

JOÃO HENRIQUE PIMENTA GIUDICE

**Estudo Estrutural e Biofísico de Três Enzimas da Via do Folato de
Microorganismos Patogênicos**

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

São Paulo
2017

JOÃO HENRIQUE PIMENTA GIUDICE

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

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Marcio Vinicius Bertacine Dias

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

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Giudice, João Henrique Pimenta
Estudos Estruturais e Biofísicos de Três Enzimas
da Via do Folato em Microorganismos Patogênicos /
João Henrique Pimenta Giudice; orientador Márcio
Vinicius Bertacine Dias. -- São Paulo, 2017.
85 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Folato. 2. Microorganismos Patogênicos. 3.
Resistência. I. Dias, Márcio Vinicius Bertacine,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): João Henrique Pimenta Giudice

Título da Dissertação: Estudo estrutural e biofísico de três enzimas da via do folato de microrganismos patogênicos

Orientador: Prof. Dr. Marcio Vinicius Bertacine Dias

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a **05/02/2018**, considerou o(a) candidato(a):

Aprovado(a) () **Reprovado(a)**

Examinador(a):

Nome: Gustavo Fernando Mercaldi
Instituição: Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais

Examinador(a):

Nome: Manoel de Arcisio Miranda Filho
Instituição: Universidade Federal de São Paulo

Examinador(a):

Nome: Ana Marcia de Sá Guimarães
Instituição: Universidade de São Paulo

Presidente:

Nome: Márcio Vinicius Bertacine Dias
Instituição: Universidade de São Paulo



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Linou Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 746/15 referente ao projeto intitulado: "*Bases estruturais da Sensibilidade da Dihidropteroato Sintase de Mycobacterium tuberculosis e M. leprae as drogas Sulfonamidas*" sob a responsabilidade de **João Henrique Pimenta Giudice**, e orientação do Prof. Dr. **Márcio Vinicius Bertacine Dias**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPESH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n° 466 de 2012.

São Paulo, 18 de junho de 2015.

PROF. DR. WOTFLAV TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M. A. ZANOTTO
Coordenador da CEPESH - ICB/USP

EXPEDIÇÃO	
DATA	25,06,2015
REL. N.º	7463



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.180.2017

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado de Isenção **746/2015**, emitido em 18/06/2015, e por solicitação do Prof. Dr. **Márcio Vinícius Bertacine Dias**, do departamento de Microbiologia, informo que o título do projeto do aluno **João Henrique Pimenta Giudice**, foi alterado para "**Estudo Estrutural e Biofísico de Três Enzimas da Via de Folato de Microorganismos Patogênicos**" por solicitação da banca de qualificação.

São Paulo, 05 de setembro de 2017.

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA-ICB/USP

Profa. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
Coordenadora CEPESH-ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais que desde de sempre me apoiam e motivam em cada decisão

Ao Prof. Dr. Marcio Vinicius Bertacine Dias por ter me aceitado em seu grupo e me concedido essa oportunidade de realizar a Pós-Graduação

A todos meus amigos do grupo LBEA e LBEA transportadores pela convivência, amizade e apoio

A Larissa Antelo de Sá por ter me apresentado ao laboratório e ter me ensinado cada técnica que usamos no laboratório além de sempre oferecer ajudar sem esperar nada em troca

A João Ribeiro e Jademilson Celestino dos Santos por sempre se mostrarem disponíveis para poder me auxiliarem e ajudar em meus experimentos, por serem meus ‘‘segundos orientadores’’

A Sair Chavez Pacheco, Natália Cerrone, Catharina Santos e Cristiane Tambascia por sempre terem me auxiliado com excepcional paciência durante meus experimentos

A Fernanda Aparecida Heleno Batista e Adrián Velázquez Campoy por terem me auxiliado com a interpretação dos dados de Calorimetria de Titulação Isotérmica e Fluorescência com extrema paciência e generosidade

A Thiago Alegria por ter auxiliado e realizado os experimentos de Espalhamento de Luz Dinâmica

A banca examinadora por se disponibilizarem a corrigir meu trabalho e com isso contribuir para que este fique mais completo

Ao Instituto de Ciências Biomédicas e Departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo pela infraestrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho

A Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo (FAPESP) e ao CNPq por financiarem o projeto – Projeto 442021/2014-3 e Bolsa 2014/24486-2

*“Em algum lugar, algo
extraordinário está
esperando para ser
descoberto”*

Carl Sagan

RESUMO

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

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

Palavras-chaves: Microrganismos patogênicos. Resistência. Folato.

ABSTRACT

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

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

Keywords: Pathogenic Microorganism. Resistance. Folate

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Doenças emergentes e re-emergentes em um âmbito global.....	17
Figura 2 - Mapa geografico demonstrando os locais com maior incidência da tuberculose	18
Figura 3 - Mapa geografico com os locais de maior número de novos casos de hanseníase.....	20
Figura 4 - Biossíntese de folato para bactérias em geral	21
Figura 5 - Estrutura da MtDHNA.	22
Figura 6 - Estrutura do PABA, sulfanilamida e dapsona.....	23
Figura 7 - Alinhamento sequencial das enzimas BaDHPS, MtDHPS e MIDHPS.....	25
Figura 8 - Sobreposição das enzimas BaDHPS e MtDHPS.	27
Figura 9 - Sobreposição estrutural das DHFRs de <i>Homo sapiens</i> e de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	28
Figura 10 - Teste de expressão da DHNA de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PaDHPS).....	43
Figura 11 - Cromatograma de afinidade e Cromatograma de exclusão molecular de PaDHNA	44
Figura 12 - Curva de desnovelamento térmico da proteína DHNA.....	45
Figura 13 - Resultado obtido do DLS de PaDHNA	46
Figura 14 - Evolução do crescimento de cristais de PaDHNA.	48
Figura 15 - Padrão de difração da enzima PaDHNA.....	48
Figura 16 - Digestão do gene <i>Mycobacterium leprae folP</i> e vetor pET28b.....	49
Figura 17 - Digestão da ligação do gene <i>Mycobacterium leprae folP</i> em pET28b.....	50
Figura 18 - Gel SDS-PAGE da expressão de BaDHPS	51
Figura 19 - Gel SDS-PAGE das expressões dos mutantes T70S e P72R	52
Figura 20 - Afinidade de MIDHPS.	53
Figura 21 - A gel filtração MIDHPS	54
Figura 22 - DLS de MIDHPS.....	56
Figura 23 - Exclusão molecular de MIDHPS.....	57
Figura 24 - Cromatograma de afinidade IMAC de BaDHPS.....	58
Figura 25 - Gel-filtração de BaDHPS.....	59
Figura 26 - Purificação por afinidade dos mutantes de BaDHPS	60
Figura 27 - Exclusão molecular dos mutantes BaDHPS T70S	61
Figura 28 – Thermalfluor de BaDHPS e MIDHPS	63
Figura 29 - Termal shift de BaDHPS, T70S e P72R com ligantes	64
Figura 30 - Fluorescência de BaDHPS e mutantes.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 31 - Curva de titulação da proteína BaDHPS e seus respectivos mutantes T70S e P72R.	67
Figura 32 – Estruturas dos aminoácidos treonina, serina, prolina e arginina.....	68
Figura 33 – Gráfico dos valores da Energia Livre de Gibbs, entalpia, e entropia do ITC de BaDHPS e mutantes com a titulação de ácido pteróico.....	70
Figura 34 – Cristais de BaDHPS e mutantes.....	71
Figura 35 - Co-cristalização de BaDHPS com Dapsona.....	72
Figura 36 - Cristais de BaDHPS co-cristalizados com Sulfanilamida	72
Figura 37 - Cristais dos mutantes de BaDHPS	72
Figura 38 - Cristais de co-cristalização dos mutantes P72R e T70S com Ácido pteróico	73
Figura 39 - Padrão de difração dos cristais de BaDHPS co-cristalizados com Dapsona	73
Figura 40 - SDS-PAGE com amostras da exclusão molecular de MtDHFR sem a presença de His-tag.....	74
Figura 41 - Cristais de MtDHFR co-cristalizados com cicloguanil	75

Figura 42 - Sobreposição da estrutura aberta obtida por Dias et al., 2014 em complexo com NADPH e com a estrutura fechada em complexo com cicloguanil.....	77
Figura 43 – Rotação do Cicloguanil.	78
Figura 44 – Distâncias entre os aminoácidos Glutamina 28, Treonina 46, Serina 49, Leucina 50 e Tirosina 100 com o cicloguanil.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Primers utilizados na mutagênese sítio dirigidas.	36
Tabela 2- Configuração do ISS PC-1 utilizada nas corridas	39
Tabela 3- Configuração do MicroCal iTC200 utilizada nas corridas.....	40
Tabela 4- Dados de difração de raios-X obtidos para BaDHPS.....	74
Tabela 5 – Dados do refinamento de MtDHFR.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS

Mt	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> /Tuberculose
MI	<i>Mycobacterium leprae</i> /hanseníase/lepra
Ba	<i>Bacillus anthracis</i>
DHPS	Dihidropteroato sintase
DHNA	Dihidroneopterina aldolase
DHFR	Dihidrofolato redutase
T70S	Mutante de BaDHPS (Treonina 70 por Serina)
P72R	Mutante da BaDHPS (Prolina 72 por Arginina)
MDR	Cepas Multirresistentes
XDR	Cepas Extremamente Resistentes
Å	Angstrom
°C	Graus célcus
µg	Micrograma (10 ⁻⁶ g)
µL	Microlitro (10 ⁻⁶ L)
µM	Micromolar (10 ⁻⁶ M)
APS	Persulfato de amônio
cm	centímetro
DLS	Dynamic Light Scattering (espalhamento de luz dinâmico)
g	Gramma
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
KDa	QuiloDalton (10 ³ Dalton)
L	Litro
M	Molar (mol/L)
mg	miligrama (10 ⁻³ g)
mL	Mililitro (10 ⁻³ L)
mM	Milimolar(10 ⁻³ M)
ng	Nanograma (10 ⁻⁹ g)
nm	nanometro
pb	pares de base

PMSF	Fluoreto de fenilmetano sulfonilo
rpm	rotação por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylenediamine
U	Unidades
V	Volts
TMP	Trimetropim

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 PaDHPS	32
3.1.2 Clonagem, Expressão e Purificação de PaDHNA	32
3.1.3 Fluorometria de escaneamento diferencial de PaDHPS	33
3.1.4 Ensaios Biofísicos	33
3.1.5 Cristalização de PaDHPS	34
3.2 MIDHPS, BaDHPS, T70S e P72R	34
3.2.1 Clonagem do Gene folP1 de MIDHPS e BaDHPS	34
3.2.2 Mutagênese Sítio Dirigida dos Mutantes de BaDHPS e MIDHPS	35
3.2.3 Expressão e purificação de BaDHPS e MIDHPS.....	37
3.2.4 Thermalfluor de MIDHPS, BaDHPS, T70S e P72R	38
3.2.5 Calorimetria de Titulação Isotérmica e Fluorescência de BaDHPS, T70S e P72R ...	38
3.2.6 Cristalização de BaDHPS, T70S e P72R	40
3.3 DHFR	40
3.3.1 Expressão e Purificação de MtDHFR	40
3.3.2 Cristalização de MtDHFR em complexo com cicloguanil	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1 PaDHPS	42
4.1.2 Fluorometro de Escaneamento Diferencial de PaDHNA	44
4.1.3 Ensaios Biofísicos de PaDHNA	45
4.1.4 Cristalização PaDHNA	47
4.2 BaDHPS, T70S e P72R	49
4.2.1 Clonagem de MIDHP e BaDHPS.....	49
4.2.2 Mutagênese Sítio Dirigida dos Mutantes de BaDHPS, MIDHPS e MtDHPS.....	50
4.2.3 Expressão e Purificação de MIDHPS, BaDHPS, T70S e P72R.....	50
4.2.4 Thermoflour de MIDHPS, BaDHPS, T70S e P72R	62
4.2.5 Calorimetria de Titulação Isotérmica e Fluorescência das DHPS.....	64
4.2.6 Cristalização de BaDHPS, T70S e P72R	70
4.3 DHFR	74
4.3.1 Expressão e Purificação de DHFR	74
4.3.2 Estudos Estruturais de DHFR em complexo com Cicloguanil	75
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
REFERENCIAS*	82

1 INTRODUÇÃO

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

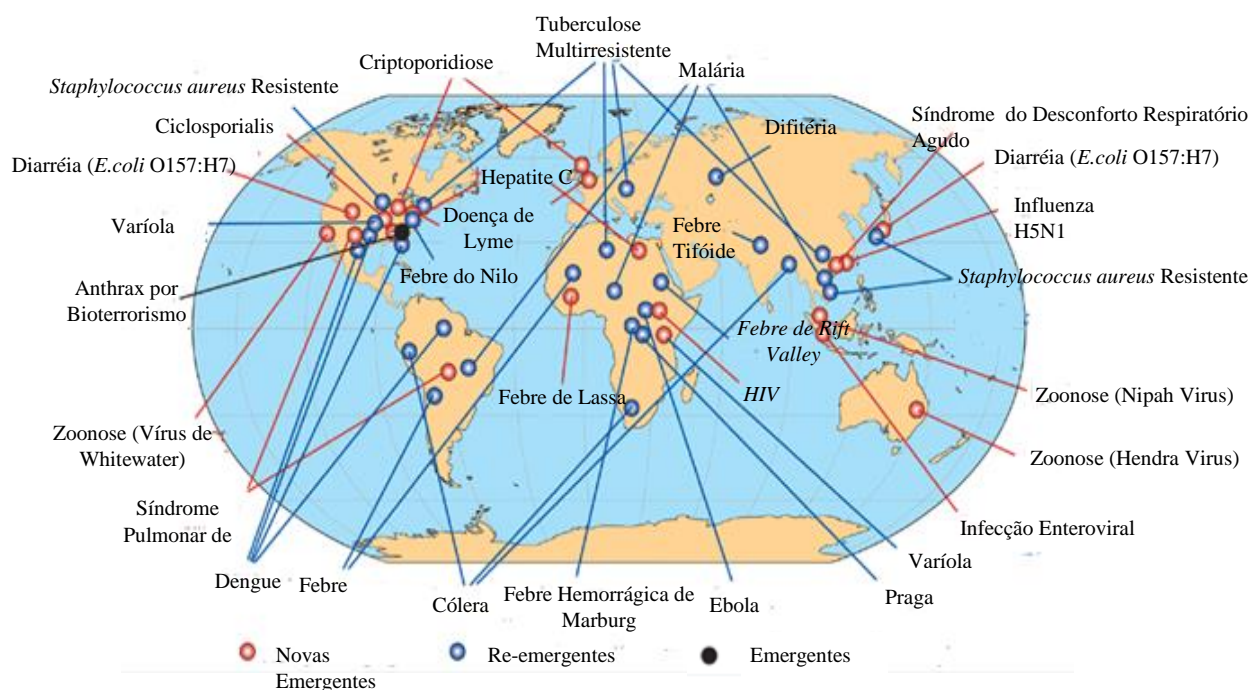


Figura 1 - Exemplos de doenças emergentes e re-emergentes em um âmbito global. É importante destacar a Tuberculose multirresistente, HIV e o bioterrorismo com *Bacillus anthracis*. Fonte: Organização Mundial da Saúde. Figura modificada

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

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

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

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

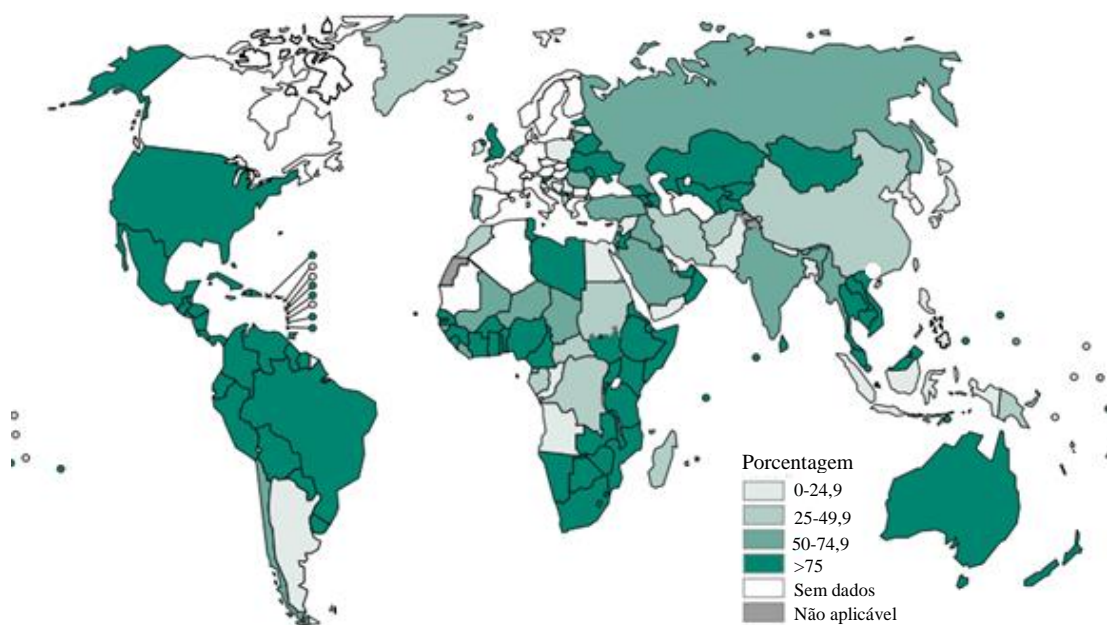


Figura 2 - Mapa ilustrando geograficamente os locais com maior incidência da tuberculose em 2016. Fonte: Global Tuberculosis Report 2016. Figura Modificada

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

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

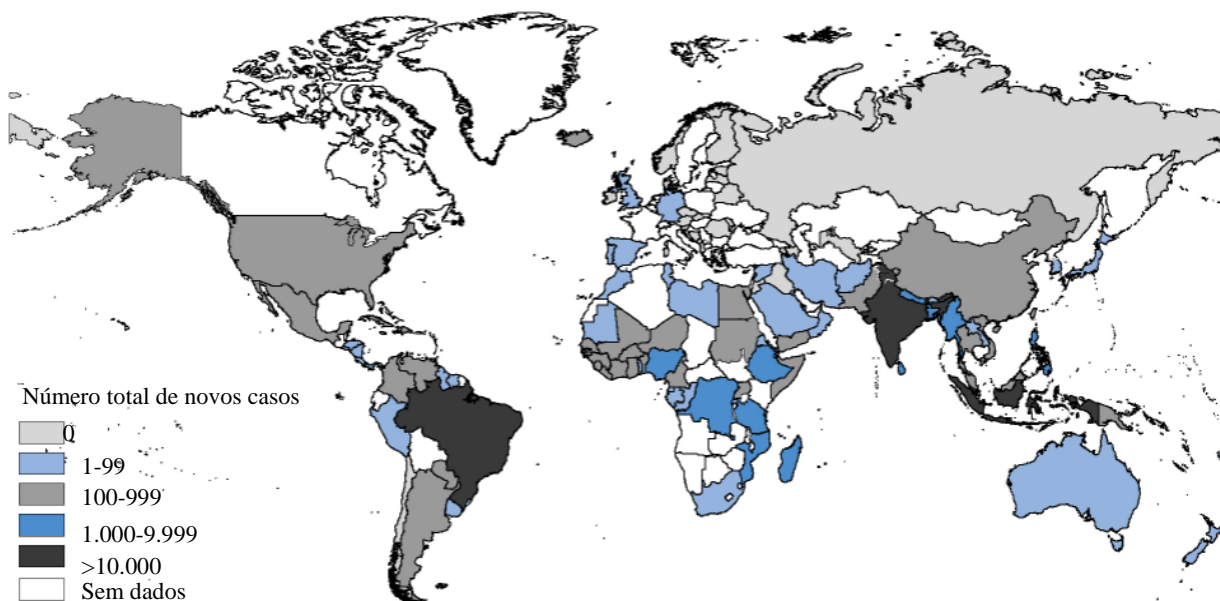


Figura 3 - Mapa ilustrando geograficamente os locais com maior número de novos casos de hanseníase em 2016. Fonte: World Health Organization, 2016. Figura modificada.

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

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

Todos esses três organismos – TB, ML e PA – necessitam produzir o folato através de sua via. Isso se deve ao fato da ausência de um sistema de transporte na membrana celular procariótica capaz de transportar esta molécula para dentro da célula (BOURNE, 2014). Entretanto o folato é uma molécula de vital importância para o crescimento celular tanto em procariotos quanto eucariotos. Isso porque o folato é utilizado pelas células como aceptores

ou doadores de uma unidade de carbono em diversas vias biossintéticas, como por exemplo, na formação de metioninas e purinas. Além disso, o folato também participa na replicação, reparo e metilação do DNA (ROSSI, 2011). Enquanto que eucariotos obtêm o folato através da alimentação, justamente por possuírem um sistema de transporte capaz de transportar o folato para dentro da célula (DESMOULIN, 2012), plantas e bactérias precisam sintetizar o folato através *de novo* (Figura 4) (BERMINGHAM, 2002). É justamente por esse motivo que muitos fármacos têm como intuito inibir enzimas desta via, como por exemplo a Dapsona e Sulfanilamida que irão inibir a Dihidropteroato sintase. Por outro lado, embora humanos tenham a enzima dihidrofolato redutase, ela é pouco conservada com a de procarionotos e portanto, moléculas como o Trimetopim, que tem como alvo a dihidrofolato redutase de microorganismos.

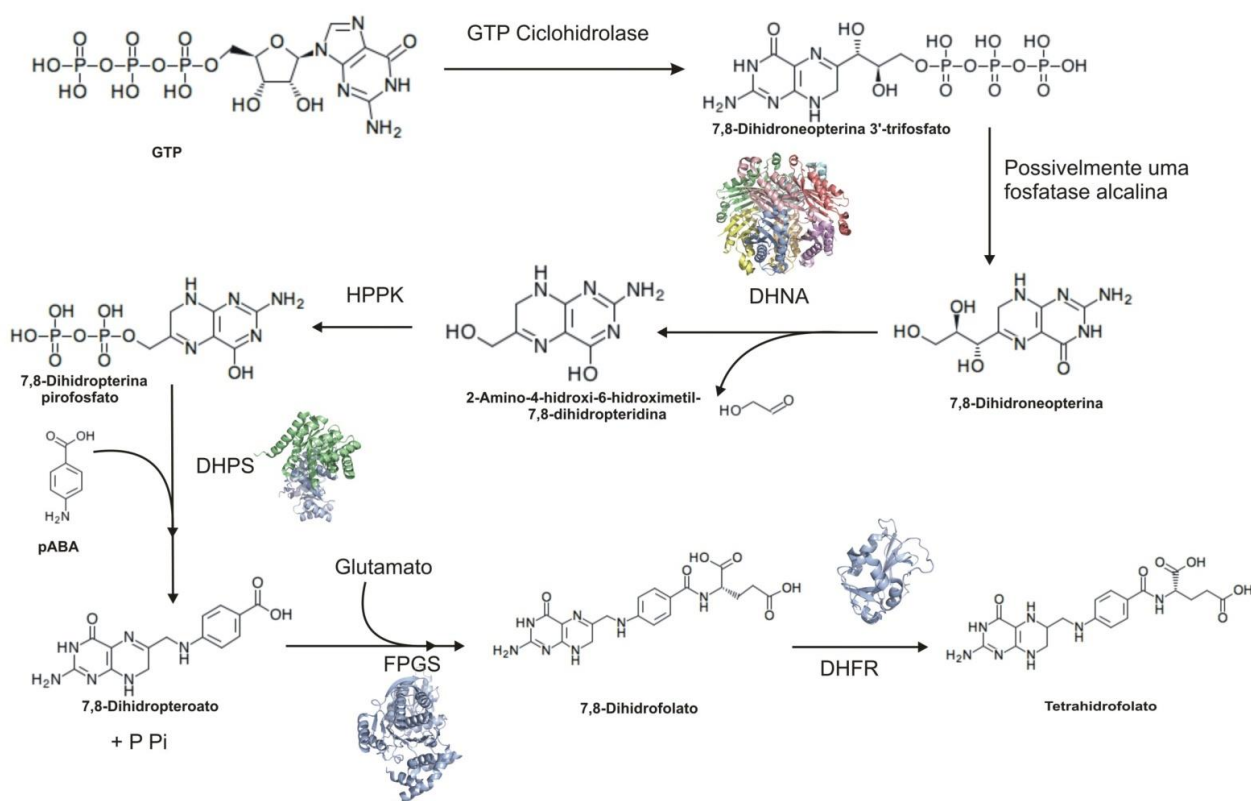


Figura 4 - Biossíntese de folato para bactérias em geral. As estruturas mostradas são para as enzimas que apresenta estruturas resolvidas para TB

O presente trabalho terá como foco o estudo de três enzimas da via do folato, a 7,8 Dihidroneopterina aldolase (DHNA), figura 5, Dihidropteroato sintase (DHPS) e a Dihidrofolato redutase (DHFR). As inibições de DHPS e DHFR acarretam a supressão da produção do tetrahidrofolato e por isso são muito utilizadas como alvo de diversos fármacos,

como por exemplo a dapsona e as sulfonamidas. No caso da DHNA, apesar de ainda não ser utilizada como alvo de fármacos, esta enzima pode representar uma nova alternativa neste quesito (FALCÃO, 2017).

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

MtDHNA geralmente adota a conformação de um octâmero na presença de seu produto (HP), entretanto, em sua forma apo, a enzima é frequentemente observada como tetramérica. É importante destacar que a conformação octamérica é formada pela união de duas subunidades tetraméricas como demonstra a figura 5 (FALCÃO et al., 2017). Esta união é mantida e estabilizada por interações hidrofóbicas entre as cadeias laterais. Cada subunidade tetramérica é mantida quase que exclusivamente por ligações de hidrogênio e é formada por dezesseis fitas antiparalelas que se arranjam de maneira muito similar a um anel circular ou *donut*. (HENNIG et al., 1998). Por já existirem dezenas de relatos na literatura sobre a resistência de organismos à fármacos que tem como alvo a DHPS e DHFR - a DHNA pode ser uma opção atrativa para o desenvolvimento de novos fármacos, apesar de que estudos estruturais e do mecanismo de catálise desta enzima ainda são precários na literatura.

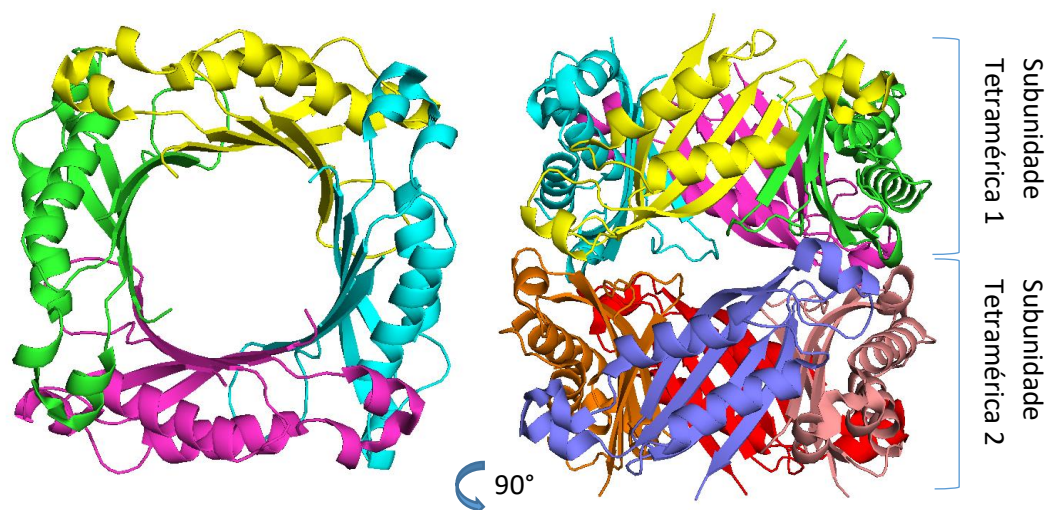


Figura 5 - Estrutura da MtDHNA (Adaptado de GOULDING et al., 2005). A figura ilustra uma visão superior (esquerda) que possibilita a observação das porções monoméricas (cada monômero foi colorido diferentemente), que formam a subunidade tetramérica. E a direita, uma visão lateral da enzima onde é possível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

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

Algumas estruturas cristalográficas para esta enzima foram obtidas, entre elas para *M. tuberculosis* (MTB) (BACA et al., 2000), *E. coli* (ACHARI et al., 1997) e *S. aureus* (HAMPELE et al., 1997). Com relação à ligação da molécula de PABA, apenas recentemente foram obtidas informações sobre o mecanismo de ligação desse substrato (YUN et al., 2012). Apesar de existirem diversos fármacos que tem como alvo a DHPS, como por exemplo a dapsona, já são descritos muitos organismos que possuem mutações nesta enzima, aumentando a resistência a estas substâncias.

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

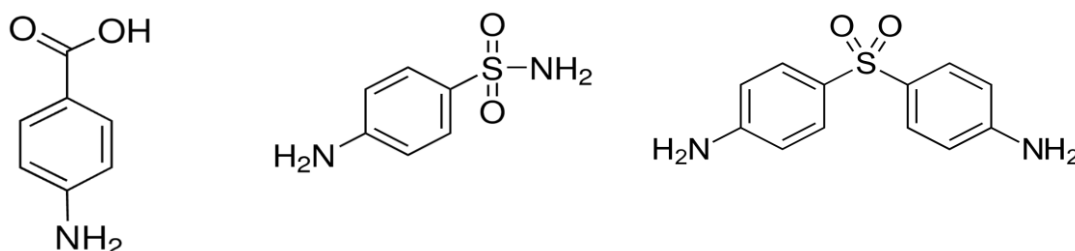


Figura 6 - Da esquerda para direita, estrutura do PABA, sulfanilamida e dapsona. É possível observar a semelhança das estruturas das sulfas, principalmente o grupo amino ligado ao grupo fenil, que mimetizam a estrutura do PABA

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

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

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

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

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

conseguir estruturas das enzimas mutantes, foi possível demonstrar através de outros métodos, que os códons com maior relação a resistência são: 53 e 55. Ao mesmo tempo que esses códons são muito importantes devido ao fato de causarem alterações muito próximas ao sítio ativo, estudos mais detalhados envolvendo essas mutações ainda necessitam ser realizados (NAKATA, 2010).

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

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

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

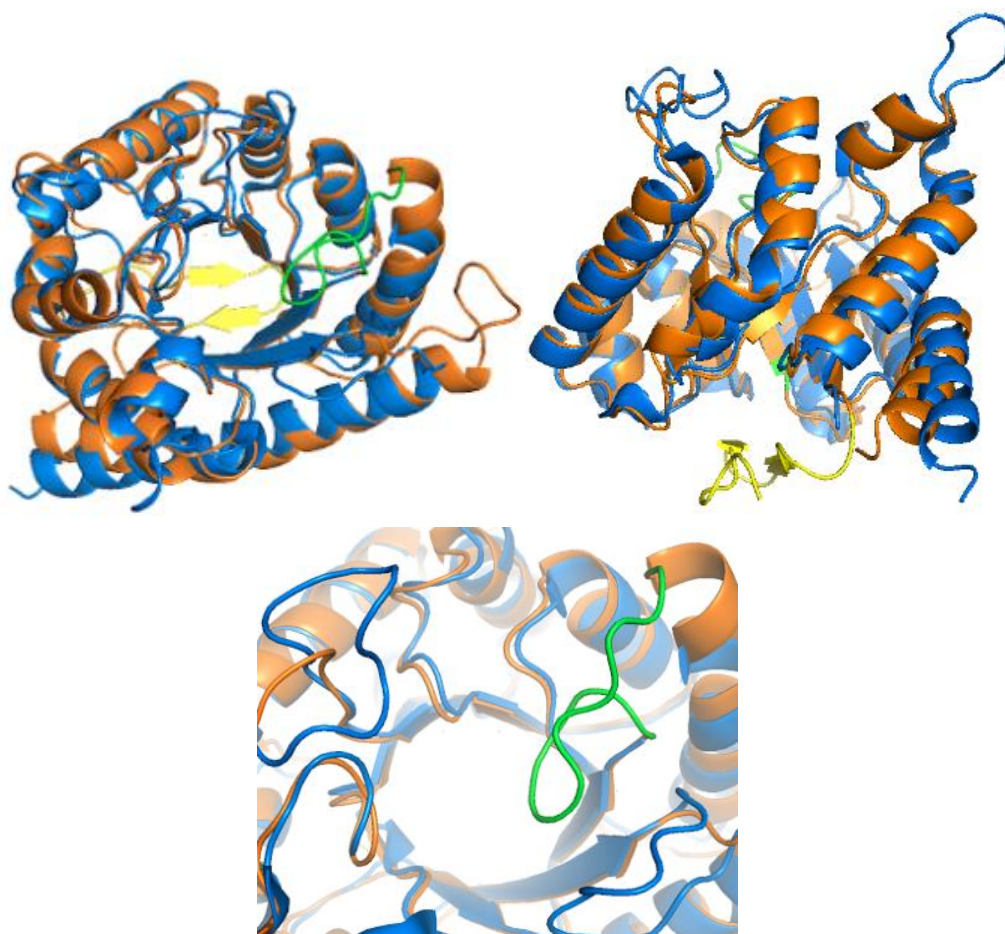


Figura 8 - Sobreposição das enzimas BaDHPS (Laranja) e MtDHPS (Azul). É nítida a alta semelhança entre ambas as enzimas, entretanto podemos observar em A que em BaDHPS há duas folhas- β (destacada em amarela) que funcionam como o "fundo" do barril. A estrutura em verde indica a alça 2, região na qual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

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

Em 1960, a trimetropina (TMP) foi introduzida para o combate de diversas doenças infecciosas, uma vez que este fármaco tem como alvo a DHFR de bactérias, fungos e

protozoários. O cicloguanil é uma outra substância com ação inibitória da DHFR e atualmente é utilizado no tratamento da malária, além disso este inibidor possui uma estrutura semelhante de TMP.

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

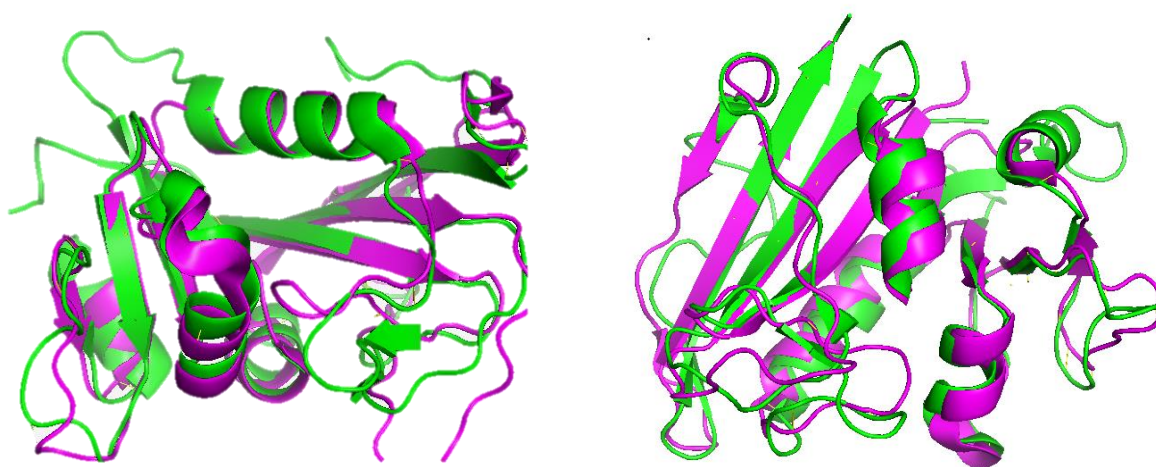


Figura 9 - Sobreposição estrutural das DHFRs de *Homo sapiens*, em verde, e de *Mycobacterium tuberculosis*, em magenta. É possível observar que apesar de serem espécie distantes, há uma grande similaridade entre as duas enzimas. Fonte: DHFR de *Homo sapiens* por CODY, V. 2009 e DHFR de *M. tuberculosis*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

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

Em MtDHFR, observou-se que a porção nicotinamida do NADPH realiza interações com compostos ligados no sítio ativo (SCHENELL et al., 2014) e isso pode resultar em mudanças conformacionais na enzima, permitindo que as alças se fechem

sobre o sítio ativo, posicionando o dihidrofolato no sítio ativo (DIAS et al., 2014). Além disso, é descrito que na conformação aberta Tyr100 realiza-se uma fraca ligação com a TMP interferindo estericamente com o grupo nicotinamida do NADPH. Entretanto, quando a enzima adota a conformação fechada, espera-se que este mesmo aminoácido se posicione ainda mais perto do grupo nicotinamida, o que resultaria na rotação do grupo pirofosfato. Contudo, como estruturas em complexo na conformação fechada com inibidores que apresentem uma estrutura rígida, como a pirimetamina ou cicloguanil ainda não foram obtidas é impossível saber se o engatamento do grupo nicotinamida causaria uma mudança na conformação desses ligantes.

2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

As indústrias farmacêuticas possuem um interesse especial em desenvolver inibidores das enzimas pertencentes da via do folato, uma vez que estas substâncias serão seletivas e terão ação antimicrobiana pela inibição de um composto essencial para as bactérias, o folato. O surgimento de cepas resistentes não só reforça a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos, mas também a compreensão dos mecanismos de resistências destas cepas. Uma das melhores maneiras atuais de se estudar esses mecanismos e propor novos inibidores, é através da biologia estrutural. Contudo, a literatura para algumas enzimas são escassa em informações sobre este assunto, principalmente de patógenos como *M. tuberculosis*, *M. leprae* ou *P.aeruginosa*, onde já são descritos mecanismos de resistências aos tratamentos atuais e com isso a obtenção destas informações é crucial.

Dentro deste contexto, esse trabalho visa a realização de estudos estruturais e a caracterização das enzimas DHNA, DHPS e DHFR nas formas apo e em complexo com diferentes ligantes, tais como os substratos, produtos e seus respectivos análogos e tem como objetivo:

- O desenvolvimento de técnicas para produção das proteínas de interesse com o intuito de realizar ensaios de caracterização estrutural e biofísico;
- Mutagênese sítio dirigida das enzimas DHPS de *Bacillus anthracis*, *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium tuberculosis*. Principalmente os resíduos que não são conservados no alinhamento das sequências, mas que interagem com a molécula de *pABA*, como a T53 em MIDHPS ou BaDHPS e S53 em MtDHFR a fim de compreender o porquê da resistência de MtDHPS e sensibilidade em MIDHPS e BaDHPS à esses inibidores.
- Caracterização biofísica preliminar da enzima DHNA de *Pseudomonas aeruginosa*;
- Caracterização estrutural e biofísica da enzima DHPS e seus respectivos mutantes na forma apo e em complexo com diferentes ligantes, tais como os substratos, produtos e seus respectivos análogos com o intuito de compreender os mecanismos de ligação e, a partir disto, possibilitar o entendimento do mecanismo de resistência às sulfas e promover *insights* para construção racional de novos fármacos;

- Caracterização estrutural da enzima DHFR na sua conformação fechada em complexo com cicloguanil.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PaDHPS

3.1.2 Clonagem, Expressão e Purificação de PaDHNA

O fragmento gênico referente a enzima PaDHNA foi clonado em vetor pETM-11/LIC pelo Pos-Doutorando Jademilson Celestino dos Santos. Para a expressão, inicialmente em 10 mL de meio LB, foram inoculados uma colônia de PaDHNA em BL21(DE3) transformada com o plasmídeo pGRO7 (TAKARA Bioscience) que permite a expressão das chaperonas GroEL e GroES (neste trabalho iremos denominar essa célula simplesmente como pGRO7), acrescidos de 1mM clorofenicol e canamicina. Esses inóculos foram mantidos a 37 °C por 16 h. Estas culturas foram então utilizadas como inóculos para 3 litros deste mesmo meio. As culturas foram mantidas a 37 °C até atingir uma densidade ótica (D_{600nm}) aproximada de 0,6. Entretanto, para as células pGRO7 é necessário a adição de 1 mg/mL de L-arabinose com D_{600nm} de 0,4 para a expressão das chaperonas groES e groEL, que irão auxiliar no enovelamento da proteína de interesse. Após atingir a D_{600nm} ideal, foi adicionado isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) a uma concentração final de 1 mM em cada litro de meio de cultura, e deixou-se a 18 °C durante 14 horas e 37 °C, por 4 horas para a indução da proteína. Em seguida, as células foram centrifugadas a 12.000 g por 35 min a 4 °C. Os pellets foram coletados e ressuspensos no Tampão 50mM HEPES; 200mM NaCl; 1 mM Imidazol (Tampão A), acrescidos de 1 mg/mL de DNase, 100 μ g/mL Lisozima e 0,5 mM isopropil- β -D-tiogalactosídeo (IPTG).

Para a purificação da DHNA, as células foram lisadas fisicamente em um sonicador Branson Sonifier 450® por 20 min em intervalos de 2 em 2 minutos para evitar o aquecimento das células. Para a separação da fração solúvel e insolúvel, a solução do extrato celular foi submetida a centrifugação à 35.000 g por 60 minutos à 4°C. Os sobrenadantes foram utilizados nos ensaios de purificação em um equipamento de Cromatografia Líquida de Rápida Performance (FPLC), do tipo Akta purifier (GE healthcare). Assim, as enzimas foram purificadas em dois passos, sendo por afinidade IMAC pela cauda de histidina e gel filtração.

Desta forma, a porção sobrenadante da enzima foi aplicada em uma coluna de 5 mL HisTrap (GE healthcare) e foi eluída em um gradiente de imidazol com o tampão B1 constituído de 50mM HEPES, 200mM NaCl e 500mM imidazol. A fração contendo a

proteína de interesse foi coletada e checada em géis de SDS-PAGE para confirmação do correto peso molecular e do grau de pureza. Em seguida, as frações contendo a proteína de interesse foram concentradas para 5 mL e injetados em uma coluna HiLoad 16/60 superdex 200 pg, previamente equilibrada pelo tampão A. Nesta etapa, as frações referentes aos picos foram coletadas e sua pureza e peso molecular foram novamente verificados em gel SDS-PAGE. As amostras foram então concentradas a 10 mg/mL, aliquotadas e congeladas a -80 °C.

3.1.3 Fluorometria de escaneamento diferencial de PaDHPS

A estabilidade térmica de PaDHNA foi averiguada por meio da técnica Thermal Shift ou DSF (*Differential Scanning Fluorometry*). O experimento foi realizado utilizando um equipamento tipo real-time PCR modelo CFX Connect da BioRad. Este experimento quantifica a variação térmica (ΔT_m) da desnaturação da proteína mediante a mudanças de tampões, concentrações de sais e pH. Esta técnica é útil pois pode indicar em qual tampão a proteína ficou mais estável, facilitando assim os ensaios biofísicos.

Basicamente o ensaio foi preparado em uma placa de 96 poços contendo a proteína a 20 mM, 5 X Sypro Orange e 20 mM do tampão testado. Primeiramente transferiu-se 5 μ L das soluções tampões de um bloco previamente preparado para uma placa de 96 poços. A concentração inicial dos tampões neste bloco é de 100 mM, sendo que cada poço do bloco possui uma solução diferente concentrada 5 X. Em seguida foram acrescentadas 3 μ L das enzimas à 10 mg/mL e 5 X da Sypro Orange, e para atingir o volume final da reação, foram adicionados água até um volume final de 25 μ L. Em seguida, a placa foi colocada no equipamento com temperatura inicial do sistema configurada em 25 °C e elevada até atingir 95 °C, com um aumento gradual de 0,5 °C/min. As análises dos dados e o valor do T_m para cada tampão foram obtidas por meio do programa Origin 8.5.1 (OriginLab).

3.1.4 Ensaios Biofísicos

A fim de se determinar e caracterizar biofísicamente a enzima PaDHPS, foram feitos ensaios de Espalhamento de Luz Dinâmica (DLS) e Ultracentrifugação Análisa (AUC)

O DLS foi realizado do Departamento de Biociências da Universidade de São Paulo, utilizando o equipamento DynaPro NanoStar (Wyatt Technology). Antes de cada corrida, todas as amostras foram centrifugadas à 7.826 g, por 15 minutos para que fosse retiradas quaisquer partículas contaminantes. Em seguida, 20 µL de amostra à 4mg/mL foram acrescentadas na cubeta e a leitura foi realizada. Todas as medições foram realizadas à 25°C.

A ultracentrifugação analítica foi realizada no Laboratório de Espectrometria e Calorimetria (LEC) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), com o equipamento Optima™ XL-A (BeckmanCoulter). Para esta técnica, utilizou-se 400µL de amostra à 0,5mg/mL com uma velocidade de rotação de 267.761 g, à 25°C, durante 21 horas. Todas as corridas foram feitas em duplicata, em um comprimento de onda de absorvância de 277nm.

3.1.5 *Cristalização de PaDHPS*

As concentrações da enzima PaDHNA utilizadas nos ensaios de cristalização foram de 5,0 mg/mL, 10 mg/mL, e 20mg/mL. Inicialmente foi feita uma triagem de aproximadamente 380 condições, utilizando o Robô de cristalização Oryx4®, com screens padronizados e comercializados pela Hampton, Jena BioScience e Qiagen. Os *hits* encontrados foram otimizados variando o pH, concentração da proteína e precipitante no sistema de cristalização de difusão em vapor por “Gota Pendurada”.

Os cristais provenientes da difusão em vapor foram encaminhados para a Linha Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) no Centro Nacional de Ciência em Energia e Materiais (CNPEM), em Campinas para a coleta de dados de difração.

3.2 *MIDHPS, BaDHPS, T70S e P72R*

3.2.1 *Clonagem do Gene folP1 de MIDHPS e BaDHPS*

Todas as sequências gênicas referentes a essas enzimas foram adquiridas junto a empresa GenScript® com otimização de códons para expressão em *E. coli*. Porém o fragmento gênico referente a BaDHPS, *folP1*, e os mutantes T70S e P72R foram adquiridos já clonados no vetor de expressão pET28a, enquanto que o fragmento gênico referente a MIDHPS foi necessário à subclonagem gênica em pET28b(+), pois este estava inicialmente clonado no vetor de clonagem pUC57. Desta forma, o plasmídeo contendo

o gene sintético para MIDHPS foi transformado em DH5 α para produção do plasmídeo, que foi extraído utilizando o kit comercial Gene Jet Plasmid DNA Purification. O plasmídeo pUC57:MIDHPS foi submetido a reação de digestão utilizando as enzimas de restrição NdeI e XhoI e o fragmento referente ao gene foi isolado por meio de gel de agarose 0,8%. A banda referente ao gene de interesse foi excisada e purificada utilizando o kit comercial GeneJET Gel Extraction (Thermo Scientific).

O produto desta purificação foi utilizado para a ligação no vetor de expressão pET28b(+) que foi digerido com as mesmas enzimas de restrição. Esse vetor apresenta a sequência que codifica o sítio de clivagem para TEV-protease e uma sequência que codifica uma cauda com seis histidinas na porção N-terminal da enzima clonada. A reação de ligação foi transformada em células competentes DH5 α . Algumas colônias obtidas na placa foram selecionadas e inoculadas em 10 mL de meio de cultura LB e crescidos por aproximadamente 14 horas. Após essa etapa, as células foram recolhidas e o plasmídeo foi extraído utilizando o Kit Gene Jet Plasmid DNA Purification (Thermo Scientific). A confirmação do inserto foi realizada mediante ao sequenciamento das amostras e pela dupla digestão utilizando as mesmas enzimas de restrição utilizadas na clonagem. Uma vez confirmada a presença do inserto, o plasmídeo foi transformado novamente, sendo que agora em cepas de células competentes para expressão. As células escolhidas para os testes foram: BL21(DE3) e pGRO7.

3.2.2 Mutagênese Sítio Dirigida dos Mutantes de BaDHPS e MIDHPS

As mutações que causam resistência a dapsona em *Mycobacterium leprae* foram primeiramente descritas por Chaitanya et al., 2015; Nakata et al., 2011, e Willians et al., 2000. Com o objetivo de se produzir DHPSs mutantes para *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Bacillus anthracis*, foram construídos primers de acordo com o protocolo e ferramenta online da Stratagene. A lista de primers e mutantes construídos estão descrita na tabela 2. Para a obtenção dos mutantes foi utilizado o protocolo descrito pelo sistema *site direct mutagenesis* da Agilent Technologies. Para isso, foram usados como molde os plasmídeos pET28a e pET28b contendo os genes de interesse que foram submetidos a uma reação de PCR, utilizando a DNA polimerase Phusion da Thermo Fischer Scientific com o seguinte ciclo: uma fase de desnaturação a 98°C por 30 segundos seguida de 22 ciclos com uma desnaturação inicial de 98°C por 10

segundos, anelamento a 70 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 3 minutos e 10 segundos mais a extensão final a 72 °C por 5 minutos.

O produto da reação do PCR foi submetido a digestão pela enzima DpnI por 90 minutos a 37 °C, que reconhece sítios de metilações onde apenas estão presentes no plasmídeo selvagem. Posteriormente esta reação foi utilizada para transformação em células competentes DH5α e JM109. Colônias isoladas foram inoculadas em meio LB contendo o antibiótico apropriado por 14 horas. As células foram recolhidas e o plasmídeo foi extraído com o kit Gene Jet Plasmid DNA Purification (Thermo Scientific). Os plasmídeos isolados foram submetidos ao serviço de sequenciamento do Centro de Pesquisa sobre Genoma Humano e Células-Tronco da Universidade de São Paulo com o equipamento ABI 3730 DNA Analyser para confirmação da presença da mutação desejada.

Tabela 1- Primers utilizados na mutagênese sítio dirigidas. Foram construídos com o auxílio do Quick Changer Primer Design by Agilent Technology®

Primer	Sequência	Mutação	Organismo
T53I	5'-CCC GGG CGG GATACTTT CACCGCCAACA-3'	Substitui Treonina por Isoleucina, Códon 53	<i>Mycobacterium leprae</i>
	5'-TGTTGGCGGTGAAAGTATCCGCCCGGG-3'		
P55R	5'-ACGAATGGCACCCCGGCGGGTACTTTC-3'	Substitui Prolina por Arginina, Códon 55	<i>Mycobacterium leprae</i>
	5'-GAAAGTACCCGCCGGGTGCCATTCGT-3'		
T53S (T70S)	5'-CCC GGG CGG GCTACTTT CACCGCCAACA3'	Substitui Treonina por Serina, Códon 53	<i>Mycobacterium leprae</i>
	5'TGTTGGCGGTGAAAGTAGCCGCCCGGG3'		
P55S	5'ACGAATGGCACCCGAGCGGGTACTTTCC3'	Substitui Prolina por Serina, Códon 55	<i>Mycobacterium leprae</i>
	5'GTGAAAGTACCCGCTCGGGTGCCATTCG3'		
T53A	5'-CCGGGCGGGCACTTT CACCGCCAACAT3'	Substitui Treonina por Alanina, Códon 55	<i>Mycobacterium leprae</i>
	5'ATGTTGGCGGTGAAAGTGCCCGCCCGG3'		
T53V	5'ACCCGGGCGGACACTTT CACCGCCAAC3'	Substitui Treonina por Valinas, Códon 53	<i>Mycobacterium leprae</i>
	5'GGATGTTGGCGGTGAAAGTGTCGCC3'		
P55A	5'-CGAATGGCACCCGCGCGGGTACTTTCA-3'	Substitui Prolina por alanina, Códon 55	<i>Mycobacterium leprae</i>
	5'-TGAAAGTACCCGCGCGGGTGCCATTCG-3'		
S53T	5'-CACCCGACGAGTGCTTT CACCGCC-3'	Substitui Serina por Treonina, códon 53	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
	5'-GGCGGTGAAAGCACTCGTCCGGGTG-3'		
P55R (P72R)	5'CTTTCGAAAACCCGACGGGTGCTCT3'	Substitui Prolina por Arginina, Códon 55	<i>Bacillus anthracis</i>
	5'CGAGAGCACCCGTCGGGGTTTTCGCAA3'		
T53I	5'ACCCGACGGATGCTCTCGCCAC3'	Substitui Tronina por Isoleucina, códon 53	<i>Bacillus anthracis</i>
	5'GGTGCGGAGAGCATCCGTCCGG3'		

3.2.3 Expressão e purificação de BaDHPS e MIDHPS

A expressão e purificação das enzimas MIDHPS, BaDHPS, T70S e P72R foram realizadas de acordo com os protocolos descritos por Nopponpunth et al., 1999 e Babaoglu et al., 2004, com algumas modificações, sendo que o protocolo de BaDHPS foi utilizado para seus mutantes sem alterações. Para isso, em 10 mL de meio LB foram inoculados uma colônia de BaDHPS em BL21(DE3) e MIDHPS em pGRO7 contendo os antibióticos apropriados. Esses inóculos foram mantidos a 37 °C por 16 horas. Estas culturas foram então utilizadas como inóculos para 4 litros deste mesmo meio. As culturas foram mantidas a 37 °C até atingir uma densidade ótica (D_{600nm}) aproximada de 0,7~0,8 para de MIDHPS e 0,6 para BaDHPS. Entretanto para as células pGRO7 foram adicionadas 1mg/mL de arabinose com D_{600nm} de 0,4 para a expressão das chaperonas GroES e GroEL. Após atingir a D_{600nm} ideal, foi adicionado isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) a uma concentração final de 1 mM em cada meio de cultura. As culturas cresceram a 25 °C por mais 14 horas para MIDHPS e a 37 °C por 4 horas para BaDHPS. Em seguida, as células foram centrifugadas a 12.000 g por 35 minutos a 4 °C. Os pellets foram coletados e ressuspensos no Tampão A2 de MIDHPS (20mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 2% Glicerol, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM imidazol) e A3 de BaDHPS (20 mM HEPES pH 6,5, 400 mM NaCl, 1mM imidazol, 1Mm $MgCl_2$), acrescidos de 0,5 mM PMSF, 100 μ g/mL de lisozima e 3U DNase.

Para a purificação das enzimas DHPS, as células foram lisadas fisicamente em um sonificador Branson Sonifier 450® por 20 minutos em intervalos de 2 em 2 minutos para BaDHPS e pela técnica Freeze and Thaw para MIDHPS. Esta última consiste da lise física das células utilizando cinco ciclos de congelamento e descongelamento com nitrogênio líquido. Para a separação da fração solúvel da insolúvel a solução do extrato celular foi submetida a centrifugação a 35.000 g por 60 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram utilizados nos ensaios de purificação em um equipamento de Cromatografia Líquida de Rápida Performace (FPLC), do tipo Akta purifier (GE healthcare). Assim, as enzimas foram purificadas em dois passos, sendo por afinidade à cauda de histidina (IMAC) e por gel filtração

Desta forma, a porção sobrenadante para cada enzima foi aplicada em uma coluna de 5 ml HisTrap (GE healthcare) e a proteína foi eluída em um gradiente de imidazol com tampão B2 (20 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 2% glicerol e 500 mM imidazol) para

MIDHPS e tampão B3 (20 mM HEPES pH 6,5, 400 mM NaCl, 500 mM imidazol, 1Mm MgCl₂) para BaDHPS. As frações contendo as proteínas de interesse foram coletadas com 32% de tampão B e checadas em géis de SDS-PAGE para confirmação do correto peso molecular e do grau de pureza para esse passo de purificação. Posteriormente, as frações contendo as proteínas de interesse foram concentradas para 2 ou 5 mL e injetados em uma coluna HiLoad 16/60 superdex 200 pg previamente equilibrada pelos tampão A2 no caso da MIDHPS e A3 no caso da BaDHPS. Nesta etapa, as frações referentes aos picos foram coletadas e sua pureza e peso molecular foram novamente verificados em gel SDS-PAGE. As amostras foram então concentradas a 10 mg/mL, alíquotadas e congeladas a -80 °C.

3.2.4 Thermalfluor de MIDHPS, BaDHPS, T70S e P72R

A estabilidade térmica das enzimas MIDHPS, BaDHPS, T70S e P72R foi realizada por meio da técnica Thermalfluor ou Thermal Shift. O experimento foi realizado utilizando um equipamento do tipo real-time PCR modelo CFX Connect da BioRad, como descrito anteriormente para a enzima PaDHNA.

A técnica também pode ser utilizada para demonstrar interações entre proteínas e ligantes uma vez que essas se tornam mais ou menos estáveis quando em complexo com seus ligantes. Sendo assim, fez-se um experimento de thermalfluor utilizando BaDHPS e seus dois mutantes, T70S e P72R, com três ligantes: dapsona, ácido pteróico e sulfanilamida. Neste ensaio, utilizou-se 50 mM de cada proteína, 1x Sypro Orange, 50 mM tampão Hepes, e 100 mM de ligante. O controle da reação foi montado apenas com tampão e proteína. Como a dapsona e sulfanilamida estão dissolvidos em DMSO e ácido pteróico em NaOH, foi necessário a utilização de dois controles, o primeiro com adição do DMSO, e o segundo com NaOH. O programa de temperatura utilizado para este ensaio teve como temperatura inicial de 25 °C com aumento de 0,5 °C até atingir 95 °C.

3.2.5 Calorimetria de Titulação Isotérmica e Fluorescência de BaDHPS, T70S e P72R

Com o intuito de se estudar as interações das enzimas DHPSs com diversos fármacos e ligantes, realizou-se a Calorimetria de Titulação Isotérmica e a Fluorescência.

A fluorescência foi realizada no Laboratório de Espectrometria e Calorimetria (LEC) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) em Campinas,

utilizando o equipamento ISS PC-1. Para o cálculo da Constante de Dissociação (K_d) através do *quenching* da proteína, realizou-se dez corridas com cada ligante, sendo eles: ácido pteóico, dapsona e sulfanilamida. A concentração inicial foi de 100 nM até a concentração final de 1000 nM. Previamente à todas corridas, incubou-se a proteína à uma concentração de 5 uM com os ligantes por cerca de trinta minutos. A configuração do equipamento pode ser verificado na tabela abaixo (tabela 2)

Tabela 2- Configuração do ISS PC-1 utilizada nas corridas

Abertura de Emissão	2
Abertura de excitação	1
Íris	40% aberta
Carrocel de Emissão	Sem polarizador
Carrocel de Excitação	Sem polarizador
Filtro	300 nm
Potência da Lâmpada	15 amperes
Comprimento de onda de Emissão inicial	300 nm
Comprimento de onda de Emissão Final	420 nm
Comprimento de onda de excitação	295 nm

A Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) foi realizada no Laboratório de Fototérmica e Calorimetria do Departamento de Física da Universidade de São Paulo, utilizando o equipamento MicroCal iTC200 (Malvern). Primeiramente realizou-se corridas de otimização para padronizar a melhor concentração de proteína e ligante assim como as configurações de equipamento (Tabela 3). Para o tratamento dos dados coletados, foi utilizado o programa Origin v.2016 contendo a extensão do equipamento MicroCal ITC200.

Tabela 3- Configuração do MicroCal iTC200 utilizada nas corridas

Número de Injeções	18		
Temperatura	20 e 25 °C		
Reference Power	11.4ucal/seg		
Initial Delay	280 seg		
Injeções:	Volume	Duração	Espaçamento
1	0,5 ul	1 seg	240 seg
2-18	2.2 ul	2.8 seg	320 seg

3.2.6 Cristalização de BaDHPS, T70S e P72R

As concentrações das enzimas utilizadas nos ensaios de cristalização foram de 5,0 mg/mL e 10 mg/mL, 15 mg/ml e 20 mg/mL. Inicialmente foram testadas as condições descritas na literatura para BaDHPS, que consiste de 1,3 M de Sulfato de lítio e 0,1 M Bis-tris propano pH 6,5 (BABA OGLU et al, 2004). Além disso, afim de se obter novas condições de cristalização para estas enzimas, foi realizada a triagem de aproximadamente 500 condições utilizando o Robô de cristalização Oryx4® com screens padronizados e comercializados pela Hampton, Jena BioScience e Qiagen. Os *hits* encontrados foram otimizados variando o pH, concentração da proteína e condição precipitante no sistema de cristalização usando o método de difusão em vapor por “Gota Pendurada”.

3.3 DHFR

3.3.1 Expressão e Purificação de MtDHFR

A expressão, purificação e cristalização desta enzima foram realizadas conjuntamente com o aluno de Doutorado João Augusto Ribeiro. Como o gene que codifica a enzima MtDHFR (*folA*) já havia sido clonado no vetor de expressão, pET28a e pET20b pelo nosso grupo de pesquisa, seguiu-se com a expressão e purificação da enzima de acordo com os protocolos estabelecidos pelo nosso grupo de pesquisa.

Essas construções plasmidiais, foram transformadas por choque térmico a 42 °C por 1 minuto em linhagem bacteriana BL21(DE3) e a expressão foi realizada em um volume de cultura de 8 L suplementada com o antibiótico canamicina ou ampicilina nas concentrações de 50 µg/mL e 100 µg/mL respectivamente. Após a O.D_{600nm} 0,6 a expressão proteica foi induzida por IPTG na concentração de 0,2 mM por 20 h a 18°C. Após centrifugação dos pellets à 12.000 g por sessenta minutos, estes foram lisados fisicamente utilizando-se um sonificador Branson Sonifier 450® em tampão A4 para MtDHFR com His (20 mM Tris, 50 mM KCl, pH 8,0) e A5 para MtDHFR sem His (20 mM Fosfato de potássio, 50 mM KCl, pH 8) e os extratos proteicos foram submetidos a uma cromatografia por afinidade (IMAC) com enzimas eluídas através de um gradiente com tampão de eluição B4 e B5 (Tampão A5 + 300mM imidazol e Tampão A5 + 1 mM dihidrofolato respectivamente). Após este processo de purificação, as frações nas quais a enzima DHFR estava presente foram recuperadas e concentradas. Em seguida, as amostras provenientes da etapa um da purificação foram submetidas a purificação por exclusão molecular, eluídas com tampão final C4 (20mM Fosfato de potássio, 50mM KCl, pH 8,0) e concentradas a uma concentração final de aproximadamente 10 mg/ml e 20 mg/ml.

3.3.2 Cristalização de MtDHFR em complexo com cicloguanil

Para a cristalização da MtDHFR foi utilizada a condição previamente determinada pelo aluno de Doutorado João Augusto Ribeiro com a construção MtDHFR sem cauda de histidina. Essa condição consiste em 2,6 M Sulfato de amônio, 0,1 M MES e 0,01 M Cloreto de Cobalto, utilizando 10 mg/mL de enzima e 10 Mm de cicloguanil.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PaDHPS

4.1.1 Expressão e Purificação de PaDHNA

Após a confirmação da clonagem por sequenciamento, *folB* foi superexpresso em células competentes para expressão. Entretanto para verificar as melhores células e condições foi realizado um teste de expressão aonde variou-se temperatura, concentração de IPTG, tempo de expressão e a utilização de chaperonas. Um Gel SDS-PAGE foi utilizado para visualização do resultado do teste de expressão como mostra a figura 11. Pela análise dos géis é possível observar que apenas as condições que utilizam as células pGRO7 tiveram a proteína DHNA na porção solúvel (sobrenadante), enquanto todas as outras condições estavam na porção insolúvel (Pellet).

A análise da figura 10 permitiu identificar as melhores condições para a superexpressão de PaDHNA. Sendo assim, a expressão foi realizada na condição 12 do gel B: expressão em células pGRO7 com temperatura de indução à 18 °C por 14 horas e 1 mM de IPTG. Entretanto, como descrito anteriormente por Falcão e colaboradores em 2017, DHNA pode adotar diferentes estados oligoméricos mediante a temperatura de expressão. Sendo assim, a proteína também foi expressa em 37 °C por 4 horas.

Uma vez que a enzima foi expressa, ela foi purificada primeiramente por afinidade IMAC utilizando colunas His-Trap IMAC 5 mL (Figura 11) e em seguida por exclusão molecular utilizando uma coluna HiLoad 16/60 superdex 200 pg um sistema de purificação de proteínas tipo Akta purifier (GE healthcare). PaDHNA apresentou um alto rendimento em ambas as etapas da purificação como mostra a figura 11.

Na purificação por afinidade pode-se observar três picos diferentes, sendo que os dois primeiros tiveram sua eluição durante o 5% de tampão B e portanto, são contaminantes, e o terceiro pico, referente a proteína, com uma eluição de 35% de tampão B. Em contrapartida, na exclusão molecular, dois picos são observados: o primeiro com eluição de 75 mL e o segundo a 80 mL. Ambos são referentes a proteína de interesse, mas possivelmente em estados oligoméricos distintos.

Como descrito para outras DHNAs, o produto e substrato desta enzima podem causar a sua octamerização. Ao purificarmos a DHNA 18 °C por um tempo de indução de 18 h, observamos uma colocação amarelada, que pode ser referente ao substrato, 7,8 dihidropterina, produto da *E. coli*. Para a proteína purificada nestas condições, acredita-

se que há uma predominância da forma octamérica. Por outro lado, a proteína expressa em uma temperatura diferente, 37 °C por 4 h, não foi observada essa colocação após a purificação e pelo tempo retentção da coluna de gel filtração, acredita-se que esta encontra-se predominantemente como tetramérica. Porém uma corrida em gel filtração analítica ainda é necessária para comprovar essa hipótese.

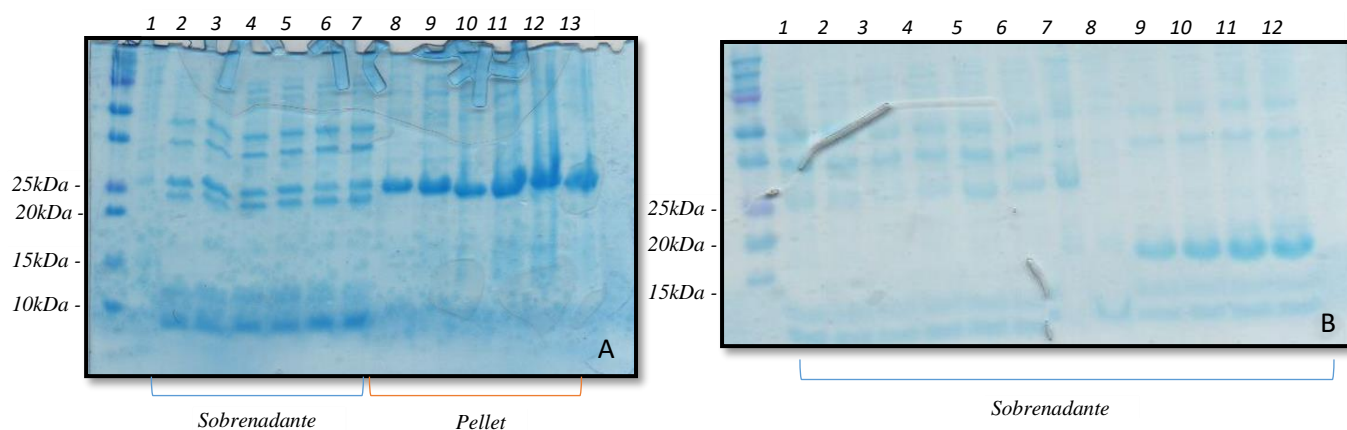


Figura 10 - Teste de expressão da DHNA de *Pseudomonas aeruginosa* (PaDHPS). Gel A: teste de expressão utilizando célula competente BL21 DE3 (pGRO7) sendo 1) Não induzido; 2) 37 °C, 1 mM IPTG, 4 horas; 3) 37 °C 1 mM IPTG, 5 horas; 4) 37 °C, 0,2 mM IPTG, 4 horas; 5) 37 °C, 0,2 mM IPTG, 5 horas; 6) 18 °C, 1 mM IPTG, overnight; 7) 18 °C, 0,2 mM IPTG, overnight; 8) 37 °C, 1 mM IPTG, 4 horas; 9) 37 °C 1 mM IPTG, 5 horas; 10) 37 °C, 0,2 mM IPTG, 4 horas; 11) 37 °C, 0,2 mM IPTG, 5 horas; 12) 18 °C, 1 mM IPTG, overnight; 13) 18 °C, 0,2 mM IPTG, overnight. Gel B: Teste de expressão utilizando células BL21(DE3) e pGRO7 aonde; 1) BL21 37 °C, 1 mM IPTG, 4 horas; 2) 37 °C 1 mM IPTG, 5 horas; 3) 37 °C 1 mM IPTG, 5 horas; 4) 37 °C, 0,2 mM IPTG, 4 horas; 5) BL21 37 °C, 0,2 mM IPTG, 5 horas; 6) BL21 18 °C, 1 mM IPTG, 4 horas; 7) BL21 18 °C, 0,2 mM IPTG, 4 horas; 8) Não induzido; 9) pGRO7 37 °C, 1MM IPTG, 4 horas; 10) pGRO7 37 °C, 0,2 mM IPTG, 4 horas; 11) pGRO7 18 °C, 0,2 mM IPTG, overnight; 12) pGRO7 18 °C, 1 mM IPTG, overnight

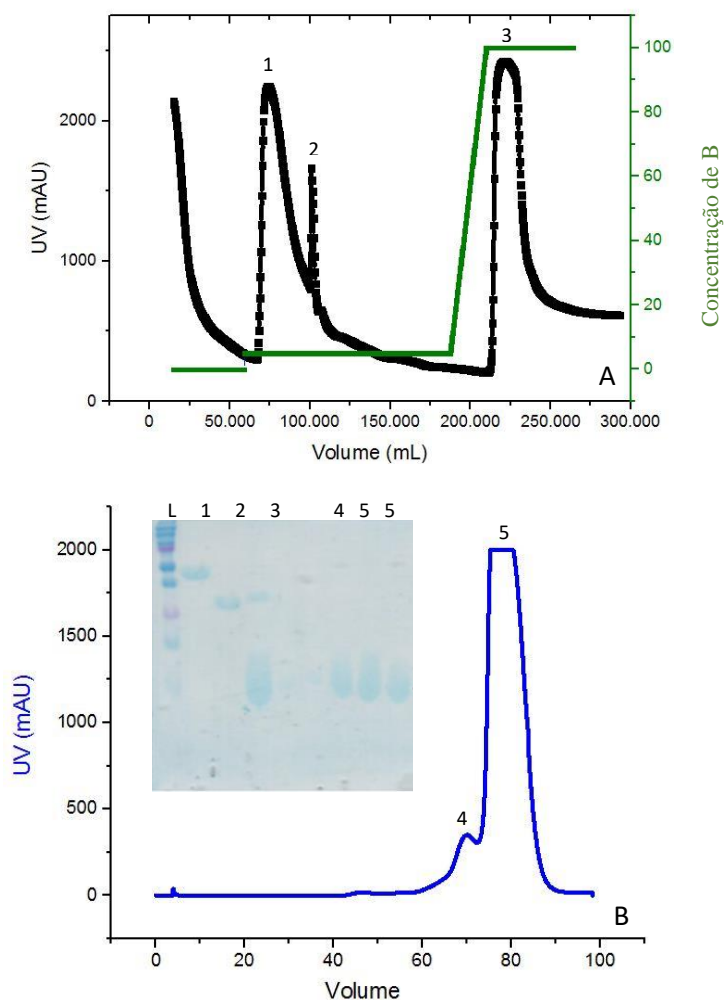


Figura 11 - A) Cromatograma de afinidade onde foi observado três picos distintos. Apenas o pico 3 foi coletado, concentrado e aplicado na coluna de exclusão molecular pois constatou-se pela análise do SDS-PAGE, que a proteína estava localizada apenas no pico 3. B) Cromatograma de exclusão molecular demonstra um alto rendimento. Um primeiro pico é evidenciado e provavelmente pode indicar uma pequena parcela da proteína em um estado oligomérico diferente do encontrado no pico 5. As bandas referentes de cada pico são evidenciadas no SDS-PAGE

4.1.2 Fluorometria de Escaneamento Diferencial de PaDHNA

O fluoróforo SYPRO-Orange (invitrogen), utilizado para quantificar as alterações, se liga não-especificamente a superfícies hidrofóbicas. À medida que ocorre a desnaturação, as porções proteicas hidrofóbicas são expostas, possibilitando a ligação proteína-fluoróforo, resultando em um aumento da fluorescência, que então é detectada pelo equipamento.

O programa Origin v.2016 foi utilizado para a normalização e triagem das melhores condições. As melhores condições encontradas para PaDHNA foram 50 mM HEPES, pH

7,0, 200 mM NaCl; 50 mM CHES pH 10 e 50 mM Bis-tris Propano pH 6,0; 200mM NaCl. Optou-se por utilizar o tampão 50 mM HEPES, pH 7,0, 200 mM NaCl por ter tido a curva mais deslocada para a direita (Figura 12), ou seja, com uma maior temperatura de desnovelamento. É possível observar que a curva deste tampão se inicia com a fluorescência a 0,4 unidade/normalizada indicando um grau inicial de desnovelamento.

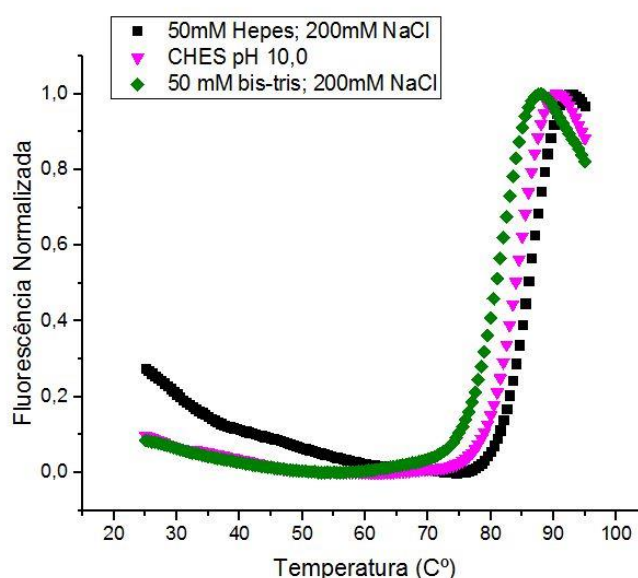


Figura 12 - Gráfico gerado pelo programa Origin, demonstrando a curva de desnovelamento térmico da proteína DHNA em três tampões diferentes.

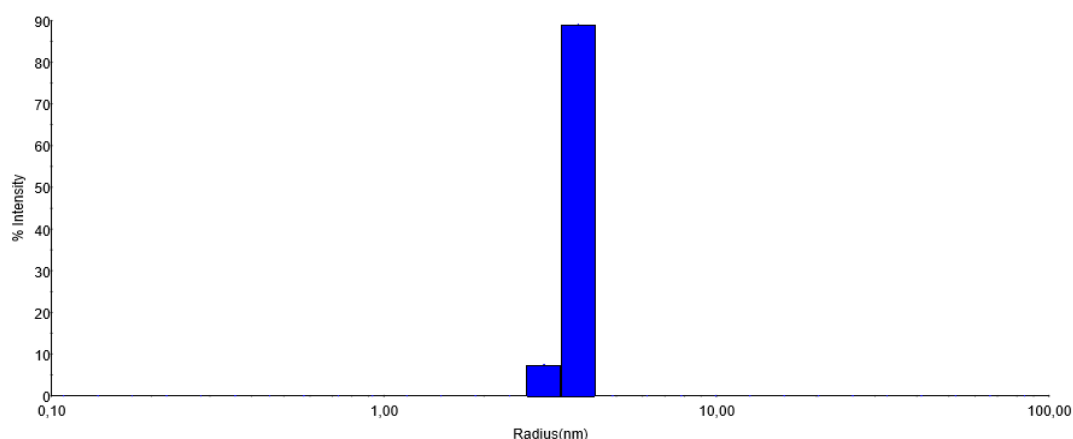
4.1.3 Ensaio Biofísicos de PaDHNA

O DLS é uma técnica biofísica baseada no movimento browniano das moléculas, portanto o equipamento irá medir o movimento das partículas em solução, conseguindo extrair informações como o peso molecular aproximado e sua distribuição (GOLDBURG, 1999). Como a medida será baseada no movimento das partículas, o DLS também é capaz de medir se uma proteína está agregada (polidispersa) ou não (monodispersa) (KURSHID, 2014).

O Espalhamento de Luz Dinâmica foi realizado do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da USP com o equipamento DynaPro NanoStar (Wyatt Technology). A figura 13 demonstra os resultados obtidos na proteína PaDHNA produzida a 18°C. Foram encontradas duas diferentes populações de partículas na solução analisada, na qual o pico 1 indica a população de PaDHNA e pico 2 pode

indicar uma pequena população de agregados proteicos. Como a porcentagem de intensidade e porcentagem de massa do pico 2 são praticamente zero e % de polidispersividade (%Pd) do pico 1 está inferior a 20, pôde-se concluir que a amostra em questão encontra-se monodispersa e pura (KHURSHID, 2014). Contudo, o peso molecular (Mw-R) acusado pelo equipamento é de 75kDa, e PaDHNA possui apenas 13,1 kDa, podendo indicar que a proteína esta disposta como um hexâmero. Como descrito por FALCÃO et al., 2017, MtDHNA em sua forma apo, adota o estado octamérico, ou seja, era esperado algo em torno de 100kDa. Desta maneira esses dados não são conclusivos sobre o peso molecular da PaDHNA

O DLS para a PaDHNA produzida a 37°C também foi realizado, entretanto o equipamento não foi capaz de identificar nenhuma molécula com o tamanho esperado da forma tetramérica de PaDHNA, 50kDa. De fato, de acordo com o manual do próprio equipamento, o mesmo possui uma limitação para identificar moléculas com peso molecular abaixo de 60kDa e raio inferior a 1µm.



	Radius (nm)	%Pd	Mw-R (kDa)	%Intensity	%Mass
Peak 1	3.778	5.7	75	96.4	100.0
Peak 2	463.340	9.4	5819030	3.6	0.0

Figura 13 - Resultado obtido do DLS demonstra a distribuição de ambas as populações. Uma vez que o peso molecular do pico 2 está desproporcionalmente grande, pode-se afirmar que esta população é referente à algum contaminante. Em contrapartida, podemos concluir que nossa amostra possui um tamanho uniforme e pura devido aos parâmetros observados em %Pd e %Mass.

Enquanto que o DLS e outras técnicas são restritas a uma pequena faixa de pesos moleculares a ultracentrifugação pode ser utilizada para praticamente qualquer tamanho de

partícula, o que a faz ser uma técnica muito confiável e versátil para este fim. A medição é feita baseada nas forças que são aplicadas em partículas suspensas em um solvente, como a sedimentação ou força gravitacional (F_s) onde F_s é proporcional à massa e aceleração da partícula (COLE, 2008).

Os dados de ultracentrifugação ainda estão em fase final de análise em colaboração com o a Dra. Juliana Fattori, contudo, durante a realização do experimento foi possível observar preliminarmente que PaDHNA na presença e na ausência do substrato e realmente apresenta uma diferença significativa de peso molecular corroborando que o substrato deve causar uma alteração no estado oligomérico da enzima. Este resultado preliminar corrobora com os dados descritos por Falcão e colaboradores em 2017 em *Mycobacterium tuberculosis*, demonstrando que para *P. aeruginosa* a DHna também forma tetrâmeros na ausência de seu substrato.

4.1.4 Cristalização PaDHNA

Após determinar o tampão adequado para a PaDHNA através da técnica de DSF, foram realizados os ensaios de cristalização utilizando o robô de cristalização Oryx4. Apenas duas condições da triagem tiveram crescimento de microcristais, contudo apenas a condição 200mM CaCl₂ pH 4,6, 0,1M Acetato de Sódio, 30% MPD (Figura 14-A) com uma concentração de proteína de 10 mg/mL foram reproduzidas utilizando o método de cristalização “Gota Pendura”. Com isso, uma otimização desta condição foi feita com o intuito de melhorar a qualidade e aumentar o tamanho dos cristais. Mesmo com a otimização, os cristais demonstraram ter tamanho insuficiente para difração (Figura 14-B)

Duas novas otimizações foram realizadas, utilizando aditivos comerciais e pela técnica micro e macroseeding. O seeding consiste na masseração de microcristais já existentes para possibilitar uma melhor nucleação e conseqüentemente aparecimento de cristais maiores. Contudo, apenas com o uso do kit comercial Additive Screen HT da Hampton Reserch, cristais de tamanho satisfatório foram obtidos com o aditivo 0,1M Hidroclorito Betaina (Figura 14-C).

Os cristais foram levados para a MX2 e difrataram a uma resolução aproximada de 5,0 Å (Figura 15), resolução insuficiente para a coleta e processamento dos dados.

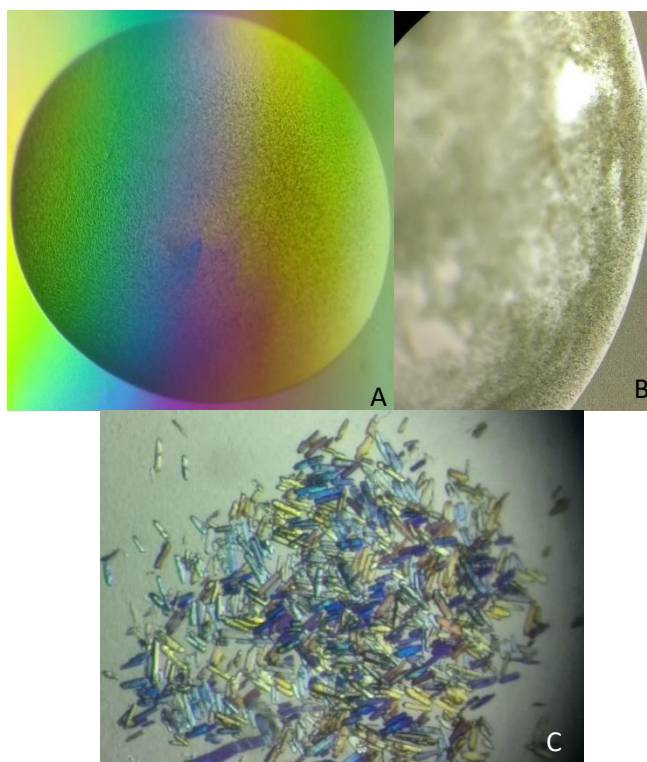


Figura 14 - Evolução do crescimento de cristais de PaDHNA em 200mM CaCl₂, 0,1M Acetato de sódio e 36% MPD. A) Microcristais obtido no kit Classic 5-8 da Jena Bioscience, realizado pelo robô de cristalização Oryx 4. B) A primeira otimização dos cristais teve-se um aumento não muito significativo no tamanho dos cristais. C) A segunda otimização dos cristais utilizando o Kit Additive Screen da Hampton Research aumentou significativamente o tamanho dos cristais.

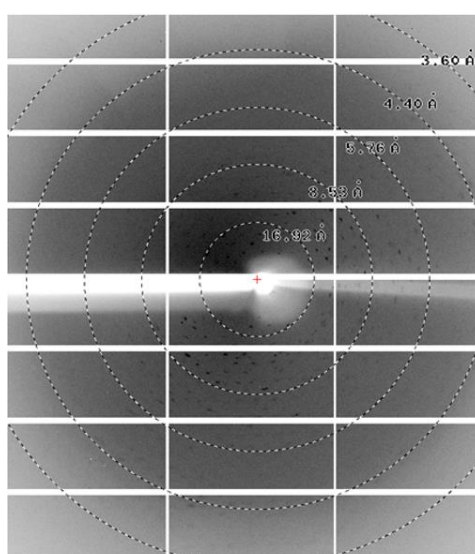


Figura 15 - Padrão de difração da enzima PaDHNA, com a resolução máxima obtida de aproximadamente 5,0 Å

4.2 BaDHPS, T70S e P72R

4.2.1 Clonagem de MIDHP e BaDHPS

O fragmento gênico referente ao gene sintético para MIDHPS (*folP1*) foi satisfatoriamente obtido a partir da digestão do pUC57 com as enzimas NdeI e XhoI, assim como a linearização do vetor de expressão pET28b (Figura 16). Com a obtenção desses produtos da digestão, foram realizadas a purificação e em seguida a reação de ligação. A reação de ligação foi transformada em células competentes DH5 α . Para confirmação da clonagem, colônias obtidas na transformação foram inoculadas em meio LB e seu DNA purificado. Em seguida foi realizada uma dupla digestão dos plasmídeos, no qual mostrou a presença do fragmento gênico com o tamanho esperado (Figura 17). Além disso, o sequenciamento também foi realizado confirmando a integridade da sequência.

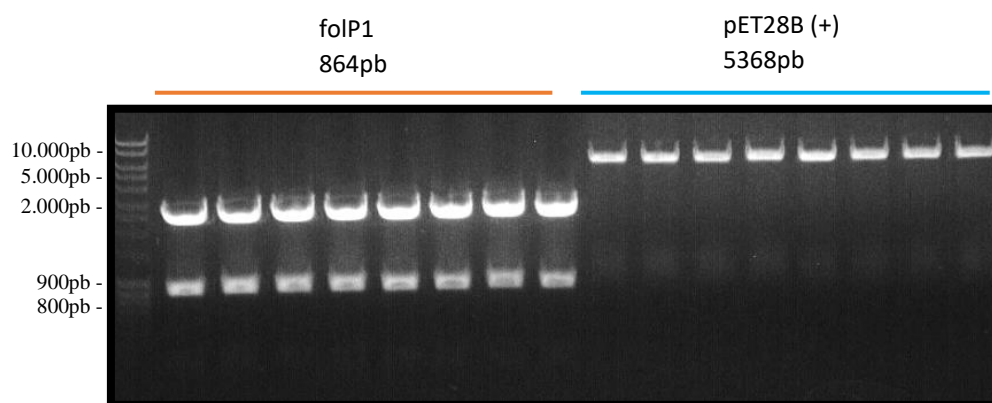


Figura 16 - Digestão do gene *Mycobacterium leprae folP* e vetor pET28b visualizados em gel de agarose 0,8%. Em *folP1*, as bandas de 2.000pb são referente a Puc57, e as inferiores, o gene de interesse. Em cada coluna há uma digestão utilizando os mesmo DNAs e demais reagentes. Marcador MassRuler DNA Ladder Mix de Thermo Fischer Scientific

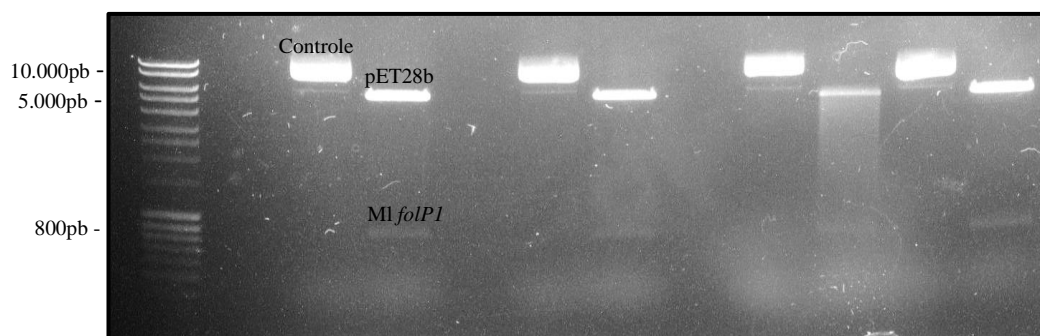


Figura 17 - Digestão para confirmação da ligação do gene *Mycobacterium leprae folP* em pET28b. As bandas referentes ao gene podem ser observadas na posição correta referente ao seu tamanho de 864bp, assim como as bandas do vetor. Foi utilizado um controle o pET28b com Ml *folP* não digerido para verificar a qualidade das amostras

4.2.2 Mutagênese Sítio Dirigida dos Mutantes de BaDHPS, MIDHPS e MtDHPS

Mediante ao aparecimento das colônias após as reações de mutagênese, estas foram inoculadas, purificadas e sequenciadas no Centro de Pesquisa sobre Genoma Humano e Células-Tronco IB-USP. Uma amostra de cada mutação foi enviada, contudo, não tivemos sucesso em conseguir uma colônia positiva. Uma atribuição a presença de colônias negativas pode ser devido à quantidade considerável de plasmídios intactos deixados por uma ação incompleta da enzima DpnI. De acordo com Lei Zheng et al, 2004, que estes plasmídeos intactos podem ser transformados com muito mais eficiência quando comparado com os plasmídeos sem metilações. Um maior tempo de exposição a DpnI e uma menor quantidade de DNA foram utilizados para tentar diminuir a interferência dos plasmídeos sem metilações da reação, diminuindo assim as chances de colônias falso-positivas e aumentando a probabilidade de sucesso da mutação. Contudo, mesmo assim, não obtivemos colônias positivas e para otimização de tempo decidiu-se adquirir os mutantes T70S e P72R junto a empresa GenScript.

4.2.3 Expressão e Purificação de MIDHPS, BaDHPS, T70S e P72R

Após a confirmação do inserto no vetor de expressão para o gene *folP1*, MIDHPS, BaDHPS, T70S e P72R foram superexpressos em células competentes BL21(DE3). Entretanto, para verificar a melhor condição de expressão para MIDHPS, foram realizados testes de expressão com a variação da temperatura, concentração de IPTG, tempo de expressão e a utilização de células pGRO7.

Optou-se em utilizar a condição de expressão a temperatura de 25 °C, 1 mM IPTG, por 14 h para MIDHPS. Desta maneira, para a produção de proteína em quantidades satisfatórias foram produzidos 4 L de cultura e conforme esperado, a maior parte da MIDHPS estava na fração solúvel.

Para a expressão da enzima BaDHPS e seus mutantes, embora tivéssemos trabalhando com um plasmídeo que apresentasse otimização de códons para expressão em *E coli*, seguimos o mesmo protocolo de expressão estabelecido por BABA OGLU et al (2004), isto é 37 °C por 4 h e 1 mM de IPTG. O resultado da expressão pôde ser observado na Figura 18. Pela análise do gel SDS-PAGE pôde-se observar que a BaDHPS encontra-se predominantemente na fração insolúvel. Entretanto, a purificação da fração solúvel se demonstrou suficiente para uma alta recuperação da proteína

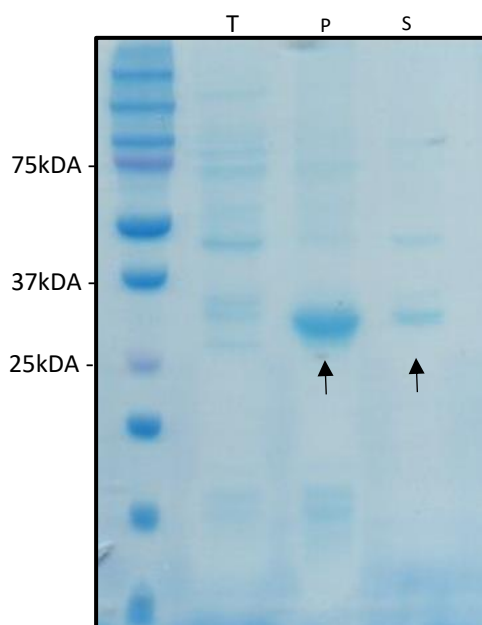


Figura 18 - Gel SDS-PAGE mostrando o resultado da expressão de BaDHPS utilizando BL21(DE3) a 37 °C por 4 h. Observou-se que a proteína se encontra predominantemente na fração insolúvel (P). As bandas referentes a proteína são destacadas pelas setas.

Não foi necessário o teste de expressão de ambos os mutantes, uma vez que a condição utilizada na proteína selvagem (BaDHPS) também apresentou um alto rendimento para os mutantes T70S e P72R, conforme demonstra a Figura 19.

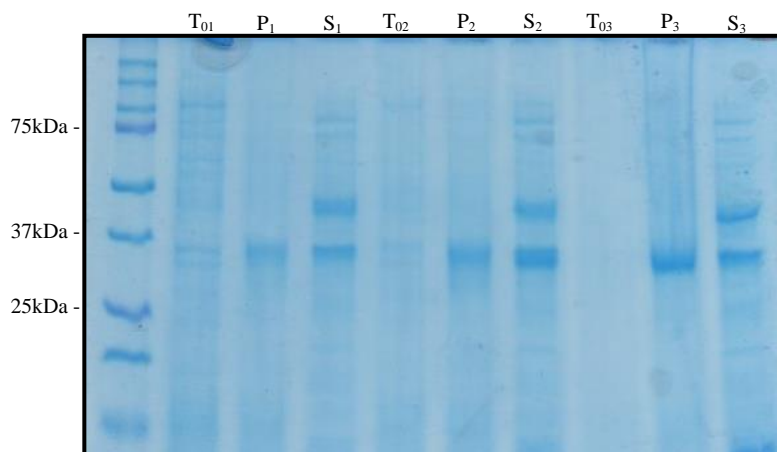


Figura 19 - Gel SDS-PAGE demonstrando as expressões dos mutantes T70S e P72R quando comparado com a selvagem BaDHPS. Foi observado que ambos as proteína mutantes estão predominantemente na porção solúvel, S1 e S2 assim como em selvagem S3. Aonde T₀₁, P₁ e S₁ são respectivamente Não induzido P72R, Não- solúvel P72R e solúvel P72R; T₀₂, P₂ e S₂ são Não induzido T70S, Não- solúvel T70S e solúvel P72S respectivamente e T₀₃, P₃ e S₃, Não-induzido BaDHPS, Não- solúvel BaDHPS e solúvel BaDHPS.

Uma vez estabelecidas as condições de expressões para as enzimas, essas foram purificadas por afinidade IMAC utilizando colunas His-Trap IMAC 5ml seguida de purificação por exclusão molecular em um sistema de purificação de proteínas tipo Akta purifier (GE healthcare)

Na purificação de MIDHPS observou-se que esta proteína se apresenta na forma agregada. A análise da purificação por afinidade em conjunto com o gel SDS-PAGE (Figura 20) demonstrou que impurezas foram eluídas junto com a proteína de interesse, com cerca de 41% de tampão B. Apenas as frações mais puras foram encaminhadas para a gel-filtração.

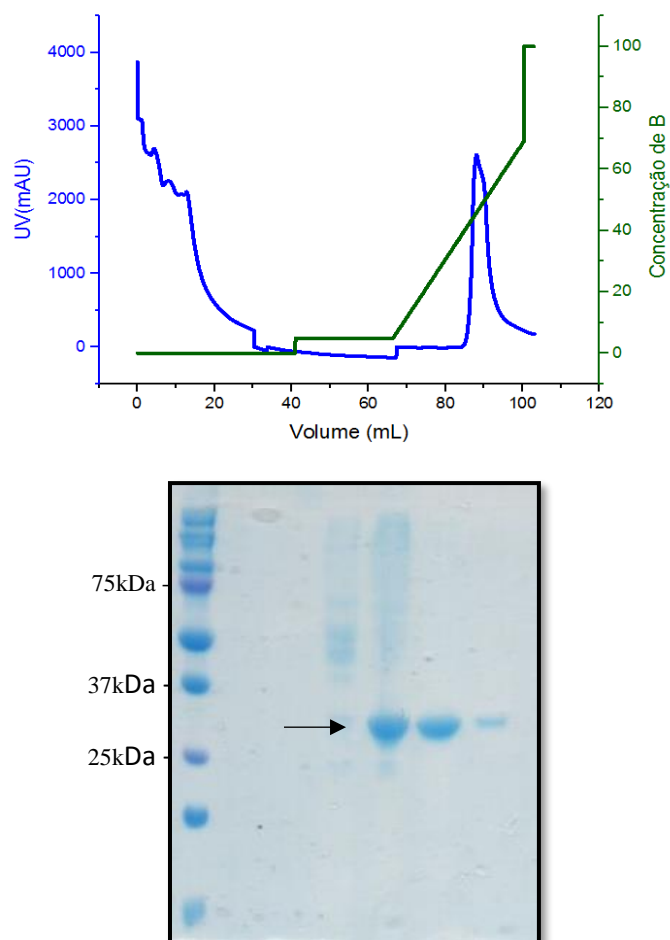


Figura 20 - Afinidade de MIDHPS demonstrou que a proteína (seta preta) está sendo eluída junto com contaminantes, possivelmente uma chaperona. Isso demonstra que o contaminante, apesar de não possuir His-tag, está sendo capaz de se ligar na coluna ou está agregado com a proteína de interesse.

Na etapa de exclusão molecular da MIDHPS, obtivemos apenas um único pico com 40 ml de tempo de retenção (Figura 21), ou seja, no volume morto da coluna, um primeiro indicativo de agregação. Quando realizado o gel SDS-PAGE referente ao pico, foi constatada a presença de uma banda referente ao peso molecular correto da enzima reforçando de que a proteína está de fato agregada. Para a confirmação, foi realizado em duplicata a técnica de Espalhamento de Luz Dinâmica (DLS) (Figura 22-A)

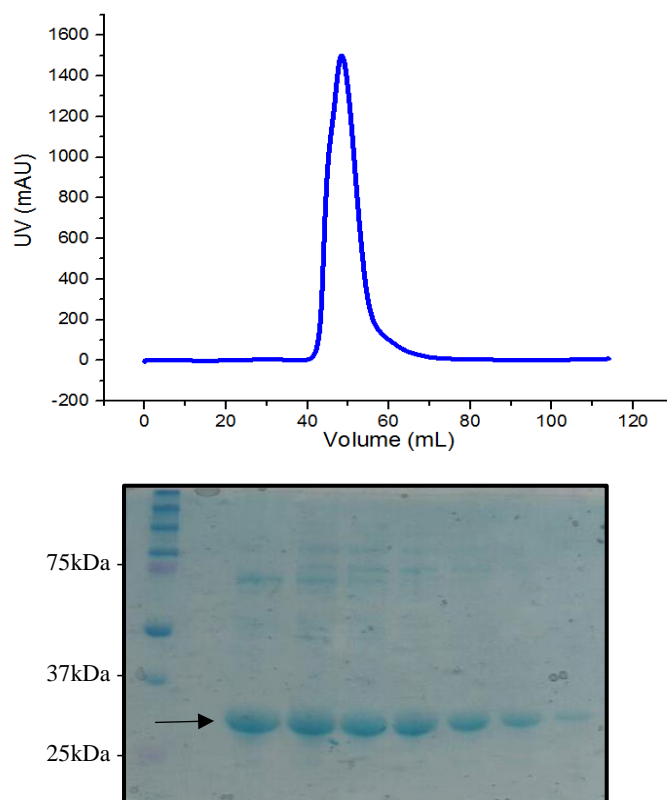


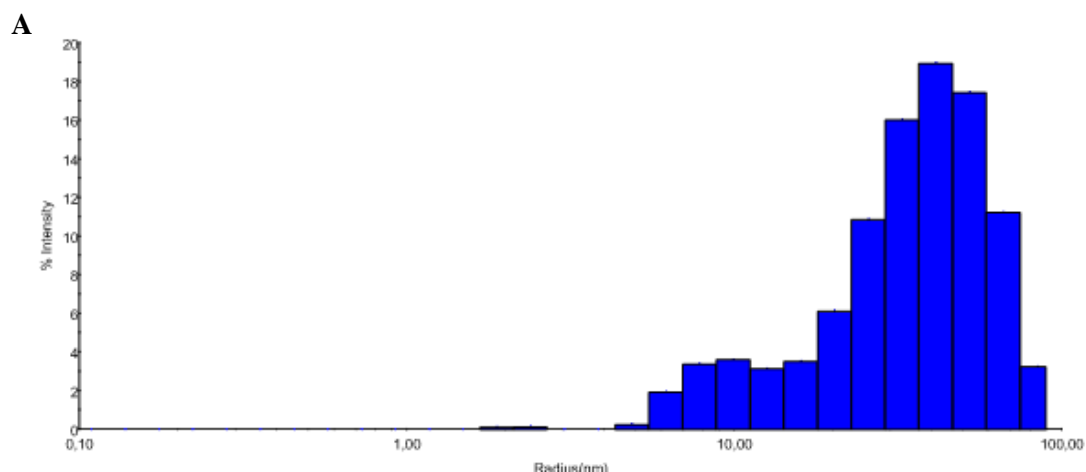
Figura 21 - A gel filtração (GF) em conjunto com o gel SDS-PAGE e a técnica de Espalhamento de Luz Dinâmica (DLS) indicam que a MIDHPS deve apresentar agregada. A seta preta destaca as bandas referentes a proteína.

Um dos motivos que são responsáveis pela agregação de proteínas é o seu incorreto enovelamento, expondo suas porções hidrofóbicas que em condições naturais ficam altamente protegidas no centro de sua estrutura. A adição de detergentes, como o Thesit, na lise celular e na purificação de proteínas tem como o objetivo impedir a precipitação e agregação. Como qualquer outro detergente, o Thesit tem a característica de ser anfipático, ou seja, sua estrutura possui uma porção hidrofóbica (cauda) e uma porção hidrofílica (cabeça). Com isso, é capaz de se ligar nas porções hidrofóbicas expostas da proteína e impedir a repulsão (PRIVÉ, 2007).

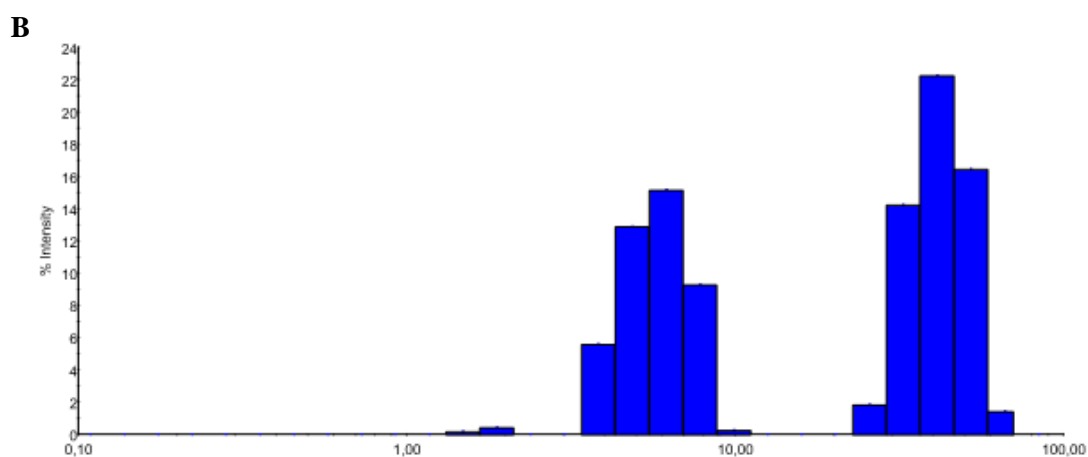
Sendo assim, uma segunda tentativa foi realizada utilizando o detergente Thesit junto aos tampões A e B e durante a lise celular. Uma concentração de 0,1% de Thesit foi acrescentada aos tampões. Além disso, como foi verificado pelo thermofluor que esta proteína é extremamente instável, com início de desenovelamento à 30°C, e por isso, na segunda purificação os tampões A e B foram refrigerados a uma temperatura de 10°C antes de ser utilizado na purificação, para um melhor controle de temperatura durante o processo de purificação. Mesmo assim, a proteína continuou apresentando a característica

de agregação. Os padrões do pico tanto na afinidade como na exclusão molecular (GF) se mantiveram o mesmo, como mostra a Figura 23. Além disso, um segundo ensaio de DLS foi realizado (Figura 22-B) na qual foi verificado três picos. Como é esperado que com o uso de detergente haja a formação de micelas e que estas são altamente carregadas mas são consideravelmente pequenas e espalham muito pouco a luz (PECORA, 1985), podemos presumir que o primeiro pico seja referente a uma micela. Já o pico 2 e 3, pode ser referente a diferentes estados de agregação da proteína de interesse.

Devido as dificuldades encontradas em trabalhar com a enzima MIDHPS e, decidimos iniciar o trabalho a enzima BaDHPS para ser utilizada como modelo para o entendimento dos efeitos das mutações identificadas em MIDHPS, uma vez que ambas sequências apresentam uma alta similaridade.



	Radius (nm)	%Pd	Mw-R (kDa)	%Intensity	%Mass
Peak 1	2.158	11.7	20	0.2	49.6
Peak 2	9.342	24.9	628	12.3	43.0
Peak 3	42.309	39.2	21514	87.4	7.4



	Radius (nm)	%Pd	Mw-R (kDa)	%Intensity	%Mass
Peak 1	1.765	10.3	13	0.6	28.2
Peak 2	5.861	22.8	211	43.2	71.4
Peak 3	42.471	20.8	21706	56.2	0.3

Figura 22 - DLS de MIDHPS demonstrou que a amostra de fato está extremamente agregada. Em A, temos o resultado do DLS antes do uso do Thesit, com peso molecular médio de 7400 kDa e três populações. Já em B, após o uso do detergentes, verificamos que o peso molecular médio caiu para 940kDa. Como o pico 1 apresenta um tamanho reduzido e intensidade muito baixa, podemos presumir que este pico seja referente a uma micela do detergente Thesit. Já os picos 2 e 3 provavelmente são referente a proteína de interesse em estados oligoméricos distintos mas agregados.

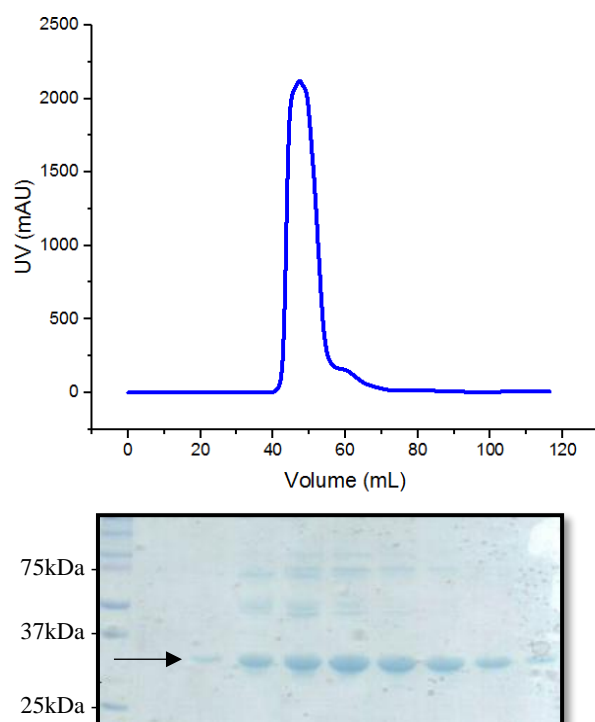


Figura 23 - Exclusão molecular de MIDHPS. Novamente, a proteína saiu no volume morto da coluna, cerca de 40 mL podendo indicar que a mesma está agregada. Seta preta destaca as bandas referente a MIDHPS.

Em contrapartida, a proteína BaDHPS apresentou um alto rendimento, e elui com aproximadamente 32% de tampão B. O cromatograma da purificação IMAC pode ser observado na Figura 24. Na purificação por exclusão molecular é possível observar que a proteína pode apresentar uma pequena parcela que está agregada e portanto, essas frações foram descartadas para os experimentos de cristalização (Figura 25). A pureza da proteína também pode ser verificada por gel SDS-PAGE na qual não apresenta qualquer outra banda de possíveis contaminantes

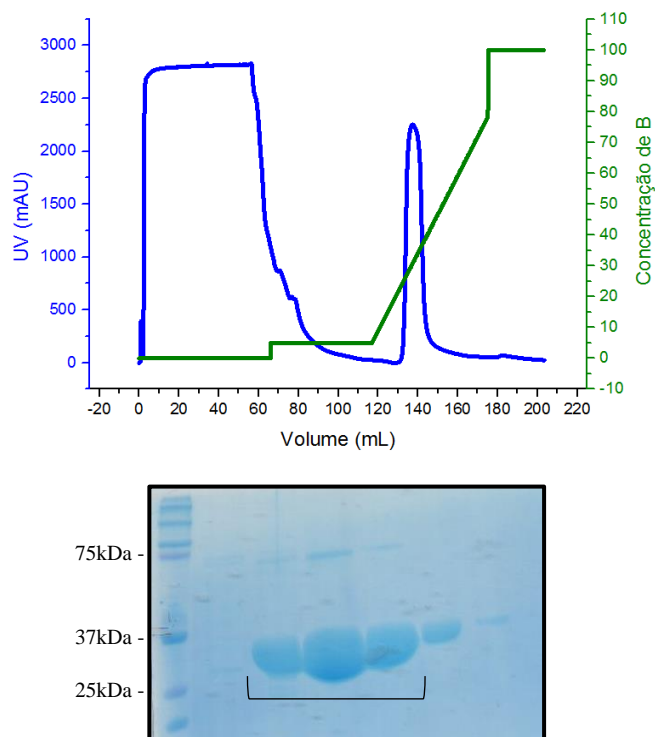


Figura 24 - Cromatograma de afinidade IMAC de BaDHPS, a proteína foi eluída com 32% de tampão B e apresentou um alto rendimento. Abaixo, gel SDS-PAGE da afinidade de BaDHPS confirmou o peso molecular e pureza da proteína (destacado pelo colchete), possibilitando o prosseguimento da purificação

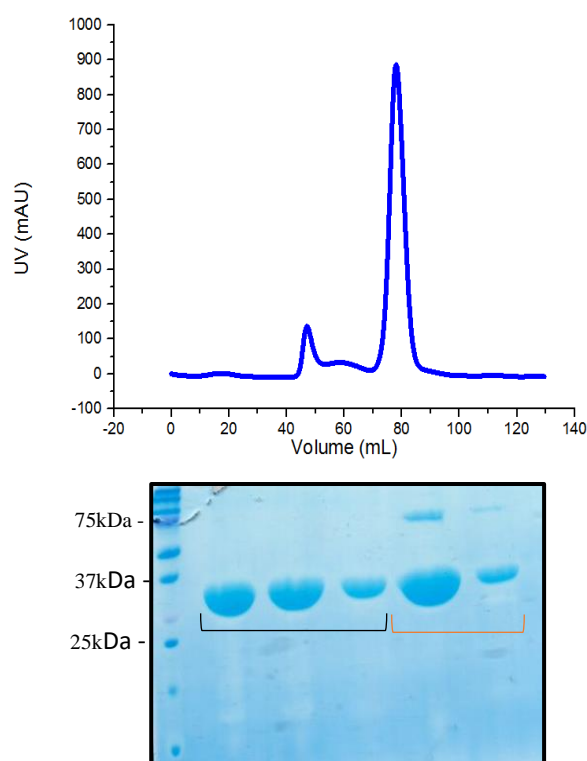


Figura 25 - Gel-filtração de BaDHPS, as frações referentes aos picos foram coletadas. O SDS-PAGE demonstrou que a proteína estava presente nas frações do segundo e maior pico. Este segundo pico teve 5 frações aonde as três primeiras, destacadas pelo colchete preto são as mais puras e essas foram alíquotadas, congeladas e utilizadas nos ensaios de cristalização. As bandas inclusas no colchete laranja foram frações menos puras, e, portanto, foram descartadas

Os cromatogramas para as BaDHPS T70S e P72R apresentam o mesmo padrão de purificação encontrado na enzima selvagem, sendo eluídos com 35% de tampão B e alto rendimento. Ambas as purificações por afinidade IMAC podem ser observadas na Figura 26. Na purificação por exclusão molecular também obtivemos um alto rendimento devido ao alto sinal de UV. Tanto BaDHPS T70S quanto P72R tiveram uma parcela de proteína agregada que foram descartadas. Nesta etapa da purificação, pela análise do gel SDS-PAGE, foi possível a retirada quase que total dos contaminantes observados na purificação por afinidade (Figura 27).

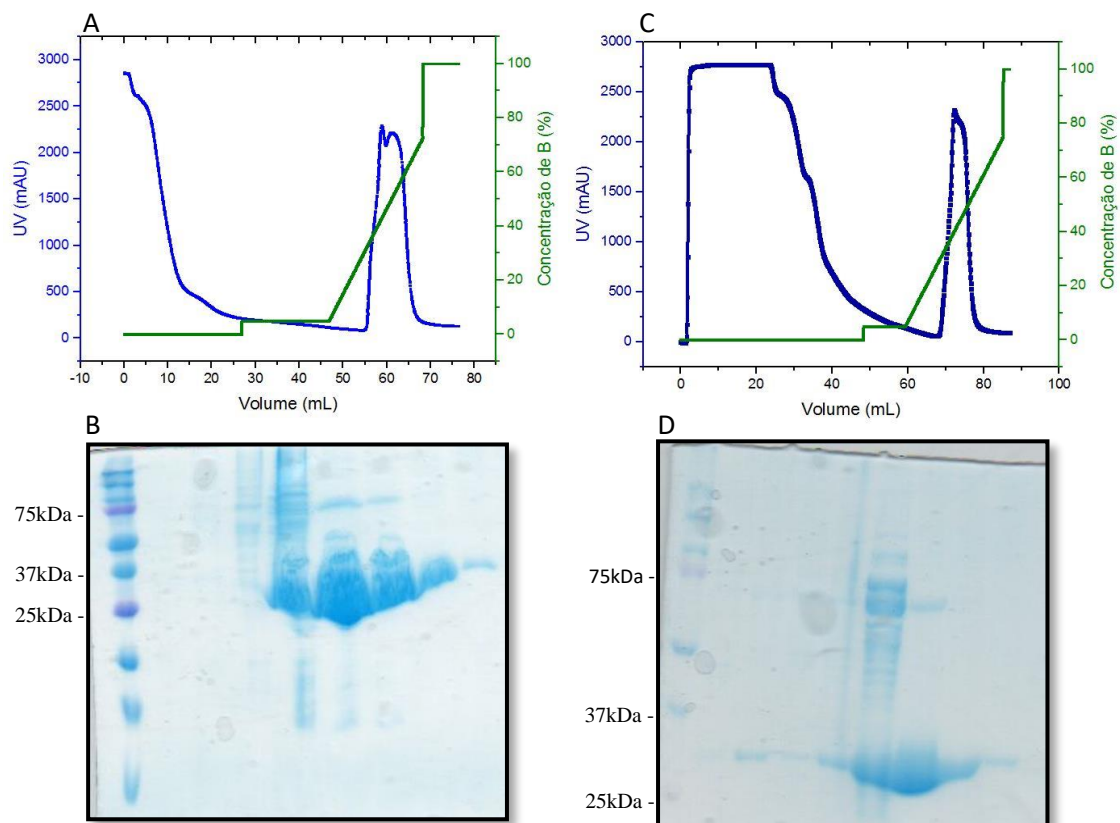


Figura 26 - Purificação por afinidade dos mutantes de BaDHPS com os respectivos géis SDS-PAGE abaixo. Em ambos, foi observado um alto rendimento de proteínas pelo alto sinal da UV obtido. Os mutantes foram eluídos com 35% de tampão B. Purificação do mutante BaDHPS T70S (A), o gel SDS-PAGE (B) demonstra que a amostra (colchete preto) foi eluída com alguns contaminantes (colchete laranja) de maior peso molecular. Purificação do mutante P72R (C), assim como o T70S, obteve-se contaminantes junto a amostra

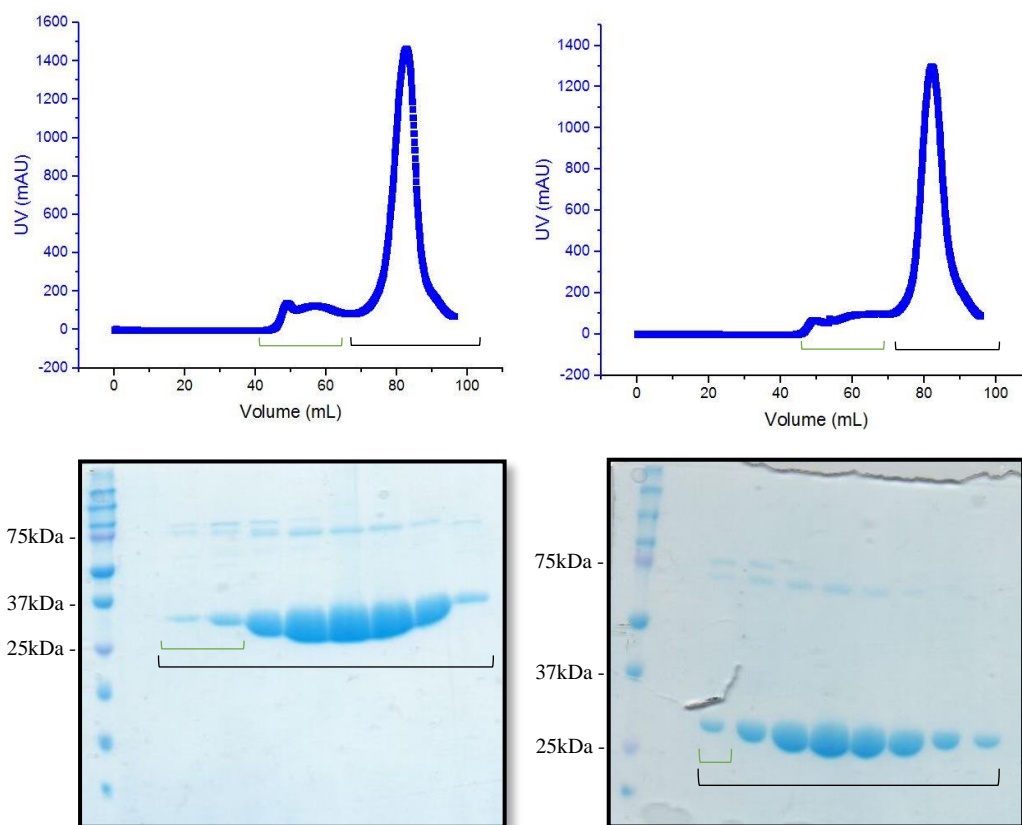


Figura 27 - Exclusão molecular dos mutantes BaDHPS T70S (esquerda) e P72R (direita). Em ambos, foi possível a separação da proteína de interesse (colchete preto) dos contaminantes presentes na etapa anterior. Da mesma maneira que na proteína selvagem, há a presença de uma parcela de amostra agregada (colchete verde) em ambos os mutantes. Esta parcela foi descartada para não interferir nos ensaios de cristalização.

4.2.4 Thermofluor de MIDHPS, BaDHPS, T70S e P72R

Para a análise dos dados de Thermofluor, esses foram normalizados e analisados no programa Origin v.2016. Para BaDHPS, as melhores condições encontradas foram 50 mM Bis-Tris pH 6,0; 50 mM Citrato de sódio pH 5,5, 200mM NaCl; 50mM Hepes pH 7,5, 200mM NaCl. Entretanto na condição Bis-Tris é possível observar na Figura 28-A que a fluorescência já inicia a 0,35 unidade/normalizada, podendo indicar que a proteína já começa com um grau de desnovelamento. Nesse sentido, as condições mais adequadas são aquelas que possuem a curva mais deslocada para a direita, indicando que a proteína requer uma temperatura maior para iniciar a desnaturação. De maneira geral, BaDHPS demonstrou-se estável. A realização do thermofluor de BaDHPS demonstrou os tampões na qual a proteína fica mais estável facilitando futuros ensaios.

Como já havia sido feita uma busca das melhores condições de BaDHPS, não foi necessário realizar o mesmo com os mutantes, uma vez que a troca de apenas um aminoácido não deveria influenciar em uma mudança da estabilidade térmica.

Em contrapartida, o ensaio com a proteína de *M. leprae* demonstrou um padrão de instabilidade da proteína com os tampões presentes no kit (Figura 28-B). Mesmo após a seleção das melhores condições, a proteína inicia sua desnaturação entre 25°C e 30°C. O melhor tampão encontrado foi 50 mM Hepes pH 7,0 com temperatura de desnovelamento inicial de 30°C e desnovelamento total a 40 °C.

Além disso, como citado anteriormente, também foi realizado o thermofluor de BaDHPS e seus respectivos mutantes com alguns ligantes, como dapsona, ácido pteróico e sulfanilamida. O mutante T70S foi descrito por Nakata et al em 2011, como responsável pela maior suscetibilidade da DHPS à dapsona (em *M. smegmatis*), contudo, conforme a análise das figuras 29, o thermofluor demonstrou que ambas as enzimas mutantes estão menos estáveis termicamente quando o ligante é acrescentado (em comparação ao selvagem). A estabilidade de uma proteína está relacionada com a energia livre de Gibbs de desnovelamento (ΔG_u) que é dependente da temperatura. Com o aumento dessa temperatura, ΔG_u diminui. Contudo, quando há o complexo proteína-ligante, geralmente o ΔG_u aumenta, o que resulta em um aumento na T_m e um aumento da estabilidade térmica da proteína (NIESEN et al, 2007). Entretanto, pela análise da Figura 29, essa T_m teve uma diminuição significativa. De fato, Cimperman e colaboradores em 2011, demonstraram que alguns ligantes não só tem a capacidade de se ligar na proteína enovelada, mas

também desnovelada, como é o caso do 1-anilino-8-naphtaleno sulfonato (ANS). Quando o ligante apresenta esta característica, ele terá um efeito desestabilizador na proteína ao invés de estabilizador (CIMPERMAN et al, 2011).

Ao analisarmos a figura 29, é possível observar que, todas as curvas dos ligantes possuem uma T_m menor que em comparação com seu controle podendo indicar que as sulfas podem ser capazes de se ligar na DHPS desnovelada. Com isso, não podemos tirar nenhuma conclusão desde experimento considerando apenas as mutações. De fato, mesmo que os ligantes não trouxessem uma diminuição na T_m , já é sabido que o Thermofluor é uma técnica qualitativa e não quantitativa, impossibilitando concluir se essas mutações trouxeram ou não uma maior ou menor afinidade aos fármacos. Contudo, esse experimento foi extremamente válido para tirar informações sobre algum possível tipo de interação entre proteína e ligantes que foram confirmadas apenas no ITC.

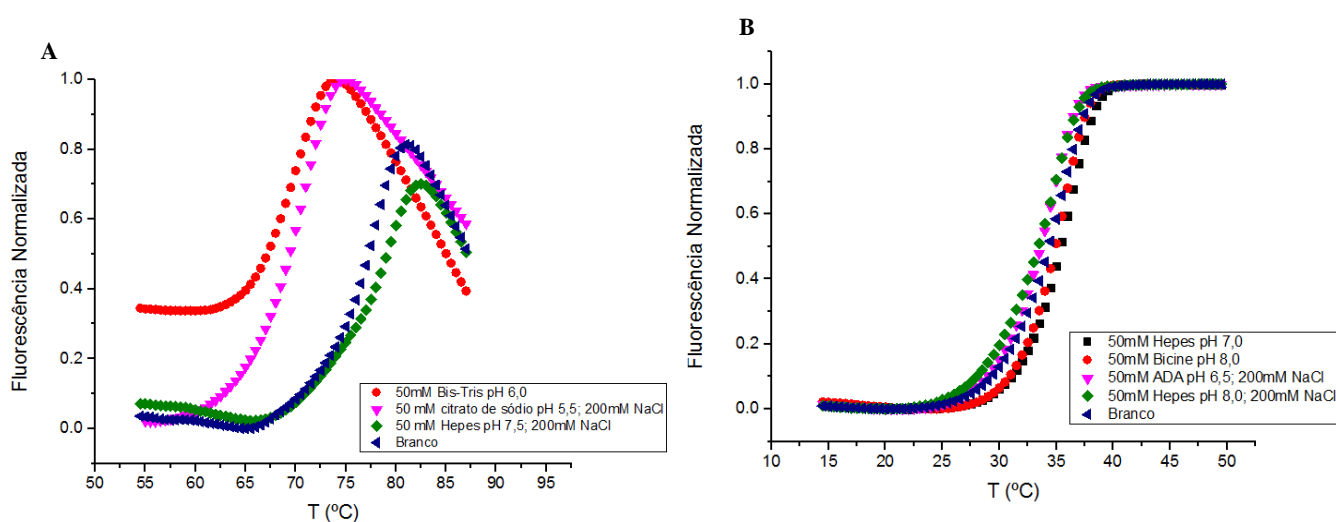


Figura 28 - Gráfico gerado pelo programa Origin v.2016 mostra os melhores tampões para as proteínas MIDHPS, em A e BaDHPS em B sendo os controles 50mM Tris-HCl Ph7,0 para MIDHPS e 50mM Tris-HCl pH 8,0, 500 M NaCl para BaDHPS

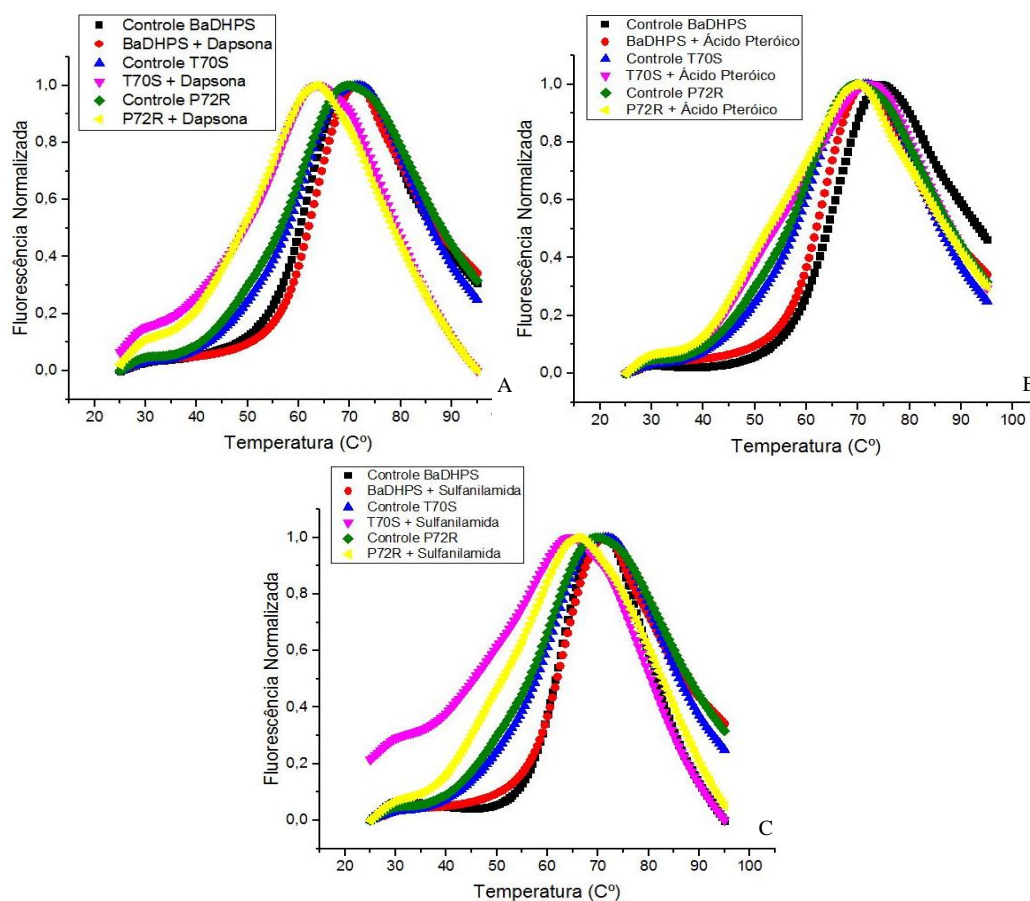


Figura 29 - Gráficos do thermal shift de BaDHPS, T70S e P72R com os respectivos ligantes (A) Dapsona, (B) Ácido pteróico e (C) Sulfanilamida. Teve-se uma diferença de 15°C entre as formas apo selvagem e mutantes e, em média, 20°C com os compostos indicando que tanto a alteração na sequência de aminoácidos, mas também as interações com os ligantes alteraram a T_m da proteína.

4.2.5 Calorimetria de Titulação Isotérmica e Fluorescência das DHPS

Com o intuito de complementar os resultados obtidos pelo termalfluor, e a fim de se obter o K_d das enzimas selvagens e mutantes foi realizado experimentos de ITC e Fluorescência.

Este último tem sido extremamente utilizado para o estudo de proteínas, peptídeos, ácidos graxos e oligonucleotídeos, principalmente em virtude desta técnica ser robusta e sensível. Fluoróforos absorvem a luz em um comprimento de onda (λ_{ex}) específico e após um curto intervalo de tempo, denominado tempo de vida fluorescente (τ), a energia é emitida em um comprimento de onda mais longo (λ_{em}) (GHISAIDOOBE, 2014).

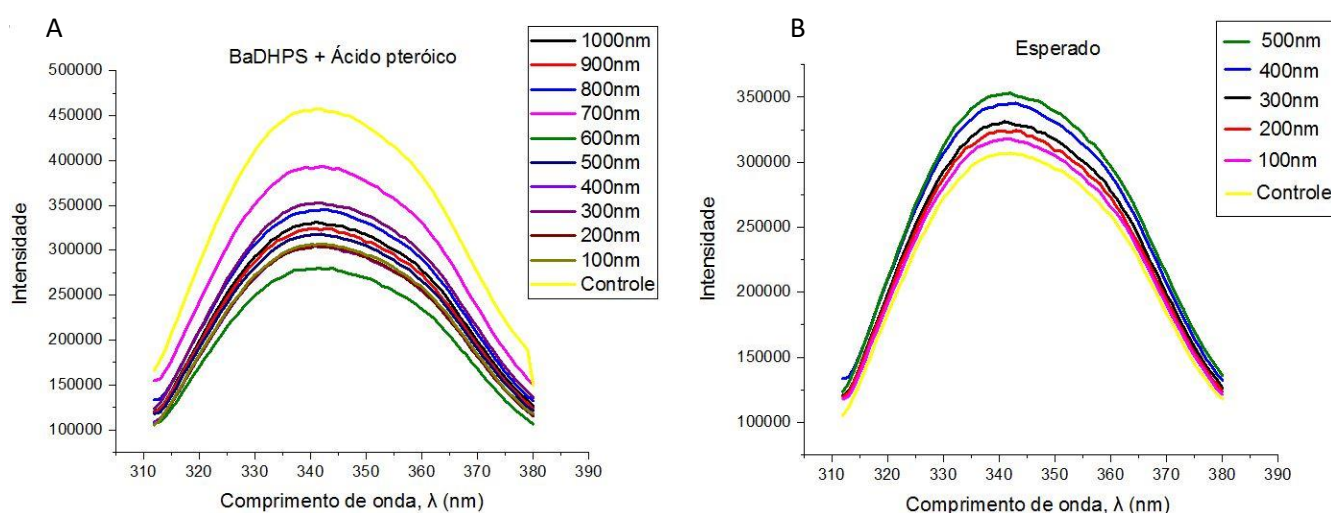
Os três aminoácidos aromáticos, triptofano, tirosina e fenilalanina possuem a capacidade intrínseca de absorver e fluorescer em comprimentos de ondas específicos, sendo esses, respectivamente, 280nm/348nm, 274m/303nm e 257nm/282nm (HELD,

2003), sendo atrativas opções para serem utilizadas como sondas para o estudo de interações de proteína por fluorescência.

O quenching se refere a todo e qualquer processo no qual a intensidade de fluorescência diminua de uma certa substância. Vários processos podem resultar no quenching como por exemplo, excitação de estados de reação, transferência de energia, formação de complexos e etc. (LAKOWICS, 1983).

Basicamente, quando ocorre a ligação de um ligante com uma proteína, verifica-se mudanças conformacionais na proteína. E é justamente este evento que a fluorescência explora para tirar informações sobre o mecanismo de ligação entre uma proteína e uma ligante, como por exemplo a constante de dissociação (K_d) calculada a partir do quenching (Figura 30-A)

Durante a mudança conformacional da proteína, aminoácidos são realocados e um quenching entre o estado apo e alo da enzima é captado pelo equipamento. Entretanto, é possível que esta mudança conformacional não seja suficiente para o deslocamento dos aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina, resultando um padrão de quenching errôneo onde não há uma relação entre a concentração do quencher (Ligante). Esse último padrão foi observado nos experimentos realizados neste trabalho. Em um experimento ideal, a intensidade adquirida pelo equipamento deve ser menor nas amostras com menor concentração de ligante (Figura 30-B).



A Calorimetria de Titulação Isotérmica é uma técnica que mede diretamente a energia de ligação de processos biológicos como ligação proteína-ligante, proteína-

lipídeo e antígeno-anticorpo. Dentre os parâmetros medidos pelo ITC estão a energia livre de Gibbs, entalpia, entropia e mudanças da capacidade de calor associado a ligações (EDWIN, 2005)

O equipamento utiliza-se de duas células diferentes, uma para a referência e outra para a amostra, para monitorar constantemente a diferença de calor entre as células. Na célula da amostra, é dispensada a proteína de interesse enquanto que na seringa é colocado o ligante. Durante o experimento, o equipamento utiliza a seringa para adicionar o ligante gradativamente na célula. Dessa maneira, é possível medir com precisão a quantidade suficiente de ligante necessária para saturar todos os sítios ativos da proteína presente na solução (EDWIN, 2005).

Pela análise das curvas de titulações da BaDHPS e dos mutantes T70S e P72R com ácido pteróico (figura 31), os valores do K_d foram, respectivamente, 33mM, 13 μ M e 91 μ M. Estes dados indicam que a mutação T70S causa um aumento na afinidade da proteína para o ligante enquanto que a mutação P72R causa uma diminuição da afinidade pelo ligante usado.

Em contrapartida, ao contrário do esperado, pode-se observar que as curvas de titulação com o ligante sulfanilamida apresentam um aumento na liberação do calor. Isso se deve ao fato de que o calor liberado proveniente da interação da proteína de interesse com o ligante (endotérmico) é muito pequeno em comparação com o calor *background* ou de diluição (exotérmico). O que ocorre é que no início da corrida, temos dois efeitos compensatórios ocorrendo: a interação endotérmica da interação proteína-ligante, e o calor exotérmico de diluição. No decorrer das titulações, a proteína é saturada com o ligante e o calor de interação progressivamente desaparece, restando apenas o calor de diluição, que pode indicar um *mismatch* entre a solução da seringa e da célula.

Como as funções do programa Origin não consideram o calor de diluição em zero, é necessário subtrair este calor *background* manualmente pela subtração da média das últimas injeções. Dessa maneira, o fitting das curvas se torna possível para um modelo com um único sítio ativo, como foi realizado. Mesmo assim, os resultados do ITC de BaDHPS com sulfanilamida se demonstraram inconclusivos.

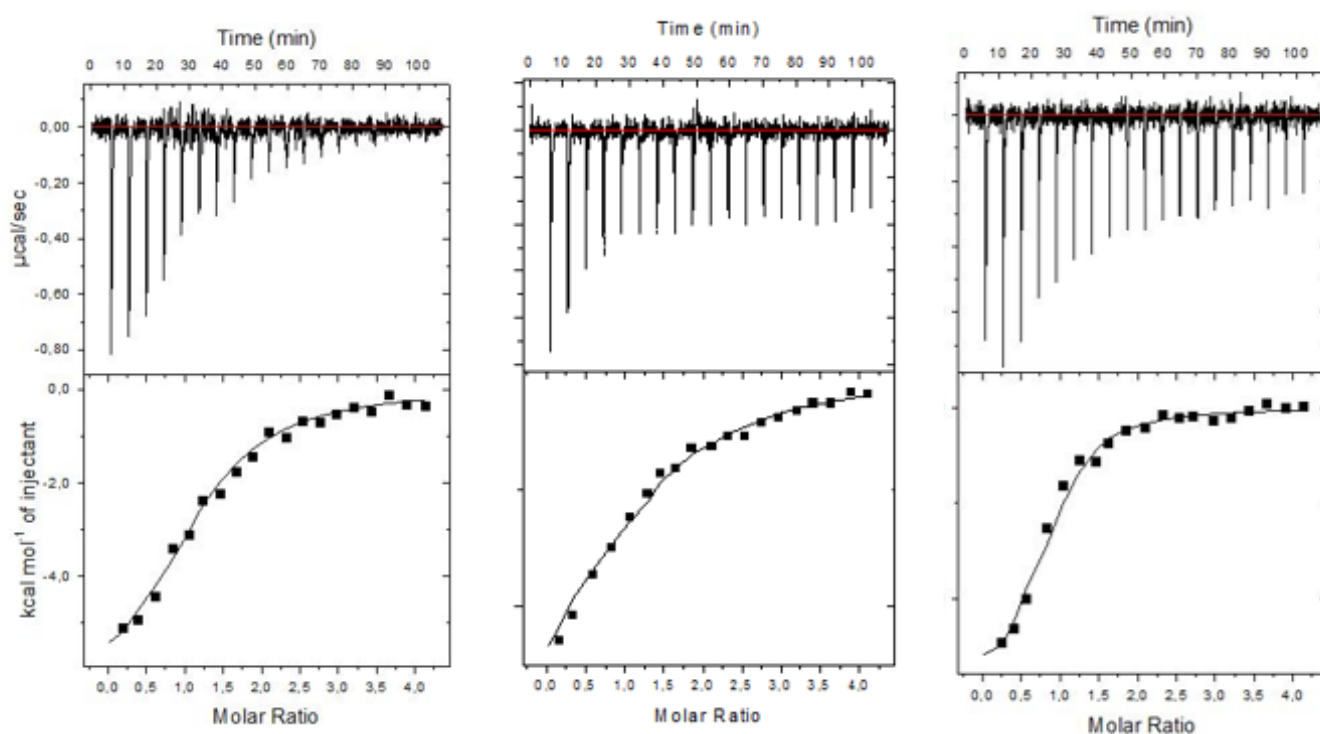


Figura 30 - Curva de titulação da proteína BaDHPS e seus respectivos mutantes T70S e P72R.

Ao analisar a estrutura dos aminoácidos treonina e serina (T70S), observamos que a única diferença é a presença do grupo hidroxila e metil na treonina (Figura 32). Apesar de ambos os aminoácidos serem polares, mas não carregados, o grupo hidroxila de ambos os aminoácidos são responsáveis por serem capazes de realizar ligações de hidrogênio e o metil, interações hidrofóbicas com outros resíduos de aminoácidos da proteína.

Em contrapartida, a diferença estrutural entre a prolina e a arginina (P72R) é muito maior do que as anteriormente analisadas. A prolina tem característica apolar, rígida e causa a desrupção de estruturas secundárias, e por ser hidrofóbica, tem uma maior tendência de estar localizada no interior da estrutura proteica. Entretanto, a arginina, por estar positivamente carregada, tipicamente se dispõem na parte externa da estrutura por ligações de hidrogênio.

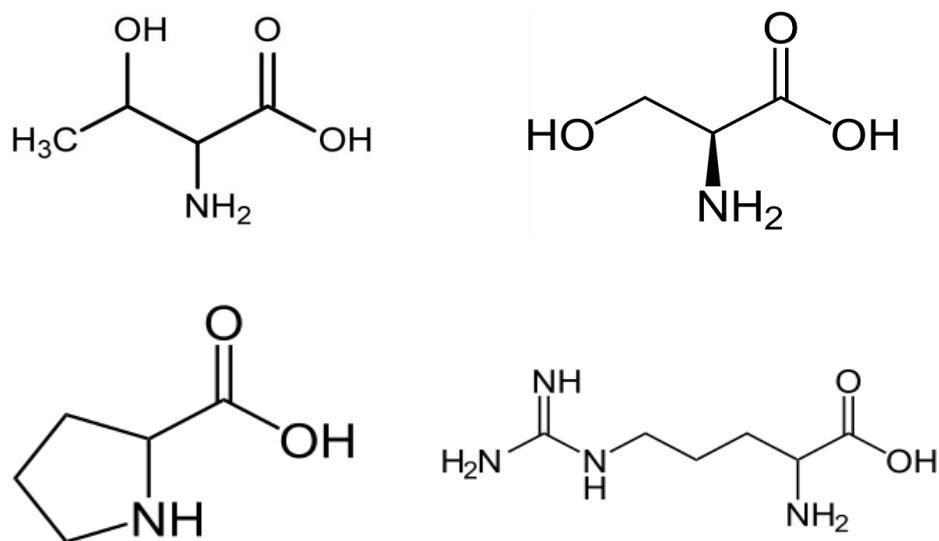


Figura 31 – Estruturas dos aminoácidos treonina, serina, prolina e arginina respectivamente

Para uma melhor compreensão dos tipos de interações que estão ocorrendo entre o ácido pteróico e BaDHPS, foi calculado os valores da Energia Livre de Gibbs (ΔG), entalpia (ΔH) e entropia ($-T\Delta S$) utilizando a fórmula de Reação de Energia Livre de estado-padrão: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$. Estes valores foram graficamente comparados (Figura 33). Em ITC, a energia livre de Gibbs irá medir o trabalho máximo realizado durante o processo de interação proteína-ligante. Quando ΔG possui valor negativo, a reação de interação tende a ocorrer espontaneamente (VELÁZQUEZ-CAMPOY, 2004), como foi verificado em nosso ensaio.

Por outro lado, a entalpia reflete o número e o tipo de ligações químicas nos reagentes e produtos. Quando uma reação libera calor, a reação é denominada exotérmica, ou seja, o conteúdo de calor dos produtos é menor que a dos reagentes e ΔH terá valor negativo. Em ITC, ΔH demonstra o quanto favorável as interações de hidrogênio, Van der Waal e eletrostáticas ocorrem na interação proteína-ligante. Em contrapartida, entropia surgirá devido a restrições dos átomos da cadeia lateral e no rearranjo das moléculas de água e íons, além de demonstrar o quão favorável as interações hidrofóbicas estão ocorrendo (DUTTA, 2015)

Pela interpretação da figura 33, podemos observar que o valor da entropia de BaDHPS esta positivo, ou seja, tem-se uma penalidade entropica. Esta entropia desfavorável pode indicar que mudanças conformacionais consideráveis estão ocorrendo

na proteína durante a interação com o ligante (GAO, 2015) e provavelmente o ácido pteróico está tendo uma resistência ao se ligar na enzima selvagem. Entretanto, para ambos os mutantes, T70S e P72R, tivemos um ganho entrópico. Para T70S, como a única diferença estrutural entre os dois aminoácidos é a ausência do grupo metil, provavelmente esta ausência estaria fornecendo uma maior flexibilidade ao grupo hidroxil da serina para realizar interações com o ligante o que explicaria o ganho entropico em T70S e a penalidade entrópica em BaDHPS.

Já em P72R, as diferenças nas características entre prolina e arginina são muito maiores. De uma lado, a prolina é um resíduo apolar, rígida e hidrofóbica e a arginina, polar, flexível, hidrofílica e carregada. Estas diferenças significantes podem estar trazendo uma desordem no microambiente do sítio ativo da proteína, resultando em um ganho entrópico. Estas possíveis interpretações das curvas observadas na figura 31, só poderão ser melhor compreendidas com uma estrutura de BaDHPS em complexo com o ácido pteróico por cristalografia. Como os resultados para o ITC da BaDHPS e sulfanilamida necessitam de mais estudos, os valores de ΔG , ΔH e de $-T\Delta S$ não foram calculados.

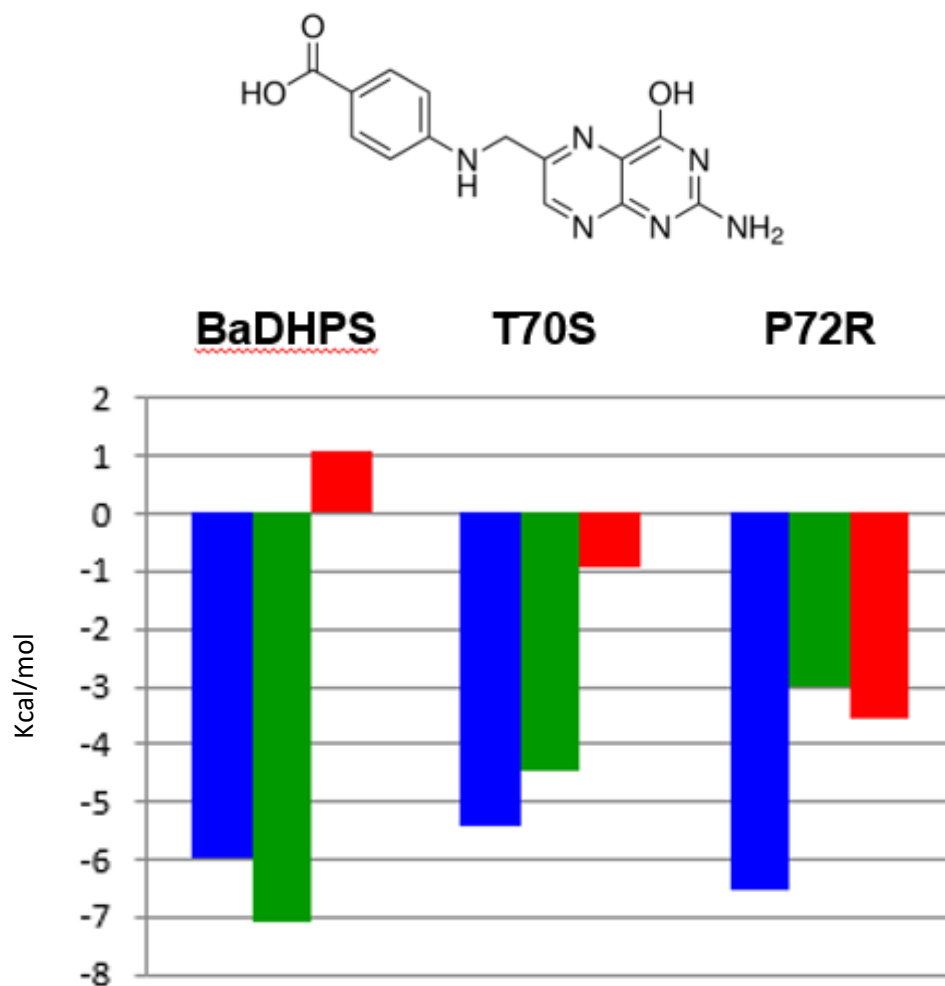


Figura 32 – Gráfico ilustrando os valores da Energia Livre de Gibbs (Azul), entalpia (verde) e entropia (Vermelho) do ITC de BaDHPS e mutantes com a titulação de ácido pteróico. A estrutura do ácido pteróico é ilustrado acima.

4.2.6 Cristalização de BaDHPS, T70S e P72R

Devido ao sucesso na produção da enzima BaDHPS e seus respectivos mutantes, estes foram submetidos a ensaios de cristalização. Foram realizadas tentativas de reprodução de cristais obtidos na literatura por BABAOGLU et al, 2004, bem como através de triagem de novas condições.

As melhores condições que apareceram cristais, ilustrados na figura 34, são aquelas que apresentavam 30% PEG 400; 100 mM MES pH 6,5 e 200 mM Acetado de Magnésio tetra hidratado; 20% PEG 3350. Além disso, se obteve sucesso na reprodução da condição reportada por BABAOGLU et al, 2004 (1,5 M de Sulfato de Lítio; 100 M Bis-Tris

propano). Entretanto, somente esses últimos foram reproduzidos e difrataram com resolução de 2.5 Å. Também foi realizada a co-cristalização com a Dapsona (Figura 35) com sua respectiva difração a 1.8 Å de resolução no LNLS e com Sulfanilamida (Figura 36).

Cristais das DHPSs mutantes, T70S e P72R, também foram obtidos na condição 100mM MES; 100mM MgCl₂; 30% peg 400 em co-cristalização com os ligantes Dapsona e ácido pteróico como demonstra a figura 37 e 38. Os cristais difrataram a 2.3 Å de resolução (Figura 39). Os dados foram indexados e integrados utilizando o programa XDS e a substituição molecular foi realizada pelo pacote CCP4, utilizando como modelo a BaDHPS (1TX2) como molde. Dificuldades foram encontradas durante esta etapa de substituição molecular uma vez que o programa não foi capaz de encontrar todas as unidades assimétricas da célula unitária e acredita-se ainda que possa existir o fenômeno de pseudo-translação em nossos cristais, tendo que os modelos obtidos apresentam valores de R excessivamente altos (Tabela 4)

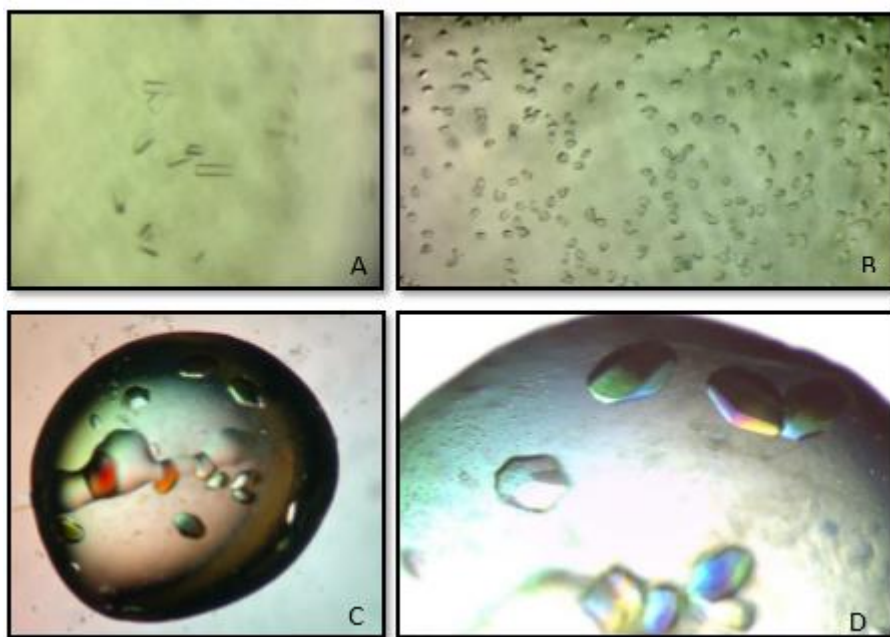


Figura 33 - A) 200 mM acetato de magnésio tetra hidratado; 20% PEG 3350; B) 30% PEG 400, 100mm MES pH 6,5, 100 mm MgCl₂; C) 1,5 M Sulfato de lítio e 100 mM Bis-Tris propano pH 6,5

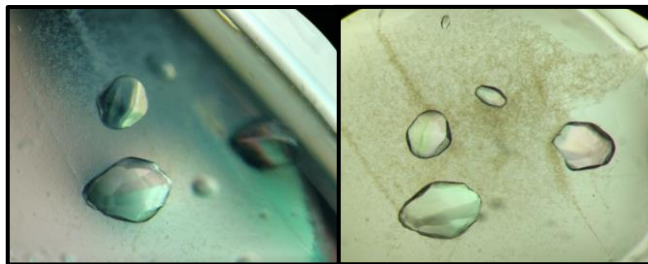


Figura 34 - Co-cristalização de BaDHPS com Dapsona (20 mM) em 1,8M Sulfato de lítio; 0,1M Bis-Tris propano

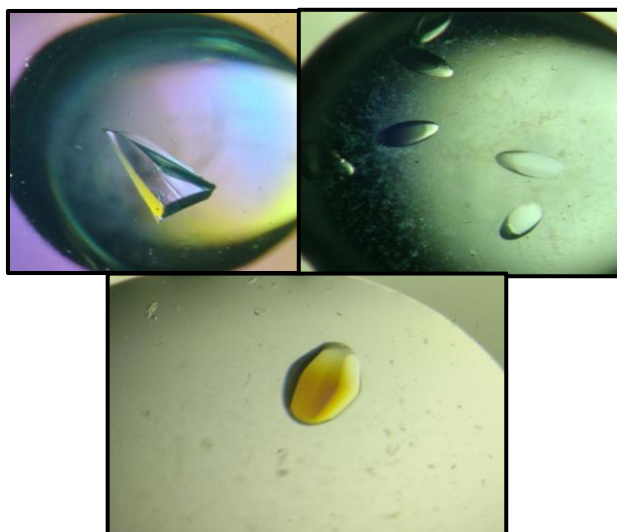


Figura 35 - Cristais de BaDHPS co-cristalizados com Sulfanilamida

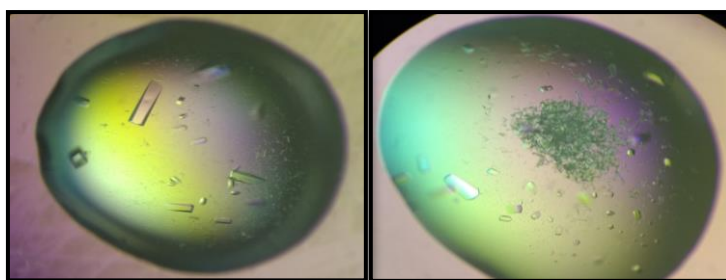


Figura 36 - Cristais dos mutantes de BaDHPS, sendo A: P72R co-cristalizado com Dapsona e B: T70S co-cristalizado com Dapsona. Ambos na condição 100mM MES; 100mM MgCl₂; 30% peg 400

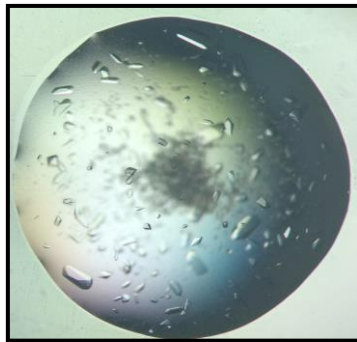


Figura 37 - Cristais de co-cristalização dos mutantes P72R (A) e T70S (B) com Ácido pteróico na condição 100mM MES; 100mM MgCl₂; 30% peg 400

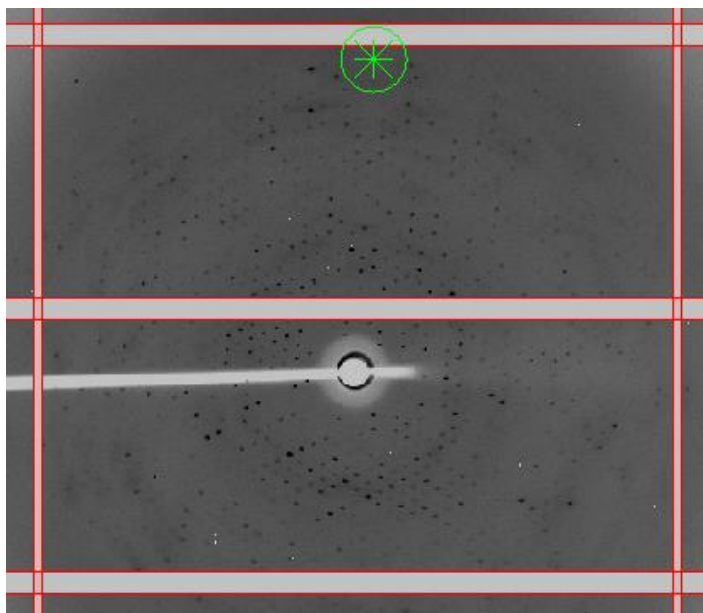


Figura 38 - Padrão de difração dos cristais de BaDHPS co-cristalizados com Dapsona

Tabela 4- Dados de dados de difração de raios-X obtidos para BaDHPS

Comprimento de Onda (Å)	2.488.310
Limite de Resolução (Å)	47.75 – 2.45 (2.39 – 2.39)
Grupo Espacial	I 2 2 2
Célula Unitária (a, b, c e α, β, γ)	60.319 71.245 72.219 90 90 90
Reflexões Totais	21512
Reflexões Únicas	61969(4411)
Multiplicidade	5.7 (5.9)
Completeza (%)	0.99 (93.4)
$\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle$	18.5 (1.8)
R-merge	0.056 (0.806)
R-meas	0.068 (1.009)

4.3 DHFR

4.3.1 Expressão e Purificação de DHFR

Após a confirmação da transformação das linhagens plasmidiais na célula de expressão BL21(DE3), MtDHFR foi superexpressa e purificada de acordo com protocolos previamente citados. Após a exclusão molecular, realizou-se SDS-PAGE com intuito de se verificar a pureza das amostras. Pela análise da Figura 40 podemos observar que MtDHFR se encontra extremamente pura, uma vez que nenhuma outra banda foi visualizada no gel.

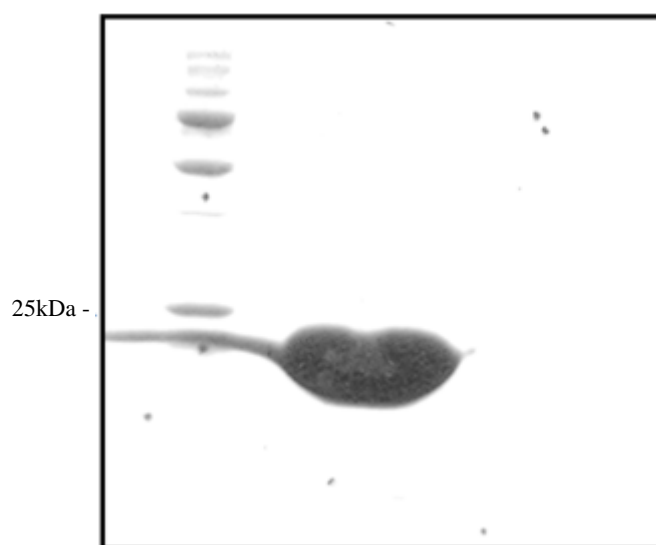


Figura 39 - SDS-PAGE com amostras da exclusão molecular de MtDHFR sem a presença de His-tag

4.3.2 Estudos Estruturais de DHFR em complexo com Cicloguanil

Após todas as etapas de purificação, proseguiu-se para os ensaios de cristalização nos quais foram possíveis produzir co-cristais com o inibidor cicloguanil na condição 2,6 M sulfato de amônio, 0,1 M MES e 0,01 M cloreto de cobalto, como demonstra a figura 41. Os cristais foram levados para serem difratados por raio-X na linha MX2 (LNLS-Campinas) e foi coletado um conjunto de dados com 1800 imagens com uma difração de 1,6 Å de resolução. Os dados foram indexados e integrados no programa XDS, na qual foi possível determinar o grupo espacial $P 2_1 2_1 2_1$, e a substituição molecular foi realizada pelo pacote CCP4 utilizando como modelo a MtDHFR (1DG8) como molde. As estatísticas de processamento e refinamento cristalográfico podem ser observadas na tabela 5

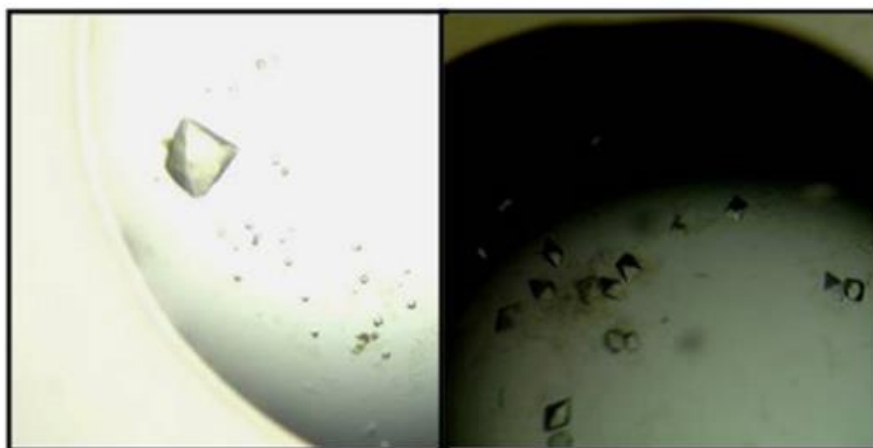


Figura 40 - Cristais de MtDHFR provenientes de uma co-cristalização com 10Mm de cicloguanil

Tabela 5: Parâmetros encontrados na etapa de refinamento da estrutura MtDHFR:NADPH:Cicloguanil

Comprimento de Onda (Å)	1,458
Límite de Resolução (Å)	30,67 – 1,523 (1,577 – 1,523)
Grupo Espacial	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Célula Unitária (a, b, c e α, β, γ)	60,319 71,245 72,219 90 90 90
Reflexões Totais	47955
Reflexões Únicas	47867 (4324)
Multiplicidade	11,6 (6,0)
Completeza (%)	0,99 (86,7)
$\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle$	19,7 (2,3)
Wilson B-factor	13,3
R-merge	0,098 (0,839)
R-meas	0,107 (1,001)
Reflexões usadas no Refinamento	47788 (4320)
Reflexões usadas no R-free	2346 (218)
R-work	0,1654 (0,2387)
R-free (%)	0,1947 (0,2895)
Resíduos da Proteína	319
RMS(ligações)	0,019
RMS(ângulos)	1,92
Ramachandran favorável (%)	98
Ramachandran permitido (%)	1,6
Ramachandran não-permitido (%)	0,31
Rotâmeros não permitidos (%)	1,2
Clashscore	7,9
Média B-factor	18,86
Número de grupos TLS	1

A estrutura de MtDHFR com cicloguanil apresenta um enovelamento previamente descrito por Li et al (2000) e Dias et al (2014) na qual consiste de uma fita β central flaqueada por seis fitas β centrais e quatro α -hélices. Contudo, Dias e colaboradores, 2014 demonstraram dois possíveis estados na qual a enzima pode adotar: Aberto e Fechado. Foi possível também verificar as diferenças estruturais nos subdomínios e nas alças entre ambas as conformações. Na conformação fechada, verificada em MtDHFR:NADPH e DHFRs similares (como DHFR de *Escherichia coli* (EcDHFR)) – os movimentos das alças L1 e L4 adotaram posições similares em ambos os organismos, possibilitando, inclusive, uma boa superimposição (DIAS, et al 2014).

Entretanto, Dias et al., 2014 foram capazes de obter apenas a estrutura de MtDHFR:NADPH em complexo com cicloguanil em sua conformação aberta, na qual o grupo nicotidamida do NADPH não está engatado no sítio ativo. Assim, não foi possível determinar se a presença do grupo nicotinamida do NADPH pode induzir mudanças significativas na posição de ligação da clicoguanil. Desta maneira, no presente trabalho, ao se fazer uma comparação da estrutura obtida por Dias et al, 2014 MtDHFR:NADPH:cicloguanil (conformação aberta) com a estrutura de MtDHFR:NADPH:cicloguanil (conformação fechada) (Figura 42) pôde-se observar que o posicionamento do grupo nicotidamida do NADPH causa uma rotação de cerca de 15° no posicionamento do grupo clorobenzil, pela realização de uma interação edge- π , em relação ao grupo pirimidina da molécula de cicloguanil (Figura 43-A). A posição do NADPH também alterou significativamente (Figura 43-B)

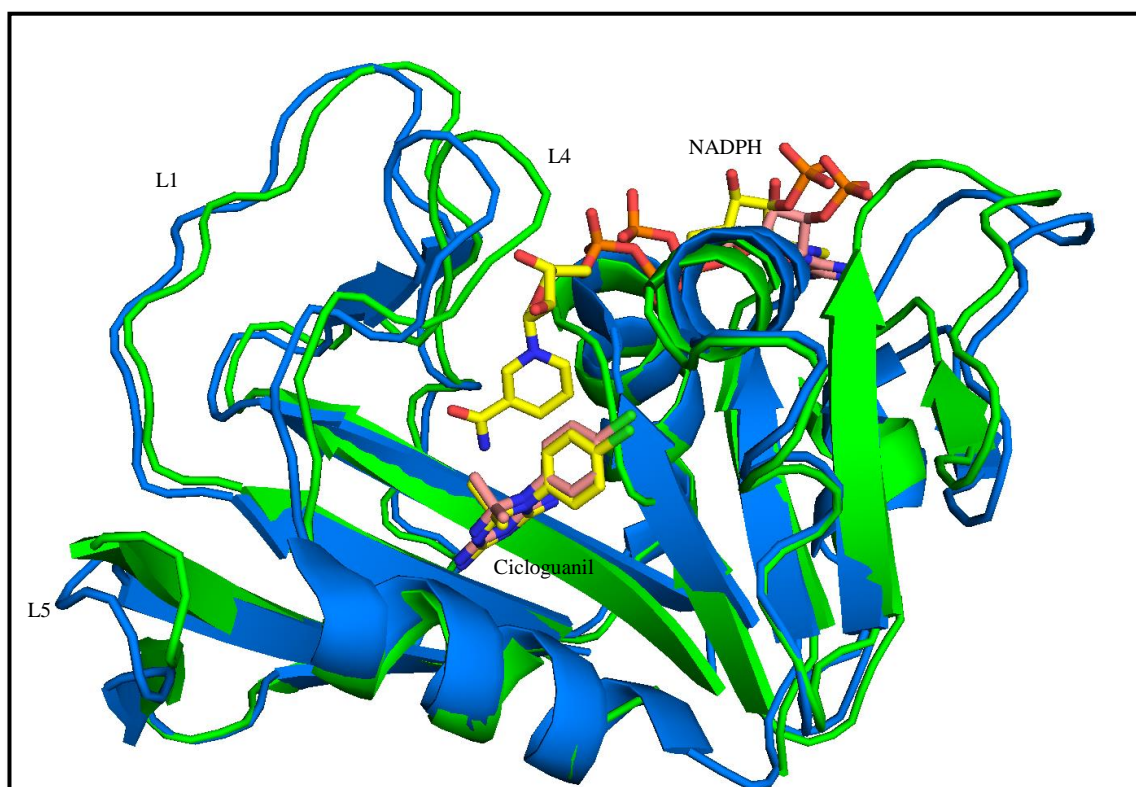


Figura 41 - Sobreposição da estrutura aberta obtida por Dias et al., 2014 em complexo com NADPH e (Azul) com a estrutura fechada em complexo com cicloguanil obtida no presente trabalho (Verde). Pode-se observar que a estrutura obtida pelo presente trabalho está fechada, especialmente e as alças 1, 4 e 5, que obtida por Dias et al., 2014. As estruturas do NADPH e Cicloguanil de Dias et al., 2014 estão com os carbonos coloridos em rosa, já os ligantes de nossa estrutura com os carbonos coloridos em amarelo.

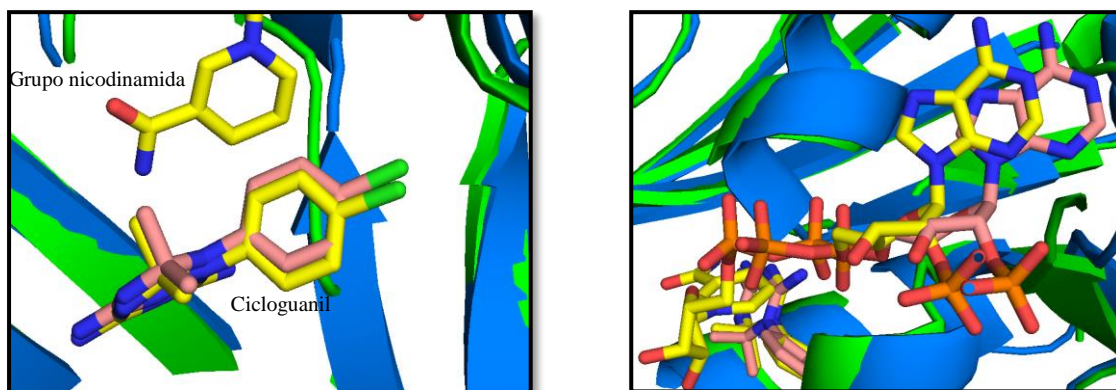


Figura 42 - (A) verifica-se a diferença na rotação do cicloguanil entre a estrutura fechada (verde) e aberta (azul) obtida por Dias et al., 2014. (B) Uma grande diferença também ocorreu entre os NADPHs de ambas as estruturas devido a falta do grupo nicotinamida na molécula em azul. As estruturas de NADPH e cicloguanil de Dias et al., 2014 estão com os carbonos coloridas em rosa, já os ligantes de nossa estrutura com os carbonos coloridos em amarelo.

Como descrito anteriormente, na conformação aberta, Dias et al., afirmam que Tyr100 pode realizar uma fraca ligação com compostos no sítio ativo interferindo estericamente com o grupo nicotinamida do NADPH e impedindo que este último fique em na posição catalítica. Contudo, na conformação fechada, observa-se que Tyr100 teve um leve afastamento do cicloguanil (Figura 44-E). Como este resíduo afastou, não há impedimento estérico, o que possibilita o engatamento do grupo nicotinamida na posição correta. Além disso foi observado a aproximação de outros resíduos como Ser49, Thr 46 e Leu50 (Figura 44). Em adição a isso, Glu28 teve sua conformação alterada na conformação fechada, o que também contribuiu para a rotação do cicloguanil

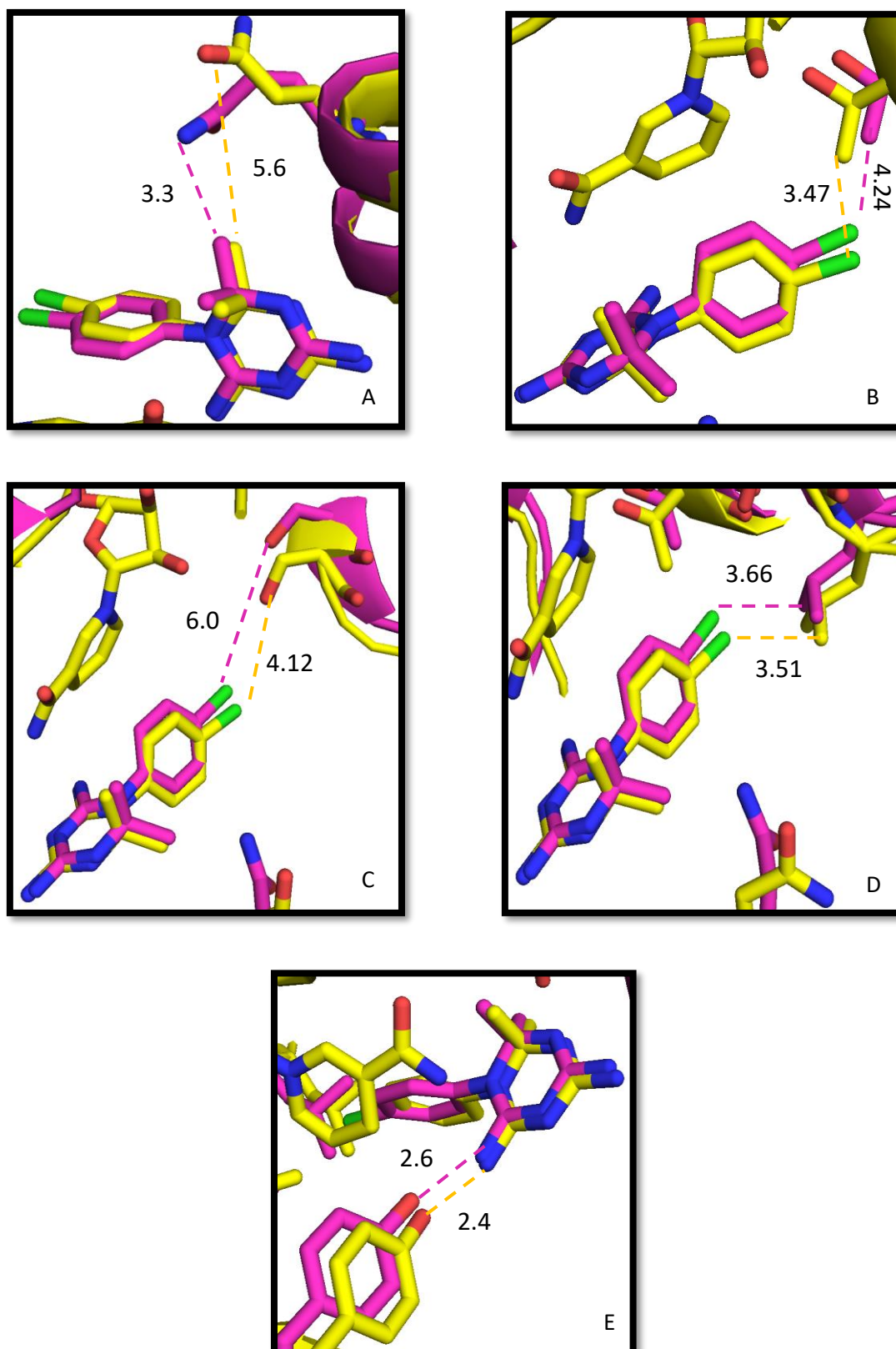


Figura 43 – Distâncias, em angstroms, calculadas pelo programa Pymol entre os aminoácidos Glutamina 28 (A), Treonina 46 (B), Serina 49 (C), Leucina 50 (D) e Tirosina 100 (E) com o ciclohexanone. As estruturas dos ligantes de Dias et al., 2014 estão com os carbonos coloridos em rosa, já os ligantes de nossa estrutura com os carbonos coloridos em amarelo.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

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

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

Com a obtenção da estrutura fechada de MtDHFR:NADPH:Cicloguanil foi possível complementar os resultados obtidos por DIAS et al., 2014. A análise da estrutura

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

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

REFERENCIAS*

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

DIAS, M.V. et al. Mycobacterium tuberculosis dihydrofolate reductase reveals two conformational states and a possible low affinity mechanism to antifolate drugs. **Structure**. 2013

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- LI, R. et al. Three-dimensional structure of *M. tuberculosis* dihydrofolate reductase reveals opportunities for the design of novel tuberculosis drugs. **Journal of Molecular Biology**. 2000
- MADIGAN, M; MARTINKO, J. Brock Biology of Microorganisms. 12 ed. Artmed. 2010
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doenças Infecciosas e Parasitárias – 8º Edição do Guia de Bolso. 2010
- NAKATA, N.; KAI, M.; MAKINO, M. Mutation analysis of the *Mycobacterium leprae* *folP1* gene and dapson resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, p. 762-766, 2011.
- NIESEN, H; BERGLUND, Helena; VEDADI, M. The use of Differential Scanning Fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. **Structural Genomics Consortium**, 2007
- NOPPONPUNTH, VANIDA, et al. "Cloning and expression of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae* dihydropteroate synthase in *Escherichia coli*." **Journal of bacteriology** 181.21 (1999): 6814-6821.
- PECORA, R. Dynamic light scattering. **Plenum Press**. v. 1, p. 394, 1985.
- PRIVÉ, GILBERT. Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins. ScienceDirect. 2007
- RAMBUKKANA, A. et al., Contact-dependent demyelination by *Mycobacterium leprae* in the absence of immune cells. **Science**, v. 296, p. 927-931, 2002.
- RENGARAJAN, J; SASSETTI, C, et al. The Folate Pathway is a Target for Resistance to the Drug Para-Aminosalicylic Acid (PAS) in Mycobacteria. **Molecular Microbiology**. v.53. 2004
- ROBERT, X., GOUET, P. (2014) "Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server". *Nucl. Acids Res.* **42**(W1), W320-W324. doi: 10.1093/nar/gku316
- ROSSI, M; AMARETTI, A; RAIMONDI, S. Folate Production by Probiotic Bacteria. **Nutrients** 118-134. 2011
- SEYDEL, J.; BUTTE, W. p-Aminobenzoic Acid Derivatives. Mode of Action and Structure-Activity Relationships in a Cell-Free System (*Escherichia coli*). **Journal of Medical Chemistry**. 1977
- TROUILLER, P. et al., Drugs for neglected diseases: a failure of the market and a public health failure? **Trop Med Int Health**, v. 6, p.945-951, 2001.
- VALDERAS, M.W. et al. Genetic Basis for Sulfonamide Resistance in *Bacillus anthracis*. **Microbial Drug Resistance**, v.13, 2008

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

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

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

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

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

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

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

