UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

RAPHAEL MENEGHELLO

Busca e caracterização de inibidores da enzima DacA de
Staphylococcus aureus

São Carlos
2016

RAPHAEL MENEGHELLO

Busca e caracterização de inibidores da enzima DacA de
Staphylococcus aureus

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Física do Instituto de
Física de São Carlos da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular

Orientador: Prof. Dr. Marcos Vicente de
Albuquerque Salles Navarro

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2016

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

Ficha catalográfica revisada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Meneghello, Raphael
Busca e caracterização de inibidores da enzima
DacA de *Staphylococcus aureus* / Raphael Meneghello;
orientador Marcos Vicente de Albuquerque Salles
Navarro - versão corrigida -- São Carlos, 2016.
127 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São
Carlos, Universidade de São Paulo, 2016.

1. Diadenilato ciclase. 2. *Staphylococcus aureus*.
3. Busca de inibidores. I. Navarro, Marcos Vicente
de Albuquerque Salles, orient. II. Título.

*Aqueles que sempre estiveram,
estão e estarão ao meu lado, meus pais e irmão.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus amigos de graduação, Mari, Hernan, Erica, Larissa, Anna, Amanda, Carol, Rubinho e Zé, pelas horas infinitas de estudos, pelas risadas, pelas aniversários sempre festivos e acompanhados de boas gordices, mas principalmente pela amizade e pela família que vocês se tornaram para mim, são pessoas que levarei para vida toda...

Aos amigos de pós-graduação, Carla, Helô, Aninha, Sinara, Ton, Nai e Gabriel, pelas ajudas, pelas discussões e claro, pelos almoços no bandeirão sempre mais alegres, divertidos e engraçados...

À Nathy e ao Helton, aqueles que me ajudaram incondicionalmente, desde o começo, e me fizeram o profissional que sou hoje. Vocês sempre serão inspirações para mim...

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Navarro, pela oportunidade de trabalhar junto, pelas lições científicas, pelo conhecimento compartilhado e pelas conversas sempre construtivas...

Ao Dr. Artur Cordeiro, que colaborou com grande parte desse projeto, disponibilizando seu laboratório e principalmente pela curiosidade e interesse em discutir sobre ciência...

A todos os professores que passaram pela minha vida e me ensinaram, sempre com a dedicação e amor à profissão. Vocês tornam todas as outras profissões possíveis. Vocês me trouxeram até aqui, e servem de inspiração para continuar. Em especial, aos professores Nilson, o exemplo maior de caráter e comprometimento com o ensino, grande Mestre, ao Wladimir, Cidinha e Fátima, que me instigaram o amor pela ciência com suas aulas sempre muito boas de matemática, física e biologia...

Aos técnicos do laboratório de Biologia Molecular “Sérgio Mascarenhas”, Bel, Andressa, Patrícia e Rafael, pelo auxílio, ajuda e pelas comidas sempre muito gordas...

Ao Instituto de Física de São Carlos, pela ótima estrutura, seja no ensino ou na pesquisa...

À Universidade de São Paulo, pela referência nacional e pela contribuição com crescimento científico do Brasil...

À CAPES pela bolsa concedida, que possibilitou esse projeto...

Ao pessoal do serviço de Graduação e Pós-Graduação do IFSC, Sílvia, Ricardo, Rodrigo e Edvane, pela atenção e dedicação...

Ao pessoal da gráfica e funcionárias da biblioteca do IFSC...

Por último, mas o mais importante, àquelas pessoas que sempre estiveram comigo...

Ao grande amigo, que considero como irmão, Pissardo. Obrigado pelos conselhos, pelas risadas, pelos momentos descontraídos, pela parceria no vôlei, e principalmente pela amizade.

Ao meu irmão, Gabriel, pela amizade, pelas brincadeiras e pelas perguntas que sempre me fez quando estava curioso...

Ao meu tio, Jonas, que sempre me defendeu, que me iniciou na ciência quando me deu um pequeno microscópio de presente, pela inteligência, pelas brincadeiras e pelos livros...

Aos meus avós Jandyrá, João, Elírio e Leonilde e aos meus pais Almir e Janete, que sempre me ajudaram, incentivaram e me fizeram a pessoa que sou. Obrigado pelas broncas, pelos presentes, pelo amor incondicional e pelo exemplo de caráter e boa pessoa, eu devo tudo a vocês e sempre farei o meu melhor por vocês...

*“A ciência sem a religião é manca,
a religião sem a ciência é cega”.
-Albert Einstein.*

RESUMO

MENEGHELLO, R. **Busca e caracterização de inibidores da enzima DacA de *Staphylococcus aureus***. 2016. 127 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Recentemente, uma molécula baseada em nucleotídeos, a adenosina monofosfato dimérica cíclica (c-di-AMP), foi identificada em várias bactérias patogênicas, ganhando rapidamente o status de um sinalizador central no controle de diversos processos bacterianos essenciais, tais como transporte iônico e vigilância a danos no DNA. Em *Staphylococcus aureus*, por exemplo, o c-di-AMP é essencial para homeostase da parede celular e resistência aos estresses ambientais. A biossíntese de c-di-AMP envolve a condensação de duas moléculas de ATP, catalisadas por enzimas que contenham o domínio DAC (diadenilato ciclase). Especialmente em *S. aureus*, somente uma ciclase (DacA) é responsável pela síntese desse segundo-mensageiro, através da enzima DacA. Recentemente, nosso grupo determinou a estrutura da DacA de *S. aureus*, demonstrando a importância do seu estado oligomérico para o mecanismo catalítico. Diferentemente da primeira diadenilato caracterizada, a DisA, uma enzima octamérica, a atividade enzimática da DacA ocorre através do encontro de dois dímeros distintos, formando uma interface cataliticamente competente. Dadas essas características, o foco desse trabalho foi a busca de novos inibidores para a DacA, através de triagens em larga escala (HTS), triagem cristalográfica por fragmentos e docagem molecular. Foram encontrados 30 compostos com atividade inibitória nos ensaios de HTS, 15 compostos derivados de fragmentos da triagem cristalográfica e construída uma biblioteca de 480 compostos docados virtualmente no sítio ativo. Os compostos encontrados na triagem cristalográfica foram caracterizados com respeito ao seu valor de IC₅₀ frente à atividade enzimática. O composto AN-584/43409544 se demonstrou bastante promissor, com valor de IC₅₀ de 54 µM. Ainda, um análogo desse composto foi encontrado na interface dimérica da DacA nos estudos cristalográficos, o que mostra um possível sítio alostérico para o desenvolvimento e busca de inibidores. Os resultados gerados nesse projeto podem servir de base para estudos futuros e desenvolvimento de novos antibióticos, que em combinação com os tratamentos

atualmente disponíveis pode levar ao controle das infecções até mesmo das formas mais resistentes de *S. aureus*.

Palavras-chave: Diadenilato ciclase. *Staphylococcus aureus*. Busca de inibidores.

ABSTRACT

MENEGHELLO, R. **Search and characterization of *Staphylococcus aureus* DacA enzyme inhibitors**. 2016. 127 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Recently, a nucleotide-based molecule, the cyclic dimeric adenosine monophosphate (c-di-AMP), has been identified in several pathogenic bacteria, rapidly gaining the status of a central signaling controlling several essential bacterial processes, such as ion transport and DNA damage surveillance. In *Staphylococcus aureus*, for example, c-di-AMP is essential for homeostasis of the cell wall and resistance to environmental stresses. The biosynthesis of c-di-AMP involves the condensation of two molecules of ATP, catalyzed by enzymes that contain the DAC (diadenylate cyclase) domain. Especially in *S. aureus*, only one cyclase (DacA) is responsible for the synthesis of this second-messenger. Recently, our group determined the structure of the *S. aureus* diadenylate cyclase, demonstrating the importance of their oligomeric state for the catalytic mechanism. Unlike the first characterized diadenylate cyclase, DisA, an octameric enzyme, the enzymatic activity of DacA occurs through the meeting of two different dimers forming a catalytically competent interface. Given these characteristics, the focus of this work was the search for new inhibitors through high-throughput screening (HTS), crystallographic screening of fragments and molecular docking. It was found 30 compounds with inhibitory activity in HTS assays, 15 compounds derived from fragments of crystallographic screening and built a 480 compound library virtually docked in the active site. The compounds found in the crystallographic screening were characterized with respect to its IC₅₀ value. The compound AN-584/43409544 has been shown very promising, with IC₅₀ of 54 µM. Also, an analog of this compound was found in the dimeric interface of DacA in crystallographic assays, which shows a possible allosteric site for inhibitors' search and development. The results generated in this project can serve as a basis for future studies and development of new antibiotics, which in combination with the currently available treatments can lead to infection control even of the most resistant strains of *S. aureus*.

Keywords: Diadenylate Cyclase. *Staphylococcus aureus*. Inhibitors.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Foto de microscopia eletrônica de varredura de *Staphylococcus aureus*. Colorido artificialmente.31
- Figura 2** – (A) Modelo estrutural do octâmero da DisA de *Thermotoga maritima*. Em verde é representada o domínio diadenilato ciclase. Em laranja, os domínio HhH de ligação ao DNA. Na ausência de dano do material genético, a DisA sintetiza c-di-AMP. (B) Representação esquemática do domínio HhH da DisA, responsável pela interação com o DNA. (C) Representação do mapa de densidade eletrônica do c-di-AMP no sítio catalítico da DisA.....33
- Figura 3** – Organização de domínios mais comumente encontrados entre as proteínas contendo o domínio DAC. DacA é associada a 3 hélices transmembranares no N-terminal, DisA possui um domínio Linker e um de ligação de DNA (HhH) no C-terminal e DacB se associa a um domínio YojJ. A arquitetura mais rara de DacC é similar à de DacA, com a inclusão de uma hélice transmembranar seguida de um domínio YbbR.....34
- Figura 4** – Processos que são controlados por nucleotídeos em bactérias.....37
- Figura 5** – Esquema mostrando a reação enzimática de condensação de duas moléculas de ATP formando o c-di-AMP e dois pirofosfatos, e sua degradação por fosfodiesterases em pApA.38
- Figura 6** – Mudanças no ambiente (raios) são potencialmente sentidas por domínios sensores associados à proteína YbbR ou por outros mecanismos ainda não elucidados. Já foi relatado que a YbbR interage com a DacA, levando a um aumento da atividade ciclase de síntese de c-di-AMP. ¹ Alguns receptores de c-di-AMP já foram identificados em organismos como *S. aureus*, *B. subtilis* e *M. smegmatis*, que são o caso dos transportadores de íons KtrA e CpaA e o sistema Kdp. Especialmente em *S. aureus*, a atividade fosfodiesterase da GdpP é afetada pela presença do grupo heme ligado ou não ao óxido nítrico (NO) através do domínio PAS (em verde), regulando a atividade fosfodiesterase do domínio DHH (em

vermelho).⁶ Em *B. subtilis*, há ainda mais duas outras ciclases, a DisA e a DacB, envolvidas na varredura do DNA, detectando ramificações no caso da DisA⁴. A DacB pode estar envolvida no processo de esporulação.⁹ Em *M. smegmatis*, o c-di-AMP é sintetizado pela DisA, e atua no receptor DarR, um fator de transcrição, regulando a homeostase da membrana celular.¹⁰ 40

Figura 7 – (A) Sa_DacA sintetiza c-di-AMP a partir de ATP enquanto que a fosfodiesterase GdpP hidrolisa c-di-AMP para 5'-pApA. Isso resulta em células nativas de *S. aureus* contendo LTA na sua parede celular (representada pela área pêssego) e uma concentração intracelular de c-di-AMP em torno de 2-3µM. (B) Cepas de *S. aureus* incapazes de produzir LTA sobrevivem através da inativação da fosfodiesterase GdpP, resultando em um aumento dos níveis intracelulares de c-di-AMP. Especula-se que nessa concentração mais alta, c-di-AMP interagem com proteínas receptoras específicas, afetando diretamente suas atividades ou a expressão de outras proteínas, compensando, assim, de alguma forma, os defeitos da parede celular causados pela ausência de LTA. 41

Figura 8 – (A) Estrutura dimérica da Sa_DacA resolvida a 2,0 Å. (B) A superfície de um dos protômeros está colorida de acordo com conservação de resíduos na família, destaque para região vermelha escura mostrando o meio-sítio ativo altamente conservado. (C) Estrutura resolvida em complexo com um análogo não hidrolisável de ATP e Mn²⁺ mostram os resíduos responsáveis pelo reconhecimento do substrato e cofator. 42

Figura 9 – A síntese de c-di-AMP é realizada pelo encontro entre dois dímeros de DacA (cinza escuro e cinza claro) para que o sítio ativo (região laranja e amarelo) de cada dímero fique em uma posição face-to-face. Em roxo está destacada a interface dimérica essencial para a reação, uma vez que somente dois monômeros, mesmo que em posições favoráveis, não são capazes de sintetizar o c-di-AMP. A atividade enzimática da DacA é supostamente regulada pela

interação com a YbbR (azul), quando for detectada alguma modificação no ambiente (raios amarelos). Analogamente ao mecanismo proposto para a DisA ⁴ , a interação entre a YbbR e a DacA deve diminuir a produção c-di-AMP.....	43
Figura 10 – Detecção da formação de c-di-AMP através do complexo c-di-AMP e a Coralyne. A formação do complexo impede que o iodo se aproxime da Coralyne e absorva sua fluorescência. Dessa forma, essa proteção feita pelo c-di-AMP possibilita a detecção da fluorescência da Coralyne.....	44
Figura 11 – (A) Estruturas do Bromofenol-TH e outras moléculas análogas. (B) Detecção da fluorescência em tempo real da Coralyne da reação catalizada pela DisA.	45
Figura 12 – Inibição da atividade da DisA pelo bromofenol-TH. Ensaio foi realizado utilizando α - ³² P-ATP e cromatografia em camada delgada para monitorar o progresso da reação enzimática. Reação foi parada após 5 min e foi calculada a porcentagem de c-di-AMP produzido. Dados foram normalizados em função da atividade na ausência do inibidor. IC ₅₀ calculado foi de 56 μ M.	46
Figura 13 – Bromofenol-TH (50 μ M) quando adicionado à solução de DisA (5 μ M) causa uma redução na fluorescência do triptofano presente na proteína. Adição de ATP (até 1 mM) não restaura a intensidade inicial (na ausência do inibidor), indicando que o bromofenol-TH não é um inibidor competitivo.....	46
Figura 14 – Conversão enzimática do 2-amino-6-mercaptopurina ribonucleosídeo (MESG) à ribose-1-fosfato e 2-amino-6-mercaptopurina por purina ribonucleosídeo fosforilase (PNP). A mudança de acompanhamento no máximo de absorção a 360 nm permite a quantificação de fosfato inorgânico (Pi) consumido durante a reação.	57
Figura 15 – O ATP restante da reação enzimática é usado como substrato pela Luciferase para catalisar a mono-oxigenação da luciferina, produzindo um fóton. A luminescência é inversamente proporcional à atividade enzimática.....	59

Figura 16 – Esquema da disposição dos controles e dos testes dos inibidores na placa de 384 poços utilizada nas triagens em larga escala.	62
Figura 17 – (A) Análise em SDS-PAGE- 15% da purificação da DacA: (MM) Padrão massas moleculares (1) Pellet; (2) Sobrenadante; (3) Sobrenadante após passar pela resina de afinidade; (4) Lavagem com tampão 20 mM Tris, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0; (5) Lavagem com tampão 20 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8,0; (6) Eluição da DacA com 10 mL de tampão 20 mM Tris, 300 mM NaCl após clivagem na coluna; (7) Segunda eluição da DacA com 10 mL de tampão 20 mM Tris, 300 mM NaCl; (8) Terceira eluição da DacA com 10 mL de tampão 20 mM Tris, 300 mM NaCl; (9) Eluição da fusão SUMO com 20mL de tampão 20 mM Tris, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH 8,0. (B) Cromatograma da gel filtração usando a coluna HiLoad 16/600 Superdex75 (GE Healthcare).	70
Figura 18 – Relação padrão entre concentração de pirofosfato e absorbância a 360 nm.....	71
Figura 19 – Relação linear entre concentração enzimática de DacA e velocidade de reação de síntese de c-di-AMP.....	71
Figura 20 – (A) Curva de cinética enzimática da enzima DacA. O valor de K_m obtido foi de 28 μM com velocidade máxima de 96,94 $\mu M/s$. (B) Gráfico de Lineweaver-Burk (duplo-recíproco) . A reta mostrada foi contruida com base nos dados de K_M e $V_{m\acute{a}x}$ obtidos na regressão não-linear do primeiro gráfico, uma vez que a transformação dos valores para os respectivos recíprocos distorcem o erro, razão pela qual não foi feita a regressão linear utilizando somente os dados recíprocos.	72
Figura 21 – Resultado das diluições seriadas de DacA. O tempo de reação ótimo foi determinado em 7 horas de reação. Para essa curva (azul) a concentração ótima de enzima é de 2 μM . Cada ponto no gráfico representa uma duplicata. O gráfico foi gerado usando o software GraphPad Prism 6.0, com o fitting da curva sendo uma sigmoidal.....	74

- Figura 22** – Esquematização da placa de ensaio para averiguação do valor do Z-fator. Nas quatro primeiras linhas estão as reações nas condições ótimas, e nas últimas quatro linhas, apenas a reação na ausência da enzima.75
- Figura 23** – Resultado da análise do Z-fator. As reações foram realizadas em placas de 96 poços, brancas de fundo chato, em 50 µl de tampão de reação (300 µM NaCl, 20 µM Tris, 10 mM MnCl₂, pH 8,0), contendo 2 µM de DacA e 20 µM de ATP (bolas vermelhas), e ausência de enzima (bolas pretas). O tempo de reação foi de 7 horas. As linhas cheias correspondem ao valor médio dos controles positivo (em preto) e negativo (vermelho). As linhas tracejadas correspondem aos valores médios ± os desvios-padrão para cada controle.75
- Figura 24** – Esquematização da placa de ensaio para verificação do valor do Z-fator em função do tempo para escalonamento do ensaio de luminescência.....76
- Figura 25** – Fator Z mostrado em vermelho. As curvas em azul e verde mostram os valores de %CV dos controles negativo e positivo, respectivamente.77
- Figura 26** – Gráfico mostrando o sinal de luminescência para cada composto triado da biblioteca NDL, em função da porcentagem de atividade enzimática restante. A linha vermelha integral mostra o valor médio do sinal de todas as moléculas, já as linhas vermelhas tracejadas mostram os valores da média somado a 3 vezes o desvio padrão para cima e para baixo ($\mu \pm 3 \times SD$). Cada ponto no gráfico representa um composto. O ponto em verde representa a porcentagem restante de reação do análogo de ATP, o α,β -metileno ATP.....78
- Figura 27** – Gráfico mostrando o sinal de luminescência para cada composto triado da biblioteca DIVERSet, em função da porcentagem de atividade enzimática restante. A linha vermelha integral mostra o valor médio do sinal de todas as moléculas, já as linhas vermelhas tracejadas mostram os valores da média somado a 3 vezes o

desvio padrão para cima e para baixo ($\mu \pm 3\text{SD}$). Cada ponto no gráfico representa um composto.	79
Figura 28 – Estrutura química dos hits da biblioteca NDL obtidos na triagem em larga escala de inibidores para a DacA.	80
Figura 29 – Estrutura química dos hits da biblioteca DIVERSet obtidos na triagem em larga escala de inibidores para a DacA.	81
Figura 30 – Estrutura química dos análogos encontrados na triagem em larga escala da biblioteca NDL que tiveram atividade inibitória frente à DacA.	81
Figura 31 – (A) Estrutura química comum observada nos análogos encontrados. Anel púrico, com 3 posições para substituintes: R ₁ na posição 6, R ₂ na posição 8 e R ₃ na posição 9. (B) Estrutura química do ATP. O substituinte na posição R ₁ é uma amina. Na posição R ₃ é a ribose e os fosfatos. (C) Estrutura cristalográfica mostrando os possíveis bolsões para crescimento (modificações) das moléculas.	82
Figura 32 – (A) Estrutura química do 1,3-diazanaftaleno observada nos análogos encontrados. Possui 3 posições para substituintes: R ₁ na posição 2, R ₂ na posição 3 e R ₃ na posição 4. (B) Estrutura química do composto 1, evidenciando as três modificações. (C) Estrutura química do composto 10, evidenciando as três modificações.	82
Figura 33 – Sobreposição das estruturas refinadas, evidenciando os sítios de interação enzima-ligante encontrados: 1- sítio ativo; 2- interface dimérica; 3 e 3'- sítios alostérico.	84
Figura 34 – Estrutura química dos ligantes refinados no sítio ativo da DacA. Os conjuntos x1051, x1095, x1204, x1210 e x1213 são referentes aos fragmentos da busca cristalográfica.	90
Figura 35 – Superposição dos conjuntos refinados do sítio ativo com a estrutura da DacA com o ATP (em laranja). Os ligantes estão representados em cinza.	91
Figura 36 – Representação do mapa diferença (em preto) do refinamento das estruturas com a omissão do ligante do sítio ativo. Em roxo é mostrado a hélice alfa responsável pela interação com os fosfatos do ATP. Os resíduos importantes para a interação entre o	

complexo enzima-ligante estão representados em bastões. As águas importantes para a interação estão mostradas como esferas vermelhas. A linha verde tracejada representa essa interação.92

Figura 37 – (A) Estrutura química do ligante encontrado no conjunto cristalográfico referente à busca por cristalografica de inibidores. (B) Superposição das estruturas x1254, que contem o ligante, e da DacA, que contem o ATP, evidenciando a interação do ligante com a interface dimérica.93

Figura 38 – Representação do mapa diferença (em preto) do refinamento da estrutura com a omissão do ligante na interface dimérica. Os resíduos importantes para a interação entre o complexo enzima-ligante estão representados em bastões. As águas importantes para a interação estão mostradas como esferas vermelhas A linha verde tracejada representa essa interação.94

Figura 39 – Estrutura química dos ligantes do sítio ativo encontrados nas estruturas cristalográficas refinadas. Todos os conjuntos são provenientes da busca de inibidores por cristalografia.....95

Figura 40 – Superposição dos conjuntos refinados do sítio alostérico com a estrutura da DacA com o ATP (em laranja). Os ligantes estão representados em cinza.95

Figura 41 – Representação do mapa diferença (em preto) do refinamento das estruturas com a omissão do ligante no sítio alostérico. Os resíduos importantes para a interação entre o complexo enzima-ligante estão representados em bastões. As águas importantes para a interação estão mostradas como esferas vermelhas. A linha verde tracejada representa essa interação.96

Figura 42 – Superposição do conjunto x1053 (em amarelo) com a estrutura da DacA com ATP (em rosa). O resíduo de tirosina Y118, na estrutura com ATP se mostra em dupla conformação, para fazer interações do tipo π -stacking com o anel púrico do ATP. Entretanto, na estrutura x1053, esse resíduo possui uma outra conformação para se ajustar e fazer o mesmo tipo de interação com o anel

imidazólico do ligante. Essa mudança de conformação pode gerar uma quebra na interação entre a tirosina e o ATP. 97

Figura 43 – Estrutura química das moléculas presentes no sítio ativo dos conjuntos D33 e G31. 100

Figura 44 – Superposição das estruturas contendo os ligantes análogos no sítio ativo com a estrutura da DacA contendo o ATP. 100

Figura 45 – Representação do mapa diferença (em preto) dos análogos presentes no sítio ativo. Em roxo é mostrado a hélice alfa responsável pela interação com os fosfatos do ATP. Os resíduos importantes para a interação entre o complexo enzima-ligante estão representados em bastões. As águas importantes para a interação estão mostradas como esferas vermelhas. A linha verde tracejada representa essa interação. 101

Figura 46 – Superposição dos conjuntos D33 e G31 e dos conjuntos x1204 e x1210. 101

Figura 47 – Estrutura comum entre os ligantes dos conjuntos x1204, x1210, D33 e G31. Ainda é mostrado o grupo R, radical que modifica as moléculas. 102

Figura 48 – Estrutura química dos análogos que possuem o anel pirimidina fundido com o tiofeno como estrutura comum. Em destaque estão as moléculas dos conjuntos cristalográficos D33 (AS-871/43477761) e G31 (AO-364/37357010). 102

Figura 49 – (A) Estrutura química do ligante presente na interface dimérica. (B) Representação do mapa diferença (em preto) do ligante na interface. Os resíduos importantes para a interação entre o complexo enzima-ligante estão representados em bastões. As águas importantes para a interação estão mostradas como esferas vermelhas. A linha verde tracejada representa essa interação. 103

Figura 50 – Estrutura química comum entre os ligantes. As modificações dos análogos ocorrem na posição do radical R. 104

Figura 51 – Representação da estrutura química dos análogos dos fragmentos da interface dimérica que tiveram seu valor de IC₅₀ avaliados. Grupo metanosulfonamida destacado com o círculo vermelho. 104

Figura 52 – Representação dos aminoácidos essenciais responsáveis pela interação entre as hélices (em roxo) que compõem a interface dimérica. Em amarelo estão representados os resíduos de leucina 89, em verde, as asparaginas 92 e em azul, as leucinas 100.	105
Figura 53 – (A) Estrutura bidimensional do ATP, em destaque, os fosfatos α , β e γ ; (B) Estrutura bidimensional do α , β -metileno ATP, destacando o radical metileno após o fosfato β	106
Figura 54 – Curva de IC_{50} do inibidor padrão α,β -metileno ATP. Em vermelho está mostrado a projeção do ponto de inflexão que reflete o valor do IC_{50} , resultando em 208,7 μM	107
Figura 55 – (A) Curva de IC_{50} para o composto AN-584/43409544. O valor obtido de IC_{50} foi de 54,1 μM . (B) Curva de IC_{50} para o composto AN-584/43409545. O valor obtido de IC_{50} foi de 172,4 μM	108
Figura 56 – Estrutura química dos quatro compostos derivados de fragmentos da interface dimérica.	108
Figura 57 – Estrutura química dos compostos derivados dos fragmentos da busca cristalográfica encontrados no sítio ativo.	110
Figura 58 – Curvas de IC_{50} para os compostos: (A) AE-848/01007013, (B) AF-834/25000580, (C) AG-205/12040018, (D) AG-205/13182025, (E) AG-690/40819218, (F) AH-262/31954020, (G) AK-105/40836944, (H) AP-381/41075530, (I) AO-364/37357010, (J) AO-364/41189905, (K) AS-871/43477761. Todos os dados foram tratados no software GraphPad Prim 6.0, com fitting da curva sigmoidal.	112
Figura 59 – Estrutura comum encontrada nos análogos dos compostos do sítio ativo que possuem atividade inibitória frente a DacA. Todos os análogos possuem um anel pirimidina fundido com um tiofeno, com quatro possibilidades de modificações, R_1 , R_2 , R_3 , e R_4	113
Figura 60 – (A) Sítio de reação e principais interações do ATP com os resíduos do sítio ativo. (B) Representação gráfica do sítio receptor para a docagem das moléculas.	114
Figura 61: Fluxograma que representa os processos envolvidos na construção da biblioteca dirigida a partir da docagem virtual.	115

- Figura 62** – Representação estrutural das 7 melhores moléculas com relação ao valor final da análise quimioinformática (ROCS+EON+FRED+HYBRID) em comparação com a estrutura do ATP. 116
- Figura 63** – (A) Superposição da melhor molécula (AK-968/41171044) com o ATP no sítio ativo da DacA. (B) Superposição das 7 melhores moléculas no sítio ativo da DacA. 116
- Figura 64** – Estrutura química dos análogos que possuem o anel purina como estrutura comum (em azul). 117
- Figura 65** – Estrutura química dos análogos que possuem o anel 1,3-diazanaftaleno como estrutura comum (em azul). 117
- Figura 66** – Estrutura química dos análogos que possuem o anel pirimidina fundido com o tiofeno como estrutura comum (em azul). 118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Constantes cinética obtidas para a DacA por ensaios de absorbância.....	73
Tabela 2 – Dados estatísticos obtidos na triagem em larga escala da biblioteca NDL.....	78
Tabela 3 – Dados estatísticos obtidos na triagem em larga escala da biblioteca DIVERSet.....	79
Tabela 4 – Valores da atividade enzimática remanescente dos hits encontrados na triagem em larga escala da biblioteca NDL	80
Tabela 5 – Valores da atividade enzimática remanescente dos hits encontrados na triagem em larga escala da biblioteca DIVERSet	81
Tabela 6 – Conjuntos cristalográficos foram divididos em 3 grupos, utilizando como critério de divisão a localização dos ligantes na molécula de DacA. Tem-se 5 conjuntos com ligantes no sítio ativo, 1 conjuntos presentes na interface dimérica e 5 conjuntos em um sítio alostérico. O código para identificação de cada ligante é o mesmo utilizado na biblioteca de fragmentos do SGC.....	84
Tabela 7 – Parâmetros estatísticos da coleta, processamento e refinamento dos dados cristalográficos da DacA com diferentes ligantes. Entre parênteses se encontram os dados referentes à última faixa de resolução.....	85
Tabela 8 – Parâmetros estatísticos da coleta, processamento e refinamento dos dados cristalográficos da DacA com diferentes ligantes da interface dimérica. Entre parênteses se encontram os dados referentes à última faixa de resolução.....	87
Tabela 9 – Parâmetros estatísticos da coleta, processamento e refinamento dos dados cristalográficos da DacA com diferentes ligantes do sítio alostérico. Entre parênteses se encontram os dados referentes à última faixa de resolução.....	88
Tabela 10 – Parâmetros estatísticos da coleta, processamento e refinamento dos dados cristalográficos da DacA com os análogos dos	

fragmentos. Entre parênteses se encontram os dados referentes à
última faixa de resolução. 98

Tabela 11 – Valores de IC₅₀ obtidos para os compostos da interface dimérica 108

Tabela 12 – Valores de IC₅₀ obtidos para os compostos do sítio ativo 112

Tabela 13 – Valores normalizados para as análises de similaridade
eletrostática e estrutural do ligante (ROCS e EON) e de docagem
molecular por duas funções matemáticas (FRED e HYBRID)..... 115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica
c-di-AMP	Adenosina monofosfato dimérica cíclica
c-di-GMP	Guanosina monofosfato dimérica cíclica
cGMP	Guanosina monofosfato cíclica
DAC	Diadenilato ciclase
DMSO	Dimetil sulfoxido
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
HTS	<i>High throughput screening</i>
K_{cat}	Eficiência catalítica
K_m	Constante de Michaelis-Menten
LNBio	Laboratório Nacional de Biociências
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Sincrotron
NDL	<i>Natural derivative library</i>
PEG	Polietilenoglicol
SD	Desvio-padrão
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecilsulfato de sódio
TRIS	Trisaminometano
VC	Volume de coluna
$V_{m\acute{a}x}$	Velocidade enzimática máxima

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	31
1.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	31
1.2	<i>O domínio Diadenilato Ciclase (DAC)</i>	32
1.3	<i>O novo segundo-mensageiro: c-di-AMP</i>	36
1.4	<i>A enzima DacA de S. Aureus</i>	41
1.5	<i>Estudo dos inibidores</i>	44
2	OBJETIVOS	51
2.1	<i>Objetivos Gerais e Justificativa</i>	51
2.2	<i>Objetivos Específicos</i>	51
3	METODOLOGIA.....	55
3.1	<i>Transformação em E. coli BL21(DE3) quimio-competentes</i>	55
3.2	<i>Expressão heteróloga da DacA.....</i>	55
3.3	<i>Obtenção e purificação da DacA.....</i>	56
3.4	<i>O ensaio de absorbância: EnzChek™ Pyrophosphate Assay.....</i>	56
3.4.1	<i>Otimização das condições para cinética</i>	57
3.4.2	<i>Cinética enzimática</i>	58
3.5	<i>O ensaio de luminescência: Kinase-Glo® Luminescent Assay.....</i>	59
3.5.1	<i>Otimização da concentração de DacA e tempo de reação</i>	60
3.5.2	<i>Qualidade estatística do ensaio de luminescência</i>	60
3.6	<i>High-throughput screening (HTS) primário</i>	61
3.7	<i>Busca e caracterização por cristalografia</i>	62
3.7.1	<i>Fragment-based Drug Discovery (FBDD).....</i>	62
3.7.2	<i>Estruturas ligante-enzima</i>	63
3.8	<i>Determinação dos valores de IC₅₀.....</i>	64
3.8.1	<i>Utilizando ensaios de luminescência</i>	64
3.8.2	<i>Utilizando ensaios de absorbância</i>	64
3.9	<i>Docagem molecular: o virtual screening.....</i>	65
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.1	<i>Expressão e purificação da enzima Diadenilato Ciclase.....</i>	69
4.2	<i>Cinética Enzimática.....</i>	70
4.2.1	<i>Curva-padrão de pirofosfato no ensaio de absorbância.....</i>	70
4.2.2	<i>Otimização da concentração de enzima para cinética</i>	71
4.2.3	<i>O ensaio de cinética enzimática</i>	72

4.3	<i>Triagem de inibidores em larga escala utilizando ensaios de luminescência.....</i>	73
4.3.1	Otimização da concentração de DacA e do tempo de reação	73
4.3.2	Avaliação do Z-fator para as condições otimizadas	74
4.3.3	Verificação do Z-fator em função do tempo de reação.....	76
4.3.4	<i>High-throughput screening</i> primário.....	77
4.4	<i>Resolução estrutural por difração de raios-X do complexo enzima-inibidor.....</i>	83
4.4.1	<i>Fragment-based Drug Discovery</i>	83
4.4.1.1	Refinamento dos conjuntos obtidos	83
4.4.1.2	Estudos estruturais dos fragmentos.....	90
4.4.2	Busca de análogos baseados nos fragmentos encontrados	98
4.4.2.1	Estudos estruturais dos análogos	99
4.5	<i>Determinação dos valores de IC₅₀ das moléculas análogas aos fragmentos</i>	106
4.5.1	Validação do IC ₅₀ usando luminescência	106
4.5.2	Compostos derivados dos fragmentos da interface dimérica	107
4.5.3	Compostos derivados dos fragmentos do sítio ativo	109
4.6	<i>Busca in silico de potenciais inibidores.....</i>	113
5	CONCLUSÕES.....	121
	REFERÊNCIAS	123

INTRODUÇÃO

NESSA SEÇÃO, SERÁ ELUCIDADO O SISTEMA BIOLÓGICO UTILIZADO NESSE TRABALHO, RESSALTANDO A PATOGENICIDADE DA BACTÉRIA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, AS CEPAS SUPER-RESISTENTES E COMO UM NOVO ALVO MOLECULAR PODE AJUDAR NO CONTROLE DE INFECÇÕES DERIVADAS DE *S. AUREUS*.

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Staphylococcus aureus*

S. aureus é uma eubactéria Gram-positiva pertencente ao filo Firmicutes (Figura 1). Podem crescer em ambientes com alta pressão osmótica e em baixa umidade e fazem parte da microbiota normal dos humanos.

Figura 1 – Foto de microscopia eletrônica de varredura de *Staphylococcus aureus*. Colorido artificialmente.

Fonte: TORTORA ⁸

Essas bactérias são comumente encontradas na conjuntiva dos olhos (membrana mucosa que reveste a parte interna da pálpebra e a superfície exposta da córnea), na pele e no trato respiratório superior (boca, nariz e garganta). Enquanto permanecerem nesses locais, não há risco de adquirir infecção. Entretanto, podem produzir diversas toxinas que contribuem com sua patogenicidade. Nesse caso, infecções por *S. aureus* podem causar a Síndrome do Choque Tóxico, e estão relacionadas à diversas doenças, desde infecções menores na pele, como espinhas, furúnculos e abscessos, até doenças potencialmente letais, como pneumonia, meningite, osteomielite e endocardite e até intoxicação alimentar. ⁸ Devido a sua habilidade em desenvolver resistências aos antibióticos, *S. aureus* são comumente encontradas em infecções hospitalares. Dessa forma, desde sua identificação, em 1880, vêm-se tentando combatê-las, uma vez que a mortalidade de pacientes com infecções causadas por *S. aureus* na era pré-antibiótico excedia os 80%. ^{14; 15}

Com a descoberta da penicilina em 1928 por Alexander Fleming, e mais tarde, em 1940, quando foi introduzida como antibiótico, o prognóstico de pacientes com infecção por *S. aureus* aumentou drasticamente. Porém, dois anos depois, em 1942, foram identificadas as primeiras cepas de *S. aureus* resistentes a penicilina

inicialmente em hospitais, e posteriormente na comunidade.¹⁶ Ao final de 1960, 80% dos isolados de *S. aureus* eram resistentes a penicilina. Hoje, cerca de 90% dos isolados possuem resistência à penicilina. Assim, novos antibióticos foram usados para combater as infecções causadas por *S. aureus*. Em 1961, foi introduzida a meticilina, entretanto, rapidamente foram reportadas cepas resistente também a esse antibiótico, as conhecidas MRSA (“methicillin-resistant” *S. aureus*).¹⁷ Na época, as infecções dessas cepas foram muito piores comparado com o observado nas cepas resistentes à penicilina. Na década de 1980, fluoroquinolonas começaram a serem usadas como tratamento de infecções por *S. aureus*, e nos anos de 1990, foi introduzida a vancomicina. De forma alarmante, as cepas resistentes a esses novos tratamentos, especialmente as VRMA (“vancomycin-resistant” *S. aureus*), também possuem resistência à penicilina e à meticilina.¹⁸

Hoje, existem poucos tratamentos para *S. aureus* resistentes e todos eles estão baseados na inibição de síntese proteica, como é o caso da quinupristina-dalfopristina e a linezolida, sendo que a linezolida é um bacteriostático, porém, já com casos de isolados resistentes.¹⁹ Novos fármacos estão ainda em fase clínica, com é o caso da daptomicina, que atua danificando a membrana citoplasmática da bactéria.

Sendo assim, buscas por novos agentes terapêuticos com novos mecanismos de ação, ou busca de novos alvos moleculares são de grande atrativo. Baseado nisso, um novo alvo proteico pode vir a ser de grande interesse, a enzima Diadenilato Ciclase.

1.2 O domínio Diadenilato Ciclase (DAC)

Em 2008, o grupo de Karl-Peter Hopfner revelou, através de análises estruturais e funcionais da proteína que supervisiona a integridade do DNA em *B. subtilis* e *Thermotoga marítima*, DisA,⁴ a estrutura e o mecanismo catalítico de um domínio conservado de função até então desconhecida (Pfam, DUF147) (Figura 2A). DisA é uma proteína octamérica que, além do domínio catalítico no N-terminal, possui um domínio formado por 4 hélices- α (chamado de DisA *linker*) na sequência e um domínio HTH de ligação ao DNA no C-terminal. A partir do mapa eletrônico obtido da difração do cristal de DisA, o grupo percebeu uma densidade eletrônica

substancial na região entre dois domínios DUF147 opostos (Figura 2C). Em combinação com características químicas dessa região, foi sugerido que o c-di-AMP era o responsável pela densidade eletrônica. O que de fato foi confirmado através de uma série de experimentos bioquímicos com a enzima DisA purificada. Desse modo, o domínio DUF147 foi renomeado para DisA_N, mostrando função de diadenilato ciclase. ⁴ Devido à diversidade de arquiteturas proteicas em que esse domínio aparece, por questão de facilidade, ele será renomeado para DAC.

Figura 2 – (A) Modelo estrutural do octâmero da DisA de *Thermotoga maritima*. Em verde é representada o domínio diadenilato ciclase. Em laranja, os domínio HhH de ligação ao DNA. Na ausência de dano do material genético, a DisA sintetiza c-di-AMP. (B) Representação esquemática do domínio HhH da DisA, responsável pela interação com o DNA. (C) Representação do mapa de densidade eletrônica do c-di-AMP no sítio catalítico da DisA.

Fonte: Adaptada de WITTE. ⁴

A maioria das proteínas que contém esse domínio são encontradas em espécies bacterianas, mas um número pequeno também está presente em archaea do filo Euryarchaeota. ²⁰ Em bactérias, são mais frequentemente encontrados em membros do filo Gram-positivo Firmicutes e Actinobactérias. Podem ser encontradas

também em bactérias Gram-negativas dos filos Bacteroidetes, Cyanobacteria, Chlamydiae e Fusobacteria e na classe das δ -proteobacteria.

Curiosamente, grande parte dos organismos contêm apenas uma única enzima com o domínio DAC. ² Organismos contendo duas ou três proteínas Diadenilato Ciclase, como algumas espécies de *Clostridium* e *Bacillus*, são exceções ². Ainda, em organismos que contêm mais de uma proteína com o domínio DAC, a arquitetura do tipo DacA (Figura 3) está sempre presente.

Todas as sequências de DAC identificadas até hoje podem ser distribuídas em 19 arquiteturas, sendo que aproximadamente 99% delas estão agrupadas em apenas 3 tipos, ² DacA, DisA e DacB (Figura 3).

Embora o domínio DAC mais estudado, pertença ao grupo da proteína que verifica integridade do DNA (DisA), esse representa 24% das sequências conhecidas, sendo o segundo grupo mais comum de proteínas contendo o domínio DAC. A arquitetura mais abundante (69,1% das sequências) encontrada nos genomas bacterianos é aquela em que o domínio DAC está conectado a um domínio transmembranar conservado de 3 hélices- α . As proteínas desse grupo são denominadas de DacA (Figura 3).

Figura 3 – Organização de domínios mais comumente encontrados entre as proteínas contendo o domínio DAC. DacA é associada a 3 hélices transmembranares no N-terminal, DisA possui um domínio Linker e um de ligação de DNA (HhH) no C-terminal e DacB se associa a um domínio YojJ. A arquitetura mais rara de DacC é similar à de DacA, com a inclusão de uma hélice transmembranar seguida de um domínio YbbR.

Fonte: Adaptada de CORRIGAN. ^{2;3}

De forma interessante, muitos patógenos, como é o caso do *S. aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Streptococcus pneumoniae*, contêm apenas uma proteína com o domínio DAC, tornando-a essencial para a bactéria. É plausível que o

domínio transmembranar da DacA atue como um domínio sensorial detectando diretamente alterações específicas externas à membrana ou parede celular, modulando a atividade enzimática do domínio DAC e consequente regulação dos níveis intracelulares de c-di-AMP.

Embora saiba-se muito pouco a respeito da estrutura e função das proteínas desse grupo, análises de outros domínios associados e da organização dos operons em que as mesmas são codificadas levantam hipóteses do papel desempenhado por essas proteínas. Tem sido observado que DacA é frequentemente encontrada em um operon com um gene que codifica uma proteína que contém um ou vários domínios YbbR.²⁰ Na maioria das δ -proteobacterias e Firmicutes, o gene codificante para a DacA é encontrado junto aos genes *cdaR* e *glmM*, que codificam, respectivamente, para a YbbR e para a fosfoglicosamina-6-fosfato mutase, envolvida nos passos iniciais da via de síntese do peptidoglicano. Dessa maneira, sugere-se que o c-di-AMP está relacionado com a homeostase da parede celular. De fato, já foi reportado que alterações na concentração intracelular de c-di-AMP leva a alterações na composição e morfologia da parede celular de *S. aureus* e *B. subtilis*.^{1;}
⁵ Em alguns casos, os domínios YbbR estão diretamente fusionados à proteína com o domínio DAC, formando um pequeno subgrupo DacC.

O terceiro grupo mais abundante (5,5% das sequências), denominado de DacB, possui um domínio YojJ conectado em seu N-terminal e alguns estudos demonstraram que o c-di-AMP produzido por DacB em *B. subtilis* provavelmente controla processos relacionados à esporulação.⁴

Nosso grupo caracterizou a enzima DacA de *S. aureus*, revelando que ela se encontra como um dímero em solução, entretanto, os sítios catalíticos de cada monômero não se encontram na posição correta para a reação, sendo necessário o encontro de mais unidades diméricas para tal. Um fator importante é a necessidade do dímero. Mutações nos resíduos de aminoácidos essenciais para a manutenção da interface dimérica resultam em perda total da atividade catalítica. Dessa forma, pode-se pensar em compostos capazes de inibir a enzima de forma não-competitiva, ou incompetitiva, buscando moléculas que interajam justamente com esse sítio da interface dimérica. Foi mostrado também que os resíduos DGA e RHR presentes no sítio ativo são muito conservados, e mutações realizadas aqui também levaram a perda total da atividade enzimática. Toda essa caracterização da DacA de *S. aureus* foi realizada pela doutora Nathalya C. M. R. Mesquita.

1.3 O novo segundo-mensageiro: c-di-AMP

Nucleotídeos são moléculas indispensáveis para a vida, independentemente do organismo, na medida em que são componentes do material genético, seja ele DNA ou RNA, e ainda servem como fontes importantes de energia. Para reconhecer mudanças no ambiente e responder apropriadamente a elas, todos os organismos se baseam em vias de transdução de sinais, reconhecendo, transferindo e respondendo a esses sinais externos. No que diz respeito a transferência de sinais, muitas células se utilizam dos chamados segundo-mensageiros, pequenas moléculas com fácil difusão dentro ou entre as células, como por exemplo os nucleotídeos, especialmente os cíclicos.

Ao longo dos últimos anos, as vias de sinalização reguladas por nucleotídeos cíclicos vêm sofrendo rápida expansão. Em eucariotos, os principais nucleotídeos usados como segundos-mensageiros são a adenosina 3',5'-monofosfato cíclica^{21; 22} (cAMP) e a guanosina 3',5'-monofosfato cíclica^{23; 24} (cGMP). Esses nucleotídeos tem papéis importantes na transferência do efeito de diversos hormônios para dentro da célula (principalmente o glucagon e a epinefrina²⁵), no relaxamento muscular e excitação neural.²⁶ Em bactérias, também são importantes sinalizadores, regulando processos como formação de cistos, biofilme, repressão do catabolismo de carbono em bactérias entéricas²⁷ e expressão de genes de virulência.^{28; 29} Mais recentemente, um novo dinucleotídeo cíclico, o GMP dimérico cíclico (c-di-GMP) foi descoberto³⁰. Entrou rapidamente para o centro das atenções como um segundo mensageiro bacteriano ubíquo em pouco tempo.³¹ Hoje, o c-di-GMP é conhecido por controlar vários processos celulares, como a transição de um estado planctônico unicelular para uma macrocolônia, o biofilme. No estado planctônico, c-di-GMP desempenha um papel central na formação e dissolução de biofilmes regulando a produção de polissacarídeos extracelulares, de proteínas adesivas e os flagelos e pili³² (figura 4).

Figura 4 – Processos que são controlados por nucleotídeos em bactérias.

Fonte: Adaptada de KALIA.¹²

Recentemente, em 2008, um novo segundo-mensageiro foi reportado, o di-AMP cíclico (c-di-AMP). Ele é formado através da reação de condensação de duas moléculas de ATP mediados pela enzima diadenilato ciclase, e degradado por fosfodiesterases pela enzima GdpP em pApA (figura 5).

Interessantemente, é o único segundo-mensageiro essencial, ou seja, os organismos capazes de sintetizar o c-di-AMP dependem dele para sobreviver, especialmente aqueles do filo Firmicutes, que inclui as bactérias *B. subtilis*, *Listeria Monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*.^{1; 33; 34; 35; 36; 37} Essa característica é própria desse nucleotídeo, não encontrada em nenhum outro segundo-mensageiro.

Figura 5 – Esquema mostrando a reação enzimática de condensação de duas moléculas de ATP formando o c-di-AMP e dois pirofosfatos, e sua degradação por fosfodiesterases em pApA.

Fonte: Adaptada de CORRIGAN.²

Já foi relatado que a concentração intracelular do c-di-AMP deve estar precisamente controlada, uma vez que tanto a baixa como a alta concentração são prejudiciais à célula.^{1; 38; 39}

A primeira descoberta da produção bacteriana de c-di-AMP foi em 2010, em que foi vista uma quantidade de c-di-AMP secretada no citosol de células hospedeiras infectadas com o patógeno *Listeria monocytogenes*. A superexpressão de bombas de efluxo resultou em um aumento da concentração de c-di-AMP no sobrenadante de culturas desse patógeno, e a superexpressão da diadenilato ciclase resultou em níveis elevados da resposta do hospedeiro durante a infecção. Foi concluído no estudo, que o c-di-AMP desencadeia a resposta do interferon tipo I das células do hospedeiro.³⁵

Como dito na sessão anterior, em diversas bactérias, o gene que codifica para a diadenilato ciclase está no mesmo operon que o gene que codifica para a enzima fosfoglucoamina-6-fosfato mutase. Desse modo, a vinculação entre o c-di-AMP e o metabolismo da síntese da parece celular é suportado por observações em mutantes de *B. subtilis*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* que produzem diferentes quantidades intracelulares desse nucleotídeo, e mostram diferentes suscetibilidades

a antibióticos com alvo na parede celular, especialmente os β -lactâmicos, como é o caso da metilicina.^{4; 36; 40}

Os segundos-mensageiros agem pela interação em um sítio alostérico de seus receptores, alterando sua atividade e, assim regulando vias celulares específicas. Dessa maneira, diversos receptores para o c-di-AMP já foram reportados na literatura.

O primeiro receptor descoberto foi identificado em *Mycobacterium smegmatis*. Um fator de transcrição denominado DarR, pertencente à família de reguladores TetR (TFRs). Proteínas dessa família possuem funções variadas que vão desde conferir resistência a antibióticos, *quorum sensing*, até expressão de genes relacionados ao metabolismo celular.⁴¹ No caso do organismo *M. smegmatis* em que o estudo teve foco, o receptor de c-di-AMP encontrado está relacionado, principalmente, com o metabolismo de ácidos graxos, sugerindo que o nucleotídeo tem papel nessa via metabólica.¹⁰

Outro receptor identificado por ligar c-di-AMP é a subunidade KtrA de um transportador de potássio.⁴² Essa subunidade é formada por dois domínios chamados RCK (regulador de condutância de K⁺). A suposição de que o c-di-AMP tem um papel importante na regulação da homeostase de potássio é suportada pela observação de mutantes que contém o gene codificante da enzima GdpP nocauteado, que resulta no aumento da concentração de c-di-AMP intracelular, são sensíveis ao estresse salino, da mesma forma que mutantes com o gene que codifica a subunidade KtrA nocauteado, e requerem altos nível de potássio no meio para crescer nessas condições de estresse osmótico.^{43; 44} Dessa forma, é sugerido que, a alta concentração intracelular de c-di-AMP leva à inibição da captação de íons potássio.

Ainda, KtrA não é a única proteína de *S. aureus* que contém o domínio RCK. A segunda proteína é a *Cation Proton Aintporter*, CpaA, que também liga o c-di-AMP, sugerindo que esse domínio funcione como um regulador que sente o nível intracelular do nucleotídeo e causa uma resposta nos transportadores de íons potássio e sódio. Essa interação entre o c-di-AMP e o domínio RCK se estende para outros organismos além do *S. aureus*, como *B. subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, e *Corynebacterium glutamicum*.^{43; 45}

Como demonstrado, o c-di-AMP está envolvido na sinalização de diversas funções celulares, como reparo ao DNA, homeostase de potássio, síntese da parede

celular, virulência e regulação da expressão gênica (Figura 6). Desse modo, não somente em *S. aureus*, como em uma grande gama de bactérias em que o c-di-AMP foi observado como segundo mensageiro essencial, a sua síntese pelas enzimas que contém o domínio DAC se torna um grande alvo molecular para busca de inibidores capazes de afetar, portanto, a concentração intracelular de c-di-AMP, que é tão crítica para a bactéria. Assim, a identificação de um modo de combinar essa inibição com os tratamentos atualmente disponíveis pode levar ao controle das infecções até mesmo das formas mais resistentes de *S. aureus* ou de outras bactérias.

Figura 6 – Mudanças no ambiente (raios) são potencialmente sentidas por domínios sensores associados à proteína YbbR ou por outros mecanismos ainda não elucidados. Já foi relatado que a YbbR interage com a DacA, levando a um aumento da atividade ciclase de síntese de c-di-AMP.¹ Alguns receptores de c-di-AMP já foram identificados em organismos como *S. aureus*, *B. subtilis* e *M. smegmatis*, que são o caso dos transportadores de íons KtrA e CpaA e o sistema Kdp. Especialmente em *S. aureus*, a atividade fosfodiesterase da GdpP é afetada pela presença do grupo heme ligado ou não ao óxido nítrico (NO) através do domínio PAS (em verde), regulando a atividade fosfodiesterase do domínio DHH (em vermelho).⁶ Em *B. subtilis*, há ainda mais duas outras ciclases, a DisA e a DacB, envolvidas na varredura do DNA, detectando ramificações no caso da DisA⁴. A DacB pode estar envolvida no processo de esporulação.⁹ Em *M. smegmatis*, o c-di-AMP é sintetizado pela DisA, e atua no receptor DarR, um fator de transcrição, regulando a homeostase da membrana celular.¹⁰

Fonte: Adaptada de CORRIGAN.²

1.4 A enzima DacA de *S. Aureus*

Pouco tempo depois da descoberta, em 2008, do domínio DAC, um estudo identificou, em 2011, cepas de *S. aureus* incapazes de produzir o ácido lipoteicoico, mas que ainda assim eram capazes de crescer e se dividir quase que normalmente.⁵ O ácido lipoteicoico (LTA) é o maior constituinte da parede celular das bactérias Gram-positivas e é crucial para o crescimento e divisão celular normal. Quando submetidas à ausência desse polímero, as bactérias geralmente aumentam seu tamanho e perdem o controle da divisão celular, o que pode levar à lise celular.^{8; 46} Foi descoberto que essas cepas tinham adquirido mutações adicionais em um gene que codifica para a fosfodiesterase GdpP que regula, junto com a DacA os níveis intracelulares de c-di-AMP. Como consequência dessas mutações, observou-se que esses níveis haviam aumentado drasticamente, inclusive em cepas resistentes à meticilina. Esse aumento de concentração interna de c-di-AMP produzido pela inativação da GdpP permitiu uma maior capacidade dessas cepas para lidar com estresses na parede celular deficiente em LTA (figura 7).⁵

Figura 7 – (A) Sa_DacA sintetiza c-di-AMP a partir de ATP enquanto que a fosfodiesterase GdpP hidrolisa c-di-AMP para 5'-pApA. Isso resulta em células nativas de *S. aureus* contendo LTA na sua parede celular (representada pela área pêssego) e uma concentração intracelular de c-di-AMP em torno de 2-3µM. (B) Cepas de *S. aureus* incapazes de produzir LTA sobrevivem através da inativação da fosfodiesterase GdpP, resultando em um aumento dos níveis intracelulares de c-di-AMP. Especula-se que nessa concentração mais alta, c-di-AMP interagem com proteínas receptoras específicas, afetando diretamente suas atividades ou a expressão de outras proteínas, compensando, assim, de alguma forma, os defeitos da parede celular causados pela ausência de LTA.

Fonte: Adaptada de CORRIGAN.⁵

Dada a importância, então, do novo segundo mensageiro, o c-di-AMP, nosso grupo começou a estudar a enzima DacA de *S. aureus* em 2012. Foi possível determinar a estrutura de uma construção excluindo as três hélices

transmembranares (85 resíduos no N-terminal), tanto na forma apo quanto ligada ao ATP e Mn^{2+} , e investigar as características funcionais do domínio DAC, as quais se mostraram totalmente distintas da DisA (resultados ainda não publicados). Diferentemente do octâmero observado na estrutura resolvida com um domínio DAC (DisA de *Thermotoga maritima*),⁴ a porção solúvel de DacA de *S. aureus* apresentou-se na forma dimérica (Figura 8).

Figura 8 – (A) Estrutura dimérica da Sa_DacA resolvida a 2,0 Å. (B) A superfície de um dos protômeros está colorida de acordo com conservação de resíduos na família, destaque para região vermelha escura mostrando o meio-sítio ativo altamente conservado. (C) Estrutura resolvida em complexo com um análogo não hidrolisável de ATP e Mn^{2+} mostram os resíduos responsáveis pelo reconhecimento do substrato e cofator.

Fonte: Cedida por Nathalya Mesquita

O domínio DAC reconhece o ATP, formando um meio-sítio, sendo necessário o encontro produtivo de dois domínios DAC para formação do c-di-AMP. Diferentemente da estrutura quaternária de DisA, no dímero de DacA os meio-sítios de cada um dos monômeros não estão voltados entre si (Figura 8B), sendo a interface dimérica distinta das encontradas em DisA. Uma extensa caracterização bioquímica foi realizada pela doutora Nathalya Mesquita, confirmando que essa construção é capaz de sintetizar c-di-AMP, utilizando especificamente Mn^{2+} como cofator, e que a interface dimérica observada na estrutura cristalina é essencial para atividade enzimática.

Considerando que o dímero de DacA é essencial para atividade, a interação entre dois dímeros de DacA é obrigatória para atividade enzimática. Essa observação foi comprovada a partir de resultados de ligação de ATP e Mn^{2+} realizados com um mutante (T207E) desenhado para desestabilizar a potencial interface cataliticamente competente entre os dois dímeros sem interferir com a ligação do substrato e cofator.

Ao contrário da DisA (Figura 2), a qual a ligação dos substratos não é necessária para multimerização e formação do sítio ativo completo ⁴, os resultados com a enzima diadenilato ciclase de *S. aureus* demonstraram que os membros do grupo DacA, apesar de possuírem o mesmo enovelamento, empregam um mecanismo totalmente diferente para catalisar a formação de c-di-AMP (Figura 9). Esse mecanismo foi proposto por nosso grupo levando em conta toda a caracterização da proteína diadenilato ciclase de *S. aureus* realizada pela doutora Nathalya Mesquita.

Figura 9 – A síntese de c-di-AMP é realizada pelo encontro entre dois dímeros de DacA (cinza escuro e cinza claro) para que o sítio ativo (região laranja e amarelo) de cada dímero fique em uma posição *face-to-face*. Em roxo está destacada a interface dimérica essencial para a reação, uma vez que somente dois monômeros, mesmo que em posições favoráveis, não são capazes de sintetizar o c-di-AMP. A atividade enzimática da DacA é supostamente regulada pela interação com a YbbR (azul), quando for detectada alguma modificação no ambiente (raios amarelos). Analogamente ao mecanismo proposto para a DisA ⁴, a interação entre a YbbR e a DacA deve diminuir a produção c-di-AMP.

Fonte: Cedida por Nathalya Mesquita

1.5 Estudo dos inibidores

Atualmente, estudos na área de busca por inibidores das diadenilato ciclases já estão sendo realizados. Entretanto, especificamente para a DacA, ainda não se tem nenhum estudo publicado nessa área.

Para a DisA, contudo, existe um artigo em que foi identificado o composto Bromofenol-tioidantina (Bromofenol-TH) como inibidor para essa diadenilato.¹³ A busca foi baseada na utilização de uma biblioteca de 1000 compostos, com testes em larga escala baseados em fluorescência. O grupo utilizou *Coralyne* como forma de agregar o c-di-AMP formado na reação catalisada pela DisA (figura 10), o que impede a ação do iodo como *quencher*, que está presente no sistema.

Figura 10 – Detecção da formação de c-di-AMP através do complexo c-di-AMP e a *Coralyne*. A formação do complexo impede que o iodo se aproxime da *Coralyne* e absorva sua fluorescência. Dessa forma, essa proteção feita pelo c-di-AMP possibilita a detecção da fluorescência da *Coralyne*.

Fonte: Adaptada de ZHENG¹³

O grupo encontrou 11 possíveis candidatos dentre essas 1000 moléculas testadas (figura 11). Contudo, apenas uma, o bromofenol-TH se mostrou capaz de inibir a reação enzimática após análises da formação de c-di-AMP acompanhada por HPLC.

Figura 11 – (A) Estruturas do Bromofenol-TH e outras moléculas análogas. (B) Detecção da fluorescência em tempo real da *Coralyme* da reação catalizada pela DisA.

Fonte: Adaptada de ZHENG ¹³

Após a identificação, o grupo avaliou o valor do IC₅₀ desse composto frente à atividade da DisA. O valor encontrado foi de 56 µM (figura 12).

Figura 12 – Inibição da atividade da DisA pelo bromofenol-TH. Ensaio foi realizado utilizando α - ^{32}P -ATP e cromatografia em camada delgada para monitorar o progresso da reação enzimática. Reação foi parada após 5 min e foi calculada a porcentagem de c-di-AMP produzido. Dados foram normalizados em função da atividade na ausência do inibidor. IC_{50} calculado foi de 56 μM .

Fonte: Adaptada de ZHENG ¹³

De forma interessante, o Bromofenol-TH não inibe a DisA de forma competitiva, ou seja, esse composto não se liga à DisA no mesmo sítio do ATP. Quando adicionado 1mM de ATP na solução, a alta concentração do nucleotídeo não afeta a interação entre inibidor/enzima (figura 13).

Figura 13 – Bromofenol-TH (50 μM) quando adicionado à solução de DisA (5 μM) causa uma redução na fluorescência do triptofano presente na proteína. Adição de ATP (até 1 mM) não restaura a intensidade inicial (na ausência do inibidor), indicando que o bromofenol-TH não é um inibidor competitivo.

Fonte: Adaptada de ZHENG ¹³

Dessa forma, o grupo mostrou que os ensaios em larga escala podem servir como uma fonte de novos inibidores, apesar da taxa de *hits* ser extremamente baixa (foi encontrado apenas 1 composto em uma biblioteca de 1000 moléculas). Ainda, o bromofenol-TH encontrado se mostrou como um inibidor que não compete pelo sítio do ATP, descartando o tipo competitivo de inibição. Mais ainda, o valor de IC₅₀ encontrado é relativamente baixo, por se tratar de uma molécula pequena, sem nenhuma modificação racional.

De modo geral, a busca por novos inibidores para as enzimas diadenilato ciclase já estão sendo realizadas. Isso porque essa enzima está envolvida em diversas vias essenciais para as bactérias, como mostrado nas sessões anteriores. Isso mostra a necessidade desses estudos, principalmente visando uma nova forma de tratamento de infecções ocasionadas por esses patógenos que contem enzimas DAC.

OBJETIVOS

AQUI SERÃO MOSTRADAS AS FINALIDADES DESSE TRABALHO, INCLUINDO UMA JUSTIFICATIVA PARA A REALIZAÇÃO DESSE ESTUDO.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais e Justificativa

A busca por novos alvos terapêuticos é um atrativo, no caso de bactérias que adquirem resistência a um determinado antibiótico. Tendo isso em vista, a enzima Diadenilato Ciclase de *S. aureus* tem se mostrado como um alvo interessante. Ela é a única proteína que sintetiza, em *S. aureus*, um importante segundo-mensageiro, o c-di-AMP, que é responsável por diversas funções de regulação da bactéria, tais como homeostase de potássio, transporte iônico, integridade do DNA e regulação da expressão gênica. Ainda, a manutenção da concentração intracelular desse mensageiro é de extrema importância, na medida em que, tanto a diminuição quanto o aumento intracelular da sua concentração podem inibir o crescimento bacteriano. Nesse sentido, esse trabalho teve como objetivo geral a busca de compostos com atividade inibitória frente à enzima Diadenilato Ciclase de *Staphylococcus aureus*, DacA, utilizando-se principalmente de triagens em larga escala e de busca cristalográfica em bibliotecas de fragmentos.

2.2 Objetivos Específicos

- *Construção de uma biblioteca de compostos baseada em docagem molecular*: triagem *in silico* baseada no ligante (similaridade com o substrato) e na estrutura da proteína;
- *Triagem em larga escala de potenciais inibidores de DacA*: Ensaio enzimático baseado em luminescência será utilizado em campanhas de triagens de inibidores em larga escala. Serão utilizadas as bibliotecas de compostos derivados de produtos naturais NDL (3200 compostos) e DIVERSet (10240 compostos);
- *Determinação da estrutura cristalográfica de complexos DacA/inibidor*: Cristalização e resolução estrutural de DacA em complexo com os hits para determinação do modo de interação dos inibidores identificados.
- *Caracterizações bioquímicas e biofísicas dos compostos bioativos identificados*: Caracterização dos hits, moléculas que apresentarem inibição,

através da determinação de constantes cinéticas, como o IC_{50} , utilizando-se de ensaios enzimáticos baseados em luminescência e absorbância.

Metodologia

NESSA SEÇÃO ESTÃO EXPLICADAS AS METODOLOGIAS EMPREGADAS NESSE PROJETO, DESDE A OBTENÇÃO DA PROTEÍNA PURIFICADA, ATÉ OS ENSAIOS UTILIZADOS, TANTO *IN VITRO* QUANTO *IN SILICO*.

3 METODOLOGIA

3.1 Transformação em *E. coli* BL21(DE3) quimio-competentes

Para a inserção do vetor petSUMO, contendo o gene codificante da DacA (apenas o domínio citoplasmático compreendendo os resíduos 86-269, excluindo as três hélices transmembranares), foi empregado o seguinte protocolo: adição de 85 ng de plasmídeo em 50 µL de células competentes (*E. coli* BL21(DE3)). A mistura foi incubada em gelo por 10 min, seguido de um choque-térmico por 2 min a 42°C, e novamente incubada em gelo por mais 5 min. À mistura foram adicionados 200 µL de meio LB líquido (10 g/L de Triptona; 5 g/L de Extrato de levedura; 10 g/L de NaCl) e incubados por 45 min (37°C, 250 rpm). Placas de Petri com meio LB ágar foram preparadas para crescimento dos transformantes com adição de canamicina na concentração final de 50 µg/mL. A mistura bacteriana foi espalhada em 15 mL de meio sólido com a ajuda da alça de Drigalski e as placas incubadas *overnight* a 37°C.

3.2 Expressão heteróloga da DacA

A partir da seleção de transformantes positivos na placa de Petri, foi preparado um pré-inóculo de 100 mL com meio LB acrescido de canamicina (concentração final de 50 µg/mL) e incubado por 3h a 37°C e 150 rpm. O caldo bacteriano foi transferido para o inóculo de 1 L de meio LB com adição de canamicina (50 µg/mL) e incubado novamente por mais 2h, 150 rpm, 37°C, tempo suficiente para que a densidade óptica a 600 nm atingisse o valor de 0,5-0,6. A seguir, a expressão foi induzida com a adição de IPTG com concentração final de 100 µM, e incubado *overnight* a 20°C e 150 rpm. A proteína recombinante foi expressa com uma calda contendo 6 histidinas acopladas à proteína SUMO (***Small Ubiquitin-like Modifier***) à região N-terminal. O *pellet* celular foi obtido a partir da centrifugação da mistura bacteriana por 45 min a 4500 rpm e 4°C, com o descarte do sobrenadante.

3.3 Obtenção e purificação da DacA

O *pellet* celular foi ressuspenso em 20 mL de tampão de lise (20 mM Tris; 300 mM NaCl; 5 mM Imidazol; pH 8,0). A lise celular foi feita por adição de lisozima (0,5 mg/mL) e por sonicação (12 min, divididos em pulsos de 30 s de sonicação e 30 s de descanso, amplitude de 20%, *Sonic Dismembrator Mode 500* – Fisher Scientific). A mistura lisada foi centrifugada por 30 min a 10000 rpm, 4°C, para a separação da fração solúvel contendo a proteína dos restos celulares. A purificação dessa fração solúvel foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de cobalto (*TALON Metal Affinity Resin* - Clontech) devido a presença da cauda de histidina com clivagem na coluna da proteína fusionada SUMO, seguindo o seguinte protocolo: lavagem da coluna com 10 VC (volumes de coluna) de água *milli-Q*, equilibrada com 5 VC de tampão de lise, passagem do sobrenadante lisado, lavagem com 10 VC de tampão A (20 mM Tris; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol; pH 8,0) e mais 3 VC de tampão B (20 mM Tris; 300 mM NaCl; pH 8,0). Ainda na coluna, foi adicionado 5 µM de SUMO protease (Ubl-specific protease 1), com incubação *overnight* a 4°C. A eluição da proteína, agora purificada, foi realizada com a lavagem de 2 VC de tampão B. A coluna foi regenerada seguindo o protocolo do fabricante após passagem de tampão B com 500 mM de Imidazol para retirada da porção 6xHis-tag-SUMO. Alíquotas da proteína foram separadas para análise em gel SDS-PAGE. Uma vez confirmada a pureza da proteína, uma etapa de cromatografia de exclusão molecular foi feita em coluna HiLoad 16/600 Superdex75 (GE Healthcare). A proteína foi, então, concentrada em concentradores Millipore 10 KDa, quantificada no Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) e estocadas em -80°C após rápido congelamento em nitrogênio líquido.

3.4 O ensaio de absorbância: *EnzChek™ Pyrophosphate Assay*

Sabendo da geração de moléculas de pirofosfato oriundas da catálise do c-di-AMP a partir de 2 moléculas de ATP, a atividade enzimática da enzima diadenilato ciclase (DacA) pode ser determinada de forma indireta a partir de métodos que identifiquem a presença de fosfato inorgânico em solução.

O ensaio desenvolvido no *kit* comercial *EnzChek™ Pyrophosphate Assay* (Molecular Probes) foi adaptado para os objetivos desse projeto (Figura 14). O método consiste na utilização de ensaios acoplados, os quais utilizam a enzima pirofosfatase para clivagem da ligação do pirofosfato (PPi), produzindo dois fosfatos inorgânicos (Pi), os quais, entram na cascata de reação base do kit. Na presença de Pi, o substrato 2-amino-6-mercapto-7-metilpurina ribonucleosídeo (MESG) é convertido em ribose-1-fosfato e 2-amino-6-mercapto-7-metilpurina pela enzima purina nucleosídeo fosforilase (PNP).

A conversão enzimática do MESG resulta em uma mudança no máximo de absorbância de 330 nm para 360 nm. O aumento ou diminuição da intensidade de absorbância é proporcional com a quantidade de PPi na amostra.

Figura 14 – Conversão enzimática do 2-amino-6-mercapto-7-metilpurina ribonucleosídeo (MESG) à ribose-1-fosfato e 2-amino-6-mercapto-7-metilpurina por purina ribonucleosídeo fosforilase (PNP). A mudança de acompanhamento no máximo de absorção a 360 nm permite a quantificação de fosfato inorgânico (Pi) consumido durante a reação.

Fonte: Adaptada de *ENZCHEK...*⁷

3.4.1 Otimização das condições para cinética

Inicialmente foi realizada uma otimização da concentração de enzima para que pudessemos realizar a cinética sob as condições de um sistema estacionário, como pede a relação de Michaelis-Menten. A ideia é utilizar uma concentração alta

de substrato e varrer um intervalo de concentrações diferentes de enzima, se modo a manter sempre o excesso de substrato para garantir que os sítios catalíticos estarão ocupados.

Essa otimização foi feita utilizando o ensaio de absorbância através do kit *EnzChek*, monitorando a produção de fosfato inorgânico proveniente da reação enzimática de condensação do ATP em c-di-AMP. Foi preparada a reação como sugerida pelo manual do *kit*, com a adição de ATP na concentração final de 1 mM e MnCl_2 a concentração final de 10 mM. Diluições da enzima foram preparadas desde 5 μM até 0,5 μM , em tampão (300 mM NaCl; 20 mM Tris; pH 8,0). 90 μl de solução do kit acrescido de ATP e MnCl_2 foram colocadas em placas transparente e para iniciar a reação, 10 μl da diluição seriada de DacA foi adicionado. Para o branco, foi adicionado 10 μl de solução contendo somente tampão. As reações foram feitas sempre em triplicatas. A reação foi monitorada por 3 horas e 30 minutos, com leituras de absorbância a 360 nm a cada 41 segundos. Ao final, foi feito um gráfico de velocidade de reação em função da concentração de enzima, utilizando a curva de calibração (manual do *kit*). A concentração de enzima ótima para uso no ensaio de cinética será a menor que permita uma relação linear entre a concentração e a velocidade inicial de reação.

3.4.2 Cinética enzimática

As constantes cinéticas foram determinadas através do experimento clássico de cinética enzimática obedecendo os requisitos de uma reação de Michaelis-Menten. Realizou-se uma varredura de concentrações de ATP que variaram desde 650 μM até 1,28 μM , diluídos em água. A reação foi realizada conforme o *kit EnzChek*, preparando-se um *mix* que continha os componentes do *kit* acrescidos de DacA e MnCl_2 na concentração final de 1 μM e 10 mM, respectivamente. Esse *mix* foi disposto em placas de 96 poções, adicionando-se 90 μl por poço. Para iniciar a reação, foi adicionado 10 μl por poço das diluições de ATP. Para o branco, foi acrescido apenas 10 μl de água. O experimento foi feito em quadruplicata. A reação foi acompanhada por 3 horas e 30 minutos, com leituras a cada 41 segundos, monitorando a absorbância em 360 nm. Os dados foram reduzidos a valores de inclinação da curva para cada diluição, nos dando informação sobre a velocidade de reação, utilizando também a curva de calibração para conversão dos valores de

absorbância em valores de velocidade de reação. Esse ensaio foi feito utilizando o leitor de placas SpectraMax i3. Os dados foram tratados usando o software GraphPad Prism 6.

3.5 O ensaio de luminescência: *Kinase-Glo® Luminescent Assay*

Outra forma de verificar a reação enzimática, sem utilizar ensaios de absorbância, que poderiam ter interferências de possíveis compostos com absorção no comprimento de onda próximo ao utilizado (360 nm), baseia-se na luminescência oriunda da oxigenação da luciferina. Para isso, foi utilizado o *kit Kinase-Glo® Luminescent Assay*, adequado também para escalonamento para ensaios em larga escala, uma vez que é necessário somente sua adição à reação teste para leitura do sinal de luminescência.

Apesar desse ensaio ter sido desenvolvido para proteínas quinases,^{11; 47; 48; 49; 50}, a detecção baseia-se unicamente no ATP não consumido durante a reação enzimática, o que o torna, a princípio, totalmente adequado para detectar a influência de potenciais inibidores na atividade de DacA. Resumidamente, a reação catalisada pela DacA foi conduzida normalmente nas condições adequadas, durante um período estabelecido. A seguir, adicionou-se o mesmo volume reacional do reagente comercial contendo luciferina e a enzima recombinante *Ultra-Glo™ Luciferase* (Promega). O ATP remanescente no momento da adição do reagente é utilizado como substrato pela luciferase para catalisar a mono-oxigenação da luciferina, processo que emite um fóton de luz por conversão (Figura 15). Esse sinal luminescente pode ser detectado por qualquer detector adequado. As condições reacionais adequadas (concentração de enzima, concentração de substrato e tempo de reação) para condução da busca de inibidores foram determinadas de acordo com procedimentos descritos no manual do kit comercial.

Figura 15 – O ATP restante da reação enzimática é usado como substrato pela Luciferase para catalisar a mono-oxigenação da luciferina, produzindo um fóton. A luminescência é inversamente proporcional à atividade enzimática.

3.5.1 Otimização da concentração de DacA e tempo de reação

Toda a otimização foi realizada com base no protocolo do próprio fabricante do *kit* (Promega Kinase-Glo Luminescent Assay). Diluições seriadas de DacA pela placa foram feitas, com concentrações que variam de 8 μM a 250 nM. A concentração de ATP foi fixada em 20 μM . Essa concentração foi escolhida pensando na triagem em larga escala, em que os compostos testados estariam a uma concentração de 40 μM nas reações teste. O próprio *kit* instrui o uso de baixas concentrações (menores que 10 μM) para ensaios de inibidores competitivos, e altas concentrações (acima de 100 μM) para outros tipos de inibição. Portanto, para manter equilibrado a busca, sem nenhum viés na busca de inibidores, a concentração de 20 μM foi utilizada. A reação foi repetida em duas placas de 96 poços. O tempo de reação foi acompanhado, adicionando o *kit* a cada 1 hora, até o final de 8 horas de reação (duplicata para cada tempo). Controles contendo apenas ATP e apenas tampão foram feitos para análise do máximo e mínimo de sinal de luminescência. A leitura foi realizada no SpectraMax i3, com dados tratados no GraphPad Prism 6.

3.5.2 Qualidade estatística do ensaio de luminescência

Para o sucesso na busca de inibidores, o ensaio de HTS primário deve ser robusto o suficiente para selecionar compostos capazes de inibir a atividade enzimática em uma concentração fixa pré-determinada. A definição do melhor ensaio para implementação do HTS primário foi feita por análises do fator Z (equação 1) e pelo coeficiente de variação (%CV – equação 2). O fator Z reflete a janela de trabalho permitida pelo erro e pela relação sinal/ruído do ensaio, sendo 1 o valor ótimo, e maior que 0,5 como um bom ensaio⁵¹. Ele é definido como:

$$Z = 1 - 3 \frac{\sigma_p + \sigma_n}{|\mu_p - \mu_n|} \quad (1)$$

Aqui, μ_n e σ_n correspondem à média do sinal do controle negativo e seu desvio padrão, e μ_p e σ_p a média e o desvio padrão do controle positivo, respectivamente.

Já o coeficiente de variação é uma medida padronizada da dispersão da frequência de distribuição, ou seja, avalia a precisão e a repetibilidade de um ensaio. Para o caso de HTS primário, valores abaixo de 5% representam um bom ensaio. É definida como:

$$\%CV = \frac{\sigma}{\mu} \quad (2)$$

Para verificar a qualidade do ensaio de luminescência, já nas condições otimizadas, foi realizada, em uma placa de 96 poços, 48 replicatas da reação enzimática da DacA (2 μ M enzima, 20 μ M de ATP, 10 mM $MnCl_2$, em tampão 20 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8,0), e mais 48 replicatas dos controles, contendo apenas ATP (mesmo tampão). A luminescência foi medida no leitor de placas SpectraMax i3 e o gráfico confeccionado no GraphPad Prism 6. A partir dos valores médios e dos desvios-padrão desses controles, foi calculado o fator Z (equação 1).

3.6 *High-throughput screening* (HTS) primário

A busca de inibidores em larga escala se deu em colaboração com o Dr. Artur Torres Cordeiro, LNBio, CNPEM, Campinas-SP, Brasil que gentilmente nos cedeu duas bibliotecas de compostos para a triagem e o seu laboratório para a realização *in loco* desse ensaio. As bibliotecas utilizadas foram: NDL (*Natural Derivative Library* – *TimTec*) que contém 3200 compostos derivados de produtos naturais; e a DIVERSet (*Chembridge*) com 10240 compostos que cobrem um grande número de farmacóforos, mantendo a diversidade estrutural. Os compostos foram recebidos pré-plaqueados em placas de 384 poços, na concentração estoque de 10 mM, em 100% DMSO e transferidos para placas-filhas diluídos a concentração final de 1 mM, em 100% DMSO. As colunas 1, 2, 23 e 24 foram preenchidas somente com DMSO para controles positivo e negativo. Essa diluição foi realizada pelo Dr. Artur. Todas as soluções usadas no HTS doravante estão em tampão contendo 20 mM Tris; 300 mM NaCl; 10 mM $MnCl_2$ e 0,01% Triton X-100. Para a triagem primária foram preparadas placas de 384 poços com 25 μ L da solução teste, contendo 20 μ L de ATP adicionados inicialmente em todos os poços, seguido da adição de 4 μ L de tampão nas colunas 1 e 24; transferência de 1 μ L da solução de compostos da placa-filha para a placa teste - essa transferência foi feita pela estação JANUS-MDT (*ParkinElmer, Waltham, MA*) equipada com uma cabeça com 384 ponteiros – e

adição final de 4 μL de solução enzimática nas colunas 2 a 23 para iniciar a reação. Desse modo, as colunas 1 e 24, que contém apenas a solução de ATP na ausência da DacA, serão os controles positivos (inibição total) e as colunas 2 e 23, que contém a solução de ATP na presença de DacA, serão os controles negativos (zero inibição) (Figura 16).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	Controle Positivo (ATP + ; DacA -)	Controle Negativo (ATP + ; DacA +)	<p style="text-align: center;">Teste dos Compostos (DacA, ATP, Mn²⁺, Compostos)</p>																				Controle Negativo (ATP + ; DacA +)	Controle Positivo (ATP + ; DacA -)
B																								
C																								
D																								
E																								
F																								
G																								
H																								
I																								
J																								
K																								
L																								
M																								
N																								
O																								
P																								

Figura 16 – Esquema da disposição dos controles e dos testes dos inibidores na placa de 384 poços utilizada nas triagens em larga escala.

Fonte: Elaborada pelo autor

Ao final do tempo de reação, 25 μL do kit de luminescência foi adicionado por poço, incubando por 1h para a leitura do sinal de luminescência (CLARIOstar – BMG Labtech). Os dados foram analisados usando o MARS *Data Analysis Software*. As concentrações finais de ATP, DacA e compostos foram, respectivamente, 20 μM , 2 μM e 40 μM .

3.7 Busca e caracterização por cristalografia

3.7.1 *Fragment-based Drug Discovery* (FBDD)

Essa etapa foi realizada pelo pós-doutor Helton José Wiggers, durante seu BEPE, no laboratório do Dr. Frank von Delft do SGC, Oxford, com o objetivo de buscar novos inibidores a partir de busca em bibliotecas de fragmentos, por métodos cristalográficos.

Exclusivamente para a busca baseada em cristalografia, foi utilizada uma construção menor da DacA, que compreende os resíduos 109-261, devido a sua maior reprodutibilidade nos ensaios cristalográficos. Essa construção será doravante denominada DacA₁₀₉.

Variações na concentração de DacA₁₀₉ de 4 a 40 mg/ml foram usadas para triagem inicial de cristais em quatro kits: *JBScreen* (Mitegen), *LFScreen* (Hampton), *HIN* (Hampton) e *HCS* (Hampton). Placas de 96 poços contendo três subpoços com volume de 150 nL, em três diferentes proporções de proteína/líquido mãe, 1:2, 1:1 e 2:1. Os cristais cresceram por difusão de vapor a 20°C em gotas sentadas. Otimização das condições iniciais em que cresceram cristais foram feitas.

Coleta de dados de difração foi realizada no Diamond *beamline* I04-1, com detector Pilatus 2M CCD a 0,91730 Å. Essa plataforma possui toda a análise dos dados de difração totalmente automatizada, gerando o arquivo MTZ usado para a resolução e refinamento da estrutura cristalografia, também automatizado (Xtriage, Phaser, eLBOW, phenix.refine, AutoBuild, and LigandFit). As estruturas contendo ligantes foram manualmente refinadas usando ciclos iterativos no COOT ⁵² e phenix.refine ⁵³ até que os valores de R_{free} e R_{work} convergissem para um valor mínimo.

Na busca de fragmentos, os cristais foram mergulhados em solução de compostos na concentração final de 20 mM, por 2 horas. As estruturas dos complexos enzima-fragmento foram determinadas usando Phenix ⁵³ (Xtriage, Phaser, eLBOW, phenix.refine, AutoBuild e LigandFit). Conjuntos que continham ligantes foram refinados manualmente com o COOT ⁵² e *Phenix*, ⁵³ até decréscimo e convergência dos valores de R_{free} e R_{work} .

Os fragmentos ligados foram usados para busca em bancos de dados, como o *DrugBank*, ⁵⁴ *ZINC Database* ⁵⁵ e *Specs*. Trinta e quatro compostos derivados desses fragmentos foram comprados para testes *in vitro* e para posterior estudos cristalográficos desses ligantes.

3.7.2 Estruturas ligante-enzima

No intuito de desenvolver os compostos *hits* em compostos *lead* otimizados, estudos cinéticos e cristalográficos foram feitos. As moléculas derivadas da busca cristalográfica também foram usadas no estudo cristalográfico de sua interação com

a enzima DacA₁₀₉. Cristais foram crescidos em soluções já otimizadas pela doutora Nathalya C. M. R. Mesquita (0,1 M de Tris, 0,2 M de Li₂SO₄.H₂O, 21% PEG3350, pH 8,0, a 18°C), em gota sentada, e mergulhados em solução contendo 40 mM de compostos (100% DMSO), por 2 horas e na solução crio-protetora contendo 15% (v/v) de etilenoglicol.

Dados foram coletados na linha MX-2 do LNLS (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, CNPEM, Campinas-SP), processados no XDS⁶⁰ e resolvidos por substituição molecular, com refinamento iterativo usando o COOT⁵² e *Phenix*.⁵³

3.8 Determinação dos valores de IC₅₀

3.8.1 Utilizando ensaios de luminescência

Para o ensaio baseado em sinal de luminescência, seguiu-se o manual do *kit*, com concentração de enzima e ATP finais de 2 µM e 20 µM, respectivamente. Placas de 96 poços, branca, de fundo chato, foram utilizadas, com volume de reação final de 25 µl, divididos em 12 µl de solução de ATP (tampão 300 mM NaCl; 20 mM Tris; 10 mM MnCl₂; 0,01% Triton X-100), 1 µl de solução de compostos (diluídos serialmente em 100% DMSO) e 12 µl de solução enzimática (mesmo tampão). Após o tempo de reação ótimo, 25 µl do *kit* foi adicionado, com leitura da luminescência 1 hora após a adição, utilizando o leitor de placas SpectraMax i3, com dados tratados no GraphPad Prism 6.

3.8.2 Utilizando ensaios de absorbância

Nos ensaios de absorbância, seguiu-se da mesma forma o protocolo do manual do kit. Foi utilizado placas de 96 poços, transparente, com volume final de 100 µl, divididos em 86 µl de solução *mix* (contendo as enzimas e substrato do *kit*, adicionados da DacA e MnCl₂), 4 µl de compostos (diluídos serialmente em 100% DMSO) e 10 µl de solução de ATP (tampão 20 mM Tris). A reação foi acompanhada por 3 horas e 30 minutos, com leituras em 360 nm a cada 33 segundos. Aqui, as concentrações finais de enzima e ATP também foram 1 µM e 20 µM, respectivamente. Tanto as leituras como os dados foram tratados utilizando o leitor

de placas SpectraMax i3, e os *softwares* nativo do equipamento e o *Prism GraphPad* 6.0 para confecção dos gráficos.

3.9 Docagem molecular: o *virtual screening*

Partindo da estrutura cristalográfica do domínio DacA co-cristalizado com o substrato, o ATP, a busca por potenciais inibidores começou a ser feita utilizando-se de quatro bancos comerciais de moléculas da empresa Specs (Holanda), com cerca de 1.000.000 de moléculas, garantindo uma grande gama de diversidade química e biológica. O procedimento de busca de inibidores foi realizado com os softwares da OpenEye, utilizando os pacotes de comparação eletrostática EON (EON 2.2.0.5: OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM) e estrutural ROCS⁶¹ (ROCS 3.2.1.4: OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM), para o planejamento baseado no ligante, e pacotes de docagem molecular FRED⁶² e HYBRID,⁶² para o planejamento baseado no receptor. Inicialmente, alguns parâmetros foram otimizados, para a obtenção de resultados mais confiáveis. Os ajustes se basearam na estrutura cristalográfica obtida do ligante, na tentativa de reproduzir a mesma estrutura de modo virtual. Uma vez ajustados os parâmetros, foram gerados os confôrmeros (estruturas tridimensionais) para cada molécula do banco, e esses comparados eletrostática e estruturalmente com o ATP cristalográfico. Os 100 000 melhores confôrmeros de cada banco foram usados para a docagem molecular.

O preparo do receptor (no caso, a DacA) para a docagem é feito pelo pacote *Make_Receptor*. Aqui, os parâmetros do sítio de ligação são ajustados de modo a deixar todos os resíduos de aminoácidos essenciais para a interação substrato-receptor no interior da caixa de docagem.

Para a docagem molecular, usou-se duas funções de pontuação diferentes, Chemgauss3 e Chemgauss4. A primeira utiliza uma função potencial gaussiana suave, o que permite fazer uma primeira docagem em resoluções baixas, reduzindo o tempo computacional. A função Chemgauss4 é uma modificação da função de pontuação anterior nas interações referentes às ligações de hidrogênio entre receptor-ligante, melhorando a percepção de direção dessas interações. Primeiramente, a docagem foi realizada no FRED, que utiliza a função de pontuação Chemgauss3, a partir de um algoritmo de busca exaustiva, ou seja, busca, sistematicamente, por rotações e translações do ligante dentro do sítio ativo do

receptor. Ao final, foi usado o FRED_RESCORE, o qual aproveita todos os parâmetros do FRED, mas emprega a função Chemgauss4 para repontuar os ligantes. Também foi feita a docagem a partir do HYBRID. Esse utiliza tanto da informação do sítio de ligação da proteína quanto do substrato para melhorar a performance da docagem. Aqui, é necessário que o receptor contenha o substrato ligado no sítio para que ocorra a docagem, diferentemente do FRED. O HYBRID utiliza a função Chemgauss4, de modo que não necessária a repontuação final.

RESULTADOS e Discussão

AQUI ESTÃO EXPLICITADOS OS RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS DOS ENSAIOS EMPREGADOS NESSE PROJETO, BEM COMO DIVERSAS DISCUSSÕES SOBRE AS IMPLICAÇÕES DESSES RESULTADOS.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Expressão e purificação da enzima Diadenilato Ciclase

Toda a parte de clonagem, transformação em *E. coli*, expressão heteróloga e purificação para a obtenção da enzima do trabalho, a DacA, foi feita pela Nathalya Mesquita, durante seu doutorado. Assim, toda a caracterização da DacA já foi feita anteriormente. Entretanto, devido ao grande uso da enzima para os ensaios propostos nesse trabalho, será mostrado aqui também os resultados de obtenção da DacA purificada. Vale mencionar o uso de diferentes construções da DacA durante os estudos e caracterização enzimática conduzidos pela Dr. Nathalya. Aqui, foi utilizada para os ensaios em larga escala (HTS) e ensaios de luminescência e absorbância para determinação dos valores de IC₅₀ apenas uma das construções, a DacA₈₆. Essa construção compreende apenas a porção citoplasmática da enzima, entre os aminoácidos 86 e 269. Apesar de ter todas as construções purificadas, apenas a DacA₈₆ se mostrou adequada para os ensaios propostos. Outras construções, como a DacA₁₀₆ (que compreende os aminoácidos 106-269), por exemplo, é de difícil cristalização.

Análises da pureza da proteína foram realizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS 15% (figura 17A). Ainda, para verificar o estado de oligomerização, foi conduzida uma cromatografia de exclusão molecular (figura 17B).

A análise qualitativa do gel de poliacrilamida mostra que a proteína possui um peso molecular em torno de 20 kDa, o que corresponde ao monômero da DacA (20,7 kDa) e sai purificada após a cromatográfica por afinidade. Na gel-filtração, a eluição no volume de retenção de 10,4 ml corresponde a um peso molecular de 42 kDa, indicando que a DacA se apresenta como um dímero em solução.

Figura 17 – (A) Análise em SDS-PAGE- 15% da purificação da DacA: (MM) Padrão massas moleculares (1) Pellet; (2) Sobrenadante; (3) Sobrenadante após passar pela resina de afinidade; (4) Lavagem com tampão 20 mM Tris, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0; (5) Lavagem com tampão 20 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8,0; (6) Eluição da DacA com 10 mL de tampão 20 mM Tris, 300 mM NaCl após clivagem na coluna; (7) Segunda eluição da DacA com 10 mL de tampão 20 mM Tris, 300 mM NaCl; (8) Terceira eluição da DacA com 10 mL de tampão 20 mM Tris, 300 mM NaCl; (9) Eluição da fusão SUMO com 20mL de tampão 20 mM Tris, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH 8,0. (B) Cromatograma da gel filtração usando a coluna HiLoad 16/600 Superdex75 (GE Healthcare).

Fonte: Elaborada pelo autor

4.2 Cinética Enzimática

4.2.1 Curva-padrão de pirofosfato no ensaio de absorbância.

Curvas padrão de pirofosfato para os ensaios de absorbância foram realizadas seguindo o protocolo do *kit* (Figura 18). Diferentes concentrações de pirofosfato (fornecido pelo *kit*) foram utilizadas para preparar triplicatas com intervalo que variaram desde 62,5 μ M até 488 nM, com leitura de absorbância em 360 nm. A curva foi utilizada para converter a absorbância nos ensaios de cinética em valores de velocidade de reação de produção de pirofosfato inorgânico.

Figura 18 – Relação padrão entre concentração de pirofosfato e absorbância a 360 nm.

Fonte: Elaborada pelo autor

4.2.2 Otimização da concentração de enzima para cinética

A otimização se deu utilizando o *kit* de absorbância, *EnzChek*, variando-se a concentração enzimática e fixando a concentração de ATP em 1 mM. As concentrações enzimáticas variaram de 5 μM a 500 nM. Dentro desse intervalo, pode-se ver que ocorre uma dependência linear com a concentração de enzima e a velocidade de reação inicial (figura 19). Dessa forma, a concentração ótima escolhida foi de 1 μM. O coeficiente de determinação, R^2 da curva foi de 0,994, número que indica o quanto a variável dependente pode ser predita a partir da variável independente. Quanto mais próximo de 1, maior o poder de predição.

Figura 19 – Relação linear entre concentração enzimática de DacA e velocidade de reação de síntese de c-di-AMP.

Fonte: Elaborada pelo autor

4.2.3 O ensaio de cinética enzimática

A cinética da DacA foi determinada através de ensaio de absorvância usando o kit comercial *EnzChek Pyrophosphate Assay*. Nesse kit, ocorre o monitoramento da produção de pirofosfato proveniente da reação de condensação das duas moléculas de ATP em c-di-AMP. O pirofosfato é degradado em fosfato inorgânico e na presença desse, ocorre um *shift* na absorvância, de 330 nm para 360 nm. Desse modo, pode-se acompanhar a reação em tempo real, se a necessidade de fazer diversas reações e pará-las em tempos diferentes. A concentração de DacA foi fixada em 1 μM , e foi feita uma varredura na concentração de ATP, em um intervalo de 650 μM até 1,27 μM . A curva de cinética segue a relação de Michaelis-Menten, como mostrado na figura 20.

Figura 20 – (A) Curva de cinética enzimática da enzima DacA. O valor de K_m obtido foi de 28 μM com velocidade máxima de 96,94 $\mu\text{M/s}$. (B) Gráfico de Lineweaver-Burk (duplo-recíproco). A reta mostrada foi contruída com base nos dados de K_m e $V_{\text{máx}}$ obtidos na regressão não-linear do primeiro gráfico, uma vez que a transformação dos valores para os respectivos recíprocos distorcem o erro, razão pela qual não foi feita a regressão linear utilizando somente os dados recíprocos.

Fonte: Elaborada pelo autor

A partir do gráfico, pode-se tirar o valor de K_m , convencionado como sendo a metade da concentração de substrato para que se tenha metade da velocidade máxima de reação. Outros dois termos importantes são a velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$) relacionada com o K_{cat} , que é a constante que caracteriza o número de reações por unidade de tempo, definida como sendo a razão entre $V_{\text{máx}}$ e a concentração de enzima total (E_t), e também a razão entre K_{cat} e K_m .

A constante K_m é comumente relacionada com a afinidade da enzima pelo substrato, de modo que quanto maior seu valor, menor seria essa afinidade. Pode-

se entender também como um valor que indica a efetividade enzimática, ou seja, quanto maior seu valor, maior a concentração de substrato necessária para realizar sua reação na velocidade máxima. Já a constante K_{cat} nos informa a medida direta de produção catalítica do produto sob condições ótimas (enzima saturada). Seu valor recíproco também é de interesse, ao passo que nos dá a quantidade de tempo necessário para realizar uma reação. A razão entre K_{cat} e K_m nos dá a efetividade da reação, principalmente quando existem diversos substratos. Para a DacA, essas constantes estão mostradas na tabela 1.

Tabela 1 – Constantes cinética obtidas para a DacA por ensaios de absorbância.

DacA	K_m	$V_{m\acute{a}x}$	K_{cat}	K_{cat}/K_m
1 μM	$28 \pm 4 \text{ uM}$	96,94 $\mu M/s$	$97 \pm 4 \text{ s}^{-1}$	$3,5 \pm 0,6 \mu M^{-1} \text{ s}^{-1}$

Fonte: Elaborada pelo autor

4.3 Triagem de inibidores em larga escala utilizando ensaios de luminescência

4.3.1 Otimização da concentração de DacA e do tempo de reação

Outro ensaio que é possível de se fazer, sabendo que a reação possui o ATP como substrato, é o ensaio de luminescência. Para esse ensaio, foi utilizado o *kit* de luminescência *Kinase-Glo Luminescent Assay* (Promega), que se baseia no consumo do ATP restante da reação pela luciferase presente no *kit*, promovendo a mono-oxigenação da luciferina, produzindo um fóton.

Inicialmente, fez-se a otimização desse ensaio, visando o seu uso para a busca em larga escala nas bibliotecas de compostos. Um ensaio preliminar foi feito para otimizar as concentrações de enzima e o tempo de reação. Diluições seriadas da concentração de DacA foram dispostas nas linhas da placa de 96 poços, e a cada duas linhas (duplicatas) corresponde a um tempo de reação avaliado. Dessa maneira, com apenas um ensaio foi possível determinar a quantidade de enzima e tempo de reação ótimos. Os resultados das medidas de luminescência estão mostrados na figura 21.

Figura 21 – Resultado das diluições seriadas de DacA. O tempo de reação ótimo foi determinado em 7 horas de reação. Para essa curva (azul) a concentração ótima de enzima é de 2 μM. Cada ponto no gráfico representa uma duplicata. O gráfico foi gerado usando o software GraphPad Prism 6.0, com o *fitting* da curva sendo uma sigmoide.

Fonte: Elaborada pelo autor

O tempo de reação ótimo foi escolhido a partir do momento em que o valor de EC₅₀ não mais se alterasse. O valor ótimo de concentração enzimática ótima é aquele em que possuísse a maior diferença entre o máximo de luminescência (sem enzima, pontos em preto), e o valor correspondente a menor concentração na porção linear da sigmoide (considerada entre os valores -0,125 e 0,3). Nesse caso, os valores ótimos de tempo e concentração enzimática foram, respectivamente, 7 horas e 2 μM.

4.3.2 Avaliação do Z-fator para as condições otimizadas

A fim de verificar a qualidade do ensaio de luminescência, utilizando agora as condições ótimas de reação, fez-se, em uma placa de 96 poços, 48 replicatas contendo a DacA, ATP e Mn²⁺, e outras 48 replicatas excluindo a enzima (Figura 22).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2 uM DacA, 20 uM ATP, 10 mM Mn ²⁺											
B												
C												
D												
E	20 uM ATP, 10 mM Mn ²⁺											
F												
G												
H												

Figura 22 – Esquemática da placa de ensaio para averiguação do valor do Z-fator. Nas quatro primeiras linhas estão as reações nas condições ótimas, e nas últimas quatro linhas, apenas a reação na ausência da enzima.

Fonte: Elaborada pelo autor

O gráfico, mostra, ponto a ponto, os valores de luminescência (Figura 23). O valor do Z-fator foi calculado a partir dos valores médios e dos desvios-padrão dos controles, utilizando a equação 1. O valor obtido para o Z-fator foi de 0,630.

Figura 23 – Resultado da análise do Z-fator. As reações foram realizadas em placas de 96 poços, brancas de fundo chato, em 50 µl de tampão de reação (300 µM NaCl, 20 µM Tris, 10 mM MnCl₂, pH 8,0), contendo 2 µM de DacA e 20 µM de ATP (bolinhas vermelhas), e ausência de enzima (bolinhas pretas). O tempo de reação foi de 7 horas. As linhas cheias correspondem ao valor médio dos controles positivo (em preto) e negativo (vermelho). As linhas tracejadas correspondem aos valores médios ± os desvios-padrão para cada controle.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3.3 Verificação do Z-fator em função do tempo de reação

Para o aumento de escala, uma nova verificação do valor do Z-fator foi realizada em função do tempo de reação. Essa nova otimização foi feita agora, em placas de 384 poços, com outro equipamento, uma vez que a triagem em larga escala foi realizada em colaboração com o Dr. Artur Cordeiro, no LNBio (CNPEN, Campinas, SP). As linhas A, B, C e D da placa de teste foram separadas para as reações do controle positivo de inibição, que continham apenas ATP, sem enzima. Nas linhas E, F, G e H, foram feitos os controles negativos, contendo ATP e enzima (Figura 24).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	Controle Positivo (20 μ M ATP, 10 mM $MnCl_2$, em 25 μ L de reação)																							
B																								
C																								
D																								
E	Controle Negativo (2 μ M DacA, 20 μ M ATP, 10 mM $MnCl_2$, em 25 μ L de reação)																							
F																								
G																								
H																								
I																								
J																								
K																								
L																								
M																								
N																								
O																								
P																								

Figura 24 – Esquematização da placa de ensaio para verificação do valor do Z-fator em função do tempo para escalonamento do ensaio de luminescência.

Fonte: Elaborada pelo autor

O volume final de reação foi de 25 μ L, separados em 20 μ L de solução de ATP (concentração final de 20 μ M, em tampão 300 mM NaCl; 20 mM Tris; 10 mM $MnCl_2$; 0,01% Triton X-100) e 5 μ L de solução com DacA (concentração final de 2 μ M, no mesmo tampão). Essas soluções foram preparadas e dispensadas na placa utilizando o dispensador *Multidrop Combi SMART dispenser* (Thermo Scientific). Para o controle positivo, 5 μ L de tampão apenas fora adicionado.

Dados os tempos de reação, que variaram de 3 a 10 horas, 25 μ L de solução do kit foram adicionados utilizando o dispensador. Após 1 hora da adição do kit, foi lida a luminescência, utilizando o leitor de placas ClarioStar. Os dados foram tratados usando o software MARS do próprio equipamento. Para a determinação do melhor tempo de reação, foi acompanhado os valores do fator Z e do coeficiente de variação (%CV). O tempo escolhido foi aquele em que o valor de Z fosse o mais alto possível (máximo de 1, maior que 0,5) e o valor de %CV o menor possível (próximo de zero).

É convencional que um valor do Z-fator acima de 0,5 é suficiente para que o ensaio seja estatisticamente confiável, entretanto, para nosso propósito de achar inibidores, o valor de corte será de 0,65. Nas etapas iniciais à busca de inibidores frente à DacA, reações com apenas enzima e substrato foram realizadas para simular o controle negativo de inibição. O controle positivo foi feito na ausência de proteína, simulando a enzima totalmente inibida. Foi monitorado também o valor do coeficiente de variância (%CV), cujo valor máximo para a proposta de triagem em larga escala é de 5% (Figura 25).

Figura 25 – Fator Z mostrado em vermelho. As curvas em azul e verde mostram os valores de %CV dos controles negativo e positivo, respectivamente.

Fonte: Elaborada pelo autor

Analisando o gráfico, o tempo de reação escolhido foi de 7 horas. Nesse tempo, obteve-se um valor de Z-fator de 0,903, com valores de %CV para o controle positivo e para o controle negativo de, respectivamente, 0,7% e 2,6%.

4.3.4 High-throughput screening primário

Após a otimização e adequação do *kit* de luminescência para o nosso ensaio, foram realizadas duas triagens em larga escala para a busca de possíveis compostos com atividade inibitória frente à DacA. As bibliotecas usadas compreendiam desde moléculas derivadas de compostos naturais, até moléculas menores com grupos farmacofóricos específicos, oriundas das bibliotecas NDL e DIVERSet, respectivamente. As figuras 26 e 27 a seguir mostram os resultados obtidos. Cada ponto no gráfico mostra o sinal normalizado de luminescência para

cada composto testado, o que corresponde a porcentagem de atividade enzimática remanescente. As linhas em vermelho indicam os valores da média (linha central) e média mais três desvios-padrão (linha superior e inferior). Os resultados estão sumarizados nas tabelas 2 e 3. Todos os compostos testados estavam com concentração final a 40 μ M.

Figura 26 – Gráfico mostrando o sinal de luminescência para cada composto triado da biblioteca NDL, em função da porcentagem de atividade enzimática restante. A linha vermelha integral mostra o valor médio do sinal de todas as moléculas, já as linhas vermelhas tracejadas mostram os valores da média somado a 3 vezes o desvio padrão para cima e para baixo ($\mu \pm 3\text{SD}$). Cada ponto no gráfico representa um composto. O ponto em verde representa a porcentagem restante de reação do análogo de ATP, o α,β -metileno ATP.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 2 – Dados estatísticos obtidos na triagem em larga escala da biblioteca NDL

MÉDIA	98,80%	HITS ENCONTRADOS	17
DESVIO PADRÃO	2,90%	TAXA DE HITS	0,53%
MÉDIA - 3 x DESVIO PADRÃO	84,50%	Z-FATOR MÉDIO	0,81 $\pm$ 0,04

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 27 – Gráfico mostrando o sinal de luminescência para cada composto triado da biblioteca DIVERSet, em função da porcentagem de atividade enzimática restante. A linha vermelha integral mostra o valor médio do sinal de todas as moléculas, já as linhas vermelhas tracejadas mostram os valores da média somado a 3 vezes o desvio padrão para cima e para baixo ($\mu \pm 3\text{xSD}$). Cada ponto no gráfico representa um composto.

Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 3 – Dados estatísticos obtidos na triagem em larga escala da biblioteca DIVERSet

MÉDIA	98,40%	HITS ENCONTRADOS	13
DESVIO PADRÃO	5,70%	TAXA DE HITS	0,13%
MÉDIA - 3 x DESVIO PADRÃO	81,50%	Z-FATOR MÉDIO	0,65 $\pm$ 0,04

Fonte: Elaborada pelo autor

Como forma de mostrar a eficácia dessa busca, um análogo de ATP não hidrolisável, o α,β -metileno-ATP, foi utilizado como padrão de inibição. Na concentração de 40 μM de análogo de ATP, a porcentagem de atividade restante da DacA foi de 89% (ponto em verde na figura 26), mostrando que os compostos encontrados podem ser mais eficazes que esse análogo. Os compostos encontrados com o sinal de luminescência abaixo do *threshold* de 3 vezes o desvio padrão com relação à média foram considerados como potenciais inibidores. Na biblioteca NDL,

foram encontradas 17 moléculas, sendo que suas estruturas químicas estão relacionadas na figura 28, assim como seus valores de porcentagem de atividade enzimática remanescente estão mostrados na tabela 4. Na biblioteca DIVERSet, 13 compostos tiveram atividade inibitória, e estão explicitados na figura 29 e seus valores obtidos sumarizados na tabela 5.

Figura 28 – Estrutura química dos *hits* da biblioteca NDL obtidos na triagem em larga escala de inibidores para a DacA.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 4 – Valores da atividade enzimática remanescente dos *hits* encontrados na triagem em larga escala da biblioteca NDL

HIT	% ATIVIDADE	HIT	% ATIVIDADE	HIT	% ATIVIDADE
1	66,8	7	78,2	13	83,9
2	68,7	8	78,7	14	87,7
3	72,1	9	79	15	89,6
4	72,6	10	81,3	16	89,7
5	77	11	82,7	17	90
6	77	12	83,1		

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 29 – Estrutura química dos hits da biblioteca DIVERSet obtidos na triagem em larga escala de inibidores para a DacA.

Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 5 – Valores da atividade enzimática remanescente dos hits encontrados na triagem em larga escala da biblioteca DIVERSet

HIT	% ATIVIDADE	HIT	% ATIVIDADE	HIT	% ATIVIDADE
1	20	6	79,7	11	80,9
2	22,9	7	80,2	12	81,3
3	40,8	8	80,3	13	81,4
4	73	9	80,5		
5	76,8	10	80,6		

Fonte: Elaborada pelo autor

Interessante notar que, na primeira triagem, 4 moléculas se destacam por serem análogas. São as moléculas 3, 7, 10 e 13 (figura 30).

Figura 30 – Estrutura química dos análogos encontrados na triagem em larga escala da biblioteca NDL que tiveram atividade inibitória frente à DacA.

Fonte: Elaborada pelo autor

Todas elas possuem um anel púrico em comum, com modificações principalmente nas posições 8 e 9 (figura 31-A). Como comparativo, o ATP (figura 31-B) possui a ribose e os fosfatos como modificação na posição 9. Visualizando a estrutura cristalográfica da DacA ligada ao ATP, pode-se notar dois bolsões (figura 31-C). Tentando imaginar a razão desses 4 análogos terem alguma inibição frente à enzima, e analisando precisamente esses diferentes radicais, modificações na posição 8 pode levar ao crescimento da molécula para o bolsão em azul, supondo que a interação enzima-inibidor ocorra no sítio ativo. Assim, propostas de modificações desses radicais, levando em conta sua estrutura e a taxa de inibição, pode levar a novas moléculas que explorem esses bolsões de forma a melhorar cada vez mais sua atividade inibitória frente à DacA.

Figura 31 – (A) Estrutura química comum observada nos análogos encontrados. Anel púrico, com 3 posições para substituintes: R₁ na posição 6, R₂ na posição 8 e R₃ na posição 9. (B) Estrutura química do ATP. O substituinte na posição R₁ é uma amina. Na posição R₃ é a ribose e os fosfatos. (C) Estrutura cristalográfica mostrando os possíveis bolsões para crescimento (modificações) das moléculas.

Fonte: Elaborada pelo autor

Na segunda biblioteca testada, verifica-se duas moléculas análogas, que possuem o 1,3-diazanftaleno como estrutura comum (figura 32).

Figura 32 – (A) Estrutura química do 1,3-diazanftaleno observada nos análogos encontrados. Possui 3 posições para substituintes: R₁ na posição 2, R₂ na posição 3 e R₃ na posição 4. (B) Estrutura química do composto 1, evidenciando as três modificações. (C) Estrutura química do composto 10, evidenciando as três modificações.

Fonte: Elaborada pelo autor

Essas análises que relacionam a estrutura das moléculas encontradas, com os valores correspondentes de porcentagem de inibição será útil na etapa de propor modificações racionais nos compostos, a fim de encontrarmos moléculas cada vez mais potentes frente à enzima DacA.

Vale mencionar que essas duas bibliotecas foram usadas para triagem pelo grupo do Prof. Artur Cordeiro, frente a uma proteína completamente diferente. Nenhuma das moléculas encontradas aqui correspondem às moléculas encontradas por ele. Isso demonstra que esses *hits* não são promíscuos, ou seja, não possui interações com vários alvos. Muitas vezes, quando se faz esse tipo de abordagem em larga escala, é comum encontrarmos compostos que interagem com vários sistemas. Esse tipo de composto não é interessante, uma vez que não possui especificidade alguma, e moléculas sem especificidade por um alvo proteico não são boas candidatas à fármacos. Ainda, bons candidatos devem possuir boa farmacocinética, ou seja, devem ser absorvidos, distribuídos, metabolizados e excretados (ADME) do organismo humano.

4.4 Resolução estrutural por difração de raios-X do complexo enzima-inibidor

4.4.1 *Fragment-based Drug Discovery*

4.4.1.1 Refinamento dos conjuntos obtidos

Dentre os aproximadamente 600 conjuntos de dados de difração coletados a partir de cristais imersos em soluções contendo fragmentos únicos, uma análise inicial em larga escala mostrou que 29 conjuntos de dados potencialmente apresentavam fragmentos ligados à enzima DacA. Esses conjuntos foram refinados, e ao final dos procedimentos, 11 confirmaram a presença do fragmento, de acordo com a boa densidade eletrônica ao redor do ligante. Importante ressaltar que, interessante, não apenas foram encontrados fragmentos com interações no sítio ativo, mas também em outros dois sítios alostéricos (Figura 33). Mais surpreendente ainda, um desses sítios é a interface dimérica. Como foi mostrado anteriormente, essa interface é essencial para a reação enzimática da DacA. Vale mencionar também que nenhum dos fragmentos aqui encontrados possui relação com as moléculas encontradas no HTS (seção 4.3.4).

Figura 33 – Sobreposição das estruturas refinadas, evidenciando os sítios de interação enzima-ligante encontrados: 1- sítio ativo; 2- interface dimérica; 3 e 3'- sítios alostérico.

Fonte: Elaborada pelo autor

Dessa forma, tem-se 11 conjuntos de fragmentos que foram divididos em 3 grupos, dependendo de sua localização: sítio ativo, interface dimérica ou sítio alostérico (Tabela 6).

Tabela 6 – Conjuntos cristalográficos foram divididos em 3 grupos, utilizando como critério de divisão a localização dos ligantes na molécula de DacA. Tem-se 5 conjuntos com ligantes no sítio ativo, 1 conjuntos presentes na interface dimérica e 5 conjuntos em um sítio alostérico. O código para identificação de cada ligante é o mesmo utilizado na biblioteca de fragmentos do SGC.

Sítio ativo	x1051; x1095; x1204; x1210; x1213
Interface Dimérica	x1254
Sítio Alostérico	x1053; x1119; x1201; x1229 e x1251

Fonte: Elaborada pelo autor

Os resultados finais de processamento de dados e refinamento de todos os conjuntos estão sumarizados nas tabelas 7, 8 e 9. Adicionalmente, a tabela 7 apresenta, como comparativo, os mesmos dados para um conjunto de DacA nativa ligada ao ATP e manganês. Esse último conjunto foi obtido, processado e refinado pela Nathalya, durante seu doutorado.

Tabela 7 – Parâmetros estatísticos da coleta, processamento e refinamento dos dados cristalográficos da DacA com diferentes ligantes. Entre parênteses se encontram os dados referentes à última faixa de resolução

Conjunto de Dados	DacA (ATP+Mn)	Sítio Ativo				
		DacA x1051	DacA x1095	DacA x1204	DacA x1210	DacA x1213
Comprimento de Onda, Å	1.5418	0.9173	0.9173	0.9173	0.9173	0.9173
Grupo Espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Célula Unitária, Å	41.7, 79.5, 94.8, 90°, 90°, 90°	42.5, 79.6, 94.6, 90°, 90°, 90°	42.3, 79.4, 94.8, 90°, 90°, 90°	41.8, 79.3, 94.6, 90°, 90°, 90°	42.0, 79.6, 94.7, 90°, 90°, 90°	41.9, 79.4, 94.8, 90°, 90°, 90°
Intervalo de Resolução, Å	60.9 - 1.4 (1.5 - 1.4)	60.9 - 1.1 (1.2 - 1.1)	60.9 - 1.1 (1.2-1.1)	60.8 - 1.2 (1.3-1.2)	60.8 - 1.1 (1.2-1.1)	60.8 - 1.1 (1.2-1.1)
Reflexões Totais	262306 (24815)	550179 (8961)	559932 (9155)	541622 (14236)	537728 (8762)	555944 (8943)
Reflexões Únicas	114248 (14904)	108601 (5504)	108633 (5547)	98711 (5450)	109101 (5984)	106998 (5399)
Completeza, %	95.0 (76.5)	95.2 (66.1)	95.2 (67.1)	96.7 (73.2)	93.7 (60.5)	94.8 (66.5)
Redundância	2.3 (1.7)	5.1 (1.6)	5.2 (1.7)	5.2 (1.7)	4.9 (1.5)	5.2 (1.7)
I/σ (I)	12.0 (1.6)	17.9 (1.1)	14.8 (1.2)	14.7 (1.1)	15.1 (1.2)	16.8 (1.1)
R-meas, %	5.2 (69.7)	4.8 (90.5)	5.5 (69.2)	5.4 (111.2)	4.2 (60.8)	4.6 (87.3)

(continua)

(conclusão)

Tabela 7 – Parâmetros estatísticos da coleta, processamento e refinamento dos dados cristalográficos da DacA com diferentes ligantes do sítio ativo. Entre parênteses se encontram os dados referentes à última faixa de resolução.

Refinamento						
R-work, %	17.08	15.45	15.78	16.33	15.19	15.83
R-free, %	19.75	18.27	17.98	19.75	18.02	18.33
Número de átomos						
Proteína	4905	5088	5137	5013	4877	5019
Ligante	43	44	21	26	22	15
Água	361	477	471	380	361	362
B-factor médio						
Proteína	24.1	19.6	17.6	17.1	21.4	17.8
Ligante	73.2	23.9	19.8	47.0	42.7	42.1
Água	33.0	31.1	29.7	29.4	32.6	29.3
RMSD						
Ligações, Å	0.010	0.008	0.017	0.009	0.008	0.009
Ângulos, °	1447	1318	2507	1245	1292	1253
Ramachandran %						
Favoráveis	98.1	97.2	97.5	97.5	97.2	97.8
Permitidas	1.6	2.2	1.5	2.2	2.2	2.2
Não permitidas	0.3	0.6	1.0	0.3	0.6	0.0

Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 8 – Parâmetros estatísticos da coleta, processamento e refinamento dos dados cristalográficos da DacA com diferentes ligantes da interface dimérica. Entre parênteses se encontram os dados referentes à última faixa de resolução.

Conjunto de Dados	Interface Dimérica DacA x1254
Comprimento de Onda, Å	0.9173
Grupo Espacial	P222
Célula Unitária, Å	42.0, 79.5, 94.1, 90°, 90°, 90°
Intervalo de Resolução, Å	60.7 - 1.3 (1.4-1.3)
Reflexões Totais	379661 (59903)
Reflexões Únicas	23433 (4245)
Completeza, %	99.3 (97.0)
Redundância	6.3 (5.5)
I/σ (I)	17.8 (2.3)
R-meas, %	5.2 (59.6)
Refinamento	
R-work, %	15.58
R-free, %	19.70
<u>Número de átomos</u>	
Proteína	5018
Ligante	32
Água	430
<u>B-factor médio</u>	
Proteína	22.1
Ligante	23.0
Água	31.1
<u>RMSD</u>	
Ligações, Å	0.009
Ângulos, °	1.226
<u>Ramachandran %</u>	
Favoráveis	97.8
Permitidas	2.2
Não permitidas	0.0

Fonte : Elaborada pelo autor

Tabela 9 – Parâmetros estatísticos da coleta, processamento e refinamento dos dados cristalográficos da DacA com diferentes ligantes do sítio alostérico. Entre parênteses se encontram os dados referentes à última faixa de resolução.

Conjunto de Dados	Sítio alostérico				
	DacA x1053	DacA x1119	DacA x1201	DacA x1229	DacA x1251
Comprimento de Onda, Å	0.9173	0.9173	0.9173	0.9173	0.9173
Grupo Espacial	P222	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P222	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Célula Unitária, Å	42.2, 79.5, 94.7, 90°, 90°, 90°	42.1, 79.4, 94.5, 90°, 90°, 90°	42.0, 79.5, 94.8, 90°, 90°, 90°	42.6, 80.1, 95.0, 90°, 90°, 90°	42.2, 79.5, 94.4, 90°, 90°, 90°
Intervalo de Resolução, Å	60.9 - 1.4 (1.4-1.5)	60.8 - 1.2 (1.2-1.3)	60.9 - 1.0 (1.1-1.0)	61.2 - 1.4 (1.4-1.5)	60.8 - 1.4 (1.4-1.5)
Reflexões Totais	329445 (22846)	511474 (19743)	569001 (1411)	385996 (22417)	379507 (22137)
Reflexões Únicas	52994 (3670)	90667 (5948)	114387 (1304)	64848 (4737)	62164 (4506)
Completeza, %	99.2 (94.6)	97.7 (88.2)	81.4 (12.8)	99.9 (99.6)	99.9 (99.9)
Redundância	6.2 (6.2)	5.6 (3.3)	5.0 (1.1)	6.0 9(4.7)	6.1 (4.9)
I/σ (I)	16.4 (2.4)	12.4 (1.3)	17.5 (1.2)	15.6 (1.3)	20.0 (1.4)
R-meas, %	8.0 (63.2)	8.4 (112.4)	4.4 (34.6)	6.6 (127.3)	5.6 (123.9)

(continua)

(conclusão)

Tabela 9 – Parâmetros estatísticos da coleta, processamento e refinamento dos dados cristalográficos da DacA com diferentes ligantes do sítio alostérico. Entre parênteses se encontram os dados referentes à última faixa de resolução

Refinamento					
R-work, %	15.64	15.82	15.15	14.59	15.87
R-free, %	17.90	19.07	17.27	18.95	19.60
<u>Número de átomos</u>					
Proteína	5077	5056	5126	5065	5038
Ligante	28	15	18	12	18
Água	399	432	432	389	400
<u>B-factor médio</u>					
Proteína	18.0	19.5	16.5	23.9	21.0
Ligante	43.7	30.9	34.1	48.9	32.4
Água	29.4	31.5	30.8	33.3	30.6
<u>RMSD</u>					
Ligações, Å	0.013	0.008	0.008	0.009	0.009
ângulos, °	1.489	1.247	1.448	1.201	1.279
<u>Ramachandran %</u>					
Favoráveis	97.8	96.6	97.0	98.1	97.2
Permitidas	1.6	3.1	2.4	1.9	2.5
Não Permitidas	0.6	0.3	0.6	0.0	0.3

Fonte: Elaborada pelo autor

Todos os conjuntos foram resolvidos por substituição molecular, utilizando a DacA nativa como modelo, com 100% de identidade, uma vez que, em cada conjunto, apenas os ligantes que diferiam.

O refinamento foi feito a partir de processos iterativos, utilizando o COOT⁵² e Phenix⁵³. Ao final de cada processo automatizado feito pelo Phenix⁵³, foi checado manualmente no COOT⁵² o resultado do refinamento. Em todos os conjuntos, as coordenadas de cada átomo foram refinadas individualmente, assim como os fatores de temperatura (*B-factors*). Nas etapas finais do refinamento, as moléculas de proteína foi particionada em segmentos que foram refinados como corpos rígidos na operação TLS (*Translation/Libration/Screw*). Ainda, foram adicionados os átomos de hidrogênio, refinados individualmente da mesma forma, e as moléculas de água. O refinamento se deu por encerrado quando não houve mais mudança significativa nos valores de R_{free} e R_{work} .

4.4.1.2 Estudos estruturais dos fragmentos

(a) Conjuntos com ligantes no sítio ativo

Foram obtidos 5 conjuntos contendo ligantes presentes no sítio ativo da DacA (figura 34) com boa densidade eletrônica.

Figura 34 – Estrutura química dos ligantes refinados no sítio ativo da DacA. Os conjuntos x1051, x1095, x1204, x1210 e x1213 são referentes aos fragmentos da busca cristalográfica.

Fonte: Elaborada pelo autor

A título de comparação, a figura 35 a seguir mostra uma superposição das estruturas cristalográficas desses 5 conjuntos juntamente com a estrutura da DacA na presença do ATP.

Figura 35 – Superposição dos conjuntos refinados do sítio ativo com a estrutura da DacA com o ATP (em laranja). Os ligantes estão representados em cinza.

Fonte: Elaborada pelo autor

Nota-se uma interação entre o dipolo da hélice alfa (em rosa) e os fosfatos presentes no ATP. Ainda, percebe-se que os ligantes ocupam o sítio de interação do anel púrico da adenina.

Como forma de mostrar claramente a presença do ligante, foi feito um refinamento no modelo final omitindo o ligante, de forma que, o mapa diferença mostrasse a ausência do ligante. Esse mapa está mostrado na figura 36, explicitando as interações entre ligante-proteína.

Figura 36 – Representação do mapa diferença (em preto) do refinamento das estruturas com a omissão do ligante do sítio ativo. Em roxo é mostrado a hélice alfa responsável pela interação com os fosfatos do ATP. Os resíduos importantes para a interação entre o complexo enzima-ligante estão representados em bastões. As águas importantes para a interação estão mostradas como esferas vermelhas. A linha verde tracejada representa essa interação.

Fonte: Elaborada pelo autor

Como comparativo, é mostrada também a estrutura da DacA nativa, ressaltando o sítio de ligação do ATP. Pode-se notar claramente que os ligantes estão posicionados no local de interação da base púrica, adenina, do ATP através de uma interação do tipo π -stacking. Esse tipo de interação ocorre particularmente entre anéis aromáticos, de modo que os orbitais π de ambos anéis se influenciam mutuamente.

Vale notar que existem também outros resíduos que suportam a interação entre enzima-ligante. Particularmente, no conjunto x1051, pode-se notar que ocorrem interações de hidrogênio entre os resíduos R134, D102, L119 e Y118 e o ligante. Mais interessante, vê-se que houve uma mudança conformacional da Y118 e do D102 para que houvesse a possibilidade de interação com uma molécula de água presente na estrutura. No conjunto x1095, a interação é entre o ligante e a cadeia principal dos resíduos de L119 e D102. Já no conjunto x1204, tem-se os resíduos D102 e S117 fazendo interação com o ligante. Nos conjuntos x1210 e x1213 não possui interações aparentes do tipo ligação de hidrogênio.

(b) Conjuntos com ligantes na interface dimérica

Foi obtida 1 estrutura que continha ligante posicionado na interface do dímero de DacA (Figura 37).

Figura 37 – (A) Estrutura química do ligante encontrado no conjunto cristalográfico referente à busca por cristalografica de inibidores. (B) Superposição das estruturas x1254, que contem o ligante, e da DacA, que contem o ATP, evidenciando a interação do ligante com a interface dimérica.

Fonte: Elaborada pelo autor

Novamente, para mostrar a presença do ligante de forma absoluta, foi feito um ciclo de refinamento omitindo-o, de modo que o mapa diferença de densidade eletrônica acusasse a falta dele (figura 38).

Figura 38 – Representação do mapa diferença (em preto) do refinamento da estrutura com a omissão do ligante na interface dimérica. Os resíduos importantes para a interação entre o complexo enzima-ligante estão representados em bastões. As águas importantes para a interação estão mostradas como esferas vermelhas. A linha verde tracejada representa essa interação.

Fonte: Elaborada pelo autor

Interessante notar aqui que o resíduo Y53 parece ser essencial para o bom encaixe do ligante, fazendo interações do tipo π -stacking. Ainda, diversas águas intermedeiam a interação entre o resíduo Q87 e a piperidina (anel com o nitrogênio) presente no ligante, e a interação entre o resíduo N92 e o oxigênio no ligante.

(c) Conjuntos com ligantes no sítio alostérico

Foram refinadas 5 estruturas que continham ligantes posicionados fora do sítio ativo e da interface dimérica (Figura 39). Essas moléculas se encontram em dois sítios diferentes. Um está bem próximo do sítio ativo, particularmente próximo ao resíduo de tirosina (em roxo, figura 40) responsável pela interação com o anel púrico do ATP. O outro sítio está próximo ao C-terminal (hélice em vermelho) da enzima.

Figura 39 – Estrutura química dos ligantes do sítio ativo encontrados nas estruturas cristalográficas refinadas. Todos os conjuntos são provenientes da busca de inibidores por cristalografia.

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 40 – Superposição dos conjuntos refinados do sítio alostérico com a estrutura da DacA com o ATP (em laranja). Os ligantes estão representados em cinza.

Fonte: Elaborada pelo autor

Para verificar a presença do ligante, foi feito, aqui também, uma análise omitindo-o. A figura 41 mostra os mapas diferença para cada conjunto refinado.

Figura 41 – Representação do mapa diferença (em preto) do refinamento das estruturas com a omissão do ligante no sítio alostérico. Os resíduos importantes para a interação entre o complexo enzima-ligante estão representados em bastões. As águas importantes para a interação estão mostradas como esferas vermelhas. A linha verde tracejada representa essa interação.

Fonte: Elaborada pelo autor

Em todas essas estruturas, não houve nenhuma mudança significativa no sítio ativo devido a presença dos ligantes no sítio alostérico. Testes *in vitro*, como IC₅₀ podem ser feitos para comprovar se, de fato, há algum tipo de influência desses compostos na atividade enzimática da DacA. No entanto, pode-se notar na estrutura nativa que o resíduo Y118 possui duas conformações quando o ATP está ligado, mas é fixada em apenas uma na presença do ligante na estrutura x1053 (Figura 42).

Figura 42 – Superposição do conjunto x1053 (em amarelo) com a estrutura da DacA com ATP (em rosa). O resíduo de tirosina Y118, na estrutura com ATP se mostra em dupla conformação, para fazer interações do tipo π -stacking com o anel púrico do ATP. Entretanto, na estrutura x1053, esse resíduo possui uma outra conformação para se ajustar e fazer o mesmo tipo de interação com o anel imidazólico do ligante. Essa mudança de conformação pode gerar uma quebra na interação entre a tirosina e o ATP.

Fonte: Elaborada pelo autor

Talvez, com o resíduo Y118 fixado nessa posição, ocorre uma desestabilidade na interação com o ATP, levando a uma perda de atividade. Todos os outros resíduos responsáveis pela interação com os fosfatos e a ribose do ATP não tem nenhuma mudança posicional.

4.4.2 Busca de análogos baseados nos fragmentos encontrados

Com base nos fragmentos encontrados, fez-se uma busca em bancos de moléculas, como o *DrugBank* ⁵⁴, *ZINC Database* ⁵⁵ e *Specs*, a fim de encontrar moléculas análogas aos fragmentos.

Baseando-se nas estruturas dos fragmentos, 30 análogos foram adquiridos para testes *in vitro*, abordados na seção 4.5, e os testes cristalográficos, explicitados nessa seção. Dentre esses 30 análogos, 16 foram usados para mergulhar cristais de DacA, na tentativa de obter estruturas que continham o complexo enzima-inibidor. Essas 16 moléculas foram escolhidas de modo a tentar visualizar ligantes nos três sítios (sítio ativo, interface e sítio alostérico). Dessas, apenas 3 conjuntos possuíam cristais da enzima complexada com o ligante, sendo 2 conjuntos com ligante no sítio ativo e 1 conjunto com o ligante na interface dimérica. A tabela 10 mostra os dados estatísticos do processamento e refinamento desses conjuntos.

Tabela 10 – Parâmetros estatísticos da coleta, processamento e refinamento dos dados cristalográficos da DacA com os análogos dos fragmentos. Entre parênteses se encontram os dados referentes à última faixa de resolução.

Conjunto de Dados	Sítio Ativo		Interface Dimérica
	DacA D33	DacA G31	DacA G21
Comprimento de Onda, Å	1.4585	1.4585	1.4585
Grupo Espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Célula Unitária, Å	41.8, 79.0, 94.1, 90°, 90°, 90°	41.8, 79.1, 93.9, 90°, 90°, 90°	41.9, 79.4, 93.7, 90°, 90°, 90°
Intervalo de Resolução, Å	60.5 – 1.3 (1.4 – 1.3)	60.5 – 1.3 (1.4 – 1.3)	60.6 – 1.3 (1.4 – 1.3)
Reflexões Totais	370710 (17044)	349356 (17686)	375596 (17347)
Reflexões Únicas	60727 (6638)	60720 (7131)	60076 (6560)
Completeza, %	93.0 (63.8)	93.3 (68.6)	91.8 (63.0)
Redundância	6.1 (2.6)	5.7 (2.5)	6.2 (2.6)
I/σ (I)	14.6 (2.3)	13.12 (2.0)	21.8 (2.9)
R-meas, %	7.7 (52.0)	8.9 (44.4)	5.1 (37,7)
Refinamento			
R-work, %	16.90	17.56	14.41
R-free, %	20.39	20.31	19.39

(continua)

Tabela 110 – Parâmetros estatísticos da coleta, processamento e refinamento dos dados cristalográficos da DacA com os análogos dos fragmentos. Entre parênteses se encontram os dados referentes à última faixa de resolução

(conclusão)

<u>Número de átomos</u>			
Proteína	5031	4915	5128
Ligante	68	80	29
Água	432	466	445
<u>B-factor médio</u>			
Proteína	14.7	14.2	15.6
Ligante	37.6	32.7	20.3
Água	29.4	28.5	29.0
<u>RMSD</u>			
Ligações, Å	0.010	0.010	0.009
Ângulos, °	1303	1309	1237
<u>Ramachandran %</u>			
Favoráveis	97.2	97.4	97.8
Permitidas	2.5	2.6	2.2
Não Permitidas	0.3	0.0	0.0

Fonte: Elaborada pelo autor

Os dados foram coletados na linha MX-2 do LNLS (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, CNPEM, Campinas-SP), processados no XDS⁶⁰ e resolvidos da mesma forma que os fragmentos, por substituição molecular, com refinamento interativo usando o COOT⁵² e *Phenix*.⁵³

4.4.2.1 Estudos estruturais dos análogos

(a) Conjuntos com ligantes no sítio ativo

Foram obtidos 2 conjuntos com ligantes no sítio ativo. A estrutura química dessas 2 moléculas está mostrada na figura 43.

Figura 43 – Estrutura química das moléculas presentes no sítio ativo dos conjuntos D33 e G31.

Fonte: Elaborada pelo autor

Como comparativo, a figura 44 mostra a superposição desses conjuntos com a estrutura da DacA contendo o ATP no sítio ativo.

Figura 44 – Superposição das estruturas contendo os ligantes análogos no sítio ativo com a estrutura da DacA contendo o ATP.

Fonte: Elaborada pelo autor

A fim de mostrar com clareza a presença do ligante na estrutura cristalográfica, foi realizado um ciclo de refinamento omitindo o ligante (Figura 45). O mapa de densidade eletrônica mostra a falta de átomos justamente no local do ligante.

Nas estruturas D33 e G31, aparece a Y118 fazendo interação do tipo π -stacking, e o resíduo D102 e uma molécula de água interagindo com o ligante.

Figura 45 – Representação do mapa diferença (em preto) dos análogos presentes no sítio ativo. Em roxo é mostrado a hélice alfa responsável pela interação com os fosfatos do ATP. Os resíduos importantes para a interação entre o complexo enzima-ligante estão representados em bastões. As águas importantes para a interação estão mostradas como esferas vermelhas. A linha verde tracejada representa essa interação.

Fonte: Elaborada pelo autor

Os ligantes das estruturas D33 e G31 são derivados dos fragmentos presentes nos conjuntos x1204 e x1210. A figura 46 mostra uma superposição dessas estruturas, evidenciando o sítio de ligação dessas moléculas.

Figura 46 – Superposição dos conjuntos D33 e G31 e dos conjuntos x1204 e x1210.

Fonte: Elaborada pelo autor

Essas moléculas possuem uma estrutura básica composta por uma pirimidina fundida com um tiofeno (figura 47). Diferentes radicais R diferenciam cada uma das moléculas.

Figura 47 – Estrutura comum entre os ligantes dos conjuntos x1204, x1210, D33 e G31. Ainda é mostrado o grupo R, radical que modifica as moléculas.

Fonte: Elaborada pelo autor

Tendo essa estrutura básica, 14 moléculas derivadas dessa estrutura (figura 48) foram compradas e testadas *in vitro*. Todas essas moléculas tiveram seu IC₅₀ avaliado (vide seção 4.5). Em destaque estão aquelas cujas estruturas com o complexo enzima-inibidor foi determinada. A molécula AS-871/43477761 corresponde ao conjunto D33 e a molécula AO-364/37357010, ao conjunto G31. Seus valores de IC₅₀ foram, respectivamente, 4307 µM e 1797 µM.

Figura 48 – Estrutura química dos análogos que possuem o anel pirimidina fundido com o tiofeno como estrutura comum. Em destaque estão as moléculas dos conjuntos cristalográficos D33 (AS-871/43477761) e G31 (AO-364/37357010).

Fonte: Elaborada pelo autor

Os altos valores de IC_{50} encontrados refletem a baixa afinidade do inibidor pelo receptor. Ainda, o fato de estar trabalhando com fragmentos de moléculas, os valores de IC_{50} tendem a aumentar, uma vez que esses fragmentos não apresentam grupos químicos que conferem interação ótima entre a molécula e a enzima. Apesar do IC_{50} não ser um indicador direto da afinidade entre inibidor/receptor, os dois podem ser relacionados, especialmente em inibidores competentes, através da relação de Cheng-Prusoff. A principal informação que se obtém a partir desses valores é a relação com a estrutura da respectiva molécula, que nos fornece ideias de possíveis modificações racionais a fim de se obter moléculas cada vez mais eficientes na inibição da DacA.

(b) Conjuntos com ligantes na interface dimérica

Apenas um conjunto foi obtido que contivesse ligante na interface dimérica. A figura 49 mostra a estrutura química da molécula, e o mapa diferença de densidade eletrônica, evidenciando a presença do ligante.

Figura 49 – (A) Estrutura química do ligante presente na interface dimérica. (B) Representação do mapa diferença (em preto) do ligante na interface. Os resíduos importantes para a interação entre o complexo enzima-ligante estão representados em bastões. As águas importantes para a interação estão mostradas como esferas vermelhas. A linha verde tracejada representa essa interação.

Fonte: Elaborada pelo autor

Pode-se notar uma estrutura básica entre esse ligante, e o fragmento presente na interface dimérica, diferindo-os apenas de um radical metil (Figura 50).

Figura 50 – Estrutura química comum entre os ligantes. As modificações dos análogos ocorrem na posição do radical R.

Fonte: Elaborada pelo autor

Vale ressaltar aqui que 2 compostos derivados dessa estrutura comum tiveram seus valores de IC_{50} determinados. Um deles com valor de 54 μM e outro com 172,4 μM . Infelizmente não tiveram cristais ligados a essas moléculas para visualização do modo de interação entre enzima-inibidor. É possível, no entanto, especular alguma explicação racional para o bom valor de IC_{50} encontrado, levando em conta que são moléculas pequenas, com poucas modificações. Ambos os compostos possuem um grupo metanosulfonamida como radical (figura 51).

AN-584/43409544 AN-584/43409545

Figura 51 – Representação da estrutura química dos análogos dos fragmentos da interface dimérica que tiveram seu valor de IC_{50} avaliados. Grupo metanosulfonamida destacado com o círculo vermelho.

Fonte: Elaborada pelo autor

Esse grupo deve interferir de alguma forma na estabilidade das hélices (em rosa) que mantém os dímeros unidos, desestabilizando especialmente os resíduos L89 (amarelo), N92 (verde) e L100 (azul) responsáveis por manter as interações entre as hélices das cadeias A e B dos monômeros da DacA (figura 52).

Figura 52 – Representação dos aminoácidos essenciais responsáveis pela interação entre as hélices (em rosa) que compõem a interface dimérica. Em amarelo estão representados os resíduos de leucina 89, em verde, as asparaginas 92 e em azul, as leucinas 100.

Fonte: Elaborada pelo autor

Os resíduos de leucina formam um espaço hidrofóbico atrás das hélices, enquanto que os resíduos de asparagina formam interações com ligações de hidrogênio entre suas cadeias laterais e as cadeias principais das leucinas. Essas interações são as que mantêm a interface. Portanto, qualquer desestabilidade nessas interações pode ser o suficiente para quebrar o dímero.

Devido à importância desses aminoácidos para a manutenção do dímero, a doutora Nathalya Mesquita fez estudos com mutantes desses aminoácidos e mostrou que, quando não ocorre a formação do dímero, a reação catalítica não acontece, evidenciando a importância do dímero, e, portanto, dessa interface, para a eficiência da catálise enzimática.

Dessa forma, esses compostos achados com interação na interface dimérica oferecem um novo leque de possibilidades na tentativa de busca de inibidores, podendo agora achar moléculas que inibam de forma não competitiva ou incompetitiva a reação catalisada pela DacA.

4.5 Determinação dos valores de IC_{50} das moléculas análogas aos fragmentos

4.5.1 Validação do IC_{50} usando luminescência

Como forma de testar o funcionamento do ensaio de luminescência para a determinação do valor de IC_{50} , foi utilizado um inibidor conhecido da DacA, o α,β -metileno ATP. Diluições foram realizadas e o valor de IC_{50} foi calculado, mostrando a viabilidade de se utilizar esse tipo de ensaio na busca de novos inibidores.

O α,β -metileno ATP é um análogo do ATP, diferindo apenas de um radical metileno inserido após os fosfatos α e β , como mostra na figura 53 a seguir, comparando com a estrutura do ATP. Com a adição desse radical, a enzima não é capaz de realizar sua atividade catalítica, portanto, servindo como um inibidor padrão.

Figura 53 – (A) Estrutura bidimensional do ATP, em destaque, os fosfatos α , β e γ ; (B) Estrutura bidimensional do α,β -metileno ATP, destacando o radical metileno após o fosfato β .

Fonte: Elaborada pelo autor

Nesse ensaio foram realizadas diluições seriadas do composto, que variaram desde 2,152 mM até 1 μ M. A curva de IC₅₀ para o α,β -metileno ATP está mostrada na figura 54 a seguir. O valor de IC₅₀ encontrado foi de 208,7 μ M, com o valor de R² de 0,974.

Figura 54 – Curva de IC₅₀ do inibidor padrão α,β -metileno ATP. Em vermelho está mostrado a projeção do ponto de inflexão que reflete o valor do IC₅₀, resultando em 208,7 μ M.

Fonte: Elaborada pelo autor

Dessa forma, foi mostrado que esse ensaio pode ser usado para verificar os valores de IC₅₀ dos *hits* encontrados na triagem em larga escala.

4.5.2 Compostos derivados dos fragmentos da interface dimérica

Foram determinados por ensaio de absorvância os valores de IC₅₀ para os quatro compostos, derivados do fragmento encontrado na busca cristalográfica da interface dimérica. Dois deles apresentaram valores mensuráveis dentro do intervalo de variação da concentração de inibidor utilizada, variando de 500 μ M a 4 μ M. Os outros dois não apresentaram inibição dentro desse intervalo. Os compostos estão mostrados abaixo (Figura 55), juntamente com as curvas de dose-resposta para os compostos AN-584/43409544 e AN-584/43409545 (Figura 56).

AN-584/43409544

AN-584/43409545

AE-641/00613061

AE-641/09365045

Figura 56 – Estrutura química dos quatro compostos derivados de fragmentos da interface dimérica.

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 55 – (A) Curva de IC_{50} para o composto AN-584/43409544. O valor obtido de IC_{50} foi de 54,1 μ M. (B) Curva de IC_{50} para o composto AN-584/43409545. O valor obtido de IC_{50} foi de 172,4 μ M.

Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 121 – Valores de IC_{50} obtidos para os compostos da interface dimérica

COMPOSTO	IC_{50}	R^2
AN-584/43409544	54,1	0,998
AN-584/43409545	172,4	0,920
AE-641/00613061	-	-
AE-641/09365045	-	-

Fonte: Elaborada pelo autor

Pode-se verificar que os compostos AN-854/43409544 e AN-854/43409545 diferem apenas por um radical acetil, o que confere a grande diferença nas curvas de IC_{50} . Pode-se supor que esse grupo possui uma importante função na interação com os resíduos de aminoácidos presentes na interface dimérica, aumentando a afinidade pela enzima. Ainda, comparando-se com os outros dois compostos que não possuem o grupo metanosulfonamida em sua estrutura, a interação entre

enzima-inibidor não é suficiente para diminuir a atividade enzimática da DacA. Esse grupo, portanto, deve interferir de alguma forma na estabilidade do dímero, causando perda da atividade. Dessa maneira, juntamente com os dados cristalográficos, pode-se propor uma mudança estrutural inteligente nessas moléculas, no sentido de verificar a relação estrutura-atividade dos compostos, para *follow-up* a partir do esqueleto inicial do composto.

4.5.3 Compostos derivados dos fragmentos do sítio ativo

Foram determinados os valores de IC_{50} para os compostos que são derivados daqueles encontrados no sítio ativo. Esses valores foram determinados utilizando ensaios de luminescência. Foram utilizadas variações de concentração de composto de 8 mM até 30 μ M. Dos 23 compostos testados (figura 57), 11 tiveram valores de IC_{50} nesse intervalo, mostrado nas curvas de dose-resposta (Figura 58). Os outros 12 compostos não possuíram inibição nesse intervalo de concentração de inibidor testado.

Figura 57 – Estrutura química dos compostos derivados dos fragmentos da busca cristalográfica encontrados no sítio ativo.

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 55 – Curvas de IC₅₀ para os compostos: (A) AE-848/01007013, (B) AF-834/25000580, (C) AG-205/12040018, (D) AG-205/13182025, (E) AG-690/40819218, (F) AH-262/31954020, (G) AK-105/40836944, (H) AP-381/41075530, (I) AO-364/37357010, (J) AO-364/41189905, (K) AS-871/43477761. Todos os dados foram tratados no software GraphPad Prim 6.0, com *fitting* da curva sigmoidal.

Fonte: Elaborada pelo autor

(continua)

(continuação)

(continua)

(conclusão)

Figura 58 – Curvas de IC₅₀ para os compostos: (A) AE-848/01007013, (B) AF-834/25000580, (C) AG-205/12040018, (D) AG-205/13182025, (E) AG-690/40819218, (F) AH-262/31954020, (G) AK-105/40836944, (H) AP-381/41075530, (I) AO-364/37357010, (J) AO-364/41189905, (K) AS-871/43477761. Todos os dados foram tratados no *software* GraphPad Prim 6.0, com *fitting* da curva sigmoide.

Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 132 – Valores de IC₅₀ obtidos para os compostos do sítio ativo

COMPOSTO	IC ₅₀ (μM)	R ²
AE-848/01007013	3085	0,988
AF-834/25000580	1506	0,977
AG-205/12040018	1366	0,953
AG-205/13182025	2821	0,958
AG-690/40819218	2144	0,992
AH-262/31954020	2234	0,976
AK-105/40836944	1636	0,983
AP-381/41075530	1650	0,955
AO-364/37357010	1797	0,960
AO-364/41189905	3772	0,995
AS-871/43477761	4307	0,984

Fonte: Elaborada pelo autor

Os valores de IC₅₀ obtidos para esses compostos são relativamente alto, quando se pensa em potenciais fármacos. No entanto, precisa-se levar em conta que são compostos derivados de fragmentos encontrados em uma busca cristalográfica, sem nenhum tipo de teste *in vitro*. A ideia agora é propor modificações química baseadas na estrutura de cada composto e seu respectivo valor de IC₅₀ com a finalidade de melhorar significativamente esse valor, ou seja, obter valores cada vez mais baixos, o que indicaria que uma pequena concentração

de composto seria capaz de inibir cada vez mais a enzima. Uma boa forma de propor esse tipo de modificação é analisar compostos homólogos, e verificar como diferentes grupos químicos influenciam na atividade enzimática. Nesses compostos testados, vê-se claramente que 6 deles possuem uma estrutura em comum, contendo um anel pirimidínico fundido com um tiofeno (Figura 59).

Figura 59 – Estrutura comum encontrada nos análogos dos compostos do sítio ativo que possuem atividade inibitória frente a DacA. Todos os análogos possuem um anel pirimidina fundido com um tiofeno, com quatro possibilidades de modificações, R₁, R₂, R₃, e R₄.

Fonte: Elaborada pelo autor

Dentre esses homólogos, o melhor deles possui uma radical etil como modificação em R₄ (AG-205/12040018). Outros radicais maiores e de características mais hidrofílicas tem sua potência inibitória diminuída. Ainda, cristais de DacA foram mergulhados em soluções contendo essas moléculas, e 2 desses análogos tiveram a estrutura enzima-ligante resolvidas (seção 4.4.2.1.1).

4.6 Busca *in silico* de potenciais inibidores

O preparo das moléculas dos bancos de dados se deu, inicialmente, com o ajuste de parâmetros para que a molécula de ATP virtual se assemelhasse ao máximo com a encontrada cristalograficamente no cristal de DacA. Para isso, um confômero tridimensional do ATP foi gerado usando o software OMEGA⁶³ e então, os parâmetros dos programas ROCS (que faz a busca por similaridade estrutural e química) e EON (que faz a busca por similaridade eletrostática) foram otimizados. Os ajustes resultaram em valores de TanimotoCombo = 1,298 e ComboScore = 1,469. Esses valores variam entre 0 e 2, de modo que o valor 2 mimetizaria o ATP cristalográfico exatamente.

Uma vez ajustados os parâmetros, gerou-se os confômeros de todas as moléculas dos bancos de compostos, e buscou-se por similaridade com o ATP (ROCS⁶¹ e EON (EON 2.2.0.5: OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM)). Nessa

busca, as 100 000 moléculas mais bem ranqueadas foram usadas para a docagem molecular.

O sítio utilizado para a docagem foi o sítio ativo da DacA. Com o cuidado de manter todos os resíduos de aminoácidos importantes para a reação catalítica (figura 60A), um sítio receptor foi determinado para a docagem, cujas dimensões foram de 15,67 Å x 17,00 Å x 27,00 Å, com um volume de 7190 Å³ (Figura 60B).

Figura 60 – (A) Sítio de reação e principais interações do ATP com os resíduos do sítio ativo. (B) Representação gráfica do sítio receptor para a docagem das moléculas.

Fonte: Elaborada pelo autor

Uma vez preparado o sítio receptor, aquelas 100 000 moléculas foram docadas de duas formas diferentes, utilizando-se dos softwares FRED^{62; 64; 65} e HYBRID^{62; 64}. Como explicado na metodologia (seção 3.4), eles usam duas funções matemáticas diferentes, pontuando as moléculas de acordo com essas funções.

Os valores de saída avaliados dos programas ROCS, EON, FRED e HYBRID estão elucidados a seguir. Para atribuição de pesos iguais tanto para o planejamento baseado no ligante (que utiliza somente a similaridade dos compostos com o substrato) quanto para o planejamento baseado na estrutura (envolve a interação dos compostos com uma proteína alvo), foi feito o reescalonamento de todos os valores para o intervalo entre 0 e 1. Desse modo, o score final de todas as moléculas é a soma dos quatro valores reescalados. A Figura 61 a seguir mostra o fluxograma empregado, mostrando de forma mais sucinta, os processos realizados para a docagem molecular.

Figura 61: Fluxograma que representa os processos envolvidos na construção da biblioteca dirigida a partir da docagem virtual.

Fonte: Elaborada pelo autor

Ao final de todo o processo, foram obtidas 28.959 moléculas. Os valores da análise quimioinformática das 7 melhores moléculas estão mostrados na tabela 14.

Tabela 143 – Valores normalizados para as análises de similaridade eletrostática e estrutural do ligante (ROCS e EON) e de docagem molecular por duas funções matemáticas (FRED e HYBRID)

Nome do composto	ROCS	EON	FRED	HYBRID	ROCS + EON	FRED + HYBRID	FINAL
AK-918/12272134	0,838	0,720	0,787	0,899	1,558	1,686	3,244
AK-918/41450872	0,839	0,639	0,825	0,85	1,478	1,674	3,152
AK-968/12513081	0,751	0,677	0,840	0,843	1,428	1,683	3,110
AK-968/41171044	0,818	0,669	0,774	0,829	1,487	1,603	3,090
AG-690/36170006	0,776	0,695	0,807	0,807	1,471	1,614	3,085
AG-205/13579050	0,95	0,677	0,773	0,667	1,627	1,439	3,067
AK-918/12271006	0,701	0,677	0,840	0,847	1,377	1,687	3,065

Fonte: Elaborada pelo autor

A seguir (figura 62), encontram-se as representações dessas moléculas, bem como a estrutura do ATP, para fins comparativos. Pode-se perceber que existem algumas semelhanças, como a presença de anéis aromáticos que foram docados na mesma região do anel púrico, e também regiões com capacidade de realizar interações de hidrogênio, assim como os fosfatos do ATP possuem (figura 63A e 63B).

Figura 62 – Representação estrutural das 7 melhores moléculas com relação ao valor final da análise quimioinformática (ROCS+EON+FRED+HYBRID) em comparação com a estrutura do ATP.

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 63 – (A) Superposição da melhor molécula (AK-968/41171044) com o ATP no sítio ativo da DacA. (B) Superposição das 7 melhores moléculas no sítio ativo da DacA.

Fonte: Elaborada pelo autor

Comparando as moléculas obtidas na triagem virtual com todas as outras utilizadas até aqui, 11 possuem o anel púrico, também presente nos análogos encontrados na triagem em larga escala da biblioteca NDL (Figura 64); 1 possui o anel 1,3-diazanaftaleno encontrado nos análogos da biblioteca DIVERSet (Figura 65); e 3 moléculas possuem o anel pirimidina fundido com o tiofeno, estrutura encontrada nos análogos dos fragmentos do sítio ativo (Figura 66).

Figura 64 – Estrutura química dos análogos que possuem o anel purina como estrutura comum (em azul).

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 65 – Estrutura química dos análogos que possuem o anel 1,3-diazanaftaleno como estrutura comum (em azul).

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 66 – Estrutura química dos análogos que possuem o anel pirimidina fundido com o tiofeno como estrutura comum (em azul).

Fonte: Elaborada pelo autor

Essas moléculas provenientes da docagem molecular, que possuem estruturas semelhantes àsquelas encontradas por testes *in vitro*, seja no *high-throughput screening* ou no *fragment-based drug discovery*, mostra que a triagem *in silico* conseguiu capturar essas moléculas em meio aquelas 100.000 testadas, colocando-as entre as 480 melhores.

Conclusões

NESSA SEÇÃO ESTÃO DISPOSTAS AS CONCLUSÕES DO TRABALHO, E COMO ESSE TRABALHO PODE CONTER APLICAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.

5 CONCLUSÕES

A busca por moléculas capazes de atuar como inibidores da enzima DacA de *S. aureus* se deu por três diferentes frentes: busca *in silico* em bancos virtuais de moléculas, com docagem molecular dessas; busca em larga escala utilizando duas bibliotecas, uma contendo moléculas derivadas de compostos naturais (NLD), e outra contendo moléculas que representem diversos grupos farmacofóricos, através de ensaios de luminescência; busca cristalográfica em bibliotecas de pequenos fragmentos.

Dessas frentes, bons resultados foram obtidos na busca cristalográfica, principalmente achando compostos que interagiram com resíduos da interface dimérica da enzima. Juntando esse achado, com o fato de que sabidamente a DacA necessita do dímero para sua catálise enzimática, nos abre mais um caminho na busca de novas moléculas, agora que interagem nesse sítio, e não só no sítio catalítico. Isso possibilita novos tipos de inibições, como a incompetitiva ou a não-competitiva.

A principal conclusão que se pode tirar desses ensaios é a possibilidade de fazer modificações racionais nas estruturas das moléculas que se mostraram promissoras, com a finalidade de analisar como a relação entre a atividade inibitória se dá através de diferentes modificações de uma estrutura comum, através de estudos de SAR (relação entre estrutura-atividade, do inglês *structure-activity relationship*). As triagens em larga escala, e a busca cristalográfica nos permitiu identificar alguns grupos de moléculas análogas e avaliar os valores de IC₅₀ desses compostos nos dá pistas de como se comporta essas diferentes modificações.

A estrutura cristalográfica dos diferentes conjuntos coletados nos permitiu também detectar alguns bolsões na proteína nos quais há a possibilidade explorar novos caminhos para o crescimento e modificações racionais das moléculas nos estudos de SAR.

O objetivo final desse projeto será a identificação de um composto capaz de inibir a DacA de forma muito eficiente, com valores baixos de IC₅₀ (na faixa de nanomolar), de forma seletiva e, principalmente, que seja capaz de atuar de forma eficaz em células humanas. Para isso, os estudos continuarão a ser desenvolvidos, com testes da atividade inibitória da biblioteca obtida virtualmente e dos *hits*

identificados na triagem em larga escala, com ajuda de ensaios cristalográficos para visualização da estrutura e interação do complexo enzima-inibidor.

Diversas bactérias possuem apenas uma cópia dessa proteína, e os processos dependentes do c-di-AMP muitas vezes são essenciais para a sobrevivência bacteriana. Apesar dos estudos de diadenilatos ciclases estar no começo, muito esse sistema tem a oferecer, principalmente na área terapêutica de controle de infecções, e muito vem sendo descoberto nos últimos anos.

REFERÊNCIAS

- 1 MEHNE, F. M. et al. Cyclic di-AMP homeostasis in bacillus subtilis: both lack and high level accumulation of the nucleotide are detrimental for cell growth. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 3, p. 2004-2017, 2013.
- 2 CORRIGAN, R. M.; GRUNDLING, A. Cyclic di-AMP: another second messenger enters the fray. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 8, p. 513-524, 2013.
- 3 BEJERANO-SAGIE, M. et al. A checkpoint protein that scans the chromosome for damage at the start of sporulation in Bacillus subtilis. **Cell**, v. 125, n. 4, p. 679-690, 2006.
- 4 WITTE, G. et al. Structural biochemistry of a bacterial checkpoint protein reveals diadenylate cyclase activity regulated by DNA recombination intermediates. **Molecular Cell**, v. 30, n. 2, p. 167-178, 2008.
- 5 CORRIGAN, R. M. et al. c-di-AMP is a new second messenger in Staphylococcus aureus with a role in controlling cell size and envelope stress. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 9, p. e1002217, 2011.
- 6 CHRISTEN, M. et al. Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 35, p. 30829-30837, 2005.
- 7 ENZCHEK Pyrophosphate Assay Kit. 2003. Disponível em: <<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp06645.pdf>>. Acesso em: 28/07/2016.
- 8 TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology**: an introduction. 10th ed. San Francisco, CA: Pearson Benjamin Cummings, 2010.
- 9 NICOLAS, P. et al. Condition-dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in Bacillus subtilis. **Science**, v. 335, n. 6072, p. 1103-1106, 2012.
- 10 ZHANG, L.; LI, W.; HE, Z. G. DarR, a TetR-like transcriptional factor, is a cyclic di-AMP-responsive repressor in Mycobacterium smegmatis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 5, p. 3085-3096, 2013.
- 11 KORESAWA, M.; OKABE, T. High-throughput screening with quantitation of ATP consumption: a universal non-radioisotope, homogeneous assay for protein kinase. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 2, n. 2, p. 153-160, 2004.
- 12 KALIA, D. et al. Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 1, p. 305-341, 2013.
- 13 ZHENG, Y. et al. Identification of bromophenol thiohydantoin as an inhibitor of DisA, a c-di-AMP synthase, from a 1000 compound library, using the coralyne assay. **Chemical Communications**, v. 50, n. 76, p. 11234-11237, 2014.

- 14 LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 9, p. 1265-1273, 2003.
- 15 SKINNER, D.; KEEFER, C. S. Significance of bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*. **Archives of Internal Medicine**, v. 68, p. 851-875, 1941.
- 16 RAMMELKAMP, C. H.; MAXON, T. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin. **Experimental Biology and Medicine**, v. 51, p. 386-389, 1942.
- 17 ERIKSEN, K. R. ["Celbenin"-resistant staphylococci]. **Ugeskr for Laeger**, v. 123, p. 384-386, 1961.
- 18 FRIDKIN, S. K. et al. Epidemiological and microbiological characterization of infections caused by *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin, United States, 1997-2001. **Clinical Infection Diseases**, v. 36, n. 4, p. 429-439, 2003.
- 19 TSIODRAS, S. et al. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. **Lancet**, v. 358, n. 9277, p. 207-208, 2001.
- 20 ROMLING, U. Great times for small molecules: c-di-AMP, a second messenger candidate in Bacteria and Archaea. **Science Signaling**, v. 1, n. 33, p. pe39, 2008.
- 21 SUTHERLAND, E. W.; RALL, T. W. Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. **Journal of Biological Chemistry**, v. 232, n. 2, p. 1077-1091, 1958.
- 22 SHEMAROVA, I. V. cAMP-dependent signal pathways in unicellular eukaryotes. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 23-42, 2009.
- 23 ASHMAN, D. F. et al. Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 11, p. 330-334, 1963.
- 24 KOTS, A. Y. et al. A short history of cGMP, guanylyl cyclases, and cGMP-dependent protein kinases. In: SCHIMIDT, H. H. H. et al. (Ed.) **Handbook of Experimental Pharmacology**. Berlin : Springer-Verlag, 2009. v. 191, p. 1-14.
- 25 VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. 4th ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2011.
- 26 KYLE, B. D. et al. Specific phosphorylation sites underlie the stimulation of a large conductance, Ca(2+)-activated K(+) channel by cGMP-dependent protein kinase. **FASEB Journal**, v. 27, n. 5, p. 2027-2038, 2013.
- 27 GORKE, B.; STULKE, J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 8, p. 613-624, 2008.
- 28 BOTSFORD, J. L.; HARMAN, J. G. Cyclic AMP in prokaryotes. **Microbiology Reviews**, v. 56, n. 1, p. 100-122, 1992.

- 29 LINDER, J. U. cGMP production in bacteria. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 334, n. 1-2, p. 215-219, 2010.
- 30 ROSS, P. et al. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. **Nature**, v. 325, n. 6101, p. 279-281, 1987.
- 31 RYJENKOV, D. A. et al. Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: insights into biochemistry of the GGDEF protein domain. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 5, p. 1792-1798, 2005.
- 32 WOLFE, A. J.; VISICK, K. L. Get the message out: cyclic-Di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 2, p. 463-475, 2008.
- 33 SONG, J. H. et al. Identification of essential genes in *Streptococcus pneumoniae* by allelic replacement mutagenesis. **Molecular Cells**, v. 19, n. 3, p. 365-374, 2005.
- 34 CHAUDHURI, R. R. et al. Comprehensive identification of essential *Staphylococcus aureus* genes using transposon-mediated differential hybridisation (TMDH). **BMC Genomics**, v. 10, p. 291, 2009.
- 35 WOODWARD, J. J.; IAVARONE, A. T.; PORTNOY, D. A. c-di-AMP secreted by intracellular *Listeria monocytogenes* activates a host type I interferon response. **Science**, v. 328, n. 5986, p. 1703-1705, 2010.
- 36 LUO, Y.; HELMANN, J. D. Analysis of the role of *Bacillus subtilis* sigma(M) in beta-lactam resistance reveals an essential role for c-di-AMP in peptidoglycan homeostasis. **Molecular Microbiology**, v. 83, n. 3, p. 623-639, 2012.
- 37 CORRIGAN, R. M. et al. Cross-talk between two nucleotide-signaling pathways in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 9, p. 5826-5839, 2015.
- 38 HUYNH, T. N. et al. An HD-domain phosphodiesterase mediates cooperative hydrolysis of c-di-AMP to affect bacterial growth and virulence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 7, p. E747-756, 2015.
- 39 BAI, Y. et al. Two DHH subfamily 1 proteins in *Streptococcus pneumoniae* possess cyclic di-AMP phosphodiesterase activity and affect bacterial growth and virulence. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 22, p. 5123-5132, 2013.
- 40 DENGLER, V. et al. Mutation in the C-di-AMP cyclase *dacA* affects fitness and resistance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e73512, 2013.
- 41 CUTHBERTSON, L.; NODWELL, J. R. The TetR family of regulators. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 3, p. 440-475, 2013.
- 42 VIEIRA-PIRES, R. S.; SZOLLOSI, A.; MORAIS-CABRAL, J. H. The structure of the KtrAB potassium transporter. **Nature**, v. 496, n. 7445, p. 323-328, 2013.

- 43 CORRIGAN, R. M. et al. Systematic identification of conserved bacterial c-di-AMP receptor proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 22, p. 9084-9089, 2013.
- 44 SMITH, W. M. et al. Heat resistance and salt hypersensitivity in *Lactococcus lactis* due to spontaneous mutation of lmg_1816 (gdpP) induced by high-temperature growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 21, p. 7753-7759, 2012.
- 45 BAI, Y. et al. Cyclic di-AMP impairs potassium uptake mediated by a cyclic di-AMP binding protein in *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, v. 196, n. 3, p. 614-623, 2014.
- 46 TALARO, K. P.; CHESS, B. **Foundations in microbiology**. 9th ed. New York, NY: McGraw-Hill Education, 2015.
- 47 BAKI, A. et al. A high throughput luminescent assay for glycogen synthase kinase-3 β inhibitors. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 5, n. 1, p. 75-83, 2007.
- 48 KASHEM, M. A. et al. Three mechanistically distinct kinase assays compared: Measurement of intrinsic ATPase activity identified the most comprehensive set of ITK inhibitors. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 12, n. 1, p. 70-83, 2007.
- 49 WALSH, D. A.; GLASS, D. B. Utilization of the inhibitor protein of adenosine cyclic monophosphate-dependent protein kinase, and peptides derived from it, as tools to study adenosine cyclic monophosphate-mediated cellular processes. **Methods in Enzymology**, v. 201, p. 304-316, 1991.
- 50 HIDAKA, H.; WATANABE, M.; KOBAYASHI, R. Properties and use of H-series compounds as protein kinase inhibitors. **Methods in Enzymology**, v. 201, p. 328-339, 1991.
- 51 ZHANG, J. H.; CHUNG, T. D.; OLDENBURG, K. R. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 4, n. 2, p. 67-73, 1999.
- 52 EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica D**, v. 60, n. Pt 12 Pt 1, p. 2126-2132, 2004.
- 53 ADAMS, P. D. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallographica D**, v. 66, n. Pt 2, p. 213-221, 2010.
- 54 WISHART, D. S. et al. DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. Database issue, p. D668-672, 2006.
- 55 IRWIN, J. J. et al. ZINC: a free tool to discover chemistry for biology. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 7, p. 1757-1768, 2012.

- 56 ECHOLS, N. et al. Automating crystallographic structure solution and refinement of protein-ligand complexes. **Acta Crystallographica D**, v. 70, n. Pt 1, p. 144-154, 2014.
- 57 KLEI, H. E. et al. Ligand placement based on prior structures: the guided ligand-replacement method. **Acta Crystallographica D**, v. 70, n. Pt 1, p. 134-143, 2014.
- 58 AFONINE, P. V. et al. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. **Acta Crystallographica D**, v. 68, n. Pt 4, p. 352-367, 2012.
- 59 KARPLUS, P. A.; DIEDERICHS, K. Linking crystallographic model and data quality. **Science**, v. 336, n. 6084, p. 1030-1033, 2012.
- 60 KABSCH, W. Xds. **Acta Crystallographica D**, v. 66, n. Pt 2, p. 125-132, 2010.
- 61 HAWKINS, P. C.; SKILLMAN, A. G.; NICHOLLS, A. Comparison of shape-matching and docking as virtual screening tools. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 1, p. 74-82, 2007.
- 62 MCGANN, M. FRED and HYBRID docking performance on standardized datasets. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 26, n. 8, p. 897-906, 2012.
- 63 HAWKINS, P. C. et al. Conformer generation with OMEGA: algorithm and validation using high quality structures from the Protein Databank and Cambridge Structural Database. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, n. 4, p. 572-584, 2010.
- 64 KELLEY, B. P. et al. POSIT: Flexible Shape-Guided Docking For Pose Prediction. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 55, n. 8, p. 1771-1780, 2015.
- 65 MCGANN, M. FRED pose prediction and virtual screening accuracy. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 3, p. 578-596, 2011.