestão os fragmentos de interesse foram purificados do gel de agarose 0,8%, utilizando o QIAquick Gel Extraction Kit (*QIAGEN*). As ligações foram feitas com aproximadamente 100 ng do pET28a, 50 ng dos insertos mutados, 400 U da DNA ligase (NEB) em tampão fornecido pelo fabricante e em um volume final de 20 µl. A reação ocorreu a 18°C por 16 horas. Células de *Escherichia coli* DH5α foram transformadas com o produto dessa ligação e foi feito PCR de colônia com o intuito de verificar dentre as colônias obtidas qual delas continha os genes de interesse. Para os experimento de PCR de colônias com os vetores pET28a foram utilizados dois oligos externos ao vetor, Bgl I e Ext I.

As colônias testadas que continham as construções pET28a com os genes para *LmDHODH* mutados foram utilizadas para preparar estoque em glicerol e armazenadas a -80°C. Os clones positivos foram purificados a partir das células transformadas, com o Kit QIAprep® Miniprep (*QIAGEN*) segundo o protocolo sugerido no manual do mesmo.

Finalmente, para confirmar os clones positivos nas colônias armazenadas, uma pequena alíquota proveniente das reações de purificação (Minipreps) foi submetida à digestão com as enzimas *Not I* e *Bam HI*. Após a digestão as amostras foram analisadas em gel de agarose 0,8%.

O DNA plasmidial de quatro clones positivos para cada uma das mutações foi enviado para o sequenciamento para confirmar a presença das mutações e a ausência de erros na sequência das proteínas. Para o sequenciamento foram utilizados dois oligos externos ao vetor, Bgl I e Ext I.

As amostras enviadas para sequenciamento foram comparados com a sequência do gene que codifica a proteína nativa, usando o programa MultAlin “Multiple sequence alignment with hierarchical clustering” [97].

As proteínas *LmDHODH*-K215F, *LmDHODH*-L72F e *LmDHODH*-Q139A, assim como todos os demais mutantes, foram expressas e purificadas nas mesmas condições previamente estabelecidas em nosso laboratório para a enzima *LmDHODH* (item 3.1.1).

3.2.2 Caracterização do espectro de absorção e determinação do coeficiente de extinção molar para os mutantes

Da mesma forma como a enzima nativa, a quantificação dos mutantes L72F, Q139A, F170A, H174A e K215F foi realizada pela determinação do coeficiente de extinção molar para cada um dos mutantes a 458 nm (item 3.1.2).

3.2.3 Avaliação da estabilidade térmica dos mutantes baseada em fluorimetria diferencial de varredura

3.2.3.1 Termofluor

Para os mutantes L72F, Q139A, F170A, H174A e K215F os estudos de estabilidade foram realizados pelo uso de fluorimetria diferencial de varredura. Nesse tipo de ensaio é possível monitorar o desenovelamento proteico baseado no aumento da temperatura. Em geral se usa um corante específico que fluoresce quando exposto a um ambiente hidrofóbico [98-100]. Assim, com um aumento de temperatura, é observado um aumento no sinal de fluorescência, devido à interação do corante com os sítios hidrofóbicos da proteína que passam a ficar expostos com o desenovelamento da mesma. A intensidade de fluorescência é plotada como função da temperatura, o que usualmente descreve uma curva sigmoidal. O ponto de inflexão da curva permite a determinação da temperatura de desenovelamento, T_m , da proteína.

Os experimentos foram realizados em um termociclador em tempo real - Mx3005P™ Real-Time PCR system (Agilent Technologies) equipado com filtros específicos para medir sinais de fluorescência, na presença do corante fluorescente SYPRO® orange (Invitrogen), que apresenta alta fluorescência em ambiente não polar, como por exemplo em sítios hidrofóbicos de proteínas desenoveladas. O experimento foi montado em uma placa de PCR contendo 96 poços. Em cada poço foi adicionado 40 µL de uma solução de enzima a 10 µM em meio contendo 50 mM HEPES pH 7,2, 150 mM NaCl, acrescido de 0,1 % SYPRO® orange 5000 vezes concentrado em DMSO (Invitrogen). A variação na intensidade de fluorescência foi monitorada utilizando os filtros FAM (492 nm) e ROX (610 nm), para excitação e emissão, respectivamente. A temperatura foi variada de 25 a 95 °C (1 °C/min) e as medidas de fluorescência realizadas.

3.2.3.2 TermoFMN

Para o mutante F170A, não foi possível a determinação da temperatura de desenovelamento, T_m , por meio da realização do Termofluor utilizando o corante fluorescente SYPRO[®] orange (Invitrogen). Assim, foi aplicada uma metodologia alternativa, desenvolvida em nosso laboratório, o TermoFMN [92]. Nesse caso, o ensaio de fluorimetria diferencial de varredura é realizado na ausência de corante e explora o grupo prostético FMN das flavoenzimas como um marcador de fluorescente. Quando complexado ao sítio ativo da enzima enovelada, o padrão de fluorescência do FMN é diferente da fluorescência observada quando o mesmo encontra-se livre. Assim, é possível monitorar o aumento do sinal de fluorescência do FMN na medida em que este vai sendo liberado do complexo com a proteína, como resultado do processo de desenovelamento protéico, dependente da temperatura. Da mesma forma que no caso anterior, a intensidade de fluorescência é plotada como função da temperatura, o que usualmente descreve uma curva sigmoidal. O ponto de inflexão da curva permite a determinação da temperatura de desenovelamento, T_m , da proteína.

Os experimentos foram realizados em um termociclador em tempo real - Mx3005PTM Real-Time PCR system (Agilent Technologies) equipado com filtros específicos para medir sinais de fluorescência do FMN. O experimento foi montado em uma placa de PCR contendo 96 poços. Em cada poço foi adicionado 40 μ L de uma solução de enzima a 10 μ M em meio contendo 50 mM HEPES pH 7,2, 150 mM NaCl. A variação na intensidade de fluorescência foi monitorada utilizando o filtro FAM SyBr green I com comprimentos de onda para excitação e emissão de 492 nm e 516 nm, respectivamente. A temperatura foi variada de 25 a 95 °C (1 °C/min) e as medidas de fluorescência realizadas.

3.2.4 Avaliação do estado de oligomerização por espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Avaliação de tamanho de partícula e índice de polidispersividade do mutante F170A foram realizadas por espalhamento dinâmico de luz (DLS). Para tanto foi utilizado o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments), gentilmente cedido pela Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez, do laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

Um volume de 40 μL da proteína, em uma concentração aproximada de 10 mg/ml em meio contendo 50 mM HEPES pH 7,2, 150 mM NaCl, foi adicionado à cubeta ZEN2112 (Hellma®), e a medida realizada após o tempo de equilíbrio de 60 segundos, com ângulo de medida de 90°.

3.2.5 Estudos estruturais

3.2.5.1 Cristalização

Os estudos de cristalização foram realizados com os mutantes L72F, Q139A, F170A, H174 e K215F fusionados a cauda de poli-histidina na região N-terminal. As concentrações finais foram calculadas utilizando o coeficiente de extinção molar experimentalmente determinado a 458 nm (item 3.2.2). De forma geral as proteínas foram testadas à concentração final de 2 mg/mL na gota. Os experimentos de cristalização foram realizados em placas *Cryschem* (Hampton Research) de 24 poços pelo método de difusão de vapor. Inicialmente foi testada a condição de cristalização anteriormente determinada para a enzima nativa [91]. No caso em que não foram obtidos cristais nas mesmas condições da enzima nativa, foram testados os kits comercialmente disponíveis: *Crystal Screen*, *Crystal Screen 2*, *PEG/ION*, *PEG/ION 2* (Hampton Research).

O método de difusão de vapor se baseia no aumento da concentração da solução de proteína até um estado de supersaturação por evaporação dos componentes voláteis da solução de cristalização. Esses componentes são gradualmente transferidos da solução do poço para a solução do reservatório por difusão de vapor, até que a pressão de vapor entre ambas entre em equilíbrio. O método foi implementado utilizando a técnica da gota sentada (Figura 14).

Figura 14. Representação esquemática de um poço da placa *Cryschem* utilizada nos experimentos de cristalização.

Como padrão experimental foram utilizados no reservatório 500 μL de solução de cristalização e no poço foram misturados 3 μL de solução de proteína e 3 μL de solução do

reservatório. O sistema foi selado com a fita adesiva *Crystal clear* (Henkel Consumer Adhesives) e armazenado à temperatura constante de 21°C.

No caso específico do mutante H174A, a estrutura da holoproteína havia sido obtida previamente em nosso laboratório (PDB ID 3TJX), contudo nosso interesse foi de obter complexo do mutante com o produto da reação ORO. Para tanto foram realizados experimentos de co-cristalização nos quais o mutante H174A foi previamente incubado com 1 mM de ORO durante 30 minutos. Em seguida foram preparadas as placas de cristalização como previamente descrito.

3.2.5.2 Coleta de dados e processamento

Os cristais obtidos foram submetidos à difração por raios X. A coleta de dados de difração de raios X foi realizada em fonte de radiação sincrotron na linha de luz W01B-MX2 no CNPEM/MCT – LNLS, Campinas – Brasil [101].

Os cristais foram transportados nas placas de cristalização para Campinas, transferidos para solução crioprotetora e resfriados diretamente em fluxo de nitrogênio gasoso, na cabeça goniométrica do difratômetro. A solução crioprotetora continha a solução de cristalização com agente precipitante em torno de 10% mais concentrado, acrescida de 20% de glicerol.

A coleta de dados foi realizada em temperatura criogênica (100K), com comprimento de onda igual a 1,45 Å. Os dados foram registrados em detectores MarCCD ou PILATUS 2M, uma vez que houve renovação do detector na linha de luz W01B-MX2 ao longo deste período. As imagens foram processadas e escalonadas utilizando os programas XDS [102] e AIMLESS [103], separando-se 5% das reflexões totais para o conjunto teste (R_{free}) a ser utilizado no teste de validação cruzada [104].

3.2.5.3 Determinação da estrutura e refinamento

Para a determinação das fases iniciais foram utilizadas as coordenadas da enzima nativa (PDB ID 3GYE – resolução 2,00 Å) por substituição molecular utilizando o programa PhaserMR [105]. Especificamente para o complexo H174A-ORO, foram utilizadas as coordenadas do mutante H174A (PDB ID 3TJX – resolução 1,64 Å).

O refinamento parcial das estruturas foi realizado utilizando o programa phenix.refine [106] seguido de ciclos de ajustes manuais do modelo feitos utilizando o programa COOT

[107, 108], em que as posições atômicas do modelo inicial foram modificadas de forma a satisfazer a estereoquímica e o mapa de densidade eletrônica.

3.2.6 Estudo da interação dos mutantes com orotato por calorimetria de titulação isotérmica

A interação dos mutantes L72F, Q139, H174A e K215F com o produto da reação ORO foi monitorada via calorimetria de titulação isotérmica.

Todos os experimentos foram realizados como previamente descrito para a enzima nativa (item 3.1.4.2). Contudo, os ensaios foram otimizados para cada mutante em termos das concentrações dos estoques de proteína e ORO utilizados. Estes detalhes serão especificados caso a caso quando os resultados forem apresentados.

3.2.7 Caracterização cinética no estado estacionário

Foram realizadas as caracterizações cinéticas no estado estacionário para os mutantes L72F, F170A, H174A. Os ensaios foram realizados como previamente descrito no item 3.1.3.1. Contudo para os mutantes, foram determinados parâmetros cinéticos aparentes à concentração saturante de cada substrato. As taxas iniciais aparentes, $v/[E]$, em diferentes concentrações DHO, com fumarato à concentração saturante, e em diferentes concentrações de fumarato, com DHO à concentração saturante, foram determinadas por meio do ajuste dos dados na equação de Hill (Equação 7) e na Equação de Michaelis-Menten (Equação 8), dependendo do caso.

3.3 Estratégias de busca por compostos com ação inibitória frente à *LmDHODH*

De forma geral, duas estratégias foram utilizadas na busca por inibidores no presente trabalho: varredura em biblioteca de fragmentos utilizando interferometria de biocamada (*BLI*) e varredura em biblioteca de fragmentos e de diversidade química utilizando ensaio enzimático. Nesse último caso o ensaio foi desenvolvido para realização de triagem molecular de alto desempenho (*HTS*) (Figura 15). Esta etapa de busca de inibidores foi realizada na Universidade de Dundee, na Divisão de Química Biológica e Desenvolvimento de Fármacos

(BCDD), College of Life Sciences, sob supervisão do Prof. William Hunter, onde a aluna realizou o estágio BEPE ao longo de um ano (de Janeiro a Dezembro de 2015).

Figura 15. Fluxo experimental implementado durante a busca por compostos com atividade inibitória frente à *LmDHODH*.

3.3.1 Varredura da biblioteca de fragmentos do “Drug Discovery Unit – DDU” utilizando Interferometria de biocamada (BLI)

3.3.1.1 Interferometria de biocamada (BLI)

Interferometria de biocamada (*biolayer interferometry* – *BLI*) é uma técnica biofísica que permite o monitoramento da complexação de ligantes a alvos macromoleculares e tem como vantagens o fato de ser livre de marcadores e permitir o monitoramento em tempo real.

Nessa técnica é possível medir padrões de interferência entre ondas de luz. Uma luz branca incide diretamente através de uma fibra ótica em um biosensor, que se assemelha a uma ponteira, ao longo de duas interfaces separadas: uma camada interna de referência e uma biocamada na superfície do sensor na qual foi previamente carregada a amostra do alvo, uma proteína por exemplo. A luz é refletida por cada uma dessas camadas e o padrão de interferência desta luz refletida é então analisado e um perfil de interferometria é obtido, em termos de intensidade em função do comprimento de onda [109].

Quando um determinado composto se liga a proteína, a espessura da biocamada, a camada mais externa, aumenta, levando a uma mudança no padrão de interferência da luz

refletida. Essa diferença em termos de comprimento de onda é plotada contra o tempo (Figura 16). Os experimentos foram realizados no equipamento OctetRED384 (*ForteBio*).

Figura 16: Esquema da detecção do sinal no BLI [109]. A. A luz refletida é recebida pelo instrumento. B. Perfil de interferometria na ausência de composto (azul) e na presença de composto que se liga a proteína (vermelho). C. Resultado final do ensaio dado em termos da variação no comprimento de onda ($\Delta\lambda$) em nm contra tempo (segundos).

3.3.1.2 BLI - detalhamento experimental

Inicialmente a enzima *LmDHODH* foi incorporada aos sensores de alta afinidade por cauda de Histidina. Esses sensores contêm ácido tris-nitriloacético (tris-NTA), inicialmente carregado com Ni^{2+} para permitir a ligação à cauda de histidina.

Sensores de Ni-NTA da *ForteBio* foram incubados em temperatura ambiente imersos no tampão do ensaio (50 mM HEPES pH 7,2, 150 mM NaCl), o mesmo no qual a proteína estava dialisada. Foram utilizadas placas escuras da *Greiner* (code 781209). TEV protease (*Tobacco Etch Virus protease*) foi utilizada como uma referência nos ensaios, uma vez que esta enzima também contém cauda de histidina. O objetivo de utilizar a TEV protease em paralelo à *LmDHODH* durante a varredura da biblioteca de compostos, refere-se a tentativa de evitar a captura de ligantes promíscuos.

Inicialmente foi necessária a otimização de alguns parâmetros do ensaio. O primeiro deles foi a quantidade de proteína utilizada. Duas concentrações (0,25 e 0,5 mg/mL) de *LmDHODH* e TEV protease a 0,1 mg/mL foram testadas. A concentração mínima da proteína que permitiu saturar o sensor ao longo da etapa de desenvolvimento do ensaio foi utilizada para realização da varredura. Para *LmDHODH* todos os experimentos de BLI foram realizados a concentração final de 0,25 mg/mL.

O protocolo geral para a realização da Interferometria de biocamada é composto por três etapas conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Protocolo para reação da varredura da biblioteca de fragmentos utilizando a Interferometria de biocamada (*BLI*).

Passo	Etapas
A. Incorporação da proteína: A proteína é preparada em tampão de reação 50 mM HEPES pH 7,2, 150 mM NaCl em placas de 96 poços.	❖ Coluna 1: 200 µL de tampão de reação ❖ Coluna 2: 200 µL de proteína ❖ Protocolo do sensor: <ol style="list-style-type: none"> 1. Linha de base (60 segundos na coluna 1) 2. Incorporação da proteína (600 segundos na coluna 2) 3. Lavagem (600 segundos na coluna 1)
B. Varredura de ligantes: É realizada em placas de 384 poços e a localização do sensor segue a ordem:	❖ Linha de base: coluna _{n+1} , linhas ímpares (60 segundos) ❖ Associação: coluna _{n+1} , linhas pares (120 segundos) ❖ Dissociação: coluna _{n+1} , linhas ímpares (120 segundos) ❖ Linha de base/ Associação/ Dissociação – passos para cada coluna da placa.
C. Remoção da proteína dos sensores	❖ Coluna 1: 200 µL de tampão de reação ❖ Coluna 2: 200 µL de 10 mM glicina pH 1.7 ❖ Coluna 3: 200 µL de 10 mM NiCl ₂ ❖ Protocolo do sensor: <ol style="list-style-type: none"> 1. Linha de base (60 segundos na coluna 1) 2. Remoção (5 segundos na column 2) 3. Neutralização (5 segundos na column 2) 4. Repetições (2-3 por 5 vezes) 5. Recarregamento (60 segundos na coluna 3) 6. Lavagem (600 segundos na coluna 1)

Um ponto muito importante durante o desenvolvimento do ensaio que permitiu a varredura da biblioteca de fragmentos utilizando *BLI* foi a obtenção de um composto para ser utilizado como controle nesta varredura. Um composto controle era necessário para monitorar a integridade dos sensores e da proteína ao longo do ensaio. Baseado nesta necessidade, ORO e succinato, os produtos da reação catalisada pela *LmDHODH* e o fumarato, o segundo substrato neste ciclo catalítico, foram inicialmente testados como possíveis controles.

Contudo, nenhum destes compostos apresentou uma resposta de complexação por meio da utilização da técnica de *BLI* quando testados à concentração máxima de 5 mM. Estes resultados eram esperados uma vez que se tratam de pequenos ligantes e o equipamento no qual o BLI foi realizado, OctetRED384, tem sensibilidade em monitorar a ligação proteína-ligante para ligantes maiores que 150 Daltons [109].

Como não possuíamos nenhum composto para ser utilizado como controle, a estratégia utilizada foi realizar uma pré-varredura das três primeiras placas (~400 compostos) pertencentes à biblioteca de fragmentos do *DDU*, a fim de identificar e validar um ligante que pudesse ser utilizado como controle quando da realização da varredura completa.

A partir desta pré-varredura, o composto 1-[3-(1H-Pirrol-1-yl)fenil]metilamina foi identificado e validado como potencial ligante frente à *LmDHODH* por meio da determinação da constante de dissociação utilizando a própria interferometria de biocamada e calorimetria de titulação isotérmica.

Esse composto foi adquirido e a partir daí validado como controle positivo. Com relação ao experimento de *BLI* para determinação da constante de dissociação, 5 diferentes concentrações do composto foram testadas (666,7; 222,2 µM; 74,1; 24,7 e 8,2 µM). Os dados para os sensores controle, os quais possuíam TEV protease imobilizada, foram subtraídos dos dados para os sensores que possuíam *LmDHODH* imobilizada. As curvas foram ajustadas utilizando o programa ForteBio Data Analysis 7.0. Os dados experimentais foram ajustados à Equação 16 para interações com estequiometria 1:1. A constante de dissociação, K_d , foi determinada.

$$K_d = \frac{[A] \times [B]}{[AB]} \quad \text{Equação 16}$$

Onde $[A]$ e $[B]$ representam as concentrações de proteína e ligantes, respectivamente e $[AB]$ é a concentração do complexo proteína-ligante formado.

A constante de dissociação foi também determinada por meio de calorimetria de titulação isotérmica, realizado como descrito no item 3.1.4.2. Foi preparada uma solução estoque de *LmDHODH* à concentração de 40 µM (com 1% v/v de DMSO) e um estoque do composto à concentração final de 1 mM, ambos em 50 mM HEPES pH 7,2, 150 mM NaCl. Uma injeção inicial de 1 µL de ligante para remover o ar residual da seringa foi efetuada, seguida por outras 10 titulações de 6 µL, 9 titulações de 7 µL e 10 titulações de 11 µL de composto em intervalos de 3 minutos a uma taxa de (0.5 µL.s⁻¹). A linha de base foi

determinada automaticamente e os picos do termograma foram integrados e ajustados segundo o modelo de um ligante por sítio.

3.3.1.3 Varredura da biblioteca de fragmentos do “Drug Discovery Unit – DDU” utilizando Interferometria de biocamada (BLI)

A biblioteca de fragmentos do DDU contendo cerca de 1200 compostos foi utilizada nesta busca. Fragmentos têm sido considerados bons pontos de partida nos programas de química medicinal.

Nove placas de 384 poços contendo os fragmentos foram preparadas pelo time de gerenciamento de compostos do DDU. A varredura foi feita utilizando 0,25 mg/mL de proteína incorporada aos sensores e compostos a concentração final de 100 μ M em 100 μ L de volume final de reação (50 mM HEPES pH 7,2; 150 mM NaCl)

A varredura foi feita conforme descrito na etapa B da Tabela 3. Deve-se ressaltar que proteína fresca foi incorporada aos sensores a cada 3 placas. O mesmo procedimento foi repetido para sensores contendo TEV protease, utilizada como controle. Em todas as placas foi utilizado, em diferentes poços, o controle positivo, 1-[3-(1H-Pirrol-1-yl)fenil]metilamina. Um composto foi considerado um *hit* quando houve resposta de ligação à *LmDHODH*, mas não houve ligação à TEV protease.

3.3.1.4 Validação dos hits por ensaio enzimático utilizando agente colorimétrico

Os compostos considerados *hits* a partir da varredura da biblioteca de fragmentos utilizando *BLI* foram testados para obtenção de informação com relação à atividade inibitória.

Contudo, foi verificado que muitos destes compostos apresentavam absorção na região dos 300 nm, comprimento de onda utilizado para o monitoramento da formação de ORO no ensaio enzimático clássico para *LmDHODH* (como descrito no item 3.1.3.1). Dessa forma, um ensaio alternativo foi utilizado, no qual a atividade enzimática foi medida indiretamente por meio do monitoramento da redução do reagente colorimétrico DCIP (2,6 - dicloroindofenol) de coloração azul. O DCIP absorve fortemente em 610 nm ($\epsilon=21500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), contudo essa absorção decai conforme este composto é reduzido a DCIPH₂, tornando-se incolor (Figura 17). A redução do reagente DCIP é estequiometricamente equivalente à

oxidação de DHO [110], possibilitando o cálculo do consumo de substrato e/ou formação de produto em função do tempo e, consequentemente, a velocidade de reação.

Figura 17. Ensaio enzimático alternativo utilizando DCIP (2,6 - dicloroindofenol). A redução do DCIP a DCIPH₂ é monitorada pelo decaimento da absorção a 610 nm.

Os fragmentos *hits* foram ensaiados à concentração final de 100 μ M. O ensaio foi realizado utilizando placas de 96 poços, à concentração final de enzima de 200 nM em 200 μ L de volume final de reação em um meio contendo 100 μ M do fragmento testado, 40 μ M DHO, 60 μ M DCIP, Triton X-100 0,01%, 50 mM HEPES pH 7,2, 150 mM NaCl.

Um controle com enzima na ausência de composto foi realizado. A redução do DCIP foi monitorada por 120 segundos a 610 nm utilizando o leitor de placas *FLUOstar OPTIMA* (BMG Labtech).

3.3.1.5 Validação dos hits por calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

Os fragmentos *hits* foram testados também por calorimetria de titulação isotérmica. Estes experimentos foram realizados sob as mesmas condições previamente descritas para a enzima nativa (item 3.1.4.2). Contudo, os ensaios foram otimizados para cada ligante em

termos das concentrações dos estoques de proteína e ligante utilizados em cada caso. Estes detalhes serão especificados caso a caso quando os resultados forem apresentados.

3.3.1.6 Estudos estruturais com os fragmentos

De forma geral, a incorporação dos ligantes nos cristais da enzima foi buscada utilizando ensaios de co-cristalização. Nesse caso, a enzima foi previamente incubada com o ligante, cerca de 30 minutos, e em seguida submetida aos ensaios de cristalização sob as condições originais obtidas para a enzima nativa de acordo com o que foi previamente estabelecido em nosso laboratório [54].

Dados de difração de raios X foram coletados *in-house* utilizando o *generator X-ray* (Rigaku M007HF com detector Saturn 944HG+ CCD). Os conjuntos de dados coletados foram indexados e integrados utilizando o programa XDS [102], e escalonados e analisados utilizando o programa AIMLESS [103], separando-se 5% das reflexões totais para o conjunto teste (R_{free}) a ser utilizado no teste de validação cruzada [104]. O conjunto de fases iniciais, e a consequente determinação das estruturas cristalográficas, foi obtido por substituição molecular utilizando o programa PhaserMR [105] utilizando as coordenadas da *LmDHODH* (PDB ID 3GYE - resolução 2,00 Å). Uma rodada de refinamento utilizando o programa phenix.refine [106] foi realizada e o mapa de densidade eletrônica foi cuidadosamente inspecionado utilizando o programa gráfico Coot [107, 108].

3.3.2 Desenvolvimento de uma plataforma para triagem de alto desempenho (HTS - High-throughput screening) tendo como alvo a enzima *LmDHODH*

Considerando que diversos compostos apresentam absorção na região dos 300 nm, comprimento de onda utilizado para o monitoramento da formação de ORO no ensaio enzimático clássico para *LmDHODH* (como descrito no item 3.1.3.1), decidimos utilizar o ensaio alternativo no qual a atividade da enzima é medida indiretamente por meio do monitoramento da redução do agente colorimétrico DCIP (conforme descrito no item 3.3.1.4).

Inicialmente foi realizada uma reunião com alguns representantes do DDU – “Drug Discovery Unit”, na Universidade de Dundee, para que fossem discutidos aspectos relacionados ao alvo *LmDHODH*. Nesta reunião foi estabelecida uma colaboração que nos

permitiu realizar todo o processo de otimização e a triagem utilizando as bibliotecas de compostos do DDU.

3.3.2.1 Estratégias para otimização do ensaio enzimático

Diferentes parâmetros foram testados para ajustar o ensaio utilizando DCIP ao que é considerado razoável para realizar uma triagem de alto desempenho (*HTS*). Um ensaio de *HTS* de qualidade deve ser capaz de identificar, com alto grau de confiança, compostos que apresentam atividade biológica.

Em um *HTS* típico, um grande número de compostos é testado e os *hits* são definidos como os compostos que exibem efeito acima de um valor limiar definido a partir do sinal resultante da inibição ou ativação no ensaio [111].

Um critério que tem sido utilizado para indicar a qualidade de um ensaio é a relação sinal/ruído (S/B). Quando o valor do sinal é menor no branco do que no controle (Ctrl), o que ocorre no caso do ensaio com DCIP, S/B robusto é definido conforme mostrado adiante (Equação 17).

$$\text{Robusto S/B} = \frac{\text{Mediana(Ctrl)}}{\text{Mediana(Branco)}} \quad \text{Equação 17}$$

Onde, Branco se refere aos poços nos quais é adicionada enzima (+ enzima), mas não existe qualquer composto, o que representaria um composto completamente inativo, ou seja, 0% de efeito inibitório. Controle (Ctrl) se refere aos poços nos quais não é adicionada enzima (- enzima), o que representaria um composto com 100% de atividade inibitória, ou seja, 100% de efeito. Nesse caso são calculadas as medianas para os valores dos sinais observados para os poços de branco e controle.

Contudo, a relação S/B não contém informação a respeito das variações dos dados, de forma que outro parâmetro é também utilizado no desenvolvimento deste tipo de ensaio. Este parâmetro é conhecido como Z' (Z prime). Da mesma forma que anteriormente, quando o valor do sinal é menor no branco do que no controle (Ctrl), Z' é definido como:

$$Z' = 1 - \frac{3(\sigma_{Ctrl} + \sigma_{Branco})}{|\mu_{Ctrl} - \mu_{Branco}|} \quad \text{Equação 18}$$

Onde, σ representa o desvio padrão considerando o sinal monitorado para cada um dos poços controle e branco e μ se refere à média dos valores dos sinais para os poços contendo controle e branco.

E também possível e útil calcular o Z' prime robusto, utilizando o desvio absoluto médio (MAD) no lugar do desvio padrão (Equação 19).

$$Z' \text{ Robusto} = 1 - \frac{3(1.4826(MAD(Ctrl))) + 3(1.4826(MAD(Branco)))}{Mediana(Ctrl) - Mediana(Branco)} \quad \text{Equação 19}$$

O Z' prime fornece informação a respeito da separação entre o sinal do controle e do branco, levando em conta os desvios padrão das medidas. Um ensaio excelente é dado quando o fator Z robusto está entre 0,5 e 1, indicando que a separação entre os sinais de controle e branco é razoável, sendo possível distinguir o efeito dos compostos que estão sendo testados [111].

Baseado nas análises destes dois parâmetros, S/B robusto e Z' prime, a otimização do ensaio foi iniciada.

Considerando a caracterização cinética previamente realizada para enzima nativa, cujos resultados serão devidamente descritos na próxima sessão, o valor de $K_{0.5}$ para DHO foi determinado como sendo de $36 \pm 4 \mu\text{M}$. Assim inicialmente, o ensaio foi planejado utilizando $40 \mu\text{M}$ de DHO e $60 \mu\text{M}$ de DCIP em um meio contendo Triton X-100 0,01%, 50 mM HEPES pH 7,2, 150 mM NaCl. As soluções foram dispensadas utilizando *multidrop dispenser* (Thermo Scientific) e *small tube dispensing cassettes* (Thermo Scientific) (Figura 18) e a absorbância foi medida utilizando o *PHERASTAR* (BMGLabtech) (Figura 19). As placas utilizadas foram placas transparentes de 384 poços (Greiner)

Figura 18. *Multidrop dispenser* (Thermo Scientific) e *small tube dispensing cassettes* (Thermo Scientific) utilizados para dispensar as soluções durante o HTS.

Figura 19. Leitor de placas para HTS PHERAstar (BMGLabtech)

A plataforma inicial do ensaio é mostrada na Figura 20. A partir desta plataforma os ensaios de otimização foram planejados.

Figura 20. Plataforma inicial para o HTS com *LmDHODH*. Os quadrados destacados em lilás representam os pontos que foram trabalhados durante a otimização.

Alguns parâmetros do ensaio foram testados durante a otimização: *i.* Concentração da enzima: seis diferentes concentrações foram testadas (170,5; 85,3; 42,6; 21,3; 10,7; 5,3 nM concentração final). A otimização da concentração de enzima foi baseada na manutenção da linearidade da reação em termos da variação de absorbância pelo tempo, durante um intervalo de tempo razoável que permitisse a preparação e leitura de um número de placas contendo compostos; *ii.* Volume final da reação: foram realizados testes variando o volume final de

reação entre 50 e 100 μ L; *iii*. Comprimento de onda monitorado: diferentes comprimentos de onda ao redor de 610 nm (590, 600 e 610 nm) foram verificados na tentativa de maximizar o sinal de absorbância resultante da redução do DCIP; *iv*. Passo de agitação: a adição de um passo de agitação utilizando um agitador de placas foi testado para facilitar a homogeneização e *v*. pH: foram testados pHs 7,2; 7,5 e 8.

3.3.2.2 Realização de um ensaio piloto

Após a etapa de otimização, foi realizado um ensaio piloto utilizando o ORO, produto da primeira reação, como composto referência. O ORO é um inibidor competitivo da *LmDHODH*, como já havia sido previamente determinado neste trabalho.

O ensaio piloto teve dois objetivos específicos. O primeiro deles foi testar diferentes concentrações de ORO, correspondentes ao IC30%, IC50% e IC70% para verificar se o ensaio desenvolvido tinha sensibilidade suficiente para identificar poços contendo estas diferentes concentrações de ORO. Outro aspecto do ensaio piloto foi permitir a determinação da tolerância ao DMSO por meio da utilização de crescentes concentrações de DMSO em poços conhecidos, uma vez que os compostos que foram testados das bibliotecas de compostos, estavam em estoque em DMSO.

O primeiro passo foi determinar o IC50 para o ORO utilizando o método do DCIP. Nesse ensaio foram utilizadas diferentes concentrações de ORO (4; 7,8; 15,6; 31,25; 62,5; 125; 250 e 500 μ M) em meio contendo 40 μ M DHO, 60 μ M DCIP, Triton X-100 0,01%, 50 mM HEPES pH 7,2 e 150 mM NaCl.

Logo após a determinação do IC50 para o ORO utilizando o método do DCIP foi possível realizar o ensaio piloto. A plataforma utilizada está mostrada na figura 21. Essa plataforma foi desenvolvida após a etapa de otimização.

Figura 21. Plataforma desenvolvida para o HTS com *LmDHODH* após otimização. A plataforma foi testada em um ensaio piloto prévio à realização do HTS.

Foi pedido para que uma das funcionárias do “Drug Discovery Unit” distribuisse randomicamente ORO a concentrações correspondentes ao IC30%, IC50% e IC70%, em três diferentes placas, entre as colunas 6 e 22. No ensaio piloto, todas as três placas utilizadas continham nas colunas 23 e 24 tampão contendo enzima na ausência de composto (branco - 0% de efeito inibitório) e meio reacional sem enzima (controle - 100% de efeito inibitório), respectivamente. A representação de uma placa utilizada no ensaio piloto é vista na Figura 22.

Para cada placa foram avaliados os valores de S/B, Z' Prime, falsos positivos e falsos negativos encontrados para o ORO.

Figura 22. Placa utilizada no ensaio piloto no processo de otimização o HTS utilizando como alvo a *LmDHODH*.

Com relação ao ensaio de tolerância de DMSO, foram testadas cinco concentrações conhecidas de DMSO (0; 0,3; 0,6; 1,2 e 2,5%) entre as colunas 1 e 5 das placas. Nas oito

primeiras linhas de cada coluna foi adicionado tampão na ausência de enzima, enquanto nas outras oito linhas de cada coluna foi adicionado tampão contendo enzima. Desta forma os valores de absorbância foram comparados e plotados em termos das diferentes concentrações de DMSO.

Após a realização do ensaio piloto e compilação dos resultados, uma nova reunião foi realizada, agora com o time de *screening* do DDU, para que o ensaio fosse avaliado previamente à realização da triagem utilizando as bibliotecas de compostos.

Baseado nas características químicas e estruturais da *LmDHODH*, os membros do time de *screening* sugeriram a utilização de duas bibliotecas de compostos: biblioteca de fragmentos e biblioteca de diversidade química.

3.3.2.3 Triagem de alto desempenho utilizando biblioteca de fragmentos e biblioteca de diversidade química, tendo como alvo a enzima LmDHODH

Foi realizada a varredura de duas bibliotecas de compostos pertencentes a “Drug Discovery Unit”. A biblioteca de fragmentos do DDU (*FragSet*) contém cerca de 1300 compostos, distribuídos em um total de quatro placas, sendo que os fragmentos foram selecionados pelos especialistas em química medicinal do DDU como estruturas ideais para pontos de partida em programas de química medicinal. Essa biblioteca foi a mesma utilizada na varredura via *BLI* (previamente descrita no item 3.3.1.3). A segunda biblioteca utilizada foi a de diversidade química (*EasySet*). Esta biblioteca consiste em uma coleção de 15368 compostos, distribuídos em um total de 46 placas, que cobrem uma ampla variedade em termos de diversidade química.

Os compostos das bibliotecas *EasySet* e de fragmentos foram testados a concentração final de 30 μ M e 1 mM, respectivamente. Em todas as placas as colunas 23 e 24 foram preenchidas com tampão contendo enzima na ausência de composto (branco - 0% de efeito inibitório) e meio reacional sem enzima (controle - 100% de efeito inibitório), respectivamente. Assim como na placa utilizada no ensaio piloto representada na Figura 22.

O procedimento utilizado nos experimentos de *HTS* está descrito na tabela 4.

Tabela 4. Protocolo geral do ensaio *HTS* para *LmDHODH*.

Passo	Descrição do passo
1	Criação das placas utilizadas no ensaio pelo time de gerenciamento de compostos do DDU (<i>EasySet</i> : 300 nL de composto em DMSO por poço até concentração final de 30 μ M. <i>FragSet</i> : 500 nL de composto em DMSO por poço até concentração final de 1 mM). DMSO é usado nos controles (colunas 23 e 24).
2	Controle de qualidade do dispensador <i>Multidrop</i> usando 0,25 mM <i>Orange G</i> preparado em água. Fazer duas adições de 50 μ L para mimetizar os passos do ensaio. Ler a 405 nm no leitor de placas <i>PheraStar</i> . Coeficiente de variação <5% é aceitável.
3	Preparo do tampão de reação (50mM HEPES pH 7,2, 150mM NaCl, 0,01% Triton-X100)
4	Preparo da solução de enzima 2X (40 nM <i>LmDHODH</i>) no tampão de reação
5	Preparo da solução de substrato 2X (80 μ M DHO + 120 μ M DCIP) no tampão de reação
6	Dispensar 50 μ L do tampão de reação na coluna 24 (controle - 100% do efeito) usando <i>Multidrop</i>
7	Dispensar 50 μ L da solução contendo enzima 2X nas colunas 1-23 usando <i>Multidrop</i>
8	Dispensar 50 μ L da solução contendo substrato 2X nas colunas 1-24 usando <i>Multidrop</i>
9	Incubar a temperatura ambiente por 20min.
10	Leitura da absorbância usando <i>PheraStar</i> a 610nm.

Os resultados gerados pelas varreduras foram analisados utilizando o programa ActivityBase XE (www.idbs.com). Este programa permite analisar cada composto testado no *HTS* e permite calcular S/B, Z' prime e a porcentagem de efeito por composto (Equação 20). Esses dados são processados utilizando o programa Vortex para a seleção dos compostos *hits*.

$$\% \text{ Efeito} = 100 - \left(\frac{\text{Dado} - \text{Mediana}(\text{Ctrl})}{\text{Mediana}(\text{Branco}) - \text{Mediana}(\text{Ctrl})} \right) \times 100$$

Equação 20

Um composto foi considerado *hit* quando a porcentagem de efeito causada por ele foi maior do que a média mais três vezes o desvio padrão do efeito causado pelos outros compostos.

3.3.2.4 Validação dos hits – Ensaio de potência

Os *hits* foram validados por meio de um ensaio de potência. Os compostos foram testados em 10 diferentes concentrações. Para os compostos obtidos a partir da varredura na

biblioteca de diversidade química, foi feita uma série de diluições 1:2 partindo da concentração mais alta de 50 μ M. Para os compostos obtidos a partir da varredura na biblioteca de fragmentos, foi feita uma série diluições 1:2 partindo da concentração mais alta de 1mM. Todos os compostos foram testados em duplicadas realizadas em placas independentes. Uma placa como a utilizada no ensaio de potência é mostrada na Figura 23.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A					Curve 1												Curve 17							
B					Curve 2												Curve 18							
C					Curve 3												Curve 19							
D					Curve 4												Curve 20							
E					Curve 5												Curve 21							
F					Curve 6												Curve 22							
G					Curve 7												Curve 23							
H					Curve 8												Curve 24							
I					Curve 9												Curve 25							
J					Curve 10												Curve 26							
K					Curve 11												Curve 27							
L					Curve 12												Curve 28							
M					Curve 13												Curve 29							
N					Curve 14												Curve 30							
O					Curve 15												Curve 31							
P					Curve 16												Curve 32							

Figura 23. Placa utilizada no ensaio de dose-resposta dos *hits* obtidos na varredura das bibliotecas *EasySet* e *FragSet* tendo como alvo a *LmDHODH*.

Os dados foram analisados utilizando o programa ActivityBase e processados utilizando o programa Vortex, como descrito no item 3.3.2.2, o que permitiu a obtenção dos valores de pIC50.

Os valores de pIC50 foram plotados para as duas réplicas de cada composto, a fim de verificar a correlação entre os dados obtidos.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.0 Resultados e Discussões

4.1 Estudo do mecanismo de reação para a enzima nativa

Os resultados apresentados nesta sessão 4.1 foram publicados recentemente pelo nosso laboratório (Reis, R.A., et al., *The mechanistic study of Leishmania major dihydroorotate dehydrogenase based on steady- and pre-steady-state kinetic analysis*. Biochem J, 2016. 473(5): p.651-60).

4.1.1 Caracterização do espectro de absorção e determinação do coeficiente de extinção molar para a LmDHODH

O espectro de varredura para a enzima *LmDHODH* permitiu a determinação do pico máximo de absorbância a 458 nm. Através do uso da equação 6 foi possível determinar o coeficiente de extinção para a *LmDHODH* associado a este comprimento de onda. O ponto de absorção máximo ao redor de 450 nm é uma característica das flavoproteínas, assim como o próprio espectro de absorção no UV/visível, pois fornece informação a respeito do ambiente no qual o FMN está complexado, de forma que isso pode ser utilizado como uma espécie de impressão digital para a proteína. Esse coeficiente de extinção determinado para a *LmDHODH* foi utilizado para a quantificação das amostras de proteína durante todos os ensaios que serão apresentados.

Figura 24. Espectro de absorção UV/Visível para *LmDHODH* (~20 μ M). O ambiente químico do FMN afeta o pico máximo de absorbância em cada flavoproteína. Para a *LmDHODH* o pico foi observado a 458 nm, de forma que o coeficiente de extinção molar para esta enzima foi determinado neste comprimento de onda ($\epsilon_{458\text{nm}} = 11722 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

4.1.2 Caracterização cinética

4.1.2.1 Ensaios enzimáticos no estado estacionário

Considerando que o ciclo catalítico da enzima *LmDHODH* envolve dois substratos, DHO e fumarato, cinética no estado estacionário na presença de ambos os substratos foi realizada para avaliar o comportamento catalítico da enzima. Quando a concentração de DHO é variada frente a dez concentrações fixas de fumarato todas as séries apresentam uma resposta sigmoidal. Os dados foram ajustados na Equação 7, a qual descreve um modelo de Hill (Figura 25A). Por outro lado, quando a concentração de fumarato foi variada, frente a oito diferentes concentrações de DHO fixas, foi observado um perfil hiperbólico e os dados se ajustam a equação de Michaelis-Menten (Equação 8) (Figura 25B).

Os parâmetros do estado estacionário foram obtidos por meio do ajuste global dos dados na Equação 9, a qual descreve um mecanismo do tipo ping-pong no qual a primeira reação segue a Equação de Hill. Nossos dados revelam um coeficiente de Hill (h) de $1,9 \pm 0,2$, o que indica cooperatividade positiva para a ligação do DHO à *LmDHODH*. Os valores de $K_{0,5}^{\text{DHO}}$ e K_m^{FUM} determinados para DHO e fumarato foram $36 \pm 4 \mu\text{M}$ e $79 \pm 8 \mu\text{M}$, respectivamente. O valor de k_{cat} durante o ciclo catalítico para a *LmDHODH* foi $12 \pm 1 \text{ s}^{-1}$ (Tabela 5). Quando os mesmos dados foram ajustados na equação clássica do modelo *ping-pong* (APÊNDICE 1), ou seja, considerando ambos os substratos seguindo um modelo Michaeliano, os parâmetros globais estimados foram inconsistentes (Tabela 5).

Figura 25. Caracterização da cinética do estado estacionário para a enzima *LmDHODH*. (A) Taxas iniciais foram obtidas a concentrações fixas de fumarato (15,63 (●), 31,25 (+), 62,5 (▲), 90 (◇), 125 (■), 250 (○), 300 (★), 375 (×), 500 (▼), 600 (□) μM) e a variadas concentrações de DHO. As linhas mostram o ajuste dos dados à equação de Hill (Equação 7). (B) As taxas iniciais de reação foram medidas a concentrações fixas de DHO (15 (●), 20 (□), 25 (▲), 30 (◇), 35 (■), 40 (○), 50 (★) and 60 (×) μM) e concentrações variadas de fumarato. As linhas mostram os dados ajustados na equação de Michaelis-Menten (Equação 8).

Tabela 5. Parâmetros do estado estacionário para as reações catalisadas pela enzima *LmDHODH*. A) Ambas as reações foram assumidas como seguindo o modelo de Michaelis-Menten (Equação no anexo 1). B) A primeira reação obedece ao modelo de Hill enquanto a segunda reação segue o modelo de Michaelis-Menten model (Equação 9).

Modelo utilizado	(A) Ping-Pong	(B) Ping-Pong Hill
$k_{cat} (s^{-1})$	110 ± 70	12 ± 1
DHO K_m or $K_{0,5} (\mu M)$	700 ± 500	36 ± 4
FUM $K_m (\mu M)$	700 ± 500	79 ± 8
H	NA	$1,9 \pm 0,2$
R^2	0,97	0,98

4.1.2.2 Ensaios enzimáticos no estado pré-estacionário por stopped-flow

A primeira etapa da reação enzimática catalisada pela enzima DHODH de *Leishmania major*, etapa redutiva, é caracterizada pela conversão de diidroorotato em orotato e concomitante redução do FMN e foi avaliada no estado pré-estacionário através do uso de técnicas de *stopped-flow* em condições aeróbica e anaeróbica.

A formação de um complexo entre a enzima oxidada e o substrato diidroorotato foi observada através do aumento da absorbância logo no início da reação (Figura 26A). Logo em seguida, a redução das bandas da flavina foi monitorada, indicando a redução do FMN pela transferência de hidreto do substrato DHO, e a consequente conversão do DHO para ORO (Figura 26A).

Análise global da evolução dos espectros ao longo do tempo foi melhor ajustada utilizando um modelo de dois passos (Figura 26B). A primeira etapa é a mais rápida, e consiste na transformação da espécie A para espécie B. Esta etapa compreende cerca de 80% em termos da mudança de amplitude do espectro a 458 nm e é relacionada com a redução do FMN (Figura 26B). Os valores de $k_{obsA \rightarrow B}$ apresentam um perfil de saturação hiperbólico frente à variação na concentração de DHO. Estes dados foram ajustados segundo um mecanismo que descreve a redução irreversível do FMN mediante formação do complexo enzima:substrato (Equação 10). Com base nestes dados, foi possível obter as constantes transientes para formação do complexo, K_d^{DHO} , e redução da flavina (k_{red}) pelo DHO (Tabela 6) com concomitante formação de ORO (Figura 26C, Tabela 5). Valores de constantes transientes semelhantes foram obtidos na presença de oxigênio e sob condições anaeróbicas

(Figura 26C) e são comparáveis aos valores previamente reportados para DHODH de classe 1A de *Lactococcus lactis* [55].

A espécie B nesta reação de redução é caracterizada tanto por um pico de absorbância em 465 nm, quanto por uma banda mais larga que se estende após os 500 nm. Essa banda mais larga pode ser explicada como relativa à formação de um complexo de transferência de carga entre o sistema anelar isoaloxazina reduzido do FMN e o produto da reação, ORO [74].

A transformação da espécie B em espécie C ocorre com a perda da banda relacionada ao complexo de transferência de carga e é correlacionada à dissociação do produto e consequente surgimento do espectro da enzima completamente reduzida (Figura 26A e 26B). As taxas de reação observadas para esta segunda etapa da redução são independentes da concentração de substrato, e apresentam valores $k_{\text{obsB} \rightarrow \text{C}}$ de 6 s^{-1} .

O fato desta constante de velocidade de reação ser da mesma ordem de k_{cat} , previamente determinado no estado estacionário, sugere que este passo é cineticamente relevante e é o passo limitante na velocidade global do ciclo catalítico. Além disso, o fato da velocidade de reação para a liberação do ORO ser independente da concentração de DHO, sugere que o DHO não é necessário para dirigir a dissociação do complexo de transferência de carga formado entre o FMN reduzido e o ORO.

Outro aspecto relevante na análise dos dados do estado pré-estacionário para a reação de redução se refere à ausência de deslocamento no espectro para comprimentos de onda maiores (*red-shift*) para o complexo transiente enzima-DHO, ao contrário do que foi previamente descrito para DHODHs de classe 1A e para DHODHs de classe 2 [55, 112, 113]. Sob o ponto de vista estrutural, as DHODHs de classe 1A, incluindo a enzima de *Leishmania major* possuem interações com DHO e ORO altamente conservadas [63, 65, 74], de tal forma que diferenças em termos do ambiente químico no sítio ativo da *LmDHODH* não poderiam justificar possíveis mudanças na estrutura eletrônica da flavina oxidada que resultariam em diferenças para a *LmDHODH* quando ocorre a complexação do DHO. Baseado em nossos experimentos e na análise cuidadosa das similaridades estruturais e cinéticas entre as DHODHs de classe 1A, podemos sugerir que o *red-shift* observado nos outros estudos é resultado da formação do complexo enzima-ORO, resultante do excesso de DHO utilizado em tais experimentos.

Figura 26. Cinética no estado pré-estacionário para a reação de redução no ciclo catalítico da *LmDHODH*. (A) Monitoramento dos espectros de absorção ao longo do tempo para a redução da *LmDHODH* ($9 \mu\text{M}$) pelo DHO ($125 \mu\text{M}$) em 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,2, a 12°C sob condições anaeróbicas. O espectro inicial para a *LmDHODH* oxidada é mostrado em linhas tracejadas. A figura mostra espectros obtidos a 0,00384; 0,0166; 0,0294; 0,055; 0,934; 0,1318; 0,1574; 0,1958 e 0,2470 s após mistura enzima-DHO. As setas indicam a direção das mudanças espectroscópicas. A figura em detalhe à direita mostra a evolução da reação em 458 nm (eixo da esquerda, linha) e 547 nm (eixo da direita, linha em negro). (B) Análise global da evolução dos espectros ao longo do tempo foi melhor ajustada utilizando um modelo de dois passos ($A \rightarrow B \rightarrow C$). O primeiro processo ($A \rightarrow B$) foi mais rápido e representou $\sim 80\%$ da amplitude da reação total. A figura em detalhe à direita mostra as dependências de concentrações simuladas para as três espécies espectrais. (C) Dependência de $k_{\text{obs}A \rightarrow B}$ com relação a concentração de DHO para a redução da *LmDHODH* sob condições aeróbicas ($\bullet$) e sob condições anaeróbicas (Δ).

Com relação ao estudo da segunda etapa da reação, a enzima foi inicialmente reduzida com DHO, em condições anaeróbicas. Foi necessário otimizar a quantidade de DHO (2:1 DHO:enzima) a ser utilizada para a redução da *LmDHODH*, a fim de promover a redução completa da enzima sem contudo, produzir excesso de ORO, produto da catálise e inibidor natural da reação. Nossos estudos mostraram que o oxigênio molecular é capaz de reoxidar o FMN (Figura 27A) e, portanto, para o estudo dessa etapa da reação catalítica os ensaios foram realizados somente em condições anaeróbicas. Contudo, deve-se destacar o fato de que na presença de fumarato, substrato natural, a reação de reoxidação é consideravelmente mais rápida, indicando que o fumarato é um agente oxidante muito mais eficiente do que o oxigênio molecular para a *LmDHODH* (Figura 27B).

Figura 27. Mudanças espectrais ao longo do tempo para a reoxidação da *LmDHODH*. (A) Reação de oxidação da *LmDHODH* ($\sim 9 \mu\text{M}$) com excesso de DHO ($18 \mu\text{M}$) sob condições aeróbicas. Espectros foram monitorados a 0,65; 13; 27; 53; 106; 158 e 250 s após mistura com tampão. (B) Reação de oxidação da *LmDHODH* ($\sim 9 \mu\text{M}$) com excesso de DHO ($18 \mu\text{M}$) sob condições aeróbicas e na presença de fumarato ($63 \mu\text{M}$). Espectros foram monitorados a 0,65; 3,93; 7,208 e 13,76 s após mistura com substrato. As medidas foram feitas em 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,2, a 12°C . O espectro da enzima oxidada e o primeiro espectro da enzima reduzida a 0,65 s estão indicados nas linhas tracejada e pontilhada, respectivamente. As figuras em detalhe à direita dos itens A e B mostram as reações ao longo do tempo para o comprimento de onda de 458 nm.

A evolução espectral para a reoxidação da *LmDHODH* pelo fumarato foi melhor ajustada em um modelo de dois passos (Figura 28A e 28B), assim como ocorreu para a etapa redutiva. O primeiro passo contribuiu para cerca de 80% em termos da mudança na absorção devido à reoxidação da flavina. Os valores de $k_{\text{obsA} \rightarrow \text{B}}$ mostram um perfil de saturação hiperbólico dependente da concentração de fumarato que se ajusta a equação que descreve um processo não reversível envolvendo a formação de um complexo seguido pela reação redox (Equação 10) (Figura 28C), permitindo a estimativas dos valores de K_d^{FUM} and k_{reox} (Tabela 6). Com relação à segunda etapa da reação de oxidação, a transformação da espécie B para C,

que contribui com menos de 20% da amplitude total para a reoxidação da flavina, é independente da concentração de fumarato e é muito lenta ($0,32 \text{ s}^{-1}$) para ser considerada relevante para a catálise. Outro aspecto bastante relevante nesta análise refere-se ao fato de que nenhuma mudança em termos de absorbância em comprimentos de onda mais longos foi observada, o que poderia corresponder a algum complexo de transferência de carga do fumarato ou intermediário de semiquinona para o FMN.

O valor de k_{reox} é cerca de 3 vezes menor do que o valor estimado para k_{red} , indicando que a reação de reoxidação poderia contribuir como um passo limitante em termos de velocidade para a reação catalisada pela *LmDHODH*.

Figura 28. Cinética no estado pré-estacionário para a reação de reoxidação da *LmDHODH*. (A) Monitoramento dos espectros de absorção ao longo do tempo para a oxidação da *LmDHODH* reduzida ($\sim 9 \mu\text{M}$) pelo fumarato ($500 \mu\text{M}$). *LmDHODH* ($\sim 18 \mu\text{M}$) foi previamente reduzida com DHO ($36 \mu\text{M}$). Setas indicam a direção das mudanças espectroscópicas. Espectro foi monitorado a 0,001; 0,009; 0,062; 0,11; 0,16; 0,21; 0,52; 1,03 e 1,96 s após mistura com substrato. A reação foi analisada em 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,2 a 12°C sob condições anaeróbicas. (B) Análise global da evolução dos espectros ao longo do tempo foi melhor ajustada utilizando um modelo de dois passos ($A \rightarrow B \rightarrow C$). O primeiro processo ($A \rightarrow B$) foi mais rápido e representou $\sim 80\%$ da amplitude da reação total. O segundo processo ($B \rightarrow C$) foi mais lento e não apresentou dependência com relação à concentração de fumarato. (C) Dependência de $k_{\text{obs}A \rightarrow B}$ com relação à concentração de fumarato para a reação de reoxidação da *LmDHODH*.

Figura 28. Continuação.

Tabela 6. Parâmetros cinéticos do estado pré-estacionário para as reações catalisadas pela enzima *LmDHODH*

Constantes transientes	Condição aeróbica	Condição anaeróbica
k_{red} (s ⁻¹)	110 ± 6	106 ± 5
k_{reox} (s ⁻¹)	NA	35 ± 2
K_d^{DHO} (μM)	180 ± 27	187 ± 30
K_d^{FUM} (μM)	NA	258 ± 53

4.1.3 Estudo da interação da enzima com os produtos da catálise

A interação da enzima *LmDHODH* com os produtos da reação, ORO e succinato, foi analisada por meio de estudos espectrais e calorimetria de titulação isotérmica baseados na titulação do ligante, e de estudos cinéticos.

4.1.3.1 Espectroscopia diferencial com os produtos da reação

A interação da *LmDHODH* com os produtos da reação, ORO e succinato, foi inicialmente estudada utilizando espectroscopia diferencial. Mudanças no espectro UV-visível devido à formação de complexo foram observadas apenas para o ORO (Figura 29). As variações de absorbância foram ajustadas segundo a Equação 11 através da qual foi possível obter o valor da constante de dissociação, K_d , para o complexo *LmDHODH*–ORO ($K_d^{ORO} = 39 \pm 2$ μM). O succinato, produto da segunda reação catalisada pela *LmDHODH*, não forma complexo espectralmente detectável com a enzima.

Figura 29. (A) Diferenças no espectro observadas após adição de 6,3; 12,6; 18,8; 31,2; 62,6; 106,3; 168,8 e 356,3 μM de ORO em 14 μM *LmDHODH*. (B) Mudanças na absorção mediante titulação de ORO em *LmDHODH* mostram um perfil hiperbólico dependente da concentração de ligante. O aumento observado na absorção a $\Delta\text{A}_{516-452\text{ nm}}$ (●) foi ajustado a uma curva de complexação teórica (Equação 11).

4.1.3.2 Calorimetria de titulação isotérmica (ITC) com os produtos da reação

A interação da *LmDHODH* com os produtos da reação, ORO e succinato, foi também estudada utilizando calorimetria de titulação isotérmica (ITC). Apenas foi possível observar formação de complexo para o ORO. Os dados foram ajustados considerando um modelo de um ligante por sítio (Figura 30). A constante de dissociação, K_d , para o complexo *LmDHODH*–ORO foi determinada como sendo $K_d^{\text{ORO}} = 8 \pm 2 \mu\text{M}$. Neste caso o valor de K_d^{ORO} é inferior ao valor determinado por espectroscopia diferencial ($K_d^{\text{ORO}} = 39 \pm 2 \mu\text{M}$). Contudo, deve-se destacar que existem diferenças significativas entre as técnicas, de forma que os valores não se apresentam tão contrastantes.

Figura 30. Isoterma para formação do complexo *LmDHODH*-ORO obtida no ITC. Perfil termodinâmico para a titulação de ORO (estoque a 950 μM) frente à *LmDHODH* (65 μM). Os dados foram ajustados considerando um modelo de um ligante por sítio.

4.1.3.3 Cinética de complexação do ORO à *LmDHODH* analisada por stopped-flow

O processo de complexação do ORO à *LmDHODH* foi investigado também por meio de métodos de cinética rápida utilizando *stopped-flow*. A evolução espectral mostra mudanças sutis em termos da posição e intensidade das bandas da flavina que foram ajustadas em um modelo de um único passo. As constantes de velocidade mostram uma dependência linear com relação à concentração de ORO (Figura 31), o que permite a obtenção dos valores da constante de formação do complexo, $k_{\text{for}} = 1,21 \pm 0,03 \text{ s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$, e dissociação, $k_{\text{rev}} = 44 \pm 3 \text{ s}^{-1}$, quando os dados são ajustados à Equação 13. O valor de K_d^{ORO} foi determinado a partir destes parâmetros, $k_{\text{rev}}/k_{\text{for}} = 36 \pm 3 \mu\text{M}$. Este valor de K_d^{ORO} está em concordância com o valor determinado por espectroscopia diferencial ($K_d^{\text{ORO}} = 39 \pm 2 \mu\text{M}$).

Figura 31. Efeito da dependência da concentração de ORO nas velocidades observadas de formação do complexo *LmDHODH*-ORO. Os valores de k_{obs} foram obtidos com base na análise global da evolução espectral para a formação do complexo. A linha sólida foi obtida por análises de regressão linear dos dados experimentais (Equação 13). As reações foram realizadas em 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,2 a 12 °C.

4.1.3.4 Ensaios de inibição da LmDHODH frente ao ORO

Medidas no estado estacionário na presença de ORO indicaram que o produto da primeira reação atua como um inibidor competitivo com relação ao DHO (Figura 32). A constante de inibição calculada para o ORO foi $K_i = 17 \pm 3 \mu\text{M}$ (ajuste na Equação 14). Por outro lado, o succinato, produto da segunda reação, foi observado não atuar como inibidor frente à LmDHODH.

Foi observada uma redução crescente nos valores do coeficiente de Hill na medida em que as concentrações de ORO aumentaram. No intervalo de ORO testado, o coeficiente de Hill variou de $1,8 \pm 0,3$ a $1,0 \pm 0,1$ (segundo ajuste na Equação 15), sugerindo que o ORO não somente afeta a complexação do DHO, como inibidor competitivo, mas também afeta a transição do sítio ativo para um estado de maior afinidade.

Figura 32. (A) Inibição da LmDHODH pelo produto da reação ORO. Dados foram obtidos a diferentes concentrações de ORO 0 ($\blacktriangle$); 7,8 ($\circ$), 15,63 ($\blacksquare$); 31,25 ($\triangle$); 62,5 ($\bullet$) and 125 ($\square$) μM na presença de fumarato (500 μM) como aceptor de elétrons. A figura em detalhe à direita mostra os diferentes valores do coeficiente de Hill para cada concentração de ORO. As reações foram realizadas em 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,2 a 20 °C.

4.1.4 Contribuições relevantes para a compreensão dos mecanismos moleculares das reações catalisadas pelas DHODHs de classe 1A baseadas nos resultados obtidos nos estudos tendo como modelo a DHODH de Leishmania major

A enzima LmDHODH catalisa a reação de oxidação do DHO à ORO por meio de um ciclo catalítico composto por duas reações, a primeira delas redutiva e a segunda de reoxidação, determinadas pelo estado de oxidação final do grupo prostético FMN.

Neste estudo foram analisadas as cinéticas no estado estacionário e no estado pré-estacionário a fim de caracterizar o ciclo catalítico da *LmDHODH*. Foi possível desta forma, obter informações a respeito do ciclo catalítico como um todo, a partir dos dados do estado estacionário, assim como das reações parciais envolvidas, a partir do estado pré-estacionário.

Considerando a complexidade do mecanismo catalítico adotado pelas DHODHs, e considerando ainda as limitações dos ensaios no estado estacionário, a caracterização cinética da enzima baseada apenas em dados no estado estacionário poderia mascarar os passos químicos importantes no contexto geral da catálise, fornecendo pouca informação em termos do mecanismo envolvido. Além disso, as análises relativas às cinéticas rápidas consistem em uma ferramenta adequada para complementar a caracterização cinética do mecanismo de inibição de ligantes identificados e pode ser útil na exploração de diferenças nas reações parciais entre as DHODHs de classe 1A e classe 2.

Pela primeira vez, análises no estado estacionário para a *LmDHODH* realizadas com amplo intervalo de variação na concentração dos substratos permitiram observar a cooperatividade positiva para a ligação de DHO com um valor de coeficiente de Hill próximo a 2.

Nós sugerimos uma possível explicação para esse comportamento cooperativo frente ao DHO. A enzima *LmDHODH* é uma homodimérica, apresentando um sítio ativo por subunidade, ambos distantes da interface dimérica [74]. Estudos prévios utilizando DHODH de *L. lactis* como modelo representativo para DHODHs de classe 1A mostraram que o estado dimérico é necessário para a atividade enzimática e também que o dímero apresenta um modelo de reatividade que envolve um monômero por vez [75, 76]. Dados cinéticos monitorando a interação com o produto da catálise, ORO, sugeriram que as DHODHs de classe 1A apresentam dois sítios de ligação com afinidades diferentes [114]. A base estrutural para justificar essa assimetria na ligação do substrato foi proposta por Palfey e colaboradores e baseia-se em um possível mecanismo para o controle da abertura e fechamento do *loop* catalítico [115].

Na verdade, foi descrito que a ligação do ORO ao sítio ativo em DHODH de classe 1A previne a dissociação do dímero [75]. Além disso, nossos resultados mostram que o grau de cooperatividade na ligação do DHO é afetado pelo ORO (Figura 32). Considerando todos estes dados, existe uma evidência de que há uma correlação entre o arranjo do sítio ativo e a interface dimérica.

Em estudos cristalográficos prévios realizados para *LmDHODH* em complexo com ligantes, foi demonstrado que o movimento do *loop* catalítico tem uma influência direta na

interface dimérica (Figura 33), resultando em alterações dinâmicas em termos de volume e distribuição de cargas da cavidade [74, 116].

Figura 33. Movimento do *loop* catalítico em direção à interface dimérica. Representação da superfície de Van der Waals para a DHODHs de subclasse 1A. *LmDHODH* em complexo com (A.) 4-Nitro-fenilisotiocianato (PDB ID 4EF9), *loop* catalítico em conformação fechada é mostrado em ciano; (B.) fenilisotiocianato (PDB ID 4EF8), *loop* catalítico na conformação aberta é mostrado em roxo; *Streptococcus mutant* DHODH (C.) *loop* catalítico na conformação aberta é mostrado em laranja (PDB ID 3OIX). A interface dimérica é mostrada em verde e o FMN é representado em amarelo.

Ainda que o mecanismo de comunicação entre os dois sítios ativos não seja conhecido, o comportamento cooperativo para a ligação do DHO (Figura 25A) e sua modulação na presença de ORO (Figura 32) fornecem dados que fortalecem a hipótese de que a complexação do ligante na primeira subunidade poderia induzir a uma mudança estrutural que modularia a reação na segunda subunidade. Na realidade, a redução do coeficiente de Hill para crescentes concentrações de ORO poderia ser explicada como o resultado de dois eventos: um aumento da diferença entre as forças de ligação nos dois sítios ativos e uma redução da energia livre de acoplamento entre os sítios. Este último evento poderia ser

controlado pelos resíduos localizados na interface dimérica. Baseados nessa hipótese, estudos de mutações sítio dirigidas em resíduos da interface dimérica foram planejadas e os resultados preliminares serão apresentados na próxima sessão.

Com relação às análises realizadas a partir dos ensaios no estado pré-estacionário, a reação de redução foi monitorada na ausência de agentes oxidantes. Mudanças espectrais ao longo da reação foram ajustadas em um processo irreversível de dois passos sem estabilização de nenhum intermediário do tipo semiquinona. Este resultado é consistente com o mecanismo concertado de catálise, no qual a conversão de DHO a ORO envolve a abstração de um próton do DHO pela cisteína catalítica e transferência de um hidreto para o sistema isoaloxazina do FMN em um passo único. Esse mesmo comportamento foi reportado previamente para DHODHs de classe 1A de *L. lactis* [55], DHODH de classe 1B de *Clostridium oroticum* [51] e DHODHs de classe 2 de fígado bovino [117]. Um mecanismo concertado também foi observado durante a reação de reoxidação [117].

Quando comparamos as reações de redução e reoxidação no ciclo catalítico da *LmDHODH*, é possível observar que o valor de k_{reox} obtido foi cerca de 3 vezes menor do que o valor k_{red} , sugerindo que a etapa de reoxidação poderia ser a limitante em termos da velocidade global da catálise (Tabela 6). Contudo, quando consideramos os dados do estado estacionário, o valor de k_{reox} é quatro vezes maior do que o valor obtido para o k_{cat} e seis vezes maior do que a dissociação do ORO da enzima completamente reduzida ($k_{\text{obsB} \rightarrow \text{C}}$). Isso nos indicava que outras reações diferentes da redução ou reoxidação do FMN eram de fato a etapa limitante da velocidade global no ciclo catalítico da *LmDHODH*.

Para investigar esta questão, estudos relacionados à interação da *LmDHODH* com os produtos da reação foram realizados a fim de detalhar todas as possíveis etapas no ciclo catalítico. Para o produto da segunda reação, succinato, não foi observada atividade inibitória frente à *LmDHODH* e não foi observada a formação de complexo com a enzima detectável pelo monitoramento do espectro da flavina, na espectroscopia diferencial, ou por calorimetria de titulação isotérmica (ITC).

Por outro lado, o produto da primeira reação, ORO, atua como forte inibidor com relação ao DHO, sendo que a constante de velocidade para a dissociação do ORO da forma oxidada da *LmDHODH*, k_{rev} , é da mesma ordem de k_{reox} . O valor de K_d^{ORO} explica limitações no estado estacionário em determinar com acurácia o valor para de k_{cat} . Assim, pequenas discrepâncias entre os valores de k_{cat} e $k_{\text{obsB} \rightarrow \text{C}}$ são esperadas uma vez que os valores determinados no estado estacionário são influenciados pela complexidade cinética que envolve a inibição pelo ORO.

Considerando todas as análises, nossos resultados indicam que a liberação do ORO na *LmDHODH* é de fato uma etapa cineticamente competente e consiste no passo limitante da velocidade no ciclo catalítico global.

Ainda que exista muita similaridade em termos da complexação do ORO nas DHODHs de classe 1A e classe 2, uma comparação dos estudos de cinética rápida sugere que estas classes divergem em termos do mecanismo da dissociação do complexo DHODH-ORO. Para as DHODHs de classe 1A, a constante de velocidade para a liberação do ORO sugere que este é o passo crucial na determinação da velocidade limitante do ciclo catalítico. Por outro lado, para as DHODHs pertencentes à classe 2, a liberação do ORO foi descrita como sendo muito lenta e não competente na catálise [113].

Uma explicação para essa diferença observada entre as classes 1A e classe 2 se refere à flexibilidade do *loop* catalítico. As DHODHs de classe 1A foram estruturalmente descritas como alternando entre conformações abertas e fechadas, sendo que esta dinâmica conformacional do *loop* catalítico é especialmente importante, uma vez que o DHO e o acceptor de elétrons, ou seja, ambos os substratos, se ligam ao mesmo sítio nesta classe [63, 74]. Esse comportamento flexível do *loop* catalítico é corroborado pelas nossas análises estruturais realizadas para a enzima *LmDHODH*, onde o mapa de densidade eletrônica para essa região é na grande maioria das vezes encontrado bastante difuso, característica de uma região altamente flexível. O mesmo comportamento não é necessário para as DHODHs de classe 2, nas quais o sítio de ligação para o segundo substrato é diferente do sítio de ligação para o DHO. Na realidade, foi mostrado que o impedimento estérico torna impossível que o *loop* catalítico nas DHODHs de classe 2 torne-se completamente aberto [63].

Diferenças nos mecanismos que controlam o acesso ao sítio ativo e a regulação da atividade catalítica podem possibilitar o planejamento de inibidores específicos para uma classe de DHODHs. Nossos resultados trazem uma importante contribuição para o entendimento dos detalhes moleculares do mecanismo catalítico para as enzimas DHODHs de classe 1A. Além disso, eles fornecem novos dados para explicar o modo cooperativo na ligação do substrato como consequência do comportamento assimétrico de funcionamento dos sítios ativos nas duas subunidades [112, 113]. Por fim, nossos resultados revelam diferenças chave no mecanismo enzimático adotado pelas enzimas DHODHs de classe 1A e classe 2, que podem ser exploradas no desenvolvimento de inibidores potentes e seletivos para a *LmDHODH*.

4.2 Estudo do mecanismo de reação baseado na construção de uma biblioteca de mutantes

Serão inicialmente apresentados os resultados gerais de caracterização dos mutantes e em seguida discutiremos alguns experimentos mais específicos que foram realizados para verificar nossas hipóteses.

4.2.1 Construção e produção heteróloga dos mutantes propostos por mutagêneses sítio-dirigidas

Todos os mutantes foram produzidos e purificados nas mesmas condições previamente estabelecidas para a enzima nativa [91]. Não houve nenhuma variação significativa em termos de rendimento. As análises dos géis de poliácridamida mostram que as construções foram expressas com sucesso na fração solúvel e ligaram-se majoritariamente à coluna de níquel (Figura 34).

Figura 34. Perfil de purificação dos mutantes de *LmDHODH* em coluna de níquel. M – Marcador de peso molecular (kDa). A. *LmDHODH*-L72F: 1) pellet 2) sobrenadante 3) efluente 4) lavagem com tampão sem imidazol 5) lavagem com tampão 25 mM de imidazol 6-8) lavagem com tampão 50 mM de imidazol 9-11) eluição com tampão 100 mM de imidazol 12-15) lavagem com tampão 500 mM de imidazol. B. *LmDHODH*-K215F: 1) pellet 2) sobrenadante 3) efluente 4) lavagem com tampão sem imidazol 5-6) lavagem com tampão 25 mM de imidazol 7-8) lavagem com tampão 50 mM de imidazol 9-16) eluição com tampão 100 mM de imidazol. C. *LmDHODH*-Q139A: 1) pellet 2) sobrenadante 3) efluente 4) lavagem com tampão 25 mM de imidazol 5-8) eluição com tampão 100 mM de imidazol. D. *LmDHODH*-H174A: 1) pellet 2) sobrenadante 3-4) efluente 5) lavagem com tampão sem imidazol 6-7) lavagem com tampão 50 mM de imidazol 8-10) eluição com tampão 100 mM de imidazol 11) lavagem com tampão 500 mM de imidazol. E. *LmDHODH*-F170A: 1) pellet 2) sobrenadante 3) lavagem com tampão sem imidazol 4) lavagem com tampão 25 mM de imidazol 5) lavagem com tampão 50 mM de imidazol 6) eluição com tampão 100 mM de imidazol 7) lavagem com tampão 500 mM de imidazol.

4.2.2 Caracterização do espectro de absorção e determinação do coeficiente de extinção molar para os mutantes

O espectro de varredura para os mutantes permitiu a determinação do pico máximo de absorbância em cada caso. Não houve nenhuma alteração em termos do comprimento de onda de absorbância máximo quando comparamos à enzima nativa, assim como não houve nenhuma alteração significativa em termos do perfil das bandas (Figura 35).

O espectro de absorção das flavoproteínas é dependente do estado redox da flavina complexada, o qual é influenciado tanto pela proteína na qual a flavina está complexada, quanto pelo estado redox do meio no qual o complexo se encontra. Os espectros de absorbância da *LmDHODH* oxidada e mutantes foram praticamente idênticos.

Figura 35. Espectro de absorção UV/Visível para *LmDHODH* e mutantes ($\sim 20 \mu\text{M}$). Em todos os casos o pico foi observado a 458 nm, de forma que o coeficiente de extinção molar para cada uma das enzimas foi determinado neste comprimento de onda (Equação 6).

O coeficiente de extinção foi determinado em todos os casos para o comprimento de onda de 458 nm (Tabela 7). Os coeficientes de extinção foram utilizados para a quantificação das amostras durante todos os ensaios apresentados.

Tabela 7. Comparação do coeficiente de extinção para a *LmDHODH* e mutantes

Enzima	$\epsilon_{458nm} M^{-1} cm^{-1}$
<i>LmDHODH</i> _{ox}	11722
L72F	10964
Q139A	11189
F170A	10517
H174	11464
K215F	11227

Nenhum dos resíduos modificados interage diretamente com o FMN, de forma que não era esperada nenhuma alteração significativa em termos do coeficiente de extinção calculado. A maior alteração encontrada foi para a proteína *LmDHODH*-F170A, onde houve uma redução significativa do coeficiente de extinção.

4.2.3 Avaliação da estabilidade térmica dos mutantes baseada em fluorimetria diferencial de varredura

Os estudos de estabilidade dos mutantes foram iniciados por fluorimetria diferencial de varredura na presença do corante fluorescente SYPRO[®] orange (*Invitrogen*), conforme descrito no item 3.2.3.1.

Os resultados obtidos mostram que as proteínas *LmDHODH*-L72F, *LmDHODH*-Q139A, *LmDHODH*-H174A e *LmDHODH*-K215F possuem temperaturas de desenovelamento (T_m) muito similares aos da enzima nativa (Tabela 8). Esses resultados sugerem que a modificação pontual desses resíduos não comprometeu a estabilidade térmica da proteína, uma evidência que as mutações não comprometeram o arranjo tridimensional da proteína.

Tabela 8. Comparação dos valores das temperaturas de desenovelamento para a enzima *LmDHODH* e mutantes estudados utilizando Termofluor.

Enzima	T_m °C
<i>LmDHODH</i> _{ox}	51,5±0,1
H174	47,9±0,4
Q139A	50,15±0,03
K215F	52,7±0,2
L72F	51,67±0,03

Contudo, para a proteína *LmDHODH*-F170A, não foi possível determinar a temperatura de desenovelamento. Para este mutante, quando a intensidade de fluorescência foi plotada como função da temperatura, não foi observado um perfil sigmoidal clássico (Figura 36).

Figura 36. Perfil de fluorescência para *LmDHODH*-F170A em função do aumento da temperatura no Termofluor.

Seguindo as investigações a respeito deste mutante, foi aplicada uma metodologia alternativa, o TermoFMN, utilizando o FMN como marcador de fluorescência, conforme descrito no item 3.2.3.2. Neste caso foi possível obter a temperatura de desenovelamento (T_m) para a *LmDHODH*-F170A, e assim comparar ao valor previamente reportado para a enzima nativa [92] (Tabela 9).

Tabela 9. Comparação dos valores das temperaturas de desenovelamento para a enzima *LmDHODH* e *LmDHODH-F170A* utilizando TermoFMN.

Enzima	<i>T_m</i> °C
<i>LmDHODH</i> _{ox}	54,9
F170A	41±1

Foi observada uma redução de ~ 14 graus em termos da temperatura de desenovelamento para este mutante, indicando uma redução da estabilidade térmica.

O fato de não ter sido possível estimar a temperatura de desenovelamento utilizando o Termofluor clássico, bem como a observação quanto à redução significativa da mesma quando monitoramos a fluorescência do FMN, nos fez inicialmente questionar sobre a manutenção do estado oligomérico para este mutante, uma vez que o resíduo de fenilalanina na posição 170 em *LmDHODH* é importante no contato entre as cadeias que compõem o dímero (Figura 11A). No entanto, devido à possibilidade de diferenças na interação entre o fluoróforo *sypro orange* e a proteína em estudo, como consequência da mutação, informações oriundas de outras técnicas são fundamentais para explicar os resultados de termofluor.

4.2.4 Avaliação do estado de oligomerização por espalhamento dinâmico de luz (DLS)

A avaliação do estado de oligomerização para o mutante *LmDHODH-F170A* foi realizada por meio de medidas de espalhamento dinâmico de luz. Estas medidas revelaram a presença de três picos (Figura 37 e Tabela 10).

Figura 37. Perfil da variação de porcentagem de intensidade de espalhamento (A) e de volume (B) em função da distribuição do diâmetro para a *LmDHODH-F170A* obtido no DLS. Proteína foi utilizada a 10 mg/mL em 50 mM HEPES pH 7,2, 150 mM NaCl.

Tabela 10. Valores obtidos para os picos da distribuição de tamanho das partículas em solução no DLS

	Diâmetro (nm)	% Intensidade	% Massa
Pico 1	11±2	68,1	100
Pico 2	127±40	30,8	0
Pico 3	4910±648	1,1	0

Apesar do aparecimento de outras duas populações, o pico majoritário (Pico 1 na Tabela 10) é monodisperso e apresenta diâmetro médio de 11±2 nm. Quando analisamos no programa Pymol o tamanho médio para a estrutura do dímero da *LmDHODH* (PDB ID 3GYE), um valor de ~ 8,22 nm foi obtido (Figura 38), bastante compatível com o diâmetro estimado pelo DLS. Assim, podemos sugerir que o pico majoritário neste caso é do dímero da *LmDHODH*-F170A. Esses resultados somados aos resultados obtidos por termofluor reforçam a hipótese de que o resíduo F170 é importante para a estabilidade da proteína, mas a mutação não alterou seu arranjo tridimensional de forma significativa.

Figura 38. Tamanho médio para o dímero da *LmDHODH* (PDB ID 3GYE). Medida realizada com o programa Pymol.

4.2.5 Estudos estruturais dos mutantes

Para os mutantes L72F, Q139A, H174A-ORO e K215, foram obtidos cristais na mesma condição da enzima nativa, ou seja, 1,1-1,3 M de sulfato de lítio, 0,3 -0,45 M de sulfato de amônio, 0,1 M citrato de sódio pH 5,6 [54] (Figura 39). Para o mutante F170A, não foram obtidos cristais nas mesmas condições da proteína *LmDHODH*, de forma que os

ensaios de cristalização foram, nesse caso, iniciados pela varredura de diferentes condições nos kits de cristalização comerciais disponíveis em nosso laboratório. Foram obtidos cristais na condição 37 do *Crystal Screen 2*, que continha 0,1 M HEPES pH 7,5, 10% PEG e 8% etilenoglicol (Figura 35). Após algumas rodadas de otimização os cristais foram submetidos à difração por raios X, porém não difrataram, apesar da aparente morfologia externa adequada.

Figura 39. Cristais das proteínas *LmDHODH-K215F* (A), *LmDHODH-L72F* (B), *LmDHODH-Q139A* (C), *LmDHODH-H174A* em complexo com ORO (D) e *LmDHODH-F170A* (E). Todos os cristais foram obtidos nas condições contendo 1,1-1,3 M de sulfato de lítio, 0,3 -0,45 M de sulfato de amônio, 0,1 M citrato de sódio pH5,6, exceto os cristais da *LmDHODH-F170A* (E) obtidos na condição contendo 0,1 M HEPES pH 7,5, 10% PEG e 8% etilenoglicol.

A coleta de dados de difração de raios X foi realizada em fonte de radiação síncrotron na linha de luz W01B-MX2 no CNPEM/MCT – LNLS, Campinas – Brasil [101]. Detalhes envolvendo a coleta de dados, estatísticas de refinamento e parâmetros do modelo estão resumidas nas Tabelas 11 e 12. Deve-se ressaltar que o refinamento dos modelos, em todos os casos, não está completo.

Tabela 11. Dados cristalográficos e estatísticos para os conjuntos coletados no LNLS, W01B-MX2 ($\lambda=1,45$ Å), a 100 K. Os valores relativos à última camada de resolução estão mostrados entre parênteses.

Dados e Parâmetros	<i>Lm</i> DHODH - L72F	<i>Lm</i> DHODH - K215F
Coleta de Dados		
Sistema Cristalino	Hexagonal	Hexagonal
Grupo especial	P6 ₁	P6 ₁
Parâmetros de rede (Å)	a=b=143,78, c=70,03	a=b=143,37, c=69,76
Intervalo de Resolução (Å)	47,06 – 1,80 (1,84 – 1,80)	46,93 – 1,93 (1,98 – 1,93)
Moléculas por unidade assimétrica	2	2
Completeza (%)	99,7 (100)	100 (100)
I / sigma (I)	14,8 (2,8)	13,3 (2,9)
^a R _{merge} (%)	6,7 (51,9)	10,6 (68)
^b R _{meas} (%)	7,5 (57,7)	11,3 (72,6)
Nº reflexões únicas	76224 (4510)	61592 (4128)
Multiplicidade	5,3 (5,2)	8,2 (8,2)
Refinamento parcial da Estrutura		
Resolução (Å)	47,06 – 1,80	46,38 – 1,93
Fator de temperatura médio (Å ²)	26,6	28,5
^c R _{factor} (%)	16,82	16,54
^d R _{free} (%)	19,99	20,55
Ângulos de ligação – rmsd (°)	1,55	1,76
Comprimento de ligação – rmsd (Å)	0,019	0,023
Ramachandram		
Região mais favorável (%)	96,3	96,1
Ramachandram outliers (%)	0	0,2

^aR_{merge} = $\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$; onde $I_i(hkl)$ é a intensidade da i-ésima medida de uma reflexão e $\langle I(hkl) \rangle$ é a intensidade média de todas as reflexões com índices hkl .

^bR_{meas} é calculado como o R_{merge} mas independente da redundância [118].

^cR_{factor} = $\sum_{hkl} ||F_{obs}| - |F_{calc}|| / \sum_{hkl} |F_{obs}|$, onde F_{obs} e F_{calc} são os fatores de estrutura observado e calculado, respectivamente.

^dR_{free} é como R_{factor} mas somado ao longo do 5 % das reflexões do conjunto teste.

Tabela 12. Dados cristalográficos e estatísticos para os conjuntos coletados no LNLS, W01B-MX2 ($\lambda=1,45$ Å), a 100 K. Os valores relativos à última camada de resolução estão mostrados entre parênteses.

Dados e Parâmetros	<i>Lm</i> DHODH - Q139A	<i>Lm</i> DHODH H174A - ORO
Coleta de Dados		
Sistema Cristalino	Hexagonal	Hexagonal
Grupo especial	P6 ₁	P6 ₁
Parâmetros de rede (Å)	a=b=143,47, c=69,74	a=b=144,28, c=144,28
Intervalo de Resolução (Å)	46,96 – 1,90 (1,94 – 1,90)	46,58 – 2,05 (2,11 – 2,05)
Moléculas por unidade assimétrica	2	2
Completeza (%)	99,9 (99,9)	99,8 (97,6)
I / sigma (I)	18,8 (3,8)	14,2 (2,9)
R _{merge} (%)	5,4 (38,0)	12,7 (37,7)
^a R _{meas} (%)	6,0 (42,2)	14,7 (49,9)
Nº reflexões únicas	64497 (4140)	52098 (3935)
Multiplicidade	5,3 (5,4)	7,6 (3,3)
Refinamento parcial da Estrutura		
Resolução (Å)	38,95 – 1,90	41,65 – 2,05
Fator de temperatura médio (Å ²)	27,4	19,5
^b R _{factor} (%)	16,53	16,01
^c R _{free} (%)	19,42	20,34
Ângulos de ligação – rmsd (°)	1,59	1,13
Comprimento de ligação – rmsd (Å)	0,021	0,007
Ramachandram		
Região mais favorável (%)	96,4	97,03
Ramachandram outliers (%)	0,50	0,2

^aR_{merge} = $\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$; onde $I_i(hkl)$ é a intensidade da i-ésima medida de uma reflexão e $\langle I(hkl) \rangle$ é a intensidade média de todas as reflexões com índices hkl .

^bR_{meas} é calculado como o R_{merge} mas independente da redundância [118].

^cR_{factor} = $\sum_{hkl} ||F_{obs}| - |F_{calc}|| / \sum_{hkl} |F_{obs}|$, onde F_{obs} e F_{calc} são os fatores de estrutura observado e calculado, respectivamente.

^dR_{free} é como R_{factor} mas somado ao longo do 5 % das reflexões do conjunto teste.

4.2.5.1 *LmDHODH-L72F*

Analizando a estrutura obtida para este mutante, observou-se um dímero, com as mesmas características gerais em termos de padrão de enovelamento quando comparamos à enzima nativa [74]. Também, foi possível confirmar a mutação do resíduo 72, baseado na análise da densidade eletrônica (Figura 40).

Figura 40. Mapa de densidade eletrônica 2mFobs-DFcalc, com σ (nível de contorno) igual a 1,2, representado em azul para *LmDHODH-L72F*. Em destaque é mostrada a densidade eletrônica para o resíduo de fenilalanina 72 nas cadeias A (à esquerda) e B (à direita) do dímero.

O aspecto mais relevante se refere ao posicionamento do *loop* catalítico. Na maioria das estruturas obtidas para *LmDHODH* em nosso laboratório não é normalmente possível determinar a posição exata do *loop* catalítico, devido a grande flexibilidade desta região. Para este mutante, foi possível modelar todo o *loop* catalítico tanto na cadeia A quanto na cadeia B. Uma vez construído o *loop* catalítico, realizamos o alinhamento da estrutura da *LmDHODH-L72F* com uma das estruturas da enzima nativa em complexo com fumarato, na qual também conseguimos modelar todo o *loop* (PDB ID 3TQ0). Foi possível observar que na estrutura da *LmDHODH-L72F* o *loop* catalítico encontra-se em uma conformação aberta, ao contrário do que é observado para a enzima nativa, na qual o mesmo encontra-se na conformação fechada (Figura 41). Quando nesta conformação aberta, o *loop* estabelece contato com a região da interface dimérica, como já havia sido previamente observado em outras estruturas para DHODHs de classe 1A (Figura 33).

Observando a localização da leucina 72 no sítio S2, substituída neste caso pelo resíduo de fenilalanina, nossa hipótese é de que a presença de um resíduo bastante volumoso, como a Phe, empurra o *loop* catalítico para a conformação aberta, por impedimento estérico.

Figura 41. Comparação entre a estrutura obtida para *LmDHODH-L72F* e enzima nativa. (A) Representação em cartoon para a *LmDHODH-L72F*. O resíduo de fenilalanina na posição 72 é mostrado em rosa e o *loop* catalítico é mostrado em roxo. (B) Alinhamento entre *LmDHODH* (PDB ID 3TQ0 – em complexo com fumarato) e *LmDHODH-L72F*. Para a *LmDHODH*, o *loop* catalítico é mostrado em azul e encontra-se na conformação fechada. Para a *LmDHODH-L72F*, o *loop* catalítico é mostrado em roxo e encontra-se na conformação aberta. Em (C) e (D) observamos a representação da superfície de Van der Waals para *LmDHODH* (PDB ID 3TQ0 – em complexo com fumarato) e *LmDHODH-L72F*, respectivamente.

4.2.5.2 *LmDHODH-K215F*

Analisando a estrutura obtida para este mutante, observa-se também um dímero, com as mesmas características gerais em termos de enovelamento quando comparamos à enzima nativa [74]. Foi possível confirmar a mutação do resíduo 215 quando analisamos a densidade eletrônica (Figura 42).

Figura 42. Mapa de densidade eletrônica 2mFobs-DFcalc, com σ (nível de contorno) igual a 1,3, representado em azul para *LmDHODH-K215F*. Em destaque é mostrada a densidade eletrônica para o resíduo de fenilalanina 215 nas cadeias A (à esquerda) e B (à direita) do dímero.

Nenhuma alteração considerável foi observada em termos estruturais. Não foi possível neste caso, construir um modelo baseado na densidade eletrônica para os *loops* catalíticos, região compreendida entre os resíduos Leu129 e Try142, devido a grande flexibilidade desta região. Para este mutante, a região entre os resíduos 132 e 138 não foi modelada na cadeia A, e na cadeia B não foi possível construir um modelo para a região entre os resíduos 131 e 138.

4.2.5.3 *LmDHODH-H174A-ORO*

Para a *LmDHODH-H174A*, a mutação do resíduo 174 foi também confirmada pela análise do mapa de densidade eletrônica (Figura 43).

Figura 43. Mapa de densidade eletrônica 2mFobs-DFcalc, com σ (nível de contorno) igual a 1,5, representado em azul para *LmDHODH-H174A*. Em destaque é mostrada a densidade eletrônica para o resíduo de alanina 174 nas cadeias A (à esquerda) e B (à direita) do dímero.

Analisando globalmente a estrutura obtida, observa-se também um dímero, com as mesmas características gerais em termos de enovelamento quando comparamos à enzima nativa. A inspeção visual do mapa de omissão permitiu a identificação do ligante ORO no sítio ativo da enzima. O ORO foi posteriormente modelado e apresentou excelente ajuste na densidade eletrônica (Figura 44). Nenhuma alteração significativa em termos do sítio de complexação do ORO foi observada quando comparamos com o descrito para a enzima nativa [74].

Figura 44. Mapa de densidade eletrônica 2mFobs-DFcalc, com σ (nível de contorno) igual a 1,5, representado em azul. Em destaque é mostrada a densidade eletrônica para o ligante ORO no sítio ativo da *LmDHODH-H174A*, nas cadeias A (a cima) e B (abaixo) do dímero.

Para este mutante, foi possível modelar o *loop* catalítico em toda sua extensão para as duas cadeias. Nesse caso, observamos o *loop* na conformação fechada, assim como encontrado para a enzima nativa na presença de fumarato (PDB ID 3TQ0). Quando analisamos a região da interface dimérica, região na qual está localizado o resíduo na posição 174, não existem grandes diferenças em relação à estrutura global da *LmDHODH*-H174A e à enzima nativa. Contudo, uma mudança local importante foi observada para o resíduo Asp171. Na estrutura da enzima nativa, o Asp171 de uma cadeia, estabelece contato com a Gln139 na base do *loop* catalítico da outra cadeia. Na estrutura do mutante, *LmDHODH*-H174A, este contato é perdido. Na ausência da His174, o resíduo de Asp171 fica voltado para a cadeia a qual ele pertence e não estabelece contato com a Gln139 da cadeia oposta (Figura 45).

Figura 45. Alinhamento das estruturas das enzimas *LmDHODH* em complexo com fumarato (PDB ID 3TQ0), representada em cinza e *LmDHODH*-H174A em complexo com orotato, representada em rosa. Estão destacados os *loops* catalíticos na conformação fechada para as estruturas. *Loop* em ciano, para a enzima nativa e *loop* em azul escuro para o mutante. As cadeias laterais dos resíduos da interface dímica são também mostradas. No mutante, o resíduo de His174 foi substituído pela Ala. É possível observar uma alteração pontual na posição do Asp171 na ausência da His174. Na estrutura da enzima nativa, o Asp 171 de uma cadeia, estabelece contato com a Gln139 na base do *loop* catalítico da outra cadeia (resíduos em cinza). Este contato é perdido para o mutante (resíduos em rosa).

4.2.5.4 *LmDHODH*-Q139A

Uma estrutura dimérica também foi encontrada para este mutante sem nenhuma alteração significativa em termos do enovelamento. Foi possível confirmar a mutação do resíduo 139 (Figura 46).

Figura 46. Mapa de densidade eletrônica 2mFobs-DFcalc, com σ (nível de contorno) igual a 1,0, representado em azul para *LmDHODH-Q139A*. Em destaque é mostrada a densidade eletrônica para o resíduo de alanina 139 nas cadeias A (à esquerda) e B (à direita) do dímero.

Não foi possível neste caso construir um modelo baseado na densidade eletrônica para os *loops* catalíticos, entre os resíduos 131 e 138 nas cadeias A e B, devido a grande flexibilidade desta região.

Quando analisamos a região da interface dimérica comparando com a enzima nativa, algumas alterações locais em termos de posição são observadas para os resíduos Asp171 e His174. Na ausência do resíduo de Gln139, substituído por um resíduo de alanina neste mutante, é possível observar que o resíduo Asp171 da cadeia oposta volta-se para a sua própria cadeia e também a His174 é ligeiramente deslocada (Figura 47).

Figura 47. Alinhamento das estruturas das enzimas *LmDHODH* em complexo com fumarato (PDB ID 3TQ0), representada em cinza e *LmDHODH*-Q139A, representada em verde. Estão destacados os *loops* catalíticos na conformação fechada para a enzima nativa. Para o mutante não foi possível modelar a região correspondente ao *loop* catalítico com base na densidade eletrônica. Com relação à região da interface dimerica, é possível observar que na ausência do resíduo Gln139, substituído por um resíduo de alanina no mutante, o resíduo Asp171 da cadeia oposta volta-se para a sua própria cadeia e também a His174 é ligeiramente deslocada.

4.2.6 Estudo da interação dos mutantes com ORO por calorimetria de titulação isotérmica

A interação dos mutantes de *LmDHODH* com o produto da reação, ORO, foi estudada utilizando calorimetria de titulação isotérmica (ITC). As concentrações de proteína e estoque de ORO utilizadas em cada experimento estão reportadas na Tabela 13. Em todos os casos foi realizada uma injeção inicial de 1 μL de ORO para remover o ar residual da seringa foi efetuada, seguida por outras 29 injeções de 8 μL em intervalos de 3 minutos (a uma taxa de 0.5 $\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$).

Tabela 13. Concentrações de proteína e estoque de ORO utilizadas em cada experimento de calorimetria de titulação isotérmica para os mutantes da *LmDHODH*

Mutante	[Proteína] μM	[ORO] μM
L72F	67	1300
Q139A	65	1200
H174A	65	700
K215F	120	2000

Figura 48. Isotherma para formação do complexo entre mutantes da *LmDHODH* e ORO obtida no ITC. A. *LmDHODH*-L72F, B. *LmDHODH*-Q139A, C. *LmDHODH*-H174A e D. *LmDHODH*-K215F. Os dados foram mais bem ajustados considerando um modelo de um ligante por sítio, em todos os casos. Os valores de K_d^{ORO} são mostrados na Figura 49.

Uma comparação entre os valores de K_d^{ORO} para cada um dos mutantes e para a enzima nativa é encontrada na figura 49. Os dados termodinâmicos extraídos dos experimentos de ITC relacionados à complexação do ORO são também mostrados na figura 49.

Figura 49. Dados termodinâmicos extraídos das isotermas dos ITCs. Os valores de ΔG , ΔH e $-T\Delta S$ correspondem à energia livre de Gibbs, entalpia e entropia, respectivamente e são dados em kcal/mol. Os valores de K_d^{ORO} para cada um dos mutantes e enzima nativa também são apresentados.

Para as proteínas *LmDHODH*-Q139A e *LmDHODH*-K215F os valores de K_d^{ORO} obtidos são muito parecidos com o encontrado para a enzima nativa. Para a *LmDHODH*-K215F as contribuições da entalpia e entropia para a energia livre são também muito parecidas com o observado na enzima nativa. Esse achado está de acordo com o fato de que nenhuma grande alteração foi observada para este mutante em termos estruturais. Para a *LmDHODH*-Q139A é possível notar uma ligeira redução de ΔH e um ligeiro aumento do termo $-T\Delta S$, resultante da redução da entropia, de forma essas duas alterações se cancelam e a variação de energia livre é praticamente a mesma quando comparada à enzima nativa.

O mesmo perfil termodinâmico encontrado para a *LmDHODH*-Q139A é intensificado quando observamos a *LmDHODH*-H174A. Neste caso, podemos notar uma grande redução da entalpia, o que é responsável pela redução do K_d^{ORO} para este mutante. Ao mesmo tempo, é possível observar um aumento do termo $-T\Delta S$, resultante da redução da entropia. Como resultado da combinação das contribuições entálpica e entrópica, o K_d^{ORO} para este mutante é 5 vezes menor do que o estimado para a enzima nativa.

Por outro lado, para a proteína *LmDHODH*-L72F, o K_d^{ORO} é cerca de 2,5 vezes maior do que o estimado para a enzima nativa. Quando analisamos o perfil termodinâmico para a complexação do ORO por este mutante, podemos observar uma considerável redução da entropia que causa um aumento no termo $-T\Delta S$. Essa redução da entropia governa o aumento do K_d^{ORO} .

4.2.7 Caracterização cinética no estado estacionário para os mutantes de *LmDHODH*

Considerando que o ciclo catalítico da enzima *LmDHODH* envolve dois substratos, DHO e fumarato, cinética no estado estacionário na presença de ambos os substratos foi realizada para avaliar o comportamento catalítico dos mutantes L72F, F170A e H174A. Para estes mutantes, foram observadas atividades inferiores ao encontrado para a enzima nativa. Em todos os três casos, foi possível apenas determinar os parâmetros cinéticos aparentes à concentração saturante de cada substrato. As taxas iniciais aparentes, $v/[E]$, em diferentes concentrações DHO, com fumarato à concentração saturante, e em diferentes concentrações de fumarato, com DHO à concentração saturante, foram determinadas por meio do ajuste dos dados utilizando a equação de Hill (Equação 7) e/ou a Equação de Michaelis-Menten (Equação 8), dependendo do caso. Deve-se ressaltar que os experimentos de avaliação do comportamento catalítico dos demais mutantes estão em andamento em nosso laboratório.

4.2.7.1 *LmDHODH-L72F*

Para este mutante, os parâmetros cinéticos aparentes foram determinados pela variação de DHO (15, 20, 30, 35, 40, 50, 60 μM) à concentração saturante de fumarato (600 μM), e pela variação de fumarato (7,8; 15,63; 31,25, 62,5, 125, 250, 375, 500 e 600 μM) à concentração saturante de DHO (50 μM) na mistura de reação contendo 50 mM HEPES pH 7,2, 150 mM NaCl. As taxas iniciais aparentes, $v/[E]$, em diferentes concentrações de DHO e fumarato foram determinadas por meio do ajuste dos dados na equação de Hill (Equação 7) e na Equação de Michaelis-Menten (Equação 8), respectivamente (Figura 50).

Figura 50. Caracterização cinética do estado estacionário para a enzima *LmDHODH-L72F*. (A) Taxas iniciais foram obtidas a concentrações fixa de fumarato (600 μM) e a variadas concentrações de DHO. A linha mostra o ajuste dos dados à equação de Hill (Equação 7). (B) Taxas iniciais de reação foram medidas a concentração fixa de DHO (50 μM) e concentrações variadas de fumarato. A linha mostra os dados ajustados na equação de Michaelis-Menten (Equação 8).

Nossos dados revelaram uma quase completa perda de atividade para este mutante. Os valores de $^{app}k_{cat}$ para DHO e fumarato foram $0,040 \pm 0,008 \text{ s}^{-1}$ e $0,0314 \pm 0,0005 \text{ s}^{-1}$, respectivamente. Contudo, foi possível observar a manutenção da cooperatividade frente à ligação de DHO, uma vez que um coeficiente de Hill (h) de $1,8 \pm 0,4$ foi estimado. Os valores de $^{app}K_{0,5}^{\text{DHO}}$ e $^{app}K_m^{\text{FUM}}$ determinados para DHO e fumarato foram $29 \pm 7 \text{ } \mu\text{M}$ e $0,7 \pm 0,4 \text{ } \mu\text{M}$, respectivamente (Tabela 14). Para o DHO não foi observada diferença com relação ao $K_{0,5}^{\text{DHO}}$ para a enzima nativa ($36 \pm 4 \text{ } \mu\text{M}$). Contudo, para o fumarato há uma imensa redução em termos de K_m^{FUM} ($79 \pm 8 \text{ } \mu\text{M}$ para a enzima nativa).

4.2.7.2 LmDHODH-H174A

Para este mutante, os parâmetros cinéticos aparentes foram determinados pela variação de DHO (12,5; 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60 μM) à concentração saturante de fumarato (600 μM), e pela variação de fumarato (3,9; 7,8; 15,63; 31,25, 62,5, 90, 125, 250, 300, 375, 500 e 600 μM) à concentração saturante de DHO (60 μM) na mistura de reação contendo 50 mM HEPES pH 7,2, 150 mM NaCl. As taxas iniciais aparentes, $v/[E]$, em diferentes concentrações de DHO e fumarato foram determinadas por meio do ajuste dos dados na equação de Michaelis-Menten (Equação 8), em ambos os casos (Figura 51).

Figura 51. Caracterização cinética do estado estacionário para a enzima *LmDHODH-H174A*. (A) Taxas iniciais foram obtidas a concentrações fixa de fumarato (600 μM) e a variadas concentrações de DHO. A linha mostra o ajuste dos dados à equação de Michaelis-Menten (Equação 8). (B) Taxas iniciais de reação foram medidas a concentração fixa de DHO (60 μM) e concentrações variadas de fumarato. A linha mostra os dados ajustados na equação de Michaelis-Menten (Equação 8).

Nossos dados revelaram também para este mutante, uma quase completa perda de atividade. Os valores de $^{app}k_{cat}$ para DHO e fumarato são $0,94 \pm 0,03 \text{ s}^{-1}$ e $0,73 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$,

respectivamente. Nossos dados sugeriram ainda a perda da cooperatividade para este mutante, uma vez que as velocidades iniciais de reação para diferentes concentrações de DHO se ajustaram melhor a equação de Michaelis-Menten. Os valores de $^{app}K_m^{DHO}$ e $^{app}K_m^{FUM}$ determinados para DHO e fumarato foram $10 \pm 1 \mu\text{M}$ e $2,4 \pm 0,3 \mu\text{M}$, respectivamente (Tabela 14). Em ambos os casos houve uma redução dos valores de $^{app}K_m$ com relação ao encontrado para a enzima nativa ($K_{0,5}^{DHO} = 36 \pm 4 \mu\text{M}$ e $K_m^{FUM} = 79 \pm 8 \mu\text{M}$). Nossos dados sugeriram a perda da cooperatividade para este mutante da interface dimérica. Contudo, a grande redução em termos de atividade dificultou bastante o ensaio. O sinal monitorado foi bastante baixo e a porção inicial da curva para diferentes concentrações de DHO não pôde ser devidamente monitorada.

Dessa forma, decidimos realizar os ensaios de atividade também para outro mutante da interface dimérica, nesse caso o mutante F170A.

4.2.7.3 *LmDHODH-F170A*

Para este mutante, os parâmetros cinéticos aparentes foram determinados pela variação de DHO (3,5; 7,5; 12,5; 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60 μM) à concentração saturante de fumarato (600 μM), e pela variação de fumarato (7,8; 15,63; 31,25, 62,5, 90, 125, 250, 300, 375, 500 e 600 μM) à concentração saturante de DHO (60 μM) na mistura de reação contendo 50 mM HEPES pH 7,2, 150 mM NaCl. As taxas iniciais aparentes, $v/[E]$, em diferentes concentrações de DHO e fumarato foram determinadas por meio do ajuste dos dados na equação de Michaelis-Menten (Equação 8), em ambos os casos (Figura 52).

Figura 52. Caracterização cinética do estado estacionário para a enzima *LmDHODH-F170A*. (A) Taxas iniciais foram obtidas a concentrações fixa de fumarato (600 μM) e a variadas concentrações de DHO. A linha mostra o ajuste dos dados à equação de Michaelis-Menten (Equação 8). (B) Taxas iniciais de reação foram medidas a concentração fixa de DHO (60 μM) e concentrações variadas de fumarato. A linha mostra os dados ajustados na equação de Michaelis-Menten (Equação 8).

Nossos dados revelaram que para este mutante há uma redução de atividade de ~2,5 vezes. Os valores de $^{app}k_{cat}$ para DHO e fumarato são $5,1 \pm 0,2 \text{ s}^{-1}$ e $4,2 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$, respectivamente ($k_{cat} = 12 \pm 1 \text{ s}^{-1}$ para a enzima nativa). Nossos dados sugeriram ainda a perda da cooperatividade para este mutante, uma vez que as velocidades iniciais de reação para diferentes concentrações de DHO se ajustaram melhor a equação de Michaelis-Menten (Figura 52). Os valores de $^{app}K_m^{\text{DHO}}$ e $^{app}K_m^{\text{FUM}}$ determinados para DHO e fumarato foram $18 \pm 1 \text{ }\mu\text{M}$ e $29 \pm 4 \text{ }\mu\text{M}$, respectivamente (Tabela 14). Ambos os valores de $^{app}K_m$ são menores do que os encontrados para a enzima nativa ($K_{0,5}^{\text{DHO}} = 36 \pm 4 \text{ }\mu\text{M}$ e $K_m^{\text{FUM}} = 79 \pm 8 \text{ }\mu\text{M}$)..

Tabela 14. Parâmetros do estado estacionário para as reações catalisadas pelos mutantes L72F, H174A e F170A construídos para a *LmDHODH*.

Mutante	Substrato	Modelo utilizado	$^{app}k_{cat} (\text{s}^{-1})$	$K_{0,5}$ or $K_m (\mu\text{M})$	h
L72F	DHO	Hill	$0,040 \pm 0,008$	29 ± 7	$1,8 \pm 0,4$
	Fumarato	Michaelis-Menten	$0,0314 \pm 0,0005$	$0,7 \pm 0,4$	NA
H174A	DHO	Michaelis-Menten	$0,94 \pm 0,03$	10 ± 1	NA
	Fumarato	Michaelis-Menten	$0,73 \pm 0,01$	$2,4 \pm 0,3$	NA
F170A	DHO	Michaelis-Menten	$5,1 \pm 0,2$	18 ± 1	NA
	Fumarato	Michaelis-Menten	$4,2 \pm 0,1$	29 ± 4	NA

4.2.8 Contribuições relevantes para a compreensão dos mecanismos moleculares das reações catalisadas pelas DHODHs de classe 1A baseadas nos resultados obtidos nos estudos tendo como modelos os mutantes L72F, Q139A, F170A, H174A e K215F da DHODH de Leishmania major

Dando continuidade à caracterização do mecanismo catalítico para a *LmDHODH*, alguns experimentos foram realizados com mutantes específicos que compõe uma biblioteca que tem sido ampliada em nosso laboratório.

Neste estudo, os mutantes utilizados como ferramentas foram: L72F, K215F, Q139A, F170A e H174A. Todos os mutantes foram inicialmente caracterizados no que se refere à determinação do coeficiente de extinção molar e espectro de absorbância. Como esperado, uma vez que nenhum dos resíduos modificados interage diretamente com o FMN, não houve mudanças significativas no coeficiente de extinção. Pequenas variações podem ser explicadas em termos das diferenças químicas e estéricas de longo alcance.

No que se refere à termoestabilidade, foram realizados experimentos de fluorometria diferencial de varredura que mostraram uma temperatura de desnovoelamento, T_m , muito próxima entre a enzima nativa e os mutantes, com exceção do F170A. Esses dados sugerem que as mutações L72F, K215F, Q139A e H174A não levaram a desestabilização do dímero ou comprometimento da estrutura tridimensional, isso foi corroborado após a obtenção da estrutura cristalográfica dimérica para todos estes mutantes. Para o mutante F170A, dada as dificuldades na obtenção das estruturas cristalográficas, estudos adicionais para verificar o estado oligomérico foram realizados por espalhamento dinâmico de luz (DLS). Quando os valores da distribuição de tamanho de partículas em solução foram analisados, o pico predominante no ensaio apresentou diâmetro médio de 11 ± 2 nm, valor parecido ao tamanho médio do dímero da *LmDHODH* ($\sim 8,22$ nm) o que sugere que o pico majoritário seja do dímero da *LmDHODH*-F170A. Nossa hipótese é a de para este mutante, ocorra um afrouxamento dos contatos na interface dimérica, de forma que, ainda que o estado dimérico seja mantido, algumas alterações em termos do ambiente químico ocorram, o que é refletido tanto na redução do coeficiente de extinção molar, quanto na redução da temperatura de desnovoelamento. Embora cristais tenham sido obtidos para o F170A, os mesmos não difrataram quando submetidos à difração por raios X. Novos experimentos de cristalização estão em andamento.

O resíduo de leucina na posição 72 está localizado na entrada do sítio catalítico e estabelece uma importante interação com o *loop* de acesso dos substratos ao sítio ativo. Nas diversas estruturas resolvidas em nosso laboratório para a *LmDHODH*, foram observados alguns movimentos da Leu72, mostrando que este resíduo poderia expor mais ou menos o sítio ativo, S1, para os sítios S3 e S4. Dessa forma foi planejada a substituição da Leu72 por um resíduo volumoso, de fenilalanina, a fim de verificar o possível bloqueio do acesso dos substratos ao sítio ativo. Na enzima humana, a Leu72 é substituída pela Phe 149. Contudo, existem importantes diferenças com relação à dinâmica conformacional dos *loops* catalíticos nestas duas classes que também puderam ser investigada a partir da construção deste mutante.

Considerando o conjunto de resultados obtidos para a *LmDHODH*-L72F, foi possível observar a redução praticamente completa da atividade catalítica para este mutante, com valores de $^{app}k_{cat}$ para DHO e fumarato de $0,040 \pm 0,008$ s⁻¹ e $0,0314 \pm 0,0005$ s⁻¹, respectivamente. Contudo, observou-se a manutenção da cooperatividade positiva para a ligação do DHO com um valor de coeficiente de Hill próximo a 2, o mesmo encontrado para a enzima nativa. Não foi encontrada nenhuma grande diferença em termos de $K_{0,5}^{DHO}$, mas houve uma redução de mais de 100 vezes no valor do K_m^{FUM} . Esses resultados sugerem que

essa leucina pode ter papel importante na estabilização do fumarato no sítio ativo. É interessante especular a respeito desse resíduo para a especificidade da classe 1A por fumarato, uma vez que com exceção do resíduo catalítico e da Ser196, esse é o único resíduo da região do sítio ativo que varia entre classe 1A e classe 2, sendo que essa última não utiliza fumarato como agente oxidante. Quando analisamos a estrutura cristalográfica do L72F, o aspecto mais relevante se refere ao posicionamento do *loop* catalítico. Para este mutante, foi possível modelar todo o *loop* catalítico tanto na cadeia A quanto na cadeia B, e este se encontra na conformação aberta (Figura 41). Nossa hipótese, é a de que a presença de um resíduo bastante volumoso, como a fenilalanina, empurra o *loop* catalítico para a conformação aberta, por impedimento estérico. Considerando o fato de que o *loop* contém o resíduo catalítico, a cisteína 131, a perda quase completa de atividade justifica-se pela ausência da orientação fechada do *loop* e consequente posicionamento da cisteína catalítica para que a reação de processe. O perfil termodinâmico extraído da isoterma de ITC para o estudo da complexação do ORO ao L72F, corrobora esta ideia. Este efeito de congelamento do *loop* catalítico na conformação aberta é observado na redução do termo entrópico (Figura 49) que contribui decisivamente para o aumento do valor final da energia livre e consequentemente do K_d^{ORO} , em cerca de 2,5 vezes, ainda que haja também uma redução da variação de entalpia provavelmente resultante da maior acessibilidade ao sítio ativo, uma vez que o *loop* catalítico encontra-se aberto.

Novamente sobre a questão da seletividade, um aspecto importante é o de que na enzima humana, *HsDHODH*, o resíduo Leu72 é substituído pela Phe149 (Figura 6) [73]. Contudo, nas DHODHs da classe 2, o *loop* catalítico é menor do que o *loop* das DHODHs de classe 1A e apresenta um comportamento dinâmico distinto, provavelmente resultante do fato de nesta classe existirem dois sítios para a complexação de substratos [63]. Assim, os mecanismos de controle do acesso aos sítios não necessitam de um ajuste tão minucioso, quanto parece ser requerido nas DHODHs de classe 1A, nas quais ambos os substratos, DHO e fumarato, se ligam ao mesmo sítio.

O resíduo de lisina na posição 215 localiza-se na região do sítio S3. A pergunta inicial com relação a este mutante se referia também à participação deste sítio no acesso do substrato ao sítio ativo da enzima. Contudo, nenhuma evidência a respeito desta participação foi ainda encontrada. Nenhuma diferença significativa foi observada em termos estruturais. Quando foi analisada a interação deste mutante com ORO, tanto o valor de K_d^{ORO} , quanto as contribuições da entalpia e entropia para a energia livre foram muito parecidas com o observado na enzima

nativa (Figura 49). Estudos de cinética enzimática serão realizados a fim de avaliar o papel desse resíduo para a atividade da proteína.

A última região investigada neste estudo compreende a interface dimérica, utilizando os mutantes Q139A, F170A e H174A. O interesse pelo papel da interface dimérica para a *LmDHODH* é antigo em nosso laboratório. Estudos prévios utilizando DHODH de *L. lactis* como modelo representativo para DHODHs de classe 1A mostraram que o estado dimérico é necessário para a atividade enzimática [75], o que despertou nosso interesse em investigar esta região. Além disso, nossos achados referentes ao comportamento cooperativo para a ligação do DHO (Figura 25A) e sua modulação na presença de ORO (Figura 32) fornecem dados que fortalecem a hipótese de que a complexação do ligante na primeira subunidade poderia induzir a uma mudança estrutural que modularia a reação na segunda subunidade, o que nos permitiu criar a hipótese de que o mecanismo de catálise para as enzimas da classe 1A envolveria essa conversa cruzada entre as cadeias do dímero e consequentemente a participação direta da interface dimérica.

Do ponto de vista estrutural, não foi observada nenhuma grande alteração quando analisamos as estruturas para os mutantes Q139A e H174A. Contudo, uma mudança local na posição do resíduo de aspartato 171 é observada em ambas as estruturais. Na estrutura da enzima nativa, o Asp171 de uma cadeia estabelece contato com a Gln139 na base do *loop* catalítico da outra cadeia. Evidentemente que na ausência da Gln139 esse contato não existe, o que é notado para o mutante Q139A. Contudo, também na estrutura do mutante, *LmDHODH*-H174A, este contato é perdido. Na ausência da His174, o resíduo de Asp171 fica voltado para a cadeia a qual ele pertence e não estabelece contato com a Gln139 da cadeia oposta (Figura 45). No que se refere à interação destes mutantes com o produto da reação ORO, existe uma mudança no perfil termodinâmico quando comparamos com os dados obtidos para a enzima nativa. Essa alteração é bastante significativa para a *LmDHODH*-H174A, na qual podemos notar uma grande redução da entalpia, o que é responsável pela redução do K_d^{ORO} para este mutante (Figura 45). Ao mesmo tempo, é possível observar um aumento do termo $-T\Delta S$, resultante da redução da entropia. Como resultado da combinação das contribuições entálpica e entrópicas, o K_d^{ORO} para este mutante é 5 vezes menor do que o estimado para a enzima nativa. Já foi demonstrado em estudos cristalográficos prévios realizados para a *LmDHODH* em complexo com ligantes, que o movimento do *loop* catalítico tem uma influência direta na interface dimérica (Figura 33), resultando em alterações dinâmicas em termos de volume e distribuição de cargas da cavidade [74, 116]. Baseado nestas análises do perfil termodinâmico para a complexação do ORO, especialmente

observando os resultados para o mutante H174A, é possível sugerir que a interface dimérica também tem uma influência sobre a dinâmica conformacional do *loop* catalítico. Quando a interface dimérica é severamente alterada, como no caso da troca do resíduo de histidina na posição 174 pelo resíduo de alanina, o contato entre o resíduo de aspartato 171 de uma cadeia e a glutamina 139, localizada exatamente na base do *loop*, da cadeia oposta é perdido (Figura 45), conforme indicam os dados estruturais mencionados anteriormente para este mutante. Assim, é possível que o *loop* catalítico seja estabilizado na conformação fechada, como observado na estrutura obtida para o H174A, o que é suportado tanto pela redução dos valores de ΔH , uma vez que as interações no sítio ativo são estabilizadas, quanto pela diminuição da entropia, resultante da redução da mobilidade dos movimentos do *loop*.

Para o mutante H174A é também observada uma redução de atividade de ~12 vezes. A análise da cinética no estado estacionário para o mutante H174A sugere também a perda da cooperatividade para a ligação do DHO. Contudo, a pouca atividade deste mutante dificultou o monitoramento da atividade catalítica, e um bom ajuste dos dados aos modelos cinéticos. Assim, foi também realizada a caracterização cinética para o mutante F170A. Para a *LmDHODH*-F170A, observamos a redução da atividade em ~2,5 vezes. Os valores de $^{app}k_{cat}$ para DHO e fumarato são $5,1 \pm 0,2 \text{ s}^{-1}$ e $4,2 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$, respectivamente ($k_{cat} = 12 \pm 1 \text{ s}^{-1}$ para a enzima nativa). Para este mutante é possível observar a perda da cooperatividade, uma vez que as velocidades iniciais de reação para as diferentes concentrações de DHO se ajustaram melhor ao modelo de Michaelis-Menten (Figura 52). Os valores de $^{app}K_m^{DHO}$ e $^{app}K_m^{FUM}$ determinados para DHO e fumarato foram $18 \pm 1 \text{ }\mu\text{M}$ e $29 \pm 4 \text{ }\mu\text{M}$, respectivamente, valores inferiores aos encontrados para a enzima nativa, que podem ser explicados também pela estabilização do *loop* catalítico na conformação fechada.

A perda da cooperatividade frente à ligação de DHO para o mutante F170A corrobora a hipótese inicial de que a interface dimérica é imprescindível nessa comunicação cruzada que ocorre entre os dois *loops* catalíticos dos monômeros para *LmDHODH*. Quando analisamos em detalhes os contatos na região da interface dimérica na enzima nativa (Figura 53) podemos observar uma hipótese de caminho para transmissão desta informação que passa pelo contato estabelecido entre a Gln139 na base do *loop* catalítico de uma cadeia e o Asp171 da cadeia oposta. A partir daí, contatos intra-cadeia são estabelecidos entre Asp171, His174, Trp 142 e novamente a Gln139 na base do *loop* catalítico. As bases moleculares da cooperatividade observada para ligação do DHO em *LmDHODH* envolvem este caminho de comunicação que se estabelece entre os dois *loops* catalíticos, via interface dimérica.

Figura 53. Interface dimérica para a estrutura *LmDHODH* (PDB ID 3TQ0). Cadeias A e B são representadas em branco e cinza, respectivamente. Está destacado o *loop* catalítico, em ciano, neste caso na conformação fechada para a estrutura. As cadeias laterais dos resíduos da interface dímica são também mostradas. Observa-se um contato importante entre D171 de uma cadeia e Q139 da cadeia oposta, e sucessivos contatos intracadeia.

Considerando o que foi encontrado para os mutantes, é razoável considerar a hipótese de que o bloqueio da passagem da informação entre os monômeros por meio de alterações nas propriedades químicas e dinâmicas da interface dimérica, seja uma estratégia inovadora no planejamento de inibidores seletivos. Outra abordagem nesse sentido seria o controle do movimento do *loop* catalítico. O mecanismo catalítico para as DHODHs de classe 1A envolve a dinâmica conformacional do *loop* catalítico e a comunicação entre os monômeros via interface dimérica. Portanto, estratégias que mirem estes dois aspectos tendem a ser promissoras no que se refere à busca de moléculas com ação inibitória e seletivas para DHODHs de classe 1A.

Os detalhes moleculares elucidados neste trabalho para a DHODH de *Leishmania major*, corroboram a importância da questão da flexibilidade nos estudos envolvendo alvos protéicos e ligantes. Diferentes estados conformacionais são acessíveis à estrutura tridimensional para *LmDHODH* e são imprescindíveis para a catálise, de forma que devem ser considerados no planejamento de inibidores seletivos para esta classe.

4.3 Busca de compostos com ação inibitória frente à *LmDHODH*

A necessidade no desenvolvimento de estratégias terapêuticas diferentes para as Leishmanioses motivou a busca por novos compostos com ação inibitória frente à *LmDHODH*. Neste trabalho, foram utilizadas duas abordagens distintas na busca por inibidores: *i*. Varredura de uma biblioteca de fragmentos utilizando a técnica conhecida como interferometria de biocamada (BLI); e *ii*. Varredura de biblioteca de fragmentos e biblioteca baseada em diversidade química monitorando a atividade enzimática, realizadas nos moldes de triagem molecular de alto desempenho (HTS).

Esta etapa de busca de inibidores foi realizada na Universidade de Dundee, na Divisão de Química Biológica e Desenvolvimento de Fármacos (BCDD), College of Life Sciences, sob supervisão do Prof. William Hunter, onde a aluna realizou o estágio BEPE ao longo de um ano (de Janeiro a Dezembro de 2015). A utilização das instalações da *Drug Discovery Unit* – DDU, hospedada na Universidade de Dundee possibilitou a realização destas varreduras, assim como permitiu a aluna conviver em um ambiente bastante fértil em termos de experiências no processo de desenvolvimento de novos fármacos. Esforços em colaboração ao longo dos 10 últimos anos permitiram ao DDU tornar-se o primeiro colocado na lista das instituições dedicadas à descoberta de novas drogas no Reino Unido [119].

4.3.1 Varredura da biblioteca de fragmentos do *Drug Discovery Unit* (DDU) utilizando Interferometria de biocamada (BLI)

4.3.1.1 Ligação da proteína *LmDHODH* aos sensores de níquel utilizados no BLI

A etapa inicial para a realização da interferometria de biocamada refere-se à imobilização da proteína alvo do estudo em sensores, neste caso sensores contendo ácido tris-nitriloacético (tris-NTA) inicialmente carregados com Ni^{2+} . A concentração mínima da proteína que permitiu saturar o sensor ao longo da etapa de desenvolvimento do ensaio foi de 0,25 mg/mL para *LmDHODH* e 0,1 mg/mL para a TEV protease, sendo esta última a proteína utilizada como controle no ensaio. A imobilização da *LmDHODH* e TEV protease nos sensores é apresentada no sensograma na Figura 54.

Figura 54. Imobilização das proteínas *LmDHODH* (A) a 0,25 mg/mL e TEV protease (B) a 0,1 mg/mL em sensores contendo ácido tris-nitriloacético (tris-NTA) inicialmente carregados com Ni^{2+} , passo inicial no ensaio de interferometria de biocamada (BLI).

4.3.1.2 Validação de um composto controle para ser utilizado na varredura da biblioteca de fragmentos utilizando o BLI

Devido à necessidade da obtenção de um composto controle para ser utilizado na varredura da biblioteca de fragmentos utilizando o BLI, uma pré-varredura de cerca de 400 compostos foi realizada previamente. O composto 1-[3-(1H-Pirrol-1-yl)fenil]metilamina foi identificado como o melhor ligante entre os testados e foi então validado por meio da determinação da constante de dissociação utilizando a própria interferometria de biocamada e calorimetria de titulação isotérmica.

Com relação aos resultados obtidos para o BLI realizado na presença de cinco diferentes concentrações deste composto (Figura 55), o K_d calculado foi de $58,0 \pm 0,2 \mu\text{M}$ (dados ajustados à Equação 16).

Figura 55. Sinal de complexação do composto 1-[3-(1H-Pirrol-1-yl)fenil]metilamina à *LmDHODH* foi monitorado no BLI. É possível observar alterações em termos de comprimento de onda no padrão da luz refletida pelo sensor ao longo do tempo para as diferentes concentrações utilizadas de composto (666,7; 222,2 μM; 74,1; 24,7 e 8,2 μM). Os primeiros 120 s correspondem à etapa de associação, seguidos pelos outros 120 s que correspondem à dissociação. À direita podemos observar os ajustes no estado estacionário baseados nas respostas para concentração do composto.

A constante de dissociação foi também determinada por meio de calorimetria de titulação isotérmica. Os dados foram mais bem ajustados considerando um modelo de um ligante por sítio (Figura 56). A constante de dissociação, K_d , para o complexo *LmDHODH*–1-[3-(1H-Pirrol-1-yl)fenil]metilamina foi determinada como sendo $K_d = 12 \pm 2$ μM.

Figura 56. Isoterma para formação do complexo *LmDHODH*–1-[3-(1H-Pirrol-1-yl)fenil]metilamina obtida no ITC. Perfil termodinâmico para a titulação do ligante (estoque a 1 mM) frente *LmDHODH* (65 μM). Os dados foram mais bem ajustados considerando um modelo de um ligante por sítio.

A diferença entre os valores estimados para a constante de dissociação pelo BLI e pelo ITC foi aceitável, considerando que as técnicas são distintas. Deve-se, contudo ressaltar que o

K_d estimado pelo ITC é provavelmente mais acurado, considerando a sensibilidade das técnicas e da proteína em solução.

De acordo com os resultados obtidos tanto para BLI quanto para o ITC, o composto 1-[3-(1H-Pirrol-1-yl)fenil]metilamina foi validado como ligante e portanto foi utilizado como controle positivo na varredura da biblioteca de fragmentos.

4.3.1.3 Varredura da biblioteca de fragmentos do Drug Discovery Unit (DDU) utilizando Interferometria de biocamada (BLI)

A biblioteca de fragmentos do DDU contendo cerca de 1200 compostos foi utilizada nesta varredura por interferometria de biocamada. Os compostos foram testados a concentração final de 100 μ M e em todas as placas foi adicionado o composto controle em alguns poços, a fim de monitorar a integridade dos sensores e da proteína ao longo do ensaio.

Uma vez que a varredura foi realizada, os *hits* foram selecionados. Um composto foi considerado um *hit* quando houve resposta de ligação à *LmDHODH*, mas não houve ligação à TEV protease.

Ao total, 49 fragmentos foram identificados como *hits*. Com base na análise cuidadosa dos sensogramas e nas características químicas dos fragmentos identificados, foram escolhidos quatro compostos para serem adquiridos e testados em ensaios posteriores. Os fragmentos adquiridos, juntamente com seus sensogramas, são mostrados na Tabela 15.

Tabela 15. Compostos *hits* obtidos a partir da varredura da biblioteca de fragmentos do DDU via BLI que foram comprados para testes posteriores. Duas curvas são representadas para cada composto, uma em vermelho mostrando o perfil para ligação à *LmDHODH* e outra mostrando o perfil para ligação à TEV protease.

Fragmento	Código DDU	Nome	Sensograma
DDD000606 77	2-(5-methyl-2-phenyloxazol-4-yl)ethanol

4.3.1.4 Validação dos hits por ensaio enzimático utilizando agente colorimétrico

Quando os *hits* comprados foram testados com relação ao potencial inibitório frente à *LmDHODH* utilizando ensaio colorimétrico com DCIP, como descrito no item 3.3.1.4, não foi observada inibição para nenhum dos fragmentos.

Nesse ponto, decidimos testar os fragmentos utilizando calorimetria de titulação isotérmica a fim de verificar se os fragmentos adquiridos se tratavam de ligantes da *LmDHODH*.

4.3.1.5 Validação dos hits por calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

Os experimentos de ITC foram realizados conforme descrito no item 3.1.4.2. As isotermas para os diferentes compostos testados são mostrados na figura 57.

Figura 57. Isotherma para os diferentes fragmentos testados frente à *LmDHODH* no ITC.

Não foi observada a formação de complexo entre *LmDHODH* e os ligantes [3-(pyrid-2-yloxy)phenyl]methanol e 4-[(4-Chlorophenyl)acetyl]-2-piperazinone. Por outro lado, para o ligante 2-(5-methyl-2-phenyloxazol-4-yl)ethanol o K_d estimado foi de $51 \pm 30 \mu M$, enquanto que para o 2H-Pyrido[3,2-b]-1,4-oxazin-3(4H)-one, o K_d estimado foi de $126 \pm 50 \mu M$.

4.3.1.6 Estudos estruturais com os fragmentos

Os fragmentos adquiridos foram testados em ensaios de cristalização com a enzima *LmDHODH*, como descrito no item 3.3.1.6. De forma geral, a incorporação dos ligantes nos cristais da enzima foi buscada utilizando ensaios de co-cristalização.

Apenas foram obtidos cristais com o composto 1-[3-(1H-Pirrol-1-yl)fenil]metilamina, utilizado como controle positivo na varredura da biblioteca de fragmentos utilizando interferometria de biocamada (BLI). Cristais foram obtidos nas mesmas condições da enzima nativa.

A estrutura foi resolvida, conforme descrito no item 3.3.1.6, e uma rodada de refinamento foi realizada. Detalhes envolvendo a coleta de dados, estatísticas de refinamento e parâmetros do modelo estão resumidas na Tabela 8.

Contudo, após inspeção criteriosa no mapa de densidade eletrônica, não foi possível identificar a presença dos ligantes na estrutura da enzima.

Baseado na varredura da biblioteca de fragmentos, utilizando o BLI, foram identificados três ligantes para a enzima *LmDHODH*, um deles com $K_d = 12 \pm 2 \mu\text{M}$ (1-[3-(1H-Pirrol-1-yl)fenil]metilamina), o que é considerado muito promissor para um fragmento. Contudo não foi possível a determinação da estrutura dos complexos entre os ligantes e a enzima, o que seria muito interessante no sentido de nos permitir identificar os sítios de complexação e promover modificações nas moléculas dos ligantes a fim de que outras interações fossem exploradas.

Tabela 16. Dados cristalográficos e estatísticos para o conjunto de dado coletado *in-house* Generator X-ray (Rigaku M007HF com detector Saturn 944HG+ CCD) ($\lambda=1,54 \text{ \AA}$), a 100 K, School of Life Sciences, University of Dundee, UK. Os valores relativos à última camada de resolução estão mostrados entre parênteses, quando apropriado.

Dados e Parâmetros	<i>Lm</i> DHODH - 1-[3-(1H-Pirrol-1-yl)fenil]metilamina
Coleta de Dados	
Sistema Cristalino	Hexagonal
Grupo especial	P6 ₁
Parâmetros de rede (Å)	a=b=143,90, c=69,90
Intervalo de Resolução (Å)	47,10 – 2,05
Moléculas por unidade assimétrica	2
Completeza (%)	99,4 (92,9)
I / sigma (I)	16,9 (2,2)
R _{merge} (%)	13,2 (76,9)
^a R _{meas} (%)	13,9 (86,3)
Nº reflexões únicas	51586 (3713)
Multiplicidade	10,0 (4,8)
Refinamento parcial da Estrutura	
Resolução (Å)	47,10 – 2,05
Fator de temperatura médio (Å ²)	22,8
^b R _{facto} (%)	22,99
^c R _{free} (%)	26,13
Ângulos de ligação – rmsd (°)	1,13
Comprimento de ligação – rmsd (Å)	0,008
Ramachandram	
Região mais favorável (%)	96,97
Ramachandram outliers (%)	0

^aR_{merge} = $\frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$; onde $I_i(hkl)$ é a intensidade da i-ésima medida de uma reflexão e $\langle I(hkl) \rangle$ é a intensidade média de todas as reflexões com índices hkl .

^bR_{meas} é calculado como o R_{merge} mas independente da redundância [118].

^cR_{factor} = $\frac{\sum_{hkl} ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{\sum_{hkl} |F_{obs}|}$, onde F_{obs} e F_{calc} são os fatores de estrutura observado e calculado, respectivamente.

^dR_{free} é como R_{factor} mas somado ao longo do 5 % das reflexões do conjunto teste.

4.3.2 Desenvolvimento de uma plataforma para triagem de alto desempenho (HTS - High-throughput screening) tendo como alvo a enzima *LmDHODH*

4.3.2.1 Estratégias para otimização do ensaio enzimático

Para viabilizar uma plataforma para HTS tendo como alvo a enzima *LmDHODH*, diversos parâmetros foram otimizados no ensaio inicial. Diversos parâmetros foram testados para ajustar o ensaio em termos do S/B e Z' prime necessários, conforme descrito no item 3.3.2.1.

O primeiro parâmetro ajustado foi à concentração de enzima. Foi realizado um teste com 6 diferentes concentrações de enzima, a fim de verificar o sinal obtido em cada caso e a duração do estágio linear da reação em termos da redução do DCIP ao longo do tempo (Figura 58).

Figura 58. Absorção em 610 nm em função do tempo para a enzima *LmDHODH* em diferentes concentrações. Otimização da concentração da enzima *LmDHODH* a ser utilizada no HTS.

A concentração de 20 nM foi escolhida para ser utilizada durante a triagem das bibliotecas de compostos. Na figura 58, o dado correspondente à concentração de 21,3 nM de *LmDHODH* é linear por cerca de 20 minutos, um tempo razoável para realização do HTS.

Um aspecto importante refere-se ao S/B para o ensaio. Para esta concentração de enzima, 21,3 nM, o S/B foi estimado como sendo ~1,4 após 20 minutos. Considerando que este valor de S/B era bastante baixo, decidimos nos concentrar na tentativa de aumentar o S/B durante a otimização.

Um segundo parâmetro testado foi o volume final de reação utilizado por poço na placa. Foram testados dois volumes finais, 50 μL e 100 μL , baseados em duas adições de 25:25 ou 50:50 μL dos tampões contendo enzima e substrato (Figura 59).

Figura 59. Curva de absorção em função do tempo durante os ensaios de otimização do ensaio enzimático de *LmDHODH* para HTS. Dois volumes finais por poço foram testados, 50 μL e 100 μL , baseados em duas adições de 25:25 ou 50:50 μL dos tampões contendo enzima e substrato.

O aumento do volume final de reação não resultou em um aumento do valor da relação S/B. Contudo, houve uma redução do desvio padrão dos valores, o que foi muito importante em termos do cálculo do valor final do Z' prime. Além disso, a linearidade durante os primeiros 20 minutos da reação foi mais clara quando a reação foi realizada em 100 μL de volume final. Desta forma, duas adições de 50 μL dos tampões, contendo enzima e substrato, foram a escolha utilizada durante o HTS.

Com relação aos demais testes realizados no processo de otimização, para os diferentes comprimentos de onda de 590, 600 e 610 nm não houve nenhuma mudança relevante em termos do sinal monitorado. Com relação à adição de um passo extra de homogeneização após as adições dos tampões contendo enzima e substrato, também não houve nenhuma alteração significativa. E sobre os diferentes pHs testados, 7,2; 7,5 e 8, para valores de pH superiores a 7,2, a reação catalisada pela *LmDHODH* foi mais rápida, de forma que o estágio linear foi reduzido. Assim foi escolhido o pH 7,2 para ser utilizado durante HTS.

4.3.2.2 Realização de um ensaio piloto

Após a etapa de otimização do ensaio, foi realizado um ensaio piloto utilizando o ORO, inibidor competitivo com relação ao DHO, como composto controle a fim de verificar

como o ensaio se comportaria, em termos de S/B e Z' prime por placa, quando realizado nas mesmas condições do HTS.

Inicialmente foi determinado o $IC_{50} = 90 \pm 20 \mu M$ para o ORO frente à *LmDHODH*, utilizando o método do DCIP (Figura 60). A partir disso, o ORO foi utilizado como referência no ensaio piloto, como descrito no item 3.3.2.1, no qual a plataforma desenvolvida para o HTS com *LmDHODH* (Figura 21) foi testada. Deve-se ressaltar que embora o ORO tenha sido utilizado como composto referência neste caso, não foi possível utilizá-lo como controle no HTS, uma vez que apenas foi possível solubilizá-lo em água e não em DMSO. Considerando o fato de que todos os compostos testados estavam preparados em soluções estoques em DMSO, optamos por utilizar como controle o tampão sem enzima (- enzima) adicionando a mesma quantidade final de DMSO à enzima.

Figura 60. IC_{50} estimado para ORO utilizando o método do DCIP. Foram utilizadas diferentes concentrações de ORO (4; 7,8; 15,6; 31,25; 62,5; 125; 250 e 500 μM) em meio contendo 40 μM DHO, 60 μM DCIP, Triton X-100 0,01%, 50 mM HEPES pH 7,2 e 150 mM NaCl.

Foram utilizadas três placas, como no modelo apresentado na Figura 22. Para cada uma destas placas foram calculados os valores de S/B e Z' *prime*, baseados nos valores dos sinais monitorados para o branco (+ enzima) e controle (-enzima), e foram identificados os eventuais falsos positivos ou negativos para o composto referência, ORO, isto é, os poços nos quais o método não conseguiu detectar a presença ou ausência de ORO corretamente. Os resultados para cada placa encontram-se sumarizados na Tabela 17.

Tabela 17. Resultados obtidos para cada uma das placas utilizadas no ensaio piloto desenvolvido para HTS utilizando a enzima *LmDHODH*. O inibidor competitivo, ORO, foi utilizado como composto referência neste caso. Os valores de absorbância na presença e ausência de enzima, branco e controle, respectivamente, permitiram calcular os valores de S/B (Equação 17) e Z' prime (Equação 18). Os falsos positivos e negativos referem-se à habilidade do ensaio em identificar os poços nos quais ORO foi previamente adicionado.

	Placa 1	Placa 2	Placa 3
+ enzima (U.A)	0,612	0,596	0,598
- enzima (U.A)	0,849	0,842	0,839
S/B	1,4	1,4	1,4
Z' prime	0,71	0,68	0,71
Falsos +	0	0	0
Falsos -	1	0	0

Conforme observado na Tabela 17, ainda que os valores de S/B para as três placas fossem bastante baixos, o Z' prime foi satisfatório nos três casos. Isso se deve ao fato de que os desvios padrão das medidas relativas aos sinais na presença e ausência de enzima foram muito pequenos em todos os casos. Além disso, o ensaio foi sensível na detecção de todos os poços nos quais ORO foi previamente adicionado, ~ 15 poços por placa, nas diferentes concentrações, correspondentes ao IC30%, IC50% e IC70%, demonstrando que o ensaio era sensível o suficiente. Apenas um dos poços com ORO, na placa 1, não foi identificado neste ensaio.

Durante o ensaio piloto foi também avaliada a tolerância da atividade enzimática ao DMSO. Uma tolerância de pelo menos 2,5% de DMSO foi demonstrada (Figura 61). A concentração final máxima de DMSO durante a realização do HTS foi de 0,5%.

Figura 61. Tolerância da atividade enzimática da *LmDHODH* frente a diferentes concentrações de DMSO (0; 0,3; 0,6; 1,2 e 2,5%).

Após as análises dos resultados obtidos no ensaio piloto e discussão com grupo de *screening* do DDU, o ensaio foi aprovado e as bibliotecas de fragmento e diversidade química foram testadas frente à *LmDHODH*.

4.3.2.3 Triagem de alto desempenho utilizando biblioteca de fragmentos e biblioteca de diversidade química, tendo como alvo a enzima *LmDHODH*

Baseado na plataforma desenvolvida ao longo do período de otimização do ensaio e nos bons resultados obtidos no ensaio piloto, prosseguimos para a realização da triagem de alto desempenho utilizando duas bibliotecas de compostos do DDU: biblioteca de fragmentos (*FragSet*) composta por 1300 fragmentos e biblioteca de diversidade química (*EasySet*) composta por 15368 compostos.

Inicialmente serão apresentados os resultados referentes à biblioteca *EasySet*. Foram feitas as análises com relação ao Z' *prime* robusto por placa (Equação 19), a fim de verificar se todas as placas seriam validadas (Figura 62). Valores de Z' *prime* entre 0,6 e 0,8 foram obtidos, de forma que todas as placas foram validadas.

Figura 62. Valores de Z' *prime* robusto para as 46 placas utilizadas para os compostos da biblioteca DDU *EasySet* testados frente à *LmDHODH*.

Foram identificados 78 compostos com porcentagem de efeito maior ou igual a 21,6%, sendo que 21,6% representou o limite estatisticamente significativo (maior que 3 vezes o desvio padrão da média do sinal na ausência de inibição) para a identificação de um composto como hit. Contudo, decidimos aumentar o limite para valores de inibição maiores ou iguais a 30%, a fim de encontrar compostos que fossem mais promissores. Assim, foram identificados como *hits*, 51 compostos, que significa neste caso, 0,33% da biblioteca. Os dados estão

sumarizados na Figura 63. Uma distribuição bastante aguda foi obtida quando analisamos os compostos em termos da porcentagem do efeito.

Figura 63. A. Resultado da varredura na biblioteca DDU *EasySet* representado em termos da distribuição dos compostos ao longo da porcentagem do efeito. B. Resultado da varredura na biblioteca DDU *EasySet* representado como uma porcentagem do efeito inibitório frente a cada composto. *Hits* estão coloridos em vermelho.

Estes compostos foram testados em ensaio de potência, conforme descrito no item 3.3.2.3. Como o ensaio de potência foi realizado em duplicata, um plote de correlação entre os valores de pIC₅₀ para cada réplica é mostrado na Figura 64.

Figura 64. Gráfico de dispersão das réplicas dos valores de pIC₅₀ determinados no ensaio de potência, para os *hits* obtidos a partir da varredura na biblioteca DDU *EasySet*.

É possível observar uma boa correlação entre os valores para as duas réplicas.

Dos 51 compostos testados, 33 compostos apresentaram valores de IC₅₀ inferiores a 50 µM, que, portanto, puderam ser estimados. Na tabela 18 são apresentados as curvas e os valores de pIC₅₀ estimados para a primeira réplica de cada composto.

Tabela 18. Hits obtidos por meio da varredura da biblioteca DDU *EasySet* com IC₅₀ inferiores à 50 μ M estimados no ensaio de potência

Composto ID	Perfil dose-resposta	pIC ₅₀	IC ₅₀ (μ M)	Coefficiente de Hill
DDD00076835	Percent Effect	6,59	0,26	2,23
DDD00077683	Percent Effect	5,97	1,07	1,44
DDD00084984	Percent Effect	5,89	1,29	2,05
DDD00084986	Percent Effect	5,66	2,19	2,28
DDD00058801	Percent Effect	5,61	2,45	4,14
DDD00085244	Percent Effect	5,47	3,39	17,12

DDD00082744	<p>Percent Effect</p> <p>Conc</p>	5,36	4,37	1,44
DDD00083454	<p>Percent Effect</p> <p>Conc</p>	5,25	5,62	1,61
DDD00076667	<p>Percent Effect</p> <p>Conc</p>	5,14	7,24	2,01
DDD00082722	<p>Percent Effect</p> <p>Conc</p>	5,1	7,94	1,38
DDD00078256	<p>Percent Effect</p> <p>Conc</p>	5,08	8,32	2,11
DDD00084959	<p>Percent Effect</p> <p>Conc</p>	5,07	8,51	2,02

DDD00083419	Percent Effect	5,04	9,12	1,57

DDD00082723	Percent Effect	5,01	9,77	1,16

DDD00081585	Percent Effect	4,95	11,22	1,45

DDD00079625	Percent Effect	4,89	12,88	7,04

DDD00075357	Percent Effect	4,86	13,80	1,18

DDD00078330	Percent Effect	4,84	14,45	6,95

DDD00081195	Percent Effect	4,8	15,85	1,62
DDD00074913	Percent Effect	4,76	17,38	1,54
DDD00083229	Percent Effect	4,74	18,20	1,75
DDD00080487	Percent Effect	4,7	19,95	1,09
DDD00083941	Percent Effect	4,65	22,39	1,57
DDD00085534	Percent Effect	4,59	25,70	1,42

DDD00078580	Percent Effect	4,58	26,30	1,55
DDD00080142	Percent Effect	4,53	29,51	2,75
DDD00080684	Percent Effect	4,46	34,67	1,01
DDD00084264	Percent Effect	4,45	35,48	1,55
DDD00078796	Percent Effect	4,41	38,90	0,99
DDD00082730	Percent Effect	4,4	39,81	1

DDD00047478	Percent Effect	4,37	42,66	1,79

DDD00057682	Percent Effect	4,37	42,66	1,26

DDD00074867	Percent Effect	4,37	42,66	1,18

Diversos compostos bastante promissores em termos de potencial de inibição foram obtidos com base na varredura desta biblioteca. O melhor composto apresentou IC₅₀ ~ 260 nM e outros 12 compostos apresentaram valores de IC₅₀ entre 1 e 10 µM. Um aspecto bastante importante refere-se ao fato de que para vários compostos obtidos como *hits* e validados no ensaio de potência, um coeficiente de Hill ao redor de 2 foi obtido. Isso ocorreu, por exemplo, para o composto mais potente. Considerando o mecanismo catalítico da *LmDHODH*, e os resultados relativos à cooperatividade frente a ligação do DHO, um coeficiente de Hill próximo a 2 é bastante razoável.

No que se refere à varredura utilizando a biblioteca DDU *FragSet*, também foram feitas as análises com relação ao *Z' prime* robusto por placa (Equação 19), a fim de verificar se todas as placas seriam validadas (Figura 65). Valores de *Z' prime* entre 0,55 e 0,7 foram obtidos, de forma que todas placas foram validadas.

Figura 65. Valores de Z' *prime* robusto para as quatro placas utilizadas para os compostos da biblioteca DDU *FragSet* testados frente à *LmDHODH*.

Foram identificados 15 compostos com porcentagem de efeito maior ou igual a 56,3%, sendo que este valor representou o limite estatisticamente significativo (maior que 3 vezes o desvio padrão da média do sinal na ausência de inibição) para a identificação de um composto como hit. Contudo, decidimos reduzir o limite para valores de inibição maiores ou iguais a 30%, mesmo limite utilizado na análise da biblioteca DDU *EasySet*. Assim, foram identificados como *hits*, 32 fragmentos, o que significa neste caso, 2,5% da biblioteca. Os dados estão sumarizados na Figura 66. Uma distribuição mais espalhada foi obtida quando analisamos os compostos em termos da porcentagem do efeito, se comparado a mesma análise para a biblioteca DDU *EasySet*.

Figura 66. A. Resultado da varredura na biblioteca DDU *FragSet* representado em termos da distribuição dos compostos ao longo da porcentagem do efeito. B. Resultado da varredura na biblioteca DDU *FragSet* representado como uma porcentagem do efeito inibitório frente a cada composto.

Estes compostos foram testados em ensaio de potência, conforme descrito no item 3.3.2.3. Como o ensaio de potência foi realizado em duplicata, um plot de correlação entre os valores de pIC₅₀ para cada réplica é mostrado na Figura 67.

Figura 67. Gráfico de dispersão das réplicas dos valores de pIC₅₀ determinados no ensaio de potência, para os *hits* obtidos a partir da varredura na biblioteca DDU *FragSet*.

Neste caso, é possível observar uma boa correlação entre os valores para as duas réplicas, exceto por um composto para o qual se observa grande diferença entre os valores de pIC₅₀ observados na duplicata.

Dos 32 compostos testados, 11 compostos apresentaram valores de IC₅₀ inferiores a 1 mM, que, portanto, puderam ser estimados. Na tabela 11 são apresentados os valores das curvas e os valores de pIC₅₀ estimados para a primeira réplica de cada composto.

Tabela 19. *Hits* obtidos por meio da varredura da biblioteca DDU *FragSet* com IC₅₀ inferiores a 1 mM estimados no ensaio de potência

Composto ID	Perfil dose-resposta	pIC ₅₀	IC ₅₀ (µM)	Coefficiente de Hill
DDD00059615:03	Percent Effect	4,26	55,0	1,68

DDD00100332:02	<p>Percent Effect</p> <p>Conc</p>	4,14	72,4	1,54
DDD00100299:02	<p>Percent Effect</p> <p>Conc</p>	3,93	117,5	1,9
DDD00805742:01	<p>Percent Effect</p> <p>Conc</p>	3,75	177,8	2,72
DDD00771428:01	<p>Percent Effect</p> <p>Conc</p>	3,67	213,8	1,98
DDD00805741:01	<p>Percent Effect</p> <p>Conc</p>	3,37	426,6	1,55
DDD00100615:02	<p>Percent Effect</p> <p>Conc</p>	3,31	489,8	2,51

DDD00100415:02	Percent Effect	3,29	512,9	1,61

DDD00100355:03	Percent Effect	3,28	524,8	16,87

DDD00002041:04	Percent Effect	3,14	724,4	2,17

DDD00805924:01	Percent Effect	3,12	758,6	1,06

Alguns fragmentos promissores foram identificados nesta varredura. Cerca de 7 fragmentos com valores de IC₅₀ entre 50 e 500 μ M foram encontrados. Deve-se destacar que estes fragmentos são diferentes do que foi encontrado para a varredura da mesma biblioteca utilizando interferometria de biocamada (BLI). O BLI é uma técnica que se destina à busca e identificação de ligantes.

Os compostos mais promissores obtidos a partir do HTS nas bibliotecas *EasySet* e *FragSet* estão sendo adquiridos pelo nosso laboratório, para que experimentos de determinação do mecanismo de inibição e ensaios de co-cristalização sejam realizados.

CONCLUSÕES

5.0 Conclusões

No quarto passo da via de biossíntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina, atua a enzima diidroorotato desidrogenase (DHODH), responsável pela conversão da molécula L-diidroorotato (DHO) em orotato em um ciclo catalítico dependente do grupo prostético flavina mononucleotídeo (FMN). Especificamente para as DHODHs, durante a catálise, a enzima utiliza a flavina mononucleotídeo como cofator, para, na primeira etapa da reação, promover a oxidação do substrato L-diidroorotato (DHO) enquanto FMN é reduzido. Na segunda etapa da reação, FMN é reoxidado através do auxílio de um segundo substrato, o agente oxidante, cuja natureza varia entre as enzimas de diferentes origens biológicas.

Considerando a relevância da rota bioquímica da qual participam as DHODHs e considerando as diferenças em termos estruturais e de mecanismo existentes entre a enzima humana e a enzima de tripanosomatídeos, nosso estudo centrou-se na obtenção do detalhamento em nível molecular envolvido na catálise enzimática promovida pela DHODH de *Leishmania major* e na busca por compostos com atividade inibitória frente a esta enzima.

No que se refere à elucidação do mecanismo catalítico, importantes contribuições resultaram do nosso estudo. Por meio da combinação dos resultados referentes ao estado pré-estacionário e estacionário, observamos que para a *LmDHODH* a liberação do ORO é o passo crucial na determinação da velocidade limitante do ciclo catalítico, o que não ocorre para as DHODHs pertencentes à classe 2, para as quais a liberação do ORO foi descrita como sendo muito lenta e não competente na catálise [113].

Pela primeira vez, análises no estado estacionário para a *LmDHODH* realizadas com amplo intervalo de variação na concentração dos substratos permitiram observar a cooperatividade positiva para a ligação de DHO com um valor de coeficiente de Hill próximo a 2 e sua modulação na presença de ORO. Também, foi demonstrado que essa cooperatividade está relacionada à comunicação cruzada entre as cadeias do dímero, sendo mediada pela interface dimérica. Nossos resultados fornecem novos dados para explicar o modo cooperativo na ligação do substrato como consequência do comportamento assimétrico de funcionamento dos sítios ativos nas duas subunidades para as DHODHs de classe 1A [76, 114].

Foram encontradas diferenças chave no mecanismo enzimático adotado pelas enzimas DHODHs de classe 1A e classe 2, que podem ser exploradas no desenvolvimento de inibidores potentes e seletivos para a *LmDHODH*.

É razoável considerar a hipótese de que o bloqueio da passagem da informação entre os monômeros por meio de alterações nas propriedades químicas e dinâmicas da interface dimérica, seja uma estratégia inovadora no planejamento de inibidores seletivos.

Outra abordagem nesse sentido seria o controle do movimento do *loop* catalítico. Baseado em evidências encontradas neste trabalho, pode-se afirmar que o mecanismo catalítico para as DHODHs de classe 1A envolve a dinâmica conformacional do *loop* catalítico e a comunicação entre os *loops* catalíticos dos monômeros via interface dimérica. Portanto, estratégias que mirem estes dois aspectos tendem a ser promissoras no que se refere à busca de moléculas com ação inibitória e seletivas para DHODHs de classe 1A.

Além disso, foi desenvolvido um ensaio para triagem de alto desempenho tendo como alvo a enzima *LmDHODH*. Alguns compostos promissores foram obtidos e encontram-se agora em fase de aquisição para que experimentos de determinação do mecanismo de inibição e ensaios de co-cristalização sejam realizados.

Os detalhes moleculares elucidados neste trabalho para a DHODH de *Leishmania major*, corroboram a importância da questão da flexibilidade nos estudos envolvendo alvos proteicos e ligantes. Diferentes estados conformacionais são acessíveis à estrutura tridimensional para *LmDHODH* e são imprescindíveis para a catálise, ressaltando a relevância em considerar os aspectos dinâmicos das interações no planejamento de inibidores seletivos para alvos enzimáticos.

Nossos resultados neste trabalho fornecem contribuições importantes sobre os mecanismos moleculares das DHODHs de classe 1A. A compreensão dinâmico-estrutural sobre como estas enzimas funcionam, no que se refere à cooperatividade mediada pela interface dimérica e a regulação dos movimentos dos *loops* catalíticos de cada monômero, nos instiga a pensar sobre os caminhos moleculares percorridos ao longo da evolução para que esse tipo de arquitetura fosse encontrada. As arquiteturas estruturais proteicas funcionam como verdadeiros fósseis moleculares que contam a história da vida. Entendendo este complexo processo, poderemos alcançar uma compreensão única sobre o caminho no qual a seleção evolucionária tem influenciado as propriedades dos sistemas moleculares no sentido de proporcionar um avanço funcional, uma vez que as proteínas são as responsáveis pela maior parte do trabalho celular.

Manuscritos publicados relacionados ao conteúdo da tese:

Reis, R.A.G, Ferreira, P., Medina, M., Nonato, M.C. *The mechanistic study of Leishmania major dihydroorotate dehydrogenase based on steady- and pre-steady-state kinetic analysis*. Biochem J, 2016. 473(5): p.651-60).

Reis, R.A.G, Lorenzato, E., Silva, V.C., Nonato, M.C. *Recombinant production, crystallization and crystal structure determination of dihydroorotate dehydrogenase from Leishmania (Viannia) braziliensis*. Acta Crystallogr F Struct Biol Commun, 2015. 71(Pt 5): p. 547-52.

Pádua, R.A.P., Tomaleri, G.P., Reis, R.A.G., David, J.S., Silva, V.C., Pinheiro, M. P., Nonato, M.C. *ThermoFMN - a thermofluor assay developed for ligand-screening as an alternative strategy for drug discovery*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2014. 25: p. 1864-1871.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6.0 Referências bibliográficas

1. Hunter, G.K., *Chapter 4 - The Catalytic Force*, in *Vital Forces*. 2000, Academic Press: London. p. 75-99.
2. Jas, J., *Materialism and Vitalism in Biology by Peter Chalmers Mitchell*. Journal of Philosophical Studies, 1930. **5**(20): p. 631-633.
3. Lohff, B., *[The history of the concept of vital force]*. Clio Med, 1981. **16**(2-3): p. 101-12.
4. Kinne-Saffran, E. and R.K. Kinne, *Vitalism and synthesis of urea. From Friedrich Wohler to Hans A. Krebs*. Am J Nephrol, 1999. **19**(2): p. 290-4.
5. Schwann, T., H. Smith, and M.J. Schleiden, *Microscopical researches into the accordance in the structure and growth of animals and plants*. 1847: The Sydenham Society.
6. Leicester, H.M. and H.S. Klickstein, *A source book in chemistry, 1400-1900*. 1952, New York: McGraw-Hill.
7. Hein, G.E., *The Liebig-Pasteur controversy: Vitality without vitalism*. Journal of Chemical Education, 1961. **38**(12): p. 614.
8. Kohler, R., *The Background to Eduard Buchner's Discovery of Cell-Free Fermentation*. Journal of the History of Biology, 1971. **4**(1): p. 35-61.
9. Stein, R.L., *Kinetics of enzyme action : essential principles for drug hunters*. 2011, Hoboken, N.J.: Wiley. xii, 302 p.
10. Kastle, J.H., *ON THE VITAL ACTIVITY OF THE ENZYMES*. Science, 1901. **13**(333): p. 765-71.
11. Radzicka, A. and R. Wolfenden, *A proficient enzyme*. Science, 1995. **267**(5194): p. 90-3.
12. Cramer, F., *Emil Fischer's Lock-and-Key Hypothesis after 100 years—Towards a Supramolecular Chemistry*, in *Perspectives in Supramolecular Chemistry*. 1994, John Wiley & Sons, Ltd. p. 1-23.
13. Brown, A.J., *XXXVI.-Enzyme action*. Journal of the Chemical Society, Transactions, 1902. **81**(0): p. 373-388.
14. Voet, D., J.G. Voet, and C.W. Pratt, *Fundamentals of biochemistry : life at the molecular level*. 2013, Hoboken, NJ: Wiley.
15. Michaelis, L., et al., *The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper*. Biochemistry, 2011. **50**(39): p. 8264-9.
16. Chang, R., *Physical chemistry for the biosciences*. 2005, Sausalito: University Science Books.
17. Briggs, G.E. and J.B. Haldane, *A Note on the Kinetics of Enzyme Action*. Biochem J, 1925. **19**(2): p. 338-9.
18. Hill, C.M., R.D. Waight, and W.G. Bardsley, *Dose any enzyme follow the Michaelis-Menten equation?* Mol Cell Biochem, 1977. **15**(3): p. 173-8.
19. Murray, R.K., *Harper's illustrated biochemistry*. 2012, New York: McGraw-Hill Medical.
20. Johnson, K.A., *Advances in transient-state kinetics*. Current Opinion in Biotechnology, 1998. **9**(1): p. 87-89.
21. Sumner, J.B., *THE ISOLATION AND CRYSTALLIZATION OF THE ENZYME UREASE: PRELIMINARY PAPER*. Journal of Biological Chemistry, 1926. **69**(2): p. 435-441.
22. Kruger, K., et al., *Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena*. Cell, 1982. **31**(1): p. 147-57.
23. Armstrong, E.F., *Enzymes. By J.B.S. Haldane, M.A. Monographs on Biochemistry. Edited by R.H.A. Plimmer, D.Sc., and Sir F. G. Hopkins, M.A., M.B., D.Sc., F.R.S. Pp. vii+235. London: Longmans, Green & Co., 1930. Price 14s. Journal of the Society of Chemical Industry, 1930. 49(44): p. 919-920.*
24. Pauling, L., *Molecular Architecture and Biological Reactions*. Chemical & Engineering News Archive, 1946. **24**(10): p. 1375-1377.
25. Wolfenden, R., *Transition state analogues for enzyme catalysis*. Nature, 1969. **223**(5207): p. 704-5.

26. Gutteridge, A., *Understanding the Relationship Between Enzyme Structure and Catalysis*, in *Darwin College*. 2005, Cambridge. p. 245.
27. Koshland, D.E., *The Key-Lock Theory and the Induced Fit Theory*. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1995. **33**(23-24): p. 2375-2378.
28. Ma, B., et al., *Folding funnels and binding mechanisms*. *Protein Eng*, 1999. **12**(9): p. 713-20.
29. Anfinsen, C.B., *Principles that govern the folding of protein chains*. *Science*, 1973. **181**(4096): p. 223-30.
30. Honig, B., *Protein folding: from the levinthal paradox to structure prediction*. *J Mol Biol*, 1999. **293**(2): p. 283-93.
31. Pande, V.S. and D.S. Rokhsar, *Folding pathway of a lattice model for proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(4): p. 1273-8.
32. Dobson, C.M., *Protein folding and misfolding*. *Nature*, 2003. **426**(6968): p. 884-90.
33. Weikl, T.R. and F. Paul, *Conformational selection in protein binding and function*. *Protein Sci*, 2014. **23**(11): p. 1508-18.
34. Teague, S.J., *Implications of protein flexibility for drug discovery*. *Nat Rev Drug Discov*, 2003. **2**(7): p. 527-41.
35. Ljungdahl, P.O. and B. Daignan-Fornier, *Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae**. *Genetics*, 2012. **190**(3): p. 885-929.
36. Carter, N.S., et al., *Purine and Pyrimidine Metabolism in *Leishmania**, in *Drug Targets in Kinetoplastid Parasites*, H.K. Majumder, Editor. 2008, Springer New York: New York, NY. p. 141-154.
37. Moffatt, B.A. and H. Ashihara, *Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism*. *Arabidopsis Book*, 2002. **1**: p. e0018.
38. Epidemiológica, M.d.S.S.d.V.e.S.D.d.V., *Manual de Vigilância e Leishmaniose Tegumentar Americana*. 2 ed. 2013, Brasil. 179.
39. Ali, J.A., et al., *Pyrimidine salvage in *Trypanosoma brucei* bloodstream forms and the trypanocidal action of halogenated pyrimidines*. *Mol Pharmacol*, 2013. **83**(2): p. 439-53.
40. Garavito, M.F., H.Y. Narváez-Ortiz, and B.H. Zimmermann, *Pyrimidine Metabolism: Dynamic and Versatile Pathways in Pathogens and Cellular Development*. *Journal of Genetics and Genomics*, 2015. **42**(5): p. 195-205.
41. Gao, G., et al., *Novel organization and sequences of five genes encoding all six enzymes for de novo pyrimidine biosynthesis in *Trypanosoma cruzi**. *J Mol Biol*, 1999. **285**(1): p. 149-61.
42. Wilson, Z.N., et al., *Genetic dissection of pyrimidine biosynthesis and salvage in *Leishmania donovani**. *J Biol Chem*, 2012. **287**(16): p. 12759-70.
43. Hashimoto, M., et al., *Critical importance of the de novo pyrimidine biosynthesis pathway for *Trypanosoma cruzi* growth in the mammalian host cell cytoplasm*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. **417**(3): p. 1002-6.
44. Arakaki, T.L., et al., *Characterization of *Trypanosoma brucei* dihydroorotate dehydrogenase as a possible drug target; structural, kinetic and RNAi studies*. *Mol Microbiol*, 2008. **68**(1): p. 37-50.
45. Annoura, T., et al., *The origin of dihydroorotate dehydrogenase genes of kinetoplastids, with special reference to their biological significance and adaptation to anaerobic, parasitic conditions*. (0022-2844 (Print)).
46. Jones, M.E., *Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: genes, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis*. (0066-4154 (Print)).
47. Macheroux, P., *UV-Visible Spectroscopy as a Tool to Study Flavoproteins*, in *Flavoprotein Protocols*, S.K. Chapman and G.A. Reid, Editors. 1999, Humana Press: Totowa, NJ. p. 1-7.
48. Walsh, C.T. and T.A. Wencewicz, *Flavoenzymes: versatile catalysts in biosynthetic pathways*. *Nat Prod Rep*, 2013. **30**(1): p. 175-200.
49. Takashima, E., et al., *Characterization of the dihydroorotate dehydrogenase as a soluble fumarate reductase in *Trypanosoma cruzi**. *Mol Biochem Parasitol*, 2002. **122**(2): p. 189-200.

50. Reis, R.A., et al., *The mechanistic study of Leishmania major dihydro-orotate dehydrogenase based on steady- and pre-steady-state kinetic analysis*. Biochem J, 2016. **473**(5): p. 651-60.
51. Argyrou, A., M.W. Washabaugh, and C.M. Pickart, *Dihydroorotate dehydrogenase from Clostridium oroticum is a class 1B enzyme and utilizes a concerted mechanism of catalysis*. Biochemistry, 2000. **39**(34): p. 10373-10384.
52. Marcinkeviciene, J., et al., *Dihydroorotate dehydrogenase B of Enterococcus faecalis. Characterization and insights into chemical mechanism*. Biochemistry, 1999. **38**(40): p. 13129-13137.
53. Zameitat, E., et al., *Biochemical characterization of recombinant dihydroorotate dehydrogenase from the opportunistic pathogenic yeast Candida albicans*. Febs Journal, 2006. **273**(14): p. 3183-3191.
54. Cordeiro, A.T., P.R. Feliciano, and M.C. Nonato, *Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of Leishmania major dihydroorotate dehydrogenase*. Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications, 2006. **62**: p. 1049-1051.
55. Fagan, R.L., et al., *Mechanism of flavin reduction in the class 1A dihydroorotate dehydrogenase from Lactococcus lactis*. Biochemistry, 2007. **46**(13): p. 4028-4036.
56. Pinheiro, M.P., J. Iulek, and M.C. Nonato, *Crystal structure of Trypanosoma cruzi dihydroorotate dehydrogenase from Y strain*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008. **369**(3): p. 812-817.
57. Liu, S.P., et al., *Structures of human dihydroorotate dehydrogenase in complex with antiproliferative agents*. Structure with Folding & Design, 2000. **8**(1): p. 25-33.
58. Löffler, M., et al., *Drosophila melanogaster dihydroorotate dehydrogenase: the N-terminus is important for biological function in vivo but not for catalytic properties in vitro*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2002. **32**(9): p. 1159-1169.
59. Rawls, J., et al., *Requirements for the mitochondrial import and localization of dihydroorotate dehydrogenase*. European Journal of Biochemistry, 2000. **267**(7): p. 2079-2087.
60. Fagan, R.L. and B.A. Palfey, *Roles in Binding and Chemistry for Conserved Active Site Residues in the Class 2 Dihydroorotate Dehydrogenase from Escherichia coli*. Biochemistry, 2009. **48**(30): p. 7169-7178.
61. Couto, S.G., M.C. Nonato, and A.J. Costa-Filho, *Defects in vesicle core induced by Escherichia coli dihydroorotate dehydrogenase*. Biophysical Journal, 2008. **94**(5): p. 1746-1753.
62. Couto, S.G., M. Cristina Nonato, and A.J. Costa-Filho, *Site directed spin labeling studies of Escherichia coli dihydroorotate dehydrogenase N-terminal extension*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011. **414**(3): p. 487-492.
63. Inaoka, D.K., et al., *Structures of Trypanosoma cruzi dihydroorotate dehydrogenase complexed with substrates and products: atomic resolution insights into mechanisms of dihydroorotate oxidation and fumarate reduction*. Biochemistry, 2008. **47**(41): p. 10881-91.
64. Reis, R.A., et al., *Recombinant production, crystallization and crystal structure determination of dihydroorotate dehydrogenase from Leishmania (Viannia) braziliensis*. Acta Crystallogr F Struct Biol Commun, 2015. **71**(Pt 5): p. 547-52.
65. Rowland, P., et al., *The crystal structure of Lactococcus lactis dihydroorotate dehydrogenase A complexed with the enzyme reaction product throws light on its enzymatic function*. Protein Science, 1998. **7**(6): p. 1269-1279.
66. Liu, Y., et al., *Structure of the putative dihydroorotate dehydrogenase from Streptococcus mutans*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2011. **67**(Pt 2): p. 182-7.
67. Rowland, P., et al., *Structure of dihydroorotate dehydrogenase B: Electron transfer between two flavin groups bridged by an iron-sulphur cluster*. Structure, 2000. **8**(12): p. 1227-1238.
68. Demmer, J.K., et al., *Insights into Flavin-based Electron Bifurcation via the NADH-dependent Reduced Ferredoxin:NADP Oxidoreductase Structure*. J Biol Chem, 2015. **290**(36): p. 21985-95.

69. Hurt, D.E., J. Widom, and J. Clardy, *Structure of Plasmodium falciparum dihydroorotate dehydrogenase with a bound inhibitor*. Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography, 2006. **62**: p. 312-323.
70. Hansen, M., et al., *Inhibitor binding in a class 2 dihydroorotate dehydrogenase causes variations in the membrane-associated N-terminal domain*. Protein Sci, 2004. **13**(4): p. 1031-42.
71. Deng, X., et al., *Fluorine modulates species selectivity in the triazolopyrimidine class of Plasmodium falciparum dihydroorotate dehydrogenase inhibitors*. J Med Chem, 2014. **57**(12): p. 5381-94.
72. Norager, S., et al., *E-coli dihydroorotate dehydrogenase reveals structural and functional distinctions between different classes of dihydroorotate dehydrogenases*. Structure, 2002. **10**(9): p. 1211-1223.
73. Cheleski, J., et al., *Novel insights for dihydroorotate dehydrogenase class 1A inhibitors discovery*. Eur J Med Chem, 2010. **45**(12): p. 5899-909.
74. Cordeiro, A.T., et al., *Crystal structure of dihydroorotate dehydrogenase from Leishmania major*. Biochimie, 2012. **94**(8): p. 1739-1748.
75. Ottosen, M.B., et al., *The dimeric dihydroorotate dehydrogenase A from Lactococcus lactis dissociates reversibly into inactive monomers*. Protein Science, 2002. **11**(11): p. 2575-2583.
76. Shi, J., et al., *Single-molecule kinetics reveals signatures of half-sites reactivity in dihydroorotate dehydrogenase A catalysis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(15): p. 5775-5780.
77. *Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde*. Revista de Saúde Pública, 2010. **44**: p. 200-202.
78. Conteh, L., T. Engels, and D.H. Molyneux, *Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases*. Lancet, 2010. **375**(9710): p. 239-47.
79. Herwaldt, B.L., *Leishmaniasis*. Lancet, 1999. **354**(9185): p. 1191-9.
80. Hotez, P.J. and R.T. Fujiwara, *Brazil's neglected tropical diseases: an overview and a report card*. (1769-714X (Electronic)).
81. Organization, W.H., *Global Health Observatory Data Repository*. 2013.
82. Christopherson, R.I., S.D. Lyons, and P.K. Wilson, *Inhibitors of de novo nucleotide biosynthesis as drugs*. Accounts of Chemical Research, 2002. **35**(11): p. 961-971.
83. Chen, S.F., et al., *INHIBITION OF DIHYDROOROTATE DEHYDROGENASE-ACTIVITY BY BREQUINAR SODIUM*. Cancer Research, 1992. **52**(13): p. 3521-3527.
84. Jockel, J., B. Wendt, and M. Löffler, *Structural and functional comparison of agents interfering with dihydroorotate, succinate and NADH oxidation of rat liver mitochondria*. Biochemical Pharmacology, 1998. **56**(8): p. 1053-1060.
85. Harder, A. and A. Haberkorn, *POSSIBLE MODE OF ACTION OF TOLTRAZURIL - STUDIES ON 2 EIMERIA SPECIES AND MAMMALIAN AND ASCARIS-SUUM ENZYMES*. Parasitology Research, 1989. **76**(1): p. 8-12.
86. Ittarat, I., et al., *EFFECTS OF ATOVAQUONE AND OTHER INHIBITORS ON PNEUMOCYSTIS-CARINII DIHYDROOROTATE DEHYDROGENASE*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1995. **39**(2): p. 325-328.
87. Goldenberg, M.M., *Leflunomide, a novel immunomodulator for the treatment of active rheumatoid arthritis*. Clin Ther, 1999. **21**(11): p. 1837-52; discussion 1821.
88. Burris, H.A., et al., *Pharmacokinetic and phase I studies of brequinar (DUP 785; NSC 368390) in combination with cisplatin in patients with advanced malignancies*. Invest New Drugs, 1998. **16**(1): p. 19-27.
89. Palfey, B.A., O. Björnberg, and K.F. Jensen, *Specific inhibition of a family 1A dihydroorotate dehydrogenase by benzoate pyrimidine analogues*. J Med Chem, 2001. **44**(18): p. 2861-4.
90. Frearson, J.A., et al., *Target assessment for antiparasitic drug discovery*. Trends Parasitol, 2007. **23**(12): p. 589-95.

91. Feliciano, P.R., et al., *Cloning, expression, purification, and characterization of Leishmania major dihydroorotate dehydrogenase*. Protein Expr Purif, 2006. **48**(1): p. 98-103.
92. Pádua, R.A.P., et al., *ThermoFMN - a thermofluor assay developed for ligand-screening as an alternative strategy for drug discovery*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2014. **25**: p. 1864-1871.
93. Gibson, Q.H. and L. Milnes, *Apparatus for rapid and sensitive spectrophotometry*. Biochem J, 1964. **91**(1): p. 161-71.
94. Larsen, D. ChemWiki. [cited 2014 Abril]; Available from: http://chemwiki.ucdavis.edu/Core/Analytical_Chemistry/Analytical_Chemistry_2.0/13_Kinetic_Methods/13B%3A_Chemical_Kinetics.
95. O'Brien, R. and I. Haq, *Applications of Biocalorimetry: Binding, Stability and Enzyme Kinetics*, in *Biocalorimetry 2*. 2004, John Wiley & Sons, Ltd. p. 1-34.
96. Heckman, K.L. and L.R. Pease, *Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension*. Nat Protoc, 2007. **2**(4): p. 924-32.
97. Corpet, F., *Multiple sequence alignment with hierarchical clustering*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(22): p. 10881-90.
98. Pantoliano, M., et al., *High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery*. Journal of Biomolecular Screening, 2001. **6**(6): p. 429-440.
99. Niesen, F., H. Berglund, and M. Vedadi, *The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability*. Nature Protocols, 2007. **2**(9): p. 2212-2221.
100. Lo, M., et al., *Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery*. Analytical Biochemistry, 2004. **332**(1): p. 153-159.
101. Guimarães, B.G., et al., *The MX2 macromolecular crystallography beamline: a wiggler X-ray source at the LNLS*. J Synchrotron Radiat, 2009. **16**(Pt 1): p. 69-75.
102. Kabsch, W., *Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2010. **66**(Pt 2): p. 133-44.
103. Evans, P., *An introduction to data reduction: space-group determination, scaling and intensity statistics*. Acta Crystallographica Section D, 2011. **67**(4): p. 282-292.
104. Brünger, A.T., *Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures*. Nature, 1992. **355**(6359): p. 472-5.
105. McCoy, A.J., et al., *Phaser crystallographic software*. J Appl Crystallogr, 2007. **40**(Pt 4): p. 658-674.
106. Afonine, P.V., et al., *Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine*. (1399-0047 (Electronic)).
107. Emsley, P. and K. Cowtan, *Coot: model-building tools for molecular graphics*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2004. **60**(Pt 12 Pt 1): p. 2126-32.
108. Emsley, P., et al., *Features and development of Coot*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2010. **66**(Pt 4): p. 486-501.
109. ForteBio. *BLI applications notes*. [cited 2015 July]; Available from: <http://www.fortebio.com/literature.html>.
110. Miller, R.W., *Dihydroorotate dehydrogenase (Neurospora)*. Methods Enzymol, 1978. **51**: p. 63-9.
111. Zhang, J.H., T.D. Chung, and K.R. Oldenburg, *A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays*. J Biomol Screen, 1999. **4**(2): p. 67-73.
112. Fagan, R.L., et al., *Mechanism of flavin reduction in class 2 dihydroorotate dehydrogenases*. Biochemistry, 2006. **45**(50): p. 14926-14932.
113. Palfey, B.A., O. Björnberg, and K.F. Jensen, *Insight into the chemistry of flavin reduction and oxidation in Escherichia coli dihydroorotate dehydrogenase obtained by rapid reaction studies*. Biochemistry, 2001. **40**(14): p. 4381-90.

114. Norager, S., et al., *Lactococcus lactis* dihydroorotate dehydrogenase A mutants reveal important facets of the enzymatic function. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**(31): p. 28812-28822.
115. Bjornberg, O., et al., *Active site of dihydroorotate dehydrogenase A from Lactococcus lactis investigated by chemical modification and mutagenesis*. *Biochemistry*, 1997. **36**(51): p. 16197-16205.
116. Pinheiro, M.P., F.d.S. Emery, and M. Cristina Nonato, *Target Sites for the Design of Anti-trypanosomatid Drugs Based on the Structure of Dihydroorotate Dehydrogenase*. *Current Pharmaceutical Design*, 2013. **19**(14): p. 2615-2627.
117. Hines, V. and M. Johnston, *MECHANISTIC STUDIES ON THE BOVINE LIVER MITOCHONDRIAL DIHYDROOROTATE DEHYDROGENASE USING KINETIC DEUTERIUM-ISOTOPE EFFECTS*. *Biochemistry*, 1989. **28**(3): p. 1227-1234.
118. Diederichs, K. and P.A. Karplus, *Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography*. *Nat Struct Biol*, 1997. **4**(4): p. 269-75.
119. Shanks, E., R. Ketteler, and D. Ebner, *Academic drug discovery within the United Kingdom: a reassessment*. *Nat Rev Drug Discov*, 2015. **14**(7): p. 510-510.

APÊNDICE A

Derivação das leis de velocidade do estado-estacionário para o mecanismo de catálise *Ping-Pong*

DHODHs são conhecidas por seguirem o mecanismo de catálise *Ping-Pong*, também chamado de reação de dupla-troca. Neste mecanismo, o primeiro produto (P_1) deve ser liberado antes que o segundo substrato (S_2) possa se ligar a enzima. Essa reação é caracterizada pela existência de um intermediário da enzima, E^* , no qual a enzima está temporariamente modificada (1).

Quando as duas semi-reações são consideradas como seguindo o mecanismo de Michaelis-Menten, a lei de velocidade no estado estacionário foi previamente descrita como:

$$v = \frac{V_{\max}[S_1][S_2]}{K_{m1}[S_2] + K_{m2}[S_1] + [S_1][S_2]} \quad (2)$$

A derivação de (2) é obtida conforme mostrado adiante:

Considerando o mecanismo de Michaelis-Menten, a lei de velocidade para cada semi-reação pode ser escrita como:

$$v_1 = \frac{dP_1}{dt} = \frac{V_{\max}[S_1]}{K_{m1} + [S_1]} \quad (3)$$

Onde

$$K_{m1} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = \frac{[E][S_1]}{[ES_1]} \quad (4)$$

e

$$v_2 = \frac{dP_2}{dt} = \frac{V_{\max}[S_2]}{K_{m2} + [S_2]} \quad (5)$$

Onde

$$K_{m2} = \frac{k_{-3} + k_4}{k_3} = \frac{[E^*][S_2]}{[E^*S_2]} \quad (6)$$

Considerando $[E_0]$ a concentração total de proteína e $[E_1]$ e $[E_2]$, $[E^*_1]$ e $[E^*_2]$, e $[ES_1]$ e $[E^*S_2]$, a concentração de enzima livre, a concentração de proteína modificada e a concentração do complexo enzima-substrato para a primeira e para a segunda semi-reações, respectivamente, pela conservação de massa temos que:

$$[E_0] = [E_1] + [E^*_1] + [ES_1] \quad (7)$$

e

$$[E_0] = [E_2] + [E^*_2] + [E^*S_2] \quad (8)$$

Assumindo um sistema fechado e uma reação em equilíbrio, temos que:

$$[E_1] = [E_2] = [E]; [E^*_1] = [E^*_2] = [E^*] \quad (9)$$

e

$$[ES_1] = [E^*S_2] \quad (10)$$

De (4), (6) e (10), obtemos:

$$[E] = \frac{K_{m1}[ES_1]}{[S_1]} = \frac{K_{m1}[E^*S_2]}{[S_1]} \quad (11)$$

e

(12)

$$[E^*] = \frac{K_{m2}[E^*S_2]}{[S_2]}$$

Quando as equações 10 e 12 são combinadas, a quantidade total de proteína dada por (8) pode ser reescrita como:

$$[E_0] = \frac{K_{m1}[E^*S_2]}{[S_1]} + \frac{K_{m2}[E^*S_2]}{[S_2]} + [E^*S_2] \quad (13)$$

ou

$$[E_0] = \left\{ \frac{K_{m1}}{[S_1]} + \frac{K_{m2}}{[S_2]} + 1 \right\} [E^*S_2] \quad (14)$$

Equação (14) pode ser rearranjada como:

$$[E^*S_2] = \frac{[E_0]}{\left\{ \frac{K_{m1}}{[S_1]} + \frac{K_{m2}}{[S_2]} + 1 \right\}} \quad (15)$$

Uma consideração similar pode ser usada para chegar à:

$$[ES_1] = \frac{[E_0]}{\left\{ \frac{K_{m1}}{[S_1]} + \frac{K_{m2}}{[S_2]} + 1 \right\}} \quad (16)$$

Considerando que a reação global é governada pela velocidade da semi-reação mais lenta, e assumindo que a ligação e dissociação do substrato ocorra mais rapidamente do que a formação do produto, a velocidade da reação pode ser escrita como:

$$v_1 = k_2[ES_1] \quad (17)$$

ou

$$v_2 = k_4[E^*S_2] \quad (18)$$

Uma vez que a velocidade máxima $V_{\max}$ é alcançada pelo sistema à concentração máxima (saturante) do substrato, ou seja, $[ES_1] = [E^*S_2] = [E_0]$, $V_{\max}$ pode ser expresso como:

$$V_{\max} = k_2 [E_0] \quad (19)$$

ou

$$V_{\max} = k_4 [E_0] \quad (20)$$

dependendo de qual semi-reação determina a velocidade para o sistema fechado.

Equações (17) e (18) podem ser escritas como

$$v_1 = \frac{k_2[E_0]}{\left\{ \frac{K_{m1}}{[S_1]} + \frac{K_{m2}}{[S_2]} + 1 \right\}} \quad (21)$$

e

$$v_2 = \frac{k_4[E_0]}{\left\{ \frac{K_{m1}}{[S_1]} + \frac{K_{m2}}{[S_2]} + 1 \right\}} \quad (22)$$

Usando a consideração de que $v = \min[v_1, v_2]$, podemos escrever que:

$$v = \frac{V_{\max}}{\left\{ \frac{K_{m1}}{[S_1]} + \frac{K_{m2}}{[S_2]} + 1 \right\}} \quad (23)$$

Onde $V_{\max} = \min \{ [k_1, k_2] \cdot E_0 \}$

Equação (23) pode ser rearranjada como:

$$v = \frac{V_{\max}[S_1][S_2]}{K_{m1}[S_2] + K_{m2}[S_1] + [S_1][S_2]} \quad \text{Q.E.D} \quad (24)$$

A equação acima foi derivada considerando ambas as semi-reações seguindo o mecanismo de Michaelis-Menten. Vamos agora considerar uma reação enzimática envolvendo dois substratos mas na qual uma semi-reação, por exemplo a primeira semi-reação, segue o modelo cooperativo de catálise e obedece a equação de Hill como descrito abaixo:

$$\theta = \frac{\text{bound sites}}{\text{total sites}} = \frac{[ES_1]}{[ES_1] + [E]} = \frac{[S_1]^h}{(K_{d1})^h + [S_1]^h} \quad (25)$$

onde θ é a fração de sítios ocupados, K_{d1} é definido como a concentração de substrato (S_1) ocupando metade dos possíveis sítios de ligação, e h é o coeficiente de Hill e indica o grau da cooperatividade.

A equação 25 pode ser rearranjada como:

$$[ES_1] = ([ES_1] + [E]) \frac{[S_1]^h}{(K_{d1})^h + [S_1]^h} \quad (26)$$

$$[ES_1]\{(K_{d1})^h + [S_1]^h\} = ([ES_1] + [E])[S_1]^h \quad (27)$$

$$\frac{[ES_1](K_{d1})^h}{[S_1]^h} + \frac{[ES_1][S_1]^h}{[S_1]^h} = [ES_1] + [E] \quad (28)$$

$$[E] = \frac{[ES_1](K_{d1})^h}{[S_1]^h} \quad (29)$$

$$\frac{[ES_1](K_{d1})^h}{[S_1]^h} + [ES_1] = [ES_1] + [E] \quad (30)$$

Considerando um sistema em equilíbrio, relações (7) e (10) permanecem inalteradas, e a quantidade total de proteína (equações 7 e 8) pode ser escrita como:

$$[E_0] = \frac{(K_{d1})^h[ES_1]}{[S_1]^h} + \frac{K_{m2}[ES_1]}{[S_2]} + [ES_1] \quad (31)$$

e

$$[E_0] = \frac{(K_{d1})^h[E^*S_2]}{[S_1]^h} + \frac{K_{m2}[E^*S_2]}{[S_2]} + [E^*S_2] \quad (32)$$

Ambas as equações podem ser rearranjadas como:

$$[E_0] = \left\{ \frac{(K_{d1})^h}{[S_1]^h} + \frac{K_{m2}}{[S_2]} + 1 \right\} [E^*S_2] = \left\{ \frac{(K_{d1})^h}{[S_1]^h} + \frac{K_{m2}}{[S_2]} + 1 \right\} [ES_1] \quad (33)$$

A concentração dos complexos enzima-substrato para a primeira e para a segunda semi-reação pode ser escrita como:

$$[ES_1] = [E^*S_2] = \frac{[E_0][S_1]^h[S_2]}{(K_{d1})^h[S_2] + K_{m2}[S_1]^h + [S_1]^h[S_2]} \quad (34)$$

Da mesma forma que descrito previamente, a velocidade da reação é determinada pela semi-reação mais lenta, podendo ser governada tanto pela primeira (equações 17 e 19) quanto pela segunda (equações 18 e 20) semi-reação. Assim, inserindo (34) em (17 e 18) a velocidade de reação pode ser escrita como:

$$v_1 = k_2[ES_1] = \frac{k_2[E_0][S_1]^h[S_2]}{(K_{d1})^h[S_2] + K_{m2}[S_1]^h + [S_1]^h[S_2]} \quad (35)$$

ou

$$v_2 = k_4[E^*S_2] = \frac{k_4[E_0][S_1]^h[S_2]}{(K_{d1})^h[S_2] + K_{m2}[S_1]^h + [S_1]^h[S_2]} \quad (36)$$

Equações (35) e (36) quando reescritas em termos de velocidade máxima podem ser reduzidas a uma expressão simples:

$$v = \frac{V_{\max}[S_1]^h[S_2]}{(K_{d1})^h[S_2] + (K_{m2})[S_1]^h + [S_1]^h[S_2]} \quad (37)$$

A equação (37) descreve a lei de velocidade para o estado estacionário para um mecanismo *Ping-Pong* no qual a primeira semi-reação obedece ao modelo de cooperatividade e a segunda semi-reação segue o modelo de Michaelis-Menten de catálise enzimática.

Uma estratégia similar pode ser usada para derivar uma equação geral para o mecanismo *Ping-Pong* no qual ambas as semi-reações seguem um modelo de cooperatividade de catálise enzimática.

$$v = \frac{V_{\max} [S_1]^{h_1} [S_2]^{h_2}}{(K_{d1})^{h_1} [S_2]^{h_2} + (K_{d2})^{h_2} [S_1]^{h_1} + [S_1]^{h_1} [S_2]^{h_2}} \quad (38)$$

Com h_1 e h_2 definidos como coeficientes de Hill para a primeira e segunda semi-reações, respectivamente.