UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

RENATA VIEIRA BUENO

Estudos estruturais e funcionais da enzima N⁵, N¹⁰ - metilenotetrahidrofolato-desidrogenase-ciclohidrolase de *Xanthomonas albilineans* aplicados à descoberta de candidatos a inibidores para o tratamento da escaaldadura das folhas

São Carlos
2018

RENATA VIEIRA BUENO

Estudos estruturais e funcionais da enzima N⁵, N¹⁰ - metilenotetrahidrofolato-desidrogenase-ciclohidrolase de *Xanthomonas albilineans* aplicados à descoberta de candidatos a inibidores para o tratamento da escladadura das folhas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

**Área de Concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Rafael V. C. Guido.**

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

SÃO CARLOS

2018

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.

Bueno, Renata Vieira

Estudos estruturais e funcionais da enzima N5, N10 - metilenotetrahidrofolato-desidrogenase-ciclohidrolase de *Xanthomonas albilineans* aplicados à descoberta de candidatos a inibidores para o tratamento da escaudadura das folhas / Renata Vieira Bueno; orientador Rafael Victório Carvalho Guido - versão corrigida -- São Carlos, 2018.

158 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2018.

1. Cana-de-açúcar. 2. Escaudadura das folhas. 3. *Xanthomonas albilineans*. 4. FoLD. I. Guido, Rafael Victório Carvalho, orient. II. Título.

Às minhas Marias.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo amor incondicional, dedicação e suporte. Ao meu irmão, por todas as travessuras e aprendizados. À tia Janaína, pela presença diária, carinho e apoio irrestrito. À vovó Maria, pelos ouvidos pacientes, pelo colo calmo e tranquilo, e pela doçura dos momentos que compartilhamos. Obrigada por todos os sonhos que vocês incentivaram e por todas as etapas que vocês ajudaram a superar.

Ao Achiles, por toda cumplicidade, amor, paciência e companheirismo - ainda mais intensos nos últimos meses. Obrigada por estar presente e tornar todos os caminhos mais serenos e felizes.

Ao Professor Rafael V. C. Guido, pela oportunidade, confiança e orientação ao longo desse período. Obrigada pela amizade, pela presença, por todas discussões científicas e ideias.

À Dr. Silvana Aparecida Creste Dias de Souza do Instituto Agrônomo de Campinas, por ceder as cepas de *X. albilineans*.

Agradeço a todos os amigos feitos ao longo dessa jornada, em especial Maluf, Gustavo, Andrew, Antônio, Bachega, Fernanda, Caroline, Lorena e Juliana. Obrigada por tornarem os dias tão divertidos e as experiências tão enriquecedoras. Andrew e Gustavo, obrigada por estarem sempre disponíveis, seja para um café ou para suporte técnico. Fernando Maluf, obrigada pela constante maiêutica e desafios.

À Carla Chiodi, pela empatia capaz de tornar a Escócia um ambiente caloroso. Ao Professor Bill Hunter e à Alice Dowson, por todo aprendizado que vocês me proporcionaram. Aos amigos Paul, Matt e Genady, pelos milhares de chocolates, seminários e experimentos compartilhados.

Às amigas Gisele, Karlla e Karina. Juntas somos mais fortes, sempre.

Aos professores do IFSC, pelo conhecimento transmitido. Aos funcionários da Secretaria, do Serviço de Pós-Graduação e da Biblioteca do IFSC, pela prestatividade e assessoria.

Agradeço à FAPESP pela concessão da bolsa de Doutorado Regular (2013/04737-8) e bolsa de Estágio em Pesquisa no Exterior (2016/16038-5), cujo suporte financeiro possibilitou uma trajetória rica em experiências e conhecimento.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

BUENO, R. V. Estudos estruturais e funcionais da enzima N^5 , N^{10} -metilenotetrahidrofolato-desidrogenase-ciclohidrolase de *Xanthomonas albilineans* aplicados à descoberta de candidatos a inibidores para o tratamento da escaldadura das folhas. 2018. 158 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

A escaldadura das folhas, causada pela bactéria Gram-negativa *Xanthomonas albilineans*, é uma das doenças mais importantes que afetam o cultivo da cana-de-açúcar, causando significativa diminuição da produtividade, necessidade de reforma precoce dos canaviais e queda da qualidade do caldo extraído. O impacto dessa doença somado à ausência de agentes químicos ou biológicos para o controle estimula a pesquisa para a descoberta e desenvolvimento de moléculas bioativas como candidatos a novos defensivos agrícolas. Nesse contexto, a enzima N^5 , N^{10} -metilenotetrahidrofolato desidrogenase ciclohidrolase (FolD) destaca-se como potencial alvo molecular. O projeto de doutoramento visou a caracterização estrutural e funcional da FolD de *X. albilineans* (XaFolD), além da triagem de moléculas candidatas a inibidores. Para tanto, foram conduzidos estudos integrados em biologia molecular estrutural e química biológica. A expressão heteróloga e purificação da XaFolD resultaram na produção de proteína funcional e adequada aos ensaios de cristalização. A caracterização das atividades desidrogenase e ciclohidrolase da XaFolD indicou os valores de K_M para os substratos de ambas as reações, N^5 , N^{10} -metileno-tetrahidrofolato ($50 \pm 10 \mu\text{M}$) e N^5 , N^{10} -metenil-tetrahidrofolato ($32 \pm 3 \mu\text{M}$) e do cofator NADP^+ ($688 \pm 81 \mu\text{M}$). A estrutura da XaFolD na forma apo, elucidada a $2,1 \text{ \AA}$ de resolução, revelou uma proteína constituída por 11 hélices alfa e 9 fitas beta distribuídas em um domínio N-terminal catalítico e um domínio C-terminal de ligação ao dinucleotídeo. A enzima pura foi utilizada para a triagem de 1.124 fragmentos por interferometria de biocamada (BLI) e foram identificados três ligantes, **DDD00808259** ($K_D = 260 \mu\text{M}$), **DDD01305586** ($K_D = 3 \text{ mM}$) e **DDD00100784** ($K_D = 210 \mu\text{M}$), com valores de afinidade na faixa do submilimolar até baixo milimolar. Paralelamente, uma abordagem computacional foi empregada para a triagem virtual de base de dados de compostos como candidatos a ligantes da XaFolD. Os critérios utilizados resultaram na seleção e aquisição de 31 compostos de diferentes classes químicas para avaliação da atividade inibitória frente a enzima alvo. Por fim, ensaios fenotípicos de triagem de inibidores resultaram na descoberta de compostos capazes de inibir o crescimento *in vitro* de *X. albilineans*. Dentre os inibidores identificados o composto **THP2** apresentou a maior potência, com valor determinado de EC_{50}

igual a $23 \pm 2 \mu\text{M}$. Os dados estruturais, cinéticos e biofísicos obtidos nesta tese de doutoramento formam a base experimental e computacional para a descoberta e planejamento de inibidores candidatos a novos agroquímicos para o tratamento da escaldadura das folhas.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar. Escaldadura das folhas. *Xanthomonas albilineans*. FOLD.

ABSTRACT

BUENO, R. V. **Structural and functional studies of the enzyme N⁵, N¹⁰ -methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-cyclohydrolase of *Xanthomonas albilineans* applied to the discovery of inhibitor candidates for the treatment of leaf scald.** 2018. 158 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

The leaf scald disease is a severe condition which affects sugarcane crops. Leaf scald is caused by the Gram-negative bacteria *Xanthomonas albilineans* and it has a dramatic impact on crop productivity, including the yield reduction and dropping the quality of the juice. The impact of this disease besides the absence of chemical or biological agents to treat it stimulates the research towards the discovery and development of bioactive molecules as lead candidates to new agrochemicals. In this context, the enzyme N⁵, N¹⁰-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-cyclohydrolase (XaFolD) stands out as a potential molecular target. Facing this scenario, the PhD project comprised the structural and functional characterization of *X. albilineans* FOLD (XaFolD) and the screening of molecules to identify inhibitors. For this purpose, integrated studies in structural molecular biology and biological chemistry have been carried out. Suitable protein for crystallization and kinetic assays was produced by heterologous expression. The XaFolD dehydrogenase and cyclohydrolase activities were characterized, revealing K_M values of $50 \pm 10 \mu\text{M}$ for N⁵, N¹⁰-methylenetetrahydrofolate, $32 \pm 3 \mu\text{M}$ for N⁵, N¹⁰-methenyltetrahydrofolate, and $688 \pm 81 \mu\text{M}$ for NADP⁺. The structure of XaFolD in the apo form was elucidated at 2.1 Å resolution and it revealed a protein consisting of 11 alpha helices and 9 beta sheets distributed in the catalytic N-terminal domain and the C-terminal dinucleotide binding domain. Screening of 1,124 fragments by biolayer interferometry (BLI) revealed three ligands, **DDD00808259**, **DDD01305586** and **DDD00100784**, with determined K_D values of 260 μM , 3 mM and 210 μM , respectively. Furthermore, a virtual screening was performed to identify XaFolD ligands. As a result, 31 chemically diverse compounds were selected to be evaluated by potency assays. Additionally, phenotypical assays against *X. albilineans* have been performed and inhibitors were identified. Among them, the compound **THP2** presented the highest potency, with a determined value of EC_{50} equal to $23 \pm 2 \mu\text{M}$. The structural, kinetic, and biophysical data obtained in this PhD thesis provide the molecular basis for discovering and planning bioactive molecules as agrochemicals to control leaf scald disease.

Keywords: Sugarcane. Leaf scald. *Xanthomonas albilineans*. FOLD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Oferta interna das principais fontes de energia no Brasil em 2017 (ano base 2016).....	24
Figura 2 – Produção global de etanol entre 2007 e 2015.....	24
Figura 3 – Estimativa dos custos de Pesquisa & Desenvolvimento para a introdução de um novo agroquímico no mercado.....	26
Figura 4 – Etapas do processo de Pesquisa & Desenvolvimento para a introdução de um novo agroquímico no mercado. 26	
Figura 5 – Distribuição geográfica de <i>Xanthomonas albilineans</i> no mundo.....	28
Figura 6 – Sinais e sintomas da cana-de-açúcar acometida pela escaldadura das folhas. A , estrias brancas desenvolvidas durante a fase crônica. B , brotação das gemas laterais e necrose das folhas durante a fase aguda.	29
Figura 7 – Estrutura 2D do tetrahydrofolato.	31
Figura 8 – Reações catalisadas pela FolD. A , conversão do substrato N ⁵ , N ¹⁰ -metileno-THF para a produção do intermediário N ⁵ , N ¹⁰ -metenil-THF. B , hidrólise do N ⁵ , N ¹⁰ -metenil-THF para a produção do N ¹⁰ -formil-tetrahydrofolato	32
Figura 9 – Reações catalisadas pela FolC. A , atividade DHFS. B , atividade FPGS; R ₁ e R ₂ podem variar, dependendo do substrato da FPGS.....	33
Figura 10 – Reação catalisada pela FolE.....	34
Figura 11 – Acompanhamento do crescimento de <i>Xanthomonas albilineans</i> no meio seletivo XAS durante 07 dias. IA , controle negativo do crescimento, composto por meio XAS líquido; IB , crescimento de <i>X. albilineans</i> em meio XAS líquido. II , crescimento de <i>X. albilineans</i> em meio XAS sólido. 63	
Figura 12 – Gel de eletroforese em agarose 1% da reação de amplificação do fragmento gênico PGBL (288 bp). MK = marcador de massa molecular, 1 = cepa IBSBF326, 2 = cepa IBSBF740.....	65
Figura 13 – Gel de agarose 1% do produto de amplificação dos segmentos gênicos de interesse. MK , marcador de massa molecular. 1 , clonagem do segmento gênico codificante para a enzima <i>XaFolC</i> , com 1260 bp. 2 , clonagem do segmento gênico codificante para a enzima <i>XaFolD</i> , com 891 bp. 3 , clonagem do segmento gênico codificante para a enzima <i>XaFolE</i> com 560 bp.	65
Figura 14 – Gel de agarose 1% das reações de PCR de colônia, obtidas após a clonagem das proteínas <i>XaFolC</i> (A), <i>XaFolD</i> (B) e <i>XaFolE</i> (C) nos vetores pETM11, pETTrx-1a e pETNus-1a. MK , marcador de massa molecular; (+), colônias positivas; (-), colônias negativas; 1* (em C), pETNus-1a- <i>XaFolD</i> . A presença do segmento codificante das enzimas <i>XaFolC</i> , <i>XaFolD</i> e <i>XaFolCE</i> foi confirmada pelas bandas amplificadas na região dos 1260 bp, 891 bp e 560 bp, respectivamente, indicadas por (+).	67
Figura 15 – Gel de poliacrilamida 15% para avaliação do perfil de expressão das frações solúveis de <i>XaFolD</i> . MK , marcador de massa molecular. 1 , construção pETM11-6HIS- <i>XaFolD</i> . 2 , construção pETM11-6HIS-TRX- <i>XaFolD</i> . Em destaque, bandas correspondentes à enzima <i>XaFolD</i> expressa na fração solúvel fusionada à 6His (pETM11) e 6HISTRX (pETTRX-1a).....	68
Figura 16 – Cromatogramas e gel SDS-PAGE para acompanhamento das etapas de purificação a partir da construção pET-6HIS-TRX- <i>XaFolD</i> . A , primeira cromatografia de afinidade; B , segunda cromatografia de afinidade; C , cromatografia de exclusão molecular; D , gel SDS-PAGE; MK , marcador de massa molecular; 1 , fração solúvel do lisado celular; 2 , fração obtida após primeira cromatografia de afinidade; 3 , frações obtidas após clivagem por TEV protease; 4 , 6HIS-TRX- <i>XaFolD</i> obtida por cromatografia de exclusão molecular; 5 , <i>XaFolD</i> após etapa final de purificação por cromatografia de exclusão molecular; 6 , 6HIS-TRX após etapa final de purificação por cromatografia de exclusão molecular.....	70
Figura 17 – Gel de poliacrilamida 10% para avaliação do perfil de expressão da <i>XaFolC</i> a partir da construção pETM11- <i>XaFolC</i> . A , avaliação da adição de NaCl a 2 M, uréia a 0,5 M e 0,2% de detergente ao tampão de lise, originalmente composto por 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl e	

10% glicerol. B , avaliação da variação do pH do tampão de lise (pH 5 a 9) e da adição dos detergentes NP40 e Tween 20. MK , marcador de massa molecular. I , fração insolúvel. S , fração solúvel. Em destaque, bandas de 47,8 kDa correspondentes à enzima <i>XaFolC</i> fusionada à 6xHis (pETM-11).	71
Figura 18 – Gel de poliacrilamida 15% para avaliação do perfil de expressão de <i>XaFolE</i> . A , construção pET-M11- <i>XaFolE</i> . B , construção pET-TRX- <i>XaFolE</i> . C , construção pET-Nus-1a- <i>XaFolE</i> . MK , marcador de massa molecular. I , fração insolúvel. S , fração solúvel. As condições de temperatura e o meio utilizado para expressão estão indicados. Em destaque, bandas de 25,6 kDa (A), 36,6 kDa (B) e 79,6 kDa (C), correspondentes à <i>XaFolE</i> em diferentes vetores.	71
Figura 19 – Cromatogramas e gel SDS-PAGE para acompanhamento das etapas de purificação a partir da construção pET-6HIS- <i>XaFolE</i> . A , primeira cromatografia de afinidade; B , segunda cromatografia de afinidade; C , cromatografia de exclusão molecular; D , gel SDS-PAGE; MK , marcador de massa molecular. 1 , <i>XaFolE</i> após etapa final de purificação por cromatografia de exclusão molecular.	72
Figura 20 – Reações catalisadas pela <i>XaFolD</i> . 1 , conversão do substrato <i>N</i> ⁵ , <i>N</i> ¹⁰ -metileno-THF para a produção do intermediário <i>N</i> ⁵ , <i>N</i> ¹⁰ -metenil-THF. 2 , hidrólise do <i>N</i> ⁵ , <i>N</i> ¹⁰ -metenil-THF para a produção do <i>N</i> ¹⁰ -formil-tetrahidrofolato.	75
Figura 21 – A , Determinação do valor de <i>K_M</i> e <i>V_{MÁX}</i> para o substrato <i>N</i> ⁵ , <i>N</i> ¹⁰ -metileno-THF na presença de 6 mM de NADP ⁺ ; B , Determinação do valor de <i>K_M</i> e <i>V_{MÁX}</i> para o cofator NADP ⁺ na presença de 500 μM do substrato <i>N</i> ⁵ , <i>N</i> ¹⁰ -metileno-THF. (C). Determinação do valor de <i>K_M</i> e <i>V_{MÁX}</i> para o segundo o substrato <i>N</i> ⁵ , <i>N</i> ¹⁰ -metil-THF.	77
Figura 22 – Determinação do efeito do pH (A) e de DMSO (B) na atividade ciclohidrolase da <i>XaFolD</i>	78
Figura 23 – Imagem representativa do padrão de difração do cristal da proteína <i>XaFolD</i> (5,0 mg/mL) obtido a partir da condição H7 do kit comercial Index, composta por 0,15M de ácido málico (pH 7,0) e 20% (p/v) PEG 3350.	79
Figura 24 – Imagem do cristal da proteína <i>XaFolD</i> (5,0 mg/mL) na forma apo, obtido a partir da condição de cristalização composta por 0,15M de ácido málico, 16% (p/v) PEG 3350 e 0,10 M e cacodilato pH 6,5.	80
Figura 25 – Imagens representativas do padrão de difração do cristal da proteína <i>XaFolD</i> na forma apo, obtido a partir da condição de cristalização composta por 0,15M de ácido málico, 16% (p/v) PEG 3350 e 0,10 M de cacodilato pH 6,5. A , primeira imagem de difração (0°); B , imagem de difração após rotação do cristal a 90°.	81
Figura 26 – Cadeia A da <i>FolD</i> de <i>E. coli</i> 1B0A utilizada como molde para a substituição molecular. A , representação dos dois domínios, N- e C-ter. B , domínio C-ter. C , domínio N-ter.	83
Figura 27 – Imagens dos cristais obtidos na triagem das condições de cristalização da <i>XaFolD</i> (5,0 mg/mL) incubada com NAD ⁺ (1,0 mM). A , PEGS B12; B , PEGS C08; C , PEGS D07; D , PEGS D10; E , PEGS G03; F , PEGS II B12; G , PEGS II C07; H , MORPHEUS E12.	86
Figura 28 – Representação do conteúdo da unidade assimétrica do modelo cristalográfico construído para a proteína <i>XaFolD</i> . Em azul, cadeia A; em laranja, cadeia B.	88
Figura 29 – Representação da cadeia A da proteína <i>XaFolD</i> . A , domínio N-terminal destacado em azul. B , domínio C-terminal destacado em azul.	89
Figura 30 – Alinhamento estrutural dos modelos de <i>XaFolD</i> (PDB ID 5NHS) e <i>EcFolD</i> (PDB ID 1B0A) representados em azul e em magenta, respectivamente. A , alinhamento realizado para as cadeias completas. B , alinhamento dos domínios N-terminal e C-terminal.	90
Figura 31 – Alinhamento dos domínios N- e C-terminal dos modelos de <i>XaFolD</i> (PDB ID 5NHS) e <i>EcFolD</i> (PDB ID 1B0A). Em destaque, a hélice C-terminal representada em azul para a <i>XaFolD</i> e em magenta para a <i>EcFolD</i>	90
Figura 32 – Alinhamento do sítio ativo N-terminal dos modelos de <i>XaFolD</i> (PDB ID 5NHS, cadeia A) e <i>TbFolD</i> (PDB ID 4CJX, cadeia A), representadas em ciano e amarelo, respectivamente. Os resíduos responsáveis pela interação com o substrato (ou com inibidores) estão destacados em linhas ciano para a <i>XaFolD</i> e em linhas amarelas para a <i>TbFolD</i> . O inibidor 9L9, análogo estrutural do substrato, está representado em bastões, com carbonos em amarelo.	91

Figura 33 – Representação do sítio ativo N-terminal dos modelos de <i>TbFolD</i> (PDB ID 4CJX, cadeia A) e <i>XaFolD</i> (PDB ID 5NHS, cadeia A). Os dois modelos foram alinhados por domínios, e estão representados na mesma orientação. Em A , o modelo <i>TbFolD</i> está representado em amarelo, com resíduos G273, G274 e G276 representados em verde e resíduos T51, L55 e L252 coloridos com átomos de carbono em branco, nitrogênio em azul e oxigênio em vermelho. Em B , o modelo <i>XaFolD</i> está representado em ciano, com resíduos G272, G273 e G275 representados em verde e resíduos V58, N62 e L251 coloridos com átomos de carbono em branco, nitrogênio em azul e oxigênio em vermelho.	92
Figura 34 – Alinhamento do sítio ativo C-terminal dos modelos de <i>XaFolD</i> (PDB ID 5NHS, cadeia A) e <i>TbFolD</i> (PDB ID 4CJX, cadeia A), representadas em ciano e amarelo, respectivamente. Os resíduos responsáveis pela interação com o NADP ⁺ estão destacados em linhas, com carbonos em ciano para a <i>XaFolD</i> e com carbonos em amarelo para a <i>TbFolD</i>	93
Figura 35 – Alinhamento sequencial dos modelos de FolD disponíveis no PDB, utilizando o T-coffee ⁹¹ no programa Jalview 2.10.3. ⁹² Os resíduos estão coloridos de acordo com a hidrofobicidade, com os resíduos mais hidrofóbicos em vermelho e os mais hidrofílicos em azul. Para o alinhamento contra a 5NHS (<i>XaFolD</i>) foram considerados os modelos de FolD disponíveis no PDB, indicados na Tabela 10. Cada sequência está identificada pelas iniciais do gênero e espécie; <i>EcFolD</i> = FolD de <i>E. coli</i> ; <i>PaFolD</i> = FolD de <i>P. aeruginosa</i> ; <i>FtFolD</i> = FolD de <i>F. tularensis</i> ; <i>CjFolD</i> = FolD de <i>C. jejuni</i> ; <i>HsFolD</i> = FolD de <i>H. sapiens</i> ; <i>LmFolD</i> = FolD de <i>L. major</i> ; <i>HpFolD</i> = FolD de <i>H. pylori</i> ; <i>AbFolD</i> = FolD de <i>A. baumannii</i> ; <i>TaFolD</i> = FolD de <i>T. acidophilum</i> . <i>TbFolD</i> = FolD de <i>T. brucei</i> ; <i>MeFolD</i> = FolD de <i>M. extorquens</i> ; <i>MtFolD</i> = FolD de <i>M. tuberculosis</i> . Os resíduos V176 e K200 estão indicados por asteriscos.	95
Figura 36 – Produto da reação de PCR de colônia da <i>XaFolD</i> V176R. MK , marcador. 1-8 , produto da reação de PCR para 8 colônias.	96
Figura 37 – Representação esquemática do ensaio de interferometria de biocamada para a detecção de eventos de ligação entre uma biomolécula imobilizada em biossensores e ligantes presentes em solução.	100
Figura 38 – Biotinilação catalisada pela proteína biotina ligase (BirA).	101
Figura 39 – Cromatogramas e gel SDS-PAGE para acompanhamento das etapas de purificação a partir da construção pET-6HIS-BAP- <i>XaFolD</i> . A , primeira cromatografia de afinidade; B , segunda cromatografia de afinidade; C , cromatografia de exclusão molecular; D , gel SDS-PAGE; MK , marcador de massa molecular; 1 , fração insolúvel do lisado celular; 2 , fração solúvel do lisado celular; 3 , frações obtidas após primeira cromatografia de afinidade; 4 , frações obtidas após segunda cromatografia de afinidade; 5 , BAP- <i>XaFolD</i> biotinilada após etapa final de purificação por cromatografia de exclusão molecular.	102
Figura 40 – Cromatogramas e gel SDS-PAGE para acompanhamento das etapas de purificação a partir da construção pET-6HIS- <i>XaFolD</i> . A , primeira cromatografia de afinidade; B , cromatografia de exclusão molecular e gel SDS-PAGE; MK , marcador de massa molecular; 1 , fração solúvel do lisado celular; 2 e 3 , frações obtidas após primeira cromatografia de afinidade; 4 , 6HIS- <i>XaFolD</i> após etapa final de purificação por cromatografia de exclusão molecular.	103
Figura 41 – A , Curvas de associação e dissociação do substrato N ⁵ , N ¹⁰ -metenil- THF à proteína <i>XaFolD</i> biotinilada imobilizada em sensores SSA. B , curva concentração-resposta obtida para determinação de K _D do N ⁵ , N ¹⁰ -metenil- THF.	104
Figura 42 – Representação da associação e dissociação do substrato N ⁵ , N ¹⁰ -metenil-THF à proteína <i>XaFolD</i> biotinilada imobilizada em sensores SSA. A resposta dos 16 sensores está sobreposta, e cada sensor está representado por uma cor.	105
Figura 43 – Distribuição da magnitude de resposta observada para cada sensor, expressa como mudança no padrão de interferência observado. Todos os sensores representados são da mesma placa de ensaio, e cada sensor está representado por uma cor. Os fragmentos testados pelo mesmo sensor estão representados pela mesma cor.	105
Figura 44 – Curvas de associação e dissociação de 5 dos 63 fragmentos considerados falso positivos durante a inspeção individual dos dados. A e B , dissociação incompleta. C , associação e dissociação lentas. D , oscilação da resposta durante a associação. E , resposta maior que três vezes a resposta do controle positivo, N ⁵ , N ¹⁰ -metenil-THF.	106

Figura 45 – Agrupamento por similaridade química ($\geq 60\%$) dos 50 fragmentos com maior magnitude de resposta (em nm). Destacados em vermelho estão os fragmentos DDD00808259 (Grupo 1), DDD1000784 (Grupo 2) e DDD1305586 (Grupo 9), selecionados para compra.	108
Figura 46 – Estrutura 2D e curvas de associação e dissociação dos compostos 3-(2-aminoetil) -1-metil-2,4(1H,3H)-quinazolinediona (A), ácido 2-(3-fluorofenil) propanoico (B) e 1-ciclo-hexil-3-piridin-3-il-metil-ureia (C), testados a 200 μM	108
Figura 47 – Representação do perfil de interação durante os ensaios de BLI e determinação da constante de dissociação, K_D . A , <i>hit</i> 1. B , <i>hit</i> 2. C , <i>hit</i> 3	110
Figura 48 – Representação esquemática do equipamento utilizado pela calorimetria de titulação isotérmica (A) e dos resultados obtidos em um ensaio de ITC (B). Em B, no painel superior estão os picos referentes às injeções consecutivas de ligante, até a saturação dos sítios da macromolécula na célula de amostra. Esses picos correspondem à diferença em compensação de energia realizada pelo equipamento para manter as duas células na mesma temperatura, em função do tempo. Em B, no painel inferior está representada a área calculada de cada pico, normalizada por mol de ligante injetado, em função da razão das concentrações de ligante e macromolécula. Os parâmetros estequiometria (n), constante de afinidade (K_a) e variação de entalpia (ΔH) são calculados a partir de modelos matemáticos de interação.	112
Figura 49 – Resultados do ensaio de ITC para o NADP^+	113
Figura 50 – Resultados do ensaio de ITC para o N^5 , N^{10} -metenil-THF.	114
Figura 51 – Resultados do ensaio de ITC para o <i>hit</i> 1.	115
Figura 52 – Resultados do ensaio de ITC para o <i>hit</i> 3.	116
Figura 53 – Ensaio concentração-resposta para o fragmento DDD01305586 (<i>hit</i> 2).	117
Figura 54 – Mapa de densidade eletrônica $F_o - F_c$ contornado a 3.0σ sobreposto à estrutura do inibidor 9L9 (PDB ID 4CJX).	118
Figura 55 – Superposição do ligante 9L9 na orientação do modelo cristalográfico 4CJX (átomos de carbono representados em branco) e na orientação observada após protocolo de ancoragem (átomos de carbono representados em ciano).	118
Figura 56 – Representação 2D das interações entre ligantes selecionados a partir da triagem virtual e os resíduos do sítio ativo. A , composto <i>Enamine Agro-like</i> Z1464631963. B , composto <i>ChemBridge DIVERSet</i> TM 47397786. C , <i>Enamine Antibacterial</i> Z281568730. D , legenda das interações representadas.	121
Figura 57 – Cultivo de <i>X. albilineans</i> (cepa Xa11) em meio XAS líquido ao longo de 7 dias.	130
Figura 58 – Crescimento de <i>Xanthomonas albilineans</i> . A , crescimento em meio seletivo XAS (verde) e controle positivo de crescimento em meio XAS suplementado com 1% de DMSO (azul). B , controle negativo de crescimento em meio XAS suplementado com 0,5 mg/mL de canamicina.	130
Figura 59 - Ensaios fenotípicos de inibição do crescimento de <i>X. albilineans</i> . A , estrutura 2D do composto THP2 e curvas de crescimento de <i>X. albilineans</i> na presença de concentrações variáveis de THP2. B , Curva de concentração – resposta para a determinação do valor de EC_{50} para o composto THP2.	135
Figura 60 - Ensaios fenotípicos de inibição do crescimento de <i>X. albilineans</i> . A , estrutura 2D e curvas de crescimento na presença do <i>hit</i> 1. B , estrutura 2D e curvas de crescimento na presença do <i>hit</i> 2. C , estrutura 2D e curvas de crescimento na presença do <i>hit</i> 3.	136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Parâmetros da reação de PCR utilizada nos estudos moleculares de <i>X. albilineans</i> .	42
Tabela 2 –	Oligonucleotídeos empregados nas reações de amplificação das enzimas selecionadas. Em negrito, caudas compatíveis com sistema LIC empregado.	43
Tabela 3 –	Composição dos tampões de lise utilizados no teste de solubilidade para <i>XaFolC</i> e <i>XaFolE</i> .	45
Tabela 4 –	Compostos incubados com <i>XaFolD</i> para ensaios de co-cristalização.	48
Tabela 5 –	Parâmetros da reação de PCR utilizada para mutação sítio-dirigida.	51
Tabela 6 –	Compostos avaliados como controle positivo de ligação à <i>XaFolD</i> .	53
Tabela 7 –	Compostos avaliados como controle positivo de ligação à <i>XaFolD</i> .	55
Tabela 8 –	Características das construções contendo a sequência codificante das proteínas de interesse.	66
Tabela 9 –	Parâmetros cinéticos K_M e V_{MAX} determinados para os substratos da <i>XaFolD</i> .	77
Tabela 10 –	Características dos modelos estruturais de <i>FolD</i> disponíveis no PDB	82
Tabela 11 –	Parâmetros estatísticos da coleta de dados, processamento e refinamento da apoproteína <i>XaFolD</i> , depositada no PDB sob o código 5NHS.	85
Tabela 12 –	Condições de cristalização observadas para <i>XaFolD</i> incubada com NAD^+ .	87
Tabela 13 –	Distribuição de fragmentos por placa.	107
Tabela 14 –	Propriedades físico-químicas, magnitude de resposta e classificação no ensaio de BLI dos fragmentos DDD00808259, DDD01305586 e DDD00100784.	109
Tabela 15 –	Número de estruturas disponíveis nas bases de dados triadas, conformeros gerados na etapa de preparo dos ligantes, poses submetidas à ancoragem no modo XP, poses analisadas por inspeção visual e número final de estruturas selecionadas para aquisição.	119
Tabela 16 –	Estrutura 2D dos compostos selecionados para aquisição e avaliação experimental.	122
Tabela 17 –	Propriedades físico-químicas dos compostos selecionados para aquisição e avaliação experimental.	124
Tabela 18 –	Características das cepas de <i>Xanthomonas albilineans</i> selecionadas para os ensaios fenotípicos para a triagem de inibidores.	129
Tabela 19 –	Compostos avaliados frente à cultura de <i>Xanthomonas albilineans</i> .	131

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
6HIS	Cauda de hexa-histidina
AINES	Anti-inflamatórios não esteroides
BAP	<i>Biotin Aceptor Peptide</i>
BLI	<i>Biolayer Interferometry</i>
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
DHFR	Dihidrofolato redutase
DHFS	Dihidrofolato sintase
DHPS	Dihidropteroato sintase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO _{600 nm}	Densidade Óptica a 600 nm
dTMP	Deoxitimidina monofosfato
DTT	Ditiotreitol
dUMP	Desoxiuridina monofosfato
EDO	Etilenoglicol
FolC	Dihidrofolato sintase / folilpoliglutamato sintase
FolD	<i>N</i> ⁵ , <i>N</i> ¹⁰ -metilenotetrahidrofolato desidrogenase-ciclohidrolase
FolE	GTP-ciclohidrolase I
FPGS	Folilpoliglutamato sintase
GTP	Guanosina trifosfato
IPTG	Isopropil-β-D-galactosídeo
ITC	<i>Isothermal Titration Calorimeter</i>
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LBVS	<i>Ligand-Based Virtual Screening</i>
LIC	<i>Ligation Independent Cloning</i>
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
Ni-NTA	<i>Nickel-charged tris-Nitriloacetic Acid</i>

OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
pABA	Ácido <i>para</i> -aminobenzóico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polietilenoglicol
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
RNA	Ácido ribonucleico
SAR	Relações estrutura-atividade
SBVS	<i>Structure-Based Virtual Screening</i>
SE4ALL	<i>Sustainable Energy for all</i>
SSA	<i>Super Streptavidin</i>
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
THF	Tetrahidrofolato
TRX	Tiorredoxina
TS	Timidilato sintase
Xa	<i>Xanthomonas albilineans</i>
XAS	Meio seletivo para <i>Xanthomonas albilineans</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
1.1	A cana-de-açúcar no contexto do desenvolvimento sustentável.....	23
1.2	Pesquisa e desenvolvimento de novos agroquímicos	25
1.3	Doenças da cana-de-açúcar.....	27
1.3.1	Escaldadura das folhas.....	27
1.3.1.1	Biossíntese de folatos	30
1.3.1.1.1	Enzima N^5 , N^{10} -metilenotetrahidrofolato desidrogenase-ciclohidrolase.....	32
1.3.1.1.2	Enzima dihidrofolato sintase / folilpoliglutamato sintase.....	33
1.3.1.1.3	Enzima GTP-ciclohidrolase	34
2	OBJETIVOS	37
3	MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1	<i>Xanthomonas albilineans</i>	41
3.1.1	Aquisição e cultivo de <i>X. albilineans</i>	41
3.1.2	Extração do DNA genômico e identificação molecular	41
3.1.3	Clonagem dos segmentos gênicos codificantes das enzimas <i>XaFolC</i> , <i>XaFolD</i> e <i>XaFolE</i>	42
3.2	<i>XaFolC</i> , <i>XaFolD</i> e <i>XaFolE</i> : testes de expressão	44
3.3	<i>XaFolD</i>	46
3.3.1	Expressão heteróloga e purificação de <i>XaFolD</i> a partir das construções pET-6HIS- <i>XaFolD</i> e pET-TRX- <i>XaFolD</i>	46
3.3.2	Co-expressão das construções pET-6HIS-BAP-FOLD e pACYC-BirA.....	47
3.3.3	Purificação de <i>XaFolD</i> biotinizada.....	47
3.3.4	Estudos estruturais	48
3.3.4.1	Triagem e otimização das condições de cristalização.....	48
3.3.4.2	Coleta e processamento de dados de difração de raios-X.....	49
3.3.4.3	Construção e refinamento do modelo cristalográfico	49
3.3.5	Mutação sítio-dirigida.....	50
3.3.6	Ensaio de caracterização cinética: determinação de K_M para os substratos	51
3.3.7	Estudos de interação entre <i>XaFolD</i> e ligantes por BLI.....	52
3.3.7.1	Padronização do ensaio.....	52
3.3.7.2	Triagem de fragmentos	53
3.3.7.3	Determinação do valor de K_D dos <i>hits</i> selecionados.....	54
3.3.8	Estudos de interação utilizando Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)	54
3.3.9	Caracterização dos inibidores identificados	55
3.3.10	Triagem Virtual de inibidores.....	56
3.3.10.1	Seleção e preparo do sítio de docagem.....	56
3.3.10.2	Seleção e preparo da base de compostos	57
3.3.10.3	Procedimento de docagem molecular	57
3.4	Ensaio fenotípico de inibição.....	58
3.5	<i>XaFolE</i>	59
3.5.1	Expressão heteróloga e purificação	59
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO – <i>Biologia Molecular</i>	63
4.1	<i>Xanthomonas albilineans</i>	63
4.1.1	Cultivo e manutenção de <i>X. albilineans</i>	63
4.1.2	Extração do DNA genômico e identificação molecular	64

4.1.3	Clonagem dos segmentos gênicos codificantes das enzimas FolC, FolD e FolE	65
4.2	<i>XaFolD</i> , <i>XaFolC</i> e <i>XaFolE</i> : priorização de alvos	68
4.2.1	<i>XaFolD</i>	68
4.2.1.1	Produção de proteína recombinante a partir das construções pET-6HIS- <i>XaFolD</i> e pET-6HIS-TRX- <i>XaFolD</i>	69
4.2.2	<i>XaFolC</i> e <i>XaFolE</i>	70
4.2.2.1	Produção de proteína recombinante a partir da construção pET-6HIS- <i>XaFolE</i>	72
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO <i>XaFolD</i>: Caracterização estrutural e funcional.....	75
5.1	<i>XaFolD</i>	75
5.1.1	Ensaio de caracterização cinética: determinação do valor de K_M para os substratos	75
5.1.2	Estudos estruturais	78
5.1.2.1	Cristalização e determinação estrutural da <i>XaFolD</i> na forma apo	78
5.1.2.2	Ensaio de co-cristalização para geração de complexos de <i>XaFolD</i>	86
5.1.2.3	Análise estrutural	87
5.1.3	Mutação sítio-dirigida	94
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO - <i>XaFolD</i>: triagem de inibidores.....	99
6.1	Produção de proteína recombinante biotinizada a partir da construção pET-6HIS-BAP-FOLD	100
6.2	Produção de proteína recombinante a partir das construções pET-6HIS- <i>XaFolD</i> e pET-6HIS-TRX- <i>XaFolD</i>	102
6.3	Estudos de interação entre <i>XaFolD</i> e ligantes por BLI	103
6.3.1	Padronização do ensaio	103
6.3.2	Triagem de fragmentos	104
6.3.3	Determinação de K_D dos hits selecionados	109
6.4	Investigação das interações entre <i>XaFolD</i> e ligantes por Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC).....	110
6.5	Validação dos <i>hits</i> identificados	116
6.6	Triagem virtual de inibidores	117
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO - <i>Xanthomonas albilineans</i>: triagem de inibidores	129
7.1	Ensaio de inibição do crescimento de <i>X. albilineans</i>	129
8	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	139
8.1	Conclusões	139
8.2	Perspectivas.....	141
	REFERÊNCIAS	143
	APÊNDICE I.....	151

CAPÍTULO 1

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 A cana-de-açúcar no contexto do desenvolvimento sustentável

O modelo sustentável de desenvolvimento busca a integração entre a economia, o meio ambiente e a sociedade através de estratégias capazes de suprir a demanda atual de recursos sem comprometer a capacidade em atender às demandas futuras. O objetivo principal do desenvolvimento sustentável é proporcionar o crescimento econômico aliado à inclusão social e à redução de riscos ambientais.¹ Nesse sentido, a garantia do acesso universal à energia, o aumento da eficiência energética e da participação de fontes renováveis na matriz energética são objetivos fundamentais a serem atingidos até 2030, de acordo com a iniciativa global Energia Sustentável para todos (SE4ALL, do inglês *Sustainable Energy for all*).²

Nesse contexto, a energia produzida a partir de derivados renováveis da biomassa apresenta grande potencial como alternativa ao uso de combustíveis fósseis, cenário no qual o setor sucroenergético brasileiro possui condições para se destacar. O território brasileiro, situado em sua maior extensão nas faixas tropical e subtropical, recebe durante todo o ano intensa radiação solar - característica que confere alta produtividade à cultura de cana-de-açúcar. Além disso, a possibilidade de dedicar novas áreas à agricultura de energia sem reduzir a área destinada à agricultura de alimentos é uma das vantagens que qualificam o Brasil à liderança do mercado mundial de bioenergia.³

As grandes áreas cultiváveis e condições edafoclimáticas favoráveis, associadas à tecnologia de agricultura tropical implementada no Brasil, contribuem para que a matriz energética brasileira seja uma das mais renováveis do mundo. No Brasil, as fontes renováveis de energia correspondem à 43,5% da matriz energética, enquanto a média mundial e a média dos países membros da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) são iguais a 14,2% e 9,5%, respectivamente.⁴ Dentre as fontes de energia renováveis, produtos derivados da cana-de-açúcar são os contribuintes majoritários, representando 17,5% da matriz energética total e ocupando o segundo lugar em importância na matriz energética nacional (Figura 1).⁴

Além de produzir 50% do açúcar consumido no mundo, o setor sucroenergético brasileiro se destaca pela cadeia produtiva do etanol, principal biocombustível derivado da cana-de-açúcar.⁵ Atualmente, estima-se para a safra 2017/2018 a produção de 27,1 bilhões de litros de etanol.⁶ Juntamente com os Estados Unidos, o Brasil lidera o mercado internacional de

biocombustíveis, sendo os dois países responsáveis pela produção de 85% do etanol produzido no mundo (Figura 2).⁷⁻⁸

Figura 1 – Oferta interna das principais fontes de energia no Brasil em 2017 (ano base 2016).
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 2 – Produção global de etanol entre 2007 e 2015.
Fonte: Elaborada pela autora.

A alta eficiência fotossintética da cana-de-açúcar associada ao aproveitamento do bagaço da cana e da palha para a co-geração de eletricidade nas usinas tornam o setor sucroenergético brasileiro altamente rentável. A biomassa gerada no processamento da cana-de-açúcar pode ainda ser aproveitada para a produção de biopolímeros, fertilizantes e ração animal, aumentando a eficiência energética.⁵

Além da relevância econômica, a cadeia produtiva da cana-de-açúcar se destaca no aspecto social, em que a descentralização da produção agrícola e do processamento industrial estimulam o desenvolvimento socioeconômico regional. Adicionalmente, o uso do etanol

proveniente da cana-de-açúcar traz benefícios ao meio ambiente, reduzindo o impacto nas emissões de gases de efeito estufa em até 90% quando comparado ao uso da gasolina.⁵

Diante da relevância econômica e social do setor sucroenergético brasileiro, fatores capazes de comprometer o cultivo da cana-de-açúcar devem ser rigorosamente controlados com o objetivo de proporcionar o aumento da produtividade e atender à crescente demanda por energia limpa e sustentável.⁹

1.2 Pesquisa e desenvolvimento de novos agroquímicos

O uso de agroquímicos permite o controle de insetos, plantas daninhas e doenças que afetam o setor agrícola, aumentando a produtividade e reduzindo tanto a área de cultivo quanto os recursos hídricos e energéticos necessários à agricultura. No entanto, há uma crescente preocupação com os impactos ambientais causados pelo uso desses produtos.¹⁰ Assim, para atender à busca do mercado de agroquímicos por moléculas potentes e com um perfil toxicológico menos agressivo ao meio ambiente, contornar a resistência desenvolvida pelos patógenos e atender às exigências das agências regulatórias, a indústria de agroquímicos tem investido cada vez mais em Pesquisa & Desenvolvimento (P&D).¹¹

Entre 1995 e 2014 estima-se um aumento de 88% nos custos envolvidos para a introdução de um novo produto agrícola no mercado, os quais passaram de US\$ 152 para US\$ 286 milhões (Figura 3).¹² O tempo investido em P&D e o número de compostos sintetizados durante as etapas iniciais de triagem aumentaram. Em 1995, para a introdução de um único produto no mercado, 52.500 compostos eram sintetizados e submetidos às etapas seguintes de avaliação, em um processo que durava entre 8 e 9 anos. Vinte anos depois, o tempo investido em P&D passou para 12 anos, e o número de compostos sintetizados durante as etapas iniciais triplicou.¹²

As etapas iniciais de P&D na indústria de agroquímicos envolvem ciclos sucessivos de síntese de compostos, avaliação biológica e otimização, sendo responsáveis por 47% do investimento realizado no setor (Figura 3 e Figura 4).¹¹ Durante esse estágio, a indústria de agroquímicos e a farmacêutica possui várias etapas em comum, sendo a seleção de alvos moleculares uma das semelhanças mais notáveis.¹³ O processo de reconhecimento molecular de fármacos ou agroquímicos por seus receptores-alvo muitas vezes é idêntico. Assim, uma mesma classe de compostos pode originar novas entidades químicas utilizadas tanto na indústria farmacêutica quanto na indústria de agroquímicos. Um dos exemplos é a classe de

derivados imidazólicos e triazólicos inibidores da enzima 14- α -demetilase, utilizados na agricultura como antifúngicos e na medicina para o tratamento de tumores.¹⁴

Figura 3 – Estimativa dos custos de Pesquisa & Desenvolvimento para a introdução de um novo agroquímico no mercado.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 4 – Etapas do processo de Pesquisa & Desenvolvimento para a introdução de um novo agroquímico no mercado.

Fonte: Elaborada pela autora.

Apesar das semelhanças entre as duas indústrias na fase de seleção de alvos e síntese de compostos, a indústria de agroquímicos possui algumas particularidades importantes. O elevado número de compostos com vários heterociclos e halogênios é uma dessas diferenças, e está relacionado com a atividade residual e com o tempo de permanência necessários para a

aplicação do agroquímico no campo.¹⁵⁻¹⁶ O método de aplicação e a permanência no campo, por sua vez, afetam diretamente as demais etapas de P&D. A avaliação biológica e toxicológica dos compostos-líderes selecionados durante a etapa de desenvolvimento deve englobar, além da espécie a qual o agroquímico se destina, todos os outros organismos e elementos envolvidos no ecossistema de aplicação.

1.3 Doenças da cana-de-açúcar

O cultivo e a produtividade da cana-de-açúcar são influenciados pelo clima, solo, genótipo da variedade cultivada e a ocorrência de doenças. Atualmente, mais de 200 doenças causadas por bactérias, fungos, vírus e nematoides já foram identificadas em todo o mundo.¹⁷⁻¹⁸ Dentre as doenças bacterianas mais importantes para o setor canavieiro estão i. o raquitismo das soqueiras, causado por *Leifsonia xyli* ii. a estria vermelha, causada por *Acidovorax avenae* e iii. a escaldadura das folhas,¹⁷⁻¹⁹ causada por *Xanthomonas albilineans* e objeto de estudo neste trabalho.

1.3.1 Escaldadura das folhas

A espécie *Xanthomonas albilineans* (Ashby 1929) Dowson 1943, causadora da escaldadura das folhas, é aeróbica, não esporulante, se apresenta como bastonete e possui um único flagelo polar. Trata-se de uma espécie de crescimento lento, favorecido por temperaturas entre 25 e 28 °C. As colônias formadas são amarelas e de aspecto não-mucoidal. Além da cana-de-açúcar, outras espécies da família *Poaceae*, como milho, bambu e sorgo selvagem podem atuar como hospedeiros alternativos de *X. albilineans*, estabelecendo-se uma infecção de curta duração. A infecção da cana-de-açúcar, ao contrário, causa uma doença severa e de grande impacto econômico.²⁰

A escaldadura das folhas foi identificada como uma doença bacteriana na década de 1920, em Java, Austrália e Fiji. Na década de 1960 a doença foi reportada em 22 países produtores de cana-de-açúcar, atingindo 58 países 30 anos depois.²¹ No Brasil, a escaldadura das folhas foi reportada pela primeira vez em 1943, no estado de São Paulo.²² Atualmente, é uma doença disseminada em praticamente todos os países em que a cana é cultivada, com relatos de surtos epidêmicos nos Estados Unidos e em países da América Central (Figura 5).²³

O gênero *Xanthomonas* reúne espécies de bactérias Gram-negativas associadas a plantas mono e dicotiledôneas, algumas das quais causam significativas perdas na agricultura. Dentre

as plantas de importância econômica atingidas por bactérias desse gênero estão a laranja (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*), o arroz (*Xanthomonas orizyae*), o tomate (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) e a cana-de-açúcar (*X. albilineans*). Atualmente, pelo menos 27 espécies e 120 patovares do gênero *Xanthomonas* são conhecidos, e muitas espécies possuem características fenotípicas em comum.²⁴ No entanto, estudos genéticos têm mostrado que a *X. albilineans* possui características que a diferenciam das demais espécies do gênero. Notadamente, a redução do genoma durante a especiação e a adaptação à sobrevivência em tecidos pobres em nutrientes são algumas dessas características.²⁵

Figura 5 – Distribuição geográfica de *Xanthomonas albilineans* no mundo.
Fonte: *Xanthomonas...*²³

A *X. albilineans*, rica em enzimas especializadas na degradação da parede celular, invade os tecidos da cana-de-açúcar. Além de se estabelecer no xilema, a bactéria também é encontrada no floema e em tecidos não vasculares, como o parênquima.²⁶ Uma vez estabelecida a infecção, a bactéria inicia a produção de albicidinas, fitotoxinas produzidas exclusivamente por essa espécie.²⁷ As albicidinas inibem a DNA girase, impedindo a diferenciação dos cloroplastos - o que dá origem às estrias brancas características da doença.²⁸⁻²⁹ A produção de albicidinas oferece vantagem competitiva à *X. albilineans* contra outras bactérias, uma vez que essas fitotoxinas inibem o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.²⁷ Uma vez estabelecida, a escaldadura das folhas promove má formação dos colmos e reduz o teor de açúcar da cana, diminuindo a qualidade do caldo extraído. A redução da produtividade e necessidade de reforma precoce dos canaviais diminui o ciclo de vida da cana-de-açúcar, causando significativo impacto econômico. Dependendo da resistência da variedade de cana-

de-açúcar cultivada, das condições ambientais de cultivo e da agressividade da cepa causadora da infecção, pode haver perdas de até 100% das lavouras. Apesar da severidade da doença, a prevalência da escaldadura das folhas não é conhecida devido a dificuldades no diagnóstico e diferenciação dos prejuízos causados por outras doenças que afetam a cana-de-açúcar, como o raquitismo das soqueiras.¹⁹

Os sintomas da escaldadura das folhas são variáveis, e a doença apresenta-se sob as formas latente, crônica e aguda (Figura 6). A forma latente é caracterizada pela ausência de sinais externos. Contudo, internamente pode haver descoloração vascular na região dos nós, semelhante à descoloração causada pelo raquitismo das soqueiras. Na forma crônica há surgimento de estrias brancas longitudinais no limbo foliar e bainha, iniciando-se a brotação das gemas basais em colmos maduros (Figura 6A). Os sintomas da fase crônica podem desaparecer com o desenvolvimento da planta e mitigar a presença da bactéria no canavial. Porém, caso o desenvolvimento da planta seja prejudicado, especialmente em caso de estresse hídrico, a doença pode evoluir para a forma aguda. Na forma aguda, as folhas da cana apresentam grandes áreas esbranquiçadas, há quebra da dominância apical e intensificação da brotação das gemas basais (Figura 6B). Além disso, as folhas apresentam aspecto seco e queimado, com intensa necrose e aparência semelhante à planta escaldada – o que dá origem ao nome da doença.¹⁹

Figura 6 – Sinais e sintomas da cana-de-açúcar acometida pela escaldadura das folhas. **A**, estrias brancas desenvolvidas durante a fase crônica. **B**, brotação das gemas laterais e necrose das folhas durante a fase aguda.

Fonte: A, Rott.³⁰ B, Baudin.³¹

A disseminação da bactéria presente em plantas infectadas ocorre a partir de ferimentos provocados nos colmos, por vento, chuva, e durante a colheita. No Brasil, a ampliação do uso de colheitas mecanizadas e a intensificação de longos períodos de tempo seco aumentam substancialmente a preocupação com a escaldadura das folhas por aumentar o risco de

propagação e a agressividade das cepas de *X. albilineans*. Portanto, enfatiza-se a necessidade de manutenção do canavial sadio e a desinfecção das ferramentas de corte durante o manejo da cultura.¹⁹

Atualmente, para o controle da doença preconiza-se o plantio de mudas sadias e a substituição de variedades susceptíveis por variedades resistentes. Assim, variedades de cana-de-açúcar com características agronômicas desejáveis, tais como alto potencial de produção e resistência a outras doenças da cana-de-açúcar, caso sejam suscetíveis à escaldadura das folhas são descartadas durante o processo de seleção de novas variedades comerciais. O plantio de variedades resistentes não é, contudo, garantia de manutenção do canavial sadio, uma vez que variações genéticas que favoreçam a quebra de resistência podem transformar cultivares resistentes em altamente suscetíveis.³²⁻³³

A ausência de produtos químicos ou biológicos para o controle satisfatório da escaldadura das folhas estimula a pesquisa e o desenvolvimento de novos agroquímicos. Nesse sentido, tanto a caracterização estrutural e funcional de potenciais alvos moleculares de *X. albilineans* quanto a triagem de moléculas bioativas podem contribuir para a descoberta de novos candidatos a compostos-líderes para o controle da escaldadura das folhas.

1.3.1.1 Biossíntese de folatos

Os folatos são essenciais para eucariotos e procariotos, atuando como cofatores durante a biossíntese de diversos componentes essenciais à sobrevivência celular. A forma monoglutamilada do folato, denominada tetraidrofolato (THF, Figura 7), atua como doadora e aceptora de unidades de carbono em vários processos metabólicos, dentre os quais os principais são a conversão de serina à glicina, o catabolismo de histidina e a síntese de purinas, de timidilato e de metionina.³⁴⁻³⁶

Estruturalmente, os folatos são formados por três componentes: *i.* anel pteridina, *ii.* ácido *para*-aminobenzóico (pABA) e *iii.* cauda glutamilada, cujo número de resíduos glutamato varia de 1 a 8. Além do número de resíduos glutamato conjugados durante a formação da cauda oligo-gama-glutâmica, os folatos também se diferenciam pelo estado de oxidação do anel pteridina e pela presença de substituintes nas posições N⁵ e N¹⁰.³⁷

Figura 7 – Estrutura 2D do tetrahydrofolato.

Fonte: Elaborada pela autora.

Ao contrário dos animais, que adquirem folatos a partir da dieta utilizando o transporte ativo mediado por proteínas associadas à membrana celular, plantas, fungos, alguns protistas e a maioria das bactérias são dependentes da síntese *de novo* de folatos – característica explorada para o desenvolvimento de fármacos. As enzimas da via de biossíntese de folatos, essenciais para a manutenção de níveis celulares adequados de THF em microrganismos patogênicos, são alvos moleculares atrativos para o desenvolvimento de antibióticos.³⁴

As sulfonamidas e as sulfonas, classes de antibióticos introduzidas na terapêutica nas décadas de 1930 e 1940, respectivamente, são análogos estruturais do pABA e atuam inibindo a enzima dihidropteroato sintase (DHPS).³⁴ Além da DHPS, outra enzima bastante explorada para o desenvolvimento de antibióticos é a dihidrofolato redutase (DHFR), situada na etapa final da via biossintética dos folatos e alvo molecular de fármacos da classe de diaminopirimidinas. As diaminopirimidinas, por sua vez, inibem a síntese bacteriana de THF por serem análogos estruturais das pteridinas. Sulfonamidas e diaminopirimidinas possuem efeito sinérgico, e por este motivo, a associação de fármacos das duas classes tem sido extensivamente utilizada para o tratamento de infecções.³⁵

A descoberta de diversas moléculas bioativas e o desenvolvimento de fármacos inibidores das enzimas DHPS e DHFR³⁸ exemplificam como enzimas essenciais à síntese de THF constituem potenciais alvos moleculares para o desenvolvimento de antibióticos. Além disso, uma vez que análogos estruturais do substrato capazes de atuar simultaneamente em enzimas da mesma cascata metabólica aumentam a eficácia do tratamento e diminuem resistência bacteriana,³⁹ a caracterização das enzimas de uma via biossintética essencial à síntese de proteínas e DNA é uma estratégia interessante na busca por novas moléculas bioativas.³⁵ Nesse contexto, três enzimas da via de biossíntese de folatos de *X. albilineans* foram selecionadas para caracterização estrutural e funcional: *i.* N^5 , N^{10} -metilenotetrahydrofolato desidrogenase-ciclohidrolase, *ii.* GTP-ciclohidrolase e *iii.* dihidrofolato sintase / folilpoliglutamato sintase.

1.3.1.1.1 Enzima N^5, N^{10} -metilenotetrahidrofolato desidrogenase-ciclohidrolase

A enzima N^5, N^{10} -metilenotetrahidrofolato desidrogenase-ciclohidrolase (FolD, EC 1.5.1.5), catalisa a produção de N^{10} -formil-THF a partir do N^5, N^{10} -metileno-THF, em uma reação reversível de duas etapas: *i.* reação de oxidação do N^5, N^{10} -metileno-THF para formação do N^5, N^{10} -metenil-THF, seguida da *ii.* hidrólise e liberação do N^{10} -formil-THF (Figura 8).⁴⁰⁻⁴¹

A

B

Figura 8 – Reações catalisadas pela FolD. **A**, conversão do substrato N^5, N^{10} -metileno-THF para a produção do intermediário N^5, N^{10} -metenil-THF. **B**, hidrólise do N^5, N^{10} -metenil-THF para a produção do N^{10} -formil-tetrahidrofolato

Fonte: Elaborada pela autora.

O produto intermediário N^5, N^{10} -metenil-THF participa da reação de conversão de desoxiuridina monofosfato (dUMP) em deoxitimidina monofosfato (dTMP) em reação catalisada pela enzima timidilato sintase (TS, EC2.1.1.45).⁴² O dTMP é um dos nucleotídeos que formam a timina – uma das bases nitrogenadas constituintes do DNA. Já o produto final da reação catalisada pela FolD, N^{10} -formil-THF, atua como doador de formil na síntese de purinas e de formil-metionina.³⁴ A enzima FolD está envolvida, portanto, na geração de produtos essenciais à síntese de DNA e de proteínas, configurando um alvo molecular promissor para a busca por novos inibidores. Além disso, estudos de *knock-out* do gene codificante para enzima FolD indicam que este gene é essencial para a biossíntese de folatos em espécies de bactérias Gram-positivas, como *Bacillus subtilis*, e também em bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli*, *Francisella novicida*, *Acinetobacter baylyi* e *Pseudomonas aeruginosa*.⁴³⁻⁴⁶

A estrutura tridimensional da FoLD encontra-se elucidada para diversas bactérias, incluindo *Acinetobacter bauamannii*, *Campylobacter jejuni*, *Francisella tularensis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Methylobacterium extorquens* e *Pseudomonas aeruginosa*. A FoLD tem se mostrado um alvo molecular promissor para o planejamento de inibidores da síntese de folatos, e alguns inibidores enzimáticos com baixa potência já foram encontrados a partir ensaios de triagem *in vitro*.⁴⁷⁻⁴⁸

1.3.1.1.2 Enzima dihidrofolato sintase / folilpoliglutamato sintase

Em *X. albilineans* as atividades dihidrofolato sintase (DHFS, EC 6.3.2.12) e folilpoliglutamato sintase (FPGS, EC 6.3.2.17) são catalisadas na presença de ATP por uma enzima bifuncional denominada FolC. Durante a biossíntese de folatos, a atividade DHFS adiciona L-glutamato ao 7,8-dihidropteroato, formando o 7,8-dihidropteroilglutamato (Figura 9A). Após a redução do 7,8-dihidropteroilglutamato ao tetrahidropteroil-[gamma-Glu]_n, catalisada pela enzima dihidrofolato redutase (DHFR), a atividade FPGS continua a adição de resíduos de glutamato (Figura 9B).⁴⁹ A atividade DHFS, ao contrário da FPGS, é exclusiva de procariotos.

Figura 9 – Reações catalisadas pela FolC. **A**, atividade DHFS. **B**, atividade FPGS; R₁ e R₂ podem variar, dependendo do substrato da FPGS.

Fonte: Elaborada pela autora.

A adição sequencial de resíduos de glutamato favorece a retenção dos folatos no ambiente intracelular, além de aumentar a afinidade e favorecer a interação dos produtos poliglutamilados com as enzimas dependentes de folatos.⁵⁰⁻⁵¹ A FolC é essencial tanto em bactérias

Gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Neisseria gonorrhoeae*, quanto em bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Streptomyces coelicolor*.⁵²⁻⁵⁴ Adicionalmente, a estrutura tridimensional da enzima bifuncional FolC encontra-se elucidada para *Yersinia pestis* e *Escherichia coli*.⁴⁹ Devido a atividade DHFS exclusiva de procariotos, a enzima FolC é considerada um alvo molecular em potencial para o desenvolvimento de inibidores seletivos.

1.3.1.1.3 Enzima GTP-ciclohidrolase

A enzima GTP-ciclohidrolase I (FolE, EC 3.5.4.16) catalisa a hidrólise do GTP para a produção de 7,8-dihidroneopterina trifosfato, liberando uma molécula de formato (Figura 10). Essa reação é responsável pela formação do anel heterocíclico pterina e marca o primeiro passo na biossíntese de THF.⁵⁵

Figura 10 – Reação catalisada pela FolE.

Fonte: Elaborada pela autora.

A estrutura tridimensional da FolE já foi elucidada para as bactérias *Neisseria gonorrhoeae*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia pestis*, *Escherichia coli* e *Thermus thermophilus*. Devido às diferenças estruturais entre as isoformas da FolE presente em humanos e patógenos, a enzima é considerada um potencial alvo molecular para o desenvolvimento de antibióticos.⁵⁶⁻⁵⁷

CAPÍTULO 2

Objetivos

2 OBJETIVOS

O objetivo fundamental desta tese de doutoramento é a elucidação estrutural e caracterização funcional de enzimas da via de biossíntese de folatos, alvos moleculares para a descoberta de candidatos a compostos líderes para o controle da escaldadura das folhas. Para atingir o objetivo fundamental, foram determinados os seguintes objetivos específicos:

- Clonagem da sequência gênica codificante das proteínas *XaFolC*, *XaFolD* e *XaFolE*,
- Testes de expressão e priorização de alvos
- Expressão heteróloga e purificação de proteína em quantidade e pureza suficientes para ensaios de cristalização
- Cristalização e elucidação estrutural por difração de raios X
- Caracterização cinética
- Triagem bioquímica de compostos e identificação de candidatos a inibidores enzimáticos
- Triagem virtual em larga escala para identificação, seleção e aquisição de ligantes candidatos a inibidores
- Caracterização dos inibidores enzimáticos identificados por métodos biofísicos
- Ensaios fenotípicos frente à *X. albilineans* para a triagem de inibidores

CAPÍTULO 3

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 *Xanthomonas albilineans*

3.1.1 Aquisição e cultivo de *X. albilineans*

As cepas sob os códigos IBSBF1374, IBSBF740, IBSBF654 e IBSBF326 foram adquiridas liofilizadas do Instituto Biológico de Campinas. Após a reconstituição em meio YSG⁵⁸ as cepas foram semeadas em meio XAS,⁵⁹ seletivo para *Xanthomonas albilineans*, e cultivadas em estufa bacteriológica a 28 °C por 7 dias.

O mesmo protocolo de cultivo em meio XAS foi seguido para as cepas Xa3, Xa5, Xa11 e Xa37, isoladas a partir da cana-de-açúcar pelo Centro da Cana do Instituto Agrônomo de Campinas e gentilmente cedidas pela Dr. Silvana Aparecida Creste Dias de Souza.⁶⁰

Para o armazenamento dessas cepas, colônias isoladas foram inoculadas em meio XAS líquido e cultivadas sob agitação a 175 rpm, a 28 °C por 5 dias, até atingir densidade óptica no comprimento de onda (λ) de 600 nm (DO_{600nm}) igual a 0,8. Ao final desse período estoques contendo 50% de glicerol foram armazenados em ultrafreezer a - 80 °C. Para a manutenção das cepas foram realizados repiques a cada seis meses.

3.1.2 Extração do DNA genômico e identificação molecular

As cepas de *X. albilineans* foram cultivadas em meio líquido XAS a 28 °C até a saturação, por 5 dias. Ao final deste período as células foram submetidas ao tratamento com lisozima (2 mg/mL) por 30 minutos em banho de gelo. Em seguida a cultura foi centrifugada (4.000 g, 20 minutos) e as células foram ressuspensas em um tampão com a seguinte concentração final: 2% de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB); 1,4 M NaCl; 100 mM Tris-HCl pH 8,0 e 20 mM EDTA. As células permaneceram no tampão à 65 °C por 60 minutos. Adicionou-se 1 volume da mistura clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), e as fases resultantes foram separadas por centrifugação (16.000 g, 10 minutos). Sobre a fase superior isolada foi adicionado novamente 1 volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), e as fases foram novamente separadas. Os ácidos nucleicos na fase superior foram precipitados com o auxílio de 1 volume de isopropanol (a -20 °C) seguido de incubação a -20 °C por 30 minutos. O *pellet* de DNA obtido foi submetido a lavagens sequenciais com etanol 70% e 96% e mantido em temperatura ambiente para secagem. O *pellet* foi ressuspenso em água e confirmou-se a

extração por eletroforese em gel de agarose 1%. Para a remoção do RNA a amostra foi tratada com 100 µg/mL de RNase A (Invitrogen™) a 37 °C por 1 hora.⁶¹

A identidade da bactéria *X. albilineans* foi confirmada pela amplificação por PCR (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) da região intergênica 16S-23S rDNA. Os reagentes, características e detalhes de cada ciclo estão apresentados na Tabela 1. A reação de PCR empregou DNA polimerase de alta fidelidade (Phusion™ - New England Biolabs®), DNA genômico extraído como molde para amplificação e o par de oligonucleotídeos específicos PGBL1 (5' – CTT TGG GTC TGT AGC TCA GG – 3') e PGBL2 (5' – GCC TCA AGG TCA TAT TCA GC – 3'). Para a ciclagem térmica realizada, empregou-se X = 42 °C e Y = 15 s/Kb. O produto da reação foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com 0,05 µg/mL de brometo de etídeo.

Tabela 1 – Parâmetros da reação de PCR utilizada nos estudos moleculares de *X. albilineans*.

Reagente		Concentração	Ciclagem Térmica
Tampão <i>Phusion</i> HF 5X		1X	98 °C – 30 s
dNTP		0,2 mM	
Oligonucleotídeo senso		0,5 µM	98 °C – 30 s X °C – 30 s 72 °C – Y s
Oligonucleotídeo anti-senso		0,5 µM	
Molde	DNA plasmidial	50-250 ng	
	DNA genômico	1 - 100 ng	35 X
<i>Phusion</i> DNA polimerase		1 U	
H ₂ O		qsp. 50 µL	
			73 °C – 10 min

Fonte: Elaborada pela autora.

3.1.3 Clonagem dos segmentos gênicos codificantes das enzimas *XaFolC*, *XaFolD* e *XaFolE*

A sequência codificante das enzimas *XaFolC*, *XaFolD* e *XaFolE* foram obtidas no banco de dados GenBank (FP565176.1). A estratégia de clonagem utilizada empregou um conjunto de vetores adaptados para o sistema de clonagem de ligação independente” (LIC, do inglês, *Ligation Independent Cloning*).⁶² Para cada enzima foi planejado e sintetizado (Sigma® – Life Science) um par de oligonucleotídeos iniciadores com caudas salientes compatíveis com os vetores utilizados no sistema, destacadas em negrito na Tabela 2.

Tabela 2 – Oligonucleotídeos empregados nas reações de amplificação das enzimas selecionadas. Em negrito, caudas compatíveis com sistema LIC empregado.

Enzima		Oligonucleotídeos
XaFolC	Senso	5'– CAGGGCGCCATGAACACGAGTCCTGTTACCC –3'
	Anti-senso	5'– GACCCGACGCGGTTAATCGGCTGAATGCAGC –3'
XaFolD	Senso	5'– CAGGGCGCCATGACCGACTCTGCGCC –3'
	Anti-senso	5'– GACCCGACGCGGTTAGCGGCGCAAGGC –3'
XaFolE	Senso	5'– CAGGGCGCCATGGCCGATTCCAAGC –3'
	Anti-senso	5'– GACCCGACGCGGTTAACGTGCGCCGC –3'

Fonte: Elaborada pela autora.

A reação de amplificação do segmento gênico de interesse foi realizada por PCR com o sistema *Phusion*TM utilizando o DNA genômico como molde para amplificação (Tabela 1), com X = 60 °C e Y = 15 s/Kb. A amplificação dos segmentos gênicos de interesse foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com 0,05 µg/mL de brometo de etídeo. O produto de cada reação de amplificação foi purificado com o *kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). A quantificação foi realizada em espectrofotômetro (NanoDrop 2000 – Thermo Scientific), e os fragmentos (~150 ng) obtidos foram tratados com T4 DNA polimerase (Fermentas) em reação (1X Tampão T4 DNA polimerase; 2,5 mM dATP; 5 mM DTT e 1U T4 DNA polimerase) por 30 minutos a 22 °C para a formação das extremidades coesivas de ligação aos vetores do sistema LIC.

Para o tratamento dos vetores, cepas bacterianas *E. coli* DH5α transformadas com os vetores pETM11, pETTRX-1a e pETNus-1a foram cultivadas a 37 °C por 16 horas em meio líquido LB. O DNA plasmidial foi obtido com o auxílio do *kit Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega). O material obtido (5 µg) foi submetido à digestão com a endonuclease BsaI (New England Biolabs®) em reação (1X New England Biolabs *buffer* 3 e 25 U BsaI). O produto da reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%. Os vetores digeridos (~ 600 ng) foram excisados e recuperados do gel com auxílio do *kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). Após a recuperação, os vetores digeridos foram tratados com T4 DNA polimerase (Fermentas) em reação (1X Tampão T4 DNA polimerase; 2,5 mM dTTP, 5 mM DTT; 1U T4 DNA polimerase) por 30 minutos a 22 °C para a formação das extremidades coesivas de ligação necessárias para o sistema de clonagem de ligação independente (LIC, do inglês *Ligation Independent Cloning*).⁶²

Após o preparo dos vetores e do fragmento codificante de XaFolD iniciou-se a reação de anelamento, realizada em temperatura ambiente por 30 minutos. O produto das reações de

anelamento foi utilizado para a transformação de células competentes *E.coli* DH10B produzidas pelo método de Inoue.⁶³ Nesse método, 100 µL de células foram incubados com 100 µL de mistura reacional (reação de anelamento + tampão de transformação - 100 mM KCl; 30mM CaCl₂; 50 mM MgCl₂ e 1,5% PEG 4.000) em gelo por 30 minutos. Ao final do período de incubação as células foram submetidas ao choque térmico em temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 1 mL de meio líquido SOC (20 g/L triptona; 5 g/L extrato de levedura; 0,5 g/L NaCl; 2,5 mM KCl; 10 Mm MgCl₂; 20 mM glicose) e incubou-se por 1 hora a 37 °C sob agitação constante a 200 rpm. O cultivo foi semeado em placas de Petri em meio sólido LB suplementado com canamicina (30 µg/mL), e em seguida as colônias positivas foram cultivadas em meio líquido LB por 16 horas a 37 °C, também suplementado com canamicina (30 µg/mL). O DNA plasmidial foi obtido com o kit *Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega). A integridade da construção foi verificada por sequenciamento.

3.2 *XaFolC*, *XaFolD* e *XaFolE*: testes de expressão

Células de *E. coli* BL21 (DE3) foram transformadas com DNA plasmidial para a expressão proteica. Para cada proteína a expressão foi avaliada nos vetores pETM-11, pETTRX-1a e pETNUS-1a. As cepas transformadas foram cultivadas aerobicamente a 37 °C em meio LB até atingirem densidade ótica igual a 0,8 no comprimento de onda de 600 nm (DO_{600 nm}). Em seguida, induziu-se a expressão proteica com a adição de 1 mM de isopropil-β-D-galactosídeo (IPTG). Para avaliar a condição com maior expressão de proteína na fração solúvel, empregou-se dois protocolos: *i.* expressão por 3 horas a 37 °C e *ii.* expressão por 16 horas a 20 °C. Ao final do período de expressão, as células foram separadas por centrifugação (4.000 g, 10 minutos) e ressuspensas em tampão de lise (50 mM Tris pH 7,5; 500 mM NaCl; 10% glicerol) em um décimo do volume de cultura inicial, suplementado com 3 unidades/mL de DNase I e 1 mg/mL de lisozima. As células ressuspensas permaneceram em banho de gelo por 30 minutos. Ao final desse período foram realizados 4 ciclos consecutivos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento. O lisado obtido foi centrifugado (16.000 g, 10 minutos) e as frações solúvel e insolúvel submetidas à análise por eletroforese em gel de acrilamida (SDS-PAGE 15%) para avaliar o perfil de expressão.

Para as proteínas *XaFolC* e *XaFolE*, além da expressão em *E. coli* BL21 (DE3) também foi avaliada a expressão em células de *E. coli* RosettaTM (DE3) e ArticExpress (DE3). Para o cultivo das cepas e a avaliação da expressão foi seguindo protocolo idêntico ao descrito, exceto pela temperatura usada para as células de ArticExpress (DE3). Para essa cepa a expressão foi

avaliada em temperaturas iguais a 4 °C e 12 °C. Além de diferentes cepas, para a *XaFolC* e *XaFolE* foram realizados testes de solubilidade proteica em diferentes tampões de lise. Os tampões avaliados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Composição dos tampões de lise utilizados no teste de solubilidade para *XaFolC* e *XaFolE*.

Identificação	Composição do tampão de lise
Triagem inicial	
7,5N	50 mM Tris pH 7,5; 50 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1 mg/mL lisozima
2S	50 mM Tris pH 7,5; 2 M NaCl; 5 mM EDTA; 1 mg/mL lisozima
0,5U	50 mM Tris pH 7,5; 50 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5 M ureia 1 mg/mL lisozima
D	20 mM Tris pH 7,5; 50 mM NaCl; 0,2 % NP 40; 1 mg/mL lisozima
Avaliação de pH	
5N	50 mM Acetato de sódio pH 5; 50 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1 mg/mL lisozima
6N	50 mM MES pH 6; 50 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1 mg/mL lisozima
7N	50 mM Tris pH 7; 50 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1 mg/mL lisozima
8N	50 mM Tris pH 8; 50 mM NaCl; 0,2 % NP 40; 1 mg/mL lisozima
9N	50 mM Tris pH 9; 50 mM NaCl; 0,2 % NP 40; 1 mg/mL lisozima
Avaliação de sal	
0,1S	50 mM Tris pH 7,5; 0,1 M NaCl; 5 mM EDTA; 1 mg/mL lisozima
0,5S	50 mM Tris pH 7,5; 0,5 M NaCl; 5 mM EDTA; 1 mg/mL lisozima
1S	50 mM Tris pH 7,5; 1 M NaCl; 5 mM EDTA; 1 mg/mL lisozima
0,1KS	50 mM Tris pH 7,5; 0,1 KCl; 5 mM EDTA; 1 mg/mL lisozima
1KS	50 mM Tris pH 7,5; 1 mM KCl; 5 mM EDTA; 1 mg/mL lisozima
Avaliação de uréia	
0,5U	50 mM Tris pH 7,5; 0,5 M Ureia; 50 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1 mg/mL lisozima
1U	50 mM Tris pH 7,5; 1 M Ureia; 50 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1 mg/mL lisozima
2U	50 mM Tris pH 7,5; 2 M Ureia; 50 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1 mg/mL lisozima
3U	50 mM Tris pH 7,5; 3 M Ureia; 50 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1 mg/mL lisozima
4U	50 mM Tris pH 7,5; 4 M Ureia; 50 mM NaCl; 5 mM EDTA
5U	50 mM Tris pH 7,5; 5 M Ureia; 50 mM NaCl; 5 mM EDTA
6U	50 mM Tris pH 7,5; 6 M Ureia; 50 mM NaCl; 5 mM EDTA
Avaliação de detergente	
D	20 mM Tris HCl pH 7,5; 50 mM NaCl; 0,2 % NP 40; 1 mg/mL lisozima
T	20 mM Tris HCl pH 7,5; 50 mM NaCl; 0,2 % triton X-100; 1 mg/mL lisozima
X	20 mM Tris HCl pH 7,5; 50 mM NaCl; 0,2 % Tween 20; 1 mg/mL lisozima
M	20 mM Tris HCl pH 7,5; 50 mM NaCl; 0,2 % dodecilmaltosida; 1 mg/mL lisozima
Avaliação de estabilizante	
10G	20 mM Tris HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 10 % glicerol, 1 mg/mL lisozima
50G	20 mM Tris HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 50 % glicerol, 1 mg/mL lisozima

Fonte: Elaborada pela autora.

3.3 *XaFold*

3.3.1 Expressão heteróloga e purificação de *XaFold* a partir das construções pET-6HIS-*XaFold* e pET-TRX-*XaFold*

Para a expressão em maior escala de *XaFold* empregou-se o meio auto indutor ZYM-5052⁶⁴ suplementado com canamicina (30 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL). Para cada litro de meio ZYM-5052 foram utilizados 10 mL de pré-inóculo crescido em LB com por 20 horas a 37°C, seguindo protocolo descrito no item 3.2. Ao atingir DO_{600nm} entre 0,6 e 0,8 a temperatura foi reduzida para 20 °C para expressão proteica, por 20 horas. O passo seguinte foi a centrifugação das células (6.000 g, 40 minutos, 4 °C). O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas no tampão de lise (50 mM Tris pH 8,0; 200 mM NaCl e 10% de glicerol). Após a adição de 2 mM de PMSF e 4 mM de DTT um lisado celular foi obtido através da sonicação em gelo (8 ciclos de 45 s intercalados com 45 s entre cada ciclo). Os debris celulares foram separados por centrifugação (20.000 g, 60 minutos, 4° C). A fração solúvel foi filtrada em dispositivo Millex® (Millipore) de 0,45 µm.

Após a expressão, *XaFold* foi purificada em etapas sequenciais de cromatografia por afinidade e exclusão molecular. Todas as etapas cromatográficas foram realizadas em sistema cromatográfico semiautomatizado Äkta (GE Lifesciences) com monitoramento da absorbância no UV ($\lambda = 280$ nm).

A primeira etapa de purificação foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna HisTrap HP 5mL (GE Lifesciences). Para a cromatografia de afinidade foram usados dois tampões, denominados Tampão A (50 mM Tris pH 8,0; 500 mM NaCl e 20 mM imidazol) e Tampão B (50 mM Tris pH 8,0; 500 mM NaCl e 500 mM imidazol), utilizando-se a estratégia de gradiente de imidazol (tampão A → tampão B) em 20 volumes de coluna (VC = 100 mL), mantendo constante o percentual de tampão B durante a eluição de frações proteicas. Em seguida foi realizada cromatografia de exclusão molecular em coluna HiPrep Desalting 26/40 Sephadex G-25 Fine (GE Lifesciences), para remoção de imidazol. Nesta etapa foi utilizado tampão sem imidazol (50 mM Tris pH 8,0 e 500 mM NaCl). A construção pET-TRX-*XaFold* foi clivada com TEV Protease por 20 horas a 4 °C, na proporção de 1 mg de TEV para cada 20 mg de proteína purificada. Após a clivagem, *XaFold* foi separada por uma segunda cromatografia de afinidade, com os mesmos tampões e seguindo a mesma estratégia empregada na primeira cromatografia de afinidade.

Na etapa final de purificação foi utilizada a cromatografia de exclusão molecular em coluna Hiload 16/60 Superdex 200 (GE Lifesciences), em tampão contendo 20 mM Tris pH 7,5 e 200 mM NaCl. A pureza final, bem como a evolução da purificação em de cada etapa foi acompanhada por eletroforese em gel de acrilamida 10% SDS-PAGE.

3.3.2 Co-expressão das construções pET-6HIS-BAP-FOLD e pACYC-BirA

A co-expressão das construções pET-6HIS-BAP-FOLD e pACYC-BirA foi realizada em meio LB suplementado com carbenicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/ mL). Para cada litro de meio foram utilizados 10 mL de pré-inóculo crescido em LB por 16 horas a 37 °C. Ao atingir $DO_{600nm} = 0,6$ a expressão proteica foi induzida pela adição de 1 mM de IPTG. Para biotilação da proteína BAP-XaFOLD pela proteína BirA adicionou-se 50 µM de biotina no início da expressão, realizada à 18 °C por 20 horas.

Ao final da expressão as células foram centrifugadas (4.000 g, 30 minutos, 4 °C), descartando-se o sobrenadante. As células foram ressuspensas em tampão de lise (50 mM Tris pH 8,0; 200 mM NaCl e 10% glicerol), seguindo-se a purificação de XaFold biotinilada ou o armazenamento em ultra freezer a -80 °C até a purificação.

3.3.3 Purificação de XaFold biotinilada

As células foram lisadas em tampão de lise na presença de 4 mM de DTT, 5 mM de coquetel inibidor de proteases PROTEOLOC™ e 0,1 mg/mL DNAase. A lise foi realizada à 20 MPa no equipamento *Stansted Pressure Cell Homogeniser*. Os debris celulares foram separados por centrifugação (40.000 g, 40 minutos, 4° C). A fração solúvel foi filtrada em dispositivo Millex® (Millipore) de 0,45 µm.

Após a co-expressão, a purificação da proteína biotinilada foi realizada em etapas sequenciais de cromatografia por afinidade e exclusão molecular. As etapas de cromatografia de afinidade foram realizadas conforme descrito no item 3.3.1. A remoção do imidazol, por sua vez, foi realizada por diálise após a primeira cromatografia de afinidade. Para diálise, realizada por 16 horas a 4 °C em membrana semipermeável com peso molecular de corte igual a 10 kDa, utilizou-se tampão composto por 50 mM Tris pH 8,0 e 500 mM NaCl. Durante a diálise também foi realizada a clivagem da cauda 6HIS pela TEV protease, na proporção de 1 mg de TEV para cada 20 mg de proteína purificada.

Na etapa final de purificação foi utilizada a cromatografia de exclusão molecular em coluna Hiload 26/60 Superdex 200 (GE Lifesciences), em tampão contendo 20 mM Tris pH 7,5 e 200 mM NaCl.

A purificação foi acompanhada por eletroforese em gel de acrilamida 10% SDS-PAGE. A biotinação da XaFold foi analisada por *western blot* utilizando anticorpo anti-biotina. Adicionalmente, ao final da purificação a proteína foi submetida à análise MALDI-TOF para avaliação da biotinação.

3.3.4 Estudos estruturais

3.3.4.1 Triagem e otimização das condições de cristalização

Após obtenção de XaFold pura a proteína foi concentrada em dispositivo Amicon Ultra-15 30 kDa (Millipore). A triagem de condições de cristalização foi realizada à 18 °C, a partir de quatro concentrações de XaFold (3,0; 5,0; 7,5; 10 mg/mL), empregando-se a técnica de difusão de vapor e matriz esparsa. Para triagem inicial foram utilizados 13 kits comerciais da Hampton Research (Index; Crystal Screen e Crystal Screen Cryo), Qiagen (Classic; Classic II; PEGs; PEGSII; JCSG Core Suite I, II, III e IV; AmSO₄) e Molecular Dimensions (Morpheus).

As gotas de cristalização foram montadas manualmente, com o auxílio de micropipetas multicanais. Para tanto, utilizou-se a técnica de gota assentada (do inglês, *sitting drop*), contendo uma mistura de 1 µL da proteína em solução e 1 µL da solução de cristalização proveniente dos kits comerciais. A inspeção visual dos experimentos de cristalização foi realizada com o auxílio de uma lupa estereoscópica nos dias 1, 3, 5 e 7 da primeira semana e, depois, a cada 7 dias. Para a cristalização da XaFold na conformação fechada a proteína purificada foi incubada com os ligantes descritos na Tabela 4 por 4 horas. Após a incubação foi realizada a triagem das condições de cristalização conforme protocolo descrito acima.

Tabela 4 – Compostos incubados com XaFold para ensaios de co-cristalização.

Sítio 1*	Sítio 2**
5 mM NADP	-
5 mM NAD	-
5 mM NADP	2 mM N ⁵ , N ¹⁰ – metileno – THF
5 mM NADPH	2 mM N ⁵ , N ¹⁰ – metenil – THF
5 mM NADP	2 mM trimetoprima
5 mM NADP	2 mM metotrexato

*Sítio 1, localizado no domínio C-terminal. **Sítio 2, localizado no domínio N-terminal.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.3.4.2 Coleta e processamento de dados de difração de raios-X

Os cristais de XaFolD obtidos a partir da triagem dos kits comerciais foram retirados da condição de cristalização utilizando *loop* de *nylon* (MiTeGen) de tamanho apropriado (0,2 – 0,4 mm) e lavados em solução composta pela solução de cristalização acrescida de 15% do agente crioprotetor etilenoglicol. Em seguida os cristais foram resfriados e armazenados em nitrogênio líquido até o momento da coleta dos dados de difração.

Os experimentos de difração de raios X foram conduzidos na linha MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron do Brasil (LNLS) – Campinas/SP, utilizando o detector PILATUS 2M. Para avaliação dos cristais e planejamento da estratégia de coleta imagens iniciais a 0 e 90° foram analisadas. O tempo de exposição também foi avaliado (2 – 10 s). Apenas o cristal formado na condição de cristalização H7 do kit Index difratou raios X. Após a otimização da condição de cristalização (item 3.3.4.1), os cristais de XaFolD obtidos foram submetidos novamente aos experimentos de difração de raios X. Um conjunto completo de dados de difração foi coletado a partir de um cristal único, resultando em 900 imagens. A coleta de dados foi realizada com o comprimento de onda λ igual a 1,458666 pelo método de rotação, empregando-se *fine- Φ -slicing* ($\Phi = 0,2^\circ$).⁶⁵ A distância do detector foi de 150 mm, e a coleta foi realizada rotacionando o cristal 180°.

A indexação e integração dos dados coletados foram realizadas utilizando o programa XDS,⁶⁶⁻⁶⁷ enquanto a determinação do grupo espacial, escalonamento e redução dos dados foi realizada no Aimless.^{66-67,68-69}

3.3.4.3 Construção e refinamento do modelo cristalográfico

Para a determinação dos fatores de estrutura as fases iniciais foram obtidas pelo método de substituição molecular. A estrutura cristalográfica usada como molde para substituição molecular foi a FolD de *E.coli* (EcFolD), sob o código PDB 1B0A e 2,56 Å de resolução.⁷⁰ O número de moléculas por unidade assimétrica foi determinado calculando-se o coeficiente de Matthews.⁷¹ Para a resolução da estrutura foram utilizados os programas Phaser⁷², SHELXE⁷³ e Buccaneer.⁷⁴⁻⁷⁵ Inicialmente, utilizou-se como molde para a substituição molecular tanto a estrutura completa quanto os domínios N-terminal e C-terminal truncados manualmente da 1B0A.

O modelo inicial de um fragmento do domínio N-terminal da XaFolD gerado pelo Phaser foi submetido ao SHELXE para melhoria das fases. As novas fases e coordenadas

geradas pelo SHELXE foram submetidas ao Buccaneer para a reconstrução do modelo completo de XaFold. Além dos parâmetros estatísticos, as soluções fornecidas pelo Phaser e pelo Buccaneer foram analisadas pelo mapa de densidade eletrônica resultante da etapa de substituição molecular, avaliando-se a presença de regiões com densidade eletrônica contínua e bem definida, característica de estruturas secundárias.

Para o refinamento do modelo utilizou-se o programa Refmac,⁷⁶ avaliando-se a convergência dos dados através dos valores de *R-factor* e *R-free*. Ciclos sucessivos de reconstrução manual no Coot, refinamento no espaço real e refinamento no espaço recíproco foram seguidos até a obtenção do modelo completo de XaFold.

3.3.5 Mutação sítio-dirigida

As mutações no sítio de ligação ao NADP⁺ foram introduzidas com o kit comercial *QuikChange Site-Directed Mutagenesis*, com algumas adaptações ao protocolo. Os oligonucleotídeos foram planejados usando a ferramenta *QuickChange primer tool* (www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp). Os reagentes, características e detalhes de cada ciclo estão descritos na Tabela 5. A reação de PCR empregou DNA polimerase de alta fidelidade (*Pfu Turbo*TM - Agilent®), DNA plasmidial de XaFold selvagem extraído a partir de cepas *E. coli* DH5α como molde para amplificação, e os seguintes pares de oligonucleotídeos:

V176R

Senso: 5'–CAACGTGGTTGCTGCGCCCGACGATGGTGG–3' e

Anti-senso: 3'–CCACCATCGTCGGGCGCAGCAACCACGTTG–5'

K200S

Senso: 5'–TCGGCCGGGGTGAAGCTGTGGCAGCAACTG–3' e

Anti-senso: 3'–CAGTTGCTGCCACAGCTTCACCCCGGCCGA–3'

Para a ciclagem térmica realizada, empregou-se X entre 40 e 57 °C e Y = 1 min/kb. O produto da reação foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com 0,05 µg/mL de brometo de etídeo.

Tabela 5 – Parâmetros da reação de PCR utilizada para mutação sítio-dirigida.

Reagente	Concentração	Ciclagem Térmica
Tampão 10X	1X	95 °C – 30 s
dNTP	200 µM	
Oligonucleotideo senso	125 ng	95 °C – 30 s
Oligonucleotideo anti-senso	125 ng	X °C – 1 min
DNA plasmidial	2-50 ng	68 °C – Y s
<i>Pfu Turbo</i> DNA polimerase	2,5 U	68 °C – 10 min
H₂O	qsp. 50 µL	

Fonte: Elaborada pela autora.

3.3.6 Ensaios de caracterização cinética: determinação de K_M para os substratos

As atividades desidrogenase e ciclo-hidrolase da *XaFolD* foram caracterizadas através do monitoramento da absorbância em 355 nm, determinando-se os valores de K_M para os substratos NADP^+ , N^5 , N^{10} -metileno-THF e N^5 , N^{10} -metenil-THF, estes dois últimos adquiridos da empresa Schirks Laboratories (Jona, Switzerland) com pureza > 95%.

Os ensaios foram realizados em cubetas de 1 mL nos espectrofotômetros Cary 60 UV-Vis e Shimadzu UV-Probe. Após otimização o volume de reação foi reduzido para 200 µL e o ensaio foi transferido para o espectrofotômetro Spectramax, em placas de 96 poços. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

Para desenvolver o protocolo do ensaio cinético foram avaliadas diferentes condições de tamponamento, bem como a adição de CHAPS (0,05 – 0,20%), BSA (0,2 – 0,8 mg/mL), 2-mercaptoetanol / DTT (2 – 20 mM) e concentrações de *XaFolD* entre 2 nM e 20 nM. O ensaio final foi estabelecido a 23 °C, em meio reacional contendo 25 mM MOPS (pH 7,3); 0,05% CHAPS; 0,4 mg/mL BSA; 4 mM 2-mercaptoetanol e 10 nM de *XaFolD*.

O valor de K_M para o substrato N^5 , N^{10} -metileno-THF foi determinado a partir de 7 concentrações entre 0,75 mM e 0,09 mM sendo que todas as reações foram conduzidas na presença de 6 mM de NADP^+ . Para a determinação do valor de K_M do NADP^+ foram utilizadas 10 concentrações entre 4 mM - 0,18 mM e concentração fixa de substrato (500 µM). Para a caracterização da atividade ciclo-hidrolase e determinação do valor de K_M para o substrato N^5 , N^{10} -metenil-THF foram utilizadas 7 concentrações a partir de 100 µM do substrato.

A determinação dos parâmetros K_M e $V_{M\text{AX}}$ foi baseada nos dados obtidos das curvas concentração-resposta e analisados por regressão não linear no programa GraphPad Prism

v.7.00, com ajuste ao modelo de Michaelis-Menten (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com).

3.3.7 Estudos de interação entre XaFold e ligantes por BLI

3.3.7.1 Padronização do ensaio

A padronização do ensaio de interferometria de biocamada (BLI, do inglês *Biolayer Interferometry*) foi realizada na Universidade de Dundee (Dundee, UK). Para a padronização, foram utilizados dois tipos de biossensores: Ni-NTA (do inglês, *Nickel-charged tris-Nitriloacetic Acid*) e SSA (do inglês, *Super Streptavidin*), ambos adquiridos da empresa Forté-Bio (USA). Todos os ensaios foram realizados em placas de 96 poços, no sistema Octet RED (Forté-Bio, USA). As construções 6HIS-TRX-XaFOLD e 6HIS-XaFOLD foram imobilizadas em biossensores Ni-NTA a 0,5 mg/mL. Para cada uma dessas duas construções foram avaliados biossensores de referência imobilizados com 6HIS-TRX e com 6HIS-TEV, a 0,5 mg/mL e 0,1 mg/mL. Os biossensores SSA foram usados para imobilização da construção BAP-XaFold biotinilada a 0,05 mg/mL, e biossensores bloqueados com biocitina a 10 µg/mL foram usados como referência.

Os compostos NADP^+ ; N^5 , N^{10} -metileno-THF; N^5 , N^{10} -metenil-THF; ácido pteróico; metotrexato e trimetoprima foram avaliados para estabelecer o controle positivo de ligação à XaFold (Tabela 6). Os compostos N^5 , N^{10} -metenil-THF, ácido pteróico, metotrexato e trimetoprima foram avaliados individualmente e também na presença de 5 mM de NADP^+ , enquanto o composto N^5 , N^{10} -metileno-THF foi avaliado individualmente e na presença de NADPH. Para os compostos solubilizados em DMSO 100% foram preparadas soluções-estoque a 200 mM, garantindo que a maior concentração de DMSO não ultrapassasse 2,5%. Para os compostos N^5 , N^{10} -metileno-THF e N^5 , N^{10} -metenil-THF foram preparadas soluções-estoque a 15 mM e 5 mM, respectivamente, e a concentração máxima testada foi estabelecida de forma a manter o pH do ensaio na faixa entre 7 e 8,5.

Os ensaios foram realizados em tampão contendo 20 Tris-HCl pH 7,5 e 200 mM NaCl (q.s.p 200 µL). A imobilização das construções nos biossensores foi realizada por 600 segundos, seguidos da remoção da XaFold não imobilizada durante 600 segundos e estabilização da linha de base por 120 segundos. Os biossensores de referência foram submetidos ao mesmo procedimento.

Cada composto foi testado em concentrações crescentes, e cada ensaio, por sua vez, foi dividido em três etapas: estabilização da linha de base (60 s), associação (120 s) e dissociação (60 s). Durante a análise dos resultados foram subtraídos dos dados brutos o sinal dos biossensores de referência e o sinal dos biossensores na ausência dos compostos.

Tabela 6 - Compostos avaliados como controle positivo de ligação à XaFold.

Composto	Concentrações testadas (μM)	Solubilização
<i>N</i> ⁵ , <i>N</i> ¹⁰ –metileno–THF	2334 – 0,397	20 mM NaOH
<i>N</i> ⁵ , <i>N</i> ¹⁰ –metenil–THF	300 – 0,005	10 mM HCl
NADP⁺	7000 – 30	20 Tris-HCl + 200 mM NaCl pH 7,5
NADPH	7000 – 30	20 Tris-HCl + 200 mM NaCl pH 7,5
Ácido pteróico	2500 – 2,41	20 Tris-HCl + 200 mM NaCl pH 7,5
Metotrexato	5000 - 20	100% DMSO
Trimetoprima	5000 - 20	100% DMSO

Fonte: Elaborada pela autora.

Ao final da padronização, foram selecionados para a triagem de fragmentos a proteína biotinilada BAP-XaFOLD imobilizada em biossensores SSA, biossensores de referência bloqueados com biocitina a 10 μg/mL e o composto *N*⁵, *N*¹⁰–metenil–THF (230 μM) como controle positivo de ligação específica à proteína de interesse.

3.3.7.2 Triagem de fragmentos

A biblioteca de fragmentos disponível no *Drug Discovery Unity*, Universidade de Dundee (Dundee, UK) foi submetida à triagem por BLI seguindo o protocolo estabelecido no item 3.3.7.1. Os 1.124 compostos da biblioteca foram distribuídos em 8 placas de 384 poços, testando-se em média 140 fragmentos por placa. Cada fragmento foi testado em concentração única de 200 μM, em meio contendo 20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl e 0,1% DMSO. Foram utilizados 16 biossensores simultaneamente durante a triagem, previamente submetidos à etapa de imobilização com BAP-XaFold biotinilada recém-purificada. Entre as bateladas de ensaio a integridade da proteína imobilizada foi verificada pela magnitude do sinal de ligação ao substrato, medida em nm.

O processamento dos dados foi realizado no programa OCTET RED Data Analysis v 7.1. Durante o processamento foram subtraídos dos dados brutos: *i.* a resposta de associação e dissociação dos sensores de referência bloqueados com biocitina na presença dos fragmentos e *ii.* o efeito da suplementação de 0,1% de DMSO ao tampão utilizado no ensaio, visando

assegurar que a mudança no padrão de interferência pudesse ser atribuída à interação específica da XaFold com os fragmentos triados.

Os 155 fragmentos que promoveram mudança no padrão de interferência $\geq 0,05$ nm foram analisados individualmente, culminando na seleção de 92 fragmentos como possíveis *hits*. Dentre os 92 *hits* foram selecionados os 50 fragmentos para os quais se observou a maior magnitude de resposta durante a triagem.

As estruturas 2D dos 50 fragmentos, fornecidas pelo DDU, foram utilizadas para o cálculo das propriedades físico-químicas e agrupadas por similaridade química utilizando o programa Molsoft (Molsoft L.L.C, USA). Adicionalmente, foram realizados estudos de docagem molecular para avaliação das interações entre esses fragmentos e a XaFold. Ao final da triagem, os compostos *i.* 1-ciclo-hexil-3-piridin-3-il-metil-ureia (*hit 1*), *ii.* ácido 2-(3-fluoro-fenil) propanoico (*hit 2*) e *iii.* 3-(2-amino-etil)-1-metil-2,4(1H, 3H)-quinazolilediona (*hit 3*) foram selecionados para aquisição.

3.3.7.3 Determinação do valor de K_D dos *hits* selecionados

A constante de dissociação, K_D , dos três compostos selecionados foi determinada por BLI utilizando o mesmo protocolo descrito durante a triagem de fragmentos, diferindo apenas em relação às múltiplas concentrações testadas. Os compostos 1-ciclo-hexil-3-piridin-3-il-metil-ureia e 2-(3-fluoro-fenil)-ácido propanoico, adquiridos das empresas Sigma Aldrich e Enamine, respectivamente, foram solubilizados em DMSO 100% para o preparo de soluções estoque a 200 mM. Para esses compostos foram testadas 10 concentrações, de 2000 a 0,009 μ M, e a máxima concentração de DMSO no ensaio foi igual a 1%.

Para o composto 3-(2-amino-etil)-1-metil-2,4(1H, 3H)-quinazolilediona, adquirido da empresa ChemBridge, uma solução-estoque a 100 mM utilizando DMSO 100% e banho de ultrassom (40 KHz, 1h) foi preparada, testando-se 10 concentrações entre 1000 e 0,004 μ M para a determinação do valor de K_D . Os dados foram analisados no programa OCTET RED Data Analysis v 7.1.

3.3.8 Estudos de interação utilizando Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

Os ensaios de Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC, do inglês, *Isothermal Titration Calorimeter*) foram realizados no equipamento MicroCal PEAQ-ITC (Malvern Instruments, UK) na Universidade de Dundee (Dundee, UK). Os substratos da XaFold N^5 , N^{10} -metileno-

THF e NADP^+ , o produto da reação NADPH, assim como os três *hits* provenientes da triagem de fragmentos foram titulados nas concentrações e tampões descritos na Tabela 7.

Para garantir que as soluções da célula de referência e da seringa fossem idênticas a proteína foi preparada no mesmo tampão utilizado para preparo do ligante (Tabela 7). Os ensaios foram realizados com a XaFold purificada a partir da construção pET-TRX-XaFold. Finalizada a purificação, a XaFold em tampão composto por 20 mM Tris-HCl e 200 mM NaCl pH 7,5 foi concentrada em dispositivo Amicon Ultra-15 30 kDa (Millipore) até 26 mg/mL (0,83 μM). O tampão da proteína foi trocado por centrifugação (2700 g, 4 °C, 15 minutos/ciclo), adicionando-se a cada ciclo 9,8 mL do tampão utilizado para o preparo do ligante (Tabela 7) à 200 μL de XaFold.

Após 3 ciclos de troca do tampão a proteína foi concentrada a 20 mg/mL (0,64 μM). A partir desse estoque a XaFold foi diluída para o preparo de 400 μL nas concentrações especificadas na Tabela 7, e 300 μL dessa solução foi aplicada na célula de amostra. A solução do composto (80 μL) foi preparada imediatamente antes do ensaio e aspirada pela seringa do equipamento de forma automatizada. Em cada ensaio foi realizada uma injeção inicial de 0,4 μL seguida de 12 injeções de 3 μL do ligante na célula da amostra. As injeções foram realizadas sob agitação de 750 rpm, a 25 °C, e o tempo de estabilização pós-injeção foi de 150s.

Tabela 7 – Compostos avaliados como controle positivo de ligação à XaFold.

[Compostos] (mM)	[XaFold] (μM)	Composição final do tampão
<i>N</i> ⁵ , <i>N</i> ¹⁰ -metileno-THF (2 – 1)	50 – 200	20 Tris-HCl + 200 mM NaCl pH 7,5 + 1% DMSO
NADP ⁺ (60 – 6)	50 – 200	20 Tris-HCl + 200 mM NaCl pH 7,5
NADPH (60 – 6)	50 – 200	20 Tris-HCl + 200 mM NaCl pH 7,5
Hit 1 (3 – 1)	50 – 200	20 Tris-HCl + 200 mM NaCl pH 7,5 + 1% DMSO
Hit 2 (3 – 1)	50 – 200	20 Tris-HCl + 200 mM NaCl pH 7,5 + 1% DMSO
Hit 3 (3 – 1)	50 – 200	20 Tris-HCl + 200 mM NaCl pH 7,5 + 1% DMSO

Fonte: Elaborada pela autora.

3.3.9 Caracterização dos inibidores identificados

Os *hits* 1 e 2 provenientes da triagem de fragmentos foram submetidos a ensaios de inibição da atividade ciclohidrolase da XaFold. Concentrações variáveis dos compostos foram testadas monitorando-se a absorbância em 355 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas, a 23 °C, em meio reacional contendo 25 mM MOPS (pH 7,3); 0,05% CHAPS; 0,4 mg/mL BSA; 4 mM 2-mercaptoetanol, 30 μM de *N*⁵, *N*¹⁰-metenil-THF e 10 nM de XaFold.

Em seguida, foram realizados ensaios de concentração-resposta através da análise de regressão não-linear no módulo de cinética enzimática do programa GraphPad Prism.

3.3.10 Triagem Virtual de inibidores

3.3.10.1 Seleção e preparo do sítio de docagem

A estrutura cristalográfica da *XaFolD* foi resolvida na ausência do NADP^+ , na conformação aberta. Consequentemente o sítio ativo de ligação ao substrato N^5, N^{10} -metileno-THF está exposto ao solvente e é inadequado para estudos de docagem molecular. Assim, para selecionar um modelo tridimensional de FolD que pudesse ser utilizado para estudos de modelagem molecular as 20 estruturas cristalográficas de FolD disponíveis no *Protein Data Bank* foram analisadas (data de acesso 23/10/2017). Para isso, além dos avaliadores estatísticos globais foram avaliadas a presença de ligantes co-cristalizados e a qualidade dos mapas de densidade eletrônica dos ligantes no sítio ativo. Adicionalmente, a conservação dos resíduos do sítio ativo de interesse e a conformação das cadeias laterais foram levadas em consideração. Essa análise culminou na seleção da FolD de *Trypanosoma brucei* (*TbFolD*) PDB ID 4CJX para os estudos de docagem molecular.

A cadeia A da *TbFolD* PDB ID 4CJX (resolução = 2,05 Å), contendo o cofator NADP^+ e o inibidor 9L9, foi selecionada para os estudos de docagem molecular. Todos os procedimentos para a criação do *grid* de docagem foram realizados usando o programa Glide versão 10.1 (Schrödinger, USA), através da interface Maestro. O primeiro passo para a criação do *grid* é a análise e processamento da estrutura proteica utilizando a ferramenta *Protein Preparation*. Nesse passo, além da adição de átomos de hidrogênios ao modelo cristalográfico, foram calculados os valores de pKa e o estado de protonação para histidinas, asparaginas e glutaminas em $\text{pH } 7,0 \pm 2,0$, utilizando o protocolo do programa PROPKA disponível no Glide. Os resíduos com dupla conformação foram analisados, selecionando-se para o modelo final a conformação com maior ocupância ou a conformação mais favorável de acordo com o ambiente químico. Todas as moléculas de solvente do modelo original foram removidas, e a minimização do modelo foi feita utilizando o campo de força OPLS 2005. A ferramenta *Receptor Grid Generation* foi utilizada para criação do *grid* cúbico centralizado no ligante 9L9, com arestas de 10 Å.

3.3.10.2 Seleção e preparo da base de compostos

As bases de dados *Enamine Agro-like*, *Enamine Antibacterial*, e *ChemBridge DIVERSet*TM foram selecionadas para os estudos de docagem molecular. Essas bases de dados possuem livre acesso *online* e disponibilizam as coordenadas tridimensionais das moléculas em formato sdf, compatível com o programa de docagem molecular. Além disso os compostos dessas bases de dados são comercialmente disponíveis e as empresas Enamine e ChemBridge garantem o envio dos compostos para o Brasil em até 10 dias.

A base de dados *Enamine Agro-like* reúne 15.000 moléculas entre 200 e 400 Da com diversidade estrutural e características desejáveis para o desenvolvimento de agroquímicos, dentre elas a presença de halogênios, enxofre, grupos funcionais altamente polares e ricos em heteroátomos, oxazóis, oxazolinas, ciclopropanos e anéis alifáticos com oxigênio.

A base de dados *Enamine Antibacterial* reúne 9.163 compostos com até 450 Da, área de superfície polar (PSA) > 35% e ClogD 7,4 < 1. Essa base de dados é rica em moléculas ionizáveis, ácidos carboxílicos e múltiplos farmacóforos.

A base de dados *ChemBridge DIVERSet*TM, por sua vez, reúne 50.000 compostos com massa molecular < 500 Da, clogP ≤ 5, TPSA ≤ 100, ligações rotacionáveis ≤ 8, aceptores de ligação de hidrogênio ≤ 10 e doadores de ligação de hidrogênio ≤ 5. Além de propriedades físico-químicas desejáveis para o desenvolvimento de fármacos, essa base de dados também foi curada para remoção de compostos com grupos químicos altamente reativos, sais e tautômeros.

As estruturas tridimensionais das 74.163 moléculas foram submetidas à ferramenta *Ligand Preparation* para *i.* eliminação de compostos na forma salina, *ii.* exploração dos centros quirais não especificados no arquivo sdf e *iii.* cálculo de cargas utilizando o campo de força OPLS 2005. Os 109.886 confôrmeros resultantes foram submetidas ao primeiro processo de docagem molecular.

3.3.10.3 Procedimento de docagem molecular

Os 109.886 confôrmeros resultantes da etapa anterior foram submetidas à docagem molecular no módulo de precisão padrão (SP) do Glide v.10.1. Para a amostragem de conformações as estruturas dos ligantes foram consideradas flexíveis. Nenhuma restrição de interação com resíduos do sítio ativo foi selecionada, visando explorar a cavidade do sítio ativo e a conformação dos ligantes da maneira mais ampla possível.

As conformações resultantes da primeira etapa de docagem foram analisadas pela função *GlideScore*, e para a próxima etapa estabeleceu-se -7,00 como valor de corte. As 15.825 conformações selecionadas a partir da docagem molecular no modo SP foram submetidas a etapa adicional de docagem, dessa vez no módulo de precisão extra (XP).

3.4 Ensaio fenotípico de inibição

A análise da taxa de crescimento e das características morfológicas das colônias resultou na seleção da cepa Xa11 para o ensaio de inibição. A cepa Xa11 foi cultivada em meio XAS líquido a partir do estoque glicerinado (175 rpm, 28 °C, 7 dias). Alíquotas do pré-inóculo foram diluídas em meio líquido XAS, na proporção de 1:100. O crescimento bacteriano foi monitorado continuamente a cada 10 minutos durante 100 horas através da DO_{600nm}. Os ensaios de inibição foram realizados na incubadora *Bioscreen Microbiological Analyser* (LabSystem, Finlândia).

O ensaio de inibição foi realizado em duas etapas: *i.* triagem de candidatos a inibidores e *ii.* determinação da concentração capaz de inibir 50% do crescimento de *X. albilineans* (EC₅₀, do inglês *half maximal effective concentration*) dos inibidores identificados. Para o ensaio de inibição os compostos foram solubilizados em DMSO 100%, preparando-se para cada composto uma solução estoque a 200 mM. Para os compostos insolúveis nessa concentração, adicionou-se DMSO 100% até solubilização completa. Os ensaios foram realizados em duplicatas, em placas de 100 poços com 200 µL/poço.

Durante a etapa de triagem testou-se três concentrações para cada composto: 2 mM, 1 mM e 0,5 mM. Para o controle negativo do ensaio de inibição utilizou-se XAS suplementado com DMSO 1%. O controle positivo do ensaio de inibição foi estabelecido em meio XAS com DMSO 1% e 0,5 mg/mL de canamicina.

Os compostos que inibiram mais de 80% do crescimento de *X. albilineans* durante a triagem foram submetidos a novos ensaios de inibição para determinação do valor de EC₅₀. Para tanto, foram testadas múltiplas concentrações obtidas por diluição seriada. Ao final do ensaio de inibição os dados de absorbância foram analisados por regressão não linear no programa GraphPad Prism v.7.00 (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com).

3.5 *XaFolE*

3.5.1 Expressão heteróloga e purificação

A expressão heteróloga da construção pETM11-*XaFolE* foi realizada em células *E. coli* Rosetta™ (DE3), seguindo o mesmo protocolo de expressão em meio autoindutor ZYM-5052⁶⁴ descrito para *XaFolD*. Finalizada a expressão, as células foram lisadas em tampão de lise (50 mM Tris pH 8,0; 200 mM NaCl; e 10% glicerol) na presença de 4 mM de DTT, 5 mM de coquetel inibidor de proteases PROTEOLOC™ e 0,1 mg/mL DNAase. A lise foi realizada à 20 MPa no equipamento *Stansted Pressure Cell Homogeniser*. Os debris celulares foram separados por centrifugação (40.000 g, 40 minutos, 4° C) e a fração solúvel foi filtrada em dispositivo Millex® (Millipore) de 0,45 µm. A *XaFolE* foi purificada em etapas sequenciais de cromatografia por afinidade e exclusão molecular, seguindo procedimentos idênticos aos descritos para a *XaFolD*.

CAPÍTULO 4

Resultados e Discussão

Biologia Molecular

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO – *Biologia Molecular*

4.1 *Xanthomonas albilineans*

4.1.1 Cultivo e manutenção de *X. albilineans*

As cepas de *X. albilineans*, apesar de disponíveis no banco de microrganismos da *American Type Culture Collection* (ATCC) sob os identificadores ATCC® 33915™, ATCC® 33196™, ATCC® 29184™, ATCC® 29185™, ATCC® 29186™ e ATCC® 12785™, não podem ser comercializadas para o Brasil devido a restrições impostas à distribuição internacional de fitobactérias. Portanto, as cepas de *X. albilineans* IBSBF1374, 740, 654 e 326 foram adquiridas da Coleção de Culturas Fitobactérias IBSBF do Instituto Biológico de Campinas para extração do DNA genômico e clonagem das sequências codificantes de interesse. Posteriormente, as cepas Xa3, Xa5, Xa11 e Xa37, isoladas a partir da cana-de-açúcar pelo Centro da Cana do Instituto Agrônomo de Campinas, foram selecionadas para realização do ensaio fenotípico de inibição. O protocolo recomendado para reidratação, recuperação e cultivo foi criteriosamente seguido para evitar contaminações, em virtude do longo tempo necessário para o crescimento de *X. albilineans*.

A *X. albilineans* é uma bactéria Gram-negativa, aeróbica, não esporulante, uniflagelada e de crescimento lento. A saturação do meio seletivo XAS ocorre entre 5-7 dias de cultivo à 28 °C.⁵⁹ Quando cultivada em meio líquido ou placa as colônias apresentam-se amareladas, com aspecto não-mucoidal (Figura 11). As características morfológicas das colônias e o crescimento lento descritos na literatura foram observados durante o cultivo, fornecendo subsídios para a confirmação da identidade de *X. albilineans*.

Figura 11 – Acompanhamento do crescimento de *Xanthomonas albilineans* no meio seletivo XAS durante 07 dias. **IA**, controle negativo do crescimento, composto por meio XAS líquido; **IB**, crescimento de *X. albilineans* em meio XAS líquido. **II**, crescimento de *X. albilineans* em meio XAS sólido.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.2 Extração do DNA genômico e identificação molecular

O diagnóstico precoce da contaminação por *X. albilineans* é uma importante estratégia de controle da doença, uma vez que mudas provenientes de plantas em fase latente podem desenvolver a doença após o plantio, em virtude do estresse climático.⁷⁷ Nesse sentido, diferentes métodos tem sido empregados como alternativa ao diagnóstico baseado em sinais e sintomas da doença. Dentre esses métodos cita-se *i.* isolamento em meio seletivo, *ii.* métodos sorológicos com anticorpos mono ou policlonais, e *iii.* métodos moleculares baseados em PCR com oligonucleotídeos específicos.⁵⁹⁻⁷⁸⁻⁷⁹ Neste trabalho optou-se pela associação de dois métodos para confirmação que as bactérias em investigação fossem realmente *X. albilineans*, ou seja, isolamento de colônias em meio seletivo seguido do diagnóstico molecular. Este último, de alta sensibilidade, consiste na detecção de *X. albilineans* através da amplificação do fragmento gênico de 288 pares de base (bp, do inglês *base pairs*) denominado PGBL, localizado na região 16S-23S.

Colônias de *X. albilineans* isoladas a partir do meio seletivo foram cultivadas para extração do DNA. Para garantir a qualidade do DNA extraído foi utilizado um protocolo adaptado e otimizado para o trabalho com *Xanthomonas* sp., uma vez que as bactérias desse gênero produzem e secretam polissacarídeos extracelulares em grande quantidade, dificultando a extração de material genômico com pureza adequada aos experimentos de Biologia Molecular. Neste protocolo o detergente catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) é utilizado para extração dos ácidos nucleicos.⁸⁰ O CTAB se complexa com os ácidos nucleicos e após tratamento com isopropanol e etanol, seguido da digestão com RNase, permite o isolamento do DNA genômico, diminuindo a contaminação por polissacarídeos. Após isolamento, o DNA foi utilizado para amplificação do PGBL, confirmando-se a identidade das cepas adquiridas. Na Figura 12 está representada a amplificação do PGBL das cepas IBSBF326 e IBSBF740.

Figura 12 – Gel de eletroforese em agarose 1% da reação de amplificação do fragmento gênico PGBL (288 bp). **MK** = marcador de massa molecular, **1** = cepa IBSBF326, **2** = cepa IBSBF740.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.3 Clonagem dos segmentos gênicos codificantes das enzimas FolC, FolD e FolE

A amplificação dos segmentos gênicos codificantes das enzimas *XaFolC* (1260 bp), *XaFolD* (891 bp) e *XaFolE* (560 bp) foi realizada por PCR, utilizando-se como molde para amplificação o DNA genômico extraído da cepa IBSBF740 de *X. albilineans*. Após análise da amplificação por eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 13) os produtos da amplificação foram purificados.

Figura 13 – Gel de agarose 1% do produto de amplificação dos segmentos gênicos de interesse. **MK**, marcador de massa molecular. **1**, clonagem do segmento gênico codificante para a enzima *XaFolC*, com 1260 bp. **2**, clonagem do segmento gênico codificante para a enzima *XaFolD*, com 891 bp. **3**, clonagem do segmento gênico codificante para a enzima *XaFolE* com 560 bp.

Fonte: Elaborada pela autora.

A clonagem das enzimas de interesse foi realizada com sucesso nos três vetores de expressão propostos (Tabela 8). Após confirmar a integridade das construções por sequenciamento, o DNA plasmidial foi utilizado na transformação de células competentes para

expressão. A presença do plasmídeo nos clones recombinantes, por sua vez, foi avaliada através de PCR de colônia (Figura 14), com bandas amplificadas nas regiões compatíveis com o tamanho dos segmentos de interesse: 1260 bp para *XaFolC*, 891 bp para *XaFolD* e 560 bp para *XaFolE*. Para as três proteínas, *XaFolC*, *XaFolD* e *XaFolE*, verificou-se a presença do gene codificante de interesse em todas as construções.

Tabela 8 – Características das construções contendo a sequência codificante das proteínas de interesse.

Construção	Vetor de Expressão	Massa Molecular Total (Construção + Vetor)	Massa Molecular após Clivagem
<i>XaFolC</i>	pETM11	47,8	44,8
	pETTRX-1a	58,8	
	pETNUS-1a	101,8	
<i>XaFolD</i>	pETM11	34,4	31,4
	pETTRX-1a	45,4	
	pETNUS-1a	88,4	
<i>XaFolE</i>	pETM11	25,6	22,6
	pETTRX-1a	36,6	
	pETNUS-1a	79,6	

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 14 – Gel de agarose 1% das reações de PCR de colônia, obtidas após a clonagem das proteínas *XaFolC* (A), *XaFolD* (B) e *XaFolE* (C) nos vetores pETM11, pETTrx-1a e pETNus-1a. **MK**, marcador de massa molecular; (+), colônias positivas; (-), colônias negativas; 1* (em C), pETNus-1a-*XaFolD*. A presença do segmento codificante das enzimas *XaFolC*, *XaFolD* e *XaFolE* foi confirmada pelas bandas amplificadas na região dos 1260 bp, 891 bp e 560 bp, respectivamente, indicadas por (+).

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 *XaFolD*, *XaFolC* e *XaFolE*: priorização de alvos

4.2.1 *XaFolD*

A expressão heteróloga de proteínas em *E. coli* pode ser influenciada por diversos fatores. Dentre eles, destacam-se: *i.* cepa bacteriana utilizada para expressão; *ii.* características da construção plasmidial contendo a proteína de interesse (*i.e.*, sistemas de co-expressão e proteínas de fusão); *iii.* agente indutor; *iv.* temperatura; e *v.* tempo de expressão.⁸¹⁻⁸²

O primeiro teste de expressão em pequena escala (10 mL) foi realizado para comparar a influência da temperatura e da inclusão de proteínas de fusão na expressão. Iniciando-se pela *XaFolD*, construções fusionadas na região N-terminal à cauda 6HIS, (pETM11-*XaFolD*), à cauda 6HIS e tiorredoxina (pETTRX-1a-*XaFolD*), e também à cauda 6HIS e Nus-1a (pETNus-1a-*XaFolD*) foram utilizadas para a transformação de células competentes *E. coli* BL21 (DE3), as quais possuem alta eficiência de transformação e são adequadas à expressão heteróloga pela deficiência em *Lon* e *OmpT* proteases.⁸³

Dois diferentes sistemas de expressão foram avaliados: *i.* expressão por 3 horas a 37°C e *ii.* expressão por 16 horas a 20°C.⁸⁴⁻⁸⁵ As construções de *XaFolD* nos vetores pETM-11 e pETTRX-1a apresentaram adequado perfil de expressão a 20°C. A Figura 15 indica as bandas de superexpressão na fração solúvel de ambos os constructos: a banda de 34,4 kDa corresponde ao pETM11-*XaFolD* (31,4 kDa da *XaFolD* + 3 kDa da cauda de hexa-histidina), enquanto a banda de 46 kDa é referente ao pETTRX-1a-*XaFolD* (31,4 kDa da *XaFolD* + 3 kDa da cauda de hexa-histidina + 11,6 kDa da proteína de fusão TRX-1a).

Figura 15 – Gel de poliacrilamida 15% para avaliação do perfil de expressão das frações solúveis de *XaFolD*. **MK**, marcador de massa molecular. **1**, construção pETM11-6HIS-*XaFolD*. **2**, construção pETM11-6HIS-TRX-*XaFolD*. Em destaque, bandas correspondentes à enzima *XaFolD* expressa na fração solúvel fusionada à 6His (pETM11) e 6HISTRX (pETTRX-1a).

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.1.1 Produção de proteína recombinante a partir das construções pET-6HIS-*XaFold* e pET-6HIS-TRX-*XaFold*

A construção 6HIS-TRX-*XaFold* foi expressa em meio auto indutor ZYM-5052⁶⁴ e purificada em etapas sequenciais de cromatografia por afinidade e exclusão molecular (Figura 16). A presença de TRX, uma oxido-redutase com alta solubilidade no citoplasma de *E. coli*, aumentou a quantidade de *XaFold* na fração solúvel, aumentando também a estabilidade da proteína durante a purificação. Assim, essa construção foi selecionada para a produção de *XaFold* para ensaios de cristalização e estudos cinéticos.

A primeira etapa cromatográfica, realizada em coluna HisTrap HP, explorou a afinidade da cauda de hexa-histidina fusionada à *XaFold* pelos íons divalentes (Ni^{2+}) imobilizados na coluna, separando a construção da proteína de interesse das demais proteínas presentes no lisado celular (Figura 16A). Em seguida o excesso de imidazol foi removido por cromatografia de exclusão molecular em coluna HiPrep Desalting 26/40 Sephadex G-25 Fine. A *XaFold* fusionada com proteína TRX foi submetida a uma etapa de clivagem com TEV protease e em seguida ambas as proteínas foram separadas por uma segunda cromatografia de afinidade, isolando a *XaFold* dos produtos remanescentes da clivagem (6HIS-TRX-*XaFold*, 6HIS-TRX e TEV protease) (Figura 16B). Adicionalmente, foi realizada uma etapa final de purificação por cromatografia de exclusão molecular em coluna pré-calibrada, na qual observou-se a presença de *XaFold* em um único estado oligomérico. De acordo com a calibração da coluna a *XaFold* apresenta-se como um dímero (Figura 16C). A *XaFold* purificada apresentou elevado teor de pureza (> 95%), indicado pela presença de uma banda única visualizada no gel de eletroforese (Figura 16D). Além disso, o processo de purificação apresentou alto rendimento, resultando em 60 mg de *XaFold* purificada por cada litro de expressão em meio ZYM5052.⁶⁴

Figura 16 – Cromatogramas e gel SDS-PAGE para acompanhamento das etapas de purificação a partir da construção pET-6HIS-TRX-XaFolD. **A**, primeira cromatografia de afinidade; **B**, segunda cromatografia de afinidade; **C**, cromatografia de exclusão molecular; **D**, gel SDS-PAGE; **MK**, marcador de massa molecular; **1**, fração solúvel do lisado celular; **2**, fração obtida após primeira cromatografia de afinidade; **3**, frações obtidas após clivagem por TEV protease; **4**, 6HIS-TRX-XaFolD obtida por cromatografia de exclusão molecular; **5**, XaFolD após etapa final de purificação por cromatografia de exclusão molecular; **6**, 6HIS-TRX após etapa final de purificação por cromatografia de exclusão molecular.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.2 XaFolC e XaFolE

A mesma avaliação de expressão em *E. coli* BL21 (DE3) descrita para a XaFolD foi realizada para XaFolC e XaFolE. Porém, nenhuma das construções apresentou superexpressão na fração solúvel. Adicionalmente, as cepas *E. coli* RosettaTM (DE3) e ArticExpress (DE3) foram utilizadas para se avaliar a influência da suplementação de códons raros e presença de chaperoninas, respectivamente, na expressão solúvel das proteínas XaFolC e XaFolE. No entanto, não houve diferença no perfil de expressão observado nos três vetores de expressão avaliados. Na ausência de diferenças que justificassem a priorização de um desses vetores, os demais testes de expressão foram realizados em RosettaTM (DE3). Diversas composições de tampão de lise (Tabela 3) foram exploradas, incluindo a presença de sal, glicerol e detergentes. No entanto, nenhuma das construções de XaFolC apresentou expressão solúvel nas condições avaliadas, conforme representado na Figura 17.

Figura 17 – Gel de poliacrilamida 10% para avaliação do perfil de expressão da *XaFolC* a partir da construção pETM11-*XaFolC*. **A**, avaliação da adição de NaCl a 2 M, uréia a 0,5 M e 0,2% de detergente ao tampão de lise, originalmente composto por 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl e 10% glicerol. **B**, avaliação da variação do pH do tampão de lise (pH 5 a 9) e da adição dos detergentes NP40 e Tween 20. **MK**, marcador de massa molecular. **I**, fração insolúvel. **S**, fração solúvel. Em destaque, bandas de 47,8 kDa correspondentes à enzima *XaFolC* fusionada a 6xHis (pETM-11).

Fonte: Elaborada pela autora.

Para a *XaFolE*, o melhor perfil de expressão foi observado para a construção pET-M11, utilizando-se o meio auto-indutor ZYM-5052 (Figura 18).⁶⁴

Figura 18 – Gel de poliacrilamida 15% para avaliação do perfil de expressão de *XaFolE*. **A**, construção pET-M11-*XaFolE*. **B**, construção pET-TRX-*XaFolE*. **C**, construção pET-Nus-1a-*XaFolE*. **MK**, marcador de massa molecular. **I**, fração insolúvel. **S**, fração solúvel. As condições de temperatura e o meio utilizado para expressão estão indicados. Em destaque, bandas de 25,6 kDa (**A**), 36,6 kDa (**B**) e 79,6 kDa (**C**), correspondentes à *XaFolE* em diferentes vetores.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.2.1 Produção de proteína recombinante a partir da construção pET-6HIS-*XaFolE*

A construção 6HIS-TRX-*XaFolE* foi expressa em meio auto indutor ZYM-5052⁶⁴ e purificada em etapas sequenciais de cromatografia por afinidade e de exclusão molecular (Figura 19). A última etapa cromatográfica foi realizada em coluna pré-calibrada, e revelou a presença de *XaFolE* um estado oligomérico predominante (Figura 19C). A *XaFolE* manteve-se estável durante as etapas de purificação e apresentou elevado teor de pureza (> 95%) após a cromatografia de exclusão molecular, indicado pela presença de uma banda única visualizada no gel de eletroforese (Figura 19). No entanto, o rendimento da *XaFolE* foi igual a 0,28 mg por litro de expressão, valor extremamente baixo e que dificulta a produção dessa proteína em quantidade suficiente para estudos de elucidação estrutural.

Figura 19 – Cromatogramas e gel SDS-PAGE para acompanhamento das etapas de purificação a partir da construção pET-6HIS-*XaFolE*. **A**, primeira cromatografia de afinidade; **B**, segunda cromatografia de afinidade; **C**, cromatografia de exclusão molecular; **D**, gel SDS-PAGE; **MK**, marcador de massa molecular. **1**, *XaFolE* após etapa final de purificação por cromatografia de exclusão molecular.

Fonte: Elaborada pela autora.

A avaliação do perfil de expressão das proteínas *XaFolD*, *XaFolC* e *XaFolE* culminou na priorização da *XaFolD* para os estudos de caracterização estrutural e funcional.

CAPÍTULO 5

Resultados e Discussão

XaFold: Caracterização estrutural e funcional

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO – *XaFold*: Caracterização estrutural e funcional

5.1 *XaFold*

5.1.1 Ensaios de caracterização cinética: determinação do valor de K_M para os substratos

A enzima *XaFold* catalisa a produção de N^{10} -formil-THF a partir de duas etapas, atuando como desidrogenase na reação de oxidação do substrato N^5, N^{10} -metileno-THF, e como ciclohidrolase para liberar o produto final N^{10} -formil-THF a partir da hidrólise do intermediário N^5, N^{10} -metenil-THF (Figura 20).³⁷⁻⁴⁷⁻⁴⁸

Figura 20 – Reações catalisadas pela *XaFold*. **1**, conversão do substrato N^5, N^{10} -metileno-THF para a produção do intermediário N^5, N^{10} -metenil-THF. **2**, hidrólise do N^5, N^{10} -metenil-THF para a produção do N^{10} -formil-tetrahydrofolato.

Fonte: Elaborada pela autora.

O substrato N^5, N^{10} -metileno-tetrahydrofolato é sensível ao pH, apresentando taxa de degradação em soluções aquosas a 1 mM igual a 5% a cada 60 min. De acordo com recomendações do fornecedor, para aumentar a estabilidade do substrato é indicado solubilizá-lo em hidróxido de sódio a 50 mM mantendo-se o pH acima de 8,5. Devido à disponibilidade limitada do substrato e da instabilidade do mesmo na faixa de pH e temperatura que a enzima

XaFold mantinha-se estável, foi necessário avaliar condições capazes de estabilizar a enzima para a conversão completa do substrato N^5 , N^{10} -metileno-tetrahidrofolato. Outro pré-requisito do ensaio era diminuição do volume reacional, garantindo relação sinal ruído apropriada mesmo para concentrações baixas do intermediário formado.

Os primeiros testes para o delineamento do ensaio de caracterização cinética foram realizados no espectrofotômetro Cary 60 UV-Vis, utilizando volumes reacionais de 1 mL. O protocolo inicial era composto por 25 mM de MOPS, agente redutor (30 mM de β -mercaptoetanol ou 1 mM de DTT), 4 mM de $NADP^+$, concentrações variáveis do substrato N^5 , N^{10} -metileno-THF, obtidas por diluição seriada (2 a 0,25 mM), e concentrações variáveis de enzima - 20, 10, 5 e 2 nM de *XaFold*.⁴⁷⁻⁴⁸ A formação do intermediário N^5 , N^{10} -metenil-tetrahidrofolato foi monitorada a 355 nm e a reação foi acompanhada por 10 minutos, em temperatura ambiente, sob agitação constante. Nesse ensaio preliminar observou-se que a proteína purificada era funcional, porém não se mantinha estável no meio reacional. Além disso, observou-se comportamentos diferentes do sistema reacional frente aos agentes redutores DTT ou β -mercaptoetanol. O passo seguinte foi variar as concentrações dos dois agentes redutores, e observar qual o tempo máximo em que a proteína permanecia estável no meio reacional. A utilização de 2 mM de β -mercaptoetanol resultou em proteína estável por até 1 hora.

Uma vez que o substrato N^5 , N^{10} -metileno-THF se degrada rapidamente, para garantir a reprodutibilidade do ensaio e a precisão das replicatas procurou-se adaptar o ensaio cinético para leitura em placa de 96 poços em volume reacional de 200 μ L. Além disso, avaliou-se novas condições de estabilização da enzima, monitorando-se o comportamento catalítico frente ao CHAPS (0,05 – 0,20%), BSA (0,2 – 0,8 mg/mL), β -mercaptoetanol (2 – 20 mM). Considerando as concentrações dos reagentes que forneceram a maior estabilização da enzima, o protocolo final estabelecido para o ensaio foi composto por 25 mM MOPS (pH 7,3); 4 mM β -mercaptoetanol; 0,05% CHAPS e 0,4 mg/mL BSA. Nessa condição, foi possível reduzir a quantidade de *XaFold* utilizada nos ensaios, que inicialmente era de 20 nM, para 10 nM. Durante a padronização do ensaio cinético notou-se a rápida degradação do substrato N^5 , N^{10} -metileno-THF. Diante disso, soluções do substrato em concentrações determinadas foram preparadas imediatamente antes de cada ensaio.

No decorrer dos experimentos de caracterização cinética, a atividade catalítica da enzima proveniente de diferentes lotes de purificação foi avaliada. Nesses ensaios, observou-se que tanto a enzima recém purificada quanto a enzima previamente armazenada em ultra freezer a -80° C por até seis meses permanecem igualmente ativas. A influência da forma de resfriamento também foi avaliada. Esses experimentos indicaram que tanto a proteína resfriada

diretamente em nitrogênio líquido quanto a proteína com de 25% de glicerol e resfriada a -80° C permanecem igualmente funcionais e estáveis para ensaios cinéticos.

Após a otimização, os valores de K_M e $V_{MÁX}$ foram determinados para o primeiro e segundo passos da reação catalisada pela *XaFolD*, conforme a Tabela 9 e a Figura 21.

Tabela 9 – Parâmetros cinéticos K_M e $V_{MÁX}$ determinados para os substratos da *XaFolD*.

	K_M (μM)	$V_{MÁX}$ ($\mu\text{M}/\text{min}$)
N^5,N^{10} –metileno–THF	50 ± 10	137 ± 6
NADP ⁺	668 ± 81	151 ± 6
N^5,N^{10} –metenil–THF	32 ± 3	285 ± 11

Fonte: Elaborada pela autora.

Considerando o número e a estabilidade dos substratos envolvidos em cada passo da reação, a atividade ciclohidrolase foi selecionada para teste de inibidores. Nesse sentido, foram realizados ensaios para determinação do pH ótimo para a atividade enzimática, determinado como 7,3. Adicionalmente, o efeito do DMSO na atividade enzimática foi avaliado, observando-se a redução em até 5% da atividade enzimática na presença de 2% de DMSO (Figura 22).

Figura 21 – **A**, Determinação do valor de K_M e $V_{MÁX}$ para o substrato N^5,N^{10} –metileno–THF na presença de 6 mM de NADP⁺; **B**, Determinação do valor de K_M e $V_{MÁX}$ para o cofator NADP⁺ na presença de 500 μM do substrato N^5,N^{10} –metileno–THF. **(C)**, Determinação do valor de K_M e $V_{MÁX}$ para o segundo o substrato N^5,N^{10} –metil–THF.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 22 – Determinação do efeito do pH (A) e de DMSO (B) na atividade ciclohrolase da *XaFold*.
Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.2 Estudos estruturais

5.1.2.1 Cristalização e determinação estrutural da *XaFold* na forma apo

A *XaFold* foi submetida à triagem de condições de cristalização utilizando a técnica de difusão por vapor com gota assentada. Durante a triagem foram exploradas as condições de 13 kits comerciais das empresas Hampton Research (Index; Crystal Screen e Crystal Screen Cryo), Qiagen (Classic; Classic II; PEGs; PEGSII; JCSG Core Suite I, II, III e IV; AMSo₄) e Molecular Dimensions (Morpheus). Todos os ensaios foram realizados com proteína recém-purificada.

As caixas de cristalização foram incubadas a 18 °C e periodicamente inspecionadas. Imediatamente após a montagem das caixas observou-se o aspecto da proteína nas gotas, límpido para a maioria das condições testadas e precipitado em condições com pH menor que 5,5 ou maior que 8,5. Ao longo do ensaio gradativamente mais condições de cristalização apresentaram precipitação de proteína, com presença de granulado amorfo e formação de película na superfície da gota.

Depois de três meses do início da triagem, durante a inspeção visual foram observados *hits* de cristalização na condição G2 do kit JCSG IV (1 M de tartarato duplo de sódio e potássio e 0,1 M de MES pH 6), e nas condições B9 (1,8 M de citrato de amônio tribásico pH 7) e H7

(0,15 M de ácido málico pH 7 e 20% de PEG 3350) do kit Index. Ao serem submetidos a experimentos de difração de raios-X na linha MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), apenas o cristal formado a partir de XaFold a 5,0 mg/mL na condição H7 do kit Index apresentou padrão de difração característico de proteína, porém inapropriado para a coleta de um conjunto de dados (Figura 23).

Figura 23 – Imagem representativa do padrão de difração do cristal da proteína XaFold (5,0 mg/mL) obtido a partir da condição H7 do kit comercial Index, composta por 0,15M de ácido málico (pH 7,0) e 20% (p/v) PEG 3350.

Fonte: Elaborada pela autora.

Condições de cristalização semelhantes à condição H7 do kit Index foram exploradas durante a otimização, realizada pela técnica da gota suspensa. Para tanto, diversas concentrações do agente precipitante PEG 3350 em combinação com diferentes condições de tamponamento foram testadas. Durante a expansão das condições de cristalização, observou-se que o incremento da concentração de proteína resultava em precipitação imediata em todas as condições exploradas. Para diminuir a precipitação e aumentar a quantidade de proteína disponível em solução foi avaliado o efeito da adição dos tampões Tris-HCl, cacodilato e HEPES em diferentes concentrações (0,1 – 0,2 M) e pH distintos (5,5; 6,5; 7,5; 8,5). O tampão cacodilato (pH 6,5) foi a solução que promoveu maior estabilização da proteína.

Após aproximadamente três semanas de incubação surgiram cristais na condição composta por 0,15 M de ácido málico, 16% (p/v) PEG 3350 e 0,1 M de cacodilato pH 6,5. Os cristais apresentavam-se como placas finas, sem crescimento homogêneo e com 12 μ m em sua maior dimensão (Figura 24).

Figura 24 – Imagem do cristal da proteína XaFold (5,0 mg/mL) na forma apo, obtido a partir da condição de cristalização composta por 0,15M de ácido málico, 16% (p/v) PEG 3350 e 0,10 M e cacodilato pH 6,5.

Fonte: Elaborada pela autora.

Um cristal único separado a partir das placas com nucleação múltipla foi coletado e transferido para solução de crioproteção, composta pela condição de cristalização suplementada com 20% de etilenoglicol. Em seguida, o cristal foi resfriado em vapor de nitrogênio e submetido à difração de raios-X na linha MX2 do LNLS. Inicialmente, avaliou-se a qualidade de difração do cristal com imagens coletadas a 0° e 90° em diferentes tempos de exposição. Com base nos dados iniciais de difração iniciou-se a coleta de dados cristalográficos pelo método de rotação, empregando-se a estratégia de *fine- Φ -slicing* ($\Phi = 0,2^\circ$),⁶⁵ com exposição por imagem igual a 10 segundos e coleta ao longo de 180°. Ao final, um conjunto completo de dados com 900 imagens e resolução de 2,11 Å foi coletado (Figura 25).

Durante o processamento do conjunto de dados o programa XDS foi utilizado para a indexação e integração do conjunto de reflexões obtidas. O retículo cristalino de XaFold foi classificado como pertencente ao sistema ortorrômbico (oP), com o grupo pontual 222. Em seguida, a determinação de simetria, o escalonamento das intensidades e redução dos dados foi utilizado o programa Aimless, que reúne as ferramentas disponíveis nos programas Pointless, Scala e C-truncate.⁶⁸⁻⁶⁹ Após a indexação realizada no XDS as restrições geométricas impostas pelas dimensões da célula unitária indicam quais são as simetrias da rede cristalina mais prováveis, porém, essa simetria só pode ser confirmada analisando a simetria do padrão de difração do cristal. Assim, com base na análise das reflexões simétricas e verificação de ausências sistemáticas de reflexões é possível classificar as possíveis simetrias cristalográficas, determinando-se o grupo de Laue.⁶⁸ Nesse estágio, dentre os possíveis grupos espaciais para o

cristal de *XaFold* ($P222$, $P222_1$, $P22_12$, $P2_12_12$, $P P2_12_12_1$) o grupo com maior coeficiente de correlação foi $P2_12_12$, indicando ser essa a simetria mais provável.

Figura 25 – Imagens representativas do padrão de difração do cristal da proteína *XaFold* na forma apo, obtido a partir da condição de cristalização composta por 0,15M de ácido málico, 16% (p/v) PEG 3350 e 0,10 M de cacodilato pH 6,5. **A**, primeira imagem de difração (0°); **B**, imagem de difração após rotação do cristal a 90° .

Fonte: Elaborada pela autora.

Para a determinação da estrutura por substituição molecular a sequência da *XaFold* obtida a partir do UniProt (D2UAL4_XANAP) foi submetida ao alinhamento contra as sequências das estruturas de Fold depositadas no PDB. Em fevereiro/2018, encontravam-se depositadas no PDB 20 estruturas de Fold, dentre as quais 2 de arqueobactérias, 6 de eucariotos e 12 provenientes de bactérias (Tabela 10). Entre as estruturas depositadas de Fold bacteriana, apenas a Fold de *Escherichia coli* (*EcFold*) depositada sob o código PDB 1B0A é reportada como apoproteína, ou seja, foi obtida na ausência do cofator NADP^+ assim como a *XaFold*. A identidade sequencial entre a Fold de *X. albilineans* e a Fold de *E. coli* é de 62%, o que resultou na escolha da *EcFold* como molde para a substituição molecular (Tabela 10).

Tabela 10 – Características dos modelos estruturais de Fold disponíveis no PDB

PDB ID	Organismo	Resolução (Å)	Ligantes	% Identidade XaFold
6APE	<i>Helicobacter pylori</i>	1,45	-	29
4CJX	<i>Trypanosoma brucei</i>	2,05	NAP / 9L9	39
4B4U	<i>Acinetobacter baumannii</i>	1,45	NAP	44
4B4V	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2,00	NAP / L34	44
4B4W	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2,00	NAP / 9L9	44
4A5O	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,20	-	61
4A26	<i>Leishmania major</i>	2,70	-	45
3NGL	<i>Thermoplasma acidophilum</i>	2,40	NAP	38
3NGX	<i>Thermoplasma acidophilum</i>	2,30	-	38
3P2O	<i>Campylobacter jejuni</i>	2,30	NAD	48
3L07	<i>Francisella tularensis</i>	1,88	-	49
2C2X	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2,00	-	46
2C2Y	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2,30	-	46
1LU9	<i>Methylobacterium extorquens</i>	1,90	-	46
1LUA	<i>Methylobacterium extorquens</i>	1,90	NAP	46
1DIA	<i>Homo sapiens</i>	2,20	NAP / L24	44
1DIB	<i>Homo sapiens</i>	2,70	NAP / L34	44
1DIG	<i>Homo sapiens</i>	2,20	NAP / L37	44
1A4I	<i>Homo sapiens</i>	1,50	NDP	44
1B0A	<i>Escherichia coli</i>	2,60	APO	62

Fonte: Elaborada pela autora.

A proteína globular Fold possui dois domínios α/β . O domínio N-terminal é o menor domínio, e se conecta ao maior domínio, C-terminal, por duas hélices e um motivo alça-hélice-alça. Levando em consideração a possível diferença de orientação desses domínios entre a estrutura molde e a XaFold, para resolver o problema das fases por substituição molecular a cadeia A da estrutura molde foi dividida manualmente em dois domínios, o menor domínio N-terminal e o maior domínio C-terminal. Adicionalmente, resíduos ou cadeias laterais expostas à superfície foram eliminados. Na Figura 26, é possível observar os dois domínios da EcFold utilizados como molde durante o processo de obtenção das fases iniciais por substituição molecular.

Figura 26 – Cadeia A da Fold de *E. coli* 1B0A utilizada como molde para a substituição molecular. **A**, representação dos dois domínios, N- e C-ter. **B**, domínio C-ter. **C**, domínio N-ter.

Fonte: Elaborada pela autora.

O programa Phaser, utilizado para a substituição molecular, utiliza funções de máxima verossimilhança (do inglês, *maximum likelihood*) para as operações de rotação, translação, empacotamento e refinamento durante a determinação da estrutura. Neste contexto, a máxima verossimilhança é uma medida de quanto o modelo e os dados que o originaram são parecidos, e é definida como a probabilidade de que os dados tenham sido medidos considerando o modelo gerado. Assim, uma das formas de se analisar a qualidade do modelo gerado pelo Phaser é através da avaliação do log de ganho de verossimilhança, (LLG, do inglês, *log of likelihood gain*), o qual indica o quanto um dado é melhor explicado por um modelo obtido após as operações de rotação e translação do que por um modelo randômico⁷². Para a substituição molecular selecionou-se no Phaser o modo de busca automatizado, considerando-se que a unidade assimétrica era composta por duas moléculas, segundo indicado pelo coeficiente de Matthews.⁷¹ Além do grupo espacial determinado pelo Pointless como o mais provável para o cristal de XaFold, $P2_12_12$, todos os grupos espaciais do mesmo grupo pontual previamente determinado foram avaliados.

Iniciando-se a busca por uma cópia do domínio C-terminal (maior domínio) nenhuma solução foi encontrada (LLG = -103,40). Ao realizar a busca por uma cópia do domínio N-terminal (menor domínio) foi encontrada uma solução (LLG = 283,45) e a busca pela segunda cópia do domínio N-terminal também foi bem-sucedida (LLG = 283,94). O grupo espacial em que a solução foi encontrada foi $P2_12_12$. Após a localização das duas cópias do domínio N-terminal na unidade assimétrica, buscou-se por uma cópia do domínio C-terminal, porém nenhum modelo satisfatório foi encontrado.

Uma vez que a substituição molecular havia resultado em um fragmento inicial correspondendo apenas ao domínio N-terminal, as coordenadas tridimensionais e as reflexões referentes a este fragmento foram submetidas ao programa SHELXE.⁷³ O SHELXE baseia-se em ciclos iterativos de modificação da densidade a partir da solução parcial obtida por

substituição molecular, reconstrução de uma cadeia de polialaninas (poliA) e cálculo da densidade eletrônica da cadeia traçada. A qualidade do modelo gerado é avaliada pela correlação entre os fatores de estrutura originais e os calculados a partir da cadeia poliA.⁷³ Assim, o SHELXE foi empregado com o objetivo de melhorar as informações de fase e assim possibilitar a expansão da solução parcial obtida para o domínio N-terminal da XaFold.

As novas informações sobre as fases bem como as coordenadas da solução parcial geradas pelo SHELXE foram submetidas ao programa Buccaneer. Este programa fundamenta-se em ciclos de alocação de carbonos alfa e na atribuição de cadeias laterais de acordo com a sequência primária da proteína para a qual se deseja obter o modelo, gerando ao final dos ciclos um modelo tridimensional.⁷⁴⁻⁷⁵ Ao final do processo de substituição molecular, para o qual empregou-se conjuntamente os programas Phaser, SHELXE e Buccaneer, obteve-se um modelo inicial de XaFold (domínio N- e C-terminal), com regiões de densidade eletrônica contínua e característica de estrutura secundária, apropriado às etapas seguintes de refinamento.

O refinamento do modelo de XaFold foi realizado no programa Refmac a partir das coordenadas atômicas geradas pelo Buccaneer e do arquivo contendo as amplitudes dos fatores de estrutura gerado pelo Aimless. O refinamento no Refmac também é baseado em funções de máxima verossimilhança, buscando ajustar os parâmetros do modelo de forma que este seja capaz de explicar os dados experimentais com a melhor aproximação possível.⁷⁶ Após submeter o modelo de XaFold ao primeiro ciclo de refinamento, obteve-se valores de *R-factor* e *R-free* iguais a 0,25 e 0,29. Em seguida, ciclos sucessivos de refinamento no espaço recíproco seguidos pela modificação das coordenadas atômicas e refinamento no espaço real utilizando o programa Coot⁸⁶ foram realizados para a determinação da estrutura inédita da enzima XaFold, depositada no PDB sob o código 5NHS. Os parâmetros estatísticos da coleta de dados, processamento e refinamento estão representados na Tabela 11.

Tabela 11 – Parâmetros estatísticos da coleta de dados, processamento e refinamento da apoproteína XaFold, depositada no PDB sob o código 5NHS.

Código PDB	5NHS
<i>Coleta de dados e processamento</i>	
Grupo espacial	$P2_12_12$
Parâmetros de célula unitária a, b, c (Å)	123,30; 76,40; 66,64
Resolução	47,98 – 2,11 (2,17 – 2,11)
Comprimento de onda (Å)	1,45864
Nº de reflexões totais	198.913 (11.295)
Nº de reflexões únicas	36.879 (2.845)
Multiplicidade	5,4 (4,0)
R_{merge}	0,10 (0,97)
R_{pim}	0,07 (0,81)
Wilson B (Å ²)	33,9
Completeza (%)	99,2 (94,6)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	11,6 (1,5)
CC(1/2)	0,99 (0,47)
<i>Refinamento</i>	
R_{work} (%)	19,8%
R_{free} (%)	24,4%
Nº de resíduos	281 (cadeia A) 280 (cadeia B)
Outros átomos	EDO (cadeia A)
Moléculas de água	292
<i>RMSZs</i>	
Ligações (Å)	1,14
Ângulos (Å)	1,14
<i>Ramachandran</i>	
Resíduos em regiões favoráveis (%)	551 (98%)
Resíduos em regiões permitidas (%)	12 (2%)
Resíduos desviantes (%)	0
<i>Média B_{factors}</i>	
Proteína (Å)	34 (cadeia A) 31 (cadeia B)
Moléculas de água (Å)	47
Ligantes (Å)	43 (EDO)

Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.2.2 Ensaios de co-cristalização para geração de complexos de XaFold

Para a obtenção de XaFold na conformação fechada foram conduzidos ensaios de co-cristalização da proteína com o cofator NADP^+ . Inicialmente, foram exploradas condições semelhantes à condição de cristalização identificada para a XaFold na forma apo. No entanto, durante o acompanhamento dos experimentos de cristalização ao longo de 70 dias as gotas permaneceram límpidas e sem cristais.

Novos ensaios de triagem usando *kits* comerciais foram conduzidos, explorando-se diferentes condições de incubação da proteína com o cofator NADP^+ e com os análogos NAD^+ e NADPH. Adicionalmente, os substratos naturais da Fold e os inibidores clássicos da síntese de folatos trimetoprim e metotrexato foram incubados com a proteína e o cofator para obtenção de complexos ternários.

Durante o processo de inspeção visual, 90 dias após a montagem dos experimentos de cristalização foram observados cristais nas condições B12, C08, D07 e G03 do *kit* PEGS; e nas condições B12 e C07 do *kit* PEGS II (Figura 27 e Tabela 12). Todos os cristais observados foram obtidos a partir da incubação de XaFold a 5 mg/mL com 1 mM de NAD^+ . A triagem com o cofator NADP^+ não resultou em nenhum cristal. Parte das gotas de cristalização precipitaram ainda na primeira semana, e as demais permaneceram límpidas por 5 meses após a montagem dos experimentos de cristalização.

Figura 27 – Imagens dos cristais obtidos na triagem das condições de cristalização da XaFold (5,0 mg/mL) incubada com NAD^+ (1,0 mM). **A**, PEGS B12; **B**, PEGS C08; **C**, PEGS D07; **D**, PEGS D10; **E**, PEGS G03; **F**, PEGS II B12; **G**, PEGS II C07; **H**, MORPHEUS E12.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 12 – Condições de cristalização observadas para *XaFold* incubada com NAD⁺.

Kit comercial	Condição de cristalização	Composição da condição de cristalização
PEGS	B12	0,1 M Tris-HCl pH 8,5 25% (p/v) PEG 2000 MME
PEGS	C08	0,1 M MES pH 6,5 25% (p/v) PEG 4000
PEGS	D07	0,1 M Tris-HCl pH 8,5 25% (p/v) PEG 3000 MME
PEGS	D10	0,1 M Tris-HCl pH 8,5 25% (p/v) PEG 8000
PEGS	G03	0,2 M acetato de sódio 20% (p/v) PEG 3350
PEGS II	B12	0,2 M sulfato de lítio 0,1 M Tris-HCl pH 8,5 30% (p/v) PEG 3000
PEGS II	C07	0,2 M sulfato de lítio 0,1 M Tris-HCl pH 8,5 16% (p/v) PEG 4000
MORPHEUS	E12	0,03 M dietilenoglicol; 0,03 M trietilenoglicol 0,03 M tetraetilenoglicol; 0,03 M pentaetilenoglicol 0,1 M Bicina - Tris Base pH 8,5 12,5% (p/v) PEG 1000 12,5% (p/v) PEG 3350 12,5% (p/v) MPD

Fonte: Elaborada pela autora.

Os cristais de *XaFold* obtidos a partir da triagem dos *kits* comerciais foram submetidos aos experimentos de difração de raios X na linha MX2 do LNLS. Para avaliação dos cristais e planejamento da estratégia de coleta imagens iniciais a 0 e 90° foram avaliadas. A análise da imagem do padrão de difração confirmou que os cristais eram de proteína, o que pôde ser inferido pela curta distância entre os *spots*, característica de macromoléculas com elevado número de átomos. No entanto, todos os cristais observados apresentaram baixo poder de difração, mesmo após a fase de otimização das condições de cristalização detectadas.

5.1.2.3 Análise estrutural

A Fold de *X. albilineans* apresenta-se como um dímero, com 296 resíduos de aminoácidos (31,4 kDa) por monômero. Os dados de difração de raios X indicam a presença de duas moléculas por unidade assimétrica. A sobreposição dessas duas moléculas resulta em um

valor de RMSD igual a 0,33 Å, sugerindo grande similaridade conformacional entre as subunidades cristalográficas (Figura 28).

Figura 28 – Representação do conteúdo da unidade assimétrica do modelo cristalográfico construído para a proteína *XaFolD*. Em azul, cadeia A; em laranja, cadeia B.
Fonte: Elaborada pela autora.

A *XaFolD* é uma proteína globular composta por dois domínios α/β . O domínio N-terminal, ou domínio catalítico, corresponde aos resíduos 13 a 130 (Pfam ID 00763) é composto por três fitas β flanqueadas por quatro hélices α , uma de cada lado (Figura 29A). O domínio C-terminal, ou domínio de ligação ao NADP^+ , engloba os resíduos de 133 a 290 (Pfam ID 02882) e possui um enovelamento típico de ligação à dinucleotídeo, denominado *Rossmann-fold* (Figura 29B).

A sequência da *XaFolD* apresenta elevada identidade em relação às sequências de *FolD* de outros organismos (Tabela 10). Para nove estruturas disponíveis no PDB a identidade sequencial da *XaFolD* é superior a 40%, atingindo 62% para a *FolD* de *E. coli*, utilizada como molde durante o processo de substituição molecular.⁷⁰

Figura 29 – Representação da cadeia A da proteína *XaFold*. **A**, domínio N-terminal destacado em azul. **B**, domínio C-terminal destacado em azul.

Fonte: Elaborada pela autora.

Apesar da elevada identidade sequencial entre a *XaFold* e a *EcFold*, o alinhamento dos α da cadeia A de cada modelo resultou em um valor de RMSD igual a 6,2 Å. Em contraposição, o alinhamento individual dos domínios resultou em valores de RMSD iguais a 0,7 e 1,0 Å para os domínios N-terminal e C-terminal, respectivamente (Figura 30).

O alinhamento individual dos domínios resulta em um valor de RMSD consideravelmente menor que aquele observado para o alinhamento da cadeia completa. A maior diferença observada entre os modelos da *XaFold* e da *EcFold* é a orientação da hélice C-terminal, localizada na região inter-domínios (Figura 31). O alinhamento estrutural dos modelos de Fold de diferentes espécies revelou grande similaridade na orientação dos domínios, exceto para a Fold de *X. albilineans*. A orientação da hélice C-terminal da *XaFold* difere da orientação observada nos demais modelos, o que pode explicar as dificuldades encontradas durante o processo da resolução da estrutura por substituição molecular.

Para a análise estrutural dos dois sítios ativos, N- e C-terminal, os dois domínios da *XaFold* foram alinhados à *EcFold* (PDB ID 1B0A) e à Fold de *T. brucei*, *TbFold* (PDB ID 4CJX), modelos que apresentam 62% e 39% de identidade sequencial, respectivamente. Apesar da baixa identidade sequencial entre a *XaFold* e a *TbFold* este modelo foi escolhido por ser o único complexo ternário disponível de Fold com ligantes completos modelados nos sítios N- e C-terminal. O inibidor 9L9, co-cristalizado com a *TbFold* e reportado como inibidor da Fold de eucariotos e procariotos, é análogo estrutural do substrato N^5 , N^{10} -metileno-THF e está representado na Figura 32 para ilustrar as interações estabelecidas com os resíduos do sítio ativo.

Figura 30 – Alinhamento estrutural dos modelos de *XaFolD* (PDB ID 5NHS) e *EcFolD* (PDB ID 1B0A) representados em azul e em magenta, respectivamente. **A**, alinhamento realizado para as cadeias completas. **B**, alinhamento dos domínios N-terminal e C-terminal.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 31 – Alinhamento dos domínios N- e C-terminal dos modelos de *XaFolD* (PDB ID 5NHS) e *EcFolD* (PDB ID 1B0A). Em destaque, a hélice C-terminal representada em azul para a *XaFolD* e em magenta para a *EcFolD*.

Fonte: Elaborada pela autora.

O sítio de ligação ao substrato N^5,N^{10} -metileno-THF possui um motivo YxxxK frequentemente observado na família desidrogenases/reduases de cadeia curta (SDR, do inglês, *Small Dehydrogenase/Reductase*).⁴¹ Em XaFolD esse motivo é formado pelos resíduos Y59 e K63 (Figura 32). O resíduo K63 é responsável por posicionar o substrato durante a transferência de hidrogênio para o $NADP^+$ na primeira etapa da reação. Além disso, estudos sugerem que esse resíduo de lisina atua como acceptor de próton na segunda etapa de reação, participando diretamente da hidrólise do intermediário N^5,N^{10} -metileno-THF para a formação do produto final N^{10} -formil-THF.⁸⁷

O anel pteridina, presente no substrato e nos inibidores de FOLD, interage com resíduos localizados na parte mais enterrada do sítio ativo através de múltiplas ligações de hidrogênio (Figura 32), estabelecidas com *i.* a cadeia lateral do resíduo D130, *ii.* grupos carbonila da cadeia principal dos resíduos V106 e L108 e *iii.* cadeia lateral do resíduo Q107. O resíduo Y59 e o anel aromático presente nos substratos e nos inibidores interagem por interações de empilhamento de elétrons π , (do inglês, π -stacking). Os resíduos G272, G273 e G275, localizados em uma região de alça da XaFolD e expostos ao solvente, interagem com a cauda glutamilada do substrato enzimático (Figura 32/Figura 31). Esses resíduos de glicina estão localizados na alça que antecede a hélice C-terminal, cuja orientação na XaFolD difere em relação à FOLD de outros organismos.

Figura 32 – Alinhamento do sítio ativo N-terminal dos modelos de XaFolD (PDB ID 5NHS, cadeia A) e TbFolD (PDB ID 4CJX, cadeia A), representadas em ciano e amarelo, respectivamente. Os resíduos responsáveis pela interação com o substrato (ou com inibidores) estão destacados em linhas ciano para a XaFolD e em linhas amarelas para a TbFolD. O inibidor 9L9, análogo estrutural do substrato, está representado em bastões, com carbonos em amarelo.

Fonte: Elaborada pela autora.

A cauda glutamilada dos inibidores é a região mais explorada para síntese de análogos e estudos de Relação Estrutura Atividade. Eadsforth e colaboradores⁸⁷ demonstraram, através da síntese de análogos e avaliação da atividade inibitória contra a *Tb*Fold, que o aumento da complementariedade estérica dos inibidores na região da cauda glutamilada aumenta a potência. Na estrutura de *Tb*Fold, a cauda glutamilada do inibidor 9L9 interage com os resíduos G273, G274 e G276, destacados em verde na Figura 33A, e com uma região predominantemente hidrofóbica formada pelos resíduos T51, L55 e L252. Na estrutura da *Xa*Fold os resíduos de glicina correspondentes, G272, G273 e G275, estão localizados na alça que antecede a hélice C-terminal, fechando o sítio de acesso à cauda glutamilada (Figura 33B). Adicionalmente, os resíduos da *Tb*Fold T51, L55 e L252 são substituídos pelos resíduos V58, N62 e L251, respectivamente, diminuindo o caráter hidrofóbico devido a substituição do resíduo L55 pelo resíduo N62.

Figura 33 – Representação do sítio ativo N-terminal dos modelos de *Tb*Fold (PDB ID 4CJX, cadeia A) e *Xa*Fold (PDB ID 5NHS, cadeia A). Os dois modelos foram alinhados por domínios, e estão representados na mesma orientação. Em **A**, o modelo *Tb*Fold está representado em amarelo, com resíduos G273, G274 e G276 representados em verde e resíduos T51, L55 e L252 coloridos com átomos de carbono em branco, nitrogênio em azul e oxigênio em vermelho. Em **B**, o modelo *Xa*Fold está representado em ciano, com resíduos G272, G273 e G275 representados em verde e resíduos V58, N62 e L251 coloridos com átomos de carbono em branco, nitrogênio em azul e oxigênio em vermelho.

Fonte: Elaborada pela autora.

O alinhamento estrutural da apoproteína *XaFold* com o complexo ternário *TbFold* está representado na Figura 34. A análise do sítio de interação da *XaFold* sugere que os resíduos V176, S177 e K200 ocupam a cavidade do sítio de interação. No entanto, o sítio ativo do NADP^+ é conservado entre as espécies. As interações estabelecidas com resíduos do sítio ativo incluem ligações de hidrogênio envolvendo *i.* oxigênios do 2'-fostato e 3'-hidroxil da ribose; *ii.* oxigênio do difosfato; *iii.* nitrogênio da nicotinamida e *iv.* nitrogênio da adenina.⁷⁰⁻⁸⁸ A interação com a nicotinamida do NADP^+ é mantida pela T279 na *TbFold*, e pela T278 na *XaFold*. O resíduo A175 da *TbFold*, responsável pela interação com o oxigênio do difosfato, é substituído pela S177 na *XaFold*. O resíduo Q218, responsável pela interação com o nitrogênio da adenina na *TbFold*, é substituído na *XaFold* pelo resíduo R223. As substituições de resíduos mencionadas mantêm a capacidade de interação com o cofator. No entanto, a substituição dos resíduos R171 e S195 da *TbFold* pelos resíduos V176 e K200 na *XaFold* são prejudiciais para a interação com o cofator, podendo diminuir a afinidade, conforme descrito na seção seguinte.

Figura 34 – Alinhamento do sítio ativo C-terminal dos modelos de *XaFold* (PDB ID 5NHS, cadeia A) e *TbFold* (PDB ID 4CJX, cadeia A), representadas em ciano e amarelo, respectivamente. Os resíduos responsáveis pela interação com o NADP^+ estão destacados em linhas, com carbonos em ciano para a *XaFold* e com carbonos em amarelo para a *TbFold*.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.3 Mutação sítio-dirigida

A análise do sítio de ligação do NADP⁺ no domínio C-terminal indica grande conservação dos resíduos em diferentes espécies. Dentre as 20 estruturas de Fold disponíveis no PDB, nove são complexos com o cofator NADP⁺. A análise da sequência e do modelo cristalográfico da XaFold revela conservação dos resíduos no sítio de interação com o cofator. No entanto, para a XaFold os resíduos V176 e K200 não são conservados. Na maioria dos complexos binários e ternários de Fold os resíduos V176 e K200 são substituídos por arginina e serina, respectivamente, como ilustrado na Figura 35.

O alinhamento das sequências, colorido de acordo com o caráter hidrofóbico dos resíduos, mostra conservação da distribuição dos resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos entre as sequências de diferentes organismos, exceto para os resíduos V176 e K200.⁸⁹ Esses resíduos são responsáveis pela interação com o fosfato ligado à ribose (2'-fosfato). Uma vez que as principais interações responsáveis pelo ancoramento do NADP⁺ no sítio ativo são mediadas pelo 2'-fosfato, a substituição da arginina e da serina por resíduos de valina e lisina, respectivamente, afeta a afinidade da XaFold pelo cofator. Estudos prévios de mutação sítio-dirigida realizados para a enzima humana mostraram que a mutação da arginina (R173A) causa um aumento de 500 vezes no valor de K_M , enquanto a mutação da serina (S197A) aumenta 20 vezes o valor de K_M .⁹⁰

Os modelos de Fold das espécies *E. coli*, *P. aeruginosa*, *F. tularensis*, *C. jejuni* e *H. pylori* possuem um resíduo de alanina, também apolar, na posição correspondente à V176 da XaFold. Nesta posição, o modelo de Fold de *M. extorquens* possui uma glicina. Para as espécies citadas o resíduo correspondente à K200 de XaFold é *i.* arginina para *E. coli*, *P. aeruginosa*, *F. tularensis* e *M. extorquens* e *ii.* isoleucina para *C. jejuni* e *H. pylori*. Nenhum modelo de Fold das espécies mencionadas está em complexo com o NADP⁺, sugerindo que a interação desses resíduos com o grupo 2'-fosfato do cofator é importante para o reconhecimento e afinidade de ligação ao NADP⁺.

Uma vez que a substituição da arginina e da serina envolvidas na interação com o 2'-fosfato reduz consideravelmente a afinidade pelo NADP⁺, experimentos de mutação sítio-dirigida foram conduzidos para gerar o duplo mutante V176R-K200S, buscando-se aumentar a afinidade da XaFold pelo cofator e favorecer a cristalização de complexos.

Figura 35 – Alinhamento sequencial dos modelos de FolD disponíveis no PDB, utilizando o T-coffee⁹¹ no programa Jalview 2.10.3.⁹² Os resíduos estão coloridos de acordo com a hidrofobicidade, com os resíduos mais hidrofóbicos em vermelho e os mais hidrofílicos em azul. Para o alinhamento contra a 5NHS (*XaFolD*) foram considerados os modelos de FolD disponíveis no PDB, indicados na Tabela 10. Cada sequência está identificada pelas iniciais do gênero e espécie; *EcFolD* = FolD de *E. coli*; *PaFolD* = FolD de *P. aeruginosa*; *FtFolD* = FolD de *F. tularensis*; *CjFolD* = FolD de *C. jejuni*; *HsFolD* = FolD de *H. sapiens*; *LmFolD* = FolD de *L. major*; *HpFolD* = FolD de *H. pylori*; *AbFolD* = FolD de *A. baumannii*; *TaFolD* = FolD de *T. acidophilum*. *TbFolD* = FolD de *T. brucei*; *MeFolD* = FolD de *M. extorquens*; *MtFolD* = FolD de *M. tuberculosis*. Os resíduos V176 e K200 estão indicados por asteriscos.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para gerar os mutantes foi utilizado o protocolo de mutação sítio dirigida *QuikChange Site-Directed Mutagenesis* (Agilent). A análise das reações de PRC para as colônias transformantes indicou a presença de bandas na região de 900 pb, tamanho esperado para a sequência codificante de *XaFolD* (Figura 36).

Figura 36 – Produto da reação de PCR de colônia da *XaFolD* V176R. **MK**, marcador. **1-8**, produto da reação de PCR para 8 colônias.

Fonte: Elaborada pela autora.

A mutação V176R foi confirmada por sequenciamento. A mutação K200S, no entanto, não foi obtida. Para avaliar a influência da mutação na função da *XaFolD*, a construção pET-6HIS-TRX-*XaFolD* V176R foi expressa, purificada e submetida a ensaios de atividade. Para a *XaFolD* mutante, observou-se redução de 34% da atividade desidrogenase. A presença dos resíduos R176 e K200 afetou negativamente a afinidade pelo NADP^+ , efeito que pode ser atribuído à presença de dois resíduos volumosos, arginina e lisina, no sítio ativo de ligação ao 2'fosfato do NADP^+ .

CAPÍTULO 6

Resultados e Discussão

XaFold: triagem de inibidores

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO - XaFold: triagem de inibidores

A maioria dos inibidores conhecidos de FOLD são derivados pirimidínicos, análogos do substrato N^5 , N^{10} -metileno-THF com modificações na cauda glutamilada.⁴⁷⁻⁸⁷ Portanto, o objetivo dessa parte do trabalho foi descobrir novas classes químicas de moléculas capazes de se ligar e inibir a atividade catalítica da XaFold. Nesse sentido, uma colaboração com o Prof. William N. Hunter da Universidade de Dundee foi estabelecida. Durante o período de um ano foi realizado um estágio sanduíche no laboratório do Prof. Hunter, estabelecendo-se um novo método biofísico para a triagem de ligantes da XaFold, denominado interferometria de biocamada (BLI, do inglês *Bio-Layer Interferometry*).

BLI é uma técnica analítica baseada no padrão de interferência da luz branca refletida entre duas superfícies: uma camada contendo uma biomolécula imobilizada na extremidade de um biossensor, e uma camada de referência interna (Figura 37). O evento de ligação entre a biomolécula imobilizada na superfície do biossensor e um analito presente na solução de imersão promove modificação do caminho óptico da extremidade do biossensor, resultando em um deslocamento da fase da onda refletida. Assim, a mudança no número de moléculas ligadas ao biossensor promove alteração do padrão de interferência que pode ser medido em tempo real, possibilitando a detecção de eventos de ligação, bem como a determinação das taxas de associação e dissociação. A alteração no padrão de interferência é monitorada pelo sistema OCTET-RED (Forté-Bio, USA). Moléculas livres em solução e mudanças no índice de refração não afetam o padrão de interferência, o qual só é alterado pela associação ou dissociação de ligantes que interagem com a biomolécula imobilizada.⁹³

Essa estratégia foi utilizada para a identificação de novos candidatos a inibidores da XaFold. As próximas sessões apresentam os desafios encontrados para a padronização do método e os resultados obtidos na triagem em larga escala para a descoberta de novos ligantes da enzima alvo.

Figura 37 – Representação esquemática do ensaio de interferometria de biocamada para a detecção de eventos de ligação entre uma biomolécula imobilizada em biossensores e ligantes presentes em solução.

Fonte: Adaptada de *BLI Technology*.⁹³

6.1 Produção de proteína recombinante biotinilada a partir da construção pET-6HIS-BAP-FOLD

O método BLI requer a imobilização da proteína alvo em sensores. Para tanto, é necessário produzir construções da proteína de interesse que tenham afinidade pelos sensores comercialmente disponíveis. Assim, estratégias de imobilização através da interação com cauda de histidina (6HIS) ou biotinylation são bastante utilizadas.

Biotinylation é definido como o processo de modificação da estrutura da proteína através da ligação covalente da molécula orgânica biotina. Trata-se de um método extensivamente utilizado para estudos de interação molecular que requerem a imobilização de proteínas. O método explora a afinidade da proteína biotinilada pela avidina e seus análogos, como a estreptavidina.⁹⁴

Para a biotinylation podem ser utilizados métodos químicos ou enzimáticos. Enquanto o processo químico promove biotinylation de resíduos de lisina localizados na superfície da proteína, o processo enzimático promove a biotinylation em um sítio específico. A biotinylation da XaFold foi realizada pelo processo enzimático, com o objetivo de promover a biotinylation

uniforme da proteína e evitar adição de biotina aos resíduos de lisina presentes no sítio ativo e no sítio de ligação ao cofator. Para essa finalidade, uma construção de *XaFold* com a sequência do peptídeo aceptor de biotina (BAP, do inglês *Biotin Acceptor Peptide*) - GLNDIFEAQKIEWHE - foi produzida utilizando vetores derivados de pET15b. A construção resultante, pET15b-6HIS-BAP-*XaFold*, foi expressa em *E. coli* BL21 (DE3) juntamente com a construção pACYC-BirA, codificante da proteína biotina-ligase (BirA). A proteína BirA promove a ligação de biotina à cadeia lateral da lisina, processo representado na Figura 38.⁹⁵

96

Figura 38 – Biotinylation catalisada pela proteína biotina ligase (BirA).

Fonte: Elaborada pela autora.

A co-expressão heteróloga das duas proteínas, BAP-*XaFold* e BirA, é possível devido à compatibilidade das origens de replicação dos vetores pET e pACYC. Para a co-expressão, células de *E. coli* BL21 (DE3) foram transformadas simultaneamente com os dois plasmídeos e cultivadas até atingir $DO_{600\text{ nm}} = 0,6$. Em seguida, adicionou-se IPTG (1 mM) e biotina (50 μM) para indução da expressão e biotinylation enzimática.

A BAP-*XaFold* biotinilada foi purificada seguindo os mesmos procedimentos descritos para a purificação de *XaFold* a partir da construção pET-6HIS-TRX-*XaFold* (Figura 39). A *XaFold* biotinilada permaneceu estável em todas as etapas de purificação. No entanto, essa construção apresentou o menor rendimento dentre todas as construções de *XaFold* exploradas, com 11 mg/L de expressão.

Figura 39 – Cromatogramas e gel SDS-PAGE para acompanhamento das etapas de purificação a partir da construção pET-6HIS-BAP-XaFold. **A**, primeira cromatografia de afinidade; **B**, segunda cromatografia de afinidade; **C**, cromatografia de exclusão molecular; **D**, gel SDS-PAGE; **MK**, marcador de massa molecular; **1**, fração insolúvel do lisado celular; **2**, fração solúvel do lisado celular; **3**, frações obtidas após primeira cromatografia de afinidade; **4**, frações obtidas após segunda cromatografia de afinidade; **5**, BAP-XaFold biotinizada após etapa final de purificação por cromatografia de exclusão molecular.

Fonte: Elaborada pela autora.

6.2 Produção de proteína recombinante a partir das construções pET-6HIS-XaFold e pET-6HIS-TRX-XaFold

A construção pET-6HIS-TRX-XaFold, utilizada para a produção de XaFold para ensaios cinéticos e de cristalização, também foi explorada durante a padronização dos ensaios de BLI. Para tanto, essa construção foi utilizada para a produção de 6HIS-TRX e 6HIS-TRX-XaFold. Adicionalmente, a construção pET-6HIS-XaFold, sem TRX, foi explorada para a produção de 6HIS-XaFold.

Para a produção de TRX com cauda de 6HIS (6HIS-TRX) foram seguidas todas as etapas de purificação descritas na seção 4.2.1.1, enquanto para a produção de 6HIS-TRX-XaFold foi realizada apenas uma cromatografia de afinidade seguida pela cromatografia por exclusão molecular (Seção 4.2.1.1, Figura 16). A 6HIS-XaFold, por sua vez, foi purificada de maneira análoga, com apenas as duas primeiras etapas de purificação, e apresentou rendimento de 47 mg por litro de expressão (Figura 40).

Figura 40 – Cromatogramas e gel SDS-PAGE para acompanhamento das etapas de purificação a partir da construção pET-6HIS-*XaFold*. **A**, primeira cromatografia de afinidade; **B**, cromatografia de exclusão molecular e gel SDS-PAGE; **MK**, marcador de massa molecular; **1**, fração solúvel do lisado celular; **2 e 3**, frações obtidas após primeira cromatografia de afinidade; **4**, 6HIS-*XaFold* após etapa final de purificação por cromatografia de exclusão molecular.

Fonte: Elaborada pela autora.

6.3 Estudos de interação entre *XaFold* e ligantes por BLI

6.3.1 Padronização do ensaio

Para a padronização do ensaio de BLI para a *XaFold* foram avaliados dois diferentes biossensores: *i*. Ni-NTA (do inglês, *Nickel-charged tris-Nitriloacetic Acid*), cuja afinidade pela histidina promove a imobilização de proteínas com HIS-tag, e *ii*. SSA (do inglês, *Super Streptavidin*), o qual explora a afinidade estreptavidina-biotina e requer a produção de proteína biotinizada. Os sensores SSA são compostos por uma alta densidade de sítios de estreptavidina, e ao interagirem com a biotina promovem imobilização irreversível da proteína.⁹⁷

Os biossensores SSA são mais sensíveis do que os Ni-NTA, porém custam quatro vezes mais caro. Enquanto um conjunto de 96 sensores SSA custa em média R\$ 5.316,00 (R\$ 55,37/unidade), o mesmo conjunto de sensores Ni-NTA custa R\$ 1.329,00 (R\$ 13,84/unidade). Além do preço, os sensores Ni-NTA apresentam a vantagem adicional de serem reutilizáveis, diminuindo ainda mais o custo do ensaio.

Visando estabelecer um ensaio custo-efetivo para a *XaFold*, ambos biossensores foram avaliados, iniciando-se a padronização pelos sensores Ni-NTA. Para tanto, duas construções de *XaFold* foram avaliadas, uma contendo apenas a cauda de histidina (6HIS-Fold) e outra contendo além da cauda de histidina a proteína Trx (6HIS-TRX-Fold). Para se estabelecer o controle de ligação inespecífica foram avaliadas as proteínas TEV e TRX, ambas com cauda de histidina, imobilizadas nos sensores de referência.

Para se estabelecer um controle positivo de ligação à *XaFold* os sensores testes e os sensores referência foram ensaiados em concentrações crescentes dos compostos N^5 , N^{10} -metileno-THF; N^5 , N^{10} -metenil-THF e $NADP^+$. Além dos substratos naturais da *Fold*, os inibidores clássicos da via de folatos metotrexato e trimetoprim também foram testados. No entanto, o mesmo perfil de associação e dissociação foi observado para os sensores imobilizados com *XaFold* e para os biossensores de referência, imobilizados com TRX e TEV protease. Assim, na ausência de proteína com cauda 6HIS que pudesse ser usada como controle de ligação inespecífica, tornou-se inviável o uso de biossensores Ni-NTA.

Diante disso, os sensores SSA foram utilizados para imobilização da *XaFold* biotinilada, estabelecendo-se como controle de ligação inespecífica sensores bloqueados com biocitina. De acordo com a magnitude de resposta e o perfil das curvas de associação e dissociação, o substrato N^5 , N^{10} -metenil-THF foi selecionado como controle positivo de ligação à *XaFold*, apresentando magnitude de resposta igual a 0,08 nm para a máxima concentração testada e K_D igual a 120 μM (Figura 41)

Figura 41 – **A**, Curvas de associação e dissociação do substrato N^5 , N^{10} - metenil- THF à proteína *XaFold* biotinilada imobilizada em sensores SSA. **B**, curva concentração-resposta obtida para determinação de K_D do N^5 , N^{10} -metenil- THF.

Fonte: Elaborada pela autora.

6.3.2 Triagem de fragmentos

Uma coleção com 1.124 fragmentos foi submetida à triagem para identificação de inibidores da *XaFold*, utilizando o ensaio de BLI previamente padronizado. A coleção de fragmentos é comercialmente disponível no *Drug Discovery Unity* (DDU) – *University of Dundee* (Dundee, UK) e inclui compostos com grande diversidade estrutural, com peso molecular menor que 300 Da, número de doadores de ligação de hidrogênio ≤ 3 e $ClogP \leq 3$.

Em cada batelada de ensaio foram triados aproximadamente 150 fragmentos, testados a 200 μM . A integridade da proteína imobilizada foi verificada pela magnitude de resposta da ligação ao substrato, a qual manteve-se igual a $0,14 \pm 0,03$ nm ao longo da triagem (Figura 42).

Figura 42 – Representação da associação e dissociação do substrato N^5 , N^{10} -metenil-THF à proteína *XaFold* biotinilada imobilizada em sensores SSA. A resposta dos 16 sensores está sobreposta, e cada sensor está representado por uma cor.

Fonte: Elaborada pela autora.

Adicionalmente, a integridade dos biossensores foi avaliada verificando-se a distribuição de respostas ao longo do ensaio. Nessa avaliação, busca-se descartar a possibilidade de que os biossensores tenham sido danificados. A resposta dos biossensores, se danificados, é a mesma para todos os fragmentos testados, notando-se a sobreposição dos pontos. Para o ensaio realizado nenhum sensor foi danificado durante a triagem (Figura 43), como demonstrado pela ampla distribuição das respostas, com magnitudes entre 0 e 0,147 nm.

Figura 43 – Distribuição da magnitude de resposta observada para cada sensor, expressa como mudança no padrão de interferência observado. Todos os sensores representados são da mesma placa de ensaio, e cada sensor está representado por uma cor. Os fragmentos testados pelo mesmo sensor estão representados pela mesma cor.

Fonte: Elaborada pela autora.

Uma vez confirmada a integridade da proteína imobilizada, o processamento de dados foi realizado utilizando o programa OCTET RED Data Analysis v.7.1 (Forté-Bio, USA). Durante o processamento foram subtraídos dos dados brutos: *i.* a resposta de associação e dissociação dos sensores de referência bloqueados com biocitina na presença dos fragmentos e *ii.* o efeito da suplementação de 0,1% de DMSO ao tampão utilizado no ensaio, visando garantir que a mudança no padrão de interferência pudesse ser atribuída à interação específica da XaFolD com os fragmentos triados.

Após o ajuste das curvas de associação e dissociação estabeleceu-se 0,05 nm como valor de corte para seleção de possíveis *hits*. Esse valor foi estabelecido considerando-se o desvio médio da resposta observada para o controle positivo de ligação, igual a 0,03 nm. Assim, 155 fragmentos com resposta acima de 0,05 foram individualmente analisados para a exclusão de falso positivos. Nessa etapa foram avaliados os dados brutos e os dados após a subtração da resposta dos sensores de referência. Diferentes padrões de curva de associação e dissociação foram observados (Figura 44). Durante a análise foram descartados fragmentos cuja curva de associação/dissociação indicava: *i.* dissociação incompleta (Figura 44A e B); *ii.* taxa de dissociação lenta (Figura 44C); *iii.* grande oscilação da resposta durante a etapa de associação (Figura 44D). Adicionalmente, fragmentos com resposta maior que três vezes a resposta do controle positivo também foram descartados, uma vez que respostas tão altas são podem indicar interações múltiplas com mais de um sítio ativo, ou interações do sítio ativo com mais de uma molécula de fragmento, ambos indícios de ligações inespecíficas (Figura 44E).

Figura 44 – Curvas de associação e dissociação de 5 dos 63 fragmentos considerados falso positivos durante a inspeção individual dos dados. **A** e **B**, dissociação incompleta. **C**, associação e dissociação lentas. **D**, oscilação da resposta durante a associação. **E**, resposta maior que três vezes a resposta do controle positivo, N^5 , N^{10} -metenil-THF.

Fonte: Elaborada pela autora.

Ao final, a inspeção individual dos 155 fragmentos considerados potenciais *hits* resultou na eliminação de 63 fragmentos, sendo mantidos 92 (Tabela 13).

Tabela 13 – Distribuição de fragmentos por placa.

Identificação da placa	Número de compostos			
	Total	$R \geq 0.05$ nm	Selecionados	Excluídos
1	154	19	11	8
2	153	37	21	16
3	149	26	19	7
4	146	20	14	6
5	154	21	11	10
6	154	14	9	5
7	151	14	6	8
8	63	4	1	3
TOTAL	1124	155	92	63

Fonte: Elaborada pela autora.

Os 92 fragmentos foram classificados em ordem decrescente de magnitude de resposta e os 50 primeiros foram selecionados para análise estrutural (Apêndice I). Para tanto, os 50 fragmentos selecionados foram agrupados por similaridade química ($\geq 60\%$) utilizando o programa Molsoft (Molsoft L.L.C, USA) (Figura 45).

A seleção dos fragmentos para inspeção e aquisição foi baseada na análise da magnitude de resposta durante o ensaio de triagem, no padrão das curvas de BLI e nas características estruturais. Os *hits* **DDD00808259** (derivado quinazolinediona), **DDD01305586** (derivado fluorfenila) e **DDD00100784** (derivado piridiniluréia), provenientes dos grupos 1, 2 e 9, respectivamente, satisfazem os critérios estabelecidos (Figura 46). Esses fragmentos pertencentes a classes químicas distintas e, além disso, não há relatos na literatura de serem ligantes de FolD, portanto, são estruturalmente diversos e candidatos a inibidores inéditos. A estrutura 2D, o nome químico e a magnitude de resposta durante o ensaio de BLI estão ilustrados na Figura 46 e as propriedades físico-químicas desses fragmentos estão apresentadas na Tabela 14.

Figura 45 – Agrupamento por similaridade química ($\geq 60\%$) dos 50 fragmentos com maior magnitude de resposta (em nm). Destacados em vermelho estão os fragmentos DDD00808259 (Grupo 1), DDD1000784 (Grupo 2) e DDD1305586 (Grupo 9), selecionados para compra.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 46 – Estrutura 2D e curvas de associação e dissociação dos compostos 3-(2-aminoetil) -1-metil-2,4(1H,3H)-quinazolinediona (A), ácido 2-(3-fluorofenil) propanoico (B) e 1-ciclo-hexil-3-piridin-3-il-metil-ureia (C), testados a 200 μM .

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 14 – Propriedades físico-químicas, magnitude de resposta e classificação no ensaio de BLI dos fragmentos DDD00808259, DDD01305586 e DDD00100784.

Fragmento	DDD00808259	DDD01305586	DDD00100784
Peso Molecular	219,1	168,1	233,2
Aceptores de ligação de H⁺	5	3	3
Doadores de ligação de H⁺	2	1	2
Ligações rotacionáveis	2	2	5
Classificação BLI	1º (0,2234 nm)	2º (0,2028)	6º (0,1503)

Fonte: Elaborada pela autora.

6.3.3 Determinação de K_D dos hits selecionados

Os três fragmentos **DDD00808259** (*hit 1*), **DDD01305586** (*hit 2*) e **DDD00100784** (*hit 3*) foram adquiridos das empresas ChemBridge, Enamine e Sigma-Aldrich para determinação da constante de dissociação, (K_D). Para tanto, ensaios de BLI com concentrações múltiplas dos ligantes foram obtidas por diluição seriada a partir de 1 mM para os *hits 1* e *2*, e a partir de 1,5 mM para o *hit 3*. Para o ajuste dos dados experimentais foi utilizado o modelo de interação 1:1, em que uma molécula do composto livre em solução se liga a uma molécula de proteína imobilizada, e os valores de K_D foram determinados a partir da razão entre as taxas de associação (ka) e dissociação (kd). Apenas para os *hits 1* e *3* foi possível observar a curva característica do gráfico de *steady-state*, indicando a saturação nos intervalos de concentrações avaliados. Os valores determinados de K_D para os *hits 1* (260 μ M) e *3* (210 μ M) estão na faixa submilimolar, enquanto para o *hit 2* (3 mM) a afinidade de ligação é na faixa do baixo milimolar. Esses valores de afinidade de ligação são comparáveis ao valor de K_D do substrato N⁵, N¹⁰-metenil- THF (K_D = 120 μ M). Além disso, a afinidade de ligação na faixa submilimolar dos *hits 1* e *3* são compatíveis com as afinidades de ligação observadas para fragmentos moleculares como *hits* iniciais para estudos de otimização de potência e afinidade.⁹⁸⁻⁹⁹ As curvas de associação e dissociação dos *hits* selecionados estão representadas na Figura 47.

Figura 47 – Representação do perfil de interação durante os ensaios de BLI e determinação da constante de dissociação, K_D . **A**, hit 1. **B**, hit 2. **C**, hit 3

Fonte: Elaborada pela autora.

6.4 Investigação das interações entre XaFold e ligantes por Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

A calorimetria de titulação isotérmica (ITC, do inglês, *Isothermal Titration Calorimetry*) é um método que permite a determinação dos parâmetros termodinâmicos envolvidos na interação entre moléculas, incluindo as interações entre macromolécula e um ligante, através da medida do calor liberado ou absorvido durante a interação. Para tanto, duas células termicamente isoladas por jaquetas adiabáticas são mantidas na mesma temperatura. Uma dessas células, chamada célula de referência, é preenchida com água ou tampão, enquanto a outra célula contém a amostra. Outro componente do sistema é a seringa, responsável pela injeção de um volume conhecido do ligante na célula de amostra e homogeneização da solução. Durante a titulação, a adição do ligante (L) à célula contendo a amostra (M) resulta na formação

do complexo ML, dependente das concentrações de ambos e da constante de associação entre eles (K_a) (Figura 48A).¹⁰⁰

A interação entre o ligante e a macromolécula envolve a liberação ou absorção de calor, caso a interação seja exotérmica ou endotérmica, respectivamente. O calor liberado ou absorvido pela interação promove alteração do equilíbrio térmico entre as células, o qual é reestabelecido por um sistema de compensação. Assim, no caso de interação exotérmica, menos energia é transferida para a célula de amostra a fim de mantê-la na mesma temperatura que a célula de referência, o que gera um pico negativo registrado durante a titulação. Por outro lado, picos positivos são gerados para interações endotérmicas, uma vez que é necessário transferir mais calor para a célula de amostra para reestabelecer o equilíbrio térmico. A energia necessária para a manutenção do equilíbrio térmico ao longo do tempo é medida pela integração dos picos gerados durante a titulação (Figura 48B). Uma vez que essa medida é proporcional ao calor da reação, a calorimetria de titulação isotérmica possibilita a medida direta da constante de associação, K_a , da variação de entalpia no processo (ΔH) e da estequiometria da reação (n). A determinação desses parâmetros, por sua vez, possibilita o cálculo da energia livre de Gibbs (ΔG) e da variação da entropia (ΔS), delineando a termodinâmica da reação entre a macromolécula e o ligante.¹⁰⁰

Assumindo a existência de um único sítio de ligação, a constante de associação determina a partição dos reagentes na forma livre e em complexo, conforme a Equação 1. A afinidade de ligação, por sua vez, pode ser descrita em função de ΔG , conforme Equação 2. Adicionalmente, ΔG pode ser descrita em função de ΔH e ΔS (Equação 3).

$$K_a = [ML]/[M][L] \quad (1)$$

$$\Delta G = - R T \ln K_a, \text{ em que } R \text{ é a constante dos gases e } T \text{ a temperatura absoluta.} \quad (2)$$

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (3)$$

Os ensaios de ITC foram realizados com três finalidades: *i.* determinar o mecanismo da primeira etapa da reação catalisada pela XaFolD *ii.* validar os *hits* identificados a partir da triagem de fragmentos e *iii.* determinar em qual dos dois sítios da XaFolD os *hits* se ligam.

Para atender ao primeiro objetivo, os substratos N^5 , N^{10} - metileno -THF e $NADP^+$ e o produto NADPH foram individualmente titulados. No entanto, para nenhum desses compostos foi possível integrar os dados dos picos de forma a obter uma assinatura termodinâmica ajustável aos modelos de interação, mesmo diante da variação de parâmetros experimentais como temperatura e concentração do ligante e da proteína. Para investigar o efeito do calor de diluição no calor observado, a titulação dos mesmos ligantes foi repetida, dessa vez com a célula de amostra contendo apenas tampão.

Figura 48 – Representação esquemática do equipamento utilizado pela calorimetria de titulação isotérmica (A) e dos resultados obtidos em um ensaio de ITC (B). Em B, no painel superior estão os picos referentes às injeções consecutivas de ligante, até a saturação dos sítios da macromolécula na célula de amostra. Esses picos correspondem à diferença em compensação de energia realizada pelo equipamento para manter as duas células na mesma temperatura, em função do tempo. Em B, no painel inferior está representada a área calculada de cada pico, normalizada por mol de ligante injetado, em função da razão das concentrações de ligante e macromolécula. Os parâmetros estequiometria (n), constante de afinidade (K_a) e variação de entalpia (ΔH) são calculados a partir de modelos matemáticos de interação.

Fonte: Adaptada de VELAZQUEZ-CAMPOY¹⁰⁰

Devido à baixa afinidade da XaFolD pelo NADP^+ ($K_M = 668 \pm 81 \mu\text{M}$), a menor concentração de NADP^+ e NADPH testadas foi igual a 6 mM (~10 vezes o valor do K_M). Altos valores referentes ao calor de diluição foram observados, como representado na Figura 49 para o NADP^+ . A afinidade baixa associada ao alto calor de diluição dificulta a investigação das interações entre a XaFolD e o NADP^+ por ITC.

Figura 49 – Resultados do ensaio de ITC para o NADP^+ .
Fonte: Elaborada pela autora.

Para o substrato N^5 , N^{10} -metileno-THF, não foi observado calor de diluição significativo. Neste caso, a ausência de picos durante a titulação é um indício da baixa afinidade entre a proteína e o primeiro substrato. Uma vez que a conversão de N^5 , N^{10} -metileno-THF em N^5 , N^{10} -metenil-THF é dependente de NADP^+ , é possível que o primeiro substrato só se ligue à XaFold após a ligação do NADP^+ . Neste caso, o mecanismo de reação proposto envolve a ligação ordenada dos dois substratos. Este mecanismo é comum em desidrogenases dependentes de análogos de nucleotídeo,¹⁰¹ como é o caso da XaFold. O mecanismo de reação proposto é reiterado pela estrutura cristalográfica de XaFold, elucidada neste trabalho na forma apo. A comparação da XaFold com complexos binários e ternários revelou diferenças na orientação entre os domínios, os quais estão mais distantes um do outro na forma apo, aumentando a superfície do sítio catalítico exposta ao solvente. Além disso, observa-se para todos os complexos de Fold com inibidores co-cristalizados no sítio catalítico a presença de NADP^+ no sítio C-terminal.

Além de investigar o mecanismo do primeiro passo da reação, ensaios de ITC foram realizados para investigar o segundo passo da reação catalisada pela XaFold. Nessa etapa, ocorre a hidrólise do N^5 , N^{10} -metenil-THF e liberação do produto final N^{10} -formil-THF. O valor calculado para o K_D foi igual a 274 μM . Os parâmetros de energia mostram que a interação entre a XaFold e o N^5 , N^{10} -metenil-THF é um processo exotérmico (Figura 50). Além disso, os valores calculados para ΔG , ΔH e $-\Delta S$ foram iguais -6,23, -1,65 e -4,58 kcal/mol, respectivamente.

Figura 50 – Resultados do ensaio de ITC para o N^5, N^{10} -met-enil-THF.
 Fonte: Elaborada pela autora.

Considerando a Equação 3, a energia livre de Gibbs pode ser descrita em termos das variações de entalpia e entropia. A entalpia de ligação reflete a natureza das interações entre o ligante e o alvo molecular em relação às interações estabelecidas com o solvente. De acordo com a natureza das interações estabelecidas com o alvo molecular, a reação pode ser caracterizada como entálpicamente favorável ou desfavorável. O primeiro caso ocorre quando as interações estabelecidas pelo ligante são fortes o suficiente para compensar a entalpia envolvida na dessolvatação. A variação da entropia, por sua vez, pode ser dividida na variação da entropia de solvatação e na variação da entropia conformacional. A dessolvatação ocasionada pela interação do ligante com os resíduos do sítio ativo, promove o deslocamento de moléculas de água, aumentando a entropia do sistema. Esse aumento é contrabalanceado pela redução dos graus de liberdade dos grupos polares envolvidos na interação e consequente redução da entropia do sistema. A interação entre o ligante e a macromolécula depende do balanceamento de efeitos. Nesse sentido, as interações podem ser dirigidas por entalpia, por entropia ou podem ser balanceadas.¹⁰²

De acordo com o resultado de ITC, a interação entre a XaFold e o N^5, N^{10} -met-enil-THF possui um componente entrópico majoritário. Apesar dos resíduos que interagem com o segundo substrato não serem conhecidos, diversos estudos na literatura relatam a participação dos resíduos do sítio ativo do metileno na segunda reação. Assim, é proposto que após a oxidação do N^5, N^{10} -metileno-THF há uma espécie de canalização do produto recém-formado,

N^5 , N^{10} -metenil-THF, para o sítio em que ocorre a hidrólise e a liberação do produto final, N^{10} -formil-THF. Apesar das interações polares estabelecidas pelo anel pteridina do substrato com os resíduos do sítio catalítico, parte do sítio ativo está exposta ao solvente, próxima à região entre os domínios. Consequentemente, a dessolvatação que ocorre durante a interação contribui para o aumento da entropia do sistema.

Ensaio de ITC também foram conduzidos para investigar a interação dos *hits* selecionados. Com exceção do *hit 2*, os ensaios de ITC foram úteis para a determinação da interação dos fragmentos com a XaFold. Para o *hit 1*, o valor de K_D determinado foi de 80,2 μM , e os valores de ΔG , ΔH e $-T\Delta S$ foram iguais a, -5,59; -2,42; e -3,18 kcal/mol, respectivamente. Assim como a reação da XaFold com o N^5 , N^{10} -metenil-THF, a interação com o *hit 1* também é exotérmica. No entanto, as contribuições da entropia e da entalpia para a reação são mais equilibradas (Figura 51).

Figura 51 – Resultados do ensaio de ITC para o *hit 1*.

Fonte: Elaborada pela autora.

A exemplo dos outros ligantes, a interação do *hit 3* com a XaFold também foi exotérmica. No entanto, a ausência de saturação durante a titulação inviabilizou a integração dos dados e determinação dos parâmetros termodinâmicos (Figura 52).

Figura 52 – Resultados do ensaio de ITC para o *hit 3*.

Fonte: Elaborada pela autora.

A análise das interações de ligantes com a XaFold por calorimetria de titulação isotérmica indicam que a contribuição da entropia para a reação é maior que a contribuição da entalpia.

6.5 Validação dos *hits* identificados

A validação dos *hits* detectados a partir da triagem de fragmentos foi realizada através de ensaios de concentração-resposta. Os fragmentos identificados como *hit 2* (DDD1305586) e *hit 3* (DDD1000784) foram incubados com 10 nM de XaFold por 5 minutos. Em seguida, ensaios cinéticos foram conduzidos, monitorando-se a atividade ciclohrolase da XaFold em 355 nm.

O *hit 2*, ácido 2-(3-fluorofenil) propanoico, reduziu em aproximadamente 1/3 a atividade ciclohrolase da XaFold na concentração de 2 mM (Figura 53). Para este fragmento, o K_D determinado foi de 3,1 mM. Apesar da baixa afinidade da enzima pelo *hit 2*, o percentual de inibição é considerado satisfatório para um fragmento de massa molecular igual a 168,1 Da. Adicionalmente, a busca por compostos similares ao ácido 2-(3-fluorofenil) propanoico utilizando a base de dados ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>) revelou um grande número de compostos bioativos, dentre os quais se destaca o ácido 2-(3-fluoro-4-difenil) propanoico, fármaco da classe dos anti-inflamatórios não esteroides (AINES) e inibidor das enzimas cicloxigenase 1 e 2.¹⁰³

Figura 53 – Ensaio concentração-resposta para o fragmento DDD01305586 (*hit 2*).

Fonte: Elaborada pela autora.

O *hit 3* (1-ciclo-hexil-3-piridin-3-il-metil-ureia), para o qual o valor determinado de K_D foi igual a 210 μ M, não inibiu a atividade ciclohidrolase na máxima concentração testada (2 mM). O composto 1-ciclo-hexil-3-piridin-3-il-metil-ureia, registrado no banco de dados ChEMBL sob o código ChEMBL1871337, é reportado como inibidor da DNA polimerase γ , competindo pela ligação com desoxinucleotídeos.¹⁰⁴ Assim, é possível que a alteração do padrão de interferência observada durante os ensaios de BLI ocorra devido a ligação do *hit 3* no sítio do NADP^+ . Neste caso, o *hit 3* pode ser explorado como aditivo de cristalização para a XaFold.

6.6 Triagem virtual de inibidores

A triagem virtual (VS, do inglês, *Virtual Screening*) envolve a análise *in silico* de grandes bases de dados de compostos com a finalidade de identificar moléculas que possam ser obtidas comercialmente ou por síntese orgânica, para avaliação *in vitro* da atividade biológica. A VS pode ser realizada em dois cenários distintos: *i.* baseado nas informações sobre o alvo-receptor (SBVS, do inglês, *Structure-Based Virtual Screening*) e *ii.* baseado na estrutura de uma molécula bioativa (LBVS, do inglês, *Ligand-Based Virtual Screening*). A escolha da estratégia dependerá do objetivo e disponibilidade de informações sobre o sistema biológico em estudo, ou seja, caso a estrutura 3D do alvo molecular de interesse seja conhecida, a estratégia de SBVS é atrativa para identificar pequenas moléculas que apresentem complementaridade estereoquímica e eletrônica com os resíduos de aminoácidos que formam o sítio de ligação na proteína-alvo.

Nessa tese, a estrutura cristalográfica de *TbFolD* (PDB ID 4CJX) foi selecionada para os estudos de docagem por se tratar de um complexo ternário co-cristalizado com o cofator NADP^+ e com o inibidor 9L9. Além disso, a análise dos mapas de densidade eletrônica dessa estrutura indicou a presença do ligante co-cristalizado em orientação favorável às interações estabelecidas com os resíduos do sítio ativo da FOLD, não restando dúvida em relação à inclusão do ligante no modelo cristalográfico 4CJX (Figura 54).

Figura 54 – Mapa de densidade eletrônica $F_o - F_c$ contornado a 3.0σ sobreposto à estrutura do inibidor 9L9 (PDB ID 4CJX).

Fonte: Elaborada pela autora.

A estrutura cristalográfica foi preparada para os estudos de docagem e em seguida foi gerado um *grid* de dimensões $10\text{\AA} \times 10\text{\AA} \times 10\text{\AA}$ centrado no ligante 9L9. Para validação do protocolo utilizado na triagem virtual, o ligante foi removido do modelo cristalográfico e submetido à docagem. O desvio quadrático médio (RMSD, do inglês *Root Mean Square Deviation*) calculado para comparar a orientação do ligante 9L9 no modelo cristalográfico e a orientação após docagem foi igual a $0,44 \text{\AA}$ (Figura 55), indicando que o método e parâmetros da modelagem conseguiram reproduzir o modo de ligação experimental observado para o ligante 9L9.

Figura 55 – Superposição do ligante 9L9 na orientação do modelo cristalográfico 4CJX (átomos de carbono representados em branco) e na orientação observada após protocolo de ancoragem (átomos de carbono representados em ciano).

Fonte: Elaborada pela autora.

Os ensaios de VS foram realizados a partir de três bases de dados: *Enamine Agro-like*, *Enamine Antibacterial*, e *ChemBridge DIVERSet*TM, totalizando 74.163 estruturas. Cada base

de dados foi triada individualmente, seguindo o mesmo protocolo. O protocolo utilizado consistiu em etapas de *i.* preparo e otimização das estruturas tridimensionais para os estudos de docagem molecular, *ii.* docagem no módulo de precisão padrão (SP, do inglês *Standard Precision*) e *iii.* docagem no módulo de precisão extra (XP, do inglês *Extra Precision*), *iv.* inspeção visual das estruturas tridimensionais e seleção final de compostos para aquisição. O número de estruturas envolvidas em cada uma dessas etapas está indicado na Tabela 15.

Tabela 15 – Número de estruturas disponíveis nas bases de dados triadas, confôrmers gerados na etapa de preparo dos ligantes, poses submetidas à ancoragem no modo XP, poses analisadas por inspeção visual e número final de estruturas selecionadas para aquisição.

Base de dados	Estruturas	Confôrmers	Poses SP → XP	Poses analisadas	Estruturas selecionadas
<i>Enamine Agro-like</i>	15.085	22.678	2.129	318	8
<i>Enamine Antibacterial</i>	9.162	11.762	1.516	487	9
<i>ChemBridge DIVERSet</i>	50.000	75.446	12.180	635	14
TOTAL	74.247	109.886	15.825	1440	31

Fonte: Elaborada pela autora.

Durante a etapa de preparo e otimização das estruturas tridimensionais, os arquivos provenientes das bases de dados foram submetidos à ferramenta *LigPrep* para o cálculo de cargas utilizando o campo de força OPLS 2005. Adicionalmente, os centros quirais dos arquivos originais foram explorados para a geração de estereoisômeros - por isso observa-se o aumento do número de confôrmers em relação ao número original de estruturas disponíveis nas bases de dados.

Durante a etapa de preparo dos ligantes foram gerados 109.886 confôrmers a partir das 74.247 estruturas das bases de dados. Os confôrmers gerados foram submetidos à docagem no modo SP. As poses geradas foram classificadas de acordo com a função *GlideScore*, observando-se valores de pontuação entre -10,1 (melhor classificação) e -2,3 (pior classificação). Os valores de pontuação atribuídos pela função *GlideScore* estão correlacionados com a afinidade de ligação proteína-ligante através do valor de ΔG . Portanto, quanto menor o valor de pontuação atribuído pela função *GlideScore* aos ligantes, maior a afinidade de interação predita. Na etapa de validação do protocolo, a docagem do ligante 9L9 previamente removido do modelo cristalográfico resultou em valores de *GlideScore* iguais a -10,8 e -15,6 para os modos SP e XP, respectivamente.

Dentre as poses obtidas pela docagem no modo SP foram selecionadas 15.825 poses com valores de *GlideScore* menores que -7,0 para a etapa seguinte de docagem no modo XP. O modo de docagem XP foi utilizado para eliminar ligantes falso-positivos posicionados no interior do sítio ativo durante a primeira etapa de docagem. Por ser um modo de amostragem conformacional e de cálculo de cargas com maior precisão, o modo XP demanda maior custo computacional, sendo recomendado apenas para a otimização de um conjunto de poses pré-selecionadas a partir do modo SP.

Ambos modos de docagem do programa Glide, SP e XP, se baseiam na busca sistemática de conformações dos ligantes durante a otimização da orientação no interior do *grid* de docagem, o qual representa o sítio ativo de interesse. A flexibilidade dos ligantes é explorada a partir da variação das ligações rotacionáveis, de forma que as conformações que estabelecem o maior número de interações favoráveis avançam para a etapa seguinte, sendo submetidas a um processo de refinamento e minimização de energia no interior do *grid* de docagem. Ao final do processo, as poses são classificadas de acordo com o algoritmo de pontuação *GlideScore*, de acordo com a Equação 4:

$$GlideScore = (0,05 \times vdW) + (0,15 \times Coul) + (Lipo) + Hbond + Metal + Rewards + RotB + Site, \quad (4)$$

em que *vdW* representa a energia de van der Waals; *Coul*, a energia de Coulomb; *Lipo*, o contato lipofílico; *Hbond*, ligações de hidrogênio, *Metal*, interação com metais; *Rewards*, penalidades impostas para características como ligações de hidrogênio correlacionadas e torções de amidas, dentre outras; *RotB*, penalidades impostas a ligações rotacionáveis; *Site*, interações polares no sítio ativo.

Após a segunda etapa de docagem as poses com valores de *GlideScore* menores que -8,0 foram selecionadas para a etapa de inspeção visual e análise de interações. No total, 1.440 poses foram inspecionadas visualmente. Durante a análise visual foram avaliadas as interações entre os ligantes e os resíduos do sítio catalítico conservados entre as espécies. Assim, na etapa de inspeção visual foram priorizados compostos capazes de estabelecer ligações de hidrogênio com os resíduos D123, L101, Q100 e K56, assim como interações do tipo *π -stacking* com o resíduo Y59 da *TbFold*. Esses resíduos são conservados nos modelos de *TbFold* e *XaFold*, conforme discutido na seção 5.1.2.3 e ilustrado na Figura 32.

Ao final da triagem virtual, 31 compostos foram selecionados para aquisição. Os compostos **Z281568730**, **Z1464631963** e **70143367** foram os melhores classificados dentre a base de dados *Enamine Antibacterial*, *Enamine Agro-like*, e *ChemBridge DIVERSet*TM, respectivamente. As interações estabelecidas com os resíduos da *TbFolD* e a pontuação atribuída pelo *GlideScore* estão representadas na Figura 56. As estruturas 2D dos compostos selecionados estão representadas na Tabela 16

Figura 56 – Representação 2D das interações entre ligantes selecionados a partir da triagem virtual e os resíduos do sítio ativo. **A**, composto *Enamine Agro-like* Z1464631963. **B**, composto *ChemBridge DIVERSet*TM 47397786. **C**, *Enamine Antibacterial* Z281568730. **D**, legenda das interações representadas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 16 – Estrutura 2D dos compostos selecionados para aquisição e avaliação experimental.

(continua)

Enamine Antibacterial

Z281568730

Z1331524860

Z1331524860

Z237710328

Z247421288

Z17974102

Z956861336

Z281568180

Z642344122

Enamine Agro-like

Z1464631963

Z1198663680

Z1269895563

Z1200376405

Z1175143705

Z1540729413

Z144654780

Z993542808

(continua)

Tabela 16 – Estrutura 2D dos compostos selecionados para aquisição e avaliação experimental.
(conclusão)

ChemBridge DIVERSet™

Fonte: Elaborada pela autora.

A massa molecular, a pontuação atribuída pela função *GlideScore*, o número de aceptores e doadores de ligação de Hidrogênio e o número de ligações rotacionáveis estão descritos na Tabela 17.

Tabela 17 – Propriedades físico-químicas dos compostos selecionados para aquisição e avaliação experimental.

<i>Enamine Antibacterial</i>					
ID	<i>GlideScore</i>	Massa Molecular	HA	HD	Ligações Rotacionáveis
Z281568730	-8,6	340,7	5	3	6
Z1331524860	-8,3	282,3	5	2	5
Z89677327	-8,2	323,3	8	2	6
Z237710328	-8,2	322,3	4	3	5
Z247421288	-8,2	314,2	7	2	5
Z17974102	-7,9	316,3	6	2	6
Z956861336	-7,9	345,7	7	3	5
Z281568180	-7,8	303,7	4	3	6
Z642344122	-7,8	313,7	4	3	6
<i>Enamine Agro-like</i>					
ID	<i>GlideScore</i>	Massa Molecular	HA*	HD**	Ligações Rotacionáveis
Z1464631963	-9,4	276,2	4	2	1
Z1198663680	-8,4	334,7	4	1	6
Z1269895563	-8,2	340,4	3	1	5
Z1200376405	-8,2	343,3	3	2	6
Z1175143705	-8,6	310,3	3	2	5
Z1540729413	-8,1	291,3	2	2	5
Z144654780	-8,0	347,7	3	2	4
Z993542808	-8,0	324,3	3	1	5
<i>ChemBridge DIVERSet™</i>					
ID	<i>GlideScore</i>	Massa Molecular	HA	HD	Ligações Rotacionáveis
70143367	-10,9	347,4	4	2	6
51405505	-10,0	355,8	4	3	5
79337947	-9,9	345,4	4	1	4
29527761	-9,8	340,4	5	3	5
66342295	-9,1	357,4	5	2	7
47397786	-9,0	264,3	2	2	4
71300095	-8,9	292,3	4	3	5
95129090	-8,9	328,4	4	3	7
43917834	-8,9	317,4	2	2	5
67682555	-8,8	316,3	5	1	7
53445492	-8,7	349,8	3	2	4
59383301	-8,5	366,4	4	3	7
85269780	-8,4	314,3	4	2	3
50881721	-8,1	291,3	3	0	5

*HA, aceptores de ligação de hidrogênio. **HD, doadores de ligação de hidrogênio.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os compostos selecionados apresentam características físico-químicas semelhantes. Apesar dos bancos de dados triados possuírem compostos com massa molecular de até 500 Da, os compostos com melhor classificação segundo os valores atribuídos pelo *GlideScore* possuem

massa molecular entre 264 e 367 Da. Além disso, a maioria dos compostos apresenta dois ou mais anéis aromáticos. Derivados piridínicos, pirimidínicos e imidazólicos são frequentes, por possuírem grupos capazes de satisfazer o padrão de ligações de hidrogênio na parte mais enterrada do sítio ativo, onde ocorre o ancoramento do anel pteridina do substrato da FOLD. Nota-se também a presença de halogênios nos grupos substituintes do anel que interage com a T59. O número de halogênios e o padrão de substituição dos anéis estão bem representados entre os compostos selecionados a partir da triagem virtual. É interessante mencionar que as mesmas características estruturais foram observadas para os 50 fragmentos com maior magnitude de resposta selecionados a partir da triagem de fragmentos por BLI (Apêndice I). Espera-se, com a aquisição e avaliação experimental dos compostos selecionados a partir da triagem virtual, estabelecer estudos de relação estrutura atividade que contribuam para a descoberta de ligantes candidatos a inibidores da XaFOLD. O pedido de compra das moléculas selecionadas foi realizado e no presente momento estas encontram-se em fase de entrega.

CAPÍTULO 7

Resultados e Discussão

***Xanthomonas albilineans*: triagem de inibidores**

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO - *Xanthomonas albilineans*: triagem de inibidores

7.1 Ensaio de inibição do crescimento de *X. albilineans*

As cepas Xa3, Xa5, Xa11 e Xa37 isoladas a partir de cana-de-açúcar pelo Centro da Cana do Instituto Agrônomo de Campinas foram selecionadas de acordo com a classificação filogenética, com a agressividade da cepa e com a distribuição geográfica da plantação de cana-de-açúcar em que foi realizada a coleta (Tabela 18).⁶⁰

Tabela 18 – Características das cepas de *Xanthomonas albilineans* selecionadas para os ensaios fenotípicos para a triagem de inibidores.

Cepa	Cultivares	Origem	Grupo	Agressividade da cepa
Xa3	IBSBF2285	Santa Adélia, SP	I	baixa
Xa5	RB72-454	Conchal, SP	II	baixa
Xa11	SP90-7027	Conchal, SP	I	alta
Xa37	IACSP08-1592	Piracicaba, SP	II	alta

Fonte: Elaborada pela autora.

O cultivo das cepas em meio seletivo sólido foi realizado em duplicatas, em três bateladas distintas, para acompanhamento da taxa de crescimento e caracterização morfológica. Após 4 dias surgiram colônias amareladas, não mucoidais, para todas as cepas. A partir do quinto dia de cultivo houve intensificação da coloração amarela. As colônias de *X. albilineans* eram pequenas e apresentavam bordas não delimitadas, convergentes, característica atribuída à presença de flagelo.²⁰⁻²¹⁻⁵⁹ As mesmas características de crescimento foram observadas para as três bateladas de ensaio. No entanto, além de colônias com as características supracitadas observou-se o surgimento de contaminantes para três das quatro cepas cultivadas: Xa37, Xa5 e Xa3. Para a cepa Xa37 a presença de contaminantes foi detectada no segundo dia de cultivo, enquanto para as cepas Xa5 e Xa3 surgiram contaminantes ao final do período de cultivo.

A cepa Xa11 foi selecionada para os ensaios fenotípicos, visto que em todos os experimentos de cultivo realizados não houve o surgimento de contaminantes. A cepa Xa11 pertence ao grupo filogenético I, é considerada de alta agressividade, e teve sua identidade confirmada pela amplificação do segmento gênico de 288 pares de base a partir do par de oligonucleotídeos específicos PGBL1 e PGBL2.⁷⁹ Colônias isoladas de *X. albilineans* foram transferidas para o meio XAS líquido e cultivadas sob agitação (180 rpm) a 28 °C até saturação, a qual ocorreu em 7 dias (Figura 57). Para o armazenamento dessas cepas em estoque glicerinado, um novo cultivo foi realizado, até atingir a DO_{600 nm} igual a 0,8 – o que ocorreu em

5 dias. Ao final desse período, estoques contendo 50% de glicerol foram armazenadas em ultrafreezer a -80°C .

Figura 57 – Cultivo de *X. albilineans* (cepa Xa11) em meio XAS líquido ao longo de 7 dias.
Fonte: Elaborada pela autora.

Confirmada a identidade da cepa Xa11, iniciou-se o delineamento do ensaio fenotípico para triagem de inibidores, monitorando-se o crescimento bacteriano na incubadora *Bioscreen Microbiological Analyser* (LabSystem, Finlândia). Para se estabelecer o controle positivo de crescimento de *X. albilineans* o ensaio fenotípico foi realizado na presença de concentrações variáveis de DMSO, uma vez que os compostos submetidos a triagem são solubilizados neste solvente. Assim, a concentração máxima de DMSO a ser utilizada nos ensaios de triagem foi estabelecida como 1%, concentração na qual o crescimento bacteriano é igual a 94% do crescimento máximo, observado na ausência de DMSO. O controle positivo de inibição foi estabelecido com o uso de antibiótico canamicina na concentração de 0,5 mg/mL, concentração capaz de inibir 100% do crescimento de *X. albilineans* (Figura 58).

Figura 58 – Crescimento de *Xanthomonas albilineans*. **A**, crescimento em meio seletivo XAS (verde) e controle positivo de crescimento em meio XAS suplementado com 1% de DMSO (azul). **B**, controle negativo de crescimento em meio XAS suplementado com 0,5 mg/mL de canamicina.

Fonte: Elaborada pela autora.

Durante a etapa de triagem de inibidores, para cada composto solubilizado em 100% de DMSO foram testadas três concentrações obtidas a partir da diluição seriada, sendo 2 mM a maior concentração testada. Uma vez estabelecido o protocolo de ensaio, foi realizada a triagem de 64 compostos de diversas classes químicas (Tabela 19), obtidos através de parcerias estabelecidas com os pesquisadores Arthur Eugen Kümmerle (Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro) e Arlene Gonçalves Correa (Universidade Federal de São Carlos).

Tabela 19 – Compostos avaliados frente à cultura de *Xanthomonas albilineans*.

(continua)

Derivados oxazólicos e imidazólicos
L2 0% inibição	L3 0% inibição	L4 0% inibição
L10 0% inibição	A2 0% inibição	A3 0% inibição
A9 0% inibição	A10 0% inibição	B2 0% inibição
C2 0% inibição		
Derivados cumarínicos
THP3 0% inibição	THP2 ~100% inibição (2 mM)	THP-Cl 0% inibição

(continua)

Tabela 19 – Compostos avaliados frente à cultura de *Xanthomonas albilineans*.
(continuação)

Derivados cumarínicos

THP-Imid
10% inibição (0,4 mM)

BNFV01
0% inibição

BNFV08
0% inibição

BNFV11
0% inibição

BNFV12
0% inibição

BSFV
0% inibição

INTER1
0% inibição

3-etinil-7-Ome
0% inibição

THP-ZnAc
20% inibição (0,4 mM)

Derivados quinolônicos, pirazínicos e tiazolidínicos

LSPN26
11% inibição

LSPN174
20% inibição

LSPN177
10% inibição

LSPN179
23% inibição

LSPN183
23% inibição

LSPN321
16% inibição

LSPN325
28% inibição

LSPN337
28% inibição

(continua)

Tabela 19 – Compostos avaliados frente à cultura de *Xanthomonas albilineans*.
(continuação)

Derivados quinolônicos, pirazínicos e tiazolidínicos

Derivados azólicos

(continua)

Tabela 19 – Compostos avaliados frente à cultura de *Xanthomonas albilineans*. (conclusão)

Derivados azólicos
<p>LSPN568 23% inibição</p>	<p>BO719 9% inibição</p>	<p>BO756 24% inibição</p>	<p>BO751 15% inibição</p>
Ésteres
<p>LSPN428 14% inibição</p>	<p>LSPN430 22% inibição</p>	<p>LSPN431 20% inibição</p>
<p>LSPN432 23%</p>	<p>LSPN433 22% inibição</p>	<p>LSPN434 21% inibição</p>
<p>LSPN435 21%</p>	<p>LSPN436 23% inibição</p>	<p>LSPN438 24% inibição</p>	

Fonte: Elaborada pela autora.

Os ensaios de triagem resultaram na identificação de 19 compostos capazes de inibir entre 20% e 40% do crescimento de *X. albilineans* (destacados em laranja na Tabela 19) e dois compostos capazes de inibir mais do que 50% do crescimento bacteriano (destacados em verde na Tabela 19). Estes compostos, identificados como **THP2** e **LSPN502**, inibiram 100% e 70%, respectivamente, do crescimento de *X. albilineans* nas maiores concentrações testadas.

O composto **THP2** foi submetido a novos ensaios para a determinação da concentração capaz de inibir 50% do crescimento de *X. albilineans*, EC_{50} . Este composto, quimicamente conhecido como 2-(1-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il) etilidieno) hidrazina-1-carbotioamida, corresponde à biomolécula identificada como CHEMBL1993778, para a qual diversas atividades biológicas já foram reportadas, dentre as quais inibição do crescimento de *Plasmodium falciparum* ($EC_{50} = 0,83 \mu M$) e atividade agonista da esfingofosfatase humana

($EC_{50} = 12 \mu M$).¹⁰⁵ Dentre os inibidores identificados através do ensaio fenotípico, o derivado cumarínico **THP2** apresentou a maior potência, com valor de EC_{50} igual a $23 \mu M \pm 2$ (Figura 59).

Figura 59 - Ensaio fenotípicos de inibição do crescimento de *X. albilineans*. **A**, estrutura 2D do composto THP2 e curvas de crescimento de *X. albilineans* na presença de concentrações variáveis de THP2. **B**, Curva de concentração – resposta para a determinação do valor de EC_{50} para o composto THP2.

Fonte: Elaborada pela autora.

Além da triagem de compostos, o ensaio fenotípico também pode ser explorado para investigar a potência de compostos identificados como inibidores de alvos moleculares essenciais à *X. albilineans*. Com esse intuito, os fragmentos identificados por BLI como ligantes de XaFold (Seção 6.3.2) foram submetidos ao ensaio fenotípico. Os três fragmentos testados, identificados como *hit 1*, *hit 2* e *hit 3*, apresentaram inibição do crescimento bacteriano igual a 15%, 88% e 17%, respectivamente, quando avaliados a 2 mM (Figura 60).

Figura 60 - Ensaio fenotípico de inibição do crescimento de *X. albilineans*. **A**, estrutura 2D e curvas de crescimento na presença do *hit 1*. **B**, estrutura 2D e curvas de crescimento na presença do *hit 2*. **C**, estrutura 2D e curvas de crescimento na presença do *hit 3*.

Fonte: Elaborada pela autora.

CAPÍTULO 8

Conclusões e Perspectivas

8 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

8.1 Conclusões

A escaldadura das folhas é uma das principais doenças que acomete a cana-de-açúcar, a principal fonte renovável da matriz energética brasileira e um dos principais produtos de exportação do agronegócio. O impacto econômico dessa doença associado à ausência de tratamento incentiva a pesquisa de moléculas bioativas e o desenvolvimento de compostos líderes candidatos a novos agroquímicos. Nesse sentido, as enzimas da via de biossíntese de folatos são potenciais alvos moleculares para o desenvolvimento de antibióticos. Inicialmente, três enzimas da via de biossíntese de folatos foram selecionadas para caracterização: *i.* di-hidrofolato sintase (*XaFolC*); *ii.* N^5 , N^{10} -metilenotetrahydrofolato desidrogenase ciclohidrolase (*XaFolD*) e *iii.* GTP-ciclohidrolase (*XaFolE*).

As três enzimas selecionadas foram clonadas em vetores pET e a expressão heteróloga foi avaliada para a priorização de alvos moleculares para caracterização. Nessa etapa, baixa quantidade das proteínas *XaFolC* e *XaFolE* foram expressas na fração solúvel. Para a *XaFolE* foi estabelecido um protocolo de purificação, porém não foram realizados ensaios posteriores devido ao baixo rendimento da proteína purificada, igual a 0,28 mg por litro de expressão. Em contrapartida, a enzima *XaFolD* foi expressa em grandes quantidades (60 mg/L) e por isso priorizada para caracterização estrutural e funcional.

A expressão heteróloga e purificação da *XaFolD* resultaram na produção de proteína funcional e adequada aos ensaios cinéticos e de cristalização. A *XaFolD* é bifuncional, e catalisa a conversão do N^5 , N^{10} -metileno-tetrahydrofolato ao intermediário N^5 , N^{10} -metenil-tetrahydrofolato em uma etapa dependente de $NADP^+$. A segunda etapa da reação consiste na conversão do N^5 , N^{10} -metenil-tetrahydrofolato ao produto final N^{10} -formil-tetrahydrofolato. Após a otimização do ensaio cinético para a *XaFolD*, as atividades desidrogenase e ciclohidrolase foram caracterizadas. Os valores determinados de K_M para o N^5 , N^{10} -metileno-tetrahydrofolato, $NADP^+$ e N^5 , N^{10} -metenil-tetrahydrofolato iguais a 50 ± 10 , 688 ± 81 e 32 ± 3 μM , respectivamente.

Experimentos de cristalização, coleta e processamento de dados resultaram na determinação da estrutura de *XaFolD* a 2,1 Å de resolução. A substituição molecular não foi um processo trivial devido às características estruturais da *XaFolD*, cristalizada na ausência do cofator $NADP^+$. A orientação dos domínios da *XaFolD* na forma apo difere em reação à orientação observada para a *FolD* de outras espécies, seja na forma apo ou em complexo com

o cofator. Para a resolução da estrutura por substituição molecular foram empregadas diferentes estratégias para a recuperação das fases iniciais utilizando como molde a FOLD de *E. coli*. Ao final do processo um modelo satisfatório de XaFOLD foi construído. A análise estrutural revelou uma proteína constituída por 11 hélices alfa e 9 fitas beta distribuídas em um domínio N-terminal catalítico e um domínio C-terminal de ligação ao dinucleotídeo. Os resíduos do sítio catalítico da XaFOLD são bastante conservados. Porém, há diferenças na porção mais exposta do sítio, as quais podem ser exploradas para o planejamento de inibidores. Na XaFOLD, a hélice C-terminal localizada na região inter-domínios e a alça que a antecede, dando acesso ao sítio catalítico, estão em uma orientação diferente da observada na FOLD das demais espécies.

Para explorar as mudanças conformacionais induzidas pela ligação do cofator à XaFOLD foram conduzidos ensaios de co-cristalização. No entanto, os *hits* de cristalização obtidos não apresentaram difração adequada para a coleta de dados e resolução da estrutura. A comparação da XaFOLD com a FOLD de outras espécies sugere que a substituição dos resíduos arginina e serina pelos resíduos V176 e K200, respectivamente, são responsáveis pela drástica redução da afinidade da XaFOLD pelo NADP⁺.

Além da caracterização estrutural e funcional da enzima, conduzida em sua maioria na Universidade de São Paulo, ensaios de triagem de fragmentos por interferometria de biocamada (BLI) foram realizados durante o período de estágio em pesquisa realizado na Universidade de Dundee, UK. A triagem de 1.124 fragmentos usando BLI revelou 92 ligantes, dentre os quais três foram selecionados para aquisição e caracterização biofísica: *i.* 1-ciclo-hexil-3-piridin-3-il-metil-ureia (*hit 1*); *ii.* ácido 2-(3-fluoro-fenil) propanoico (*hit 2*) e *iii.* 3-(2-amino-etil)-1-metil-2,4(1H, 3H)-quinazolilediona (*hit 3*). Os valores determinados de K_D para os hits **1**, **2** e **3** foram iguais a 260 μ M, 3 mM e 210 μ M, respectivamente. Ensaios de concentração-resposta realizados para os *hits 2* e **3** indicaram que o *hit 2* inibe 32% da atividade ciclohidrolase a 2 mM, enquanto o *hit 3* não inibe a atividade ciclohidrolase. Apesar do *hit 3* não ser um inibidor, ensaios de BLI indicam a ligação deste fragmento à XaFOLD com alta afinidade, sugerindo que a ligação do *hit 3* ocorre no sítio ativo C-terminal. Assim, o *hit 3* pode ser utilizado como aditivo de cristalização em trabalhos futuros com esse alvo molecular, com o objetivo de diminuir a flexibilidade inter-domínios e favorecer a cristalização de complexos de XaFOLD. Adicionalmente, os fragmentos *hit 1*, *hit 2* e *hit 3* foram avaliados quanto à capacidade de inibir o crescimento de *X. albilineans*, e apresentaram inibição igual a 15%, 88% e 17%, respectivamente, quando testados a 2 mM.

Além da triagem de fragmentos por BLI, 74.163 estruturas provenientes de três bancos de dados foram submetidas à triagem virtual para identificação de compostos candidatos a

ligantes da XaFold. Ao final da triagem virtual, 31 compostos foram selecionados para aquisição e ensaio de potência. Espera-se, após a avaliação experimental dos compostos selecionados a partir da triagem virtual, estabelecer estudos de relação estrutura atividade que contribuam para a descoberta inibidores da XaFold. Por fim, o ensaio fenotípico frente à cultura de *X. albilineans*, realizado em paralelo aos ensaios de caracterização do alvo molecular, resultou na descoberta do inibidor **THP2** (EC_{50} igual a $23 \pm 2 \mu\text{M}$).

Em suma, durante o doutoramento estratégias moleculares e celulares para a triagem de moléculas bioativas foram exploradas, buscando-se ligantes candidatos a compostos líderes para o tratamento da escaldadura das folhas.

8.2 Perspectivas

A potência do fragmento 1-ciclo-hexil-3-piridin-3-il-metil-ureia (*hit 1*) selecionado a partir da triagem de fragmentos será avaliada por ensaios de inibição da atividade ciclohidrolase da XaFold, assim como os compostos selecionados a partir da triagem virtual. Espera-se, com a avaliação experimental desses compostos, estabelecer estudos de relação estrutura atividade que contribuam para a descoberta de inibidores da XaFold. Além disso, ensaios de inibição do crescimento de *X. albilineans* serão realizados para os inibidores de XaFold identificados a partir da triagem virtual.

REFERÊNCIAS

- 1 BRUNDTLAND, G. H. Our Common Future: Report of the World Commission on Environment and Development. **United Nations Commission**, v. 4, n. 1, p. 300, 1987.
- 2 UNITED NATIONS. **Sustainable energy for all: a global action agenda**. 2012. 32p. Disponível em <<http://www.se4all.org/sites/default/files/1/2014/01/SEFA-Action-Agenda-Final.pdf>>. Acesso em: 18 dez. 2017.
- 3 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano nacional de agroenergia 2006-2011**. 2ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 110p.
- 4 BRASIL. Empresa de Pesquisa Energética. **Balanco energético nacional 2017: ano base 2016**. Rio de Janeiro, 2017. 182p.
- 5 SOUSA, E. L. L. de; MACEDO, I. de C. **Etanol e bioeletricidade: a cana-de-açúcar no futuro da matriz energética**. São Paulo: Luc Projetos de Comunicação, 2010. 315p.
- 6 BRASIL, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar: safra 2017/2018**. 3ed. Brasília, 2017. 81p.
- 7 GLOBAL Ethanol Production. 2016: alternative fuels data center. Disponível em: <<https://www.afdc.energy.gov/data/10331>>. Acesso em: 10 nov. 2017.
- 8 INTERNATIONAL Energy Statistics. Energy Information Administration. 2017. Disponível em: <<https://www.eia.gov/beta/international/rankings/#?iso=BRA&cy=2016iso=BRA>> Acesso em: 28 jan. 2018.
- 9 SOUZA, G. M. et al. **Bioenergy & sustainability: bridging the gaps**. São Paulo: Scientific Committee on Problems of the Environment (SCOPE), 2015. 779p.
- 10 DELANEY, J. et al. Modern agrochemical research: a missed opportunity for drug discovery? **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 17-18, p. 839-845, 2006.
- 11 LAMBERTH, C. et al. Current challenges and trends in the discovery of agrochemicals. **Science**, v. 341, n. 6147, p. 742-6, 2013.
- 12 MCDUGALL, P. **Agrochemical research and development: the cost of new product discovery, development and registration, industry R&D expenditure in 2014 and expectations for 2019**. 2016. Disponível em: <http://www.ecpa.eu/reports_infographics/agrochemical-research-and-development-rd-report-2016>. Acesso em: 5 jan. 2018.
- 13 LOSO, M. R. et al. Lead generation in crop protection research: a portfolio approach to agrochemical discovery. **Pest Management Science**, v. 73, n. 4, p. 678-685, 2017.
- 14 TRÖSKEN, E. R. et al. Comparative assessment of the inhibition of recombinant human CYP19 (aromatase) by azoles used in agriculture and as drugs for humans. **Endocrine Research**, v. 30, n. 3, p. 387-394, 2004.
- 15 TICE, C. M. Selecting the right compounds for screening: does Lipinski's Rule of 5 for pharmaceuticals apply to agrochemicals? **Pest Management Science**, v. 57, n. 1, p. 3-16, 2001.

- 16 JESCHKE, P. The unique role of halogen substituents in the design of modern crop protection compounds. In: _____ **Modern methods in crop protection research**. New York: John Wiley, 2013. cap. 4, p. 73-128.
- 17 CENTRO de Tecnologia Canavieira. **Pragas e doenças da cana-de-açúcar**: 'Roguing'. São Paulo: CTC, 2013, 56p.
- 18 ROSETTO, R.; SANTIAGO, A. D. **Doenças da cana de açúcar**. Disponível em < http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_55_711200516718.html > Acesso: 12 dez. 2017.
- 19 SANTOS, F.; BORÉM, A. **Cana-de-açúcar**: do plantio à colheita. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2013. 257p.
- 20 BIRCH, G.; KONG, H. Pathogen profile *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach. **Molecular Plant Pathology**, v. 2, n. 1, p. 1-11, 2001.
- 21 DAVIS, M. J. et al. Intraspecific genomic variation within *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. **Phytopathology**, v. 87, n. 3, p. 316-324, 1997.
- 22 CASAGRANDE, M. V.; SANGUINO, A.; FERREZINI, E. Evolução, prejuízos e métodos de controle de quatro importantes doenças da cana-de-açúcar. **Seminário de Tecnologia Agrônômica**, v. 7, p. 183-190, 1997.
- 23 *XANTHOMONAS albilineans* (leaf scald of sugarcane). Invasive species compendium. Disponível em: <<https://www.cabi.org/isc/datasheet/56901>>. Acesso em: 10 jan. 2018.
- 24 PIERETTI, I. et al. What makes *Xanthomonas albilineans* unique amongst xanthomonads? **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1-7, 2015. doi: 10.3389/fpls.2015.00289.
- 25 PIERETTI, I. et al. Genomic insights into strategies used by *Xanthomonas albilineans* with its reduced artillery to spread within sugarcane xylem vessels. **BMC Genomics**, v. 13, p. 658, 2012.
- 26 MENSI, I. et al. Breaking dogmas: the plant vascular pathogen *Xanthomonas albilineans* is able to invade non-vascular tissues despite its reduced genome. **Open Biology**, v. 4, n. 2, p. 130116-130116, 2014.
- 27 HASHIMI, S. M. et al. The phytotoxin albicidin is a novel inhibitor of DNA gyrase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 181-187, 2007.
- 28 BIRCH, R. G.; PATIL, S. S. Preliminary characterization of an antibiotic produced by *Xanthomonas albilineans* which inhibits DNA synthesis in *Escherichia coli*. **Journal of General Microbiology**, v. 131, n. 1985, p. 1069-1075, 1985.
- 29 COCIANCICH, S. et al. The gyrase inhibitor albicidin consists of p-aminobenzoic acids and cyanoalanine. **Nature Chemical Biology**, v. 11, n. 3, p. 195-197, 2015.
- 30 ROTT, P. **White streaks and necrosis caused by *Xanthomonas albilineans* on a sugarcane leaf**. 2014. Disponível em: <http://www.cirad.fr/en/our-research/research-results/2014/a-new-infection-mechanism-has-been-discovered-in-the-sugarcane-leaf-scald-bacterium>. Acesso em: 8 jan. 2018.
- 31 BAUDIN, P. **Leaf scald on a sugarcane plant**. 2011. Disponível em:

<http://www.cirad.fr/en/our-research/research-results/2010/xanthomonas-albilineans-a-small-but-sturdy-genome>. Acesso em: 8 jan. 2018.

32 SILVA, M. D. S. E. et al. Caracterização molecular e patogênica de isolados de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, agente causal da escaldadura das folhas da cana-de-açúcar. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 4, p. 341-347, 2007.

33 DABBAS, K. M. et al. Genes diferencialmente expressos em cana-de-açúcar inoculada com *Xanthomonas albilineans*, o agente causal da escaldadura da folha. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 4, p. 328-338, 2006.

34 BERMINGHAM, A.; DERRICK, J. P. The folic acid biosynthesis pathway in bacteria: Evaluation of potential for antibacterial drug discovery. **BioEssays**, v. 24, n. 7, p. 637-648, 2002.

35 BOURNE, C. Utility of the biosynthetic folate pathway for targets in antimicrobial discovery. **Antibiotics**, v. 3, n. 1, p. 1-28, 2014.

36 STOVER, P. J. One-carbon metabolism in folated associated pathologies. **Journal of Nutrition**, v.139, n.12, p. 2402-2405, 2009.

37 LUCOCK, M. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 71, n. 1-2, p. 121-138, 2000.

38 ANDERSON, A. C.; WRIGHT, D. L. Antifolate agents: a patent review (2010 - 2013). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 24, n. 6, p. 687-697, 2014.

39 HOPKINS, A. L. Network pharmacology: The next paradigm in drug discovery. **Nature Chemical Biology**, v. 4, n. 11, p. 682-690, 2008.

40 CHEUNG, E. et al. Purification, crystallization, and preliminary x-ray studies of a bifunctional 5,10-methenyl/methylene-tetrahydrofolate cyclohydrolase/dehydrogenase from *Escherichia coli*. **Proteins**, v. 27, n. 2, p. 322-324, 1997.

41 EADSFORTH, T. C. et al. Assessment of *Pseudomonas aeruginosa* N5,N10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase - cyclohydrolase as a potential antibacterial drug target. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35973, 2012.

42 MONTFORT, W. R. et al. Structure, multiple site binding, and segmental accommodation in thymidylate synthase on binding dUMP and an anti-folate. **Biochemistry**, v. 29, n. 30, p. 6964-6977, 1990.

43 KOBAYASHI, K. et al. Essential *Bacillus subtilis* genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 8, p. 4678-4683, 2003.

44 BABA, T. et al. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. **Molecular Systems Biology**, v. 2, p. 2006-2008, 2006.

45 GALLAGHER, L. a et al. A comprehensive transposon mutant library of *Francisella novicida*, a bioweapon surrogate. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 3, p. 1009-1014, 2007.

46 DE BERARDINIS, V. et al. A complete collection of single-gene deletion mutants of *Acinetobacter baylyi* ADP1. **Molecular Systems Biology**, v. 4, n. 174, p. 174, 2008.

- 47 EADSFORTH, T. C., MALUF, F. V.; HUNTER, W. N. Acinetobacter baumannii F_{olD} ligand complexes: potent inhibitors of folate metabolism and a re-evaluation of the structure of LY374571. **FEBS Journal**, v. 279, n. 23, p. 4350-4360, 2012.
- 48 EADSFORTH, T. C. et al. Assessment of Pseudomonas aeruginosa N⁵,N¹⁰-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-cyclohydrolase as a potential antibacterial drug target. **PloS One**, v. 7, n. 4, p. e35973, 2012.
- 49 MATHIEU, M. et al. Escherichia coli F_{olC} structure reveals an unexpected dihydrofolate binding site providing an attractive target for anti-microbial therapy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 19, p. 18916-22, 2005.
- 50 SHENG, Y. et al. Mutation of an essential glutamate residue in folypolyglutamate synthetase and activation of the enzyme by pterate binding. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 402, n. 1, p. 94-103, 2002.
- 51 SHENG, Y. et al. Mutagenesis of folypolyglutamate synthetase indicates that dihydropterate and tetrahydrofolate bind to the same site. **Biochemistry**, v. 47, n. 8, p. 2388-2396, 2008.
- 52 BURGER, A. et al. Analysis of a Streptomyces coelicolor A3(2) locus containing the nucleoside diphosphate kinase (ndk) and folypolyglutamate synthetase (folC) genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 159, n. 2, p. 283-291, 1998.
- 53 FUSSENEGGER, M.; MEYER, T. F. Cloning and characterization of the Neisseria gonorrhoeae MS11 folC gene. **Molecular and General Genetics**, v. 250, n. 3, p. 277-285, 1996.
- 54 PYNE, C.; BOGNAR, A. L. Replacement of the folC gene, encoding folypolyglutamate synthetase- dihydrofolate synthetase in Escherichia coli, with genes mutagenized in vitro. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 6, p. 1750-1759, 1992.
- 55 REBELO, J. et al. Biosynthesis of pteridines: reaction mechanism of GTP cyclohydrolase I. **Journal of Molecular Biology**, v. 326, n. 2, p. 503-516, 2003.
- 56 SANKARAN, B. et al. Zinc-independent folate biosynthesis: genetic, biochemical, and structural investigations reveal new metal dependence for GTP cyclohydrolase IB. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 22, p. 6936-6949, 2009.
- 57 TANAKA, Y. et al. Novel reaction mechanism of GTP cyclohydrolase I: high-resolution X-ray crystallography of Thermus thermophilus HB8 enzyme complexed with a transition state analogue, the 8-oxoguanine derivative. **Journal of Biochemistry**, v. 138, n. 3, p. 263-275, 2005.
- 58 DYE, W. D. The inadequacy of the usual determinative tests for the identification of Xanthomonas spp. **New Zealand Journal of Science**, v. 5, n.4, p. 393-416, 1962.
- 59 DAVIS, M. J. et al. Evaluation of selective media and immunoassays for detection of xanthomonas albilineans, causal agent of sugarcane leaf scald disease. **Plant Disease**, v. 78, n. 1, p. 78-82, 1994.
- 60 TARDIANI, A. C. et al. Molecular and pathogenic diversity among brazilian isolates of Xanthomonas albilineans assessed with SSR marker loci. **Plant Disease**, v. 98, n. 4, p. 540-546, 2014.

- 61 WILSON, K. Preparation of genomic DNA from bacteria. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. chapter 2, n. 2001, p. unit 2.3, 2001. doi: 10.1002/0471142727.mb0204s56.
- 62 ASLANIDIS, C.; DE JONG, P. J. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 20, p. 6069-74, 1990.
- 63 INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, v. 96, n. 1, p. 23-8, 1990.
- 64 STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. **Protein Expression and Purification**, v. 41, n. 1, p. 207-34, 2005.
- 65 BRÖNNIMANN, C. et al. Continuous sample rotation data collection for protein crystallography with the PILATUS detector. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section A**, v. 510, n. 1-2, p. 24-28, 2003.
- 66 KABSCH, W. XDS. **Acta Crystallographica Section D**, v. 66, n. 2, p. 125-132, 2010.
- 67 KABSCH, W. Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. **Acta Crystallographica Section D**, v. 66, n. 2, p. 133-144, 2010.
- 68 EVANS, P. R. An introduction to data reduction: Space-group determination, scaling and intensity statistics. **Acta Crystallographica Section D**, v. 67, n. 4, p. 282-292, 2011.
- 69 EVANS, P. Scaling and assessment of data quality. **Acta Crystallographica Section D**, v. 62, n. 1, p. 72-82, 2006.
- 70 SHEN, B. W. et al. The crystal structure of a bacterial, bifunctional 5,10 methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase. **Protein Science**, v. 8, n. 6, p. 1342-1349, 1999.
- 71 KANTARDJIEFF, K. a; RUPP, B. Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals. **Protein Science**, v. 12, n. 9, p. 1865-1871, 2003.
- 72 MCCOY, A. J. et al. Phaser crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, n. 4, p. 658-674, 2007.
- 73 THORN, A.; SHELDRICK, G. M. Extending molecular-replacement solutions with SHELXE. **Acta Crystallographica Section D**, v. 69, n. 11, p. 2251-2256, 2013.
- 74 COWTAN, K. The Buccaneer software for automated model building. 1. Tracing protein chains. **Acta Crystallographica Section D**, v. 62, n. 9, p. 1002-1011, 2006.
- 75 COWTAN, K. Fitting molecular fragments into electron density. **Acta Crystallographica Section D**, v. 64, n. 1, p. 83-89, 2007.
- 76 MURSHUDOV, G. N. et al. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. **Acta Crystallographica Section D**, v. 67, n. 4, p. 355-367, 2011.
- 77 URASHIMA, A. S.; ZAVAGLIA, A. C. Comparação de dois métodos diagnósticos de escaldadura-das-folhas (*Xanthomonas albilineans*) da cana-de-açúcar. **Summa Phytopathologica**, v. 38, p. 155-158, 2012.
- 78 COMSTOCK, J. C. Using tissue blot immunoassay, ELISA, and isolation techniques. **Plant**

Disease, v. 76, n. 10, p. 1033, 1992.

79 PAN, Y. B. et al. Development of polymerase chain reaction primers highly specific for *Xanthomonas albilineans*, the causal bacterium of sugarcane leaf scald disease. **Plant Disease**, v. 83, n. 3, p. 218-222, 1999.

80 JAUFEEERSLLY-FAKIM, Y.; DOOKUN, a. Extraction of high quality dna from polysaccharides-secreting *Xanthomonads*. **Science and Technology**, v. 6, p. 33-40, 2000.

81 HANNIG, G.; MAKRIDES, S. C. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 54-60, 1998.

82 BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 411-421, 1999.

83 EMBL Laboratory. **Choice of vector**. Disponível em: <http://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/cloning/choice_vector/ecoli/vectorfeatures/>. Acesso em: 04 out. 2017.

84 BIRD, L. E. High throughput construction and small scale expression screening of multi-tag vectors in *Escherichia coli*. **Methods**, v. 55, n. 1, p. 29-37, 2011.

85 VINCENTELLI, R. et al. High-throughput protein expression screening and purification in *Escherichia coli*. **Methods**, v. 55, n. 1, p. 65-72, 2011.

86 EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: Model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica Section D**, v. 60, n. 12 i, p. 2126-2132, 2004.

87 EADSFORTH, T. C. et al. Characterization of 2,4-diamino-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl ureido based inhibitors of *Trypanosoma brucei* FOLD and testing for antiparasitic activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 20, p. 7938-7948, 2015.

88 SCHMIDT, A. et al. Structures of three inhibitor complexes provide insight into the reaction mechanism of the human methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase. **Biochemistry**, v. 39, n. 21, p. 6325-6335, 2000.

89 KYTE, J.; DOOLITTLE, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **Journal of Molecular Biology**, v. 157, n. 1, p. 105-132, 1982.

90 PAWELEK, P. D. et al. Channeling efficiency in the bifunctional methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase domain: the effects of site-directed mutagenesis of NADP binding residues. **Biochimica et Biophysica Acta: protein structure and molecular enzymology**, v. 1479, n. 1-2, p. 59-68, 2000.

91 NOTREDAME, C.; HIGGINS, D. G.; HERINGA, J. T-coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. **Journal of Molecular Biology**, v. 302, n. 1, p. 205-217, 2000.

92 WATERHOUSE, A. M. et al. Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1189-1191, 2009.

93 BLI Technology. Califórnia, 2017. FORTÉBIO. Disponível em: <<https://www.fortebio.com/bli-technology.html>>. Acesso em: 14 abr. 2017.

- 94 BAYER, E. A.; MEIR, W. Protein biotinylation. **Methods in Enzymology**, v. 184, n. 1976, p. 138-160, 1990.
- 95 LI, Y.; SOUSA, R. Expression and purification of E. coli BirA biotin ligase for in vitro biotinylation. **Protein Expression and Purification**, v. 82, n. 1, p. 162-167, 2012.
- 96 CHAPMAN-SMITH, A.; CRONAN, J. E. In vivo enzymatic protein biotinylation. **Biomolecular Engineering**, v. 16, n. 1-4, p. 119-125, 1999.
- 97 TOBIAS, R. Biomolecular binding kinetics assays on the Octet Platform. **ForteBio Interactions**, Pall Life Sciences, v. 1, p. 2-22, 2013.
- 98 FANG, Y. Ligand–receptor interaction platforms and their applications for drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 7, n. 10, p. 969-988, 2012.
- 99 HOLDGATE, G. A.; GILL, A. L. Kinetic efficiency: the missing metric for enhancing compound quality? **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 21-22, p. 910-913, 2011.
- 100 VELAZQUEZ-CAMPOY, A. et al. Isothermal titration calorimetry. **Current Protocols in Cell Biology**, p. 1781-17824, 2004.
- 101 LESKOVAC, V. E. K. Linear inhibition. **Comprehensive Enzyme Kinetics**, p. 73-86, 2003.
- 102 KLEBE, G. Applying thermodynamic profiling in lead finding and optimization. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 95-110, 2015.
- 103 CHEMBL Database. Flurbiprofen. 2018. Disponível em: <<https://www.ebi.ac.uk/chembl/compound/inspect/CHEMBL563>>. Acesso em: 6 jan. 2018.
- 104 CHEMBL Database. CHEMBL1871337. 2018. Disponível em: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/compound/inspect/CHEMBL1871337>. Acesso em: 6 jan. 2018.
- 105 CHEMBL Database. CHEMBL1993778. 2018. Disponível em: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/compound/inspect/CHEMBL1993778>. Acesso em: 18 jan. 2018.

APÊNDICE I

B	mol	BLI_Response	Rank	MW	drugLikeness	RotB	HBA	HBD	ord	cl
DDD00103635		0.1257	8	241.1	0.8961	3	3	3	1	1
DDD00103338		0.0857	27	215.1	0.5028	2	3	3	2	1
DDD00122069		0.0725	44	192.1	0.1359	3	2	3	3	1
DDD00072751		0.0968	17	247.1	1.209	4	4	4	4	1
DDD00808259		0.2234	1	219.1	0.5562	2	5	2	5	1
DDD00070359		0.0752	41	224.1	-0.3007	2	2	2	6	1
DDD00100784		0.1503	6	233.2	0.5365	5	3	2	7	2

B	mol	BL_Response	Rank	MW	drugLikeness	RotB	HBA	HBD	ord	cl
DD000025616		0.0896	25	225.1	0.9211	1	3	2	8	2
DD001512407		0.0886	26	228.1	0.5047	4	4	2	9	2
DD000086019		0.0767	38	184.1	-0.6347	3	1	1	10	2
DD000100601		0.1671	4	198.1	0.2063	3	2	1	11	2
DD000100593		0.0899	24	198.1	-0.1413	3	2	1	12	2
DD000100649		0.0933	20	198.1	-0.1007	3	2	1	13	2
DD000100389		0.0748	43	199.1	-1.072	2	4	1	14	2

B	mol	BLI_Response	Rank	MW	drugLikeness	RotB	HBA	HBD	ord	cl
DD000100387		0.0718	47	185.1	-1.219	2	2	1	15	2
DD000100592		0.0716	49	185.1	-0.4822	2	2	1	16	2
DD000001120		0.1501	7	144.1	-1.178	0	1	2	17	2
DD000309055		0.081	31	144.1	-0.9341	0	1	2	18	2
DD000771428		0.07	50	122.1	-0.5264	2	2	2	19	2
DD000086483		0.0952	18	239.1	-0.8429	2	2	1	20	2
DD000100640		0.1075	11	204.1	-0.05313	3	3	1	21	2

B	mol	BLI_Response	Rank	MW	drugLikeness	RotB	HBA	HBD	ord	cl
DD000122014		0.0716	48	240.1	-0.1797	2	3	0	22	3
DD000103752		0.1056	12	252.1	-0.05369	3	3	0	23	3
DD001512353		0.0841	29	216.1	-0.1752	2	3	0	24	3
DD001008877		0.0773	37	267.1	0.5601	4	3	1	25	3
DD000121999		0.1804	3	229.1	-0.11	2	3	1	26	3
DD001008829		0.0851	28	288.1	-0.3717	3	6	0	27	3
DD000805763		0.0814	30	268.1	0.2887	4	6	0	28	3

B	mol	BLI_Response	Rank	MW	drugLikeness	RotB	HBA	HBD	ord	cl
DD000100312		0.0749	42	252.1	0.6035	3	4	1	29	3
DD001008805		0.0762	40	204.1	-0.1306	3	3	2	30	3
DD001085543		0.1049	13	226.1	-0.6608	2	6	2	31	3
DD000957472		0.0792	33	157.1	-0.6495	3	3	1	32	3
DD001085499		0.0907	21	260.2	0.4757	2	4	2	33	4
DD001008885		0.0776	36	208.1	-0.5619	0	3	1	34	4
DD001008788		0.1031	14	194.1	-0.3449	1	4	2	35	4

B	mol	BL_Response	Rank	MW	drugLikeness	RotB	HBA	HBD	ord	cl
DD000175997		0.1508	5	135.1	-1.563	0	1	1	36	5
DD000771453		0.0787	35	179.1	-1.027	1	2	1	37	5
DD001269650		0.0725	45	249.2	0.1399	2	5	1	38	6
DD001269620		0.0973	16	222.1	-0.05913	1	6	2	39	6
DD001008787		0.0937	19	152.1	-0.7151	1	3	1	40	6
DD000103423		0.0998	15	151.1	-0.9879	0	2	1	41	6
DD000108566		0.0789	34	175.1	-0.8831	2	4	2	42	7

B	mol	BLI_Response	Rank	MW	drugLikeness	RotB	HBA	HBD	ord	cl
DDD00061770		0.0904	23	193	-0.9694	1	1	3	43	8
DDD01012349		0.0763	39	243	-0.7926	2	8	0	44	9
DDD00100556		0.0798	32	224.9	-1.038	1	5	2	45	9
DDD00095351		0.1092	10	204	-1.124	3	3	1	46	10
DDD01305586		0.2028	2	168.1	0.3306	2	3	1	47	10
DDD00771485		0.0904	22	158	-1.829	1	3	1	48	10
DDD01305716		0.1101	9	144.1	-1.202	2	4	1	49	11

B	mol	BU_Response	Rank	MW	drugLikeness	RotB	HBA	HBD	ord	cl
DD000957469		0.0719	46	158.1	-1.189	4	4	0	50	12