UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA E BIOLÓGICA

JESSYKA LIMA SANTOS

Clonagem e expressão da Homoserina Desidrogenase de *Paracoccidioides brasiliensis* em células de *Escherichia coli* e sua caracterização estrutural

São Carlos

2019

JESSYKA LIMA SANTOS

Clonagem e expressão da Homoserina Desidrogenase de *Paracoccidioides brasiliensis* em células de *Escherichia coli* e sua caracterização estrutural

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em ciências

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Canduri

São Carlos

2019

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.

Assinatura:

Data:

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Santos, Jessyka Lima

Clonagem e expressão da Homoserina Desidrogenase de *Paracoccidioides* brasiliensis em células de *Escherichia coli* e sua caracterização estrutural / Jessyka Lima Santos. — São Carlos, 2019.

91 f.

Dissertação (Mestrado em Química Orgânica e Biológica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2019.

Edição revisada

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Canduri

1. Proteínas. 2. *Paracoccidioidomicose*. 3. *Paracoccidioides* brasilienses. 4. Homoserina desidrogenase. I. Título.

Dedico esta conquista com todo o meu amor ao meu pai, Eliton, e à minha mãe, Katia, por cuidarem de mim e me fornecerem toda a base para que eu possa perseguir meus sonhos, por acreditarem em mim e me apoiarem em cada nova etapa da minha vida, por me respeitarem sempre e por me amarem imensamente, serei eternamente grata.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à minha mãe e ao meu pai pelo suporte e apoio recebido ao longo da minha vida pessoal e profissional e por amor e carinho que me foi dado.

Aos familiares e amigos por acreditarem no meu potencial e pela companhia, mesmo nos momentos de dificuldades.

Aos docentes que fizeram parte da minha formação, do ensino básico à pós-graduação, por todo o conhecimento que me foi passado.

Aos amigos e colegas do Grupo de pesquisa de Bioquímica Molecular e Estrutural, em especial à Diandra e à Rebeka, pela amizade, apoio e contribuição científica obtidos ao longo do meu mestrado.

Ao Prof. Dr. Flavio Augusto Vicente Seixas e aos alunos de seu grupo de pesquisa pela colaboração com a pesquisa aqui mostrada.

À Profa. Dra. Fernanda Canduri pela oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa, pelo conhecimento passado, pela orientação e pelo apoio durante a realização deste trabalho.

À UNESP por uma ótima formação acadêmica.

Às agências de fomento à pesquisa FAPESP e CAPES pelo auxílio financeiro.

À agência de fomento à pesquisa CNPq pela bolsa concedida e por todo o suporte financeiro para a realização desta pesquisa.

Por fim, ao IQSC e à USP pela estrutura, formação e capacitação profissional de excelência a mim concedidos.

“Precisa-se...

De pessoas que tenham os pés na terra e a cabeça nas estrelas.

Capazes de sonhar, sem medo dos sonhos.

Tão idealistas que transformem seus sonhos em metas.

Pessoas tão práticas que sejam capazes de transformar suas metas em realidade.

Pessoas determinadas que nunca abram mão de construir seus destinos e arquitetar suas vidas.

Que não temam mudanças e saibam tirar proveito delas.

Que tornem seu trabalho objeto de prazer e uma porção substancial de realização pessoal.

Que percebam, na visão e na missão de suas vidas profissionais, de suas dedicações humanistas em prol da humanidade, um forte impulso para sua própria motivação.

Pessoas com dignidade, que se conduzam com coerência em seus discursos, seus atos, suas crenças e seus valores.

Precisa-se de pessoas que questionem, não pela simples contestação, mas pela necessidade íntima de só aplicar as melhores ideias.

Pessoas que mostrem sua face de parceiros legais. Sem se mostrarem superiores nem inferiores. Mas... iguais.

Precisa-se de pessoas ávidas por aprender e que se orgulhem de absorver o novo.

Pessoas de coragem para abrir caminhos, enfrentar desafios, criar soluções, correr riscos calculados. Sem medo de errar.

Precisa-se de pessoas que construam suas equipes e se integrem nelas.

Que não tomem para si o poder, mas saibam compartilhá-lo.

Pessoas que não se empolguem com seu próprio brilho. Mas com o brilho do resultado alcançado em conjunto.

Precisa-se de pessoas que enxerguem as árvores. Mas também prestem atenção na magia das florestas. Que tenham percepção do todo e da parte.

Seres humanos justos, que inspirem confiança e demonstrem confiança nos parceiros.

Estimulando-os, energizando-os, sem receio que lhe façam sombra, mas sim se orgulhando deles.

Precisa-se de pessoas que criem em torno de si um ambiente de entusiasmo

De liberdade, de responsabilidade, de determinação, De respeito e de amizade.

Precisa-se de seres racionais. Tão racionais que compreendam que sua realização pessoal está atrelada à vazão de suas emoções.

É na emoção que encontramos a razão de viver.

Precisa-se de gente que saiba administrar COISAS e liderar PESSOAS.

Precisa-se urgentemente de um novo ser."

(Precisa-se, Isaac Liberman)

RESUMO

A paracoccidioidomicose é uma micose granulomatosa sistêmica causada pelo fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. Esta doença é a mais importante infecção fúngica na América Latina e um importante problema de saúde no Brasil, representando 51% das mortes por infecção fúngica. A homoserina desidrogenase é uma enzima oxidoredutase que atua na síntese de aminoácidos no metabolismo de fungos e plantas, não sendo encontrada em humanos. Tal fato tornou-a um alvo em potencial para o desenvolvimento de novos fármacos específicos para o tratamento da doença. O objetivo deste trabalho foi a superexpressão heteróloga em *Escherichia coli*, purificação e caracterização estrutural e funcional da homoserina desidrogenase da *Paracoccidioides brasiliensis*, a fim de fornecer base científica para posteriores estudos farmacológicos. A proteína homoserina desidrogenase foi expressa em vetor pET-SUMO na forma solúvel, obtendo-se uma quantidade média de $29,672 \pm 6,828$ mg de proteína por litro de expressão com aproximadamente 94% de pureza. A análise por espectroscopia de dicroísmo circular apresentou um perfil espectral de uma estrutura secundária predominantemente formada por hélices α , $45,5 \pm 7,3$ %, e com pouca contribuição de fitas β , $10,5 \pm 7,0$ %. As análises por espectroscopia de emissão de fluorescência mostraram que a proteína possui uma boa estabilidade na presença do agente desnaturante ureia, apresentando um C_m de $4,13 \pm 0,21$ M de ureia, e uma ampla faixa de pH na qual não há mudança conformacional, do pH 6 ao pH 10. Na análise por calorimetria diferencial de varredura foi possível verificar que a proteína possui uma alta estabilidade a temperatura ambiente, porém uma baixa estabilidade em altas temperaturas, sofrendo uma desnaturação irreversível, a T_m obtida foi de $58,65 \pm 0,87$ °C. Os estudos da atividade enzimática da homoserina desidrogenase por espectroscopia de absorção molecular no UV/Vis mostrou que a proteína possui um pH ótimo entre 9,35 e 9,50, um comportamento michaeliano, que a reação enzimática se dá por meio de um processo não cooperativo, que a enzima possui um K_M de 0,266 mM e um V_{Max} de $1,78 \text{ mM s}^{-1}$ e que a mesma não é sensível a inibição por treonina com um IC_{50} de $184 \pm 3,0$ mM. Portanto, a expressão e purificação da proteína foram eficientes e as análises de caracterização estrutural mostraram que a proteína foi obtida na forma enovelada e enzimaticamente ativa, sendo bastante estável frente a diversos agentes externos.

Palavras chaves: Proteínas; Paracoccidioidomicose; *Paracoccidioides brasiliensis*; Homoserina desidrogenase.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis is a systemic granulomatous mycosis caused by the thermodynamophilic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. This disease is the most important fungal infection in Latin America and a major health problem in Brazil, representing 51 % of deaths due to fungal infection. Homoserine dehydrogenase is an oxidoreductase enzyme that acts on the synthesis of amino acids in the metabolism of fungi and plants, not being found in humans. This fact has made it a potential target for the development of new specific drugs for the treatment of the disease. The objective of this work was the heterologous overexpression in *Escherichia coli*, purification and structural and functional characterization of the homoserine dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis*, in order to provide scientific basis for later pharmacological studies. The homoserine dehydrogenase protein was expressed in pET-SUMO vector in soluble form, obtaining a mean amount of 29.672 ± 6.828 mg of protein per liter of expression at approximately 94 % purity. The analysis by circular dichroism spectroscopy showed a spectral profile of a secondary structure predominantly composed of α -helices, 45.5 ± 7.3 %, and little contribution of β -strands, 10.5 ± 7.0 %. Fluorescence emission spectroscopy analyses showed that the protein has a good stability in the presence of the denaturing agent urea, presenting a C_m of 4.13 ± 0.21 M urea, and a broad pH range in which there is no conformational change from pH 6 to pH 10. In the analysis by differential scanning calorimetry, it was possible to verify that the protein has a high stability at room temperature, but a low stability at high temperatures, suffering irreversible denaturation, the obtained T_m was 58.65 ± 0.87 °C. Studies of the enzymatic activity of homoserine dehydrogenase by molecular absorption spectroscopy in UV/Vis showed that the protein has an optimum pH between 9.35 and 9.50, a Michaelian behavior, the enzymatic reaction is carried out by means of a non-cooperative process, the enzyme has a K_M of 0.266 mM and a V_{Max} of 1.78 mM s⁻¹ and it is not sensitive to inhibition by threonine with an IC_{50} of 184 ± 3.0 mM. Therefore, protein expression and purification were efficient and the structural characterization analyses showed that the protein was obtained in the folded and enzymatically active form, being quite stable against several external agents.

Key words: Proteins; Paracoccidioidomycosis; *Paracoccidioides brasiliensis*; Homoserine dehydrogenase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Áreas geográficas endêmicas de paracoccidioidomicose na América Latina: (■) primeiras áreas reconhecidas com alta endemicidade; (■) Alta endemicidade observada desde as últimas décadas do século 20; (■) área com recente evidência do crescimento endêmico; (■) áreas com moderada endemicidade; (■) baixa endemicidade; (□) Sem áreas endêmicas ou raro casos reportados nesses países ou regiões.	23
Figura 2 - Microambientes de citocinas decorrentes da interação entre <i>P. brasiliensis</i> e fagócito mononuclear	25
Figura 3 - Propagação de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (Pb) e <i>Paracoccidioides lutzii</i> (Pl).....	27
Figura 4 – Morfologia do fungo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> . a) Morfologia microscópica à 25 °C: forma filamentosa. b) Morfologia macroscópica à 25 °C: forma filamentosa. c) Morfologia microscópica à 37 °C: forma leveduriforme. d) Morfologia macroscópica à 37 °C: forma leveduriforme.	28
Figura 5 – Biossíntese dos aminoácidos essenciais treonina, metionina e lisina em bactérias.....	30
Figura 6 – Reação catalisada pela Homoserina Desidrogenase.....	31
Figura 7 – Alinhamento da sequência de aminoácidos da PbHSD e da PHSD. O alinhamento foi realizado com o uso do software MultAlin (CORPET, 1988).	31
Figura 8 – Sítio de múltipla clonagem do vetor de expressão pET-SUMO construído.	34
Figura 9 – DNA codificante da proteína PbHSD com os sítios de restrição da EcoRI e da XhoI.	35
Figura 10 - Sequência do cDNA da proteína SUMO fusionada à proteína homoserina desidrogenase.	40
Figura 11 – Estrutura primária da proteína PbHSD fusionada à proteína SUMO.....	42
Figura 12 – Estrutura primária da proteína PbHSD-his isolada.....	43
Figura 13 – a) Curva de absorção molar do NAD ⁺ e do NADH em função do comprimento de onda incidido. b) Conversão do NAD ⁺ em NADH.	47

- Figura 14 – Gel de agarose 0,8 % referente a PCR realizada em um gradiente de temperatura para determinação da melhor temperatura de anelamento. 1: Marcador de massa molecular 1kb DNA *ladder* (Sinapse Inc). 2 a 6: DNA referente à HSD do *P. brasiliensis* amplificado nas temperaturas de anelamento de 60,0; 63,6; 66,7; 71,1 e 78,0 °C, respectivamente.....50
- Figura 15 – Gel de agarose 0,8 % referente à amplificação do DNA codificante da *PbHSD*. 1: Marcador de massa molecular 1kb DNA *ladder* (Sinapse Inc). 2: DNA referente à HSD do *P. brasiliensis* amplificado na temperatura de 60,0 °C.51
- Figura 16 – Gel de agarose 0,8 % referente a reação de digestão a 37 °C por 16 h. 1: Marcador de massa molecular 1kb DNA *ladder* (Sinapse Inc). 2: DNA referente à HSD do *P. brasiliensis* digerido. 3: DNA referente ao vetor pET-SUMO digerido.....52
- Figura 17 – Alinhamento da sequência da *PbHSD* inserida no vetor pET-SUMO com os resultados do sequenciamento. Sequência *forward* (5'→3') (*seqfwr*) e *reverse* (3'→5') (*seqrev*). As caixas em verde mostram os códons de iniciação e de terminação.....53
- Figura 18 – SDS-PAGE 15 % referente à expressão da proteína his-SUMO-*PbHSD*-his em *E. coli* utilizando o vetor pET-SUMO com indução à 12 °C por 72 h com adição de 0,1 mmol L⁻¹ de IPTG do experimento 1. a: Marcador de massa molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Thermo Fisher Scientific Inc.). b: Sobrenadante proveniente da lise celular com 0 h de indução c: Sobrenadante proveniente da lise celular com 72 h de indução.....54
- Figura 19 - Cromatograma referente à primeira etapa de purificação da amostra obtida da expressão da proteína his-SUMO-*PbHSD*-his em *E. coli* utilizando o vetor pET-SUMO com indução por 0,1 mmol L⁻¹ de IPTG à 12 °C por 72 h do experimento 1. Tampão de ligação: Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, NaCl 500 mmol L⁻¹, imidazol 20 mmol L⁻¹ e glicerol 10 %, pH 7,4. Tampão de eluição: Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, NaCl 300 mmol L⁻¹, imidazol 300 mmol L⁻¹ e glicerol 10 %, pH 7,4. Coluna: coluna *HisTrap*[™] FF (GE Healthcare Life Sciences) com Co²⁺ imobilizado.56
- Figura 20 - SDS-PAGE 15 % referente à primeira etapa de purificação da proteína his-SUMO-*PbHSD*-his expressa em *E. coli* utilizando o vetor pET-SUMO com

indução por 0,1 mmol L ⁻¹ de IPTG à 12 °C por 72 h do experimento 1. a: Marcador de massa molecular <i>Unstained Protein Molecular Weight Marker</i> (Thermo Fisher Scientific Inc.). b: Frações 1 a 31 da cromatografia de afinidade. c: Frações 42 a 74 da cromatografia de afinidade.	57
Figura 21 - SDS-PAGE 15 % referente à reação de clivagem das proteínas fusionadas his-SUMO- <i>PbHSD</i> -his pela SUMO protease, e purificada previamente por cromatografia de afinidade do experimento 1. a: Marcador de massa molecular <i>Unstained Protein Molecular Weight Marker</i> (Thermo Fisher Scientific Inc.). b: Descarte da etapa de concentração do eluato. c: Produto da reação de clivagem realizada pela SUMO protease.....	58
Figura 22 – Cromatograma referente à segunda etapa de purificação da <i>PbHSD</i> -his expressa em <i>E. coli</i> utilizando o vetor pET-SUMO aplicando cromatografia de exclusão molecular do experimento 1. Tampão empregado: Tris-HCl 50 mmol L ⁻¹ , NaCl 150 mmol L ⁻¹ e glicerol 10 %, pH 7,4. Fluxo do tampão 0,5 mL min ⁻¹ . Coluna: <i>HiLoad</i> 16/600 Superdex 75 pg.....	59
Figura 23 - SDS-PAGE 15 % referente à segunda etapa de purificação da proteína <i>PbHSD</i> -his expressa em <i>E. coli</i> utilizando o vetor pET-SUMO com indução por 0,1 mmol L ⁻¹ de IPTG à 12 °C por 72 h, purificada previamente por cromatografia de afinidade e clivada pela proteína SUMO protease do experimento 1. a: Marcador de massa molecular <i>Unstained Protein Molecular Weight Marker</i> (Thermo Fisher Scientific Inc.). b, c, d e e: Frações 3, 13, 22 e 28 da cromatografia de exclusão molecular, respectivamente.	60
Figura 24 – Espectros de CD da <i>PbHSD</i> -his em diferentes concentrações no tampão Tris-HCl 50 mmol L ⁻¹ , NaCl 150 mmol L ⁻¹ e glicerol 10 %, pH 7,4, diluído 60 vezes em água deionizada, referentes ao experimento 1. a) Espectro da elipticidade em função do comprimento de onda. b) Espectro da elipticidade molar residual em função do comprimento de onda.....	61
Figura 25 – Espectros de fluorescência da <i>PbHSD</i> -his na concentração de 0,033 mg mL ⁻¹ em tampão Tris-HCl 50 mmol L ⁻¹ , NaCl 150 mmol L ⁻¹ e glicerol 10 %, pH 7,4, na presença de diferentes concentrações de ureia (0 a 8 M) referentes ao experimento 1.....	64

Figura 26 - Desnaturação da <i>PbHSD</i> -his na concentração de 0,033 mg mL ⁻¹ em tampão Tris-HCl 50 mmol L ⁻¹ , NaCl 150 mmol L ⁻¹ e glicerol 10 %, pH 7,4, em função do aumento da concentração de ureia (de 0 a 8 M).	65
Figura 27 - Espectros de fluorescência da <i>PbHSD</i> -his na concentração de 0,033 mg mL ⁻¹ em tampão NaC ₂ H ₃ O ₂ 20 mmol L ⁻¹ , Na ₂ B ₄ O ₇ . 10 H ₂ O 20 mmol L ⁻¹ , NaH ₂ PO ₄ 20 mmol L ⁻¹ , NaCl 150 mmol L ⁻¹ e glicerol 10 %, na presença de diferentes pH (2 a 12) referentes ao experimento 1.	66
Figura 28 - Estabilidade da <i>PbHSD</i> -his na concentração de 0,033 mg mL ⁻¹ em tampão NaC ₂ H ₃ O ₂ 20 mmol L ⁻¹ , Na ₂ B ₄ O ₇ . 10 H ₂ O 20 mmol L ⁻¹ , NaH ₂ PO ₄ 20 mmol L ⁻¹ , NaCl 150 mmol L ⁻¹ e glicerol 10 %, em função da variação do pH do tampão (de 2 a 12).	67
Figura 29 – Desnaturação térmica da <i>PbHSD</i> -his na concentração de 1,160 mg mL ⁻¹ no tampão NaH ₂ PO ₄ 50 mmol L ⁻¹ e NaCl 100 mmol L ⁻¹ , pH 7,4, referente ao experimento 1.....	68
Figura 30 - Efeito do pH sobre a atividade da enzima <i>PbHSD</i> -his 15 nM em tampão Tris-HCl/carbonato-bicarbonato 100 mM na presença de NADP ⁺ 90 µM e L-homoserina 300 µM. Cada ponto representa a média de duas determinações com os respectivos desvio-padrão. A linha vermelha representa o ajuste de uma equação gaussiana.....	69
Figura 31 – Variação na taxa de produção de NADPH pela <i>PbHSD</i> -his 0,6 µg mL ⁻¹ em função da concentração de L-homoserina em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 9,0 na presença de NADP ⁺ 0,09 mM. Cada ponto representa a média das repetições com as respectivas barras de erro. A linha vermelha representa o melhor ajuste da equação de Hill aos pontos experimentais.....	70
Figura 32 – Gráfico de Lineweaver-Burk da <i>PbHSD</i> -his para a produção de NADPH pela <i>PbHSD</i> -his 0,6 µg mL ⁻¹ em função da concentração de L-homoserina em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 9,0 na presença de NADP ⁺ 0,09 mM. ...	71
Figura 33 - Efeito da concentração de L-treonina de sobre a atividade da <i>PbHSD</i> -his 20 µM. Tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,5, 25 °C. Foi avaliada a reação reversa HSE→ASA na presença de 90 µM de NADP ⁺ e 150 µM de HSE. Cada ponto representa a média de duas repetições com as respectivas barras de erro. A linha vermelha representa o melhor ajuste da equação de Hill aos pontos experimentais.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Medicamentos mais utilizados em pacientes com paracoccidioidomicose	26
Tabela 2 – Homoserina desidrogenases com estruturas cristalográficas resolvidas depositadas no PDB. Os dados de cobertura e identidade das estruturas cristalográficas resolvidas em relação a homoserina desidrogenase de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> foram gerados pelo software Swiss-model (WATERHOUSE <i>et al.</i> , 2018).....	32
Tabela 3 – Primers <i>foward</i> e <i>reverse</i> e suas propriedades.	35
Tabela 4 – Protocolo e programa utilizados na PCR para a amplificação do cDNA referente à <i>PbHSD</i>	37
Tabela 5 – Protocolos para a reação de digestão do DNA alvo e vetor.	38
Tabela 6 – Protocolo para a reação de ligação inserto-vetor.	39
Tabela 7 – Protocolo para realização da análise do efeito do pH na cinética enzimática.	48
Tabela 8 – Predição da estrutura secundária da proteína <i>PbHSD</i> -his a partir do espectro de CD em tampão Tris-HCl 50 mmol L ⁻¹ , NaCl 150 mmol L ⁻¹ e glicerol 10 %, pH 7,4, diluído 60 vezes em água deionizada, obtida com o uso do CDNN CD <i>Spectra Deconvolution Software</i>	62
Tabela 9 - Predição da estrutura secundária da proteína <i>PbHSD</i> -his a partir da sequência de aminoácidos por diferentes <i>softwares</i>	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico codificante
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ATP	Adenosina trifosfato
PDB	Banco de dados de proteínas
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
CAQI	Central de Análises Químicas Instrumentais
FPLC	Cromatografia líquida de proteína rápida
DO	Densidade ótica
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
CD	Dicroísmo circular
DTT	Ditiotreitol
Dr.	Doutor
EM	Emissão
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EX	Excitação
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
Fw	<i>Foward</i>
his-SUMO- <i>PbHSD</i> -his	Proteína recombinante homoserina desidrogenase de <i>Paracoccidioides brasilienses</i> fusionada a proteína SUMO
HSD	Homoserina desidrogenase
<i>PbHSD</i>	Homoserina desidrogenase de <i>Paracoccidioides brasilienses</i>
<i>PbHSD</i> -his	Proteína recombinante homoserina desidrogenase de <i>Paracoccidioides brasilienses</i> isolada
<i>PHSD</i>	Homoserina desidrogenase de <i>Paracoccidioides lutzii</i>
IFSC	Instituto de Física de São Carlos
IQSC	Instituto de Química de São Carlos
IPTG	Isopropil-tiogalactosídeo
LB	Luria-Bertani
<i>Pb - P. brasiliensis</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>PI - P. lutzii</i>	<i>Paracoccidioides lutzii</i>

PCM	Paracoccidioidomicose
Prof.	Professor
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Rv	<i>Reverse</i>
SUMO	<i>Small ubiquitin modifying protein</i>
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
SOD	<i>Super optimal broth</i>
TAE	Tampão Tris-Acetato- ácido etilenodiamino tetra-acético
USP	Universidade de São Paulo
HIV	Vírus da imunodeficiência humana

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo dos aminoácidos

Código (1 letra)	Código (3 letras)	Aminoácido
E	Glu	Ácido glutâmico
A	Ala	Alanina
R	Arg	Arginina
N	Asn	Asparagina
D	Asp	Aspartato
C	Cys	Cisteína
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
Q	Gln	Glutamina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
L	Leu	Leucina
K	Lys	Lisina
M	Met	Metionina
P	Pro	Prolina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
W	Trp	Triptófano
Y	Tyr	Tirosina
V	Val	Valina

Outros simbolo

$\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$	Acetato de sódio
HCl	Ácido clorídrico
H_2O	Água
α	Alfa
β	Beta
KCl	Cloreto de potássio
MgCl_2	Cloreto de magnésio
NaCl	Cloreto de sódio

Co	Cobalto
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sódio monobásico
Nm	Nanômetro
Pb	Pares de bases
pI	Ponto isoelétrico
pH	Potencial hidrogeniônico
kDa	Quilo Dalton
Kb	Quilo pares de bases
Rpm	Rotação por minuto
Na ₂ B ₄ O ₇	Tetraborato de sódio
U	Unidade
x	Vezez

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
1.1. Paracoccidioidomicose	22
1.2. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	27
1.3. Homoserina desidrogenase	29
1.4. Objetivos.....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1. Organismo hospedeiro, vetor, primers e inserto	34
3.2. Subclonagem do inserto codificante da proteína Homoserina Desidrogenase em vetor de expressão pET-SUMO	36
3.2.1. Preparação do vetor pET-SUMO e do DNA codificante da proteína Homoserina Desidrogenase	36
3.2.2. Amplificação do cDNA da proteína Homoserina Desidrogenase por Reação em Cadeia da Polimerase	36
3.2.3. Digestão do DNA codificante da proteína Homoserina Desidrogenase e do vetor pET-SUMO	38
3.2.4. Ligação do DNA codificante da proteína Homoserina Desidrogenase ao vetor pET-SUMO	39
3.2.5. Transformação em células de <i>Escherichia coli</i> DH5 α quimicamente competentes.....	39
3.2.6. Preparação do pré-inóculo e purificação do plasmídeo transformante.....	40
3.2.7. Sequenciamento do DNA recombinante a partir do pET-SUMO:: <i>PbHSD</i>	40
3.3. Expressão heteróloga da proteína Homoserina Desidrogenase em <i>Escherichia coli</i> 41	
3.3.1. Transformação em células de <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) quimicamente competentes e preparação do pré-inóculo	41
3.3.2. Indução com o uso de isopropil-tiogalactosídeo	41
3.3.3. Lise das células	41

3.4.	Purificação da proteína Homoserina Desidrogenase.....	42
3.4.1.	Primeira etapa de purificação utilizando cromatografia de afinidade.....	42
3.4.2.	Clivagem da proteína SUMO fusionada à proteína Homoserina Desidrogenase	43
3.4.3.	Segunda etapa de purificação utilizando cromatografia de exclusão molecular.....	44
3.5.	Caracterização da proteína Homoserina Desidrogenase	44
3.5.1.	Análise estrutural por Espectroscopia de Dicroísmo Circular	44
3.5.2.	Análise da estabilidade por Espectroscopia de Emissão de Fluorescência.....	45
3.5.2.1.	Análise da estabilidade química frente a variação de ureia.....	45
3.5.2.2.	Análise da estabilidade química frente a variação de pH	45
3.5.3.	Análise da estabilidade térmica por Calorimetria Diferencial de Varredura	46
3.5.4.	Estudo da atividade enzimática por Espectrometria de Absorção Molecular no UV/Vis	46
3.5.4.1.	Análise do efeito do pH na cinética enzimática	47
3.5.4.2.	Determinação do K_M e do V_{MAX}	48
3.5.4.3.	Análise da inibição enzimática com o uso de L-Treonina.....	48
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1.	Subclonagem do DNA codificante da proteína Homoserina Desidrogenase em vetor pET-SUMO.....	50
5.1.1.	Amplificação do cDNA da proteína Homoserina Desidrogenase por Reação em Cadeia da Polimerase	50
5.1.2.	Digestão do DNA codificante da proteína Homoserina Desidrogenase e do vetor pET-SUMO.....	51
5.1.3.	Ligação do DNA codificante da proteína Homoserina Desidrogenase ao vetor pET-SUMO e purificação do plasmídeo transformante	52
5.1.4.	Sequenciamento do DNA codificante a partir do plasmídeo pET-SUMO:: <i>PbHSD</i>	52

5.2.	Expressão heteróloga da proteína Homoserina Desidrogenase em <i>Escherichia coli</i>	54
5.3.	Purificação da proteína Homoserina Desidrogenase.....	55
5.3.1.	Primeira etapa de purificação utilizando cromatografia de afinidade.....	55
5.3.2.	Clivagem da proteína SUMO fusionada à proteína Homoserina Desidrogenase	57
5.3.3.	Segunda etapa de purificação utilizando cromatografia de exclusão molecular.....	58
5.4.	Caracterização da proteína Homoserina Desidrogenase	60
5.4.1.	Análise estrutural por Espectroscopia de Dicroísmo Circular	60
5.4.2.	Análise da estabilidade por Espectroscopia de Emissão de Fluorescência.....	63
5.4.2.1.	Análise da estabilidade química frente a variação de ureia.....	63
5.4.2.2.	Análise da estabilidade química frente a variação de pH	66
5.4.3.	Análise da estabilidade térmica por Calorimetria Diferencial de Varredura	68
5.4.4.	Estudo da atividade enzimática por Espectroscopia de Absorção Molecular no UV/Vis	69
5.4.4.1.	Análise do efeito do pH na cinética enzimática	69
5.4.4.2.	Determinação do K_M e do V_{MAX}	70
5.4.4.3.	Análise da inibição enzimática com o uso de L-Treonina.....	71
6.	CONCLUSÕES.....	73
7.	PLANOS FUTUROS.....	74
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
	APÊNDICE A – Teste realizados no refinamento do protocolo de expressão e purificação da homoserina desidrogenase de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	79
	APÊNDICE B – Artigo publicado	81

1. INTRODUÇÃO

1.1. Paracoccidioidomicose

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose granulomatosa sistêmica, descrita pela primeira vez em 1908 por Adolpho Lutz, cujos agentes etiológicos são *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*) e *Paracoccidioides lutzii* (*P. lutzii*), duas espécies de fungos termodimórficos. A espécie *P. lutzii* só foi identificada como agente causador da PCM em 2006, por anos acreditou-se que o único agente envolvido era a espécie *P. brasiliensis*, por este motivo grande parte das informações sobre ecoepidemiologia, infecção e doença não fazem distinção entre as duas espécies. (MARTINEZ, 2017)

A PCM é a mais importante infecção fúngica na América Latina e um importante problema de saúde pública no Brasil. A prevalência da micose é estimada tendo como base levantamentos epidemiológicos, séries de casos, registros de hospitalização e dados de mortalidades. Em áreas endêmicas a incidência de novos casos varia de 3 a 4 novos casos por 1 milhão de habitantes por ano até 1 a 3 novos casos por 100.000 habitantes por ano. (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017)

Cerca de 80 % dos pacientes adquiriram a doença no Brasil, os demais adquiriram predominantemente em outros países da América do Sul, em destaque na Argentina, Colômbia, Venezuela e Equador. De 1986 a 2006, foram documentados 1.853 casos de morte relacionadas à PCM no Brasil, representando 51% das mortes por infecção fúngica sistêmica. (MARTINEZ, 2017)

A Figura 1 apresenta as áreas endêmicas da PCM na América Latina.

Figura 1 – Áreas geográficas endêmicas de paracoccidioidomicose na América Latina: (■) primeiras áreas reconhecidas com alta endemicidade; (■) Alta endemicidade observada desde as últimas décadas do século 20; (■) área com recente evidência do crescimento endêmico; (■) áreas com moderada endemicidade; (■) baixa endemicidade; (□) Sem áreas endêmicas ou raro casos reportados nesses países ou regiões.

Fonte: MARTINEZ, 2017.

A infecção por PCM é adquirida principalmente nas duas primeiras décadas de vida, com máxima incidência entre 10 e 20 anos de idade. Entretanto, não é comum manifestações clínicas ou a evolução da infecção para a doença nesta faixa etária. A doença ocorre com mais frequência em adultos entre 30 e 50 anos de idade. Estima-se que apenas 10% dos casos ocorram em indivíduos abaixo dos 20 anos de idade. Na infância, a frequência de casos é similar em ambos os gêneros, porém na fase adulta, a frequência aumenta para 15 homens por 1 mulher. (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017)

O maior fator de risco para aquisição da infecção é a atuação em uma profissão ou atividade relacionada ao manejo de solo contaminado com o fungo, como agricultura, terraplanagem, preparação de solo, jardinagem e transporte de produtos vegetais. O consumo de álcool, em quantidades superiores a 50 g por dia, e o hábito de fumar, em quantidades superiores a 20 cigarros por dia por mais de 20 anos, também se apresentam como fatores de risco para o desenvolvimento da forma crônica de micoses. Casos de PCM também foram associados às infecções por HIV, câncer e, com menos incidência, transplantes de órgãos e uso de imunobiológicos. Tais relações foram evidenciadas pois os agentes etiológicos da PCM podem atuar como oportunistas em indivíduos com baixa imunidade, porém, trata-se de uma doença não contagiosa. (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017)

A PCM pode comprometer qualquer órgão, aparelho ou sistema, e a variedade de sintomas dificulta sua classificação. Segundo o Colóquio Internacional de Paracoccidioidomicose realizado em fevereiro de 1986 em Medellín, Colômbia, a PCM é classificada de acordo com as formas clínicas da seguinte maneira:

- I. Paracoccidioidomicose infecciosa
- II. Paracoccidioidomicose (doença)
 - A. Forma aguda/subaguda (jovens)
 - Moderada
 - Grave
 - B. Forma crônica (adultos)
 - Leve
 - Moderada
 - Grave
- III. Forma residual ou sequela

A forma aguda progride rapidamente através do sistema linfático e hematopoiético e tem uma alta taxa de mortalidade, pois compromete o sistema reticulo-endotelial. A forma crônica progride lentamente e afeta principalmente os pulmões, porém pode se desenvolver de forma multifocal, se alastrando para

qualquer órgão, especialmente o mucocutâneo. Alguns dos sintomas apresentados por um paciente que possui PCM são insônia, fraqueza, falta de apetite, disfagia, dispneia, tosse, hemoptise, febre, perda de peso, prurido e pirose. (BAGATIN *et al.*, 2017)

A evolução da infecção para a doença depende primordialmente do ambiente de citocinas gerado pela interação do fungo com os macrófagos do sistema imunológico do hospedeiro, como apresentado na

Figura 2. (FORTES *et al.*, 2011)

Figura 2 - Microambientes de citocinas decorrentes da interação entre *P. brasiliensis* e fagócito mononuclear

Fonte: FORTES *et al.*, 2011.

A infecção é contida em hospedeiros saudáveis pela resposta eficiente do sistema imunológico, evidenciada pela produção de mediadores inflamatórios do tipo Th1. Já a indução precoce dos mediadores anti-inflamatórios pelo fungo pode levar a diminuição da atividade do sistema imunológico do hospedeiro, o que possibilita o

alastramento da infecção. Em geral, a doença se desenvolve quando o sistema imunológico do hospedeiro não é capaz de produzir a quantidade necessária de mediadores inflamatórios do tipo Th1, o que leva a produção de mediadores inflamatórios do tipo Th2 que não são eficientes no combate da infecção por *P. brasiliensis*. (FORTES *et al.*, 2011)

O primeiro fármaco eficaz para o tratamento da PCM que teve sua aplicabilidade comprovada em 1940 foi a sulfapiridina e o segundo foi a anfotericina B com aplicabilidade comprovada em 1958. O segundo estando até hoje entre os medicamentos mais utilizados para o tratamento da PCM como mostrado na Tabela 1 porém seu uso é dificultado pela necessidade de longos períodos de internação hospitalar, já que a anfotericina B possui administração intravenosa, e pela toxicidade, sendo organodepositária nos rins e fígado. (MENDES *et al.*, 2017 e SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2018)

Tabela 1 – Medicamentos mais utilizados em pacientes com paracoccidioidomicose

Medicamento	Dose	Duração média
Itraconazol*	200mg diários **Crianças com <30 kg e >5 anos – 5 a 10mg/kg/dia; ajustar dose sem abrir a cápsula	9-18 meses
Cotrimoxazol*	Trimetoprim, 160mg + Sulfametoxazol, 800mg (VO 8/8 h ou 12/12h) Crianças – trimetoprim, 8 a 10mg/kg Sulfametoxazol, 40 a 50mg/kg, VO 12/12 h	18-24 meses***
Anfotericina B	Desoxicolato, 0,5 a 0,7 mg/kg/dia Formulações lipídicas, 3 a 5 mg/kg/dia	2-4 semanas**** (até melhora)

Nota:

* Não usar concomitantemente com astemizol, antiácidos e bloqueadores de receptor H₂, barbitúricos, cisapride, ciclosporina, didanosina, digoxina, fentanil, fenitoína, rifampicina, cisaprida e terfenadina.

** Maior experiência em crianças – com sulfametoxazol/trimetoprim.

*** Prolongar a duração do tratamento quando há envolvimento de sistema nervoso central.

**** Requer tratamento de manutenção com itraconazol ou cotrimoxazol.

Fonte: SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2018.

Ainda não há fármacos específicos para o tratamento de PCM e o tratamento se mantém limitado a alguns grupos de agentes antifúngicos, três desses agentes são mostrados na Tabela 1. A resistência do fungo aos fármacos normalmente utilizados no tratamento se tornou um problema de saúde pública. O período prolongado de tratamento e os efeitos adversos dos fármacos disponíveis levam pacientes a abandonar o tratamento, o que pode acarretar no surgimento de variantes mais resistentes do fungo e de infecções por microrganismos oportunistas. E aqueles

pacientes que se submetem ao tratamento podem apresentar sequelas pulmonares causadas pelos fármacos atualmente empregados. Tais fatos comprovam a importância de se pesquisar novos fármacos e identificar novos alvos farmacológicos que possam ser mais específicos para o tratamento da PCM. (BAGATIN *et al.*, 2017)

1.2. *Paracoccidioides brasiliensis*

Ambos agentes etiológicos da PCM são classificados como organismo da seguinte maneira: Super reino: *Eukaryota*, Reino: *Fungi*, Sub reino: *Dikarya*, Filo: *Ascomycota*, Sub filo: *Pezizomycotina*, Classe: *Eurotiomycetes*, Ordem: *Onygenales*, Sub ordem: *Onygenales incertae sedis*, Família: *Ajellomycetaceae*, Gênero: *Paracoccidioides*.

Os fungos *P. brasiliensis* e *P. lutzii* se desenvolvem no ambiente na forma de estruturas filamentosas, a infecção se dá pela inalação dos propágulos produzidos pelo fungo nesta fase, estes propágulos são denominados conídios. Já no hospedeiro, os conídios evoluem para a forma de levedura do fungo, sendo esta a forma parasitária do microrganismo, como mostrado na Figura 3. (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017).

Figura 3 - Propagação de *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) e *Paracoccidioides lutzii* (Pl)

Fonte: SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2018.

As diferentes morfologias da *P. brasiliensis* observadas no ciclo evolutivo da PCM se dão por causa do termodimorfismo do fungo, isto é, o crescimento do microrganismo se dá em diferentes formas morfológicas de acordo com a temperatura em que o microrganismo se encontra submetido. As diferentes formas morfológicas da *P. brasiliensis* a 25 °C, temperatura ambiente, e a 37 °C, temperatura corporal dos hospedeiros, são apresentados na Figura 4. (DESJARDINS *et al.*, 2011)

Figura 4 – Morfologia do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. a) Morfologia microscópica à 25 °C: forma filamentosa. b) Morfologia macroscópica à 25 °C: forma filamentosa. c) Morfologia microscópica à 37 °C: forma leveduriforme. d) Morfologia macroscópica à 37 °C: forma leveduriforme.

Fonte: CRUZ, [20--].

O identificador de táxon da *P. brasiliensis* é 121759 e o da *P. lutzii* é 1048829. A *P. brasiliensis* possui duas cepas a *Pb18* e a *Pb03* que possuem um genoma de 30,0 Mb e 29,1 Mb, respectivamente, com aproximadamente 96% de similaridade entre si, já a *P. lutzii* possui um genoma de 32,9 Mb com aproximadamente 90% de

similaridade com os genomas das cepas da *P. brasiliensis*. (DESJARDINS *et al.*, 2011)

1.3. Homoserina desidrogenase

As homoserinas desidrogenase (HSD) são enzimas pertencentes a classe das oxidoredutases, seu *Enzyme Commission number* é EC: 1.1.1.3, que atuam na via metabólica responsável pela síntese dos aminoácidos treonina (Thr), metionina (Met) e lisina (Lys), no metabolismo de fungos, bactérias e plantas.

A via metabólica do aspartato, da qual a HSD faz parte, não está presente no metabolismo humano o que torna os aminoácidos treonina, metionina e lisina, três dos nove aminoácidos essenciais de humanos, os quais devem ser obtidos pela dieta. Consequentemente, a HSD não é encontrada em humanos, o que a torna um alvo com grande potencial para o desenvolvimento de fármacos específicos e com menores efeitos adversos para o tratamento de doenças fúngicas e bacterianas (BAGATIN *et al.*, 2017).

A via de biossíntese desses aminoácidos é mostrada a seguir:

Figura 5 – Biossíntese dos aminoácidos essenciais treonina, metionina e lisina em bactérias.

Fonte: Adaptada de NELSON e COX, 2014.

A reação catalisada pela homoserina desidrogenase é reversível como mostrada na Figura 6.

Figura 6 – Reação catalisada pela Homoserina Desidrogenase.

Fonte: BAGATIN *et al.*, 2017.

A homoserina desidrogenase da *P. brasiliensis* (*PbHSD*) possui 372 resíduos de aminoácidos e uma massa molecular de 39,36763 kDa, um *pI* teórico de 6,85 e um coeficiente de extinção molar teórico de $36900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

A *PbHSD* possui o mesmo tamanho que a homoserina desidrogenase da *P. lutzii* (*PHSD*), diferenciando-se por possuírem sete aminoácidos distintos, como pode ser visto na Figura 7.

Figura 7 – Alinhamento da sequência de aminoácidos da *PbHSD* e da *PHSD*. O alinhamento foi realizado com o uso do software MultAlin (CORPET, 1988).

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
seqPbHSD	MSGKTIYLGIVGVGGVGAHFLTQLSRLPNAPSLVLLARSSQTVTSPAPSYSPATIPSDHQSAFSTSSASYSYTGSGAHPDQIAYLSKAPGRAVLVONTSDPTVADAYPLFLSKGISTIVTPNKKAFSSSF													
seqPHSD	MSGKTIYLGIVGVGGVGAHFLTQLSRLPNAPSLVLLARSSQTVTSPAPSYSPATIPSDHQSAFSTSSASYSYTGSGAHPDQIAYLSKAPGRAVLVONTSDPTVADAYPLFLSKGISTIVTPNKKAFSSSF													
Consensus	MSGKTIYLGIVGVGGVGAHFLTQLSRLPNAPSLVLLARSSQTVTSPAPSYSPATIPSDHQSAFSTSSASYSYTGSGAHPDQIAYLSKAPGRAVLVONTSDPTVADAYPLFLSKGISTIVTPNKKAFSSSF													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
seqPbHSD	NLAKNIFNTAASSTSLVYHSTYVAGLPVYSTLRDLVATGDRITRIEGVSGTSLFLN ^S FAPATAQSGVSAQKHSQVY ^A QAKDLGYTEPDPRDNLNGMDVARKVITLARIAGLEVQSPESFPVESLIPA													
seqPHSD	DLAKNIFNTAASSTSLVYHSTYVAGLPVYSTLRDLVATGDRITRIEGVSGTSLFLN ^S FAPATAQSGVSAQKHSQVY ^A QAKDLGFTEPDPRDNLNGMDVARKVITLARIAGLEVQSPESFPVESLIPA													
Consensus	NLAKNIFNTAASSTSLVYHSTYVAGLPVYSTLRDLVATGDRITRIEGVSGTSLFLN ^S FAPATAQSGVSAQKHSQVY ^A QAKDLGFTEPDPRDNLNGMDVARKVITLARIAGLEVQSPESFPVESLIPA													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
seqPbHSD	KLRLTSAAEFMRQLPDFDDQMEAIKQAREAGKIVRYVGRYDVEGKVKYVGLQQFDKDSAIAGLKGSDNIISFYTERYGKNPLIIQGAGAGGAVTANGVTADLIKVLRLH													
seqPHSD	KLRLTSAAEFMRQLPDFDDQMEAIKQAREAGKIVRYVGRYDVEGKVKYVGLQQFDKDSAIAGLKGSDNIISFYTERYGKNPLIIQGAGAGGAVTANGVTADLIKVLRLH													
Consensus	KLRLTSAAEFMRQLPDFDDQMEAIKQAREAGKIVRYVGRYDVEGKVKYVGLQQFDKDSAIAGLKGSDNIISFYTERYGKNPLIIQGAGAGGAVTANGVTADLIKVLRLH													

Fonte: Autoria própria.

As homoserina desidrogenases de *P. brasiliensis* e de *P. lutzii* não possuem estruturas cristalográficas resolvidas. Atualmente há depositadas no banco de dados de proteínas (PDB) as estruturas cristalográficas resolvidas das homoserina desidrogenases dos organismos mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Homoserina desidrogenases com estruturas cristalográficas resolvidas depositadas no PDB. Os dados de cobertura e identidade das estruturas cristalográficas resolvidas em relação a homoserina desidrogenase de *Paracoccidioides brasiliensis* foram gerados pelo software Swiss-model (WATERHOUSE *et al.*, 2018).

Tipo de organismo	Organismo	PDBid	Relação com a <i>PbHSD</i>	
			Cobertura	Identidade
Fungo	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1EBF	0,92	49,43
Bactéria	<i>Thiobacillus denitrificans</i>	3MTJ	0,80	29,08
	<i>Mycobacterium</i>	6DZS	0,80	24,68
	<i>Thermus thermophilus</i>	2EJW	0,78	26,26
	<i>Escherichia coli</i>	6MX1	0,34	27,69
	<i>Staphylococcus aureus</i>	4PG4	0,33	28,80
Arquea	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	4XB1	0,80	24,03
	<i>Thermoplasma acidophilum</i>	3ING	0,80	23,05
	<i>Thermoplasma volcanium</i>	3C8M	0,34	34,09
	<i>Sulfurisphaera tokodaii</i>	4YDR	0,33	35,94

Fonte: Autoria própria.

A homoserina desidrogenase de *Saccharomyces cerevisiae*, dentre as proteínas com estrutura cristalográfica resolvidas e depositadas no PDB, é a que possui maior cobertura e identidade em relação a *PbHSD*. Ela é um homodímero, cada monômero é formado por três regiões distintas, a região de ligação ao nucleotídeo, a região de dimerização e a região de ligação ao substrato, sendo estas descontinuas na sequência primária da proteína. (DELABARRE *et al.*, 2000)

A região de ligação ao nucleotídeo apresenta um motivo de dobramento denominado dobra de Rossmann com uma variação não documentada anteriormente. As dobras identificadas na região de dimerização e de ligação ao substrato não possuíram semelhanças com nenhuma dobra presente nas estruturas depositadas anteriormente no PDB. A interface entre os monômeros é de natureza predominantemente hidrofóbica, os monômeros são conectados por uma rede de ligações de hidrogênio e duas ligações iônicas. Foi evidenciada a presença de um íon metálico, Na⁺, em cada monômero com coordenação octaédrica e o sítio de ligação do íon está localizado na junção entre a região de ligação ao nucleotídeo e a região de dimerização. (DELABARRE *et al.*, 2000)

1.4. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi a expressão heteróloga em *Escherichia coli* (*E. coli*), purificação e caracterização da proteína Homoserina Desidrogenase do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (*PbHSD*), fornecendo assim uma base científica para o desenvolvimento de inibidores específicos para o tratamento da Paracoccidioidomicose, utilizando um protocolo de baixo custo, alto rendimento e rápida realização em comparação com a extração da proteína selvagem diretamente do fungo.

Objetivos específicos:

- Subclonagem no vetor de expressão pET-SUMO
- Superexpressão da proteína *PbHSD* na forma solúvel
- Purificação e isolamento da proteína *PbHSD*
- Caracterização estrutural da proteína *PbHSD* por dicroísmo circular (CD), fluorescência intrínseca do triptofano (Trp) e Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)
- Caracterização funcional por espectrofotometria no UV/Vis

Este trabalho foi realizado em colaboração com o laboratório do Prof. Dr. Flavio Augusto Vicente Seixas, professor associado do Departamento de Tecnologia da Universidade Estadual de Maringá-UEM.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O material de partida experimental empregado neste trabalho foi um plasmídeo recombinante contendo a sequência de DNA que codifica a *PbHSD* de interesse, inserida no vetor de clonagem pUC57. Este plasmídeo recombinante foi sintetizado pela empresa FastBio Ltda e fornecido pelo Prof. Dr. Flavio Augusto Vicente Seixas, professor associado do Departamento de Tecnologia da Universidade Estadual de Maringá-UEM.

3.1. Organismo hospedeiro, vetor, primers e inserto

O organismo hospedeiro utilizado para a expressão da proteína *PbHSD* foi a bactéria *E. coli*, pois esta possui uma cinética de crescimento rápida, fácil alcance de culturas com alta densidade celular, aplicação de meios de cultura complexos ricos de fácil preparo e de baixo custo e uma transformação com DNA exógeno rápida e fácil. (ROSANO e CECCARELLI, 2014)

O vetor utilizado foi o vetor pET-SUMO, gentilmente cedido pelo do Grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas” do Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP), construído a partir da inserção do DNA codificante da proteína SUMO no vetor pET-28a(+) entre os sítios de restrição da *NdeI* e da *BamHI*, este possui 5633 pb. O uso do vetor pET-SUMO leva à expressão da proteína alvo fusionada à proteína SUMO (*small ubiquitin modifying protein*).

O sítio de múltipla clonagem do vetor pET-SUMO construído é mostrado na Figura 8.

Figura 8 – Sítio de múltipla clonagem do vetor de expressão pET-SUMO construído.

Fonte: Autoria própria.

Para possibilitar a clonagem da *PbHSD* neste vetor foram utilizados os *primers* *foward* e *reverse* contendo os sítios de restrição *EcoRI* e *XhoI*, respectivamente, construídos pela Dra. Celia Sulzbacher Caruso, colaboradora do presente trabalho, e sintetizados pela Sigma-Aldrich.

Os primers empregados e suas propriedades estão contidos na Tabela 3.

Tabela 3 – Primers *foward* e *reverse* e suas propriedades.

Primer	Enzima de restrição	Sequência dos primer 5'-3'	Ponto de Fusão (°C)	Conteúdo de CG (%)
Fw <i>PbHSDH</i>	<i>EcoRI</i>	GGCGAATTCATGAGCGGCAAAACCATTT	77,9	46,4
Rv <i>PbHSDH</i>	<i>XhoI</i>	CTTCTCGAGATGCAGGCGTTCCAG	73,8	58,3

Fonte: Autoria própria.

A construção final do inserto codificante da proteína *PbHSD* com os sítios de restrições de interesse possui 1134 pares de bases e é apresentado na Figura 9.

Figura 9 – DNA codificante da proteína *PbHSD* com os sítios de restrição da *EcoRI* e da *XhoI*.

Fonte: Autoria própria.

3.2. Subclonagem do inserto codificante da proteína Homoserina Desidrogenase em vetor de expressão pET-SUMO

3.2.1. Preparação do vetor pET-SUMO e do DNA codificante da proteína Homoserina Desidrogenase

A partir dos estoques do vetor e o do inserto armazenados em células de *E. coli* DH5 α congeladas a -80 °C foram feitos pré-inóculos de 5 mL de meio LB (10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura e 10 g de NaCl em 1 L, pH 7,0) cada. A cada pré-inóculo foi adicionado o volume de antibiótico correspondente à resistência do vetor para uma concentração final de 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ao pré-inóculo do pUC57::PbHSD foi adicionado o antibiótico ampicilina e ao pré-inóculo do pET-SUMO foi adicionado o antibiótico canamicina.

Estes pré-inóculos foram incubados no *shaker* (MAXQ500 – Thermo Fisher Scientific) a 37 °C e 250 rpm, durante a noite, em seguida realizou-se a purificação dos plasmídeos com o uso do GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) e a concentração das amostras foram determinadas no espectrofotômetro DS-11+ (De Novix) do laboratório do Grupo de Estudos em Química Medicinal do Instituto de Química de São Carlos (IQSC/USP).

3.2.2. Amplificação do cDNA da proteína Homoserina Desidrogenase por Reação em Cadeia da Polimerase

Seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante da *Phusion Hot Start II* DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific), enzima empregada na reação em cadeia da polimerase (PCR), foram estabelecidas as quantidades utilizadas de cada reagente para as reações realizadas. Para a determinação da melhor temperatura de anelamento para as PCRs posteriores, foi realizado um teste na qual foram preparados 50 μL de mistura conforme o protocolo, estes foram divididos em 5 alíquotas de 10 μL e cada alíquota foi submetida a uma temperatura distinta de um gradiente de temperatura determinado, a partir dos pontos de fusão dos primers utilizados.

O equipamento utilizado foi o termociclador *MyCycler Thermal Cycler* (BIORad) e o protocolo e programa utilizados estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 – Protocolo e programa utilizados na PCR para a amplificação do cDNA referente à *PbHSD*.

Protocolo			
Reagente		Volume (µL)	Concentração final
Água deionizada		32,5	-
5x <i>Phusion</i> HF Buffer		10	1x
dNTPs 10 mM		1	0,2 mM
Primer Fw 10 µM		2,5	0,5 µM
Primer Rv 10 µM		2,5	0,5 µM
cDNA da <i>PbHSD</i> 286,07 ng µL ⁻¹		0,5	2,9 ng µL ⁻¹
MgCl ₂ 25 mM		0,5	0,25 mM
<i>Phusion Hot Start</i> II DNA Polimerase 2U µL ⁻¹		0,5	0,02 U µL ⁻¹
Total		50 µL	-
Programa			
Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Repetições
Desnaturação inicial	98	30 s	1x
Desnaturação	98	10 s	35x
Anelamento	60,0 - 63,6 - 66,7 - 71,1 - 78,0	30 s	
Extensão	72	30 s	
Extensão final	72	10 min	1x
	4	∞	

Fonte: Autoria própria.

Definida a melhor temperatura, a PCR foi realizada com o mesmo programa. A concentração final de cDNA da *PbHSD* foi alterada para 20,0 ng µL⁻¹, a concentração final de enzima foi aumentada para 0,16 U µL⁻¹ e consequentemente, o volume de água utilizado foi de 126,5 µL, as quantidades dos demais reagentes presentes no protocolo foram aumentadas proporcionalmente para um volume final de reação de 200 µL. As mudanças foram realizadas no intuito de aumentar o rendimento da reação, sem exceder os máximos recomendados pelo fabricante da enzima.

Foram realizadas duas PCR de 200 µL e os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 0,8 % em tampão TAE (Tris-acetato 40 mmol L⁻¹, EDTA 1,0 mmol L⁻¹ e pH 8,0). As amostras aplicadas no gel de agarose consistiram numa mistura 5:1 de DNA em tampão de carregamento *loading* 6x (Tris-HCl 10 mmol L⁻¹, azul de bromofenol 0,03 %, xileno cianol 0,03 %, glicerol 60 %, EDTA 60 mmol L⁻¹ e

pH 7,6), mais 1:10 do corante *BlueGreen* em relação a amostra preparada, o marcador usado foi o 1kb DNA *ladder* (Sinapse Inc). O potencial aplicado foi de 110 V, o gel foi visualizado no fotodocumentador MiniBis pro (DNR *Bio-Imaging Systems*), as bandas purificadas por meio do GeneJET Gel *Extraction Kit* (Thermo Fisher *Scientific*) e a concentração de DNA foi determinada a 260 nm utilizando o espectrofotômetro DS-11+ (De Novix).

3.2.3. Digestão do DNA codificante da proteína Homoserina Desidrogenase e do vetor pET-SUMO

Os protocolos de digestão foram estabelecidos de acordo com as recomendações dos fabricantes das enzimas, as enzimas utilizadas foram a *EcoRI* (Thermo Fisher *Scientific*) e a *XhoI* (BioLabs), o tampão utilizado foi o 10x *Buffer O* (Thermo Fisher *Scientific*), no qual a enzima *EcoRI* possui 100 % de atividade, e que possui a mesma composição do *NEBuffer* 3.1, no qual a enzima *XhoI* possui 100 % de atividade. As reações foram realizadas por 16 h a 37 °C. A enzima *XhoI* foi adicionada no início da reação e a enzima *EcoRI* após 1 h de reação. Os protocolos utilizados estão contidos na Tabela 5.

Tabela 5 – Protocolos para a reação de digestão do DNA alvo e vetor.

PbHSD			pET-SUMO		
Reagente	Volume (μL)	Concentração final	Reagente	Volume (μL)	Concentração final
cDNA 261,67 ng μL ⁻¹	37	193,64 ng μL ⁻¹	DNA 149,87 ng μL ⁻¹	50	107,05 ng μL ⁻¹
10x Buffer O	5	1x	10x Buffer O	7	1x
EcoRI 10000 U mL ⁻¹	5	1 U μL ⁻¹	EcoRI 10000 U mL ⁻¹	3,75	0,54 U μL ⁻¹
XhoI 20000 U mL ⁻¹	2,5	1 U μL ⁻¹	XhoI 20000 U mL ⁻¹	1,875	0,54 U μL ⁻¹
Água deionizada	0,5	-	Água deionizada	7,375	-
Total	50	-	Total	70	-

Fonte: Autoria própria.

Os produtos de digestão foram aplicados em um gel de agarose 0,8 %, purificados e as concentrações foram determinadas como descrito anteriormente.

3.2.4. Ligação do DNA codificante da proteína Homoserina Desidrogenase ao vetor pET-SUMO

A reação de ligação foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido nas recomendações do fabricante da enzima T4 DNA ligase (SigmaAldrich), a 16 °C por 16 h. O protocolo utilizado é mostrado na Tabela 6.

Tabela 6 – Protocolo para a reação de ligação inserto-vetor.

Reagente	Volume (μL)	Concentração final
Água autoclavada	8,4	-
cDNA <i>PbHSD</i> 164,83 ng μL ⁻¹	2,45	20,19 ng μL ⁻¹
DNA pET-SUMO 63,62 ng μL ⁻¹	3,15	10,02 ng μL ⁻¹
10x <i>Ligation Buffer</i>	2	1x
ATP <i>Solution</i> 10 mM	2	1 mM
T4 DNA Ligase 1 U μL ⁻¹	2	0,1 U μL ⁻¹
Total	20	-

Fonte: Autoria própria.

3.2.5. Transformação em células de *Escherichia coli* DH5α quimicamente competentes

Aos 100 μL de células de *E. coli* DH5α quimicamente competentes foram adicionados 10 μL do produto de ligação, e a mistura foi levada ao gelo por 30 min, seguido por 2 min no banho a 42 °C e de novo ao gelo por 3 min. Após o choque térmico, adicionou-se 500 μL de meio LB à mistura e o microtubo foi levado ao *shaker* por 1 h a 37 °C e 200 rpm.

Ao final da 1 h, a mistura foi centrifugada por 2 min na microcentrifuga de velocidade fixa GMCLab™ (Gilson™) a 6000 rpm, 500 μL do sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado nos 100 μL restantes de sobrenadante. As células ressuspensionadas foram plaqueadas utilizando 20 mL de meio LB-ágar (10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 10 g de NaCl e 15 g de ágar em 1 L, pH 7,0) com uma concentração de 30 μg mL⁻¹ do antibiótico canamicina correspondente a

resistência do vetor. A placa foi levada a estufa a 37 °C, durante a noite, para o crescimento das colônias contendo o plasmídeo transformante.

3.2.6. Preparação do pré-inóculo e purificação do plasmídeo transformante

Uma colônia contendo o plasmídeo transformante foi coletada com o auxílio de um palito autoclavado e inoculada em 5 mL de meio LB contendo o antibiótico canamicina numa concentração de 30 µg mL⁻¹. O pré-inóculo foi incubado, o plasmídeo foi purificado e a concentração medida como descrito no item 3.2.1.

3.2.7. Sequenciamento do DNA recombinante a partir do pET-SUMO::PbHSD

O plasmídeo transformante purificado foi sequenciado no sequenciador 310 *Genetic Analyzer (Applied Biosystems)* do Grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas” do Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP) utilizando o método de Sanger automatizado. O resultado obtido foi comparado com a sequência referência da *PbHSD* pelo uso da ferramenta MultAlin, para confirmação da integridade do DNA alvo. Adicionalmente, a sequência do DNA codificante da proteína SUMO fusionada à proteína homoserina desidrogenase também é mostrada na Figura 10.

Figura 10 - Sequência do cDNA da proteína SUMO fusionada à proteína homoserina desidrogenase.

Fonte: Autoria própria.

3.3. Expressão heteróloga da proteína Homoserina Desidrogenase em *Escherichia coli*

3.3.1. Transformação em células de *Escherichia coli* BL21(DE3) quimicamente competentes e preparação do pré-inóculo

Utilizando 2 μL do plasmídeo purificado na concentração de 98,07 ng μL^{-1} foi realizada a transformação em células de *E. coli* BL21(DE3) como descrito no item 3.2.5. Uma colônia crescida foi coletada, com o auxílio de um palito de madeira autoclavado, e inoculada em 20 mL de meio LB contendo o antibiótico canamicina numa concentração de 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o pré-inóculo foi incubado a 30 °C e 250 rpm, durante a noite.

3.3.2. Indução com o uso de isopropil-tiogalactosídeo

O pré-inóculo foi inoculado em 1 L de meio SOB (20 g de triptona, 10 g de extrato de levedura, 5 g de NaCl, 4 g de KCl, 6,4058 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mL de glicerol e 7,88 g de Tris-HCl em 1 L, pH 7,4) com concentração de 30 $\mu\text{L mL}^{-1}$ do antibiótico canamicina e incubado no *shaker* a 250 rpm e 37 °C até que a densidade ótica (DO) alcançasse uma absorbância de 0,6 à 600 nm. Este passo foi monitorado utilizando o espectrofotômetro Biomate3 (Thermo Fisher *Scientific*). Atingida a DO de interesse, foi adicionado ao inóculo isopropil-tiogalactosídeo (IPTG) para uma concentração final de 0,1 mmol L^{-1} e a indução foi conduzida a 12 °C e 250 rpm por 72 h. Ao final da indução, o inóculo foi centrifugado a 8600 rpm e 4 °C por 30 min com o uso da centrífuga CR 21GII (HITACHI) e mantido a -20 °C até a realização da lise das células.

O protocolo utilizado foi baseado na melhora da expressão proteica evidenciada por Zuo *et al.* (2005), aplicando um maior tempo e uma menor temperatura de indução com o uso da tecnologia de fusão SUMO.

3.3.3. Lise das células

Após centrifugação, o precipitado de células foi ressuspendido na proporção de 4 mL de tampão de lise (Tris-HCl 50 mmol L^{-1} pH 7,4, NaCl 300 mmol L^{-1} , Imidazol 20 mmol L^{-1}) para cada 1 g de precipitado obtido, e a lise foi realizada pela adição de PMSF para uma concentração final de 1 mmol L^{-1} , de DNase para uma concentração

final de $0,05 \text{ U L}^{-1}$, de β -Mercaptoetanol para uma concentração final de 1 mmol L^{-1} e de lisozima para uma concentração final de $0,1 \text{ g L}^{-1}$. A solução foi mantida em repouso por 30 min no gelo, posteriormente submetida a sonicação a 20 % de amplitude durante 5 ciclos de 10 s *ON* e 59,9 s *OFF*, utilizando-se o sonicador SONIC Dirmembratos Model 500 (Fisher Scientific) do laboratório do Grupo de Estudos em Química Medicinal do Instituto de Química de São Carlos (IQSC/USP) e ao final centrifugada a 19000 rpm e a 4°C por 1 h. O sobrenadante obtido após centrifugação foi aplicado numa coluna de afinidade.

3.4. Purificação da proteína Homoserina Desidrogenase

A proteína recombinante *PbHSD* fusionada à proteína SUMO (his-SUMO-*PbHSD*-his) possui a estrutura primária apresentada na Figura 11.

Figura 11 – Estrutura primaria da proteína *PbHSD* fusionada à proteína SUMO.

Fonte: Autoria própria.

3.4.1. Primeira etapa de purificação utilizando cromatografia de afinidade

O protocolo utilizado foi baseado naquele descrito por Peroutka *et al.* (2011), para o uso da tecnologia de fusão SUMO para obtenção de uma expressão proteica otimizada.

A purificação da proteína his-SUMO-*PbHSD*-his foi realizada por FPLC (*Fast protein liquid chromatography*) utilizando um cromatógrafo ÄKTApurifier (GE Healthcare Life Sciences) e uma coluna HisTrap™ FF (GE Healthcare Life Sciences) com Co^{2+} imobilizado. Empregou-se um tampão de ligação composto por Tris-HCl 50 mmol L^{-1} , NaCl 500 mmol L^{-1} , imidazol 20 mmol L^{-1} e glicerol 10 %, pH 7,4 e um tampão de eluição composto por Tris-HCl 50 mmol L^{-1} , NaCl 300 mmol L^{-1} , imidazol 300 mmol L^{-1} e glicerol 10 %, pH 7,4. A composição do método utilizado foi:

- 1) 50 mL de tampão de ligação para equilíbrio da coluna
- 2) Injeção da amostra
- 3) 50 mL de tampão de ligação (100 %) para lavagem da coluna
- 4) 50 mL de tampão de ligação (92,9 %) para lavagem, seguido de 7,1 % de tampão de eluição
- 5) 50 mL de tampão de eluição (100 %) para eluição da amostra
- 6) 30 mL de tampão de eluição (100 %) para limpeza da coluna

3.4.2. Clivagem da proteína SUMO fusionada à proteína Homoserina Desidrogenase

A partir da superexpressão das proteínas fusionadas a 12 °C, concentrou-se o eluato da primeira etapa de purificação até se obter uma concentração próxima a 8 mg mL⁻¹ utilizando-se o dispositivo de filtro centrífugo Amicon® Ultra 30K da Merck™ Millipore®.

Após realizada a concentração procedeu-se com a reação de clivagem da proteína para posterior isolamento da proteína *PbHSD*-his. O protocolo foi determinado com base nos manuais de uso da Merck™ Sigma-Aldrich® SUMO Protease, da Thermo Fisher Scientific Inc. Invitrogen™ SUMO Protease e da CoolCutter™ SUMO Protease. A reação foi realizada utilizando-se 2,5 U de SUMO protease da Merck™ Sigma-Aldrich® para cada 1 mg de proteína his-SUMO-*PbHSD*-his na presença de 10 mmol L⁻¹ de ditioneitol (DTT) e incubada a 16 °C por 16h. Após o tempo de incubação, o produto da reação foi aplicado na coluna de exclusão molecular *HiLoad* 16/600 Superdex 75 pg.

Ao final da reação de clivagem, a proteína *PbHSD*-his apresenta a estrutura primária mostrada na Figura 12.

Figura 12 – Estrutura primária da proteína *PbHSD*-his isolada.

SEFMSGKTIYLVIGVGGVGAHFLTQLSRLPNAPSLVLLARSSQTVTSPAPSYSPAIAPSDWQSAFSTSSASYSYQSGAWNPDQIAAYLS
KAPGRAVLVDNTSDPTVADAYPLFLSKGISIVTPNKKAFSSSNLWKNIFNTAASTSSLVYHESVVGAGLPVVSTLRDLVATGDRITRIEG
VFSGTSLFLNFSFAPATAQSGVSAQKWSQVVAQAKDLGYTEPDPRDDLNGMDVARKVTILARIAGLEVQSPESFPVESLIPAKLRGLTS
AAEFMQRLPDFDDQMEAIKNQAEAGKIVRYVGRVDVEGKVVKVGLQQFDKDSAIAGLKGSDNIISFYTERYGKNPLIIQGAGAGGA
VTAMGVATDLIKVLERLHLEHHHHHH

His tag Proteína *PbHSD*

Fonte: Autoria própria.

3.4.3. Segunda etapa de purificação utilizando cromatografia de exclusão molecular

O isolamento da proteína *PbHSD-his* foi realizado por meio de cromatografia de exclusão molecular utilizando uma coluna *HiLoad 16/600 Superdex 75* pg e empregou-se o tampão composto por Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, NaCl 150 mmol L⁻¹ e glicerol 10 %, pH 7,4. A composição do método utilizado foi:

- 1) 240 mL de tampão para o equilíbrio da coluna
- 2) Injeção da amostra
- 3) 180 mL de tampão para eluição da amostra

Tanto as amostras obtidas a partir da expressão heteróloga, quanto as amostras obtidas após purificação, foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, cada amostra foi preparada com a adição de tampão desnaturante (Tris-HCl 0,188 mol L⁻¹ pH 6,8, contendo SDS 6%, EDTA 6 mmol L⁻¹, glicerol 30%, azul de bromofenol 0,01% e β-mercaptoetanol 10%), as misturas foram aquecidas por 5 minutos a 95°C e então cada amostra foi aplicada em uma canaleta do gel. O marcador de massa molecular utilizado foi o *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Thermo Fisher Scientific Inc.), a corrida foi iniciada a 90 V, para passagem das amostras pelo gel de empilhamento, e então terminada a 120 V quando da passagem das amostras pelo gel de resolução. Os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue R* e então descorados para revelação das bandas.

3.5. Caracterização da proteína Homoserina Desidrogenase

3.5.1. Análise estrutural por Espectroscopia de Dicroísmo Circular

A espectroscopia de dicroísmo circular (CD) foi utilizada na caracterização dos elementos de estrutura secundária da *PbHSD-his*, em três diferentes concentrações. Uma amostra da proteína em tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ pH 7,4, NaCl 150 mmol L⁻¹ e glicerol 10 % foi diluída 60 vezes em água deionizada, com o intuito de minimizar a interferência do tampão nas medidas, e então concentrada até as concentrações de interesse com o uso do dispositivo de filtro centrífugo Amicon® Ultra 10K da Merck™ Millipore®.

Realizou-se as medidas nos seguintes parâmetros D.I.T. 0,5 s, *band width* 1,00 nm, *data pitch* 0,5 nm, *scanning speed* 100 nm min⁻¹, de 260 a 190 nm, a 20 °C com 20 acumulações, com o uso de uma cubeta de quartzo com 0,1 cm de caminho ótico. Foi utilizado o espectropolarímetro JASCO J-815 CD *Spectrometer* (JASCO Corporation) da Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) – do Instituto de Química de São Carlos.

3.5.2. Análise da estabilidade por Espectroscopia de Emissão de Fluorescência

As medidas de espectroscopia de emissão de fluorescência foram realizadas no espectrofluorímetro RF-5301PC *Spectrofluorophotometer* (Shimadzu Corporation) da Central de Análises Químicas Instrumentais – CAQI do Instituto de Química de São Carlos.

O espectro de emissão foi obtido usando-se os seguintes parâmetros: *EX wavelength* 295 nm, *EM wavelength range* de 310 a 420 nm, *recording range* de 0 a 50, *sampling interval* 1 nm, *EX slit width* 3 e *EM slit width* 5 e uma cubeta de quartzo com 1,0 cm de caminho ótico.

Os preparos das amostras estão descritos nos subitens a seguir.

3.5.2.1. Análise da estabilidade química frente a variação de ureia

Analisou-se a estabilidade química da *PbHSD-his* na presença de ureia medindo a fluorescência intrínseca do triptofano em tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ pH 7,4, NaCl 150 mmol L⁻¹ e glicerol 10 % nas concentrações de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 M de ureia e na ausência de ureia ao final de 16 h de incubação. A proteína foi utilizada na concentração de 0,033 mg mL⁻¹ em todas as medidas.

3.5.2.2. Análise da estabilidade química frente a variação de pH

Para analisar a estabilidade da *PbHSD-his* em diferentes pH a proteína foi incubada por 16 h em tampão NaC₂H₃O₂ 20 mmol L⁻¹, Na₂B₄O₇. 10 H₂O 20 mmol L⁻¹, NaH₂PO₄ 20 mmol L⁻¹, NaCl 150 mmol L⁻¹ e glicerol 10% nos pH 2, 4, 6, 8, 10 e 12. A concentração da proteína foi de 0,033 mg mL⁻¹, e após o tempo de incubação realizou-se a medida da fluorescência intrínseca dos 4 triptofanos da *PbHSD-his*.

3.5.3. Análise da estabilidade térmica por Calorimetria Diferencial de Varredura

A estabilidade térmica da proteína *PbHSD-his* foi determinada por calorimetria diferencial de varredura (DSC). A proteína foi dialisada em tampão NaH_2PO_4 50 mmol L^{-1} pH 7,4 e NaCl 100 mmol L^{-1} por 20 h sob refrigeração. Após a diálise, a amostra foi centrifugada a 10300 rpm por 10 min para eliminar possível agregação proteica em decorrência da diálise. A concentração de proteína foi mantida próxima a 1 mg mL^{-1} para a realização da medida.

Os parâmetros utilizados foram *scanning* de 20 a 90 °C, *rate* 1 °C min^{-1} , *set pressure* once 3 atm e *data interval* 3 s. A medida foi realizada no Nano DSC (TA Instruments) do laboratório do Grupo de Estudos em Química Medicinal do Instituto de Química de São Carlos (IQSC/USP).

Importante considerar que a expressão, purificação e caracterização da proteína homoserina desidrogenase foi realizada em triplicata para validação da metodologia utilizada.

3.5.4. Estudo da atividade enzimática por Espectrometria de Absorção Molecular no UV/Vis

Todos os experimentos de caracterização descritos neste item foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Flavio Augusto Vicente Seixas, professor associado do Departamento de Tecnologia da Universidade Estadual de Maringá-UEM, por um membro do laboratório supracitado.

As análises foram baseadas na reação abaixo catalisada pela homoserina desidrogenase:

O NADPH absorve em 340 nm, enquanto que o NADP^+ não absorve. Portanto, as reações foram monitoradas em função do aumento da concentração de NADPH (aumento da Abs em 340 nm), considerando assim a reação reversa, dado que o substrato aspartato semialdeído é um composto instável (DELABARRE *et al.* 1998) e que não é vendido comercialmente, necessitando da realização de uma síntese química para sua obtenção.

Figura 13 – a) Curva de absorção molar do NAD⁺ e do NADH em função do comprimento de onda incidido. b) Conversão do NAD⁺ em NADH.

Fonte: HEGYI *et al.*, 2013.

Todos os ensaios foram realizados em um espectrofotômetro de varredura duplo feixe modelo UV1650-PC (Shimadzu, Japan) com temperatura controlada de 25 °C por um banho termostatizado acoplado. Estes foram realizados em duplicata (fez-se a triplicata somente quando a variação dos resultados foi maior que 5 %).

Os reagentes L-homoserina, NADP⁺ e L-treonina foram preparados para uso, nas análises descritas a seguir, por dissolução em tampão Tris-HCl 50 mM. A solução de uso de L-homoserina e de NADP⁺ foi acertada para pH 8,0 e a solução de L-treonina para pH 8,5.

As atividades foram expressas pela taxa de $\Delta\text{Abs}_{340} \text{ tempo}^{-1}$ entre 100 e 300 s.

3.5.4.1. Análise do efeito do pH na cinética enzimática

Um volume de 50 μL da solução estoque de enzima ($\sim 8 \text{ mg mL}^{-1} = 200 \mu\text{M}$) na presença de 100 mM de NaCl, 10 % de glicerol foi diluída em 3 mL de tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 50 mM, pH 8,5 e em seguida concentrada até 350 μL em concentradores Amicon® cut off de 30 KDa, para a troca de tampão e retirada do glicerol. Ao final, a solução estava 7x diluída em relação a solução estoque.

Misturou-se, em um microtubo, 70 μL da enzima diluída 7x e 430 μL do tampão Tris-HCl 50Mm e NaCl 50 mM, pH 8,5, obtendo assim uma solução da enzima diluída 100x em relação a solução estoque. A concentração da enzima nesta solução de uso foi de $\sim 80 \mu\text{g mL}^{-1} = 2 \mu\text{M}$. Esta solução foi então utilizada na realização da análise.

A cinética enzimática foi monitorada no intervalo de pH de 8,0 a 10,5. Para os ensaios em pHs 8,0, 8,5, e 9,0 foi utilizado tampão Tris-HCl 100 mM. Para os ensaios em pHs 9,5, 9,75, 10,0 e 10,5 foi utilizado tampão carbonato-bicarbonato 100 mM.

A análise foi realizada utilizando uma cubeta de quartzo com volume de 1 mL, conforme protocolo mostrado na Tabela 7.

Tabela 7 – Protocolo para realização da análise do efeito do pH na cinética enzimática.

Reagente	Volume (μL)	Concentração final
Tampão 100 mM (pH desejado)	758	98,57 mM
NADP ⁺ 6 mM	12	90 μM
Homoserina 10 mM	24	300 μM
<i>Zerar o espectrofotômetro. Adicionar a enzima</i>		
Enzima $\sim 80 \mu\text{g mL}^{-1}$	6	$\sim 0,6 \mu\text{g mL}^{-1} = 15 \text{ nM}$
<i>Agitar por 10 segundos e apertar start</i>		

Fonte: Laboratório do Prof. Dr. Flavio Augusto Vicente Seixas.

3.5.4.2. Determinação do K_M e do V_{MAX}

Para determinação das constantes K_M e V_{MAX} foi empregada a mesma solução de uso da enzima *PbHSD-his* a $\sim 80 \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizada na análise descrita no item 3.5.4.1.

O ensaio foi realizado em uma cubeta de quartzo de 1 mL em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 9,0, na presença de NADP⁺ 0,09 mM com as seguintes concentrações do substrato L-homoserina: 0,075, 0,150, 0,300, 0,600, 0,900, 1,200, 1,500 e 3,00 mM. Zerou-se o espectrofotômetro e então adicionou-se a enzima *PbHSD-his* para uma concentração final de $0,6 \mu\text{g mL}^{-1}$, agitou-se a solução por 10 s e então iniciou-se a medida.

3.5.4.3. Análise da inibição enzimática com o uso de L-Treonina

Para determinar a atividade da enzima na presença do inibidor, foi monitorada a reação reversa HSE $\rightarrow$ ASA. Para isso, foi adicionado em uma cubeta uma solução contendo 150 μM de L-homoserina, concentração consideravelmente acima da concentração intracelular, 90 μM de NADP⁺, L-treonina (0 a 375 mM), tampão Tris-

HCl 50 mM, pH 8,5 (q.s.p. 800 μ L). Em seguida foi adicionado a enzima (20 μ M) e a variação na absorbância em 340 nm foi mensurada por 360 s.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em testes anteriores realizados pelo mesmo grupo de pesquisa, não foi possível a expressão da homoserina desidrogenase na forma solúvel, empregando os vetores pET28a, pET28GST e pET23a. Dado tais resultados, foi estabelecido uma nova estratégia na tentativa de expressar a proteína heteróloga, utilizando o vetor pET-SUMO, que tem como vantagens a proteção contra degradação, aumento da expressão da proteína recombinante, aprimoramento da solubilidade proteica e purificação e detecção simplificados. (BUTT *et al.*, 2005)

5.1. Subclonagem do DNA codificante da proteína Homoserina Desidrogenase em vetor pET-SUMO

5.1.1. Amplificação do cDNA da proteína Homoserina Desidrogenase por Reação em Cadeia da Polimerase

Após preparo dos pré-inóculos a partir do estoque do vetor e do inserto, realizou-se a purificação dos DNAs de interesse e os mesmos foram quantificados.

Utilizando o plasmídeo recombinante pUC57::*PbHSD* purificado fez-se a amplificação do cDNA da proteína homoserina desidrogenase por meio da PCR. A reação foi eficiente em 4 das 5 temperaturas testadas, como apresentados na Figura 14.

Figura 14 – Gel de agarose 0,8 % referente a PCR realizada em um gradiente de temperatura para determinação da melhor temperatura de anelamento. 1: Marcador de massa molecular 1kb DNA ladder (Sinapse Inc). 2 a 6: DNA referente à HSD do *P. brasiliensis* amplificado nas temperaturas de anelamento de 60,0; 63,6; 66,7; 71,1 e 78,0 °C, respectivamente.

Fonte: Autoria própria.

Foi então escolhida a temperatura de 60 °C para realizar uma nova PCR com um volume de reação suficiente para posterior purificação. O gel desta reação é mostrado na Figura 15.

Figura 15 – Gel de agarose 0,8 % referente à amplificação do DNA codificante da *PbHSD*. 1: Marcador de massa molecular 1kb DNA *ladder* (Sinapse Inc). 2: DNA referente à HSD do *P. brasiliensis* amplificado na temperatura de 60,0 °C.

Fonte: Autoria própria.

Após a purificação, foi realizada a quantificação do cDNA e a amostra correspondente a canaleta 2 apresentou uma concentração de 261,67 ng μL^{-1} . Esta foi então submetida a reação de digestão.

5.1.2. Digestão do DNA codificante da proteína Homoserina Desidrogenase e do vetor pET-SUMO

A reação de digestão foi realizada a 37 °C por 16 h utilizando as enzimas *Xho*I e *Eco*RI, para o produto de PCR e para o vetor pET-SUMO. Os produtos da digestão foram aplicados no gel de agarose 0,8 % (Figura 16).

Figura 16 – Gel de agarose 0,8 % referente a reação de digestão a 37 °C por 16 h. 1: Marcador de massa molecular 1kb DNA *ladder* (Sinapse Inc). 2: DNA referente à HSD do *P. brasiliensis* digerido. 3: DNA referente ao vetor pET-SUMO digerido.

Fonte: Autoria própria.

Os DNAs digeridos foram então purificados. A concentração obtida para o cDNA da *PbHSD* foi de $164,83 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ e a concentração do vetor pET-SUMO de $63,62 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. Prosseguiu-se então com a reação de ligação.

5.1.3. Ligação do DNA codificante da proteína Homoserina Desidrogenase ao vetor pET-SUMO e purificação do plasmídeo transformante

Realizou-se a reação de ligação a 16 °C por 16 h, ao término do período de incubação, o produto da ligação foi então transformado em células DH5 α . A partir de uma colônia proveniente da transformação foi feito um pré-inóculo, para aumentar o número de cópias do plasmídeo recombinante, parte do pré-inóculo foi congelado a -80 °C para estoque e a outra parte foi purificada. A concentração obtida do plasmídeo transformante pET-SUMO::*PbHSD* foi de $98,07 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$.

5.1.4. Sequenciamento do DNA codificante a partir do plasmídeo pET-SUMO::*PbHSD*

O plasmídeo transformante purificado foi submetido ao sequenciamento para analisar a sequência do plasmídeo transformante. As sequências obtidas a partir do sequenciamento foram alinhadas com a sequência do DNA do pET-SUMO::*PbHSD* mostrada na Figura 10. O alinhamento é mostrado na Figura 17.

A superexpressão da proteína, purificação e caracterização foram realizadas em triplicata a partir de três transformações em BL21(DE3) com o intuito de validar a metodologia utilizada para obtenção da proteína recombinante.

5.2. Expressão heteróloga da proteína Homoserina Desidrogenase em *Escherichia coli*

A proteína his-SUMO-*PbHSD*-his contém 504 resíduos de aminoácidos, uma massa molecular de 54,5 kDa, um pI teórico de 6,23 e um coeficiente de extinção molar teórico de $38390 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, determinados com o uso do *software* ProtParam (GASTEIGER, 2005) a partir da sua estrutura primaria.

A proteína his-SUMO-*PbHSD*-his foi obtida por meio de expressão heteróloga com indução por IPTG a 12°C por 72 h. As células bacterianas foram separadas do meio de expressão por centrifugação ao final do período de indução, posteriormente as mesmas foram lisadas em tampão Tris-HCl 50 mmol L^{-1} pH 7,4 e uma amostra do sobrenadante proveniente da lise celular foi aplicado em SDS-PAGE para comprovação da obtenção da proteína na sua forma solúvel, mostrado na Figura 18.

Figura 18 – SDS-PAGE 15 % referente à expressão da proteína his-SUMO-*PbHSD*-his em *E. coli* utilizando o vetor pET-SUMO com indução à 12°C por 72 h com adição de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de IPTG do experimento 1. a: Marcador de massa molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Thermo Fisher Scientific Inc.). b: Sobrenadante proveniente da lise celular com 0 h de indução c: Sobrenadante proveniente da lise celular com 72 h de indução.

Fonte: Autoria própria.

A obtenção da proteína na sua forma solúvel foi efetiva com o protocolo utilizado, procedeu-se então com a primeira etapa de purificação e isolamento da proteína *PbHSD* aplicando o sobrenadante da lise celular em uma coluna cromatográfica de afinidade.

5.3. Purificação da proteína Homoserina Desidrogenase

5.3.1. Primeira etapa de purificação utilizando cromatografia de afinidade

A primeira etapa de purificação foi realizada com o uso de um método constituído de três etapas, a primeira etapa continha uma baixa concentração de imidazol de 20 mmol L⁻¹ possibilitando a ligação da proteína his-SUMO-*PbHSD*-his, porém diminuindo a ligação inespecífica de outras proteínas contidas no sobrenadante da lise celular, a segunda etapa com um aumento da concentração de imidazol para 40 mmol L⁻¹ visando uma lavagem da coluna para a máxima eluição de proteínas ligadas inespecificamente a coluna, a etapa final foi realizada com alta concentração de imidazol (300 mmol L⁻¹) para a eluição da proteína de interesse, respeitando o limite da concentração de imidazol suportado pela SUMO protease, necessária à reação de clivagem realizada após a primeira etapa de purificação.

O cromatograma referente a purificação da proteína his-SUMO-*PbHSD*-his é mostrado na Figura 19.

Figura 19 - Cromatograma referente à primeira etapa de purificação da amostra obtida da expressão da proteína his-SUMO-*PbHSD*-his em *E. coli* utilizando o vetor pET-SUMO com indução por 0,1 mmol L⁻¹ de IPTG à 12 °C por 72 h do experimento 1. Tampão de ligação: Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, NaCl 500 mmol L⁻¹, imidazol 20 mmol L⁻¹ e glicerol 10 %, pH 7,4. Tampão de eluição: Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, NaCl 300 mmol L⁻¹, imidazol 300 mmol L⁻¹ e glicerol 10 %, pH 7,4. Coluna: coluna *HisTrap*™ FF (GE Healthcare Life Sciences) com Co²⁺ imobilizado.

Fonte: Autoria própria.

A eficiência de separação da cromatografia foi comprovada por eletroforese em gel de poliacrilamida de uma amostra do pico do *void* e do eluato como mostrado na Figura 20.

Figura 20 - SDS-PAGE 15 % referente à primeira etapa de purificação da proteína his-SUMO-*PbHSD*-his expressa em *E. coli* utilizando o vetor pET-SUMO com indução por 0,1 mmol L⁻¹ de IPTG à 12 °C por 72 h do experimento 1. a: Marcador de massa molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Thermo Fisher Scientific Inc.). b: Frações 1 a 31 da cromatografia de afinidade. c: Frações 42 a 74 da cromatografia de afinidade.

Fonte: Autoria própria.

Não houve perda da proteína de interesse na primeira etapa de purificação, o que pode ser observado na canaleta b da Figura 20. Ao final da primeira etapa de purificação obteve-se uma quantidade média de $56,9 \pm 9,7$ mg por litro de expressão de proteína his-SUMO-*PbHSD*-his por expressão com indução por 0,1 mmol L⁻¹ de IPTG.

Quarenta miligramas da proteína eluída foi concentrada para uma concentração de 8 mg mL⁻¹, tendo em vista o limite de proteína suportado pela coluna HiLoad 16/600 Superdex 75 pg, o restante da proteína foi armazenado a 4 °C.

5.3.2. Clivagem da proteína SUMO fusionada à proteína Homoserina Desidrogenase

Toda a proteína concentrada foi submetida à reação de clivagem pela proteína SUMO protease para possibilitar o isolamento da proteína *PbHSD*-his, a reação foi realizada a 16 °C por 16 h. A eficiência da clivagem foi comprovada pelo deslocamento da banda da proteína de 54,5 kDa (his-SUMO-*PbHSD*-his), apresentada na Figura 20, para 40,8 kDa (*PbHSD*-his) e pelo surgimento da banda referente a liberação da proteína his-SUMO mostrada na Figura 21.

Figura 21 - SDS-PAGE 15 % referente à reação de clivagem das proteínas fusionadas his-SUMO-*PbHSD*-his pela SUMO protease, e purificada previamente por cromatografia de afinidade do experimento 1. a: Marcador de massa molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Thermo Fisher Scientific Inc.). b: Descarte da etapa de concentração do eluato. c: Produto da reação de clivagem realizada pela SUMO protease.

Fonte: Autoria própria.

A proteína *PbHSD*-his isolada possui 383 resíduos de aminoácidos, uma massa molecular de 40,8 kDa, um pI teórico de 6,50 e um coeficiente de extinção molar teórico de $36900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, determinados com o uso do *software* ProtParam (GASTEIGER, 2005) a partir da sua estrutura primária. Após o tempo de reação, todo o produto foi aplicado em coluna cromatográfica de exclusão molecular para o isolamento da proteína *PbHSD*-his.

5.3.3. Segunda etapa de purificação utilizando cromatografia de exclusão molecular

A segunda etapa de purificação da proteína homoserina desidrogenase foi realizada por meio de cromatografia de exclusão molecular. O método utilizado contou com um fluxo do tampão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, lento o suficiente para a obtenção de uma boa resolução entre os picos. O cromatograma referente a esta etapa é mostrado na Figura 22.

Figura 22 – Cromatograma referente à segunda etapa de purificação da *PbHSD*-his expressa em *E. coli* utilizando o vetor pET-SUMO aplicando cromatografia de exclusão molecular do experimento 1.

Tampão empregado: Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, NaCl 150 mmol L⁻¹ e glicerol 10 %, pH 7,4. Fluxo do tampão 0,5 mL min⁻¹. Coluna: *HiLoad* 16/600 Superdex 75 pg.

Fonte: Autoria própria.

Houve a separação das proteínas presentes na amostra proveniente da reação de clivagem e sua efetividade foi comprovada por meio de SDS-PAGE apresentado na Figura 23.

Figura 23 - SDS-PAGE 15 % referente à segunda etapa de purificação da proteína *PbHSD-his* expressa em *E. coli* utilizando o vetor pET-SUMO com indução por 0,1 mmol L⁻¹ de IPTG à 12 °C por 72 h, purificada previamente por cromatografia de afinidade e clivada pela proteína SUMO protease do experimento 1. a: Marcador de massa molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Thermo Fisher Scientific Inc.). b, c, d e e: Frações 3, 13, 22 e 28 da cromatografia de exclusão molecular, respectivamente.

Fonte: Autoria própria.

O primeiro pico do cromatograma contido na Figura 22 refere-se à proteína *PbHSD-his* isolada como pode ser observado na canaleta c do gel SDS-PAGE da Figura 23, obteve-se uma quantidade média de $29,7 \pm 6,8$ mg de proteína *PbHSD-his* isolada por litro de cultura com ~94 % de pureza, determinada com o uso do *software* ImageJ (SCHNEIDER, 2012). A canaleta e refere-se a SUMO após clivagem.

5.4. Caracterização da proteína Homoserina Desidrogenase

5.4.1. Análise estrutural por Espectroscopia de Dicroísmo Circular

O estudo da estrutura secundária da *PbHSD-his* foi realizado por CD. Para as medidas de CD foram utilizadas três diferentes concentrações da proteína, variando entre 1 e 4 μ M, a fim de determinar se a estrutura da *PbHSD-his* seria dependente da concentração, porém não foi possível testar concentrações mais elevadas da proteína por conta da alta voltagem alcançada durante a leitura do espectro. Os espectros obtidos são apresentados na Figura 24-a.

A Figura 24-b apresenta os espectros da elipticidade molar residual, $[\theta]$, em função do comprimento de onda, gerados a partir do seguinte tratamento de dados:

$$[\theta] = \frac{\theta \times 100 \times M}{C \times l \times n} \quad [1]$$

No qual θ é a elipticidade medida em mdeg, M é a massa molecular da proteína em kDa, C é a concentração da proteína em mg mL^{-1} , l é o caminho ótico em cm e n é o número de resíduos de aminoácidos da proteína (KELLY, JESS e PRICE, 2005).

Figura 24 – Espectros de CD da *PbHSD-his* em diferentes concentrações no tampão Tris-HCl 50 mmol L^{-1} , NaCl 150 mmol L^{-1} e glicerol 10 %, pH 7,4, diluído 60 vezes em água deionizada, referentes ao experimento 1. a) Espectro da elipticidade em função do comprimento de onda. b) Espectro da elipticidade molar residual em função do comprimento de onda.

Fonte: Autoria própria.

O espectro de elipticidade da *PbHSD-his* mostra um perfil característico de uma proteína com predominância conformacional de hélices α , com mínimos em 222 nm e 208 nm e um máximo em 193 nm, e uma leve contribuição do mínimo característico em 218 nm de fitas β , ambos perfis mostrados por Greenfield (2007), o perfil se mostrou o mesmo nos três experimentos realizados a partir da proteína obtida em três diferentes ensaios de produção de proteína recombinante. A partir dos dados de elipticidade molar residual foi feita a deconvolução pelo *CDNN CD Spectra Deconvolution Software*, e os resultados obtidos utilizando 33 *basespectra* para o tratamento dos dados de 200 a 260 nm são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 – Predição da estrutura secundária da proteína *PbHSD-his* a partir do espectro de CD em tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, NaCl 150 mmol L⁻¹ e glicerol 10 %, pH 7,4, diluído 60 vezes em água deionizada, obtida com o uso do CDNN CD *Spectra Deconvolution Software*.

Elementos de estrutura secundária	Quantidade média entre as diferentes concentrações (%)			Média (%)
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	
Hélice α	46,0	45,9	44,6	45,5 $\pm$ 7,3
Fita β	10,1	10,3	11,1	10,5 $\pm$ 7,0
Região não periódica	43,3	43,0	43,1	43,2 $\pm$ 6,7
Soma total	99,5	99,3	98,8	99,2 $\pm$ 6,9

Fonte: Autoria própria.

A deconvolução mostrou um resultado compatível com o perfil do espectro da *PbHSD-his* no qual há predominância de hélices α e uma pequena porcentagem de fitas β , e o erro médio das estruturas secundárias previstas com o uso de 33 *basespectra* e os dados de 200 a 260 nm no CDNN é de 6,45 %. A estrutura secundária teórica da *PbHSD-his* predita a partir da sequência de aminoácidos por diferentes softwares é mostrada na Tabela 9.

Tabela 9 - Predição da estrutura secundária da proteína *PbHSD-his* a partir da sequência de aminoácidos por diferentes *softwares*.

Elementos de estrutura secundária	Quantidade (%)			
	Porter 5.0	Swiss-model 1	Swiss-model 2	Spider 2
Hélice α	39,17	39,43	37,6	37,6
Fita β	16,97	17,76	18,28	18,02
Região não periódica	43,86	42,81	44,12	44,38

Fonte: Autoria própria.

A predição de estrutura secundária a partir do espectro de CD da proteína *PbHSD-his* mostrou uma porcentagem maior de hélices α que a predita pela sequência de aminoácidos, e uma porcentagem menor de fita β , porém comprovou

que a proteína se encontra na forma enovelada e que possui uma estrutura predominantemente composta por hélices α . Considerando os erros intrínsecos contidos na análise de CD e no tratamento de dados, os resultados são compatíveis mesmo com as diferenças nas porcentagens entre as duas predições.

Em comparação com a estrutura cristalográfica da homoserina desidrogenase de *Saccharomyces cerevisiae* depositada no PDB, que possui 49,43 % de identidade com a PbHSD em 0,92 de cobertura, os resultados obtidos a partir da análise por CD apresentaram uma maior porcentagem de hélices α e de região desordenada, e uma menor porcentagem de fitas β , sendo as porcentagens apresentadas pela *Saccharomyces cerevisiae* de 39 % de hélices α , 25 % de fitas β e 35 % de região desordenada (DELABARRE, B. *et al.*, 2000).

5.4.2. Análise da estabilidade por Espectroscopia de Emissão de Fluorescência

Os estudos de estabilidade da proteína PbHSD-his não foram reproduzidos no CD devido a necessidade de uma alta diluição do tampão contendo a proteína para manter a voltagem dentro do limite permitido para leitura do espectro de dicroísmo circular.

5.4.2.1. Análise da estabilidade química frente a variação de ureia

O estudo da estabilidade química da PbHSD-his frente a um agente desnaturante foi realizado por espectroscopia. Mediu-se a fluorescência intrínseca da proteína PbHSD-his em diferentes concentrações de ureia e os espectros de emissão são apresentados na Figura 25.

Figura 25 – Espectros de fluorescência da *PbHSD-his* na concentração de 0,033 mg mL⁻¹ em tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, NaCl 150 mmol L⁻¹ e glicerol 10 %, pH 7,4, na presença de diferentes concentrações de ureia (0 a 8 M) referentes ao experimento 1.

Fonte: Autoria própria.

Houve a supressão do sinal e o deslocamento de 333 nm para 351 nm, o pico em 330 nm é característico do triptofano em ambiente rígido dentro do glóbulo da proteína e o pico em 350 nm em ambiente polar em contato com as moléculas de água livres no solvente como descrito por Ladokhin (2006). Tal comportamento mostrou que houve o desenovelamento da proteína com o aumento da concentração de ureia.

A desnaturação da proteína pode ser representada pela fração desnaturada (f_D) conforme mostrado por Caruso (2007), para se calcular a fração desnaturada da proteína é necessário primeiro calcular o centro de massa (λ_{cm}) de cada espectro de fluorescência a partir da equação mostrada a seguir:

$$\lambda_{cm} = \frac{\sum \lambda \times I(\lambda)}{\sum I(\lambda)} \quad [2]$$

Na qual λ é o comprimento de onda de emissão e $I(\lambda)$ é a intensidade de emissão no comprimento de onda λ . Com os centros de massa determinados é possível determinar a fração desnaturada utilizando a seguinte equação:

$$f_D = \frac{\lambda_n - \lambda_{obs}}{\lambda_n - \lambda_d} \quad [3]$$

Onde λ_n é o centro de massa do espectro da proteína na forma nativa, λ_{obs} é o centro de massa do espectro em análise e λ_d é o centro de massa do espectro da proteína na forma desenovelada.

Fez-se o tratamento matemático para todos os espectros, considerando λ_n o centro de massa da proteína em ureia 0 M e λ_d como centro de massa da proteína em ureia 8 M, o resultado é apresentado na Figura 26.

Figura 26 - Desnaturação da *PbHSD-his* na concentração de 0,033 mg mL⁻¹ em tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, NaCl 150 mmol L⁻¹ e glicerol 10 %, pH 7,4, em função do aumento da concentração de ureia (de 0 a 8 M).

Fonte: Autoria própria.

Por esta curva foi possível estimar a concentração de ureia necessária para desnaturar 50 % da proteína (C_m) da *PbHSD-his*. A C_m média determinada foi de $4,13 \pm 0,21$ M de ureia, mostrando que a proteína de interesse possui uma boa estabilidade química frente ao agente desnaturante.

5.4.2.2. Análise da estabilidade química frente a variação de pH

O estudo da estabilidade química da proteína frente a variação de pH foi realizado medindo-se a fluorescência da *PbHSD-his* em pH de 2 a 12, os espectros são mostrados na Figura 27.

Figura 27 - Espectros de fluorescência da *PbHSD-his* na concentração de $0,033 \text{ mg mL}^{-1}$ em tampão $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ 20 mmol L^{-1} , $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ 20 mmol L^{-1} , NaH_2PO_4 20 mmol L^{-1} , NaCl 150 mmol L^{-1} e glicerol 10 %, na presença de diferentes pH (2 a 12) referentes ao experimento 1.

Fonte: Autoria própria.

Houve a supressão do sinal tanto para pH altamente ácidos como para pH altamente básicos, o máximo de emissão se manteve em 333 nm dos pHs ácidos até o pH 10, já para o pH básico 12 o máximo de emissão foi observado em 338 nm, o que indica uma mudança conformacional que deixou os triptofanos mais expostos ao solvente.

A supressão do sinal dos triptofanos pode ser devido a presença de grupos ácidos protonados, pela protonação do grupo α -carboxil do resíduo de aminoácido e pelo aumento da polaridade do meio, como descrito por Góes Filho (2005).

O intervalo de pH no qual os espectros não sofrem supressão está entre os pH no qual a HSD de *Pyrococcus horikoshii* se mostrou estável (HAYASHI *et al.*, 2015)

Por não ter havido um deslocamento do máximo de emissão considerável com a variação do pH, como ocorreu na presença do agente desnaturante ureia, havendo apenas a supressão do sinal, não foi possível calcular o f_D , optou-se por analisar os resultados pela determinação da fração de intensidade de emissão suprimida (f_S).

Determinou-se a área sobre a curva de cada espectro de emissão (A_E) como mostrado na equação a seguir:

$$A_E = \int_{310}^{420} I(\lambda) d\lambda \quad [4]$$

No qual $I(\lambda)$ é a intensidade de emissão no comprimento de onda λ . A partir das áreas calculadas determinou-se a f_S pela seguinte equação:

$$f_S = \frac{A_{obs}}{A_n} \quad [5]$$

Onde A_n é a área sobre a curva referente ao espectro de emissão da proteína na forma nativa e A_{obs} é a área sobre a curva referente ao espectro de emissão em análise, o resultado é apresentado na Figura 28.

Figura 28 - Estabilidade da *PbHSD-his* na concentração de 0,033 mg mL⁻¹ em tampão NaC₂H₃O₂ 20 mmol L⁻¹, Na₂B₄O₇ 10 H₂O 20 mmol L⁻¹, NaH₂PO₄ 20 mmol L⁻¹, NaCl 150 mmol L⁻¹ e glicerol 10 %, em função da variação do pH do tampão (de 2 a 12).

Fonte: Autoria própria.

Foi possível verificar que o padrão de mudança no f_s da proteína foi reprodutível, bem como a supressão do sinal apenas nos pH 2, 4 e 12.

5.4.3. Análise da estabilidade térmica por Calorimetria Diferencial de Varredura

A estabilidade térmica da proteína *PbHSD-his* foi determinada por meio da técnica de DSC num aquecimento de 20 a 90 °C, com o aumento da temperatura de 1 °C min⁻¹. A T_m foi determinada com o uso do *NanoAnalyze Software* v3.8.0 para o tratamento dos dados obtidos.

Figura 29 – Desnaturação térmica da *PbHSD-his* na concentração de 1,160 mg mL⁻¹ no tampão NaH₂PO₄ 50 mmol L⁻¹ e NaCl 100 mmol L⁻¹, pH 7,4, referente ao experimento 1.

Fonte: Autoria própria.

A curva acima mostra o calor absorvido pela amostra durante o aquecimento da cela. A temperatura média na qual a metade da amostra analisada encontrou-se desnovelada foi de $58,65 \pm 0,87$ °C, mostrando que a proteína possui uma boa estabilidade em temperatura ambiente, porém não é resistente temperaturas superiores à 50 °C. Foi realizada a varredura no resfriamento da amostra após o aquecimento, porém não houve renaturação da proteína, o que comprova que a desnaturação térmica da *PbHSD-his* é um processo irreversível.

5.4.4. Estudo da atividade enzimática por Espectroscopia de Absorção Molecular no UV/Vis

Todos os experimentos de caracterização descritos neste item foram realizados pelo grupo do Prof. Dr. Flavio Augusto Vicente Seixas, professor associado do Departamento de Tecnologia da Universidade Estadual de Maringá-UEM, no laboratório do mesmo.

5.4.4.1. Análise do efeito do pH na cinética enzimática

A atividade enzimática da homoserina desidrogenase da *P. brasiliensis* foi monitorada a 340 nm nos pH 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 9,75, 10,0, e 10,5, para a determinação do pH ótimo da enzima, o resultado obtido é mostrado na Figura 30.

Figura 30 - Efeito do pH sobre a atividade da enzima *PbHSD*-his 15 nM em tampão Tris-HCl/carbonato-bicarbonato 100 mM na presença de NADP⁺ 90 µM e L-homoserina 300 µM. Cada ponto representa a média de duas determinações com os respectivos desvio-padrão. A linha vermelha representa o ajuste de uma equação gaussiana.

Fonte: Laboratório do Prof. Dr. Flavio Augusto Vicente Seixas

A partir da variação na taxa de produção de NADPH foi possível determinar que o pH ótimo para a atividade enzimática da *PbHSD*-his está entre 9,35 e 9,50, sendo este um pH mais básico que o pH fisiológico. Este resultado está próximo do pH ótimo

de >9,5 da homoserina desidrogenase de *Saccharomyces cerevisiae* para a reação reversa evidenciado por Jacques *et al.* (2001).

5.4.4.2. Determinação do K_M e do V_{MAX}

Tendo em vista o pH ótimo da *PbHSD-his* foi então analisada a produção de NADPH em função da concentração do substrato L-homoserina, possibilitando assim a construção do gráfico de Michaelis-Menten para a homoserina desidrogenase apresentado na Figura 31.

Figura 31 – Variação na taxa de produção de NADPH pela *PbHSD-his* 0,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em função da concentração de L-homoserina em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 9,0 na presença de NADP^+ 0,09 mM. Cada ponto representa a média das repetições com as respectivas barras de erro. A linha vermelha representa o melhor ajuste da equação de Hill aos pontos experimentais.

Fonte: Laboratório do Prof. Dr. Flavio Augusto Vicente Seixas

O gráfico de Michaelis-Menten mostrou que a enzima tem comportamento michaeliano. O $n=1$ significa que o processo não é cooperativo. A partir da linearização deste tem-se o gráfico de Lineweaver-Burk mostrado na Figura 32.

Figura 32 – Gráfico de Lineweaver-Burk da *PbHSD-his* para a produção de NADPH pela *PbHSD-his* 0,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em função da concentração de L-homoserina em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 9,0 na presença de NADP⁺ 0,09 mM.

Fonte: Laboratório do Prof. Dr. Flavio Augusto Vicente Seixas

Por este gráfico foi possível confirmar os valores de K_M de 0,293 mM e de V_{Max} de 182 nM min^{-1} obtidos pelo gráfico de Michaelis-Menten. O K_M encontrado foi próximo do apresentado pela HSD de *Glycine max* de 0,275 mM para o mesmo substrato (SCHROEDER et al, 2010).

A atividade específica é de 303 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, o K_{cat} encontrado foi de 0,02 s^{-1} e a eficiência catalítica ($K_{cat} K_M^{-1}$) foi de 0,068 $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$ também compatível com o encontrado para a HSD de *Glycine max*.

5.4.4.3. Análise da inibição enzimática com o uso de L-Treonina

A atividade enzimática da *PbHSD-his* na presença do inibidor L-treonina foi determinada pelo monitoramento da reação reversa HSE $\rightarrow$ ASA, o resultado obtido é apresentado na Figura 33.

Figura 33 - Efeito da concentração de L-treonina de sobre a atividade da *PbHSD*-his 20 μ M. Tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,5, 25 °C. Foi avaliada a reação reversa HSE $\rightarrow$ ASA na presença de 90 μ M de NADP⁺ e 150 μ M de HSE. Cada ponto representa a média de duas repetições com as respectivas barras de erro. A linha vermelha representa o melhor ajuste da equação de Hill aos pontos experimentais.

Fonte: Laboratório do Prof. Dr. Flavio Augusto Vicente Seixas

O IC₅₀ encontrado foi de $184 \pm 3,0$ mM, ou seja, mais de 1.200 vezes a concentração do substrato utilizado no ensaio. Utilizando o *software IC₅₀-toK_i converter* (Cer *et al.*, 2009) determinou o K_i $\approx$ 184 mM para a inibição não competitiva da *PbHSD* pelo inibidor treonina, este resultado está dentro do intervalo de K_i encontrado para este mesmo inibidor para a HSD de *Glycine max* (SCHROEDER *et al.*, 2010), quando avaliaram a reação *forward* (ASA $\rightarrow$ HSE). O IC₅₀, bem como o K_i encontrados neste trabalho mostram que a *PbHSD*-his não é sensível a inibição por treonina, assim como a HSD de *Glycine max*.

Utilizando a proteína obtida neste trabalho foram realizados testes preliminares com inibidores em potencial resultando na publicação do artigo “*New 4-methoxy-naphthalene derivatives as promisor antifungal agents for paracoccidioidomycosis treatment*” apresentado no APÊNDICE B.

6. CONCLUSÕES

A subclonagem do cDNA da *PbHSD*-his no vetor pET-SUMO foi efetiva e a integridade do cDNA foi mantida, sendo evidenciada pela ausência de mutações na análise por sequenciamento do plasmídeo recombinante.

A expressão à 12 °C foi eficiente para a obtenção da proteína superexpressa na sua forma solúvel e a cromatografia de afinidade foi efetiva como uma primeira etapa de purificação da proteína *PbHSD*-his das demais proteínas presentes no sobrenadante da lise celular.

A reação de clivagem realizada pela enzima SUMO protease foi eficiente, bem como o posterior isolamento da *PbHSD*-his por meio da cromatografia de exclusão molecular, e ao final das duas etapas cromatográficas, a proteína *PbHSD*-his foi isolada numa pureza de 94 %.

A análise de CD comprovou que a estrutura da *PbHSD*-his é formada predominantemente por hélices α , porém nas condições utilizadas para a medida a proteína apresentou uma porcentagem maior de hélice α do que a predita a partir da sequência de aminoácidos.

As análises por fluorescência mostraram uma alta estabilidade da proteína *PbHSD*-his frente ao aumento da concentração de ureia, sendo este um agente desnaturante, a C_m estimada foi de 4,36 M de ureia. Em uma ampla faixa de pH na qual a proteína não sofre mudanças conformacionais, a proteína não sofreu supressão da fluorescência do pH 6 ao 10. O pH ótimo para atividade enzimática da *PbHSD*-his encontrado foi entre 9,35 e 9,50.

A análise de DSC mostrou que a proteína possui uma boa estabilidade a temperatura ambiente, porém não é resistente a altas temperaturas sofrendo uma desnaturação irreversível, a T_m encontrada foi de 57,65 °C.

As análises por UV/Vis mostraram que a *PbHSD*-his possui um comportamento michaeliano com um K_M de 0,226 mM e um V_{Max} de 182 nM min⁻¹, uma atividade específica de 303 μ mol min⁻¹ mg⁻¹, um K_{cat} de 0,02 s⁻¹ e uma eficiência catalítica de 0,068 mM⁻¹ s⁻¹, que a conversão de HSE em ASA é realizada por meio de um processo não cooperativo e que a *PbHSD*-his não é sensível a inibição por treonina, sendo o IC_{50} de 184 $\pm$ 3,0 mM de treonina.

Os resultados obtidos neste trabalho fornecem a base ao estudo de inibidores da enzima *PbHSD*-his com potencial aplicação farmacológica no tratamento da PCM.

7. PLANOS FUTUROS

Dar-se-á continuidade ao trabalho com a iniciação dos testes para o estudo da atividade dos inibidores em potenciais, bem como com a realização de testes de cristalização e de co-cristalização da proteína *PbHSD-his* com estes potenciais inibidores.

Os inibidores a serem estudados já foram previamente determinados por docking molecular, pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Flavio Augusto Vicente Seixas da Universidade Estadual de Maringá-UEM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAGATIN, M. C.; PIMENTEL, A. L.; BIAVATTI, D. C.; BASSO, E. A.; KIOSHIMA, E.S.; SEIXAS, F. A. V.; GAUZE, G.F. Targeting the homoserine dehydrogenase of paracoccidioides species for treatment of systemic fungal infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 61, n. 9, p. 1-13, 2017.
- BÖHM, G.; MUHR, R.; JAENICKE, R. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. **Protein Engineering**, Oxford, v. 5, n. 3, p. 191–195, 1992.
- BUTT, T. R.; EDAVETTAL, S. C.; HALL, J. P.; MATTERN, M. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. **Protein Expression and Purification**, Maryland Heights, v. 43, p. 1-9, 2005.
- CARUSO, C. S. **Clonagem, expressão e Caracterização de proteínas recombinantes de Xylella fastidiosa**. 2007. 169 f. Tese(Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
- CER, R. Z.; MUDUNURI, U.; STEPHENS, R.; LEBEDA, F. J. IC50-to-Ki: a web-based tool for converting IC50 to Ki values for inhibitors of enzyme activity and ligand binding. **Nucleic Acids Research**. v. 37, p. W441-W445, 2009. <https://bioinfo-abcc.ncifcrf.gov/IC50_Ki_Converter/index.php>
- CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 16, n. 22, p. 10881-10890, 1988.
- CRUZ, R. C. **Imagens do conhecimento**. Belo Horizonte: UFMG, [20--]. Disponível em: <https://www2.ufmg.br/imagensdoconhecimento/Imagens/Areas/Ciencias-Biologicas/Substancias-inibem-acao-de-fungo-causador-de-micose#cont>. Acesso em: 06 jun. 2018.
- DELABARRE B.; JACQUES, S.L.; PRATT, C.E.; RUTH, D. A.; WRIGHT, G. D.; BERGHUIS, A. M. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of homoserine dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, Malden, n. 54, p. 413-415, 1998.
- DELABARRE B.; THOMPSON, P.R.; WRIGHT, G.D.; BERGHUIS, A.M. Crystal structures of homoserine dehydrogenase suggest a novel catalytic mechanism for oxidoreductases. **Nature Structural Biology**, New York, v. 7, n. 3, p. 238-244, 2000.
- DESJARDINS, C. A.; CHAMPION, M. D.; HOLDER, J.W.; MUSZEWSKA, A.; GOLDBERG, J.; BAILÃO, A.M.; BRIGIDO, M.M.; FERREIRA, M.E.; GARCIA, A. M.; GRYNBERG, M.; GUJJA, S.; HEIMAN, D. I.; HENN, M. R.; KODIRA, C. D.; LEÓN-NARVÁEZ, H.; LONGO, L.V.; MA, L.J.; MALAVAZI, I.; MATSUO, A.L.; MORAIS, F.V.; PEREIRA, M.; RODRÍGUEZ-BRITO, S.; SAKTHIKUMAR, S.; SALEM-IZACC,

S.M.; SYKES, S.M.; TEIXEIRA, M.M.; VALLEJO, M.C.; WALTER, M.E.; YANDAVA, C.; YOUNG, S.; ZENG, Q.; ZUCKER, J.; FELIPE, M.S.; GOLDMAN, G.H.; HAAS, B.J.; MCEWEN, J.G.; NINO-VEJA, G.; PUCCIA, R.; SAN-BLAS, G.; SOARES, C.M.; BIRREN, B.W.; CUOMO, C.A. Comparative genomic analysis of human fungal pathogens causing paracoccidioidomycosis. **PLOS Genetics**, San Francisco, v. 7, n. 10, p.1-16, 2011.

FORTES, M. R. P.; MIOT, H. A.; KUROKAWA, C. S.; MARQUES, M. E. A.; MARQUES, S. A. Imunologia da paracoccidioidomicose. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 86, p. 516-25, 2011.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, H.; DUVAUD, S'E.; WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: WALKER, J. M. (ed.). **The proteomics protocols handbook**. Totowa: Humana Press, 2005. p. 571-607.

GÓES FILHO, L. S. **Caracterização e estudos cinéticos de albumina tratada com espécies reativas derivadas de óxidos de nitrogênio**: espectroscopia de absorção e fluorescência. 2005. Dissertação (Mestrado em Física) - Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, London, v. 1, n. 6, p. 2876-2890, 2007.

HAYASHI, J.; INOUE, S.; KIM, K.; YONEDA, K.; KAWARABAYASI, Y.; OHSHIMA, T.; SAKURABA, H. Crystal Structures of a Hyperthermophilic Archaeal Homoserine Dehydrogenase Suggest a Novel Cofactor Binding Mode for Oxidoreductases. **Scientific Reports**, London, v. 5, n. 11674, p.1-14, 2015.

HE, C.; OHNISHI, K. Efficient renaturation of inclusion body proteins denatured by SDS. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Philadelphia, v. 490, n. 4, p. 1250-1253, 2017.

HEGYI, G.; KARDOS, J.; KOVÁCS, M.; MÁLNÁSI-CSIZMADIA, A.; NYITRAY, L.; PÁL, G.; RADNAI, L.; REMÉNYI, A.; VENEKEI, I. **Introduction to practical biochemistry**. Budapest: Digitális Tankönyvtár, 2013. Disponível em: https://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop412A/2011-0073_introduction_practical_biochemistry/ch04s06.html. Acesso em: 04 jul. 2019.

JACQUES, S. L.; NIEMAN, C.; BAREICH, D.; BROADHEAD, G.; KINACH, R.; HONEK, J. F.; WRIGHT, J. R. Characterization of yeast homoserine dehydrogenase, an antifungal target: the invariant histidine 309 is important for enzyme integrity. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1544, n. 1-2, p. 28-41, 2001.

JACQUES, S. L., EJIM, L. J.; WRIGHT, G. D. Homoserine dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*: kinetic mechanism and stereochemistry of hydride transfer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, Amsterdam, v. 1544, n. 1-2, p. 42-54, 2001.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1751, n. 2, p. 119-139, 2005.

LADOKHIN, A. S. Fluorescence spectroscopy in peptide and protein analysis. *In*: **ENCYCLOPEDIA of analytical chemistry**. New York: John Wiley, 2006.

LUTZ, A. Uma mycose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. **Brazil-Medico, Revista Semanal de Medicina e Cirurgia**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 13, 15, p. 121-4, 142-4, 1908.

MARTINEZ, R. New trends in paracoccidioidomycosis epidemiology. **Journal of Fungi**, Basel, v. 3, n. 1, p. 1-13, 2017.

MENDES, R. P.; CAVALCANTE, R. S.; MARQUES, S. A.; MARQUES, M. E. A.; VENTURINI, J.; SYLVESTRE, T. F.; PANIAGO, A. M. M.; PEREIRA, A.C.; DA SILVA, J. F.; FABRO, A.T.; BOSCO, S. M. G.; BAGAGLI, E.; HAHN, R. C.; LEVORATO, A. D. Paracoccidioidomycosis: current perspectives from Brazil. **The Open Microbiology Journal**, Sharjah, v. 11, p. 224-282, 2017.

MURAKAMI, L. M. Z.; RULLER, R. **Uso da técnica de dicroísmo circular para avaliação de proteínas com aplicações biotecnológicas**. Campinas: CNPEM, 2016. (Memorando técnico, 3).

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

PEROUTKA III, R. J.; ORCUTT, S. J.; STRICKLER, J. E.; BUTT, T. R. SUMO fusion technology for enhanced protein expression and purification in Prokaryotes and Eukaryotes. *In*: EVANS JUNIOR, T., XU, M.Q. (eds.). **Heterologous gene expression in E.coli: methods and protocols**. New York: Springer, 2011.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 5, n. 172, p. 1-17, 2014.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, London, v. 9, p. 671-675, 2012.

SCHROEDER, A. C.; ZHU, C.; YANAMADALA, S. R.; CAHOON, R. E.; ARKUS, K. A.; WACHSSTOCK, L.; BLEEKE, J.; KRISHNAN, H. B.; JEZ, J. M. Threonine-insensitive homoserine dehydrogenase from soybean: genomic organization, kinetic mechanism, and in vivo activity. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 285, p. 827-34, 2010.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; QUEIROZ-TELLES, F.; KONO, A. S. G.; PANIAGO, A. M. M.; NATHAN, A.; DO VALLE, A. C. F.; BAGAGLI, E.; BENARD, G.; FERREIRA, M. S.; TEIXEIRA, M. M.; SILVA-VERGARA,

M. L.; PEREIRA, R. M.; CAVALCANTE, R. S.; HAHN, R.; DURLACHER, R. R.; KHOURY, Z.; CAMARGO, Z. P.; MORETTI, M. L.; MARTINEZ, R. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**; Brasília, v. 50, n. 5, p. 715-740, 2017.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; QUEIROZ-TELLES, F.; KONO, A. S. G.; PANIAGO, A. M. M.; NATHAN, A.; DO VALLE, A. C. F.; BAGAGLI, E.; BENARD, G.; FERREIRA, M. S.; TEIXEIRA, M. M.; SILVA-VERGARA, M. L.; PEREIRA, R. M.; CAVALCANTE, R. S.; HAHN, R.; DURLACHER, R. R.; KHOURY, Z.; CAMARGO, Z. P.; MORETTI, M. L.; MARTINEZ, R. II Consenso Brasileiro em Paracoccidioidomicose. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 27, n. esp., p. 1-34, 2018.

TEIXEIRA, M. M.; THEODORO, R. C.; CARVALHO, M. J. A.; FERNANDES, L.; PAES, H. C.; HAHN, R. C.; MENDOZA, L.; BAGAGLI, E.; SAN-BLAS, G.; FELIPE, M. S. S. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Maryland Heights, v. 52, n. 2, p. 273–83, 2009.

TORRISI, M.; KALEEL, M.; POLLASTRI, G. Porter 5: state-of-the-art ab initio prediction of protein secondary structure in 3 and 8 classes. **bioRxiv**, Dublin, P. 1-7, 2018.

WATERHOUSE, A.; BERTONI, M.; BIENERT, S.; STUDER, G.; TAURIELLO, G., GUMIENNY, R.; HEER, T. F.; DE BEER, T. A. P.; REMPFER, C.; BORDOLI, L.; LEPORE, R.; SCHWEDE, T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**; Oxford, v. W1, n. 46, p. W296-W303, 2018.

YANG, Y.; HEFFERNAN, R.; PALIWAL, K.; LYONS, J.; DEHZANGI, A.; SHARMA, A.; WANG, J.; SATTAR, A.; ZHOU, Y. SPIDER2: A package to predict secondary structure.; accessible surface area.; and main-chain torsional angles by deep neural networks. *In*: ZHOU, Y.; KLOCZKOWSKI, A.; FARAGGI, E.; YANG, Y. (eds.). **Prediction of protein secondary structure**. New York: Springer, 2017. p. 55-63. (Methods in molecular biology, v. 1484).

ZUO, X.; MATTERN, M. R.; TAN, R.; LI, S.; HALL, J.; STERNER, D. E.; SHOO, J.; TRAN, H.; LIM, P.; SARAFIANOS, S.G.; KAZI, L.; NAVAS-MARTIN, S.; WEISS, S.R.; BUTT, T. R. Expression and purification of SARS coronavirus proteins using SUMO-fusions. **Protein Expression and Purification**, Maryland Heights, v. 42, n. 1, p. 100-110, 2005.

APÊNDICE A – Teste realizados no refinamento do protocolo de expressão e purificação da homoserina desidrogenase de *Paracoccidioides brasiliensis*

Os testes descritos neste apêndice foram realizados durante a determinação e refinamento do protocolo para a obtenção da proteína *PbHSD*-his, citando-os na ordem cronológica que foram aplicados.

- **Indução a 30 °C**

Condições de expressão: Meio LB, 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de canamicina, 250 rpm e 37 °C até atingir a DO (entre 0,4 e 0,6 de absorbância à 600 nm), indução com 1 mmol L^{-1} de IPTG, 250 rpm, 30 °C por 3 e 4 horas.

Resultado: Superexpressão da proteína his-SUMO-*PbHSD*-his apenas na forma insolúvel, máxima expressão com 3 horas.

- **Variação na concentração de IPTG**

Condições de expressão: Meio LB, 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de canamicina, 250 rpm e 37 °C até atingir a DO (entre 0,4 e 0,6 de absorbância à 600 nm), indução com 0,1 mmol L^{-1} de IPTG e sem adição de IPTG, 250 rpm, 30 °C por 3 horas.

Resultado: Não houve superexpressão da proteína sem adição de IPTG e com a concentração de 0,1 mM de IPTG houve superexpressão numa quantidade similar ao expressado com o uso de 1 mM de IPTG.

- **Purificação por cromatografia em coluna de afinidade com Ni^{2+} imobilizado da proteína expressa a 30 e 37 °C**

Condições de expressão: Meio LB, 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de canamicina, 250 rpm e 37 °C até atingir a DO (entre 0,4 e 0,6 de absorbância à 600 nm), indução com 0,1 mmol L^{-1} de IPTG, 250 rpm, 30 e 37 °C por 3 horas.

Resultado: A proteína his-SUMO-*PbHSD*-his, expressa na forma insolúvel e ressolubilizada com SDS, não se ligou a coluna de afinidade, impossibilitando sua purificação.

- **Variação na temperatura de indução**

Condições de expressão: Meio LB, 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de canamicina, 250 rpm e 37 °C até atingir a DO (entre 0,4 e 0,6 de absorbância à 600 nm), indução com 0,1 mmol L⁻¹ de IPTG, 250 rpm, a 16 °C por 24 h, a 18 °C por 20 h e a 20 °C por 20 h.

Resultado: Superexpressão da proteína his-SUMO-*PbHSD*-his na forma solúvel e insolúvel, com maior expressão na forma solúvel utilizando a temperatura de indução de 18 °C.

- **Purificação por cromatografia em coluna de afinidade com Ni²⁺ e Co²⁺ imobilizado da proteína expressa a 18 °C**

Condições de expressão: Meio LB, 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de canamicina, 250 rpm e 37 °C até atingir a DO (entre 0,4 e 0,6 de absorbância à 600 nm), indução com 0,1 mmol L⁻¹ de IPTG, 250 rpm, a 18 °C por 24 h.

Resultado: A proteína his-SUMO-*PbHSD*-his superexpressa na forma solúvel se ligou a coluna, não havendo perda da mesma no *void* da cromatografia. A cromatografia com Co²⁺ imobilizado se mostrou mais eficiente, diminuindo a quantidade de impurezas na proteína eluída.

- **Expressão com meio auto indutor**

Condições de expressão: Meio auto-indutor, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de canamicina, indução com 0,1 mmol L⁻¹ de IPTG, 300 rpm, a 18 °C por 24 h.

Resultado: Não houve superexpressão da proteína his-SUMO-*PbHSD*-his.

- **Expressão com meio SOB**

Condições de expressão: Meio SOB, 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de canamicina, 250 rpm e 37 °C até atingir a DO (entre 0,4 e 0,6 de absorbância à 600 nm), indução com 0,1 mmol L⁻¹ de IPTG, 250 rpm, a 18 °C por 24 h.

Resultado: Houve um aumento da expressão da proteína his-SUMO-*PbHSD*-his com o uso do meio SOB e verificou-se que uma grande parte da proteína foi expressa na forma insolúvel com o uso da temperatura de indução de 18°C.

APÊNDICE B – Artigo publicado

Research Article

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

Future
MICROBIOLOGY

New 4-methoxy-naphthalene derivatives as promisor antifungal agents for paracoccidioidomycosis treatment

Mariane C Bagatin¹, Andrew M F Rozada¹, Franciele A V Rodrigues², Paulo S A Bueno³, Jessyka L Santos⁴, Fernanda Canduri⁴, Érika S Kioshima², Flavio A V Seixas³, Ernani A Basso¹ & Gisele F Gauze^{*1}

¹Department of Chemistry, State University of Maringá, Maringá, PR, Brazil

²Department of Clinical Analysis & Biomedicine, State University of Maringá, Maringá, PR, Brazil

³Department of Technology, State University of Maringá, Umuarama, PR, Brazil

⁴São Carlos Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Carlos, SP, Brazil

*Author for correspondence: Tel.: +55 44 30113674; Fax: +55 44 30114125; gfgbandoch@uem.br

Aim: Novel 4-methoxy-naphthalene derivatives were synthesized based on *hits* structures in order to evaluate the antifungal activity against *Paracoccidioides* spp. **Methods:** Antifungal activity of compounds was evaluated against *P. brasiliensis* and most promising compounds **2** and **3** were tested against eight clinically important fungal species. **Results:** Compound **3** was the more active compound with MIC 8 to 32 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for *Paracoccidioides* spp without toxicity monkey kidney and murine macrophagecells. Carbohydrazide **3** showed good synergistic antifungal activity with amphotericin B against *P. brasiliensis* specie. Titration assay of carbohydrazide **3** with *PbHSD* enzyme demonstrates the binding ligand-protein. Molecular dynamics simulations show that ligand **3** let the *PbHSD* protein more stable. **Conclusion:** New carbohydrazide **3** is an attractive lead for drug development to treat paracoccidioidomycoses.

First draft submitted: 8 October 2018; Accepted for publication: 18 December 2018; Published online: 21 January 2019

Keywords: antifungal activity • carbohydrazide • homoserine dehydrogenase • molecular modeling

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic granulomatous mycosis, caused by fungi *Paracoccidioides brasiliensis* [1,2] and *Paracoccidioides lutzii* [3–5]. PCM is an endemic fungal infection in Latin America and most cases and occur in Brazil, Argentina, Colombia, Ecuador, Venezuela and Paraguay [6–8]. PCM mainly affects rural workers from endemic areas, low-income people generally associated with malnutrition, smoking or alcoholism [9]. This endemic mycosis has been considered as a neglected disease, requiring the public agencies attention to understand the real problem [10].

Unlike some other pathogenic fungi, *Paracoccidioides* spp respond well to the available antifungal, as amphotericin B (AMB), itraconazole (ITZ) and sulfamethoxazole/trimethoprim [8]. However, the major therapeutic limitation of PCM is the long period of treatment, which reflect increased toxicity, high costs and low adherence to treatment [8]. In addition, the fibrotic sequelae was frequently observed even after prolonged treatment [10]. The similarity between pathogen and host cells appears to be responsible for several side effects and toxicity, possibly due to nonspecific interactions with enzymes present in human cells [11]. Thus, the development of new antifungal compounds is still mandatory for systemic mycosis treatment.

A strategy to select compounds more selective has been to exploit the drug targets essential to the pathogen but absent in humans [12]. In this way, the aspartate pathway is attractive for the antifungal development.

HSD is an essential enzyme of metabolic aspartate pathway, responsible for the biosynthesis of lysine (Lys), methionine (Met) and threonine (Thr) in fungi, bacteria and plants [13]. This oxidoreductases family member catalyzes the third reaction step, converting *L*-aspartate-4-semialdehyde in homoserine that is a reversible reaction NAD(P)H-dependent [14].

In our previous study, two *hits* compounds were selected as potential inhibitors of the HSD from *P. brasiliensis* (*PbHSD*) by virtual screening [15]. These compounds, named HS1 and HS2, showed promisor antifungal activity

Future
Medicine

against *Paracoccidioides* genus. Therefore, we decide synthesize novel derivatives based on *hits* structures in order to research new compounds with more potent antifungal activity and against different fungal species. Additionally, docking and dynamic molecular studies were performed for biological provide a basis for the novel compounds having improved potency.

Materials & methods

Chemicals

4-Methoxy-1-naphthoic acid and reagents were purchased from SIGMA (Sigma-Aldrich, MO, USA). NMR spectra were acquired with Bruker avance III HD 500 MHz using TMS as an internal standard. HRMS analysis was performed in a high resolution mass spectrometer (Impact II, Bruker Daltonics Corporation, Germany) equipped with an electrospray ionization source (ESI).

1-carboxyethyl-4-methoxy-1-naphthalene (2)

To a solution of 4-methoxy-1-naphthoic acid (1.0 mmol) in ethanol (10 ml) thionyl chloride (1.2 mmol) was added dropwise under stirred and the reaction mixture was heated under reflux for 12 h [16]. The remaining ethanol was evaporated and the reaction mixture was washed with water (25 ml) and extracted twice with ethyl acetate (3 × 20 ml). The combined organic layers were then washed with saturated sodium bicarbonate solution (2 × 15 ml) and brine (2 × 15 ml) and dried over sodium sulphate. Removal of the dried organic solvent yielded the 1-carboxyethyl-4-methoxy-1-naphthalene with 90% yield and p.f.: 63–65°C.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, ppm): δ 1.46 (t, 3H, J = 7.1 Hz), δ 4.03 (s, 3H), δ 4.45 (q, 2H, J = 7.1 Hz), δ 6.78 (d, 1H, J = 8.3 Hz), δ 7.52 (ddd, 1H, J = 8.2; 6.8; 1.2 Hz), δ 7.63 (ddd, 1H, J = 8.6; 6.8; 1.5 Hz), δ 8.24 (d, 1H, J = 8.3 Hz), δ 8.33 (ddd, 1H, J = 8.4; 1.5; 0.7 Hz), δ 9.05 (ddd, 1H, J = 8.7; 1.1; 0.7 Hz).

¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃, ppm): δ 14.5, δ 55.8, δ 60.7, δ 102.5, δ 119.3, δ 122.3, δ 125.5, δ 125.7, δ 125.8, δ 128.3, δ 132.2, δ 132.9, δ 159.3, δ 167.4.

HRMS (ESI+): calculated for C₁₄H₁₄O₃Na⁺, [M+Na]⁺: 253.0835, found 253.0826

1-Carbohydrazinyl-4-methoxy-1-naphthalene (3)

A mixture of ester **2** (1 mmol) and hydrazine monohydrate 80% (100 mmol) in ethanol (10 ml) was stirred vigorously for 24 h at reflux. Excess ethanol was evaporated and the remaining solid was washed with cold hexane/acetate (7:3), which was filtered to yield the corresponding carbohydrazide **3** with 63% yield and p.f.: 178–179°C.

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD, ppm): δ 4.03 (s, 3H), δ 6.91 (d, 1H, J = 8.0 Hz), δ 7.50 (ddd, 1H, J = 8.2; 6.9; 1.3), δ 7.55 (m, 2H), δ 8.23 (dt, 1H, J = 8.4; 0.9), δ 8.27 (ddd, 1H, J = 8.3; 1.5; 0.7)

¹³C NMR (500 MHz, CD₃OD, ppm): δ 56.2, δ 103.6, δ 123.2, δ 125.8, δ 126.1, δ 126.6, δ 126.9, δ 127.9, δ 128.4, δ 132.9, δ 158.7, δ 171.8.

HRMS (ESI+): calculated for C₁₂H₁₃N₂O₂⁺, [M+H]⁺: 217.0971, found 217.0973

1-Carboglycinylmethylester-4-methoxy-1-naphthalene (4)

4-methoxy-1-naphthoic acid (0.247 mmol), glycine methyl ester hydrochloride (0.272 mol), triethylamine (0.272 mmol) and DMTMM (0.247 mmol) was dissolved in 5 ml of methanol. The reaction was stirred for 1 h at room temperature [17]. The methanol was evaporated and the remaining oil was washed sodium bicarbonate solution 10% (2x20 ml). Removal of the solvent and purified by recrystallization water/methanol, yielded the corresponding product with 40% yield and p.f.: 137–138°C.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, ppm): δ 3.78 (s, 3H), 3.99 (s, 3H), δ 4.26 (d, 2H, J = 5.3 Hz), δ 6.70 (d, 1H, J = 8.0 Hz), δ 7.49 (ddd, 1H, J = 8.2; 6.8; 1.3 Hz), δ 7.55 (ddd, 1H, J = 8.5; 6.8; 1.5 Hz), δ 7.61 (d, 1H, J = 7.9 Hz), δ 8.28 (dt, 1H, J = 8.3; 1.0 Hz), δ 8.39 (dt, 1H, J = 8.5; 1.0 Hz).

¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃, ppm): δ 41.8, δ 52.5, δ 55.8, δ 102.4, δ 122.3, δ 125.3, δ 125.8, δ 125.8, δ 125.8, δ 126.7, δ 127.8, δ 131.5, δ 157.6, δ 169.7, δ 170.7.

HRMS (ESI+): calculated for C₁₅H₁₆NO₄⁺, [M+H]⁺: 274.1073, found 274.1069.

1-Carboglycinyl-4-methoxy-1-naphthalene (5)

To a solution of 1-carboglycinylmethylester-4-methoxy-1-naphthalene (**4**) (0.146 mmol) in MeOH (2 ml) was added 2.5 M NaOH (50 ml) and the reaction let to stir at room-temperature for 24 h. Workup involved removal

of MeOH followed by addition of HCl until pH 1 [18]. A white precipitate formed and was extracted into ethyl acetate (3x30 ml). The organic fraction was dried over sodium sulphate, the solvent removed to furnish the corresponding product with 70% yield and p.f.: 186–188°C.

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD, ppm): δ 4.0 (s, 3H), 4.15 (s, 2H), 6.91 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 7.49 (ddd, 1H, J = 8.2; 6.8; 1.3 Hz), 7.55 (ddd, 1H, J = 8.4; 6.8; 1.5 Hz), 7.69 (d, 1H, J = 7.9 Hz), 8.27 (ddd, 1H, J = 8.4; 1.5; 0.7 Hz), 8.36 (dt, 1H, J = 8.5; 1.0 Hz).

¹³C NMR (500 MHz, CD₃OD, ppm): δ 4.5, 56.2, δ 103.6, δ 123.1, δ 126.4, δ 126.6, δ 126.9, δ 127.2, δ 127.9, δ 128.3, δ 132.8, δ 158.7, δ 172.9, δ 173.2.

HRMS (ESI+): calculated for C₁₄H₁₄NO₄⁺, [M+H]⁺: 260.0917, found 260.0921.

Bioassays

In vitro susceptibility tests were performed for eight pathogenic yeast species, three of which were isolated from *P. lutzi* (Pb01, 8334 e ROSC), four isolates from *P. brasiliensis* (Pb18, Mg14, Mg15 and Mg16), reference strains from *C. albicans* (ATCC 90028), *C. parapsilosis* (ATCC 22019), *C. glabrata* (ATCC 90030), *C. tropicalis* (ATCC 750) and *Cryptococcus neoformans* (INCQS 40283). Prior to testing, *Candida* spp. was subcultured on Sabouraud dextrose agar (SDA; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) and incubated at 35°C for 24 h. *C. neoformans* was also subcultured in SDA medium, incubated at 25°C, 48 h before assaying. The *Paracoccidioides* spp. was subcultured in Fava-Netto medium [19] at 36°C and used on the fifth day of culture. The tests were conducted using the broth microdilution methods according to M27-A3 protocol (former NCCLS – *National Committee for Clinical Laboratory Standards*) [20] with modifications for *Paracoccidioides* spp and *Cryptococcus* spp. The stock solution of compounds was prepared in DMSO at concentration of 100 µg/ml. For experiments, the work solution was prepared with RPMI 1640 medium and the complete solubilization of compounds was achieved with the addition of Pluronic 0.2%. Suspensions were prepared in sterile saline solution (0.85%) with yeast concentrations adjusted to 1 to 2 × 10⁴ cell/ml for *Paracoccidioides* spp. and 1 to 2 × 10³ cell/ml for *Candida* spp and *Cryptococcus neoformans*. The plates were incubated at 36°C for 7 days (*P. brasiliensis*), at 36°C for 24 h (*Candida* species) and at 28°C for 48 h (*C. neoformans*). MICs were determined as the lowest concentration of the drug able to inhibit 80% of the cell growth, as compared with positive control. All tests were performed three-times in duplicate.

Checkerboard assays

The interaction compound **3** with AMB was investigated by checkerboard tests on 96-well plates, performed according to the CLSI approved standard M27-A3 [21] with modification to *P. brasiliensis* species. Briefly, yeast suspensions were prepared in RPMI 1640 in the concentration of 0.5 to 2.5 × 10⁵ CFU/ml. The MIC plates were incubated at 35°C for 7 days. The compound **3** and AMB concentrations tested ranged from 1 to 64 µg/ml and from 0.003 to 2 µg/ml, respectively. The fractional inhibitory concentration (FIC) index was calculated as the sum of the FICs of either drugs (MIC_{AMP} in combination/MIC_{AMP} alone + MIC_{HS} in combination/MIC_{HS} alone). Drug interactions were classified as synergistic when the FIC value was ≤0.5 and antagonistic when the FIC value was > 4 [17,18]. Experiments were repeated a minimum of three-times.

In vitro cytotoxicity assay

The cytotoxicity assay was performed in Vero and J774 cells, using the CellTiter 96 assay (Promega, WI, USA), based on the reduction of MTS (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-5-[3-carboxymethoxyphenyl]-2-[4-sulfophenyl]-2H-tetrazolium). Briefly, the cells were incubated in 96-well culture plates maintained in DMEM (Eagle's Modified Dulbecco's Medium) with fetal bovine serum (5%) and treated with different concentrations of the compound **3**. After 24 or 48 h, MTS solution was added to each well and incubated for 180 min in a CO₂ oven (5%) at 37°C. Cell viability was determined by optical density in a spectrophotometer (490 nm). The compounds cytotoxicity was presented as the average of three independent experiments with three replicates for each compound. Percentages of cell viability were calculated in relation to controls with medium only.

Spectroscopy binding assay

The recombinant protein *PbHSD* was supplied through collaboration with the Molecular and Structural Biochemistry Laboratory of IQSC-USP, coordinated by Professor Fernanda Canduri.

For assays, the protein was diluted in Tris-HCl buffer pH 8.0 to the concentration of ~2 mM. The working solution of 780 µM compound **3** was prepared in pure DMSO (99.9%) at the time of use. Two 2.5 µl volumes of

the compound **3** solution (5 μ l total) were added to a cuvette containing 800 μ l of Tris-HCl Buffer pH 8.0 ($Abs_{max} \sim 0.2$). In the reference was added 5 μ l of DMSO. The spectral variation was monitored on a spectrophotometer model UV-1650 PC (Shimadzu, Tokyo, Japan) between 500 and 225 nm coupled to a thermostated bath at 25°C. Aliquots of 10 μ l of the PbHSD solution were added to the sample and to the reference and the absorption spectrum after each addition was collected. The spectral variation at 261 nm was plotted as a function of protein concentration. The logistic sigmoidal Equation (1) that correlates a transition between the two states of protein (free and bound) was adjusted to the experimental data points to obtain the dissociation constant [22].

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x/x_0)^p} + A_2 \quad (1)$$

were $A_1 = Abs_{(NAF3 \text{ free})}$, $A_2 = Abs_{(NAF3 \text{ bonded})}$, p = cooperativity and x_0 = dissociation constant (K_d).

Molecular dynamics

The structure of PbHSD, in complex with substrate *L*-homoserine and cofactor was previous modeled [14,23]. This structure (Supplementary Data) was used for docking and molecular dynamics (MD) procedures in this work. Docking was carried out using standard algorithm of Autodock 4.2.3 with search box centered at the substrate binding site. The MD was done using NAMD2 [24] software package with a CHARMM [25] c35b2-c36a2 force field being applied to the atoms of protein and NAD^+ . The force fields for *L*-homoserine and for other ligands synthesized were generated by the SwissParam server [26] in the same format, with partial charges obtained by density functional method in B3LYP/6-311 G, using the COSMO solvation model of the ORCA program, [27] in the state of protonation at pH 7.0.

In the system preparation, the spatial coordinates of the protein-ligand complex, as well as the enzyme in the apo form, were inserted in a periodic box with Tip3 water whose limits lie at least 10 Å away from the outer surface of the protein, under NPT conditions, meaning constants number of atoms, pressure (1 atm) and temperature (300 K) being controlled by Langevin dynamics and Langevin piston pressure control methods. A sufficient amount of Na^+ counterions were added to neutralize the system charges.

The molecular dynamics occurs in steps. Initially, the atoms of *L*-homoserine were fixed in space while all other system atoms were submitted to 30,000 steps of energy minimization by the conjugate gradient method (CG) as a way to maximize the interaction of the protein with the ligand, something that was not performed by the modeling program. In the second step, all the system atoms were minimized again by over 10,000 CG steps. In the third step, the atoms of the protein and ligand were fixed in space while the water and ions were equilibrated for 60 ps of MD. Finally, in the fourth step, all the atoms of the system were minimized again by 20,000 new CG steps. The minimized coordinates resulting from this step were used as input parameters (reference frame) for redocking simulations, virtual screening and long-time MD equilibrium. In the long-time molecular dynamics, all atoms were equilibrated for 100 ns, sufficient time to observe system convergence for thermodynamic equilibrium conditions.

The analyses of the simulations were performed in terms of root mean square deviation (RMSD) from the minimized (reference) structure. The radius of gyration (r_{gyr}) of the whole protein-ligand complex, the residues in contact with the inhibitor between distances around 4.0 Å and the root mean square fluctuation (RMSF) for backbone atoms of each residue were extracted from the trajectory file.

All MD simulations were performed in 20 nodes of an Intel Xeon E5-2695v2 Ivy Bridge, 2,4GHZ (480 cores) of the supercomputer SDumont in LNCC, Brazil.

Results & discussion

Chemistry

The 4-methoxy-1-naphtioic acid derivatives **2-5** (Figure 1) were synthesized using a classical method as previously reported [16–18] and briefly described below.

The derivative **2** was prepared by one pot esterification of 4-methoxy-1-naphtioic acid with thionyl chloride and ethanol. The reaction of **2** with an excess of hydrazine monohydrate furnished **3** in 80% yield. The compound **4** was prepared by the nucleophilic acyl substitution reaction between 4-methoxy-1-naphtioic acid and glycine methyl ester hydrochloride using DMTMM for activation of carboxylic acid. DMTMM was prepared in two steps, as previously described by Kunishima *et al.* [17]. Finally, the amidoester **4** was hydrolyzed in basic medium to obtain the amidoacido **5** in 70% yield.

Figure 1. General route for the preparation of 4-methoxy-1-naphthoic acid derivatives 2-5.

Table 1. *In vitro* antifungal activities of 4-methoxy-naphthalene derivatives against *Paracoccidioides* strain (Pb18).

Compounds	MIC ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)
1	128
2	64
3	16
4	128
5	512
HS1	64
AMB	1
ITZ	1

AMB: Amphotericin B; ITZ: Itraconazole.

All derivatives **2–5** were obtained in high purity level and have been well-characterized by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy and high resolution mass spectra.

Biological assays

The four synthesized compounds **2–5** and 4-methoxy-1-naphthoic acid were initially tested for *in vitro* antifungal activity against *P. brasiliensis*, isolate Pb18. The conventional drugs (ITZ and AMB) and the HS1 (*hits*) also were tested for comparison purposes. The susceptibility profile of Pb18 against the novel compounds are presented by the minimum inhibitory concentration (MIC) values (Table 1).

The most promising compounds are the ester **2** and the carbohydrazide **3**, pointing out for the last that is four-times more active than lead HS1. Then, the most promising compounds **2** and **3** were tested against eight clinically important fungal species, namely *Paracoccidioides brasiliensis*, *P. lutzii*, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* and *Cryptococcus neoformans* (Table 2). Carbohydrazide **3** was the most active compound with MIC ranging from 8 to $32 \mu\text{g.ml}^{-1}$ for *Paracoccidioides* spp and also show antifungal activity against *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis*. These results suggested that the carbohydrazide group attached in C-1 of 4-methoxy-naphthalene ring seems to be directly related to antifungal activity.

In addition, the cytotoxicity of the more active compound **3** was evaluated in the monkey kidney (Vero) and murine macrophage (J774) cells and results are shown in Figure 2. The compound **3** displayed low cytotoxicity,

Table 2. MIC ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) for compounds 2 and 3 against *Paracoccidioides* spp, *Candida* spp and *Cryptococcus neoformans*.

Comp.	<i>P. brasiliensis</i>				<i>P. lutzi</i>			<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. neoformans</i>
	Pb18	Mg14	Mg15	Mg16	Pb01	8334	ROSC	ATCC 90028	ATCC 2201	ATCC 90030	ATCC 750	ATCC 6258	INCQS 40283
2	64	64	128	8	64	64	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
3	16	32	8	8	32	16	32	256	128	128	>512	>512	>512

Figure 2. *In vitro* cytotoxicity of compound 3. The viability of two cell lineages, Vero cells and macrophages J774, were tested against the most active compound at concentrations of 1024 to 2 $\mu\text{g/ml}$. To calculate the percentage of cell viability after treatment with compound 3, the D.O values obtained in the MTS assay for untreated cells was taken as 100% viability. The experiments were performed in triplicate. The compound 3 does not interfere with cell viability at concentrations up to sixfold greater than the MIC concentration against *P. brasiliensis*.

Table 3. Synergistic effects of the compound 3 in combination with amphotericin B against *P. brasiliensis*.

Compound	MIC ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)		FIC	ΣFIC	Outcome
	Alone	Combination			
3	32	4	0.250	0.375	Synergistic
AMB	2	0.5	0.250	–	–

The MIC and FIC values were obtained from the checkerboard assay. $\text{FIC} = \text{MIC values of drug in combination} / \text{MIC of drug alone}$ $\Sigma\text{FIC} = (\text{FIC of AMB}) + (\text{FIC of compound 3})$. A $\Sigma\text{FIC} \leq 0.5$ is indicative of synergism.
AMB: Amphotericin B; FIC: Fractional inhibitory concentration; MIC: Minimum inhibitory concentration.

with cellular viability higher than 80% until concentrations of 512 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ toward tested cells (Figure 2). These results demonstrate the enormous potential of these carbonylhydrazide for search of new antifungal agents.

The synergistic effect of the compound 3 was evaluated with AMB, because AMB is the choice drug for in the PCM severe, but this drug has high nephrotoxicity [8]. In addition, the AMB action mechanism could facilitate the cell entrance of compound 3, increasing its power. The synergism results clearly show this effect, since the MIC value of the compound reduced four-times, of 32 to 4.0 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, when combined with AMB. The MIC value of AMB also reduced from 2.0 to 0.5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (Table 3). The ΣFIC value to combination do AMB and the compound 3 was 0.375 indicative of a synergistic effect. The drug combination was also tested for possible toxicity (Figure 3). Even a concentration greater than four-times the FIC value was not detected reduction in viability of Vero cells.

Spectroscopic binding assays

In order to test if the carbonylhydrazide 3 were able to specifically inhibit *Pb*HSD enzyme were performed titration assays. The increase in the absorbance of the carbonylhydrazide 3 spectrum along the titration of the *Pb*HSD enzyme

Figure 3. *In vitro* cytotoxicity of compound 3 in combination with Amphotericin B. The viability of Vero cells were tested against the drugs combination: compound 3 and Amphotericin B at concentrations ranging between 64.0 to 0.125 μg/ml and 8.0 to 0.015 μg/ml, respectively. To calculate the percentage of cell viability after treatment, the D.O values obtained in the MTS assay for untreated cells was taken as 100% viability. The maximum concentration tested was fourfold the fractional inhibitory concentration value and it showed no toxicity against Vero cells.

Figure 4. Enzyme titration curves. (A) carbohydrazide 3 was dissolved in DMSO to a concentration ~777 μM (work solution) then, 5 μl was added to 800 μl of a buffer Tris-HCl 50 mM, pH 9.0 (~5 μM black spectrum, figure A). In this way, the DMSO content in sample was less than 0.6%. Then, the solution was titrated with PbHSD (~2 μM) using 10 μl aliquots (see figure B). Spectral changes were monitored between 500 and 230 nm. The red and blue trace represent intermediate and final spectrum recorded at ~222 and 431 nM PbHSD (see figure A). Temperature was constant at 25°C. (B) Mean absorption changes at 261 nm (from three determinations) as a function of the protein concentration indicating binding of 3 to PbHSD. A sigmoidal logistic equation was adjusted to data point (red line) yielding a dissociation constant at 229 ± 8.1 nM (red line). The standard deviation at each PbHSD concentration is shown as error bars.

demonstrates the interaction between the two molecules (Figure 4A). If no interaction had occurred, the expected result would be an opposite effect, that is, we should expect a decrease in the absorbance as a function of the dilution. The spectral variation observed at 261 nm along titration of PbHSD in the carbohydrazide 3 solution clearly demonstrates a transition between two states, which correspond to free and bounded compound (Figure 4B). From the adjustment of Equation 1 to the experimental points of Figure 4B it was possible to estimate the dissociation constant in 229 ± 8.1 nM.

Figure 5. Root mean square deviation of *PbHSD* main-chain atoms along simulation in the presence of substrate (HSE) or ligand 3.

Figure 6. Root mean square fluctuation of α -carbons from *PbHSD* at last 5 ns of the dynamics.

Molecular dynamics simulations

Molecular dynamics simulations were run along the time of 100 ns, to evaluate the behavior of the enzyme *PbHSD* in the presence of substrate *L*-homoserine (HSE) and the ligand **3**, which exhibit the best *in vitro* results.

The results in Figure 5 show the root mean square deviation (RMSD) of the main chain atoms of *PbHSD* along the simulation. All complexes achieved thermodynamic equilibrium after 25 ns, as indicated by a stable RMSD value.

The last 5 ns of the simulation were analyzed to access the movement of the α -carbons of each residue, demonstrated by root mean square fluctuation (RMSF) in Figure 6. The most flexible regions are the N-terminal coil and around residue 198, that refers to a loop in the enzyme outer surface. However the movement of this segment did not affect the docking simulation, since these residues are quite distant of HSE active site.

Figure 7 shows the radius of gyration (r_{gyr}) which is defined as “the root mean square distance of the collection

Figure 7. Radius of gyration (r_{gyr}) calculated for *Pb*HSD complexes along simulation.

Residue	HSE (substrate)	Ligand 3
LYS-122	0.89	–
PHE-179	0.14	–
SER-180	0.21	0.48
GLY-181	0.14	0.19
THR-182	0.16	0.77
GLY-215	–	0.64
TYR-216	–	0.29
GLU-218	0.75	0.96
ASP-223	0.35	–
ASP-224	0.48	1.00
ASP-229	0.98	0.64
LYS-233	0.98	0.14
GLY-349	0.45	0.14
ALA-350	0.17	0.58
GLY-351	–	0.29
NAD-371	0.70	0.43

of atoms from their common center of gravity along simulation” [14]. If the value of r_{gyr} oscillates little along the simulation, it means that the enzyme remains folded and the interaction with ligand not unfold the protein. So, it can be seen that all the complexes exhibit a r_{gyr} around 27.5 Å after 7.5 ns equilibration, showing that every of them are stable.

The active site may be defined by the “residues making any contact with the ligand within a distance range of 4.0 Å” [14]. In order to estimate the importance of each residue in the active site delimitation, the contact frequency of the *Pb*HSD residues with the compound **3** was determinate (Table 4). It is possible to analyze that the residues that maintain ligand **3** are mainly GLU218 and ASP224, followed by THR182, GLY215 and ASP229.

Conclusion & future perspective

In summary, a series of new 4-methoxy-naphthalene derivatives was synthesized based on *hit* compound. The most active compound **3** showed several advantages as a promising antifungal lead: it showed potent antifungal

activity against *Paracoccidioides* spp with MIC ranging from 8 to 32 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ and also show antifungal activity against *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. glabrata*. It was about four-times more active than *hit* compound against *Paracoccidioides* spp. it showed good synergistic antifungal activities in combination with AMB against *P. brasiliensis*; it not show toxicity against monkey kidney and murine macrophage cells. Molecular dynamics simulations show that carbohydrazide **3** let the *PbHSD* protein more stable and the titration assays confirm the binding with the enzyme. The results obtained in human pathogenic fungal strains suggest that new carbohydrazide **3** is attractive lead for drug development to treat paracoccidioidomycoses.

Summary points

- Novel 4-methoxy-naphthalene derivatives were synthesized based on *hits* structures in order to evaluate the antifungal activity against *Paracoccidioides* spp.
- Antifungal activity of compounds was evaluated against *P. brasiliensis*.
- The most promising compounds **2** and **3** were tested against eight clinically important fungal species.
- Compound **3** was the more active compound with MIC of 8 to 32 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ for *Paracoccidioides* spp. also shows antifungal activity against *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. glabrata*.
- Carbohydrazide **3** showed good synergistic antifungal activities in combination with amphotericin B against *P. brasiliensis*.
- Carbohydrazide **3** and its combination with amphotericin B not show toxicity against cells lineage.
- Titration assay of carbohydrazide **3** with *PbHSD* enzyme demonstrates the binding ligand-protein.
- Molecular dynamics simulations show that carbohydrazide **3** let the *PbHSD* protein more stable.
- New carbohydrazide **3** is a promising antifungal lead for drug development against paracoccidioidomycoses.

Supplementary data

To view the supplementary data that accompany this paper please visit the journal website at: www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/fmb-0276-2018

Acknowledgments

The authors thank the CENAPAD/SP (proj520) for computational facilities and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for fellowship.

Financial & competing interests disclosure

This work was supported by Fundação Araucária (Grant #147/14), CNPq (404455/2016-6). The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

No writing assistance was used in the production of this manuscript.

References

Papers of special note have been highlighted as: • of interest

1. Wanke B, Aidé MA. Paracoccidioidomycose. *J. Bras. Pneumol.* 35, 1245–1249 (2009).
2. Teixeira MM, Theodoro RC, Nino-Vega G, Bagagli E, Felipe MSS. *Paracoccidioides* species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. *PLoS Pathog.* 10(10), 1–4 (2014).
3. Teixeira MM, Theodoro RC, Carvalho MJ et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol. Phylog. Evol.* 52, 273–83 (2009).
4. Teixeira MM, Theodoro RC, Oliveira FFM et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications *Med. Mycol.* 52, 19–28 (2014).
5. Desjardins CA, Champion MD, Holder JW, Muszewska A, Goldberg J. Comparative genomic analysis of human fungal pathogens causing Paracoccidioidomycosis. *PLoS Genet.* 7(10), 1–15 (2011).
6. Martinez R. New trends in paracoccidioidomycosis epidemiology. *J. Fungi.* 3, 1–13 (2017).
7. Mendes RP, Cavalcante RS, Marques SA et al. Paracoccidioidomycosis: current perspectives from Brazil. *Open Microbiol. J.* 11, 224–282 (2017).

8. Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Colombo AL *et al.* Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. *Epidemiol. Serv. Saude.* 27(spe), e0500001 (2018).
9. Colombo AL, Tobón A, Restrepo A, Queiroz-Telles F, Nucci M. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Med. Mycol.* 49, 785–798 (2011).
10. Queiroz-Telles F, Fahal AH, Falci DR, Caceres DH, Chiller T, Pasqualotto AC. Neglected endemic mycoses. *Lancet* 11, e367–e377 (2017).
- **Review of neglected endemic mycosis, describing clinical presentation, diagnosis and treatment.**
11. Naranjo TW, Lopera DE, Diaz-Granados LR, Duque JJ, Restrepo A, Cano LE. Combined itraconazole-pentoxifylline treatment promptly reduces lung fibrosis induced by chronic pulmonary paracoccidioidomycosis in mice. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 24, 81–91 (2011).
12. Abadio AKR, Kioshima ES, Leroux V, Martins NF, Maigret B, Felipe MSS. Identification of new antifungal compounds targeting thioredoxin reductase of *Paracoccidioides* genus. *PLoS ONE* 10, 1–18 (2015).
- **A computer-aided screening strategy against the TRR1 protein of *Paracoccidioides lutzii*.**
13. Ejim L, Mirza IA, Capone C *et al.* New phenolic inhibitors of yeast homoserine dehydrogenase. *Bioorganc. Med. Chem.* 12, 3825–3830 (2004).
- **Identified a new class of inhibitors of homoserine dehydrogenase and performed X-ray crystal structural analysis of one of the inhibitors in complex with enzyme.**
14. Bagatin MC, Pimentel AL, Biavatti DC *et al.* Targeting homoserine dehydrogenase from *Paracoccidioides* Genus against systemic fungal infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61(9), 1–13 (2017).
- **First study that evaluated new potential inhibitors of the enzyme homoserine dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis*.**
15. Harikishore A, Leow ML, Niang M *et al.* Adamantyl derivative as a potent inhibitor of plasmodium FK506 binding protein 35. *Med. Chem. Lett.* 4, 1097–1101 (2013).
16. Kunishima M, Kawachi C, Morita J, Terao K, Iwasaki F, Tani S. 4-(4, 6-Dimethoxy-1, 3, 5-triazin-2-yl)-4-morpholinium chloride: an efficient condensing agent leading to the formation of amides and esters. *Tetrahedron* 55, 13159–13170 (1990).
- **Describe the synthesis of DMTEM and its efficiency in the condensation of carboxylic acids and amines.**
17. Poulsen SA. Direct screening of a dynamic combinatorial library using mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 17, 1074–1080 (2006).
18. Netto CF, Vegas VS, Sciannaméa IM, Guarnieri DB. The polysaccharidic antigen from *Paracoccidioides brasiliensis*. Study of the time of cultivation necessary for the preparation of the antigen. *Rev. Inst. Med. Trop.* 11, 177–181 (1969).
19. CLSI. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi: Approved Standard-Second Edition. LSI document M38-A2.* Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (2008). https://clsi.org/media/1455/m38a2_sample.pdf
20. Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH. Combination antifungal therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 693–715 (2004).
21. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 1 (2003).
- **Instructions on FICI interpretation of 'synergy' (FICI ≤ 0.5), 'antagonism' (FICI > 4.0) and 'no interaction' (FICI > 0.5–4.0).**
22. Colombo MF, Seixas FAV. Novel allosteric conformation of human HB revealed by the hydration and anion effects on O(2) binding. *Biochemistry* 38, 11741–11748 (1999).
23. DeLaBarre B, Thompson PR, Wright GD, Berghuis AM. Crystal structures of homoserine dehydrogenase suggest a novel catalytic mechanism for oxidoreductases. *Nat. Struct. Biol.* 7, 238 (2000).
24. Phillips JC, Braun R, Wang W *et al.* Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comp. Chem.* 26, 1781–1802 (2005).
25. Mackerell JAD, Feig M, Brooks CL. Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. *J. Comp. Chem.* 25, 1400–1415 (2004).
26. Zoete V, Cuendet MA, Grosdidier A, Michielin O. SwissParam: a fast force field generation tool for small organic molecules. *J. Comput. Chem.* 32, 2359–2368 (2011).
27. Neese F. The ORCA program system. *Comput. Mol. Sci.* 2, 73–78 (2012).