

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

DIEGO DE SOUZA LIMA

**INVESTIGAÇÃO *IN SILICO* DA LIGAÇÃO DA PIPERINA NA RNA-
POLIMERASE DE *Mycobacterium leprae* E POSSÍVEL SINERGISMO COM
RIFAMPICINA: MODELAGEM, *DOCKING* E DINÂMICA MOLECULAR.**

Maringá

2020

DIEGO DE SOUZA LIMA

INVESTIGAÇÃO *IN SILICO* DA LIGAÇÃO DA PIPERINA NA RNA-POLIMERASE DE *Mycobacterium leprae* E POSSÍVEL SINERGISMO COM RIFAMPICINA: MODELAGEM, *DOCKING* E DINÂMICA MOLECULAR.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Área de concentração - Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Augusto Vicente Seixas

Maringá

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

L732i Lima, Diego de Souza
Investigação in silico da ligação da piperina na RNA-polimerase de *Mycobacterium leprae*: modelagem, *docking* e dinâmica molecular / Diego de Souza Lima. -- Umuarama, 2020.
41 f.: il. color., figs.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Augusto Vicente Seixas.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Tecnologia, Departamento de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular), 2020.

1. Hanseníase (*Mycobacterium leprae*). 2. Dinâmica molecular. 3. Modelagem molecular. 4. Piperina - Pimenta-preta (*Piper nigrum*). 5. Fármacos - Desenvolvimento. I. Seixas, Flávio Augusto Vicente, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Tecnologia. Departamento de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular). III. Título.

CDD 21.ed.572.8

Elaine Cristina Soares Lira - CRB-9/1202

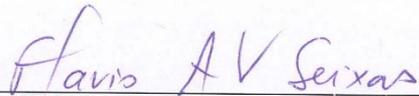
DIEGO DE SOUZA LIMA

INVESTIGAÇÃO *IN SILICO* DA LIGAÇÃO DA PIPERINA NA RNA-POLIMERASE DE *Mycobacterium leprae* E POSSÍVEL SINERGISMO COM RIFAMPICINA: MODELAGEM, DOCKING E DINÂMICA MOLECULAR.

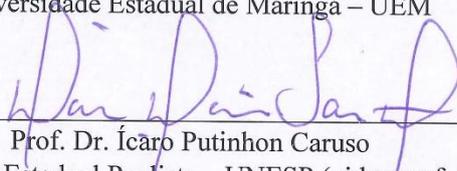
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Aprovado em: 27 de fevereiro de 2020.

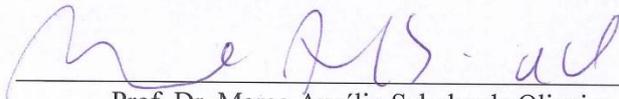
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Flávio Augusto Vicente Seixas (Presidente)
Universidade Estadual de Maringá – UEM



Prof. Dr. Ícaro Putinhon Caruso
Universidade Estadual Paulista – UNESP (videoconferência)



Prof. Dr. Marco Aurélio Schuler de Oliveira
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Sumário

BIOGRAFIA	6
AGRADECIMENTOS	7
APRESENTAÇÃO.....	8
RESUMO GERAL	9
GENERAL ABSTRACT.....	10
Resumo	13
Introdução.....	14
Metodologia.....	16
Modelagem da RNAP de <i>Mycobacterium leprae</i>	16
Docking molecular.....	16
Simulações de Dinâmica Molecular	17
Análise de Componentes Principais	18
Dinâmica Molecular Dirigida (Steered Molecular Dynamics).....	19
Resultados e Discussão.....	20
Modelagem da RNAP de <i>Mycobacterium leprae</i>	20
Docking molecular da PPN no sítio de ligação do 88G.....	21
Simulações de Dinâmica Molecular.	22
Análise de componentes principais (PCA)	25
Dinâmica Molecular Dirigida (Steered Molecular Dynamics).....	27
Possível sinergismo entre PPN e RFP em <i>Mycobacterium leprae</i>	29
Conclusão	32
Referências	33
Material suplementar.	35
Artigo publicado no período.....	43

BIOGRAFIA

Diego de Souza Lima nasceu em Curitiba, estado do Paraná, em 14 de março de 1992. Iniciou a graduação no ano de 2013, no curso de bacharelado em Bioquímica pela Universidade Estadual de Maringá (UEM). Neste período, atuou em projetos de iniciação tecnológica no Grupo de Materiais Poliméricos e Compósitos (GMPC), orientado pelo Prof. Marcos Hiroiui Kunita, do departamento de Química. Graduou-se em 2017 e, no ano seguinte, ingressou no mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) da UEM. Realizou sua pesquisa sob orientação do Prof. Dr. Flávio Augusto Vicente Seixas no laboratório de Bioquímica Estrutural, na cidade de Umuarama, onde localiza-se o *campus* de Tecnologia da universidade. Seu trabalho, intitulado “Investigação *in silico* da ligação da piperina na RNA-polimerase de *Mycobacterium leprae* e possível sinergismo com rifampicina”, resultou na descoberta da piperina como possível adjuvante no tratamento de infecções causadas por micobactérias, em conjunto com rifampicina, o que representa uma contribuição significativa para o combate a doenças infecciosas causadas por micobactérias.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais por tudo que fizeram para que hoje eu pudesse estar aqui. Pelo apoio incondicional e por todos os ensinamentos. Agradeço ao meus familiares e amigos que sempre estiveram presentes e por todos os momentos compartilhados. Agradeço ao Prof. Flávio Seixas por todas as oportunidades e ensinamentos, e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas.

Agradecemos ao auxílio financeiro fornecido por CNPq, CAPES (código 001) e Fundação Araucária (convênios 40/2016 e 53/2019). Ao COMCAP/UEM pelo uso dos equipamentos e LNCC pelos recursos computacionais.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é composta de um artigo científico, que em consonância com as regras do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá (UEM), foi redigido de acordo com as normas da revista de interesse.

O artigo intitulado “Investigação *in silico* da ligação da piperina na RNA-polimerase de *Mycobacterium leprae* e possível sinergismo com rifampicina: Modelagem, *Docking* e Dinâmica Molecular” que será submetido à revista **Journal of Molecular Modeling** e inicia com uma introdução sobre a doença causada pelo *Mycobacterium leprae* e segue com a caracterização da enzima alvo do trabalho, a RNA-polimerase bacteriana, juntamente com a justificativa de sua utilização em todos os processos computacionais realizados.

RESUMO GERAL

A hanseníase é uma doença crônica causada pelo microrganismo *Mycobacterium leprae* e, apesar de ser uma doença curável pelo uso de terapia multidroga (dapsona, rifampicina e clofazimina), permanece como um problema de saúde pública em países em desenvolvimento. Além disso, o surgimento de linhagens resistentes aos antibióticos tem dificultado ainda mais o combate a este microrganismo. Assim, novas estratégias de tratamento precisam ser desenvolvidas. Uma estratégia promissora baseia-se no sinergismo entre antibióticos, onde a coadministração de duas ou mais substâncias causa um efeito de maior potência do que quando administradas isoladamente. Recentemente, o grupo de pesquisa da Dra. Rosilene Fressatti Carduso do DAB/UEM descobriu que a piperina, composto bioativo encontrado na pimenta-preta (*Piper nigrum*), possui sinergismo com rifampicina em *Mycobacterium tuberculosis*. Estudos *in silico* sugeriram que a piperina possa se ligar na estrutura da RNA-polimerase bacteriana, em um local próximo ao sítio-ativo. Como os genes da RNA-polimerase são altamente conservados em micobactérias, este trabalho teve como objetivo investigar por meio de ferramentas de bioinformática, se este mesmo efeito seria observado em *Mycobacterium leprae*. A estrutura da RNA-polimerase de *Mycobacterium leprae* foi modelada a partir da RNA-polimerase de *Mycobacterium tuberculosis* (PDB: 5uhg). A partir da estrutura modelada, foram realizadas simulações de *docking* molecular, de modo a verificar o modo de ligação da piperina no sítio de ligação, assim como simulações de dinâmica molecular, com o objetivo de avaliar o comportamento e estabilidade da estrutura modelada. Os efeitos da ligação da piperina nos elementos dinâmicos do sítio ativo da RNA-polimerase foram analisados por meio de Análise de componentes principais (PCA) e Dinâmica molecular dirigida (SMD). A partir dos resultados obtidos, foi possível sugerir que a ligação da piperina pode afetar o mecanismo de catálise da RNA-polimerase, aumentando o efeito inibitório da rifampicina.

GENERAL ABSTRACT

Leprosy is a chronic disease caused by the microorganism *Mycobacterium leprae* and, despite being curable by multidrug therapy (dapson, rifampicin and clofazimine), it remains a public health problem in developing countries. In addition, the emergence of antibiotic-resistant bacteria makes the combat of this microorganism an emergency issue. Thus, new treatment strategies need to be created. A promising strategy is based on synergism between antibiotics, where the administration of two or more substances has a greater potency effect than when administered alone. Recently, the research group of Dr. Rosilene Fressatti Cardoso DAB/EM discovered that piperine, a bioactive compound found in black pepper (*Piper nigrum*), has synergism with rifampicin in *Mycobacterium tuberculosis*. The *in silico* evaluations suggest that piperine binds to the structure of bacterial RNA polymerase, at a location close to active site. Since the genes of RNA polymerase are highly conserved in mycobacteria, this work aimed to investigate if the same effect could be observed in *Mycobacterium leprae*. The structure of RNA polymerase from *Mycobacterium leprae* was modeled using RNA polymerase from *Mycobacterium tuberculosis* (PDB: 5uhg) as template. Molecular docking simulations were carried out using the modeled structure to verifying if piperine binds at the same site, as well as molecular dynamics simulations in order to assess the behavior and stability of the modeled structure. The effects of piperine binding on the dynamic elements of the active site of RNA polymerase were analyzed using Principal Component Analysis (PCA) and Steered Molecular Dynamics (SMD). The results suggest that the binding of piperine may affect the mechanism of catalysis of RNA polymerase, increasing the inhibitory effect of rifampicin.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BH	<i>Bridge-helix</i>
DM	Dinâmica molecular
EPI	Inibidor de bomba-de-efluxo (<i>efflux pump inhibitor</i>)
LNCC	Laboratório Nacional de Computação Científica
MVD	Molegro <i>Virtual Docker</i>
NAC	Ciclo de adição de nucleotídeos (<i>Nucleotide addition cycle</i>)
PC	Componente principal (<i>Principal component</i>)
PCA	Análise de componentes principais (<i>Principal component analysis</i>)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PPN	Piperina
RFP	Rifampicina
Rgyr	Raio de giro (<i>Radius of gyration</i>)
RMSD	Raiz quadrática média do desvio (<i>Root-mean-square deviation</i>)
RMSF	<i>Root-mean-square fluctuations</i>
RNAP	RNA-polimerase
SMD	Dinâmica molecular dirigida (<i>Steered molecular dynamics</i>)
TH	<i>Trigger-helix</i>
TL	<i>Trigger-loop</i>

Investigação *in silico* da ligação da piperina na RNA-polimerase de *Mycobacterium leprae* e possível sinergismo com rifampicina: Modelagem, *docking* e dinâmica molecular.

Diego de Souza Lima¹, Letícia Murase², João Vitor Perez de Souza², Rosilene Fressatti Cardoso², Flávio Augusto Vicente Seixas^{1*}.

1. Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Maringá – Campus Umuarama (UEM – CAU). Umuarama - PR, Brasil.

2. Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá - PR, Brasil.

*Autor para correspondência: favseixas@uem.br

Fone: (+55) 44 36219337 Fax: (+55) 44 36219326

Resumo: A hanseníase é uma doença crônica causada pelo microrganismo *Mycobacterium leprae* e, apesar de ser uma doença curável pelo uso de terapia multidroga (dapsona, rifampicina e clofazimina), permanece como um problema de saúde pública em países em desenvolvimento. Além disso, o surgimento de linhagens resistentes aos antibióticos tem dificultado ainda mais o combate a este microrganismo. Assim, novas estratégias de tratamento precisam ser desenvolvidas. Uma estratégia promissora baseia-se no sinergismo entre antibióticos, onde a coadministração de duas ou mais substâncias causa um efeito de maior potência do que quando administradas isoladamente. A literatura relata que a piperina, composto bioativo encontrado na pimenta-preta (*Piper nigrum*), possui sinergismo com rifampicina em *Mycobacterium tuberculosis*. Assim, foi sugerido que a piperina possa se ligar na estrutura da RNA-polimerase bacteriana, em um local próximo ao sítio-ativo. Como os genes da RNA-polimerase são altamente conservados em micobactérias, este trabalho teve como objetivo investigar por meio de ferramentas de bioinformática, se este mesmo efeito seria observado em *Mycobacterium leprae*. A estrutura da RNA-polimerase de *Mycobacterium leprae* foi modelada a partir da RNA-polimerase de *Mycobacterium tuberculosis* (PDB: 5uhg). A partir da estrutura modelada, foram realizadas simulações de *docking* molecular, de modo a verificar o modo de ligação da piperina ao sítio de ligação proposto. Também foram realizadas simulações de dinâmica molecular, com o objetivo de avaliar o comportamento e estabilidade da estrutura modelada. Os efeitos da ligação da piperina nos elementos dinâmicos do sítio ativo da RNA-polimerase foram analisados por meio de Análise de componentes principais (PCA) e Dinâmica molecular dirigida (SMD). A partir dos resultados obtidos, foi possível sugerir que a ligação da piperina pode afetar o mecanismo de catálise da RNA-polimerase, aumentando o efeito inibitório da rifampicina.

Palavras-chave: *Mycobacterium leprae*, piperina, dinâmica molecular.

Introdução

A hanseníase (também conhecida como lepra) é uma doença crônica causada pelo microrganismo *Mycobacterium leprae*, e pode afetar os nervos periféricos, a pele e outros órgãos, em casos mais severos (Mohanty *et al.*, 2018). Apesar de ser uma doença curável pelo uso de terapia multidroga (dapsona, rifampicina e clofazimina), a lepra permanece como um problema de saúde pública na América do Sul, África, sul e sudeste Asiático e Micronésia, sendo que mais de 200.000 casos de hanseníase são relatados todo ano (Benjak *et al.*, 2018). Além disso, o surgimento de linhagens resistentes aos antibióticos de primeira linha, como a rifampicina (RFP), tem dificultado ainda mais o combate a este microrganismo. Assim, novas estratégias de tratamento precisam ser desenvolvidas. Uma estratégia promissora baseia-se no sinergismo entre antibióticos, onde a coadministração de duas ou mais substâncias causa um efeito de maior potência comparado a sua administração de forma isolada (Kohanski, Dwyer e Collins, 2010). Recentemente, Hegeto e colaboradores relataram que a piperina (PPN) possui sinergismo com RFP em *Mycobacterium tuberculosis*, sendo descrito como um inibidor de bomba-de-efluxo (EPI) (Hegeto *et al.*, 2018). A PPN, composto bioativo encontrado na pimenta-preta (*Piper nigrum*), exibe diversos efeitos terapêuticos, como atividade anti-inflamatória, antioxidante, além de aumentar a eficácia de anti-microbianos (Hegeto *et al.*, 2019). Em 2001, Balakrishnan demonstrou que a PPN aumenta a inibição da RNA-polimerase (RNAP) pela RFP em *Mycobacterium smegmatis* (Balakrishnan, Varma e Chatterji, 2001). No entanto, o estudo sugeriu que a PPN se ligaria no mesmo sítio de ligação que a RFP.

Recentemente, Murase e colaboradores investigaram a possibilidade da ligação da PPN em um sítio localizado entre as subunidades β e β' da RNAP de *Mycobacterium tuberculosis*, por meio de simulações de *docking* molecular (Murase *et al.*, 2019). Este sítio de ligação foi descrito em *Mycobacterium tuberculosis* por Lin e colaboradores (Lin *et al.*, 2017), assim como sua estrutura tridimensional resolvida em complexo com a molécula D-AAP1 (88G). Apesar de não possuírem uma alta semelhança estrutural (índice de Tanimoto de 0.173), PPN e 88G possuem pesos moleculares próximos (285,34 e 358,17 g/mol, respectivamente), o que permite que encaixem nos mesmos sítios de ligação, além de apresentarem *scores* e modos de ligação semelhantes nas simulações de *docking*. Como os genes das subunidades da RNAP são altamente conservados, propomos a hipótese de que o mesmo sinergismo seja possível em outras micobactérias.

A RNAP bacteriana é composta de 5 subunidades conservadas nos três domínios da vida (*Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya*) (Murakami, 2015). A forma mais simples e bem caracterizada deste complexo enzimático consiste de duas cópias da subunidade α , uma subunidade β , β' e ω . Juntamente com o fator de transcrição σ , formam a holoenzima RNAP. O sítio ativo da RNAP é localizado na subunidade β' , sendo formado por elementos conservados que atuam em conjunto durante o ciclo de adição de nucleotídeos (NAC). Entre estes elementos, destacam-se o *trigger-loop* (TL), que na etapa de inserção do nucleotídeo enovela-se em *trigger-helix* (TH), e a *bridge-helix*, que sofre mudanças conformacionais durante a etapa de translocação (Brueckner, Ortiz e Cramer, 2009). O sítio de ligação do 88G é formado por resíduos que compõe uma porção da BH, e a atividade inibitória de ligantes neste sítio está relacionada com a restrição da dinâmica conformacional da BH causada pelas interações com estas moléculas (Lin *et al.*, 2017).

Devido ao seu papel fundamental na expressão gênica, a RNAP é um alvo importante no desenvolvimento de antibióticos, tendo sua estrutura tridimensional resolvida em organismos como *Mycobacterium tuberculosis* (Lin *et al.*, 2017), *Thermus thermophilus* (Vassylyev *et al.*, 2007) e *Escherichia coli* (Abdelkareem *et al.*, 2019). No entanto, a estrutura da RNAP de *Mycobacterium leprae* permanece pouco estudada, devido principalmente à dificuldade do estudo *in vitro* deste organismo, por este ser um patógeno intracelular obrigatório (Benjak *et al.*, 2018). Este fato, juntamente com as informações estruturais proporcionadas e baixo custo relativo, justificam a abordagem *in silico* empregada neste trabalho.

Assim, neste trabalho, para investigar uma possível ligação da PPN na RNAP de *Mycobacterium leprae*, a estrutura do complexo enzimático foi modelada, por mutações pontuais, a partir da estrutura da RNAP de *Mycobacterium tuberculosis*. Foram realizadas simulações de *docking* molecular, assim como simulações de dinâmica molecular (DM), para avaliar a estabilidade e as interações da PPN com a RNAP de *Mycobacterium leprae*. A partir das trajetórias obtidas pelas simulações de DM, foram realizadas análises de componentes principais (PCA) e simulações de dinâmica molecular dirigida (SMD), para analisar os efeitos da ligação da PPN na estrutura modelada da RNAP.

Metodologia

Modelagem da RNAP de Mycobacterium leprae

A modelagem da RNAP de *Mycobacterium leprae* foi realizada utilizando-se como referência a estrutura de RNAP de *Mycobacterium tuberculosis* em complexo com RFP, D-AAP1 (88G) e DNA (PDBid: 5uhg) (Lin *et al.*, 2017). As sequências dos genes de cada subunidade da RNAP de *Mycobacterium leprae* (cepa TN) foram obtidas pelo banco de dados Uniprot (Bateman *et al.*, 2017) (rpoA: Q9X798 – subunidade α ; rpoB: P30760 – subunidade β ; rpoC: P30761 – subunidade β' ; rpoZ: Q9CCQ6 – subunidade ω ; rpoT: Q7AQB1 – fator σ (SigA). Foi realizado um alinhamento entre os genes de *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium tuberculosis* (rpoA: P9WGZ1, rpoB: P9WGY9, rpoC: P9WGY7, rpoZ: P9WGY5, sigA: P9WGI1), utilizando o ClustalOmega (Sievers e Higgins, 2014) (Figuras S1, S2, S3, S4 e S5, material suplementar). Na estrutura do fator σ de *Mycobacterium tuberculosis* (5uhg), estavam presentes apenas os aminoácidos de número 205 a 528, portanto, apenas esta porção da sequência do gene rpoT foi considerada no alinhamento. Todas as subunidades apresentaram identidade superior a 90%, assim, os resíduos de aminoácidos foram substituídos por mutações pontuais no programa Coot (Emsley e Cowtan, 2004). Nenhuma das mutações afetaram o sítio de ligação do ligante cristalográfico 88G. Na subunidade β' , a estrutura do segmento *trigger-loop* (resíduos 1011 – 1026) estava ausente. Portanto, este *loop* foi modelado por homologia nas conformações aberta (*trigger-loop*) e fechada (*trigger-helix*), usando o programa Modeller (Webb e Sali, 2017). Para modelá-lo na conformação aberta, utilizou-se a sequência do gene rpoC de *Mycobacterium leprae*. Já para modelar a conformação fechada, juntamente com ATP, foi utilizado como referência a estrutura de RNAP de *Thermus thermophilus* (PDBid: 2o5j) (Vassylyev *et al.*, 2007) (Figura S6, material suplementar). Foi corrigido a cadeia lateral do resíduo de Asp429 que também estava ausente na estrutura do fator σ .

Docking molecular

De forma a avaliar o modo e o *score* de ligação da PPN ao sítio alvo da estrutura modelada, foram realizados estudos de *docking* molecular, utilizando os programas Autodock (Forli *et al.*, 2012), implementado na interface gráfica PyRx 0.9 (Dallakyan e Olson, 2015) e Molegro Virtual Docker (MVD) (Thomsen e Christensen, 2006). Os protocolos de *docking* foram validados pelo *redocking* do ligante 88G na estrutura

modelada da RNAP de *Mycobacterium leprae*, em ambos os programas, em quatro repetições (Tabela S1, material suplementar). No Autodock, utilizou-se o algoritmo genético lamarckiano (*Lamarckian GA*) como algoritmo de busca, e Autodock Score como algoritmo de ranqueamento. A caixa de busca foi centralizada no ligante 88G, com dimensões de *grid* de 50 nos eixos *x*, *y* e *z* (espaçamento de 0,375 Å). O número de corridas (*GA runs*) foi aumentado para 50 e o número máximo de avaliações de energia para 2.500.000 (*medium*). Já no MVD, foi utilizado o algoritmo Iterated Simplex como algoritmo de busca, e PLANTS Score [Grid] como algoritmo de ranqueamento, raio de busca de 15 Å e os outros parâmetros foram mantidos como padrão (*default*). O protocolo foi considerado válido quando as poses de maior afinidade apresentaram RMSD menor que 1 Å em relação a pose da estrutura cristalográfica, nas quatro repetições (Tabela S1, material suplementar). Os protocolos validados foram então aplicados no *docking* da PPN.

Simulações de Dinâmica Molecular

A dinâmica molecular (DM) consiste em resolver numericamente as equações de movimento de Newton em função do tempo. A partir de uma estrutura inicial, calcula-se as forças atuantes nos átomos que compõe o sistema e, assim, determina-se a sua trajetória. Pela análise das trajetórias obtidas, é possível verificar a estabilidade das conformações geradas, bem como observar as interações que a estabilizam. Neste trabalho, as simulações de DM foram realizadas utilizando o pacote de programas NAMD/VMD (Phillips *et al.*, 2005) e campo de forças CHARMM (Brooks *et al.*, 2009), em condições de pressão e temperatura constantes (1 atm, 300 K) e tempo de integração de 2 fs por passo de tempo. Os arquivos de campo de força dos ligantes (88G, RFP e PPN) foram gerados pelo servidor SwissParam (Zoete *et al.*, 2011), e as cargas parciais de Mulliken calculadas pelo programa Orca 4.1 (Neese, 2012), utilizando o método B3LYP/6-311G e modelo de solvatação SCP. As estruturas foram virtualmente imersas em uma caixa em condições de contorno periódicas com água TIP3, com margens a, pelo menos, 10 Å de distância da superfície mais externa da proteína. As cargas dos sistemas foram neutralizadas pela adição de contraíons Na ou Cl. Em seguida, os sistemas foram minimizados nas seguintes etapas: i) 20 mil passos de minimização por gradiente conjugado, com as moléculas de DNA, sais e ligantes fixos no espaço; ii) 20 mil passos de minimização por gradiente conjugado, com todos os átomos livres; iii) 60 ps de

equilíbrio, com apenas moléculas do solvente livres e iv) 50 mil passos de minimização, com todos os átomos livres. Após estas etapas, foram realizadas simulações de DM de 50 ns (25 milhões de passos de equilíbrio), no supercomputador SDumont (LNCC – RJ). As trajetórias foram analisadas em termos de RMSD (*root-mean-square deviation*) e Raio de Giro (R_{gyr}), de modo a verificar a estabilidade da estrutura em relação à conformação inicial. Além disso, foram avaliadas as flutuações dos $C\alpha$ de cada resíduo durante as simulações (RMSF, *root-mean-square fluctuation*), assim como a frequência de contato dos resíduos do sítio de ligação com os ligantes.

Análise de Componentes Principais

A Análise de Componentes Principais (PCA) é um método estatístico multivariado de redução de dimensionalidade, que utiliza transformações lineares para obter um número menor de variáveis, a partir de uma matriz de covariância (Wang *et al.*, 2019). Quando aplicadas em trajetórias de proteínas obtidas por simulações de DM, este processo é denominado Dinâmica Essencial, pois os movimentos “essenciais” da proteína são extraídos do conjunto de conformações (David e Jacobs, 2014). Neste caso, a matriz de covariância é construída a partir das coordenadas Cartesianas que descrevem a trajetória do sistema. Para realizar a PCA, as conformações da trajetória foram sobrepostas de modo a eliminar os movimentos rotacionais e translacionais. Realizou-se a decomposição de autovalores da matriz de covariância para obter o conjunto de modos coletivos ortogonais, os autovetores (*eigenvectors*), e seus respectivos autovalores (*eigenvalues*), que caracterizam uma porção do movimento, onde autovalores maiores descrevem movimentos de maior escala espacial. Quando os dados originais são projetados em um autovetor, o resultado é chamado de componente principal (PC), sendo os componentes principais ordenados de forma decrescente de autovalores. Este método foi utilizado para analisar as dinâmicas essenciais do elemento estrutural *bridge-helix*, na ausência e presença da PPN e 88G, na estrutura da RNAP de *Mycobacterium leprae*, com a TH nas conformações aberta e fechada. Foram considerados nos cálculos apenas as coordenadas dos átomos de $C\alpha$ da *bridge-helix* (resíduos 844 – 880 da subunidade β'), a partir de 5 ns de simulação de DM (últimos 45 ns, que correspondem a região de equilíbrio termodinâmico). As análises foram realizadas utilizando o pacote de programas Bio3D (Grant *et al.*, 2006).

Dinâmica Molecular Dirigida (Steered Molecular Dynamics)

A dinâmica molecular dirigida (SMD) consiste em aplicar uma força externa em um ou mais átomos durante uma simulação de dinâmica molecular, de modo a forçar o sistema a se afastar de sua condição de equilíbrio inicial, e assim, acelerar transições entre diferentes mínimos de energia (Patel *et al.*, 2014). Foram realizadas simulações de SMD para analisar a influência da ligação da piperina no desenovelamento do elemento *trigger-helix*, de sua conformação fechada, para sua conformação aberta (*trigger-loop*). Para isso, foi utilizado o método de tração em velocidade constante (*constant velocity pulling*). Neste tipo de simulação, o átomo a ser tracionado, denominado átomo SMD, é ligado a um átomo modelo (*dummy atom*) por uma mola virtual. O átomo *dummy* é então movido à uma velocidade constante e calcula-se a força exercida entre os dois. As estruturas iniciais utilizadas nas simulações de SMD foram obtidas a partir das conformações em equilíbrio geradas por DM.

Para isso, foram gerados os gráficos de calor (*heatmap*) com os valores de RMSD *all-to-all* das trajetórias dos C α da subunidade β' dos complexos RNAP-APO e RNAP-PPN (Figuras S7) e, a partir destes, verificou-se a ocorrência de conjuntos de conformações semelhantes (*clusters*) nas regiões de equilíbrio (porção mais clara do gráfico). Dessa forma, foram escolhidas as conformações entre os *frames* 2200 e 2400 das trajetórias para gerar uma estrutura média, representativa desta região, que foi utilizada nas simulações de SMD. O C α do resíduo Gly1021 foi escolhido como átomo SMD, por estar entre as duas hélices da *trigger-helix*, e ser o resíduo mais distante na conformação aberta. Os átomos de C α dos resíduos Pro1006 e Pro1029, localizados na base das hélices, foram considerados fixos. Pela sobreposição das estruturas médias com a *trigger-helix* na conformação aberta e fechada, o vetor de tração (*pulling vector*) foi calculado de modo a apontar na direção do C α do resíduo Gly1021 da conformação fechada, até o C α do mesmo resíduo na conformação aberta. As simulações foram realizadas na presença e ausência de PPN, em triplicata, nas mesmas condições das simulações de DM descritas anteriormente. O átomo SMD foi tracionado com velocidade constante de 0,002 Å/ps e constante de elasticidade de 7 kcal/mol/Å, durante 10 ns.

Resultados e Discussão

Modelagem da RNAP de Mycobacterium leprae

A fim de realizar estudos *in silico*, a estrutura da RNAP de *Mycobacterium leprae* foi modelada (Figura 1) a partir da estrutura da RNAP de *Mycobacterium tuberculosis*, a qual foi recentemente resolvida em complexo com RFP e D-AAP1 (88G). Como os genes da RNAP bacteriana possuem alto grau de similaridade (*rpoB* e *rpoC* apresentam identidade maior que 95% entre *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae*), a modelagem foi realizada por mutações pontuais na estrutura. Pelo gráfico de Ramachandran, verificou-se que 97% dos resíduos no modelo obtido encontram-se em posições permitidas (Figura S8, material suplementar). Na estrutura de referência utilizada (PDB id: 5uhg), o elemento *trigger-loop* (TL) estava ausente. O TL, juntamente com a *bridge-helix* (BH) e *F-loop* (Figura 2), são elementos estruturais altamente conservados localizados no sítio-ativo da RNAP, e a catálise é dirigida por mudanças conformacionais coordenadas entre estes elementos (Brueckner, Ortiz e Cramer, 2009). Durante o ciclo de adição de nucleotídeos (NAC), a ligação do nucleotídeo a ser adicionado é acompanhada por uma transição do TL para uma conformação fechada, formada por duas α -hélices chamadas de *trigger-helix* (TH), facilitando a inserção do nucleotídeo e a formação da ligação fosfodiéster (Miropolskaya *et al.*, 2014), conforme Figura 2. Portanto, neste trabalho, foram construídos modelos com este elemento nas conformações fechada e aberta (Figuras 2a e 2b, respectivamente).

A partir das conformações aberta e fechada da estrutura cristalográfica da RNAP de *Mycobacterium tuberculosis* em complexo com rifampicina (RFP) e 88G, foram geradas as estruturas modeladas nas mesmas conformações da RNAP de *Mycobacterium leprae* em complexo com RFP e 88G. A partir destas estruturas foram gerados os complexos apenas com rifampicina (RNAP-RFP), com rifampicina e 88G (RNAP-RFP-88G) e da RNAP sem ligantes (RNAP-APO). Os complexos com piperina (RNAP-PPN e RNAP-RFP-PPN) foram obtidos por *docking* molecular da PPN.

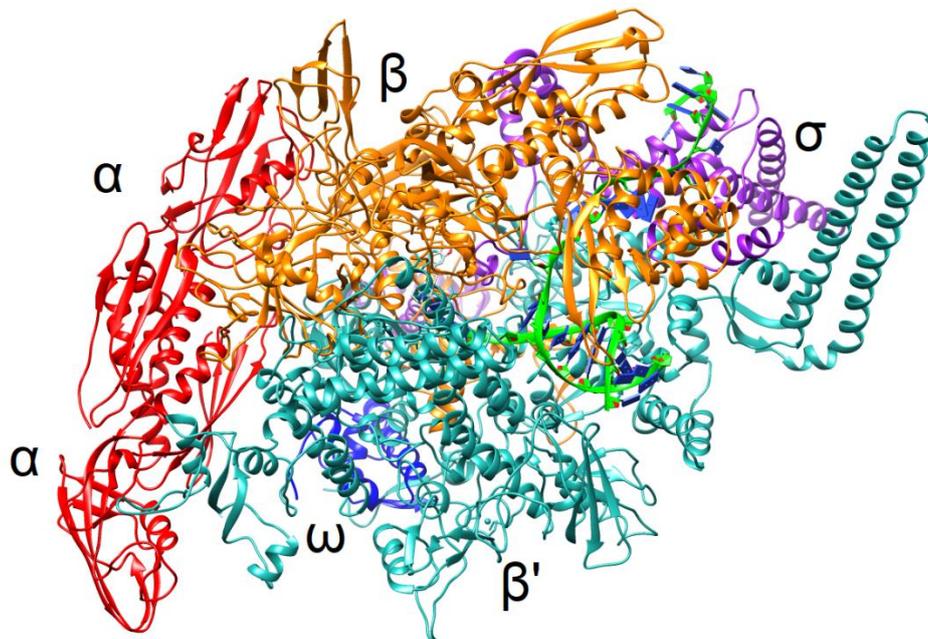


Fig. 1. Estrutura tridimensional da RNAP de *Mycobacterium leprae*, modelada a partir da RNAP de *Mycobacterium tuberculosis* (5uhg). Em vermelho: subunidade α , laranja: subunidade β , azul claro: subunidade β' , azul escuro: subunidade ω , roxo: fator σ (SigA), verde: DNA.

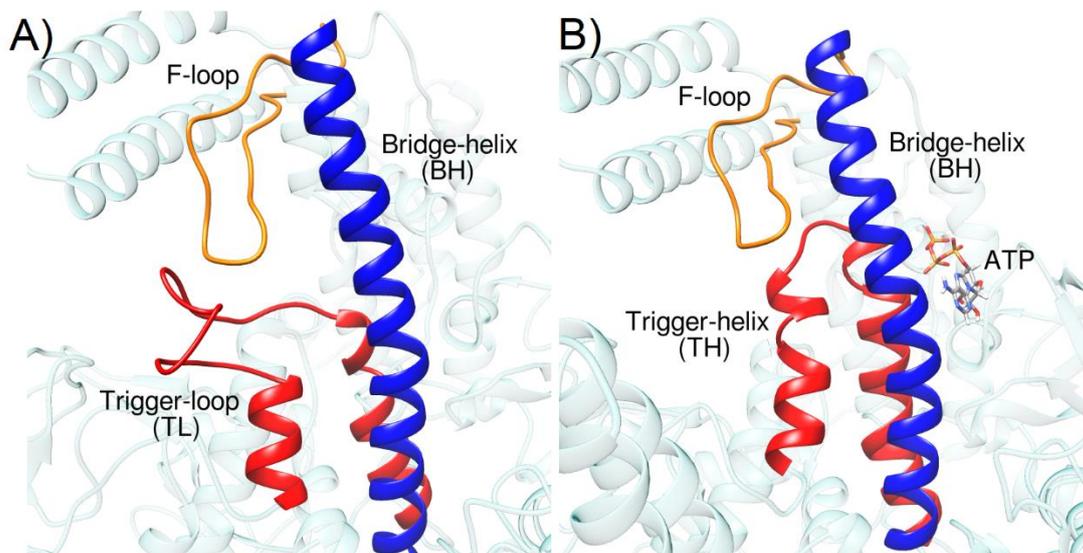


Fig. 2. Elementos dinâmicos do sítio ativo da RNAP modelada de *Mycobacterium leprae* (Laranja: F-loop, azul: Bridge-helix (BH), vermelho: Trigger-helix (TH)/Trigger-loop (TL). A) Sítio ativo na conformação aberta. B) Sítio ativo na conformação fechada.

Docking molecular da PPN no sítio de ligação do 88G.

De modo a verificar a ligação da PPN na RNAP de *Mycobacterium leprae*, foram realizados estudos de *docking* molecular por meio dos programas Autodock e MVD. Nestas simulações, a PPN e o 88G apresentaram *scores* de afinidade próximos (Tabela S2, material suplementar) e modos de ligação semelhantes (Figura S9, material

suplementar). O sítio de ligação do 88G se localiza entre as subunidades β e β' , e os ligantes fazem contato direto com os elementos *F-loop* e *bridge-helix*. Os resíduos que compõem este sítio, juntamente com as poses do 88G e PPN podem ser visualizados nas Figura 3a e 3b, respectivamente.

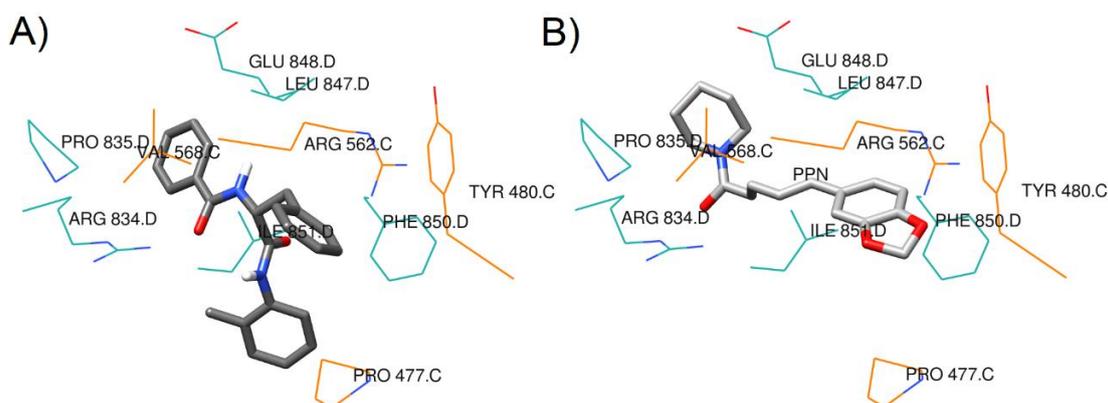


Fig. 3. Modos de ligação dos ligantes obtidos por docking. A) 88G e B) PPN. Em laranja os resíduos da subunidade β e em azul os da subunidade β' .

Para analisar a estabilidade e as interações dos ligantes no sítio de ligação, foram realizadas simulações de dinâmica molecular.

Simulações de Dinâmica Molecular.

Todos os complexos de RNap com ligantes (estando o sítio ativo nas conformações aberta e fechada) foram simulados por dinâmica molecular. Pelos gráficos de RMSD, foi possível verificar que os sistemas alcançaram o equilíbrio nos últimos 10 ns (Figuras S10a e S10b, material suplementar), e os de R_{gyr} , mostram que a RNap permaneceu enovelada durante todas as simulações (Figura S10c e S10d, material suplementar). Os cálculos de RMSF, das subunidades β (cadeia C) e β' (cadeia D), demonstram que os complexos possuem perfis de flutuações de $C\alpha$ semelhantes, apresentando diferenças significativas apenas na região entre os resíduos 200 e 400 na cadeia C do complexo RNap-RFP (Figuras S10e e S10f, material suplementar), e nas regiões entre os resíduos 150 e 200 na cadeia D do complexo RNap-PPN, e 1000 e 1200 no complexo RNap-88G (Figuras S10g e S10h, material suplementar).

Pelos cálculos de frequência de contato durante os 50 ns de simulação, foi possível avaliar quais resíduos do sítio de ligação possuem maior afinidade pelos ligantes (Figura 4). Os resíduos Pro477, Arg562, Gly566, na subunidade β , e Leu847, Phe850 e Ile851 (subunidade β'), permaneceram em contato com ambos os ligantes (PPN e 88G) por mais de 70% do tempo em todas as simulações, indicando que servem como pontos de contato importantes para a estabilidade de moléculas pequenas que se ligam neste local. Nas simulações contendo 88G, além dos resíduos já citados, os resíduos Glu567, na subunidade β , Arg834, Pro835 e His854, na subunidade β' , apresentaram frequência de contato maior que 70%. Já nas simulações com PPN, o resíduo Tyr480, da subunidade β , permaneceu em contato com frequência maior que 70%. Portanto, o ligante 88G apresentou um total de 10 resíduos com frequência de contato maior que 70% em todas as simulações, enquanto que a PPN apresentou um total de 7 resíduos (Figura 5A e 5B, respectivamente), sugerindo uma maior estabilidade do ligante 88G em comparação com a PPN, contudo, o cálculo teórico da afinidade ($\Delta G_{\text{binding}}$) não foi realizado. Assim, a estrutura da PPN possui potencial para ser modificada de modo a gerar derivados com capacidade de interagir com resíduos adicionais no sítio de ligação, aumentando sua estabilidade e, possivelmente sua afinidade. Além disso, estes resultados proporcionam informações importantes no planejamento de futuros ensaios *in vivo* e *in vitro*, visto que mutações nos resíduos com maior frequência de contato poderiam diminuir a afinidade destas moléculas pelo sítio de ligação, validando nosso modelo computacional.

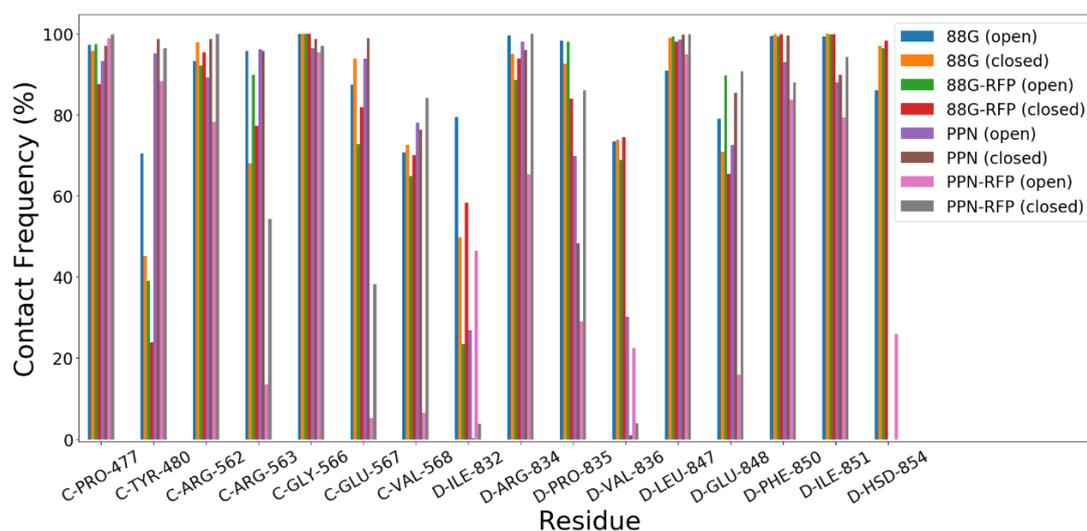


Fig. 4. Frequência de contato em comum entre os resíduos da RNAP e ligantes (PPN e 88G) em todas as simulações de DM (50 ns).

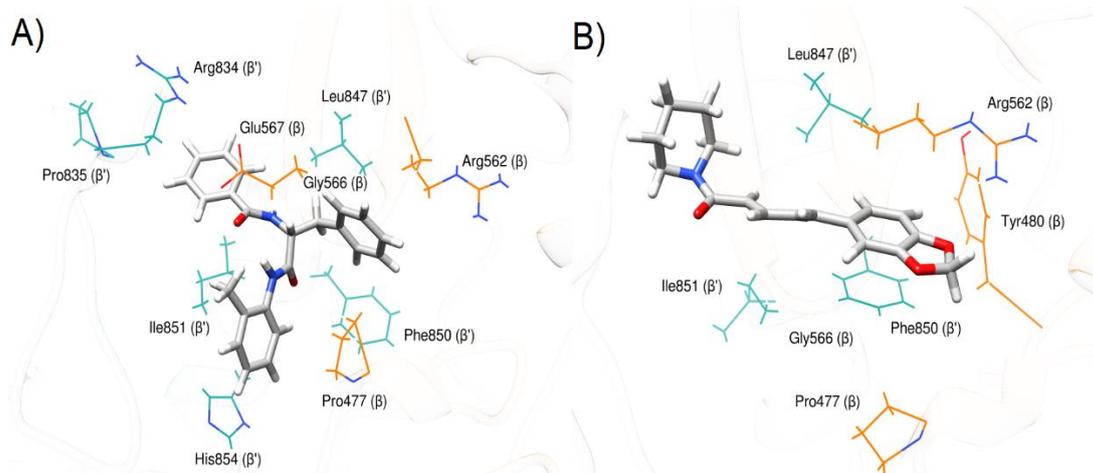


Fig. 5. Resíduos com frequência de contato maior que 70% em todas as simulações de DM (50 ns). A) 88G e resíduos Pro477, Arg562, Gly566 e Glu567 (subunidade β , em laranja), Arg834, Pro835, Leu847, Phe850, Ile851, His854 (subunidade β' , em azul), B) PPN e resíduos Pro477, Tyr480, Arg562 e Gly566 (subunidade β), Leu847, Phe850, Ile851 (subunidade β')

Para verificar a estabilidade da PPN em um intervalo de tempo maior, a simulação de DM do complexo RNAP-PPN foi estendida em 50 ns adicionais, totalizando uma trajetória de 100 ns. Nesta simulação, a PPN permaneceu estável, como pode ser visto na Figura S11 (material suplementar), onde as regiões mais claras do mapa de calor indicam menor variação no valor de RMSD do ligante.

Durante as análises das trajetórias obtidas, notamos que o elemento BH sofreu mudanças conformacionais nas simulações da RNAP-APO, enquanto permaneceu relativamente estável nos complexos com PPN e 88G (Figura 6). A BH consiste de uma longa α -hélice que se estende pela subunidade β' e forma uma das paredes do sítio ativo da RNAP. Este elemento estrutural passa por ciclos de mudanças conformacionais, pela formação de dobras, durante os ciclos de adição de nucleotídeos na transcrição (Hein e Landick, 2010). Acredita-se que moléculas que se ligam neste motivo, como os CBR (Malinen *et al.*, 2014), inibem a RNAP pela restrição das dinâmicas conformacionais da BH. A fim de verificar a influência da ligação de PPN e 88G na dinâmica da BH, foram realizadas análises de componentes principais (PCA) das trajetórias obtidas por DM.

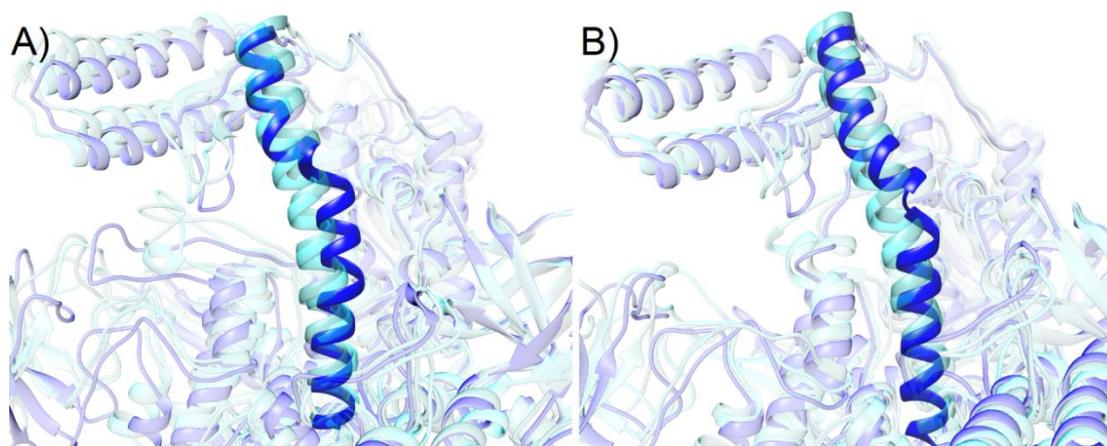


Fig. 6. Conformação assumida pela BH durante a simulação de DM. A) Sítio ativo na conformação aberta. B) Sítio ativo na conformação fechada. Azul escuro: simulação de DM da RNAP-APO. Azul claro: simulações de DM da RNAP-88G e RNAP-PPN.

Análise de componentes principais (PCA)

As trajetórias das simulações de DM dos complexos RNAP-PPN, RNAP-88G, assim como da RNAP-APO, com a TH nas conformações aberta e fechada, foram analisadas por PCA, com o objetivo de extrair os movimentos coletivos significativos (dinâmicas essenciais) da BH. Este método proporciona informações conformacionais importantes, a partir dos autovetores ortogonais que descrevem os eixos de maior variância da distribuição de conformações. A projeção da distribuição no subespaço definido pelos maiores componentes principais (PCs) resultam em uma representação de menor dimensionalidade do conjunto de dados estrutural, sendo a porcentagem de variância em cada dimensão, caracterizada pelo seu autovalor correspondente (Grant *et al.*, 2006). Pela análise de componentes principais das trajetórias da BH nas simulações de DM, verificou-se que os três primeiros PCs apresentaram variância cumulativa de 63%, 51% e 58% nas trajetórias das simulações APO, 88G e PPN, respectivamente, na conformação aberta. Já nas simulações com a TH na conformação fechada, os três primeiros PCs apresentaram variância cumulativa de 66%, 50% e 50% nas simulações APO, 88G e PPN, respectivamente (Figura 7).

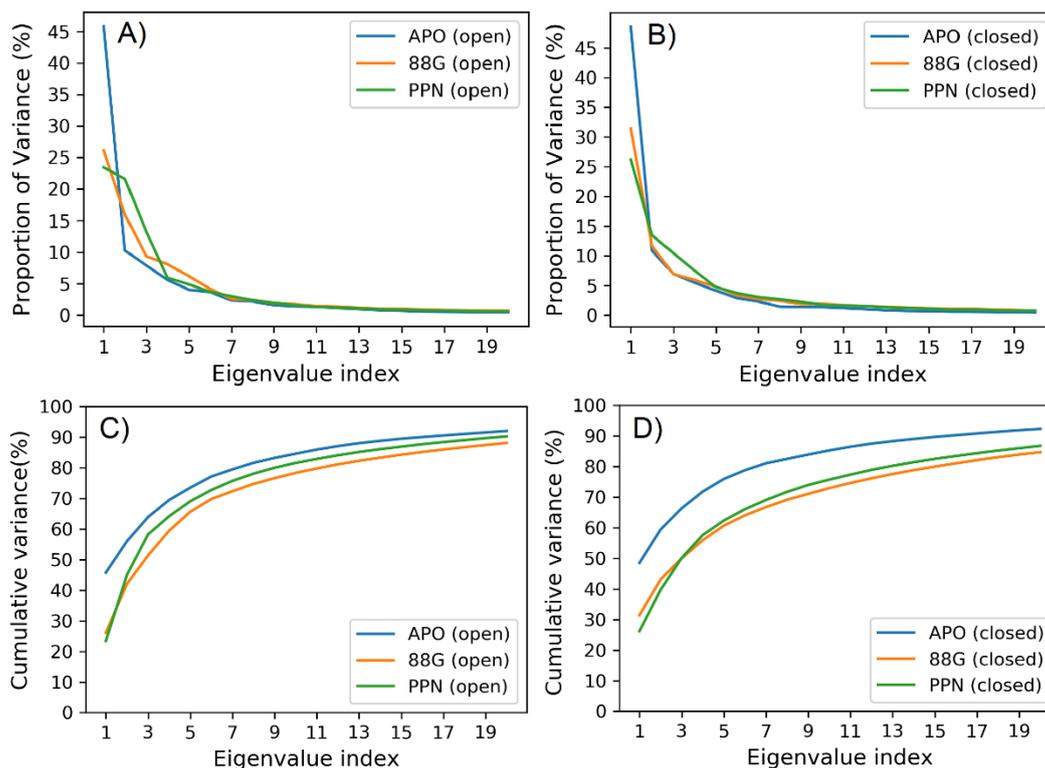


Fig. 7. Scree plot e variância cumulativa da PCA das trajetórias da BH obtidas por DM. Azul: RNAp-APO, laranja: RNAp-88G, verde: RNAp-PPN.

Os resultados da PCA para as trajetórias podem ser vistos na Figura 8. Pelos gráficos, nota-se que, nas simulações APO, as conformações obtiveram valores de *scores* maiores ao longo dos três primeiros PCs, resultando em pontos mais espalhados pelo gráfico em relação às simulações 88G e PPN. Estes resultados sugerem que a BH apresentou maior mobilidade estrutural, e foi capaz de explorar uma região mais abrangente do espaço conformacional na ausência de ligantes. O valor de traço da matriz de covariância (soma dos autovalores) foi de $11,4 \text{ \AA}^2$, 7 \AA^2 e $10,5 \text{ \AA}^2$, nas simulações APO, 88G e PPN, respectivamente, na conformação aberta, e de $12,3 \text{ \AA}^2$, $5,3 \text{ \AA}^2$ e $6,5 \text{ \AA}^2$ nas simulações APO, 88G e PPN na conformação fechada. Como os autovalores estão relacionados com a escala do movimento, estes valores indicam que os resíduos da BH apresentaram movimentos de maior escala espacial nas simulações sem ligantes (APO). Assim, sugere-se que nas simulações, a ligação da PPN e 88G foi capaz de restringir a dinâmica conformacional da BH.

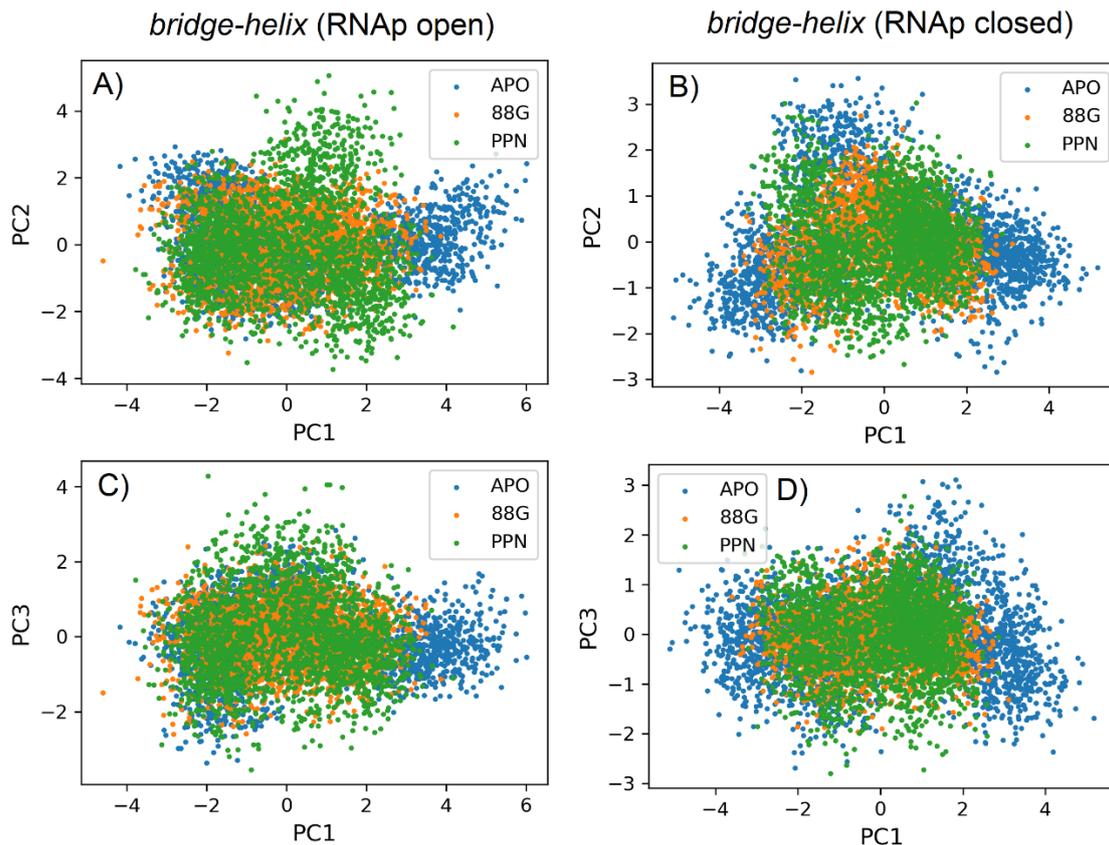


Fig. 8. Resultado das análises de componentes principais (PCA) das trajetórias da BH obtidas por DM. APO: azul, 88G: laranja, PPN: verde.

Dinâmica Molecular Dirigida (Steered Molecular Dynamics).

Além da BH, o sítio ativo da RNAP também é definido por outro elemento altamente dinâmico, denominado *Trigger-loop*. Este elemento sofre mudanças conformacionais durante o ciclo de adição de nucleotídeos, formando duas hélices (*Trigger-helix*) que estabilizam o nucleotídeo de entrada no sítio ativo, favorecendo o mecanismo de catálise. Como a PPN se liga diretamente no motivo estrutural *F-loop*, que está envolvido na modulação da dinâmica da *Trigger-helix* (Miropolskaya *et al.*, 2014), utilizamos o método de SMD para verificar o efeito da sua ligação no desenovelamento deste elemento. Para isso, o átomo de C α do resíduo de Gly1021 foi tracionado a uma velocidade constante de 0,002 Å/ps durante 10 ns (Figura 9).

Durante as simulações, o átomo SMD deslocou-se 20 Å durante 10 ns (Figura S12, material suplementar) e foi possível notar que, para que as hélices pudessem se desenovelar, o *F-loop* precisou ser deslocado de sua posição inicial nos primeiros 5 ns. Assim, sugerimos que a ligação da PPN no *F-loop* restringe a movimentação deste elemento, dificultando o desenovelamento da TH. Essa hipótese é corroborada pelos

cálculos da média da força exercida no átomo SMD durante as simulações em triplicata (Figura 10). No gráfico é possível observar que a força necessária para mover o átomo SMD e deslocar o *F-loop* atingiu valores maiores nas simulações contendo PPN em comparação às simulações sem ligantes (APO). Nos primeiros 2 ns, a força atingiu valores de 400 pN nas simulações com PPN, enquanto nas simulações APO, o valor variou entre 150 e 300 pN. Já no intervalo entre 3 ns e 5 ns, a força variou entre 600 e 800 pN nas simulações APO, e 600 e 900 pN, nas simulações com PPN (Figura 11). Após 5 ns, há uma inversão nos valores de força, sendo maiores nas simulações APO. No entanto, após este tempo, a TH já se encontra próxima da conformação da TL, portanto, outros fenômenos podem estar relacionados com esta inversão. Estes resultados indicam que, nas simulações, a PPN influenciou o processo de desenovelamento da TH.

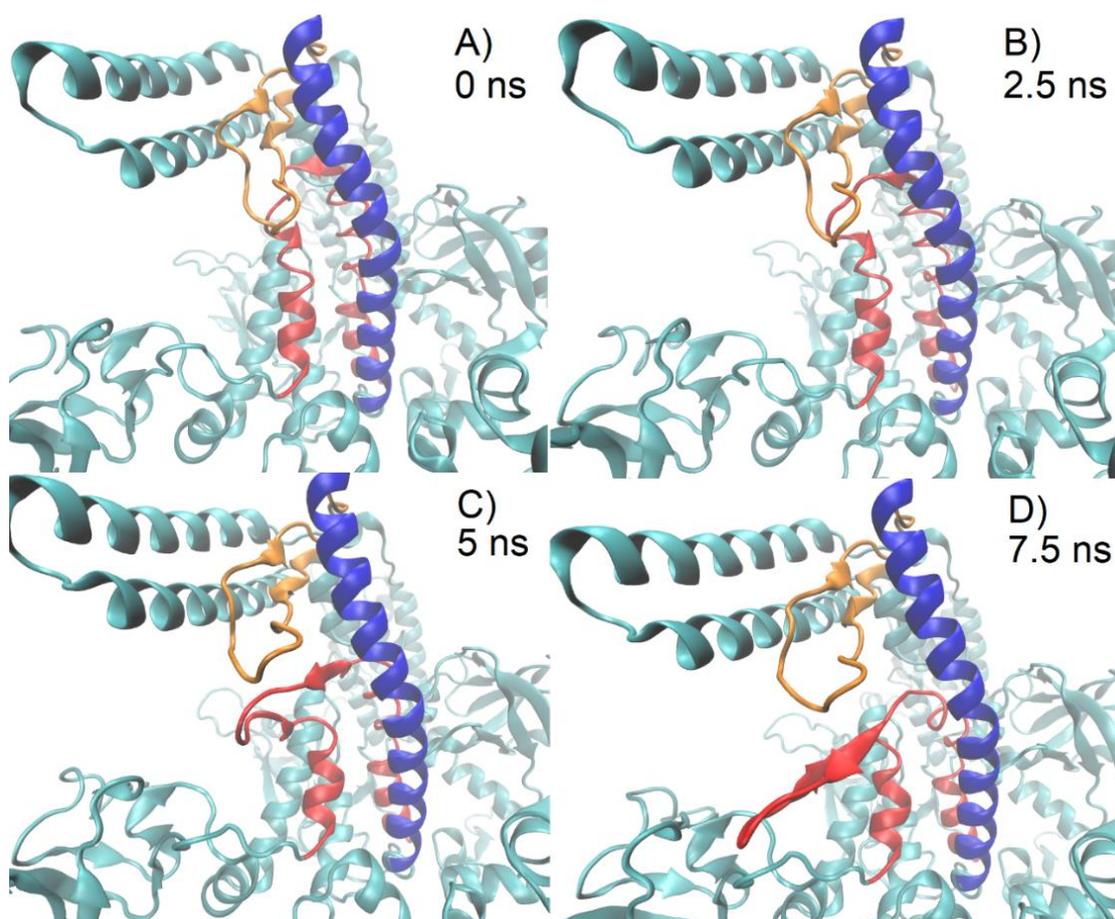


Fig. 9. Visualização da trajetória obtida por SMD, ilustrando o desenovelamento da *trigger-helix* em *trigger-loop*. Azul escuro: *Bridge-helix*, vermelho: *Trigger-helix*, Laranja: *F-loop*

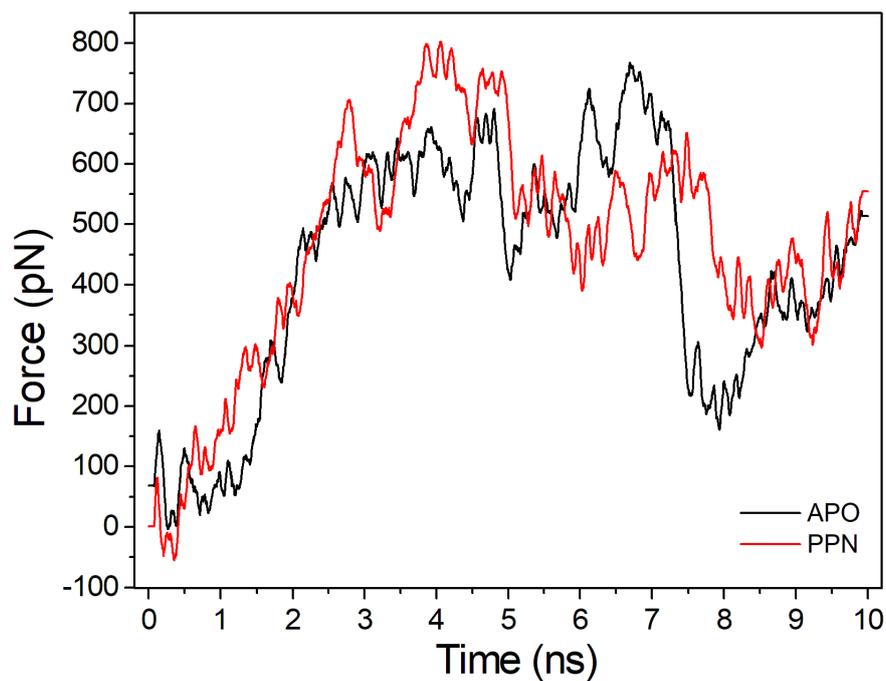


Fig. 10. Média da força exercida no átomo SMD em função do tempo (Simulações em triplicata). Em vermelho: Média da força exercida no átomo SMD na presença de PPN. Preto: Média da força exercida no átomo SDM nas simulações sem ligantes.

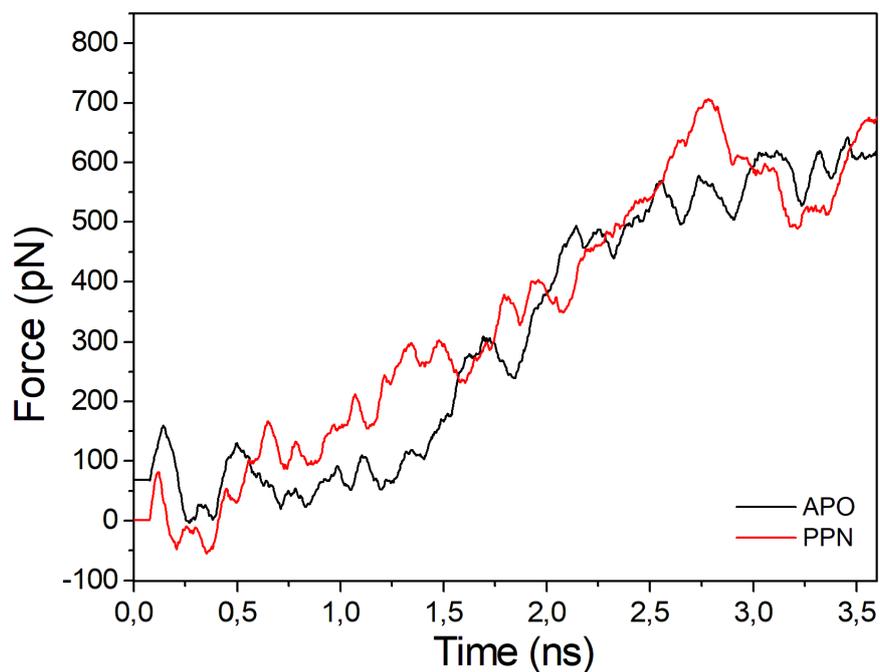


Fig. 11. Média da força exercida no átomo SMD nos primeiros 3,5 ns.

Possível sinergismo entre PPN e RFP na RNAP em Mycobacterium leprae.

Os resultados obtidos por *docking* molecular, tanto nos estudos de Murase e colaboradores, quanto os apresentados neste trabalho, corroboram a hipótese da ligação da PPN na RNAP, pois PPN e 88G apresentaram *scores* e modos de ligação semelhantes na RNAP. Pelas simulações de DM, também foi possível verificar que os mesmos resíduos do sítio de ligação estão envolvidos na estabilização de ambas as moléculas (Figura 4). Com base na hipótese da ligação da PPN em elementos do sítio ativo da RNAP, bem como nos resultados apresentados neste trabalho, é possível sugerir uma explicação estrutural para o sinergismo entre PPN e RFP observado em micobactérias no modelo da RNAP.

Neste modelo, a PPN se liga no mesmo sítio de ligação que a molécula 88G e os compostos CBR. A habilidade destas moléculas e da RFP se ligarem na mesma molécula, mas em sítios diferentes, indica que a coadministração destes compostos resultaria em um efeito aditivo de inibição. Este efeito foi sugerido por Lin e colaboradores (Lin *et al.*, 2017) em *Mycobacterium tuberculosis* e Feng e colaboradores (Feng *et al.*, 2015) em *Escherichia coli*, para o 88G e compostos CBR, respectivamente. O sítio de ligação é formado por elementos altamente dinâmicos do sítio ativo, como o *Trigger-loop*, *Bridge-helix* e *F-loop*, sendo que os ligantes analisados fazem contato direto com estes dois últimos. Assim, a ligação de uma molécula pequena nestes elementos poderia causar a restrição das dinâmicas conformacionais necessárias para o funcionamento do ciclo de adição de nucleotídeos (NAC). Um mecanismo semelhante foi proposto para a inibição da transcrição pela α -amanitina (Bushnell, Cramer e Kornberg, 2002) e estreptolidigina (Murakami, 2015). No entanto, a PPN sozinha não é suficiente para inibir a transcrição completamente (Murase *et al.*, 2019). Dessa forma, para entender o sinergismo, é preciso levar em conta o mecanismo de inibição da RFP.

O efeito dominante da ligação da RFP na atividade da RNAP é o bloqueio da síntese da segunda ou terceira ligação fosfodiéster, por meio de “oclusão estérica” que impede a extensão do transcrito. Esse efeito foi sugerido por Campbell e colaboradores (Campbell *et al.*, 2001) e visualizado nas estruturas cristalográficas determinadas por Lin e colaboradores (Lin *et al.*, 2017). Após a síntese de um transcrito maior que 4 nt, a RNAP torna-se totalmente resistente à RFP, pois seu sítio de ligação não é mais acessível

(Campbell *et al.*, 2001). Portanto, como moléculas pequenas que se ligam aos elementos do sítio ativo da RNAP interferem no NAC, a processividade da enzima é reduzida. Consequentemente, aumentam-se as chances de a RFP interagir com uma RNAP que ainda não sintetizou um transcrito longo, diminuindo a concentração de RFP necessária para inibir a transcrição bacteriana. Este modelo de sinergismo é proposto, neste trabalho, para a RFP em combinação com PPN nas micobactérias, assim como para outras classes de moléculas com capacidade de ligar em elementos estruturais do sítio ativo da RNAP. No entanto, vale ressaltar que a PPN possui alvos alternativos na célula, como bombas de efluxo (Hegeto *et al.*, 2018). Portanto, este modelo de inibição para a RNAP não é o único responsável pelo efeito sinérgico observado *in vitro*.

Conclusão

Apesar de ser uma doença curável e conhecida a séculos, a lepra continua sendo um problema de saúde pública em países em desenvolvimento. O surgimento de organismos resistentes a antibióticos gera uma urgente demanda pelo desenvolvimento de novas estratégias de tratamento. Explorar o sinergismo entre antibióticos já conhecidos é uma estratégia promissora e de baixo custo relativo. Os resultados obtidos indicam que a ligação da PPN no sítio investigado poderia afetar a dinâmica conformacional dos elementos do sítio ativo da RNAP, como a BH e TL, sugerindo que um sinergismo entre PPN e RFP é possível em *Mycobacterium leprae*, além de possibilitar uma explicação estrutural para o sinergismo observado em outras micobactérias. No entanto, estudos adicionais devem ser conduzidos a fim de confirmar experimentalmente estas hipóteses. Além disso, este trabalho fornece informações estruturais importantes para a otimização estrutural da Piperina, visando modificações capazes de aumentar sua estabilidade no sítio de ligação, e para a descoberta de novos antimicrobianos.

Referências

- ABDELKAREEM, M. *et al.* Structural Basis of Transcription: RNA Polymerase Backtracking and Its Reactivation. **Molecular Cell**, 2019.
- BALAKRISHNAN, V.; VARMA, S.; CHATTERJI, D. Piperine augments transcription inhibitory activity of rifampicin by severalfold in Mycobacterium smegmatis. **Current Science**, 2001.
- BATEMAN, A. *et al.* UniProt: The universal protein knowledgebase. **Nucleic Acids Research**, 2017.
- BENJAK, A. *et al.* Phylogenomics and antimicrobial resistance of the leprosy bacillus Mycobacterium leprae. **Nature Communications**, 2018.
- BROOKS, B. R. *et al.* CHARMM: The biomolecular simulation program. **Journal of Computational Chemistry**, 2009.
- BRUECKNER, F.; ORTIZ, J.; CRAMER, P. A movie of the RNA polymerase nucleotide addition cycle. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 19, n. 3, p. 294–299, 2009.
- BUSHNELL, D. A.; CRAMER, P.; KORNBERG, R. D. Structural basis of transcription: α -amanitin-RNA polymerase II cocrystal at 2.8 Å resolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 3, p. 1218–1222, 2002.
- CAMPBELL, E. A. *et al.* Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. **Cell**, v. 104, n. 6, p. 901–912, 2001.
- DALLAKYAN, S.; OLSON, A. J. Small-Molecule Library Screening by Docking with PyRx. *In: Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. [s.l: s.n.]. v. 1263p. 243–250.
- DAVID, C. C.; JACOBS, D. J. Principal component analysis: A method for determining the essential dynamics of proteins. **Methods in Molecular Biology**, 2014.
- EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: Model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, 2004.
- FENG, Y. *et al.* Structural Basis of Transcription Inhibition by CBR Hydroxamidines and CBR Pyrazoles. **Structure**, v. 23, n. 8, p. 1470–1481, 2015.
- FORLI, W. *et al.* AutoDock Version 4.2. **Citeseer**, 2012.
- GRANT, B. J. *et al.* Bio3d: An R package for the comparative analysis of protein structures. **Bioinformatics**, v. 22, n. 21, p. 2695–2696, 2006.
- HEGETO, L. A. *et al.* In vitro combinatory activity of piperine and anti-tuberculosis drugs in Mycobacterium tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 111, n. May, p. 35–40, 2018.
- _____. Promising Antituberculosis Activity of Piperine Combined with Antimicrobials: A Systematic Review. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 1, p. 120–126, 2019.
- HEIN, P. P.; LANDICK, R. The bridge helix coordinates movements of modules in RNA polymerase. **BMC Biology**, 2010.
- KOHANSKI, M. A.; DWYER, D. J.; COLLINS, J. J. How antibiotics kill bacteria: From targets to networks. **Nature Reviews Microbiology**, 2010.

- LIN, W. *et al.* Structural Basis of Mycobacterium tuberculosis Transcription and Transcription Inhibition. **Molecular Cell**, v. 66, n. 2, p. 169- 179.e8, 2017.
- MALINEN, A. M. *et al.* CBR antimicrobials alter coupling between the bridge helix and the β subunit in RNA polymerase. **Nature Communications**, v. 5, 2014.
- MIROPOLSKAYA, N. *et al.* Interplay between the trigger loop and the F loop during RNA polymerase catalysis. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 1, p. 544–552, 2014.
- MOHANTY, P. S. *et al.* Ribonucleotide reductase as a drug target against drug resistance Mycobacterium leprae: A molecular docking study. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 60, n. September 2017, p. 58–65, 2018.
- MURAKAMI, K. S. Structural biology of bacterial RNA polymerase. **Biomolecules**, v. 5, n. 2, p. 848–864, 2015.
- MURASE, L. S. *et al.* Possible binding of piperine in mycobacterium tuberculosis RNA polymerase and rifampin synergism. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2019.
- NEESE, F. The ORCA program system. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, 2012.
- PATEL, J. S. *et al.* Steered molecular dynamics simulations for studying protein-ligand interaction in cyclin-dependent kinase 5. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, n. 2, p. 470–480, 2014.
- PHILLIPS, J. C. *et al.* Scalable molecular dynamics with NAMD **Journal of Computational Chemistry**, 2005.
- SIEVERS, F.; HIGGINS, D. G. Clustal omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. **Methods in Molecular Biology**, 2014.
- THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking. 2006.
- VASSYLYEV, D. G. *et al.* Structural basis for substrate loading in bacterial RNA polymerase. **Nature**, 2007.
- WANG, R. R. *et al.* Exploring the reason for increased activity of SHP2 caused by D61Y mutation through molecular dynamics. **Computational Biology and Chemistry**, 2019.
- WEBB, B.; SALI, A. Protein structure modeling with MODELLER. *In: Methods in Molecular Biology*. [s.l.: s.n.]. .
- ZOETE, V. *et al.* SwissParam: A fast force field generation tool for small organic molecules. **Journal of Computational Chemistry**, 2011.

Material suplementar.

CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment

```

sp|P9WGZ1|RPOA_MYCTU      MLISQRPTLSEDLTDNRSQFVIEPLEPGFGYTLGNSLRRTLLSSIPGAAVTSIRIDGVL 60
sp|Q9X798|RPOA_MYCLE      MLISQRPTLSEDLTDNRSQFVIEPLEPGFGYTLGNSLRRTLLSSIPGAAVTSIRIDGVL 60
*****;*****

sp|P9WGZ1|RPOA_MYCTU      HEFTTVPGVKEDVTEIILNLKSLVVSSEEDEPVTMYLRKQGPGEVTAGDIVPPAGVTVHN 120
sp|Q9X798|RPOA_MYCLE      HEFTTVPGVKEDVTEIILNLKGLVVSSEEDEPVTMYLRKQGPGEVTAGDIVPPAGVTVLHN 120
*****_******_*

sp|P9WGZ1|RPOA_MYCTU      PGMHIATLNDKKGKLELVVERGRGYVPAVQNRASGAEIGRIPVDSIYSPVLKVTYKVDA 180
sp|Q9X798|RPOA_MYCLE      PGMRIATLNDKKGKIEAEVVERGRGYVPAVQNRALGAEIGRIPVDSIYSPVLKVTYKVDA 180
***_******_*_******_*

sp|P9WGZ1|RPOA_MYCTU      TRVEQRTDFDKLILDVETKNSISPRDALASAGKTLVELFGLARELNVEAEGIEIGPSPA 240
sp|Q9X798|RPOA_MYCLE      TRVEQRTDFDKLILDVETKSSITPRDALASAGKTLVELFGLARELNVEAEGIEIGPSPA 240
*****_*_******_*_*

sp|P9WGZ1|RPOA_MYCTU      ADHIASFALPIDDLTVRSYNCLKREGVHTVGEVARTESDLLDIRNFGQKSIDEVKIK 300
sp|Q9X798|RPOA_MYCLE      ADHIASFALPIDDLTVRSYNCLKREGVHTVGEVSRTESDLLDIRNFGQKSIDEVKVK 300
*****_*_******_*_*_*

sp|P9WGZ1|RPOA_MYCTU      LHQLGLSLKDSPPSFDPEVAGYDVATGTWSTEGAYDEQDYAETEQL 347
sp|Q9X798|RPOA_MYCLE      LHQLGLSLKDSPPSFDPEVAGYDVTGTWSTDGAYDSQDYAETEQL 347
*****_*_******_*_*_*

```

Fig. S1. Alinhamento das seqüências de aminoácidos dos genes rpoA de *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium tuberculosis* (95,68% de identidade).


```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

sp|P9WGY5|RPOZ_MYCTU      MSISQSDASLAAPVAVDQFDPPSSGASGGYDTPPLGITNPPIDE LLDRVSSKYALVIYAAKR 60
sp|Q9CCQ6|RPOZ_MYCLE      MSIPQSNTSLSAVIAVDQFDPPSSGGQGVYDTPPLGITNPPIDE LLDRVSSKYALVIYAAKR 60
                          ***  *::**.* ** *****_* *****

sp|P9WGY5|RPOZ_MYCTU      ARQINDYYNQLGEGILEYVGPLVEPGLQEKPLSIALREIHADLLEHTEGE 110
sp|Q9CCQ6|RPOZ_MYCLE      ARQINDHYNQLGEGILEYVGPLVEPGLQEKPLSIAMREIHADLLEHTEGE 110
                          *****_* *****_* *****

```

Fig. S4. Alinhamento das seqüências de aminoácidos dos genes rpoZ de *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium tuberculosis* (90,91% de identidade).

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

sp|P9WGI1|SIGA_MYCTU      DESEALRQARKDAELTASADSVRAYLKQIGKVALLNAAEEVELAKRIEAGLYATQLMTEL 60
tr|Q7AQB1|Q7AQB1_MYCLE    DESEALRQARKDAELTASADSVRAYLKQIGKVALLNAAEEVELAKRIEAGLYATQLMTEL 60
                          *****

sp|P9WGI1|SIGA_MYCTU      SERGEKLPAAQRDRMMWICRDGDRAKNHLLEANLRLVVS LAKRYTGRGMAFLDLIQEGNL 120
tr|Q7AQB1|Q7AQB1_MYCLE    SERGTKLPTAQRDRMMWICRDGDRAKNHLLEANLRLVVS LAKRYTGRGMAFLDLIQEGNL 120
                          **** *::*****

sp|P9WGI1|SIGA_MYCTU      GLIRAVEKFDYTKGYKFSYATWWIRQAITRAMADQARTIRIPVHMVEVINKLGRIQREL 180
tr|Q7AQB1|Q7AQB1_MYCLE    GLIRAVEKFDYTKGYKFSYATWWIRQAITRAMADQARTIRIPVHMVEVINKLGRIQREL 180
                          *****

sp|P9WGI1|SIGA_MYCTU      LQDLGREPTPEELAKEMDITPEKVLEIQQYAREPISLDQTIGDEGDSQLGDFIEDSEAVV 240
tr|Q7AQB1|Q7AQB1_MYCLE    LQDLGREPTPEELAKEMDITPEKVLEIQQYAREPISLDQTIGDEGDSQLGDFIEDSEAVV 240
                          *****

sp|P9WGI1|SIGA_MYCTU      AVDAVSFTLLQDQLQSVLDTLSEREAGVVRLRFGLTDGQPRTLDEIGQVYGVTRERIRQI 300
tr|Q7AQB1|Q7AQB1_MYCLE    AVDAVSFTLLQDQLQSVLETLSEREAGVVRLRFGLTDGQPRTLDEIGQVYGVTRERIRQI 300
                          *****_* *****

sp|P9WGI1|SIGA_MYCTU      ESKTMSKLRHPSRSQVLRDYLD 322
tr|Q7AQB1|Q7AQB1_MYCLE    ESKTMSKLRHPSRSQVLRDYLD 322
                          *****

```

Fig. S5. Alinhamento das seqüências de aminoácidos dos genes rpoT (sigA) de *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium tuberculosis* (99,07% de identidade).

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

trigger-helix-2o5j        VGIVAAQSISIEPGTQLTMRTFHTGGVAGAADITQGLPRVIELFEAR 46
trigger-helix-MLE        VGIVAAQSISIEPGTQLTMRTFHQGGVG--EDITGGLPRVQELFEAR 44
                          *****_* *****

```

Fig. S6. Alinhamento das seqüências de aminoácidos da *trigger-helix* de *Thermus thermophilus* (PDBid 2O5J) e *Mycobacterium leprae* (88,64% de identidade).

Tabela S1. Redocking do 88G na estrutura da RNAP de *Mycobacterium leprae*.

	Autodock	MVD
RMSD (88G)	0.96 +/- 0.16	0.59 +/- 0.21

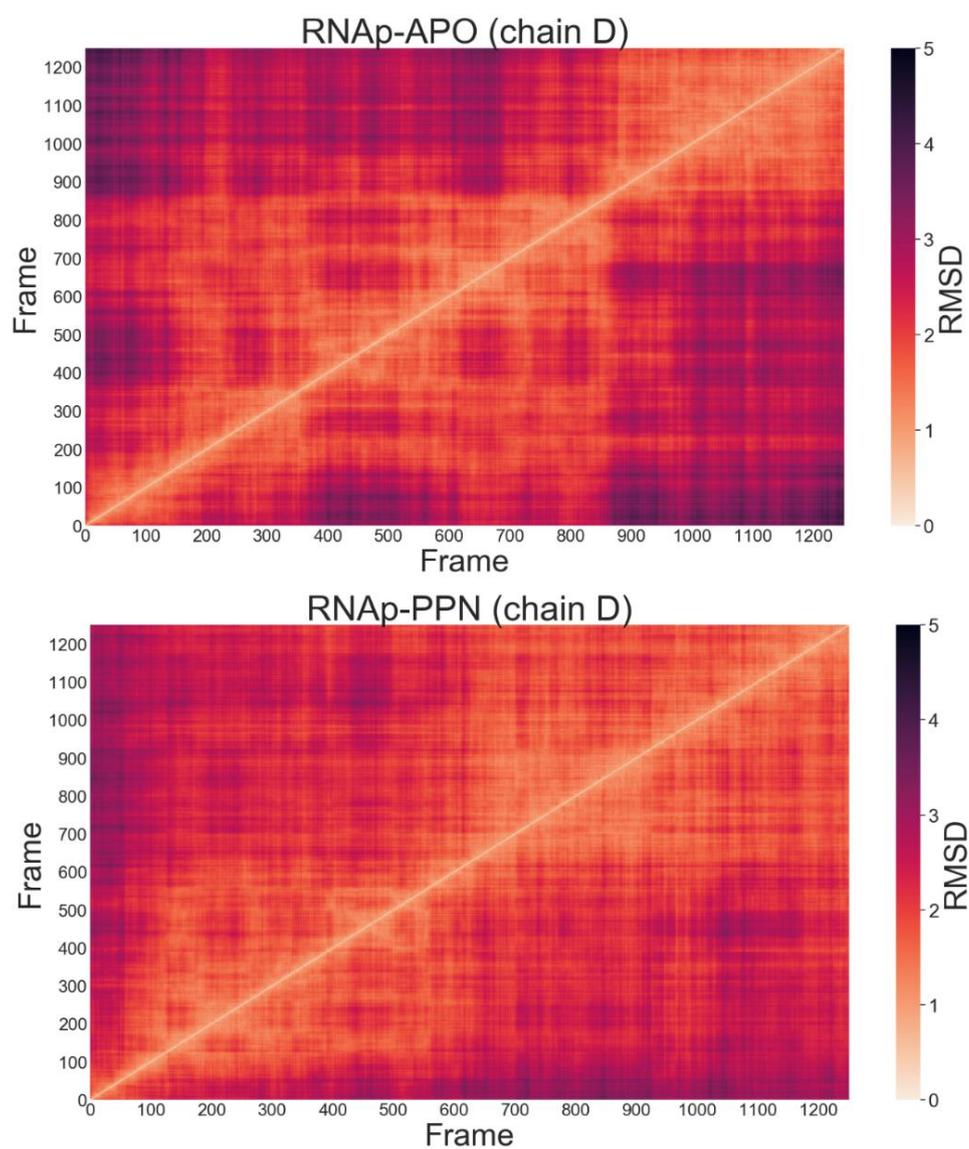
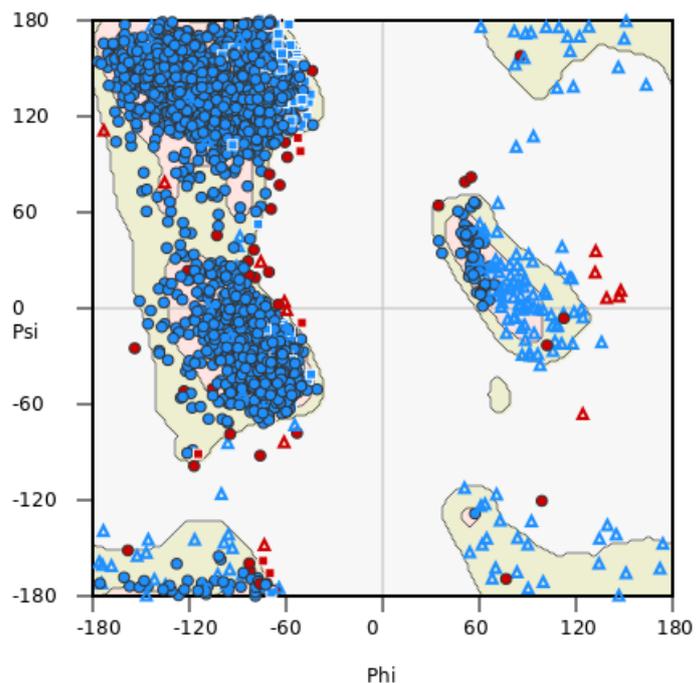


Fig. S7. Mapa de calor (*heatmap*) dos valores de RMSD *all-to-all* das trajetórias obtidas por DM de 50 ns da RNAP de *Mycobacterium leprae* (2500 frames, *stride* = 2).



In preferred regions: 2985 (92.02%)
In allowed regions: 202 (6.23%)
Outliers: 57 (1.76%)

Fig. S8. Gráfico de Ramachandran da estrutura modelada da RNAP de *Mycobacterium leprae*.

Tabela S2. Scores obtidos por docking dos ligantes PPN e 88G na estrutura modelada da RNAP de *Mycobacterium leprae*.

	Autodock	MVD (MolDock Score)
88G	-11.42 +/- 0.30	-154.459 +/- 3.90
PPN	-9.45 +/- 0.16	-117.8 +/- 3.1

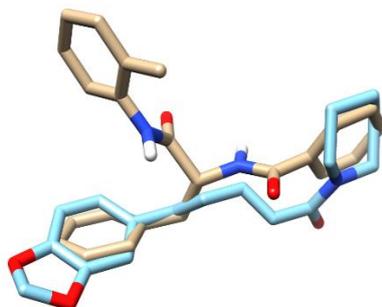


Fig. S9. Modo de ligação da PPN (azul) e 88G (marrom) na RNAP de *Mycobacterium leprae* (Molegro).

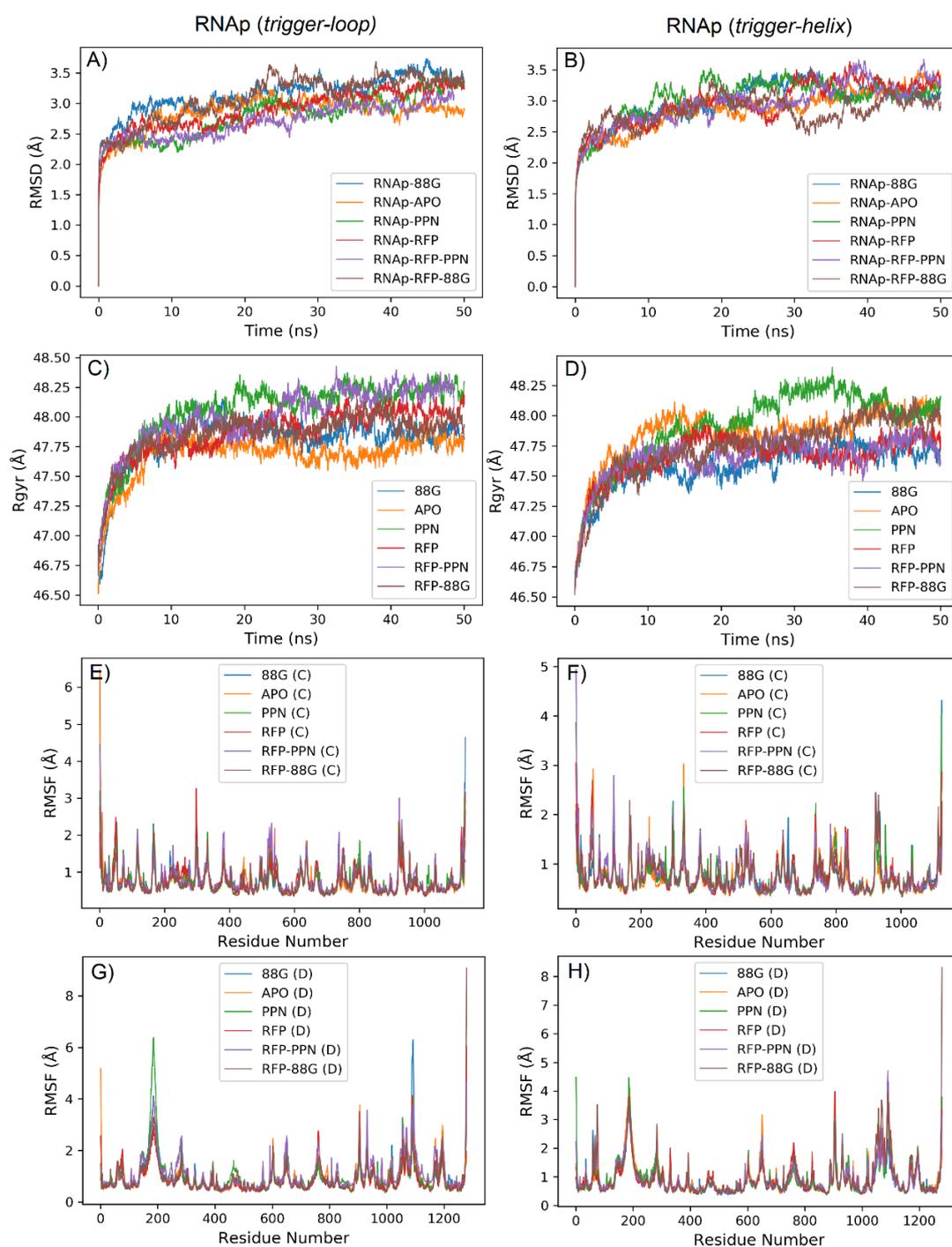


Fig. S10. Resultados das simulações de DM. Esquerda: DM da RNAP com sítio ativo na conformação aberta. Direita: DM da RNAP com sítio ativo na conformação fechada. A) e B): Gráficos de RMSD (*backbone*) em função do tempo. C) e D): Gráficos de Rgyr em função do tempo. E) e F): Gráficos de RMSF dos resíduos da subunidade β . G) e H): Gráficos de RMSF dos resíduos da subunidade β' .

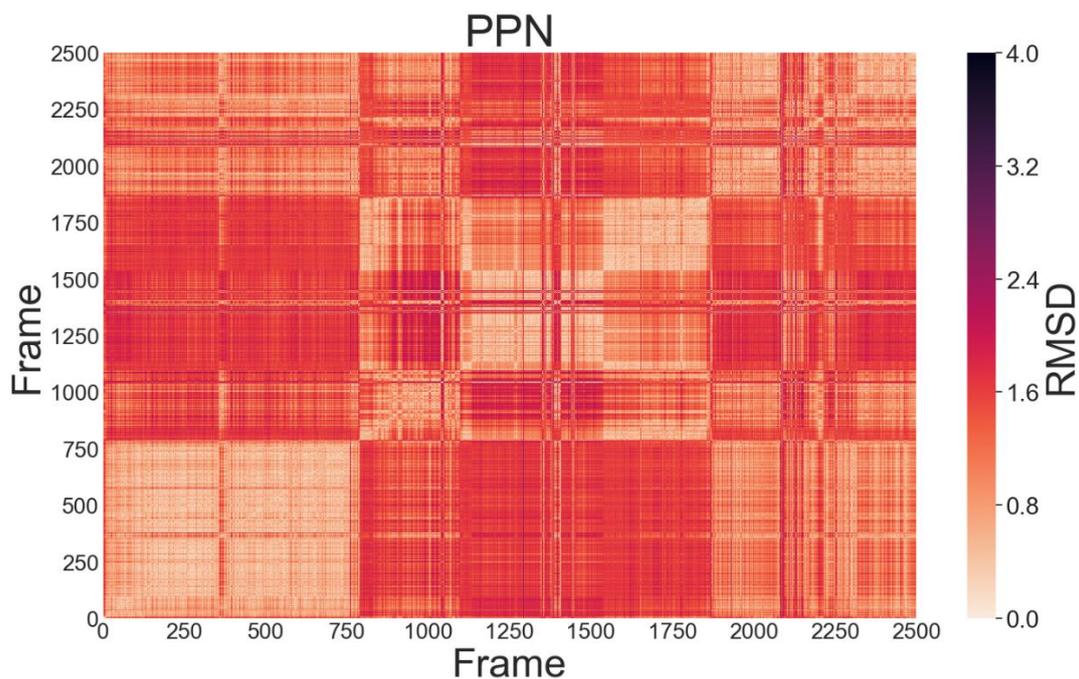


Fig. S11. Mapa de calor (*heatmap*) dos valores de RMSD *all-to-all* da trajetória da PPN na simulação de DM de 100 ns (5000 frames, *stride* = 2).

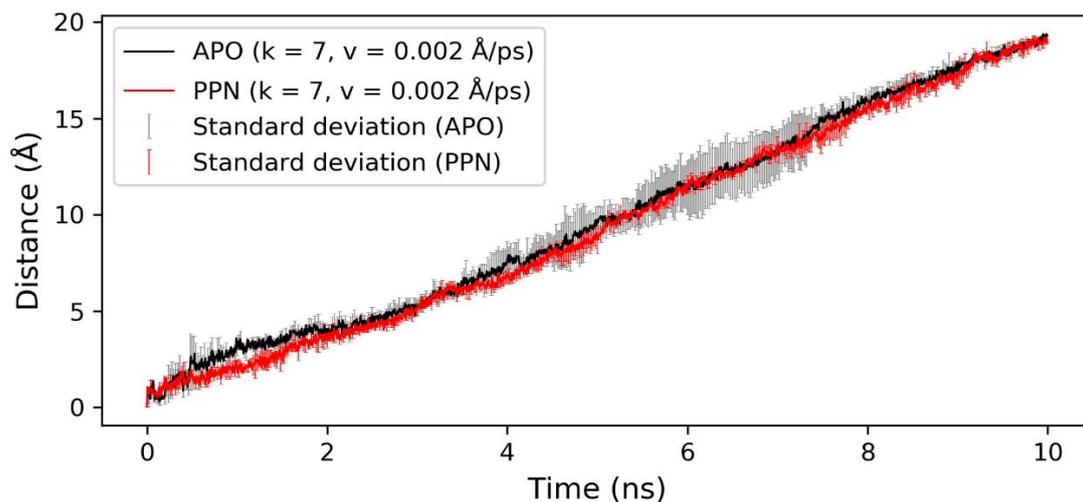


Fig. S12. Média da distância percorrida pelo átomo SMD em função do tempo (simulações em triplicata).



In silico evaluation of condensed and hydrolysable tannins as inhibitors of pancreatic α -amylase

Paulo Sérgio Alves Bueno¹ · Camila Gabriel Kato-Schwartz^{1,2} · Diego de Souza Lima³ · Adelar Bracht^{1,2} · Rosane Marina Peralta^{1,2} · Flavio Augusto Vicente Seixas³ 

Received: 6 November 2018 / Accepted: 19 August 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Amylases are interesting targets for antidiabetic drugs because their inhibition is able to lower glycaemia without the need of hormonal control, as promoted by insulin or glibenclamide. In this context, the comparison between the binding features of α -amylases with their substrate and known inhibitors may provide insights aiming at the discovery of new antidiabetic drugs. In this work, the structure of the porcine pancreatic α -amylase was modelled with the acarbose pentasaccharide inhibitor, and used in structure-based virtual screening simulations based on a library containing the structures of amylose (AMY), acarbose (ACA) and the more representative structures of condensed tannin (CTN) and hydrolysable tannin (HTN). After validation of the methodology by redocking (mean rmsd ~ 0.8 Å), the scores provided by programs AutoDock/Molegro were contradictory ($-1.5/-23.3$; $-3.5/-24.6$; $-4.3/-14.6$; $-/-19.5$ for AMY, ACA, CTN and HTN respectively), indicating that a more sensitive methodology was necessary. The $\Delta G_{\text{binding}}$ was calculated by the molecular mechanics Poisson–Boltzmann surface area (MM-PBSA) method, which indicated that the HTN, ACA and CTN had higher affinities for the enzyme regarding the AMY substrate, with values of -350.0 , -346.2 , -320.5 and -209.2 kJ mol⁻¹, respectively. The predicted relative affinities of HTN and CTN are in agreement with those obtained experimentally. The results provided useful information for the characterization of tannin binding to α -amylase, which can be applied in future studies aiming at finding new hypoglycaemic molecules among natural products.

Keywords Enzyme · Diabetes · Natural products · MM-PBSA · Docking