

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Arethusa Lobo Pimentel

**SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS NA DESCOBERTA DE INIBIDORES DA
ENZIMA ALANINA RACEMASE DE BACTÉRIAS E NO ESTUDO DA
INTERAÇÃO DA ISONIAZIDA COM MUTAÇÕES PONTUAIS NA ENZIMA KatG
DE *Mycobacterium tuberculosis***

Maringá
2018

Arethusa Lobo Pimentel

**SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS NA DESCOBERTA DE INIBIDORES DA
ENZIMA ALANINA RACEMASE DE BACTÉRIAS E NO ESTUDO DA
INTERAÇÃO DA ISONIAZIDA COM MUTAÇÕES PONTUAIS NA ENZIMA KatG
DE *Mycobacterium tuberculosis***

“Tese 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 título de Doutora em Ciências Biológicas”.

Orientador: Prof. Dr. Flavio Augusto Vicente Seixas

Co-orientadora: Profa. Dra. Cristiane Mengue Feniman Moritz

Maringá
2018

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

P644s Pimentel, Arethusa Lobo, 1985-
Simulações computacionais na descoberta de inibidores da enzima alanina racemase de bactérias e no estudo da interação da isoniazida com mutações pontuais na enzima katg de *Mycobacterium tuberculosis* / Arethusa Lobo Pimentel. -- Maringá, 2018.
66 f. : figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Flavio Augusto Vicente Seixas.

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Cristiane Mengue Feniman Moritz.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Bioquímica, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2018.

1. Alanina Racemase. 2. *Vibrio cholerae*. 3. *Mycobacterium tuberculosis*. 4. *Catalase-peroxidase*. 5. Isoniazida. 6. Resistência à antibióticos. I. Seixas, Flavio Augusto Vicente, orient. II. Moritz, Cristiane Mengue Feniman, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

CDD 23.ed. 572.8

Glauucia Volponi de Souza - CRB9/948

ARETHUSA LOBO PIMENTEL

**SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS NA DESCOBERTA DE INIBIDORES DA
ENZIMA ALANINA RACEMASE DE BACTÉRIAS E NO ESTUDO DA
INTERAÇÃO DA ISONIAZIDA COM MUTAÇÕES PONTUAIS NA ENZIMA KatG
DE *Mycobacterium tuberculosis***

“Tese 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 Doutora em Ciências Biológicas”.

Aprovado em: 28 de setembro de 2018.

Banca Examinadora

Orientador: Prof. Dr. Flavio Augusto Vicente Seixas
Departamento de Bioquímica (DBQ)
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Laurival Antônio Vilas-Boas
Departamento de Biologia Geral
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Cristiane Mengue Feniman Moritz
Departamento de Tecnologia (DTC)
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Marco Aurelio Schüler de Oliveira
Departamento de Bioquímica (DBQ)
Universidade Estadual de Maringá

Profa. Dra. Gisele de Freitas Gauze
Departamento de Química (DQI)
Universidade Estadual de Maringá

BIOGRAFIA

Arethusa Lobo Pimentel, filha de Nelma Lobo Garcia Pimentel e João Danilo Lamarques Pimentel, nasceu em Foz do Iguaçu-PR, em 16 de janeiro de 1985. Bacharela em Ciências Biológicas pela Universidade Paranaense - UNIPAR (2011). Ingressou no ano de 2012 no Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Área de Concentração – Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá, onde realizou pesquisa na área de farmacologia da transmissão neuromuscular sob orientação do Prof. Dr. Wilson Alves-Do-Prado, avaliando os efeitos relaxantes musculares não despolarizantes na neurotransmissão de ratos tratados com bloqueadores de receptores muscarínicos e/ou adenosinérgicos. Obteve o título de Mestre em Ciências Biológicas no mês de junho de 2014 e posteriormente publicou o estudo intitulado: “*Atropine is more efficient than ZM241385 to reduce a drastic level of fade caused by cisatracurium at 50 Hz*”. Atualmente é Doutoranda pela mesma instituição, onde desenvolve pesquisa, sob orientação do Prof. Dr. Flavio Augusto Vicente Seixas, para a determinação da estrutura de proteínas (enzimas), ainda não obtidas por meio de métodos experimentais, como difração de raios X, de agentes etiológicos de doenças de importância para saúde pública, para serem utilizadas como possíveis alvos de drogas, através de técnicas de modelagem molecular computacional e de dinâmica molecular voltadas à análise da estabilidade de complexos proteicos, com objetivo de encontrar possíveis compostos inovadores que atuem como inibidores, por meio de técnicas *In silico* de varredura virtual e ancoragem (*docking*) de inibidores, de modo que estes possam ser utilizados futuramente como antibióticos de uso humano e/ou veterinário.

DEDICATÓRIA

Ao meu amado companheiro Marcos Alves Gomes que têm sido meu alicerce por todos estes anos, pelo apoio incondicional, esforços incansáveis, carinho e compreensão em todos os momentos, permitindo assim que eu pudesse enfim concluir essa jornada.

AGRADECIMENTO

Primeiramente aos meus pais, Nelma Lobo Garcia Pimentel e João Danilo Lamarques Pimentel, por todo o amor e dedicação, por sempre me incentivarem a acreditar nos meus sonhos, por me ensinarem a agir com caráter e honestidade em busca dos meus objetivos.

A minha co-orientadora, Profa. Dra. Cristiane Mengue Feniman Moritz, por todo o apoio, paciência em me auxiliar no aprendizado e na execução das técnicas *In vitro*, as quais utilizei durante parte do meu doutorado.

A Profa. Dra. Sheila Rezler Wosiacki por todos os preciosos ensinamentos da vida acadêmica e científica, por me ajudar a pensar “fora da caixa”, por todo o tempo que sempre disponibilizou para me orientar generosamente, com dedicação e paciência na condução dos experimentos *In vitro*, por tantas conversas produtivas e criativas, mas principalmente por me incentivar em todos os momentos dessa jornada.

Ao colega de laboratório Paulo Sérgio Alves Bueno pela parceria nos eventos e nos cursos de inverno, por me auxiliar prontamente em todas as ocasiões em que precisei, pelas conversas e por todo o apoio no desenvolvimento de tantos trabalhos.

A minha querida amiga Elisângela Andrade Angelo, por ser um grande exemplo de calma, dedicação e conhecimento, por todos os momentos de aprendizado e trabalho os quais extrapolaram os limites do laboratório, acrescentando riquezas tanto à minha vivência acadêmica quanto pessoal.

A minha amiga Raquel Granato, que de companheira de trabalho se tornou também alguém muito especial em minha vida, por todos os momentos de apoio nas angústias e incertezas do dia a dia durante estes anos, por todos os momentos de descontração e companhia singular para o café, por estar sempre pronta a me auxiliar e acompanhar em tantos dias e noites intermináveis de trabalho no laboratório. Agradeço imensamente por aumentar ainda mais a minha admiração e respeito pela sua nobre profissão.

A técnica do laboratório de Microbiologia Animal, Vanessa Capoa Vignoto por todos os momentos de suporte e companheirismo dedicados.

A colega Ana Claudia Lemes Pavan, por sempre estar disponível para me ajudar e dividir seu conhecimento sobre microbiologia.

A técnica do laboratório de Microbiologia e de Bioquímica do CTC, Milene Ribeiro da Silva, por ser sempre tão agradável, disposta a ensinar e atenciosamente auxiliar no desenvolvimento dos experimentos e organização das aulas do meu estágio de docência.

Ao Prof. Dr. Flavio Augusto Vicente Seixas, por ser o maior exemplo de amor e dedicação à profissão que já conheci, pela grande oportunidade que ofereceu ao aceitar me orientar, por toda a confiança em mim investida, pela generosidade em compartilhar sem limitações o seu imenso conhecimento em tantas áreas com paciência e didática incomparáveis, por ter sido o maior incentivador na superação dos meus limites, sendo capaz de exigir na mesma medida que reconhecer cada esforço direcionado a realização dos nossos trabalhos. Serei eternamente grata pelas suas incalculáveis contribuições para o meu crescimento pessoal, acadêmico e científico.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e a Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná pelo auxílio financeiro, a Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas pela oportunidade oferecida.

APRESENTAÇÃO

Em consonância com as regras do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (UEM) previstas na Resolução nº 38/2017, esta Tese é composta por dois artigos científicos:

O primeiro, um artigo científico ainda não publicado, intitulado: “Modelagem por Homologia da Enzima Alanina Racemase de *Vibrio cholerae* e de *Staphylococcus aureus* MRSA cepa Mu50 complexadas com ligantes: Simulações de Ancoragem e Dinâmica Molecular”, que será submetido à revista “*Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*”. Consistiu no estudo *In silico* de modelagem por homologia da enzima alanina racemase de dois patógenos causadores de doenças de grande importância em saúde pública atualmente, o *V. cholerae* e o *S. aureus* MRSA cepa Mu50. A partir da modelagem da alanina racemase destes dois microrganismos foi possível a identificação de 22 candidatos em comum à inibidores desta enzima, utilizando a metodologia de *docking* (ancoragem) e varredura virtual de compostos químicos provenientes de bancos de dados de produtos naturais, os quais atenderam aos critérios ADMETox (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade). Além disso, o resultado da modelagem também foi utilizado para a execução dos estudos da DM da estrutura tridimensional destas enzimas, o que permitiu a análise estrutural e das interações da enzima com os ligantes, revelando detalhes moleculares do processo catalítico.

O segundo, um artigo científico publicado em 16 de março de 2017 na revista “*Journal of Molecular Modeling*” (DOI 10.1007/s00894-017-3290-3), sob o título: “*Mutations in catalase-peroxidase KatG from isoniazid resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates: insights from molecular dynamics simulations*”. No qual foram avaliadas mutações pontuais de nove proteínas mutantes, com base nas coordenadas da estrutura nativa H₃₇Rv, previamente determinadas por ensaios de identificação molecular de Reação em cadeia da Polimerase de Polimorfismo de Conformação de Fita Simples (PCR-SSP) correlacionados com estudos de concentração inibitória mínima (CIM) das mutações no gene *katG* de isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* na enzima catalase-peroxidase (KatG) relacionadas à resistência ao antibiótico isoniazida (INH), por meio de Dinâmica Molecular (DM) na presença do ligante INH.

1. Pimentel, Arethusa Lobo; Seixas, Flavio Augusto Vicente. Modelagem por Homologia da Enzima Alanina Racemase de *Vibrio cholerae* e de *Staphylococcus aureus* MRSA cepa Mu50 complexadas com ligantes: Simulações de Ancoragem e Dinâmica Molecular. **J Biomol Struct Dynamics**.

2. Pimentel, Arethusa Lobo; Scodro, Regiane Bertin de Lima; Caleffi-Ferracioli, Katiany Rizzieri; Siqueira, Vera Lúcia Dias; Campanerut-Sá, Paula Aline Zanetti; Lopes, Luciana Dias Ghiraldi; Almeida, Aryadne Larissa; Cardoso, Rosilene Fressatti; Seixas, Flavio Augusto Vicente. Mutations in catalase-peroxidase KatG from isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates: insights from molecular dynamics simulations. **J Mol Model**, 23:121, 2017.

RESUMO GERAL

Introdução: Atualmente bactérias resistentes ou multirresistentes, tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas são responsáveis por graves infecções difíceis ou até mesmo intratáveis pelos antimicrobianos disponíveis. O *Staphylococcus aureus* MRSA é uma das principais causas de infecções, em especial, das infecções hospitalares em todo o mundo, sendo classificado em uma lista de prioridades de patógenos resistentes à antibióticos da Organização Mundial de Saúde como de alta prioridade para pesquisa, descoberta e desenvolvimento de fármacos. O *Vibrio cholerae*, bacilo Gram-negativo responsável pela cólera é um patógeno que coloniza o intestino humano produzindo a toxina colérica que causa uma infecção diarreica aguda, transmitida pela ingestão de água e alimentos contaminados com esta bactéria. Como um microrganismo ambiental, o *V. cholerae* é capaz de adquirir genes de resistência pelo contato direto com bactérias ambientais intrinsecamente resistentes através de elementos genéticos móveis e, ainda, compartilhar características de resistência com microrganismos comensais ou outros patógenos entéricos, complicando o tratamento de várias outras infecções. Neste contexto, a alanina racemase (AlaR), uma enzima da família das isomerases dependente do cofator piridoxal 5'-fosfato (PLP) que catalisa a racemização reversível de L-alanina em D-alanina, pode ser um excelente alvo para o desenvolvimento de novas drogas de ação seletiva. Esta enzima está presente nas bactérias, mas é ausente em seres humanos e é rara em eucariotos. Atualmente, o único inibidor para a enzima AlaR comercializado clinicamente é a D-cicloserina (D-4-amino-isoxazolidona) (4AX), um análogo estrutural cíclico da D-alanina utilizado como tratamento de segunda opção contra *Mycobacterium tuberculosis*. Contudo, assim como outros inibidores da AlaR descritos, apresenta o problema da falta de especificidade a enzima, causando efeitos colaterais decorrentes da inibição de outras enzimas também dependentes do PLP. Fatores estes que realçam a necessidade da busca por compostos que apresentem maior especificidade, o que pode se traduzir em uma menor toxicidade aos seres humanos. Neste sentido, a modelagem por homologia, assim como as técnicas de ancoragem (*docking*) e varredura virtual (VS) de compostos, podem ser ferramentas importantes para auxiliar na busca por novos inibidores específicos contra a AlaR, principalmente pela possibilidade de resolverem as estruturas tridimensionais desta enzima de *V. cholerae* e *S. aureus* MRSA cepa Mu50, as quais não foram anteriormente obtidas por métodos experimentais, como difração de raios X ou ressonância magnética nuclear (RMN), fornecendo as informações necessárias para a busca por compostos que apresentem atividade antimicrobiana para serem posteriormente testados *In vitro*. Já a tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada pelo bacilo *M. tuberculosis*. Atualmente o tratamento recomendado para a TB suscetível a drogas consiste em 6 meses de antibioticoterapia com quatro medicamentos de primeira escolha: a isoniazida (INH), sempre em combinação com outros antibióticos como rifampicin, etambutol e pirazinamida. A INH ou hidrazida do ácido isonicotínico é o mais antigo fármaco sintético efetivo contra a TB e um dos principais antibióticos de primeira escolha no tratamento da doença, sendo reconhecida desde 1952 como um potente agente contra o *M. tuberculosis*. É considerada um pró-fármaco, que tem como alvo a catalase peroxidase (KatG) do *M. tuberculosis* e necessita ser convertida em um metabólito ativo intracelular pela enzima. A resistência aos medicamentos associada ao *M. tuberculosis* geralmente é causada por mutações espontâneas no genoma da bactéria, ao contrário de outros microrganismos que ocorre como resultado da transferência horizontal de genes. As mutações associadas à resistência a INH estão ligadas a pelo menos cinco genes bacterianos, mais comumente ao gene *katG* que codifica para a enzima KatG, reduzindo sua atividade ou até impedindo a conversão do pró-fármaco no seu metabólito ativo. Em um estudo anterior com isolados clínicos brasileiros de *M. tuberculosis* resistentes a INH,

diferentes mutações no gene *katG* foram determinadas por estudos de identificação molecular e correlacionadas com a resistência à droga por meio de ensaios de concentração inibitória mínima (CIM). Contudo, pouco se sabe sobre os mecanismos estruturais que envolvem a resistência associada a estas mutações. Sendo assim, a Dinâmica Molecular (DM) é uma ferramenta que permite prever os efeitos das mutações pontuais na estrutura da proteína KatG ao longo do tempo, em simulações em nível microscópico, o que pode fornecer, através de cálculos apropriados, uma estimativa da afinidade de ligação da INH com a enzima.

Objetivos: Os objetivos destes estudos foram a determinação das estruturas tridimensionais da enzima Alanina Racemase de *V. cholerae* e de *S. aureus* cepa Mu50/ATCC700699 ligadas ao cofator (PLP) e ao inibidor 4AX pelo método de modelagem por homologia, para sua utilização em técnicas de varredura virtual e ancoragem (*docking*) de inibidores. Bem como, a investigação do efeito de mutações pontuais detectadas em isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes à INH nas coordenadas estruturais da KatG de *M. tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC25618) por meio de simulações de DM sobre esta proteína ligada a INH. Uma melhor compreensão desse mecanismo pode levar ao desenvolvimento de drogas mais eficazes capazes de contornar a resistência.

Metodologia: As sequências da AlaR de *V. cholerae* (*Vcholerae*AR) complexada ao substrato L-alanina e ao cofator PLP e da AlaR-1 de *S. aureus* cepa Mu50/ATCC700699 (*Saureus*AR1) em sua forma apo provenientes da base de dados Uniprot (Uniprot Q9KUY6 e P63479), assim como seus moldes 2RJH e 4A3Q do *Protein Data Bank* (PDB) serviram de base para o alinhamento e obtenção da estrutura dos homodímeros, ligados ao cofator Piridoxal 5'-fosfato (PLP) e a 4AX, proveniente da estrutura do PDB 1XQL, utilizando o software Modeller (V.9.13). O melhor dos 1000 modelos gerados foi totalmente minimizado por meio do pacote de programas NAMD2 e posteriormente utilizado em simulações de dinâmica e ancoragem molecular. A VS de ambas as AlaR foi realizada a partir de três bibliotecas montadas com estruturas provenientes da base de dados ZINC, contendo aproximadamente 306.000 compostos. Foram realizados testes *In vitro* de concentração inibitória mínima (CIM) utilizando a metodologia de microdiluição em caldo em oito bactérias Gram-negativas, incluindo o *V.cholerae* ATCC9459 e outras oito culturas padrão de *S. aureus* (ATCC23235, ATCC43300; ATCC29523; ATCC19095; ATCC14458; ATCC13565; ATCC27664; ATCC BAA1707). Os ensaios foram realizados nas concentrações de 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 e 1 µg.mL⁻¹, utilizando 10 dos compostos selecionados por meio da VS (Ar1, Ar2, Ar5, VcAr30, VcAr31, VcAr32, VcAr33, VcAr34, VcAr35 e VcAr36), além do inibidor conhecido ácido 1-aminoetilfosfônico (AEF ou VcAr10), a tiazolidinona (TDZD-8) e a 4AX, para fins comparativos. Além disso, foram realizados ensaios de CIM incluindo EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) em combinação ou não com tampão Tris (2-Amino-2-hidroxi-metil-propano-1,3-diol) e com os compostos selecionados por meio da VS. A estrutura nativa da proteína KatG de *M. tuberculosis* H₃₇RV (ATCC25618, Uniprot: P9WIE5), ligada ao grupo prostético heme (*Mt*KatG) foi obtida a partir do PDB (PDBid: 1SJ2), a única coordenada disponível em sua forma nativa. As moléculas de água foram removidas e os ligantes INH, cloreto (CLA) e sódio (SOD) foram inseridos por meio de *docking* geométrico em ambas as subunidades, conforme aparecem na KatG de *Burkholderia pseudomallei* (PDBid: 4KWQ). O diagrama da estrutura secundária foi preparado usando o servidor da web PDBSum. As mutações pontuais avaliadas detectadas em isolados brasileiros, Ala109Val, Ser315Thr, Ser315Arg, Ser315Ile, Ser315Asn, Pro232Arg, Gly273Cys e Ser315Gly, bem como a mutação dupla His97Arg + Lys200Glu, foram construídas nas coordenadas espaciais da estrutura nativa por meio de do programa Coot-0.7.2 e a cavidade que forma o sítio de ligação da INH, localizada entre a proteína e o grupo heme, teve seu volume e área monitorados ao longo da DM pelo programa MDPocket. A simulação de DM foi realizada utilizando o pacote de programas NAMD2.

Resultados e Discussão: A análise da frequência de contato dos resíduos do sítio ativo de ambas as cadeias da proteína com a

4AX, resultou nos resíduos Arg128, Met301 e Tyr341 em *Vcholerae*AR e dos resíduos Arg137, Met311 e Tyr283 em *Saureus*AR1 como os de maior importância para a estabilização do ligante no sítio ativo. As simulações de DM dos complexos *Vcholerae*AR e *Saureus*AR1 foram realizadas pelo tempo de 50 ns para as suas formas apo e complexadas com o ligante 4AX. Os valores de RMSD ao longo da simulação mostraram que ambos os complexos atingiram o equilíbrio termodinâmico nos últimos 10 ns. Contudo, houve menor oscilação quando complexados com a 4AX do que na forma apo, o que sugere que os ligantes são importantes para a estabilização da estrutura do homodímero. Os resultados dos cálculos do R_{gyr} dos átomos da cadeia principal mostraram que ambos os complexos tiveram uma pequena expansão de volume ao longo da simulação. Sendo que em *Vcholerae*AR este volume se estabilizou a partir de 20 ns e em *Saureus*AR1 a partir dos 10 ns de simulação. A VS resultou em 22 candidatos a inibidores para *Vcholerae*AR e *Saureus*AR1 em comum entre as duas AlaR, dos quais foram adquiridos 10 para os ensaios de CIM. Nenhum dos compostos testados apresentou atividade inibitória, nem mesmo quando submetidos aos testes em associação com EDTA, Tris ou EDTA-Tris. Isto pode ser explicado com base na estrutura química dos compostos em comparação com o inibidor conhecido AEF, o qual também não apresentou atividade pois é um produto ativo da hidrólise da alafosfina, composto que necessita de transportadores específicos para entrar na célula bacteriana. Além disso, estes compostos possuem carga em pH 7,0, o que dificulta ainda mais a sua passagem pela membrana plasmática. Os resultados das simulações de DM com o complexo *MtKatG* sugerem que o mecanismo de resistência a INH (CIM de valores iguais ou maiores que 32 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) estão relacionados a substituições dos resíduos no domínio N-terminal da proteína por outros com cadeias laterais maiores (efeitos estéricos) e não a modificações nas cargas ou cargas parciais destes substituintes (efeitos eletrostáticos). A Ser315 é um ponto-chave na resistência, este resíduo está localizado no canal de acesso ao sítio catalítico no qual passa a INH, de modo que mutações neste local causam um impedimento estérico a passagem de ligantes maiores que o substrato natural da enzima, o H_2O_2 . Substituições por resíduos menores que a Ser315 ou levemente maiores promovem uma resistência menos dramática (CIM de 8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ou 16 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), uma vez que estes ocupam menor espaço no sítio catalítico. As mutações em resíduos localizados em outras regiões da molécula podem afetar a interação da INH com o heme indiretamente, promovendo mudanças estéricas que se propagam ao longo da cadeia principal da proteína afetando o sítio catalítico, por distorcer a geometria do heme ou por modificações no volume do sítio de ligação, levando à baixa ativação da INH.

Conclusões: As informações obtidas a partir do estudo dos modelos tridimensionais da enzima AlaR de *V. cholerae* e *S.aureus* MRSA cepa Mu50 ligados ao 4AX não haviam anteriormente sido obtidas por métodos experimentais. A metodologia de *docking* comparativo, utilizando diferentes programas para a triagem por VS da mesma biblioteca, permitiram a seleção de 22 candidatos à inibidores com potencial para auxiliarem no desenvolvimento de novos fármacos. Os compostos selecionados através da VS poderão, ainda, serem utilizados futuramente em investigações da cinética enzimática da enzima AlaR isolada, o que poderá ser fundamental para comprovar sua atividade *In vitro*, como sugerido pelas metodologias *In silico*. Os resultados do estudo das mutações na *MtKatG* mostraram que o mecanismo de resistência está relacionado a modificações estereoquímicas no domínio N-terminal da proteína, que restringem o acesso da INH ao seu sítio catalítico, não envolvendo mecanismos de natureza eletrostática. Estes resultados mostram *insights* que podem levar a descoberta de novos fármacos contra agentes causadores de doenças de grande importância em saúde pública atualmente.

Palavras-Chave: Alanina Racemase; MRSA; *Vibrio cholerae*; *Mycobacterium tuberculosis*; Catalase-peroxidase; Isoniazida; Resistência à antibióticos.

GENERAL ABSTRACT

Introduction: Currently resistant or multiresistant bacteria, both Gram-positive and Gram-negative are responsible for serious infections difficult or even intractable by available antimicrobials. *Staphylococcus aureus* MRSA is one of the leading causes of infections, especially in hospital infections worldwide, and is ranked as a priority priority for antibiotic resistant pathogens of the World Health Organization as a high priority for research, discovery and development of drugs. *Vibrio cholerae*, Gram-negative bacillus responsible for cholera is a pathogen that colonizes the human intestine producing the cholera toxin that causes an acute diarrheal infection, transmitted by the ingestion of water and foods contaminated with this bacterium. As an environmental microorganism, *V. cholerae* is able to acquire resistance genes through direct contact with intrinsically resistant environmental bacteria through mobile genetic elements, and to share resistance characteristics with commensal microorganisms or other enteric pathogens, complicating the treatment of several other infections. In this context, alanine racemase (AlaR), an enzyme of the isomerase family and dependent of the cofactor pyridoxal 5'-phosphate (PLP) that catalyzes the reversible racemization of L-alanine in D-alanine, may be an excellent target for the development of new selective-action drugs. This enzyme is present in bacteria, but is absent in humans and is rare in eukaryotes. Currently, the only inhibitor for the clinically utilized against AlaR enzyme is D-cycloserine (D-4-amino-isoxazolidone) (4AX), a cyclic structural analogue of D-alanine applied as second line treatment against *Mycobacterium tuberculosis*. However, like other AlaR inhibitors described, it presents the problem of lack of specificity to the enzyme, causing side effects arising from the inhibition of other PLP-dependent enzymes. Factors that highlight the need for the search for compounds that present higher specificity, which can translate into a lower toxicity to humans. Therefore, homology modeling, as well as docking and virtual screening (VS) of compounds, can be important tools to aid in the search for new specific inhibitors against AlaR, mainly for the possibility of solving three-dimensional structures of this enzyme of *V. cholerae* and *S. aureus* MRSA strain Mu50, which were not previously obtained by experimental methods such as X-ray diffraction or nuclear magnetic resonance (NMR), providing the information necessary for the search for compounds that present antimicrobial activity to be further tested *In vitro*. Already tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by the *M. tuberculosis* bacillus. Currently the recommended treatment for drug-susceptible TB consists of 6 months of antibiotic therapy with four first-line drugs: isoniazid (INH), always in combination with other antibiotics such as rifampicin, ethambutol and pyrazinamide. The INH or isonicotinic acid hydrazide is the oldest synthetic drug effective against TB and one of the leading first-line antibiotics in the treatment of the disease and has been recognized since 1952 as a potent agent against *M. tuberculosis*. It is considered a prodrug, which targets *M. tuberculosis* catalase peroxidase (KatG), and needs to be converted into an intracellular active metabolite by the enzyme. Drug resistance associated with *M. tuberculosis* is usually caused by spontaneous mutations in the bacterial genome, unlike other microorganisms that occur as a result of horizontal gene transfer. Mutations associated with INH resistance are linked to at least five bacterial genes, most commonly the *katG* gene encoding the KatG enzyme, reducing its activity or even preventing the conversion of the prodrug into its active metabolite. In previous studies with Brazilian clinical isolates of INH-resistant *M. tuberculosis*, different mutations in the *katG* gene were determined by molecular identification studies and correlated with drug resistance through MIC assays. However, little is known about the structural mechanisms that involve the resistance associated with these mutations. Thus, Molecular Dynamics (DM) is a tool that allows predicting the effects of point mutations on the structure of the KatG protein over time, in

simulations at the microscopic level, which can provide, through appropriate calculations, an estimate of the affinity of the INH with the enzyme. **Objectives:** The objectives of these studies were to determine the three-dimensional structures of the enzyme Alanine Racemase of *V. cholerae* and *S. aureus* strain Mu50/ATCC700699 bounded to the cofactor (PLP) and to the 4AX inhibitor by the homology modeling method, for use in virtual screening techniques and docking of inhibitors. As well as the investigation of the effect of point mutations detected in INH resistant *M. tuberculosis* clinical isolates on the structural coordinates of *M. tuberculosis* KatG H₃₇Rv (ATCC25618) by means of simulations of DM on this protein bonded to INH. A better understanding of this mechanism may lead to the development of more effective drugs capable of bypassing resistance. **Methodology:** The sequences of *V. cholerae* AlaR (*Vcholerae*AR) complexed to the L-alanine substrate and to the PLP cofactor and AlaR-1 of *S. aureus* strain Mu50/ATCC700699 (*Saureus*AR1) in their apo form from the Uniprot database (Uniprot Q9KUY6 and P63479) as well as their 2RJH and 4A3Q molds from Protein Data Bank (PDB) served as the basis for the alignment and homodimer structure, bound to the cofactor Pyridoxal 5'-phosphate (PLP) and 4AX from the structure of the 1XQL PDB using the Modeller software (V.9.13). The best of the 1000 generated models was totally minimized through the NAMD2 program package and later used in molecular dynamics and docking simulations. The VS of both AlaR was made from three libraries assembled with structures from the ZINC database, containing approximately 306,000 compounds. *In vitro* tests of minimum inhibitory concentration (MIC) using broth microdilution methodology in Gram-negative bacteria, including *V.cholerae* ATCC9459 and eight other standard cultures of *S. aureus* (ATCC23235, ATCC43300; ATCC29523; ATCC19095; ATCC14458 ; ATCC13565; ATCC27664; ATCC BAA1707). The assays were carried out at the concentrations of 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 and 1 µg.mL⁻¹, using 10 of the compounds selected by means of VS (Ar1, Ar2, Ar5, VcAr30, VcAr31, VcAr32, VcAr33, VcAr34, VcAr35 and VcAr36), in addition to the known inhibitor 1-aminoethylphosphonic acid (AEF or VcAr10), thiazolidinone and 4AX, for comparative purposes. In addition, MIC assays were performed including EDTA (ethylenediaminetetracetic acid) in combination or not with Tris (2-Amino-2-hydroxymethylpropane-1,3-diol) buffer and the compounds selected by means of the VS. The native structure of the *M. tuberculosis* KatG protein H₃₇RV (ATCC25618, Uniprot: P9WIE5) bonded to the prosthetic group heme (*Mt*KatG) was obtained from the PDB (PDBid: 1SJ2), the only coordinate available in its native form. The water molecules were removed and the INH, sodium chloride (CLA) and sodium (SOD) were inserted by means of geometric docking in both subunits, as they appear in KatG of *Burkholderia pseudomallei* (PDBid: 4KWQ). The secondary structure diagram was prepared using the PDBSum web server. The evaluated point mutations detected in brazilian isolates, Ala109Val, Ser315Thr, Ser315Arg, Ser315Ile, Ser315Asn, Pro232Arg, Gly273Cys and Ser315Gly, as well as the double mutation His97Arg + Lys200Glu, were constructed in the spatial coordinates of the native structure by means of the Coot-0.7.2 program and the cavity that forms the INH binding site, located between the protein and the heme group, had its volume and area monitored along the DM by means the MDPocket program. DM simulation was performed using the NAMD2 program package. **Results and Discussion:** Analysis of the contact frequency of active site residues from both chains of the protein with 4AX resulted in residues Arg128, Met301 and Tyr341 in *Vcholerae*AR and residues Arg137, Met311 and Tyr283 in *Saureus*AR1 as the most important for the stabilization of the ligand at the active site. The DM simulations of the *Vcholerae*AR and *Saureus*AR1 complexes were performed for the time of 50 ns for their apo forms and complexed with the 4AX ligand. The rmsd values throughout the simulation showed that both complexes reached the thermodynamic equilibrium in the last 10 ns. However, there was less oscillation when complexed with 4AX than in the apo form, which

suggests that the ligands are important for the stabilization of the homodimer structure. The results of the R_{gyr} calculations of the main chain atoms showed that in both complexes there was a small volume expansion throughout the simulation. Since in *Vcholerae*AR this volume stabilized from 20 ns and in *Saureus*AR1 from the 10 ns of simulation. The VS resulted in 22 candidates for inhibitors for *Vcholerae*AR and *Saureus*AR1 in common between the two AlaRs, from which 10 were acquired for MIC assays. None of the compounds tested showed inhibitory activity, even when tested in combination with EDTA, Tris or EDTA-Tris. This can be explained based on the chemical structure of the compounds compared to the known inhibitor AEF, which also has no activity since it is an active product of the hydrolysis of alaphosphin, a compound that needs specific transporters to enter the bacterial cell. In addition, these compounds have a charge at pH 7.0, which makes their passage through the plasmatic membrane even more difficult. The results of the DM simulations with the *MtKatG* complex suggest that the mechanism of resistance to INH (MICs of values equal to or greater than 32 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) are related to substitutions of residues in the N-terminal domain of the protein by others with chains (steric effects) and not to modifications in the loads or partial loads of these substituents (electrostatic effects). Ser315 is a strategic point in resistance, this residue is located in the channel of access to the catalytic site in which INH is passed, so that mutations at this site cause a steric hindrance to pass through ligands larger than the enzyme's natural substrate, H_2O_2 . Substitutions for smaller residues than Ser315 or slightly larger ones promote a less dramatic resistance (MIC of 8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ or 16 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), since these occupy less space at the catalytic site. Substitutions for smaller residues than Ser315 or slightly larger ones promote a less dramatic resistance (MIC of 8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ or 16 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), since these occupy less space at the catalytic site. Mutations in residues located in other regions of the molecule may affect the interaction of INH with heme indirectly, promoting steric changes that propagate along the major chain of the protein affecting the catalytic site, by distorting heme geometry or by changes in volume of the binding site, leading to low INH activation.

Conclusions: The information obtained from the study of three-dimensional models of the AlaR enzyme of *V. cholerae* and *S. aureus* MRSA strain Mu50 bounded to 4AX had not previously been obtained by experimental methods. The comparative docking methodology, using different programs for the VS of the same library, allowed the selection of 22 candidates to the inhibitors with potential to aid in the development of new drugs. The compounds selected through VS may also be used in future investigations of the enzymatic kinetics of the isolated AlaR enzyme, which may be essential to prove their *In vitro* activity, as suggested by the *In silico* methodologies. The results of the study of mutations in *MtKatG* showed that the mechanism of resistance is related to steric modifications in the N-terminal domain of the protein, which restrict the access of INH to its catalytic site, not involving mechanisms of an electrostatic nature. These results show insights that may lead to the discovery of new drugs against agents of major diseases in public health today.

Keywords: Alanine Racemase; MRSA; *Vibrio cholerae*; *Mycobacterium tuberculosis*; Catalase-peroxidase; Isoniazid; Drug resistance.

Sumário Geral

Artigo 1

MODELAGEM POR HOMOLOGIA DA ENZIMA ALANINA RACEMASE DE *V. cholerae* E DE *Staphylococcus aureus* MRSA cepa Mu50 COMPLEXADAS COM LIGANTES: SIMULAÇÕES DE ANCORAGEM E DINÂMICA MOLECULAR

1 Introdução.....	18
2 Objetivo	21
3 Material e Métodos.....	21
4 Resultados e Discussão.....	25
5 Conclusões.....	32
6 Referências	33

Artigo 2

MUTATIONS IN CATALASE-PEROXIDASE KatG FROM ISONIAZID RESISTANT *Mycobacterium tuberculosis* CLINICAL ISOLATES: INSIGHTS FROM MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS

Introduction.....	39
Materials and methods	40
Results and discussion.....	40
Conclusions.....	43
References.....	44
Material Suplementar - Artigo 2.....	45

OUTRAS PRODUÇÕES EM AUTORIA OU CO-AUTORIA REALIZADAS DURANTE O DOUTORADO	49
OUTRAS PRODUÇÕES EM CO-AUTORIA SUBMETIDAS DURANTE O DOUTORADO.....	65

MODELAGEM POR HOMOLOGIA DA ENZIMA ALANINA RACEMASE DE *V. cholerae* E DE *Staphylococcus aureus* MRSA cepa Mu50 COMPLEXADAS COM LIGANTES: SIMULAÇÕES DE ANCORAGEM E DINÂMICA MOLECULAR

Arethusa Lobo Pimentel¹; Flávio Augusto Vicente Seixas².

¹Doutoranda do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá.

²Professor Associado do Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá.

*Autor para correspondência:

favseixas@uem.br

Laboratório de Bioquímica Estrutural

Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Bloco I89

Av. Colombo, 5.790, Maringá, PR, Brasil, CEP 87020-900

Fone: +55 44 36219337

Resumo: O objetivo deste estudo foi a determinação das estruturas tridimensionais da enzima Alanina Racemase de *Vibrio cholerae* e de *Staphylococcus aureus* cepa Mu50/ATCC700699 ligadas ao cofator (PLP) e ao inibidor D-cicloserina (4AX) pelo método de modelagem por homologia, para sua utilização em técnicas de varredura virtual e ancoragem (*docking*) de inibidores. As sequências da AlaR de *V. cholerae* (*VcholeraeAR*) complexada ao substrato L-alanina e ao cofator PLP e da AlaR-1 de *S. aureus* cepa Mu50/ATCC700699 (*SaureusAR1*) em sua forma apo provenientes da base de dados *Uniprot* (Uniprot Q9KUY6 e P63479), assim como seus moldes 2RJH e 4A3Q do *Protein Data Bank* (PDB) serviram de base para o alinhamento para a obtenção da estrutura dos homodímeros, PLP e a 4AX, proveniente da estrutura do PDB 1XQL, utilizando o software Modeller. O melhor dos 1000 modelos gerados foi totalmente minimizado por meio do pacote de programas NAMD e posteriormente utilizado em simulações de dinâmica e ancoragem molecular. As informações obtidas a partir do estudo dos modelos tridimensionais da enzima AlaR de *V. cholerae* e *S.aureus* MRSA cepa Mu50 não haviam anteriormente sido obtidas por métodos experimentais. A metodologia de *docking* comparativo, utilizando diferentes programas para a triagem por VS da mesma biblioteca, conduziram a seleção de 22 candidatos à inibidores com potencial para auxiliarem no desenvolvimento de novos fármacos. Os compostos selecionados através da VS poderão, ainda, ser utilizados futuramente em investigações da cinética enzimática da enzima AlaR isolada, o que poderá ser fundamental para comprovar sua atividade *In vitro*, como observado no estudo *In silico*.

Palavras-Chave: Ancoragem Molecular; Varredura Virtual; Bioinformática; Bactéria Multiresistente; Concentração Inibitória Mínima (CIM); Resistência à antibióticos.

Abstract: The objective of this study was to determine the three-dimensional structures of the enzyme Alanine Racemase of *Vibrio cholerae* and *Staphylococcus aureus* strain Mu50/ATCC700699 bounded to the cofactor (PLP) and the D-cycloserine inhibitor (4AX) by the homology modeling method, for its use in docking and virtual screening techniques of search inhibitors. The *V. cholerae* AlaR sequences (*VcholeraeAR*) complexed to the L-alanine substrate and to the PLP cofactor and the AlaR-1 of *S. aureus* strain Mu50/ATCC700699 (*SaureusAR1*) in their apo form from the Uniprot database (Uniprot Q9KUY6 and P63479) as well as their 2RJH and 4A3Q templates from Protein Data Bank (PDB) served as the basis for alignment to obtain the homodimer, PLP and 4AX structure from the 1XQL PDB structure using Modeller software. The best of the 1000 generated models was totally minimized through the NAMD program package and later used in molecular dynamics and anchorage simulations. The information obtained from the study of the three-dimensional models of the AlaR enzyme of *V. cholerae* and MRSA *S. aureus* strain Mu50 had not previously been obtained by experimental methods. The comparative docking methodology, using different programs for VS of the same library, led to the selection of 22 candidate inhibitors with potential to aid in the development of new drugs. The compounds selected through VS may also be used in future investigations of the enzymatic kinetics of AlaR enzyme alone, which may be essential to prove their *In vitro* activity, as observed in *silico* study.

Keywords: Docking; Virtual Screening; Bioinformatics; Multiresistant Bacteria; Minimum Inhibitory Concentration (MIC); Drug resistance.

1 Introdução

As infecções causadas por microrganismos resistentes e multirresistentes são atualmente uma das maiores ameaças à saúde pública e segurança alimentar em todo o mundo, sendo associadas altas taxas de morbidade e mortalidade (Who, 2018). Entre as principais causas do desenvolvimento da resistência está o uso inadequado dos antimicrobianos o que é, pelo menos parcialmente responsável pelo desenvolvimento de graves infecções por *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), enterococos resistentes à vancomicina, *Enterobacteriaceae* produtora de β -lactamase de espectro estendido (ESBL) entre outros agentes infecciosos importantes (Habboush e Guzman, 2018).

A Organização Mundial de Saúde, divulgou em recente publicação a lista global de prioridade de patógenos resistentes à antibióticos (WHO-PLL) para orientar a pesquisa, descoberta e desenvolvimento de fármacos. Os microrganismos de relevância foram agrupados em níveis de prioridade e *S. aureus* MRSA, *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina (VISA) e *S. aureus* resistente à vancomicina (VRSA) foram classificados como de alta prioridade (nível 2) (Who, 2017). *S. aureus* é, ainda, uma das principais causas de infecções hospitalares em todo o mundo. É uma bactéria comensal humana envolvida em diversas patologias, desde pequenas infecções dermatológicas até doenças graves como a pneumonia, endocardite, meningite ou sepse. O surgimento dos primeiros microrganismos resistentes à penicilina apenas alguns anos após o seu descobrimento na década de 1940, seguido da disseminação das cepas resistentes à penicilinas, entre as quais a meticilina, macrolídeos, tetraciclina, aminoglicosídeos e, recentemente, glicopeptídeos, transformaram a terapia de infecções estafilocócicas em um desafio global. A resistência aos glicopeptídeos em *S. aureus* consiste também em um grande problema devido aos altos custos, pois, especialmente em hospitais, tal classe de antibióticos e, em particular à vancomicina, se tornaram um dos únicos recursos para combater infecções causadas por cepas MRSA (Spagnolo *et al.*, 2014).

O *V. Cholerae* é uma bactéria que coloniza o intestino humano e multiplica-se rapidamente produzindo a toxina colérica, uma enterotoxina responsável pela diarreia aguda característica da doença. Sobretudo, se o indivíduo infectado não for rapidamente tratado o óbito pode ocorrer em poucas horas, devido à desidratação (Ruiz-Moreno *et al.*, 2010). A cólera afeta principalmente populações dos países em desenvolvimento, sem acesso a recursos adequados de tratamento da água e saneamento básico. A infecção é causada principalmente pela ingestão de alimentos ou água contaminados com a bactéria *Vibrio cholerae* O1 ou

O139. No entanto, muitos indivíduos infectados são assintomáticos ou apresentam sintomas muito leves, o que é outra importante fonte de infecção (King *et al.*, 2008). Esta doença negligenciada constitui em uma ameaça global à saúde pública, pois é um indicador-chave da falta de desenvolvimento social. O ressurgimento da cólera foi observado paralelamente ao aumento expressivo das populações vulneráveis que vivem em condições insalubres (Who, 2016).

Os antibióticos não são necessários para resolver os sintomas da cólera e não podem ser o único tratamento para a doença. Mas existem vantagens em se combinar a terapia de reidratação oral com a antibioticoterapia, que pode ser administrada para diminuir o tempo de duração da doença, além de reduzir a disseminação do *V. cholerae* através das fezes das pessoas infectadas, podendo amenizar a gravidade dos sintomas pela redução do volume de diarreia e, portanto, a quantidade de fluidos necessários para manter a hidratação (Nelson *et al.*, 2011). Isso é especialmente importante nos países onde o acesso à água potável é limitado e as soluções de reidratação oral escassas (Kitaoka *et al.*, 2011). Os antibióticos eficazes no tratamento da cólera incluem a doxiciclina, ciprofloxacina e azitromicina, desde que a bactéria seja sensível à atuação destes (Nelson *et al.*, 2011). Contudo, tais fármacos não são criteriosamente utilizados como parte do regime de tratamento da cólera e o número de cepas patogênicas resistentes a um ou mais antibióticos está aumentando. Além disso, o *V. cholerae* possui meios para adquirir genes de resistência pelo contato direto com bactérias ambientais intrinsecamente resistentes (Martínez, 2008). Em contrapartida, o *V. cholerae* pode compartilhar tais características de resistência com microrganismos comensais ou outros patógenos entéricos do paciente infectado, complicando o tratamento de várias outras infecções (Kitaoka *et al.*, 2011).

Diante da gravidade dos problemas causados pela resistência aos antibióticos atualmente disponíveis, observada tanto para *S.aureus* quanto para *V. cholerae*, se torna imprescindível o desenvolvimento de estratégias alternativas e novas abordagens na gestão das doenças causadas por tais patógenos, com perspectivas que envolvam os aspectos individuais da infecção e, principalmente, com terapias mais específicas contra estes microrganismos. Neste contexto, a alanina racemase (AlaR) (EC 5.1.1.1), uma enzima da família das isomerases dependente do cofator piridoxal 5'-fosfato (PLP) que catalisa a racemização reversível de L-alanina em D-alanina, pode ser um excelente alvo para o desenvolvimento de novas drogas de ação seletiva (Walsh, 1989). Esta enzima está presente nas bactérias, mas ausente em seres humanos e é rara em eucariotos, com exceções que incluem os fungos *Tolyocladium niveum*, *Cochliobolus carbonum* (Hoffmann *et al.*, 1994;

Cheng e Walton, 2000) e o molusco bivalve *Corbicula japonica* (Nomura *et al.*, 2001). A AlaR é a enzima inicial na via da alanina para a biossíntese de difosfato de uridina (UDP)-*N*-acetil-murâmico (MurNAc)-pentapeptídeo. Este nucleotídeo e UDP-*N*-acetilglucosamina são precursores do peptidoglicano, uma estrutura heteropolimérica encontrada nas paredes de células bacterianas. Como a D-alanina é um componente essencial do peptidoglicano da parede celular bacteriana, a inibição da AlaR é letal para os organismos procariontes que são dependentes desta enzima (Lambert e Neuhaus, 1972; Lam *et al.*, 2009).

Atualmente, o único inibidor da AlaR comercializado clinicamente é a D-cicloserina (D-4-amino-isoxazolidona) (4AX), um análogo estrutural cíclico da D-alanina. É um agente de segunda escolha utilizado no tratamento da tuberculose contra a infecção pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* resistente a múltiplos fármacos (Golan *et al.*, 2009). Embora a 4AX tenha notáveis efeitos como inibidor do crescimento da *M. tuberculosis*, seus efeitos secundários têm limitado seu uso (Mustata e Briggs, 2002). Os efeitos adversos incluem convulsões, síndromes neurológicas, como neuropatia periférica e psicose (Golan *et al.*, 2009), sintomas estes que, parecem resultar da inibição de enzimas humanas que também utilizam o PLP como cofator (Lambert e Neuhaus, 1972; Kim *et al.*, 2003). Outros inibidores que não são utilizados clinicamente, tais como o fosfonato de alanina e o propionato de alanina, que também têm como alvo o PLP, apresentam o problema comum, a falta de especificidade (Stamper *et al.*, 1998; Morollo *et al.*, 1999). Tais aspectos realçam a necessidade do desenvolvimento de inibidores da AlaR que apresentem maior especificidade, o que pode se traduzir em uma menor toxicidade de tais compostos aos seres humanos.

Neste sentido, as metodologias computacionais tornaram-se ferramentas fundamentais em muitos estudos direcionados para descoberta de fármacos. Os avanços das técnicas *in silico* de modelagem, dinâmica molecular (DM), ancoragem e varredura virtual (VS) de compostos com potencial terapêutico, como novos e eficientes algoritmos de busca e ranqueamento, podem ser poderosas ferramentas para auxiliar na diminuição considerável do tempo e dos custos no ciclo do desenvolvimento de novas drogas (Cheng *et al.*, 2012). As técnicas de VS, sem dúvida, mudaram e melhoraram este processo, sendo estabelecidas como uma das mais promissoras metodologias *in silico* disponíveis para este fim, por permitir a busca de candidatos em bancos de dados com milhares ou até milhões de pequenas moléculas, aplicando-se métodos de triagem e seleção com maior correspondência com a estrutura-alvo específica, o que se traduz em maior eficiência, com a diminuição dos custos e menor tempo dedicado ao desenvolvimento dos estudos pré-clínicos (Kumar e Zhang, 2018).

2 Objetivo

O objetivo deste estudo foi a determinação *In silico* da estrutura tridimensional da enzima Alanina Racemase (AlaR) de uma bactéria Gram-negativa, *Vibrio cholerae* e de uma bactéria Gram-positiva, *Staphylococcus aureus* cepa Mu50/ATCC700699, ligadas ao cofator (PLP) e ao inibidor 4AX pelo método de modelagem por homologia. Bem como a utilização destas estruturas em técnicas de varredura virtual (VS) e ancoragem (*docking*) para a descoberta de inibidores em comum entre ambas as AlaR. As possíveis atividades inibitórias foram testadas *In vitro* através de ensaios de concentração inibitória mínima (CIM).

3 Material e Métodos

A estrutura tridimensional da AlaR de *V. cholerae* O1 depositada no Protein Data Bank (PDBid: 2RJH) foi utilizada como molde para a modelagem de *VcholeraeAR* (uniprot A9KUY6) complexada ao substrato L-alanina e ao cofator PLP (Wu *et al.*, 2008), selecionada por ser a de maior incidência no Brasil (Leal *et al.*, 2008). Para a modelagem da Alanina Racemase-1 de *S. aureus* cepa Mu50/ATCC700699, *SaureusAR1* (Uniprot P63479) foi utilizada a estrutura obtida no PDB (PDBid: 4A3Q) em sua forma apo (livre) (Scaletti *et al.*, 2012). Esta estrutura apresenta ausência de regiões importantes do sítio ativo que não foram anteriormente determinadas, devido à falta de densidade eletrônica nos experimentos de difração de raios-X. Tais regiões incompletas foram modeladas *in silico*.

A modelagem de ambas as estruturas tridimensionais de AlaR foi realizada por meio do programa Modeller v.9.13 (Eswar *et al.*, 2006). Foram gerados modelos na forma apo (sem ligante nem cofator) e PLP-4AX (complexada com o cofator e com o ligante D-Cicloserina, ZINC34676244). Para cada forma, foram gerados 1.000 modelos. Destes, foram escolhidos os melhores, com base nos parâmetros internos de ranqueamento do programa Modeller, levando-se consideração a qualidade estereoquímica avaliada por meio do programa Procheck (Collaborative Computational Project, 1994). A partir dos modelos selecionados, foram gerados novos 500 e em seguida reavaliados. As unidades biológicas de *VcholeraeAR* e *SaureusAR1* foram modeladas com restrição de simetria aplicada aos C α das duas cadeias de cada proteína. As ligações entre Lys33 e o PLP358 da cadeia “A” e a Lys392 e o PLP717 da cadeia “B”, além da aplicação de uma restrição de distância de 1,5 Å entre o NH₃ da Lys e o C14 do PLP para *VcholeraeAR*. Em *SaureusAR1* as ligações entre Lys38 e o PLP382 da cadeia “A” e a Lys424 e o PLP768 da cadeia “B”, com uma restrição de distância de 1,6 Å entre Lys e PLP.

As unidades biológicas de *Vcholerae*AR e *Saureus*AR1 foram submetidas a 30.000 passos de minimização de energia pelo método de Gradiente Conjugado (CG) para o refinamento do modelo, passo necessário para a correção de possíveis colisões estereoquímicas entre os átomos da proteína e do ligante. Para isso, foi utilizado o pacote de programas VMD/NAMD2 (Phillips *et al.*, 2005) para dinâmica e visualização das estruturas, onde ambos os complexos foram imersos em uma caixa periódica contendo água TIP3 com as extremidades a pelo menos 10 Å de distância da superfície mais externa da molécula e com íons Na⁺ ou Cl⁻ em quantidade suficiente para neutralização das cargas do sistema, temperatura de 300K, 1 atm de pressão e pH 7.0. Foi utilizado o campo de força Charmm C35b2-C36a2 (Mackerell, 2004) para os resíduos da proteína, enquanto que o campo de força dos ligantes foram gerados no mesmo formato pelo servidor SwissParam (Zoete *et al.*, 2011). A ligação aldimina (covalente) entre a Lys e o PLP foi parametrizada pelo método B3LYP/6-31G* do programa Orca. As estruturas finais minimizadas de cada um dos complexos serviram de parâmetro de entrada para as simulações de ancoragem e dinâmica molecular.

As estruturas de *Vcholerae*AR e *Saureus*AR1 minimizadas foram utilizadas nas simulações de re-ancoragem (*redocking*) para validar o protocolo utilizado posteriormente na varredura virtual (VS). Foram utilizados os programas Autodock, implementado na interface gráfica do Pyrx-0.9 (Wolf, 2009) e o Molegro virtual docker 6.0 (Thomsen e Christensen, 2006), que utilizam diferentes algoritmos em sua execução. No programa Autodock foi utilizado o algoritmo padrão de busca e ranqueamento com centro e tamanho da caixa determinados a partir das coordenadas do ligante, 4AX. No programa Molegro, foram testadas combinações dos algoritmos de busca e ranqueamento, tendo o centro de busca a partir de uma esfera, cujo raio parte do ligante modelado. Em ambos os programas o protocolo foi considerado validado para cada um dos complexos quando houve reprodutibilidade dos resultados na ancoragem do ligante modelado, obtendo-se um valor de raiz quadrada média da distância (rmsd) menor que 1.0 Å.

As bibliotecas de novos candidatos a inibidores da enzima AlaR de *V.cholerae* e *S.aureus* foi montada de três maneiras diferentes: (1) a partir de moléculas semelhantes aos inibidores conhecidos desta enzima reportados na literatura. Para encontrar candidatos nas bases de dados foi utilizado o coeficiente de Tanimoto com no mínimo 80% de similaridade estrutural. Além disso, foi utilizado o filtro “*purchasable*” para que fossem testados somente compostos que pudessem ser adquiridos dos fornecedores. As estruturas de todos os compostos foram obtidas a partir da base de dados de acesso público *Zinc Database* (<http://zinc.docking.org/>). (2) A segunda biblioteca foi a de Produtos Naturais disponível na *Zinc Database* (Irwin *et al.*, 2005). (3) Também foram utilizados catálogos de compostos de

empresas específicas, como a *Sigma-Aldrich* e *Acros Organics*. Além das bibliotecas obtidas a partir das bases de dados, foi incluída na biblioteca a tiazolidinona (TDZD-8, ZINC 27361), descrita como potente inibidor contra AlaR de *S. aureus* MRSA (Ciustea *et al.*, 2012). Todas as estruturas selecionadas foram baixadas no formato *.sdf e utilizadas no processo de *docking* molecular.

No *docking* molecular realizado utilizando os softwares AutoDock 4.2.3 e *Molegro Virtual Docker* 6.0 através do protocolo validado no *redocking*, a partir das estruturas modeladas de *VcholeraeAR* e *SaureusAR1*, foi possível testar a ligação dos candidatos à inibidores obtidos a partir das bases de dados. Os melhores candidatos foram selecionados levando-se em consideração o mais baixo valor de rmsd, bem como o melhor *score* do software, obtidos por meio dos diferentes programas de avaliação utilizados. Uma vez selecionado pelo processo de ancoragem como potencial inibidor para *VcholeraeAR* e *SaureusAR1* outros parâmetros foram analisados para avaliar a qualidade do possível fármaco, como as regras de Lipinski e os critérios ADMETox (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade), com auxílio do servidor Osiris Property Explorer (<https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>).

As estruturas de *VcholeraeAR* e *SaureusAR1* finais minimizadas serviram como parâmetros de entrada para a dinâmica molecular, realizada por meio do programa NAMD2, utilizando os campos de força descritos anteriormente. As simulações foram realizadas pelo tempo de 50 ns em condições de temperatura de 300K, pressão de 1 atm, com todos os resíduos ionizáveis ajustados para seu grau de protonação em pH 7,0. As simulações foram analisadas a partir dos seus arquivos de trajetória, em termos de raiz quadrada média da distância entre os átomos (rmsd) e seu raio de giro (R_{gyr}), a partir dos resíduos da cadeia principal da proteína de ambas as AlaR e tendo a estrutura inicial minimizada como referência. A análise da raiz quadrada média da flutuação dos carbonos α de cada resíduo (rmsf), bem como a frequência de contatos dos resíduos da proteína com o ligante foram realizadas a partir da região de equilíbrio termodinâmico (últimos 5 ns). Todas as simulações de DM foram realizadas em quatro nós de um sistema SGI Altix ICE 8400 LX composto por dois processadores Intel Six Core 5680 de 3.33GHz (48 núcleos) e 36GB de RAM disponível no Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho (CENAPAD) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

Todos os testes *In vitro* foram realizados no Laboratório de Microbiologia Animal do Departamento de Medicina Veterinária (Centro de Ciências Agrárias) sob coordenação da Prof. Dra. Sheila Rezler Wosiacki e no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do

Departamento de Tecnologia (Centro de Tecnologia) sob coordenação da Prof. Dra. Cristiane Mengue Feniman Moritz, do Campus de Regional de Umuarama da Universidade Estadual de Maringá. Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados utilizando o método de microdiluição em caldo para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) (Clsi, 2014), utilizando cepas padrão da American *Type Culture Collection* (ATCC), gentilmente cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Foram utilizadas as bactérias Gram-negativas, incluindo *V. cholerae* ATCC9459, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhi ATCC19214, *S. enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhimurium ATCC13313, *Shigella flexneri* ATCC12022, *S. dysenteriae* ATCC13313, *Escherichia coli* ATCC25922, *E. coli* ATCC11229, *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603, além das cepas Gram-positivas de *Staphylococcus aureus* ATCC23235, *S. aureus* ATCC43300, *S. aureus* ATCC29523, *S. aureus* ATCC19095, *S. aureus* ATCC14458, *S. aureus* ATCC13565, *S. aureus* ATCC27664, *S. aureus* ATCC BAA1707. Foram testados os compostos Ar1 (4-(3-Nitro-phenyl)-4,5,6,7-tetrahydro-3H-imidazo[4,5-c]pyridine-6-carboxylic acid), Ar2 (8-carbamoil-6,7,8,9-tetrahydro-5H-carbazole-1-carboxylic), Ar5 (3-Amino-3-(3-phenoxyphenyl)propanoic acid) (InterBioScreen®), VcAr30 (D, L-Buthionine), VcAr31 (amino(5-chloro-2-methoxyphenyl) acetic acid), VcAr32 ((2R)-2-amino-3-(2-aminoethylsulfanyl) propanoic acid), VcAr33 ((S)-4-fluorofenilglicine), VcAr34 (DL-Methionine sulfoxide), VcAr35 (2-Amino-3-cyclopropylpropanoic acid), VcAr36 (1-aminocyclobutanecarboxylic acid), além do Ácido 1-aminoetilfosfônico (VcAr10), D-cicloserina e Tiazolidinona (4-Benzyl-2-methyl-1,2,4-thiadiazolidine-3,5-dione) (Sigma-Aldrich®), nas concentrações de 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 e 1 µg.mL⁻¹. Também foram realizados ensaios em associação com o EDTA (ácido etilenodiaminotetracético, Synt®) em combinação ou não com tampão Tris (2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol, Invitrogen®). Todas as culturas foram ativadas em caldo TSB (*Tryptic Soy Broth*) (Himedia®) e incubadas a 37°C por um período de 18 a 24h. Em seguida os inóculos bacterianos foram padronizados em solução salina 0,9% estéril na escala visual 0,5 de MacFarland, obtendo-se uma suspensão bacteriana de aproximadamente 1,0×10⁸ UFC.mL⁻¹. Após a padronização, foi realizada uma diluição 1:100 em Caldo Müeller-Hinton (Himedia®) obtendo-se uma concentração bacteriana de aproximadamente 5×10⁵ UFC.mL⁻¹ em concentrações finais de 100 µL por poço. A leitura da CIM foi realizada, após um período de incubação mínimo de 20 e máximo 24 horas em BOD à 37°C, com auxílio do indicador Tetrazólio (*Triphenyl tetrazolium chloride*, Inlab), onde mostrou-se incolor como negativo e róseo/vermelho como positivo para o crescimento bacteriano.

4 Resultados e Discussão

A D-cicloserina (4AX) é o único inibidor específico para a enzima AlaR clinicamente utilizado atualmente (Azam e Jayaram, 2016). A modelagem da 4AX ligada à AlaR teve como objetivo a visualização dos finos detalhes estruturais da interação do ligante com os sítios ativos da enzima, além de servir como um guia para a adequada orientação nos estudos de ancoragem com outros possíveis inibidores. Os procedimentos de minimização da DM garantem que o sítio de ligação do inibidor esteja estereoquimicamente adaptado à presença do ligante, bem como o ligante também esteja satisfatoriamente adaptado ao sítio ativo da enzima, de modo a conduzir o complexo à conformação mais estável de baixa energia, condição necessária para os estudos de ancoragem molecular (Dias *et al.*, 2008). A unidade biológica da AlaR possui dois sítios ativos, ambos compostos de resíduos do domínio N-terminal de um monômero e resíduos do domínio C-terminal do segundo monômero, de forma que estes dois monômeros contribuam como porta de entrada e sítio ativo da enzima. Cada monômero é composto de dois domínios distintos e correlacionados. O domínio N-terminal consiste do motivo 8-stranded- α/β -barril. O cofator PLP, essencial para a atividade da enzima, está covalentemente ligado ao resíduo de lisina catalítico (Lys33 em *Vcholerae*AR e Lys38 em *Saureus*AR1) por meio de uma ligação interna aldimina altamente conservada e estende-se em direção ao centro α/β -barril. O domínio C-terminal tem uma estrutura secundária que é predominantemente composto por folha- β (Lam *et al.*, 2009). Fatos estes que tornaram fundamental a modelagem de ambas as cadeias do complexo, tanto ligadas ao inibidor 4AX, quanto na presença do cofator essencial PLP, que compõe ambas as AlaR, para

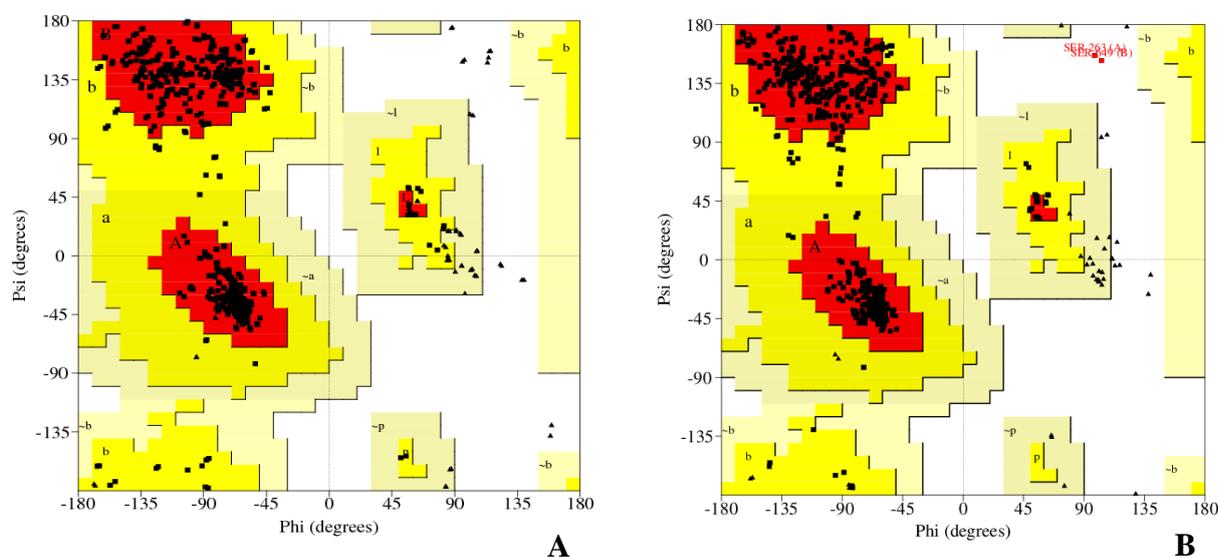


Figura 1. Gráfico de Ramachandran do complexo de *Vcholerae*AR (A) e de *Saureus*AR1 (B).

que a enzima estivesse em sua conformação ativa, sua estrutura estivesse estereoquimicamente adequada e permitisse assim, que os estudos de ancoragem fossem realizados. Como mostrado pelo gráfico de Ramachandran dos modelos minimizados de cada AlaR, onde mais de 90% dos resíduos estão situados nas regiões permitidas (Figura 1).

A modelagem por homologia de proteínas geralmente fornece modelos de alta qualidade que são comparáveis com cristalografia de raios X de baixa resolução ou estruturas solucionadas por RMN de média resolução (Fiser, 2010). Entre os critérios que envolvem a modelagem, um dos mais importantes consiste na busca pelo molde para a construção do modelo, que é baseado no princípio de que proteínas da mesma família se enovelam de maneira semelhante. Na prática, isso significa que se a estrutura de pelo menos uma proteína da família estiver sido determinada por métodos experimentais, os outros membros da família poderão ser modelados com base em seu alinhamento com a estrutura conhecida. Isso é possível porque pequenas alterações na sequência de proteínas geralmente resultam em poucas alterações em sua estrutura tridimensional (Chothia e Lesk, 1986). Um percentual superior a 25% de identidade entre as sequências de duas ou mais proteínas indicam similaridade entre suas estruturas tridimensionais (Rost, 1999; Yang e Honig, 2000), o que determina que a modelagem por homologia de *Vcholerae*AR, que apresentou 60% de identidade com o molde selecionado (PDBid: 2RJH) e de *Saureus*AR1 (PDBid: 4A3Q) com 99,7%, poderia ser realizada.

As simulações de DM foram executadas pelo tempo de 50 ns nos complexos de *Vcholerae*AR e *Saureus*AR1, para ambas as suas formas, apo e complexadas com o ligante 4AX. Os valores de RMSD ao longo da simulação de DM mostraram que ambos os complexos atingiram o equilíbrio termodinâmico nos últimos 10 ns de simulação. Sendo que

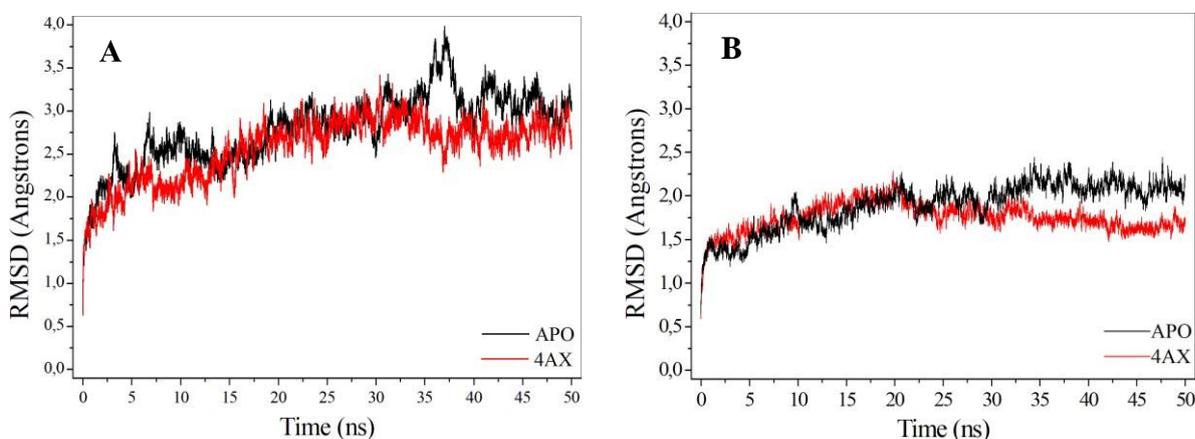


Figura 2. RMSD dos átomos da cadeia principal de *Vcholerae*AR (A) e de *Saureus*AR1 (B) em suas formas apo e complexadas com o ligante 4AX.

tanto *VcholeraeAR* quanto *SaureusAR1* oscilaram menos quando complexados com a 4AX do que a forma apo, sugerindo que os ligantes são importantes para estabilização da estrutura do homodímero (Figura 2).

A análise da frequência de contato dos resíduos que compõe o sítio ativo as duas cadeias da proteína *VcholeraeAR* complexada com 4AX, resultou nos resíduos Arg128, Met301 e Tyr341 e para as cadeias de *SaureusAR1* nos resíduos Arg137, Met311 e Tyr283 como os de maior importância para a estabilização do ligante no sítio ativo (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência de contato do ligante 4AX com os resíduos de aminoácidos de *VcholeraeAr* e *SaureusAR1* formados a partir da cadeia A (grupo acima) e cadeia B (grupo abaixo).

<i>VcholeraeAR</i>		<i>SaureusAR1</i>	
Resíduo	4AX	Resíduo	4AX
Tyr-253	0,16	Tyr-264	0,89
Tyr-272	0,42	Tyr-283	0,40
Arg-278	0,16	Cys-310	0,96
Val-299	0,01	Met-311	0,99
Ser-300	0,26	Lys-38	0,20
Met-301	0,51	Arg-137	1,00
Asp-302	0,01	Ile-351	0,28
		Tyr-353	0,74
Lys-33	0,38		
Tyr-37	0,05	Lys-38	0,52
Met-126	0,46	Arg-137	1,00
Arg-128	0,75	Tyr-353	0,51
His-158	0,45	Tyr-264	0,59
Phe-159	0,00	Tyr-283	0,96
Ala-192	0,42	Cys-310	0,99
Ile-339	0,02	Met-311	1,00
Tyr-341	0,95	PLP-382	1,00
PLP-358	1,00		

O raio de giro (R_{gyr}) pode ser definido como a distância entre o centro de massa do complexo com a distância média dos átomos do seu centro de gravidade comum (raio médio da distância) ao longo de uma simulação. Os resultados dos cálculos do R_{gyr} dos átomos da cadeia principal de *VcholeraeAR* mostram que ambos os complexos tiveram uma pequena expansão de volume ao longo da simulação. Porém, este volume ficou estabilizado a partir dos 25 ns. Contudo, o complexo de *VcholeraeAR* complexada com a 4AX se expandiu menos, ficando mais estável ao longo da simulação. Já os resultados dos cálculos do R_{gyr} para a cadeia principal de *SaureusAR1* indicam que o complexo se estabilizou a partir dos últimos 5 ns de simulação, sendo que igualmente ao que foi visto em relação ao complexo de *VcholeraeAR*, a expansão do complexo de *SaureusAR1* complexada com os ligantes foi

menor em relação a proteína apo. Isto sugere que os ligantes PLP e 4AX são importantes para a manutenção da estrutura do dímero e, que a presença dos ligantes não levaram nenhuma das proteínas a se desenovelar, o que indica que os modelos gerados são de boa qualidade (Figura 3).

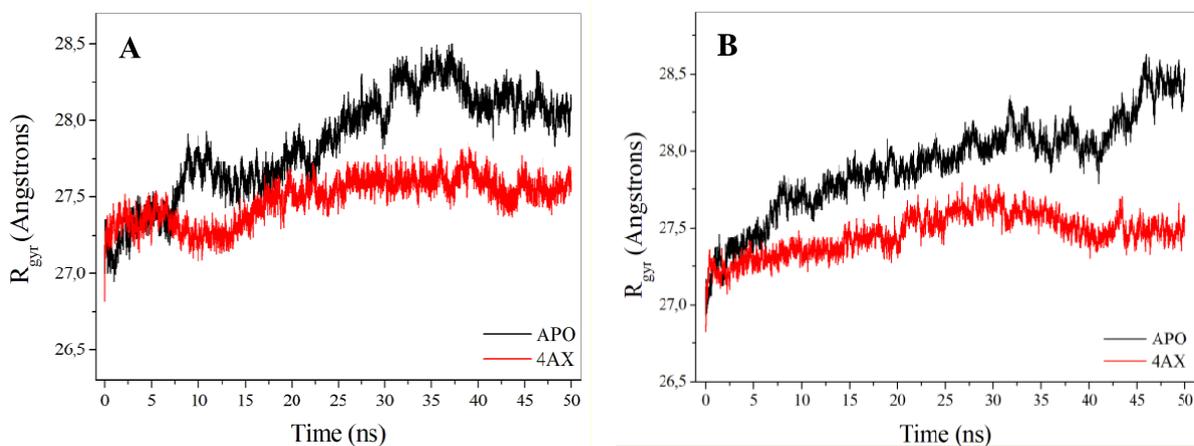


Figura 3. Raio de giro (R_{gyr}) dos átomos da cadeia principal de *VcholeraeAR* (A) e de *SaureusAR1* (B) em suas formas apo e complexadas com o ligante 4AX.

Proteínas não são estruturas estáticas *in vivo*, o que denota que algumas regiões possam maior flexibilidade em relação às outras. Podemos verificar as regiões de maior flexibilidade dos complexos *VcholeraeAR* e *SaureusAR1* observando a análise dos cálculos da raiz quadrada média da flutuação dos átomos Ca presentes na cadeia principal das proteínas (rmsf). Os resultados de rmsf para os complexos de *SaureusAR1* e *VcholeraeAR* indicam que em ambos os complexos houveram variações da flutuação equilibradas entre as duas formas, apo ou complexada com o ligante 4AX. Em *VcholeraeAR* (A) e *SaureusAR1* (B) nota-se uma média de flutuação maior nas regiões correspondentes ao sítio ativo no complexo da proteína apo, tanto na cadeia A quanto na cadeia B, em comparação as

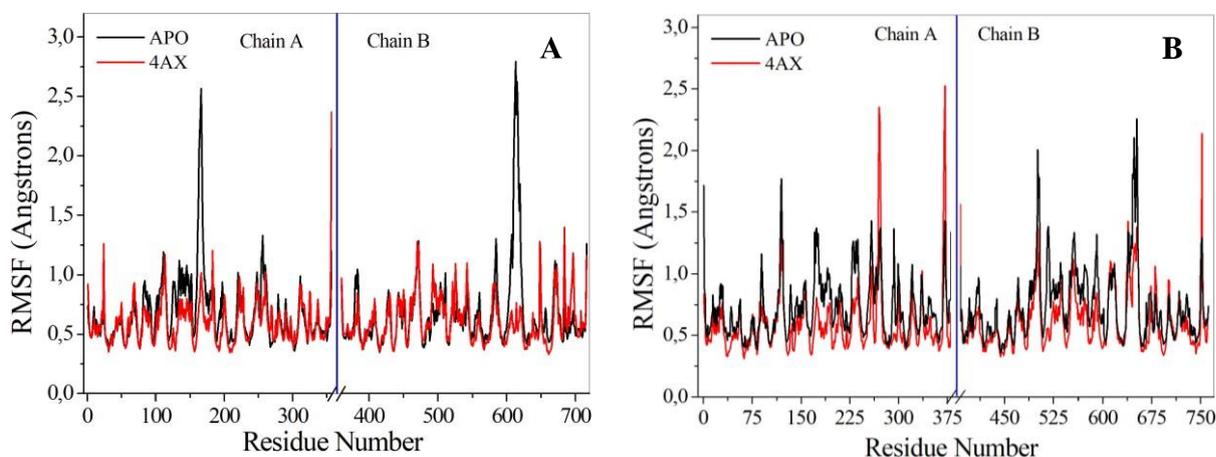


Figura 4. Raiz quadrada média de flutuação dos Ca (RMSF) dos átomos da cadeia principal de *VcholeraeAR* (A) e de *SaureusAR1* (B) em suas formas apo e complexadas com o ligante 4AX.

complexadas com o ligante 4AX, o que também demonstra que a presença dos ligantes é importante para a estabilização do sítio ativo (Figura 4).

Em relação a varredura virtual, foram montadas três bibliotecas que foram utilizadas tanto para a varredura com *Vcholerae*AR quanto com *Saureus*AR1, devido a semelhança estrutural do sítio ativo de ambas as AlaR e por se tratar da mesma enzima, levando-se em conta que possíveis candidatos a inibidores deveriam apresentar atividade em ambas as enzimas. Além disso, todas as simulações de VS foram realizadas a partir de dois programas diferentes, o *AutoDock* e o *Molegro Virtual Docker*. Para ambas as enzimas foi realizada a VS a partir do programa *AutoDock* para a seleção dos melhores compostos, tendo como estrutura de referência a 4AX. Os ligantes selecionados foram agrupados em uma pasta chamada *Best Results* e estes, em seguida foram submetidos a mais 4 varreduras em cada um dos programas, para cada uma das AlaR individualmente, seguindo os protocolos previamente validados pelos estudos de *redocking*, para que pudesse ser assegurada a reprodutibilidade dos resultados obtidos, bem como eliminar falsos positivos. Como resultado final foram selecionados 22 candidatos a inibidores para *Vcholerae*AR e *Saureus*AR1 em comum entre as duas AlaR, denominados VcAr01(ZINC2117712), VcAr02 (ZINC265983), VcAr03 (ZINC3159118), VcAr04 (ZINC3159119), VcAr05 (ZINC2111574), VcAr06 (ZINC533770), VcAr07 (ZINC2389355), VcAr08 (ZINC13525577), VcAr09 (ZINC5395369), VcAr10 (ZINC4090202), VcAr30 (ZINC2391061), VcAr31 (ZINC2582472), VcAr32 (ZINC1731787), VcAr33 (ZINC388691), VcAr34 (ZINC1529567), VcAr35 (405158), VcAr36 (ZINC3995578), Ar1 (ZINC19703380), Ar2 (ZINC4029562), Ar5 (ZINC265983), Ar6 (ZINC39072870) e Ar7 (ZINC3647400) (Figura 5), a partir das bibliotecas contendo aproximadamente 306.000 compostos. Todos os candidatos selecionados foram filtrados com sucesso pelas regras de Lipinski e pelos critérios ADMETox. Foi verificado que o composto Ar7, o 1-aminociclopropanofosfonato, selecionado a partir da biblioteca de compostos com pelo menos 80% de similaridade aos descritos na literatura, montada a partir de estruturas obtidas na base de dados ZINC e encontradas na busca no *Brenda Enzymes*, havia sido previamente descrito (Erion e Walsh, 1987). Além disso, foi observado que outro composto obtido a partir desta mesma biblioteca (VcAr10), o ácido 1-aminoetilfosfônico (AEF), também havia sido relatado anteriormente como inibidor para AlaR (Stamper *et al.*, 1998). Foram adquiridos para os testes *In vitro* de CIM, devido à limites no orçamento, apenas 10 dos compostos selecionados por meio da VS (Ar1, Ar2, Ar5, VcAr30, VcAr31, VcAr32, VcAr33, VcAr34, VcAr35 e VcAr36), além do inibidor conhecido AEF (VcAr10), a tiazolidinona e a 4AX (Figura 5), para fins comparativos.

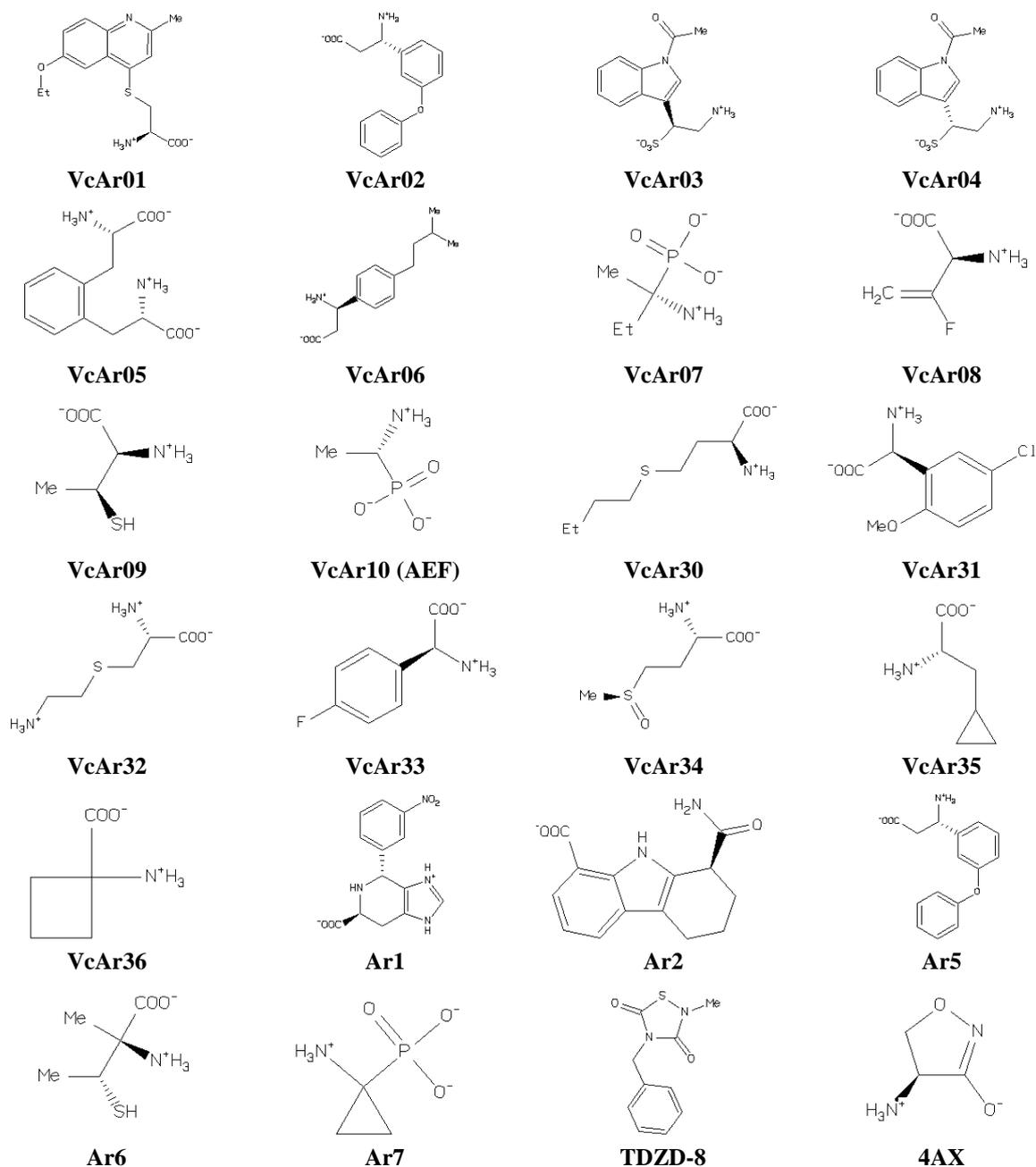


Figura 5. Estruturas químicas dos 22 compostos em comum selecionados como candidatos a inibidores da AlaR de *V. cholerae* e *S. aureus* MRSA por VS, da tiazolidinona (TDZD-8) e da D-cicloserina (4AX). Imagens: *Zinc database* (<http://zinc.docking.org/>).

Nenhum dos 10 compostos testados apresentou atividade inibitória significativa nos ensaios *In vitro* de CIM para as bactérias Gram positivas testadas (*S. aureus*) e para as Gram negativas (incluindo o *V. cholerae* ATCC9459), nem mesmo o conhecido inibidor AEF (valores de CIM $\leq 512 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (dados não mostrados). Este fato talvez possa ser explicado com base na natureza dos compostos se comparados AEF e seu mecanismo de ação, pois os 10 compostos selecionados a partir da VS possuem certas semelhanças estruturais com o AEF. Di e oligopeptídeos naturais, que podem apresentar um papel metabólico em muitas

bactérias, necessitam de transportadores específicos para entrarem na célula bacteriana, são carregados por permeases estereoespecíficas localizadas na membrana plasmática. O AEF é o produto ativo da hidrólise intracelular da alafosfina (ácido L-alanil-L-1-aminoetilfosfônico), um inibidor seletivo da biossíntese do peptidoglicano em bactérias. Seu mecanismo de ação envolve o acúmulo de uridina tripeptídeo difosfato ácido *N*-acetilmurâmico e a significativa redução do *pool* intracelular de D-alanina. Nas células bacterianas, após o transporte ativo a alafosfina é hidrolisada em AEF pela ação de amino peptidases intracelulares. O alvo do AEF é a enzima AlaR, que é reversível e competitivamente inibida em bactérias Gram-negativas, como a *E. coli* ($K_i=0.03\text{mM}$; $K_m=0.93\text{mM}$) e irreversivelmente inibida de maneira tempo-dependente em bactérias Gram-positivas, como *S. aureus* e *S. faecalis* ($K_i=0.4\text{mM}$; $K_m=0.9\text{mM}$) (Atherton *et al.*, 1979). A reação do AEF com a AlaR envolve a formação de uma aldimina externa ligada ao cofator PLP que não pode ser eficientemente hidrolisada ou racemizada, onde o grupo fosfonato interage com os resíduos do sítio ativo, tornando-os assim, indisponíveis para a catálise (Stamper *et al.*, 1998). Além disso, os compostos selecionados por meio da VS possuem carga em pH 7.0, o que pode se apresentar como uma dificuldade adicional para atravessarem a parede celular e/ou membrana plasmática.

Neste contexto, foram ainda realizados ensaios de CIM utilizando EDTA em combinação ou não com tampão Tris e com os compostos selecionados por meio da VS. O EDTA é capaz de aumentar a permeabilidade da membrana aos solutos extracelulares e o extravasamento dos intracelulares, sensibilizando a célula para agentes bactericidas e antibióticos (Wooley e Jones, 1983). Este agente atua como quelante de íons metálicos, removendo cátions divalentes presentes na parede celular (Gray e Wilkinson, 1965; Asbell e Eagon, 1966), alterando a sua integridade e permeabilidade com a liberação de enzimas periplasmáticas, lipopolissacarídeos (Leive, 1965), proteínas e fosfolipídeos da membrana celular bacteriana (Lambert *et al.*, 2004). Além disso, o EDTA também atua inibindo a formação de biofilme (Meng *et al.*, 2013). O Tris é um tampão alcalino que potencializa a ação do EDTA (Wooley e Jones, 1983). A combinação de EDTA-Tris e lisozima ou antibióticos podem ser eficazes no tratamento de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente (Buckley *et al.*, 2013), atuando na inibição da formação de biofilme em *S. aureus* MRSA (Jain *et al.*, 2016) e podem potencializar em 50% o efeito da penicilina, oxitetraciclina ou clorafenicol em *E. coli* em testes *In vitro* (Wooley e Jones, 1983), por exemplo. Embora o EDTA ou a combinação EDTA-Tris sejam descritos como agentes com a capacidade de aumentar a permeabilidade celular e facilitar a entrada de antibióticos conhecidos na célula bacteriana, os testes de CIM na presença de EDTA, Tris, Tris-EDTA ou a associação destes

com os compostos selecionados a partir da VS não foram significativos para nenhuma das cepas Gram-positivas ou Gram-negativas avaliadas (dados não mostrados).

Considerando a dificuldade em se contornar os possíveis mecanismos envolvidos na entrada dos compostos selecionados por meio da VS nas células bacterianas das cepas envolvidas neste estudo utilizando a técnica de CIM, futuramente serão realizadas a clonagem e expressão da enzima AlaR de *V. cholerae* ATCC9459 e de *S. aureus* cepa Mu50/ATCC700699 para estudos de cinética enzimática *In vitro* dos compostos previamente adquiridos. Desta forma, será possível concluir se os compostos realmente se ligam a enzima, conforme sugerido pela simulação de *docking* e que a ausência de atividade antibacteriana nos ensaios de CIM seja devido a mecanismos que impedem sua entrada na célula. Caso isso seja comprovado será possível idealizar métodos que auxiliam na absorção como a incorporação com dipeptídeos, a exemplo do que foi feito com o AEF.

5 Conclusões

Este trabalho resultou na obtenção de dois modelos com fins detalhes da estrutura tridimensional da enzima AlaR de uma bactéria Gram-negativa, o *V. cholerae*, responsável por uma doença negligenciada que causa milhares de mortes todos os anos em todo o mundo, e de uma bactéria Gram-positiva multirresistente, que constitui em um dos maiores desafios globais atualmente em saúde pública, o *S. aureus* MRSA. As informações obtidas a partir do estudo dos modelos tridimensionais da enzima AlaR ligadas ao inibidor D-cicloserina destes organismos não haviam sido obtidas anteriormente por métodos experimentais. A metodologia de *docking* comparativo, utilizando diferentes programas para a triagem por VS da mesma biblioteca, conduziram a seleção de 22 candidatos à inibidores com potencial para auxiliarem no desenvolvimento de novos fármacos. A análise estrutural e das interações proteína-ligante no sítio ativo dos modelos desta enzima, realizadas a partir dos resultados dos estudos de dinâmica molecular, forneceram detalhes sobre as interações, a cavidade da ligação e dos resíduos mais importantes envolvidos na interação com o ligante 4AX no processo catalítico. Os compostos selecionados através da VS poderão, ainda, ser utilizados futuramente em investigações da cinética enzimática da enzima AlaR isolada, o que poderá ser fundamental para comprovar sua atividade *In vitro*, como sugerido pelo estudo *in silico*. Os resultados deste estudo sugeriram mecanismos que podem ser aplicados na descoberta de novos fármacos contra dois agentes causadores de doenças de grande importância em saúde pública atualmente.

6 Referências

- ASBELL, M. A.; EAGON, R. G. The role of multivalent cations in the organization and structure of bacterial cell walls. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 22, n. 6, p. 664-71, Mar 1966. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4957666> >.
- ATHERTON, F. R. et al. Phosphonopeptides as antibacterial agents: mechanism of action of alaphosphin. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 15, n. 5, p. 696-705, May 1979. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/525987> >.
- AZAM, M. A.; JAYARAM, U. Inhibitors of alanine racemase enzyme: a review. **J Enzyme Inhib Med Chem**, v. 31, n. 4, p. 517-26, Aug 2016. ISSN 1475-6374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26024289> >.
- BUCKLEY, L. M.; MCEWAN, N. A.; NUTTALL, T. Tris-EDTA significantly enhances antibiotic efficacy against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. **Vet Dermatol**, v. 24, n. 5, p. 519-e122, Oct 2013. ISSN 1365-3164. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24025021> >.
- CHENG, T. et al. Structure-based virtual screening for drug discovery: a problem-centric review. **AAPS J**, v. 14, n. 1, p. 133-41, Mar 2012. ISSN 1550-7416. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22281989> >.
- CHENG, Y. Q.; WALTON, J. D. A eukaryotic alanine racemase gene involved in cyclic peptide biosynthesis. **J Biol Chem**, v. 275, n. 7, p. 4906-11, Feb 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10671527> >.
- CHOTHIA, C.; LESK, A. M. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. **EMBO J**, v. 5, n. 4, p. 823-6, Apr 1986. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3709526> >.
- CIUSTEA, M. et al. Thiadiazolidinones: a new class of alanine racemase inhibitors with antimicrobial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Biochem Pharmacol**, v. 83, n. 3, p. 368-77, Feb 2012. ISSN 1873-2968. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22146584> >.
- CLSI. **M100-S24: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement** 2014.
- COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, N. M. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 50, n. Pt 5, p. 760-3, Sep 1994. ISSN 0907-4449. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15299374> >.
- DIAS, R. et al. Evaluation of molecular docking using polynomial empirical scoring functions. **Curr Drug Targets**, v. 9, n. 12, p. 1062-70, Dec 2008. ISSN 1873-5592. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19128216> >.
- ERION, M. D.; WALSH, C. T. 1-Aminocyclopropanephosphonate: time-dependent inactivation of 1-aminocyclopropanecarboxylate deaminase and *Bacillus stearothermophilus* alanine racemase by slow dissociation behavior. **Biochemistry**, v. 26, n. 12, p. 3417-25, Jun 1987. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3651390> >.
- ESWAR, N. et al. Comparative protein structure modeling using Modeller. **Curr Protoc Bioinformatics**, v. Chapter 5, p. Unit-5.6, Oct 2006. ISSN 1934-340X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18428767> >.
- FISER, A. Template-based protein structure modeling. **Methods Mol Biol**, v. 673, p. 73-94, 2010. ISSN 1940-6029. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20835794> >.
- GOLAN, D. E. et al. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2. ed. Guanabara Koogan, 2009. ISBN 9788527715201.

GRAY, G. W.; WILKINSON, S. G. The Action of Ethylenediaminetetra-acetic Acid on *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 28, n. 1, p. 153-164, 1965. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2672.1965.tb02138.x> >.

HABBOUSH, Y.; GUZMAN, N. **Antibiotic Resistance**. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2018. Disponível em: < <http://europepmc.org/abstract/MED/30020649> >. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513277> >. Disponível em: < <http://europepmc.org/books/NBK513277> >.

HOFFMANN, K. et al. Purification and characterization of eucaryotic alanine racemase acting as key enzyme in cyclosporin biosynthesis. **J Biol Chem**, v. 269, n. 17, p. 12710-4, Apr 1994. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8175682> >.

JAIN, S. et al. Can EDTA Change MRSA into MSSA? A Future Prospective! **J Clin Diagn Res**, v. 10, n. 2, p. DC22-5, Feb 2016. ISSN 2249-782X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27042464> >.

KIM, M. G. et al. N(2)-substituted D,L-cycloserine derivatives: synthesis and evaluation as alanine racemase inhibitors. **J Antibiot (Tokyo)**, v. 56, n. 2, p. 160-8, Feb 2003. ISSN 0021-8820. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12715876> >.

KING, A. A. et al. Inapparent infections and cholera dynamics. **Nature**, v. 454, n. 7206, p. 877-80, Aug 2008. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18704085> >.

KITAOKA, M. et al. Antibiotic resistance mechanisms of *Vibrio cholerae*. **J Med Microbiol**, v. 60, n. Pt 4, p. 397-407, Apr 2011. ISSN 1473-5644. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21252269> >.

KUMAR, A.; ZHANG, K. Y. J. Advances in the Development of Shape Similarity Methods and Their Application in Drug Discovery. **Front Chem**, v. 6, p. 315, 2018. ISSN 2296-2646. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30090808> >.

LAM, H. et al. D-amino acids govern stationary phase cell wall remodeling in bacteria. **Science**, v. 325, n. 5947, p. 1552-5, Sep 2009. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19762646> >.

LAMBERT, M. P.; NEUHAUS, F. C. Factors affecting the level of alanine racemase in *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 109, n. 3, p. 1156-61, Mar 1972. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4551748> >.

LAMBERT, R. J. W.; HANLON, G. W.; DENYER, S. P. The synergistic effect of EDTA/antimicrobial combinations on *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 2, p. 244-253, 2004. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2672.2004.02135.x> >.

LEAL, N. C. et al. Characterization of *Vibrio cholerae* isolated from the aquatic basins of the State of Pernambuco, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 102, n. 3, p. 272-6, Mar 2008. ISSN 0035-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18258274> >.

LEIVE, L. Release of lipopolysaccharide by EDTA treatment of *E. coli*. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 21, n. 4, p. 290-6, Nov 1965. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4159978> >.

MACKERELL, A. D. Empirical force fields for biological macromolecules: overview and issues. **J Comput Chem**, v. 25, n. 13, p. 1584-604, Oct 2004. ISSN 0192-8651. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15264253> >.

MARTÍNEZ, J. L. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. **Science**, v. 321, n. 5887, p. 365-7, Jul 2008. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18635792> >.

MENG, L. et al. Inhibition of Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) on Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus*. **Food Science and Technology Research**, v. 19, n. 2, p. 323-330, 2013.

MOROLLO, A. A.; PETSKO, G. A.; RINGE, D. Structure of a Michaelis complex analogue: propionate binds in the substrate carboxylate site of alanine racemase. **Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 3293-301, Mar 1999. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10079072> >.

MUSTATA, G. I.; BRIGGS, J. M. A structure-based design approach for the identification of novel inhibitors: application to an alanine racemase. **J Comput Aided Mol Des**, v. 16, n. 12, p. 935-53, Dec 2002. ISSN 0920-654X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12825624> >.

NELSON, E. J. et al. Antibiotics for both moderate and severe cholera. **N Engl J Med**, v. 364, n. 1, p. 5-7, Jan 2011. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21142691> >.

NOMURA, T. et al. Purification and some properties of alanine racemase from a bivalve mollusc *Corbicula japonica*. **J Exp Zool**, v. 289, n. 1, p. 1-9, Jan 2001. ISSN 0022-104X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11169488> >.

PHILLIPS, J. C. et al. Scalable molecular dynamics with NAMM. **J Comput Chem**, v. 26, n. 16, p. 1781-802, Dec 2005. ISSN 0192-8651. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16222654> >.

ROST, B. Twilight zone of protein sequence alignments. **Protein Eng**, v. 12, n. 2, p. 85-94, Feb 1999. ISSN 0269-2139. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10195279> >.

RUIZ-MORENO, D. et al. Spatial clustering in the spatio-temporal dynamics of endemic cholera. **BMC Infect Dis**, v. 10, p. 51, Mar 2010. ISSN 1471-2334. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20205935> >.

SCALETTI, E. R.; LUCKNER, S. R.; KRAUSE, K. L. Structural features and kinetic characterization of alanine racemase from *Staphylococcus aureus* (Mu50). **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 68, n. Pt 1, p. 82-92, Jan 2012. ISSN 1399-0047. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22194336> >.

SPAGNOLO, A. M. et al. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in healthcare settings. **J Prev Med Hyg**, v. 55, n. 4, p. 137-44, Dec 2014. ISSN 1121-2233. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26137787> >.

STAMPER, G. F. et al. Reaction of alanine racemase with 1-aminoethylphosphonic acid forms a stable external aldimine. **Biochemistry**, v. 37, n. 29, p. 10438-45, Jul 1998. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9671513> >.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. **J Med Chem**, v. 49, n. 11, p. 3315-21, Jun 2006. ISSN 0022-2623. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16722650> >.

WALSH, C. T. Enzymes in the D-alanine branch of bacterial cell wall peptidoglycan assembly. **J Biol Chem**, v. 264, n. 5, p. 2393-6, Feb 1989. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2644260> >.

WHO. 10 facts on cholera. 2016. Disponível em: < <http://www.who.int/features/factfiles/cholera/en/> >. Acesso em: 09 Ago 2018.

_____. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. 2017. Disponível em: < <http://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> >. Acesso em: 08 Ago 2018.

_____. Antimicrobial Resistance. 2018. Disponível em: < <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> >. Acesso em: 08 Ago 2018.

WOLF, L. K. digital briefs. **Chemical & Engineering News Archive**, v. 87, n. 45, p. 48, 2009/11/09 2009. ISSN 0009-2347. Disponível em: < <https://doi.org/10.1021/cen-v087n045.p048> >.

WOOLEY, R. E.; JONES, M. S. Action of EDTA-Tris and antimicrobial agent combinations on selected pathogenic bacteria. **Vet Microbiol**, v. 8, n. 3, p. 271-80, Jun 1983. ISSN 0378-1135. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6412426> >.

WU, D. et al. Residues Asp164 and Glu165 at the substrate entryway function potentially in substrate orientation of alanine racemase from *E. coli*: Enzymatic characterization with crystal structure analysis. **Protein Sci**, v. 17, n. 6, p. 1066-76, Jun 2008. ISSN 1469-896X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18434499> >.

YANG, A. S.; HONIG, B. An integrated approach to the analysis and modeling of protein sequences and structures. I. Protein structural alignment and a quantitative measure for protein structural distance. **J Mol Biol**, v. 301, n. 3, p. 665-78, Aug 2000. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10966776> >.

ZOETE, V. et al. SwissParam: a fast force field generation tool for small organic molecules. **J Comput Chem**, v. 32, n. 11, p. 2359-68, Aug 2011. ISSN 1096-987X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21541964> >.

**MUTATIONS IN CATALASE-PEROXIDASE KatG FROM ISONIAZID RESISTANT
Mycobacterium tuberculosis CLINICAL ISOLATES: INSIGHTS FROM MOLECULAR
DYNAMICS SIMULATIONS**

Arethusa Lobo Pimentel¹; Regiane Bertin de Lima Scodro²; Katiany Rizzieri Caleffi-
Ferracioli²; Vera Lúcia Dias Siqueira²; Paula Aline Zanetti Campanerut-Sá²; Luciana Dias
Ghiraldi Lopes²; Aryadne Larissa de Almeida²; Rosilene Fressatti Cardoso²; Flavio Augusto
Vicente Seixas¹

¹ Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá.

² Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá.

*Autor para correspondência:

favseixas@uem.br

Laboratório de Bioquímica Estrutural

Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Bloco I89

Av. Colombo, 5.790, Maringá, PR, Brasil, CEP 87020-900

Fone: +55 44 36219337

Resumo: O objetivo deste estudo foi a investigação do efeito de mutações pontuais detectadas em isolados clínicos brasileiros de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes à isoniazida (INH) nas coordenadas estruturais da KatG de *M. tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC25618) por meio de simulações de DM sobre esta proteína ligada a INH. Foram avaliadas as mutações pontuais Ala109Val, Ser315Thr, Ser315Arg, Ser315Ile, Ser315Asn, Pro232Arg, Gly273Cys e Ser315Gly, bem como a mutação dupla His97Arg + Lys200Glu. Os resultados das simulações de DM sugerem que o mecanismo de resistência a INH nestas mutações está relacionado a substituições dos resíduos no domínio N-terminal da proteína por outros com cadeias laterais maiores (efeitos estéricos) e não a modificações nas cargas ou cargas parciais destes substituintes (efeitos eletrostáticos). A Ser315 é um ponto-chave na resistência, pois está localizada no canal de acesso ao sítio catalítico no qual passa a INH de modo que tais mutações causam um impedimento estérico a passagem de ligantes maiores que o substrato natural da enzima. As mutações em resíduos localizados em outras regiões da molécula podem afetar a interação da INH com o heme indiretamente, promovendo mudanças estéricas que se propagam ao longo da cadeia principal da proteína afetando o sítio catalítico. Os resultados do estudo das mutações na *MtKatG* mostraram que o mecanismo de resistência está relacionado a modificações estereoquímicas no domínio N-terminal da proteína, que restringem o acesso da INH ao sítio catalítico ou causam sua baixa ativação. Tais resultados mostram *insights* que podem ser úteis para a identificação de novos medicamentos anti-TB que possam contornar estes mecanismos de resistência.

Palavras-chave: Catalase-Peroxidase; *Mycobacterium tuberculosis*; Isoniazida; Resistência à antibióticos.

Abstract: The objective of this study was to investigate the effect of point mutations detected in Brazilian clinical isolates of *M. tuberculosis* resistant to isoniazid (INH) in the structural coordinates of KatG of *M. tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC25618) by means of simulations of DM on this protein bounded to INH. Ala109Val, Ser315Thr, Ser315Arg, Ser315Ar, Ser315Asn, Pro232Arg, Gly273Cys and Ser315Gly mutations were evaluated as well as the His97Arg + Lys200Glu double mutation. The results of the DM simulations suggest that the mechanism of INH resistance in these mutations is related to substitutions of residues in the N-terminal domain of the protein by others with larger side chains (steric effects) and not to modifications in the partial charges or charges of these substituents (electrostatic effects). Ser315 is a key point in the resistance because it is located in the channel of access to the catalytic site in which INH passes such that such mutations cause a steric hindrance to pass through ligands greater than the natural substrate of the enzyme. Mutations in residues located in other regions of the molecule may affect the interaction of INH with heme indirectly, promoting steric changes that propagate along the major chain of the protein affecting the catalytic site. The results of the mutation study in *MtKatG* showed that the mechanism of resistance is related to stereochemical modifications in the N-terminal domain of the protein, which restrict the access of INH to the catalytic site or cause its low activation. These results show insights that may be useful for identifying new anti-TB drugs that may circumvent these resistance mechanisms.

Keywords: Catalase-peroxidase; *Mycobacterium tuberculosis*; Isoniazid; Drug resistance.



Mutations in catalase-peroxidase KatG from isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates: insights from molecular dynamics simulations

Arethusa Lobo Pimentel¹ & Regiane Bertin de Lima Scodro² & Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli² & Vera Lúcia Dias Siqueira² & Paula Aline Zanetti Campanerut-Sá² & Luciana Dias Ghiraldi Lopes² & Aryadne Larissa de Almeida² & Rosilene Fressatti Cardoso² & Flavio Augusto Vicente Seixas¹ 

Received: 3 October 2016 / Accepted: 20 February 2017
Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017

Abstract The current multidrug therapy for tuberculosis (TB) is based on the use of isoniazid (INH) in combination with other antibiotics such as rifampin, ethambutol and pyrazinamide. Literature reports have shown that *Mycobacterium tuberculosis*, the causative agent of TB, has become resistant to this treatment by means of point mutations in the target enzymes of these drugs, such as catalase-peroxidase (KatG). By means of equilibrium molecular dynamics in the presence of the ligand, this work evaluated ten point mutations described in the enzyme KatG that are related to resistance to INH. The results showed that the resistance mechanism is related to stereochemical modifications at the N-terminal domain of the protein, which restrict INH access to its catalytic site, not involving mechanisms of electrostatic nature. These results show insights that can be useful for the identification of new anti-TB drugs which may be able to circumvent this mechanism of resistance.

Keywords Catalase-peroxidase · *Mycobacterium tuberculosis* · Isoniazid · Drug resistance

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00894-017-3290-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

* Flavio Augusto Vicente Seixas
favseixas@uem.br

¹ Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Av. Colombo, 5790 Maringá, PR, Brazil

² Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Av. Colombo, 5790 Maringá, PR, Brazil

Introduction

Tuberculosis (TB) is a major public health problem worldwide due to the high mortality and morbidity associated with the disease. The treatment is multidrug, with isoniazid (INH), always in combination with other drugs such as rifampin, ethambutol and pyrazinamide, being the first choice [1]. INH is one of the oldest known synthetic antitubercular drugs [2] and is considered a prodrug, which targets the catalase-peroxidase (KatG) of the bacterium *Mycobacterium tuberculosis* in such a way that it is converted to an active metabolite, acting against the bacillus only at the active replication stage [3].

Resistance to anti-TB drugs is usually caused by spontaneous mutations in the genome of *M. tuberculosis*, and not as a result of horizontal gene transfer as occurs with other bacterial species [4]. INH resistance is linked to mutations in at least five bacterial genes, most commonly mutations in the *katG* gene encoding the KatG enzyme, which reduce its activity and even prevent conversion of the prodrug INH to its active metabolite [5]. Other resistance mechanisms are related to mutations in *inhA* and other related genes such as *kasA* [6].

In our previous study with Brazilian clinical isolates of INH-resistant *M. tuberculosis*, different mutations in the *katG* gene were determined by, and correlated with, resistance to this drug by minimum inhibitory concentration (MIC) assays [7]. However, very little is known about the structural mechanism that defines the resistance associated with these mutations. In this context, molecular dynamics (MD) is a tool that allows the effect of point mutations on the structure of protein KatG throughout time to be simulated at microscopic level, providing an estimate of the binding affinity with INH by appropriate calculations [6, 8, 9].

In this respect, the aim of this work was to investigate the effect of point mutations detected in INH

resistant *M. tuberculosis* clinical isolates on the structural coordinates of *M. tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 25618) KatG by means of MD simulations on this protein bonded to INH. A better understanding of this mechanism may lead to the development of more effective drugs able to circumvent this mechanism of resistance.

Materials and methods

INH resistance assays and identification of mutations in the *KatG* gene from clinical isolates of *M. tuberculosis*

INH resistance MIC assays and molecular identification of mutations in the *katG* gene from clinical isolates of *M. tuberculosis* were previously reported [7].

Protein structure and ligands

The native structure of KatG protein from *M. tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 25618, Uniprot: p9wie5), bonded to the prosthetic group heme (*MtKatG*) was obtained from the protein data bank, PDBid: 1sj2 [10]. The water molecules were removed and the ligands INH, chloride (CLA) and sodium (SOD) were inserted by means of geometric docking in both subunits as they appear in KatG of *Burkholderia pseudomallei*, PDBid: 4kwq [11]. Five structures for *M. tuberculosis* KatG are deposited in the PDB, of which only structure 1sj2 at 2.41 Å is in the native form. The other four coordinates represent mutant structures. The secondary structure diagram was prepared using the PDBSum web server [12]. The evaluated point mutations detected from Brazilian isolates, i.e., Ala109Val, Ser315Thr, Ser315Arg, Ser315Ile, Ser315Asn, Pro232Arg, Gly273Cys, and Ser315Gly, as well as the double mutation His97Arg + Lys200Glu, were built in the spatial coordinates of the native structure by means of the Coot-0.7.2 program [13]. The cavity that forms the INH binding site, located between the protein and the heme group, had its volume and area monitored along MD by means of the program MDPocket [14].

Molecular dynamics

The spatial coordinates of the complex *MtKatG*-heme-INH were used as the input parameter for the execution of the equilibrium MD, which was carried out in steps using the program NAMD2 [15] and the force field Charmm c35b2-c36a2 for the protein and heme group [16]. The force field for the ligand INH in the deprotonated form (zinc1590) was generated in the Charmm format by the SwissParam server [17]. In order to obtain a more accurate force field, the partial atom charges of INH were calculated by the method B3LYP/

6-311G (Opt, Tight SCF) using the COSMO solvation (water) model through the Orca program [18].

In the first step of simulation, an energy minimization through the conjugate gradient method (CG) was performed to avoid steric collisions between INH and protein *MtKatG* due to the geometric docking. In this step, the INH atoms, water and salts were set free to move, whereas the coordinates of the protein and heme group were fixed in space. The bonding interaction between atom N3 of INH with the Fe atom of the heme group was parameterized, and the restrictions for this bonding were imposed by a connection patch within an ideal distance of 2.8 Å [19]. The spatial coordinates of the complex *MtKatG*-heme-INH were then virtually immersed in a periodic box containing TIP3p water and 100 mM NaCl, and minimized by 20,000 steps of CG. The native structure of *MtKatG* docked to heme, INH, CLA and SOD resulting from this first step was used as an input parameter for the next step.

In the second step of simulation, a bonding connection between the heme group and the protein was applied through a PHEM patch available in the CHARMM force field topology. From this step forward, no distance constraint was applied in the interaction between INH and the heme group. All system atoms were then minimized by 20,000 CG steps. In the third step, the atoms of the protein and ligands were fixed in space whereas the water and the salts were subjected to 60 ps equilibrium MD. This step was necessary because there is a large number of solvent molecules, which first respond to changes in the system. In the fourth step, all atoms of the system were minimized again by 20,000 steps. In the fifth and last step, MD was carried out for 20 ns using NPT conditions (1 atm, 300K). The other simulation parameters were adjusted according to our standard protocol [20].

Results and discussion

Analysis of the root mean square deviation (RMSD) calculated for the main chain atoms of *MtKatG* along the simulation indicates that 20 ns was sufficient for the entire system to reach thermodynamic equilibrium, since this parameter stabilized into a plateau that can be seen in all simulations in the last 5 ns (Fig. 1a). The radius of gyration remained constant throughout the simulation, varying around a mean value of 35.5 Å, which indicates that neither the mutations nor the presence of INH bonded to protein was able to drive the system to unfold (Fig. 1b).

The results presented in Fig. 1 indicate that the point mutations did not cause any damage to the protein structure, which remained functional. Therefore, we carried out further analysis regarding the effect of point mutations on the interaction between the protein and the INH ligand.

Figure 3S (supplementary material) shows the distance between the N3 atom of the hydrazine group of INH and the iron

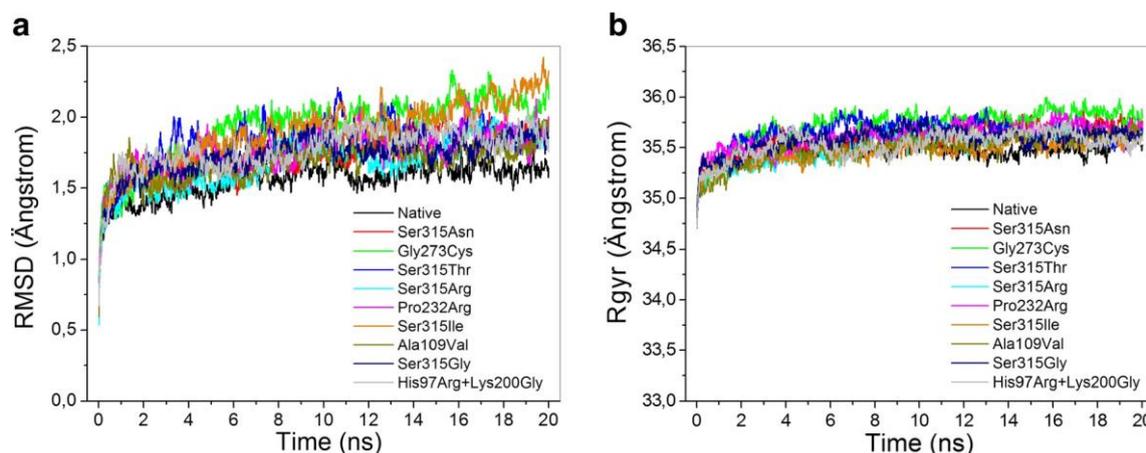


Fig. 1a,b Protein behavior throughout molecular dynamics (MD) simulation. a Root mean square deviation (RMSD) calculated for the main chain atoms. b Radius of gyration calculated for the main chain atoms

atom of the heme group along the simulation. The greater the distance, the less the interaction between them. It is noted that some of the mutations virtually lead to expulsion of INH from its site, as observed by the increased value of this distance over time. The average distance of this contact in the last 5 ns of dynamics (thermodynamic equilibrium region) for each protein variant is shown in Table 1, which makes it clear that the average distance of this bonding increases for all studied mutations.

Figure 2 shows the effect of the mutations on the volume of the INH binding pocket throughout the simulation. It is remarkable that in all of them, the pocket volume decreases significantly when compared to that from the standard strain. The lines of Fig. 2 were integrated to quantify this variation and the values obtained from these areas are presented in Table 1.

Ser315 is a strategic point of resistance due to single nucleotide polymorphisms in the *katG* codon [21, 22]. This residue interacts with INH by a van der Waals contact and also with the heme group through a dipole-charge bonding

between its side chain OH with heme COO^- . This latter interaction plays an important role in the stabilization between heme and protein. This residue is located in the catalytic site of the KatG, where the reaction with INH occurs; thus, mutations in this site may hinder the entry or even prevent the permanence of INH there due to its larger size (MW 137.14) compared with the KatG natural substrate H_2O_2 (MW 34.01) [23].

In the mutation Ser315Gly, both interactions with INH and the heme group are lost, which causes the INH docking to become weaker, and justifies the output of the INH from its binding site at the last 3 ns of dynamics (Fig. S3b). Double mixing stopped-flow experiments also confirm the poor activation of INH by the Ser315Gly mutation [24].

When a mutation occurs and Ser315 is replaced by a residue with a longer side chain such as arginine or threonine, this change is reflected in the higher MIC values ($>32 \mu\text{g mL}^{-1}$), because these residues occupy the space once occupied by INH, making its access to the active site of KatG more difficult. This observation was previously reported by Zhao et al.

Table 1 Characteristics of point mutations of mutant catalase-peroxidase (*MtKatG*) evaluated in this work

Mutation	MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$) [7]	Distance (Å) (INH) N3-Fe (heme) ^a	Integrated volume ^b
Wild type	–	4.1 (0.54)	10,376
Ser315Asn	>32, 16, 4	6.0 (0.27)	8993
Gly273Cys	>32	8.8 (0.26)	9753
Ser315Thr	>32, 32, 16, 8	15.5 (3.52)	9608
Ser315Arg	>32, 32	16.9 (2.78)	6534
Pro232Arg	32	6.1 (0.31)	5133
Ser315Ile	16	5.2 (0.39)	5036
Ala109Val	16	4.3 (0.36)	10147
Ser315Gly	8	8.3 (2.66)	7619
His97Arg + Lys200Glu	8	16.9 (2.62)	7132

^a Average distance in the last 5 ns MD simulation (equilibrium region)

^b Integration of the pocket volume of isoniazid (INH) binding site along the simulation (from Fig. 3)

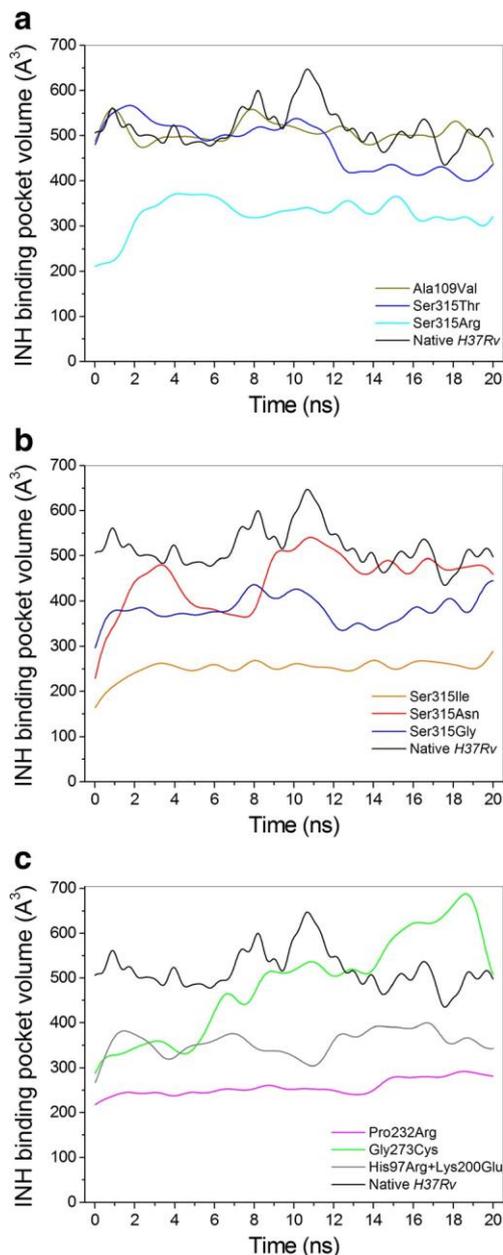


Fig. 2a–c Variation in the volume of INH binding pocket along the simulation relative to native H37Rv. a Ala109Val, Ser315Thr, and Ser315Arg. b Ser315Ile, Ser315Asn, and Ser315Gly. c Pro232Arg, Gly273Cys, and (His97Arg + Lys200Glu)

[25] when the crystallographic structure of the mutant enzyme Ser315Thr was solved, and also by Purohit et al. [26], who performed INH docking assays on native and mutant S315T structures.

In the mutation Ser315Arg, besides the larger size of arginine, the new mutation also brings about a positive charge. However, according to the data presented in Table 1, the higher resistance to INH ($\text{MIC} > 32 \mu\text{g mL}^{-1}$) appears to be caused by the increased size of the replaced residue, not by its charge, since the INH has neutral charge at physiological pH (Fig. S1) making electrostatic repulsion less probable.

The mutation Gly273Cys occurs in a residue located in the loop between helices 18 and 19 in an inner region of the molecule, at the opposite side of the heme group regarded INH position (Fig. 3). Due to the location of this mutation, no direct interference from Cys273 to INH was observed. However, its effect is indirect since the mutant Cys273 side chain promotes a distortion in the planarity of the heme group in order to decrease the pocket volume of catalytic site, which creates a steric barrier to INH entrance. This makes the catalysis more difficult, explaining the observed resistance ($\text{MIC} > 32 \mu\text{g mL}^{-1}$).

The mutation Pro232Arg is located in the loop between the end of beta sheet A and helix 16, along the surface forming the tunnel leading to the INH binding site. Since Arg232 is a larger residue, its longer side chain inserts between the heme group and INH (Fig. 4), which greatly hinders the approach of the INH to the iron atom, where catalysis takes place. This steric hindrance explains the high microbial resistance that arose from this mutation ($\text{MIC} 32 \mu\text{g mL}^{-1}$).

The mutation Ala109Val occurs at the end of helix 8, quite distant from the heme group and INH, and therefore, without any direct contact with these ligands. However, its effect on the affinity of *MtKatG* via INH occurs through an indirect mechanism, also due to steric modifications, where a small residue is replaced by another slightly bigger one. This causes readjustments on helix 8, as reflected in the position of residues Trp107 and His108, which are both in contact with INH and the heme group, respectively (Fig. 5). Because this mutation causes very subtle structural changes, its effect on the resistance to INH is less intense ($\text{MIC} 16 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Mutations at locations distant from the active site, or from other catalytically important sites, may not affect enzyme activity. For instance, the mutation Arg463Leu is located at the end of helix 30—a region exposed to the solvent and distant from catalytic site of *KatG*. This mutation was present in both INH-resistant and INH-susceptible strains of *M. tuberculosis*, leading to the conclusion that this mutation is not an indicator of resistance [27]. This observation sounds plausible when we observe that the vast majority of unique mutations in *MtKatG*

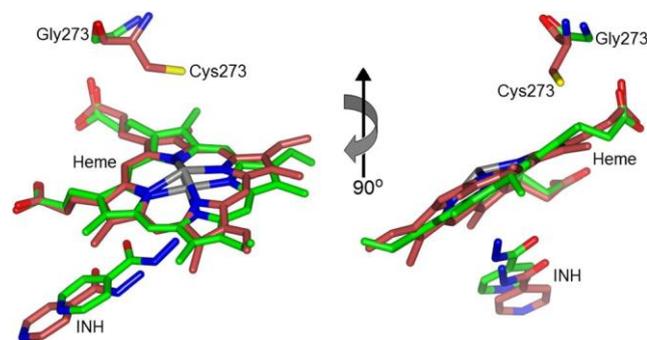
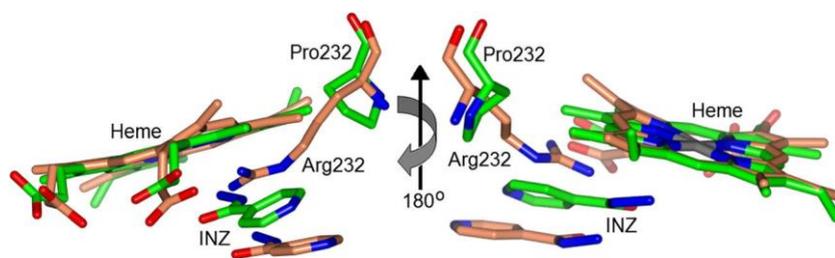


Fig. 3 Mutant structure of *MtKatG* (Gly273Cys) (brown) superimposed on wild type (green), highlighting the stereochemistry distortion in the heme group caused by the mutation

Fig. 4 Mutant structure of *MtKatG* (Pro232Arg) (*coral*) superimposed on wild type (*green*), showing the insertion of the side chain of Arg232 between INH and the heme group



related to INH resistance are located in the N-terminal domain (residues 1–414), a region where the heme group is located. Mutations in the C-terminal domain (residues 415–712) appear to be related to resistance to INH only when linked to mutations in other enzymes such as *inhA* P, *oxyR*-*ahpC*, or *kasA* [7].

The double mutation His97Arg + Lys200Glu had little impact on the structure of *MtKatG*, which is reflected in a less significant resistance to INH (MIC 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$). One of these replacements (His97Arg) is located between helices 7 and 8 at the protein surface exposed to solvent, away from INH or heme. The other replacement (Lys200Glu) is located in a large loop between helix 15 and beta sheet A, also distant from INH or heme. When evaluated individually, it is very unlikely that either of these mutations is responsible for some kind of resistance to INH. However, the simulation results suggest that this double mutation in *MtKatG* prevents the permanent insertion of INH to its site. This fact was observed in two simulations (repetitions). Therefore, it appears to be a concrete result due to a combined effect of these two changes on the protein structure, which causes a synergistic effect reflected in the affinity for INH.

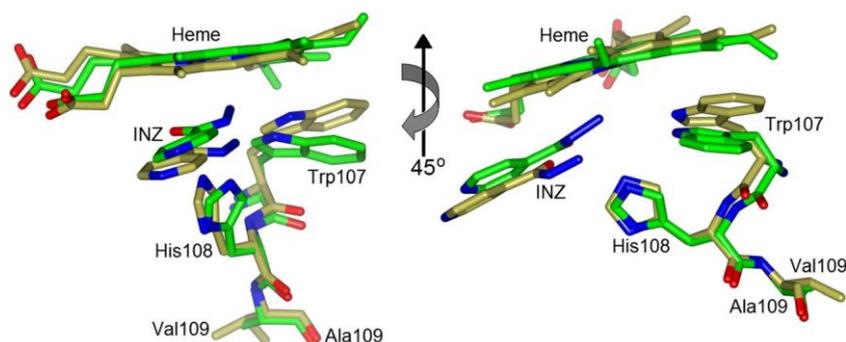
Analysis of root mean square fluctuation (RMSF) evidence found that the C α fluctuations of the substituted residues was no different from that observed in the native form of the protein (Fig. S4 supplementary material), i.e., the fluctuation of the substituted residues was less than the mean value observed for the protein as a whole, and therefore not significant. This fact reinforces the hypothesis that the resistance of *MtKatG* to INH is due to stereochemical impairment caused by the substitution of the side chain in the mutated residues, without affecting the function of the protein as a whole.

It is important to emphasize that resistance to INH, in *M. tuberculosis*, is not essentially caused by mutation in *katG*. Specific mutations in the open reading frame or regulatory regions of other genes, or even an association of these mutations, may also cause resistance. More recently, membrane-based efflux pump systems are clearly recognized to play an important role in pathogenicity and antimicrobial resistance in bacterial species, including *M. tuberculosis*, by the extrusion of toxic substrates and antibiotics from the inner cell [28].

Conclusions

Our simulations suggest that increased resistance (MICs equal or bigger than 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$) is related much more to replacements of residues with bigger side chains (steric effects) than by modifications to the charges or partial charges of these residues (electrostatic effects). The Ser315 is a strategic point for resistance; this residue is located at the access channel of the catalytic site through which the INH passes, so that mutations at this location cause a steric hindrance in the passage of ligands larger than the substrate H_2O_2 . Replacements of Ser315 by smaller residues such as glycine or slightly larger residues such as isoleucine, promote a less dramatic resistance (MIC of 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ or 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$), since these residues take up less space in the catalytic site. Mutations in other residues located in other regions of the molecule can affect the interaction of INH with heme via indirect effects, promoting steric changes that propagate along the main chain of the protein and affect the catalytic site, either by distorting the heme geometry, or by modifications in the volume of the catalytic site, thus leading to low activation of INH.

Fig. 5 Mutant structure of *MtKatG* (Ala109Val) (*gold*) superimposed on wild type (*green*), showing the indirect steric effect due to this replacement on positioning of His108 and Trp107, which shifts the INH and weakens its contact with the iron atom of the heme group



These observations provide a sound starting point for further studies involving the modeling of new anti-TB drugs based on the resistant *MtKatG* structure, which is adapted to circumvent the reference medicine INH.

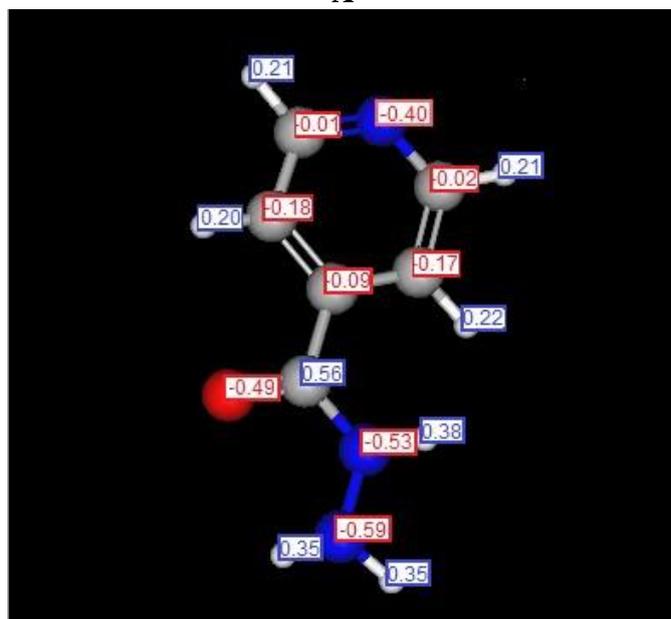
Acknowledgments Fundação Araucária (convênio 147/14), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho-Sao Paulo (CENAPAD-SP) (proj512) and Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC).

References

- Degen T, Bregenzler T (2016) The treatment of tuberculosis. *Praxis* (Bern 1994) 105(8):457–461. doi:10.1024/1661-8157/a002322
- Johnsson K, King DS, Schultz PG (1995) Studies on the mechanism of action of isoniazid and ethionamide in the chemotherapy of tuberculosis. *J Am Chem Soc* 117:5009–5010. doi:10.1021/ja00122a038
- Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, Collins D, de Lisle G, Jacobs WR Jr (1994) *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 263(5144):227–230
- Conde M, Fiterman J, Lima MA (2012) Tuberculosis - Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia Grupo Gen, Rio de Janeiro
- Blanchard JS (1996) Molecular mechanisms of drug resistance in *mycobacterium tuberculosis*. *Annu Rev Biochem* 65:215–239. doi:10.1146/annurev.bi.65.070196.001243
- da Costa AL, Pauli I, Dorn M, Schroeder EK, Zhan CG, de Souza ON (2012) Conformational changes in 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase (*InhA*) from *M. tuberculosis* induced by an inorganic complex: a molecular dynamics simulation study. *J Mol Model* 18(5):1779–1790. doi:10.1007/s00894-011-1200-7
- Cardoso RF, Cooksey RC, Morlock GP, Barco P, Cecon L, Forestiero F, Leite CQ, Sato DN, Shikama Mde L, Mamizuka EM, Hirata RD, Hirata MH (2004) Screening and characterization of mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 48(9):3373–3381. doi:10.1128/AAC.48.9.3373-3381.2004
- Kumari R, Kumar R, Lynn A, Consort OSDD (2014) *g_mmpbsa-A* GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. *J Chem Inf Model* 54(7):1951–1962. doi:10.1021/Ci500020m
- Gutierrez-de-Teran H, Aqvist J (2012) Linear interaction energy: method and applications in drug design. *Methods Mol Biol* 819:305–323. doi:10.1007/978-1-61779-465-0_20
- Bertrand T, Eady NA, Jones JN, Jesmin NJM, Jamart-Gregoire B, Raven EL, Brown KA (2004) Crystal structure of *mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase. *J Biol Chem* 279(37):38991–38999. doi:10.1074/jbc.M402382200
- Vidossich P, Loewen PC, Carpena X, Fiorin G, Fita I, Rovira C (2014) Binding of the antitubercular pro-drug isoniazid in the heme access channel of catalase-peroxidase (KatG): a combined structural and metadynamics investigation. *J Phys Chem B* 118(11):2924–2931. doi:10.1021/jp4123425
- de Beer TA, Berka K, Thornton JM, Laskowski RA (2014) PDBsum additions. *Nucleic Acids Res* 42:D292–296. doi:10.1093/nar/gkt940
- Emsley P, Cowtan K (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60(Pt 12 Pt 1):2126–2132. doi:10.1107/S0907444904019158
- Schmidtke P, Bidon-Chanal A, Luque FJ, Barril X (2011) MDpocket: open-source cavity detection and characterization on molecular dynamics trajectories. *Bioinformatics* 27(23):3276–3285. doi:10.1093/bioinformatics/btr550
- Phillips JC, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, Chipot C, Skeel RD, Kale L, Schulten K (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem* 26(16):1781–1802
- Mackerell AD Jr, Feig M, Brooks CL 3rd (2004) Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. *J Comput Chem* 25(11):1400–1415. doi:10.1002/jcc.20065
- Zoete V, Cuendet MA, Grosdidier A, Michielin O (2011) Swiss Param: a fast force field generation tool for small organic molecules. *J Comput Chem* 32(11):2359–2368. doi:10.1002/jcc.21816
- Neese F (2012) The ORCA program system. *Wiley Interdiscip Rev: Comput Mol Sci* 2(1):73–78. doi:10.1002/wcms.81
- Seixas FA, Santini TD, Moura VP, Gandra EA (2008) Evaluation of the (haem)Fe–Nepsilon(2)(HisF8) bond distances from haemoglobin structures deposited in the protein data bank. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 64(Pt 9):971–976. doi:10.1107/S0907444908022208
- Pacheco Homem D, Flores R Jr, Tosqui P, de Castro RT, Abicht Basso E, Gasparotto A Jr, Augusto Vicente Seixas F (2013) Homology modeling of dihydrofolate reductase from *T. gondii* bonded to antagonists: molecular docking and molecular dynamics simulations. *Mol Biosyst* 9(6):1308–1315. doi:10.1039/c3mb25530a
- Jeeves RE, Marriott AA, Pullan ST, Hatch KA, Allnutt JC, Freire-Martin I, Hendon-Dunn CL, Watson R, Witney AA, Tyler RH, Arnold C, Marsh PD, McHugh TD, Bacon J (2015) *Mycobacterium tuberculosis* is resistant to isoniazid at a slow growth rate by single nucleotide polymorphisms in *katG* codon Ser315. *PLoS One* 10(9), e0138253. doi:10.1371/journal.pone.0138253
- Unissa AN, Selvakumar N, Narayanan S, Suganthi C, Hanna LE (2015) Investigation of Ser315 substitutions within *katG* gene in isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from south India. *Biomed Res Int* 2015:257983. doi:10.1155/2015/257983
- Zhao X, Hersleth HP, Zhu J, Andersson KK, Magliozzo RS (2013) Access channel residues Ser315 and Asp137 in *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG) control peroxidatic activation of the pro-drug isoniazid. *Chem Commun (Camb)* 49(99):11650–11652. doi:10.1039/c3cc47022a
- Suarez J, Rangelova K, Schelvis JP, Magliozzo RS (2009) Antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: peroxidase intermediate bypass causes poor isoniazid activation by the S315G mutant of *M. tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG). *J Biol Chem* 284(24):16146–16155. doi:10.1074/jbc.M109.005546
- Zhao X, Yu H, Yu S, Wang F, Sacchettini JC, Magliozzo RS (2006) Hydrogen peroxide-mediated isoniazid activation catalyzed by *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG) and its S315T mutant. *Biochemistry* 45(13):4131–4140. doi:10.1021/bi051967o
- Purohit R, Rajendran V, Sethumadhavan R (2011) Relationship between mutation of serine residue at 315th position in *M. tuberculosis* catalase-peroxidase enzyme and isoniazid susceptibility: an in silico analysis. *J Mol Model* 17(4):869–877. doi:10.1007/s00894-010-0785-6
- van Doorn HR, Kuijper EJ, van der Ende A, Welten AG, van Soolingen D, de Haas PE, Dankert J (2001) The susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and the Arg–Leu mutation at codon 463 of *katG* are not associated. *J Clin Microbiol* 39(4):1591–1594. doi:10.1128/JCM.39.4.1591-1594.2001
- Rodrigues L, Machado D, Couto I, Amaral L, Viveiros M (2012) Contribution of efflux activity to isoniazid resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Infect Genet Evol* 12(4):695–700. doi:10.1016/j.meegid.2011.08.009

Material Suplementar - Artigo 2

A



B

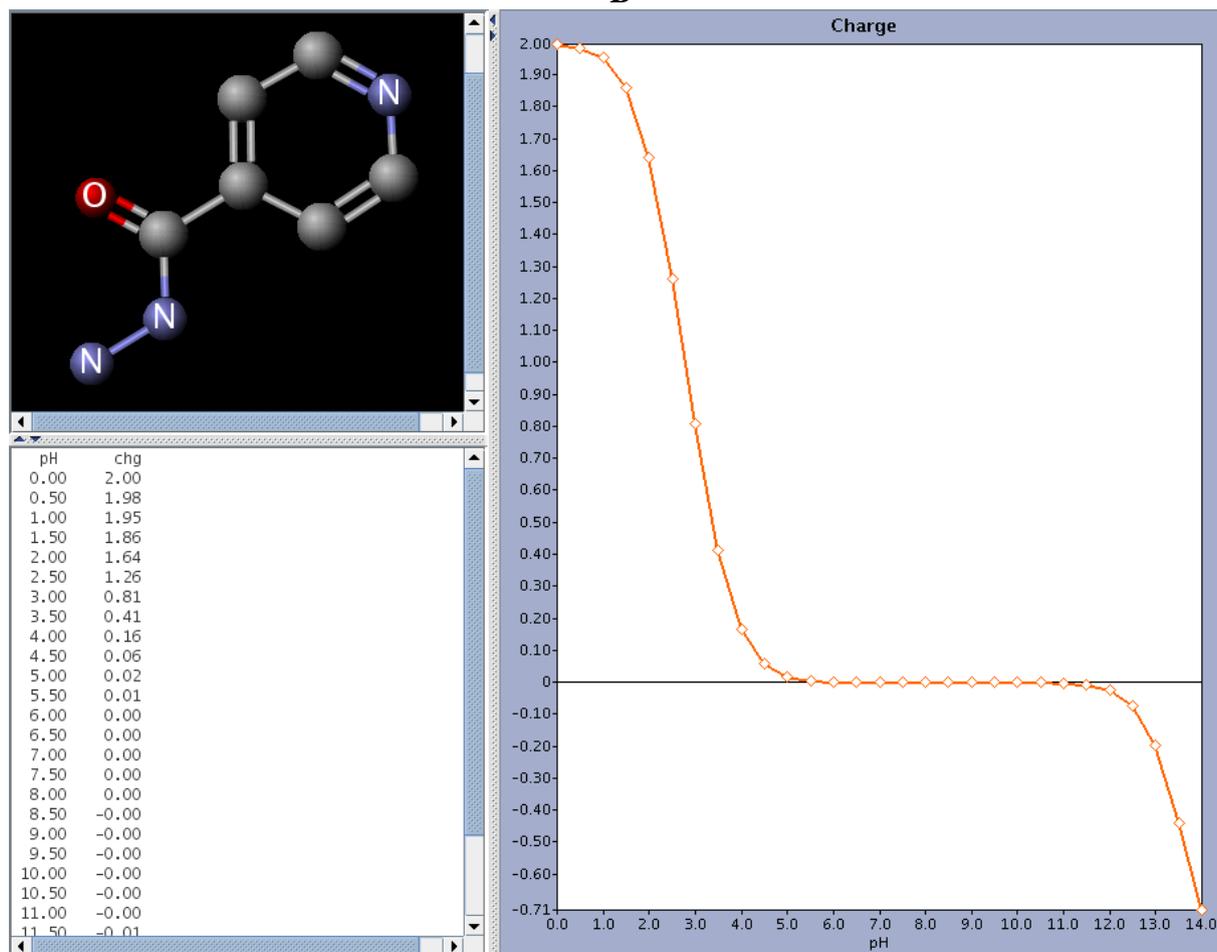


Fig. 1S Partial charge distribution of Isoniazid calculated by ORCA program (A). Estimative of the isoelectric point from Zinc1590.sdf file, calculated by Marvin (<http://www.chemaxon.com>) (B).

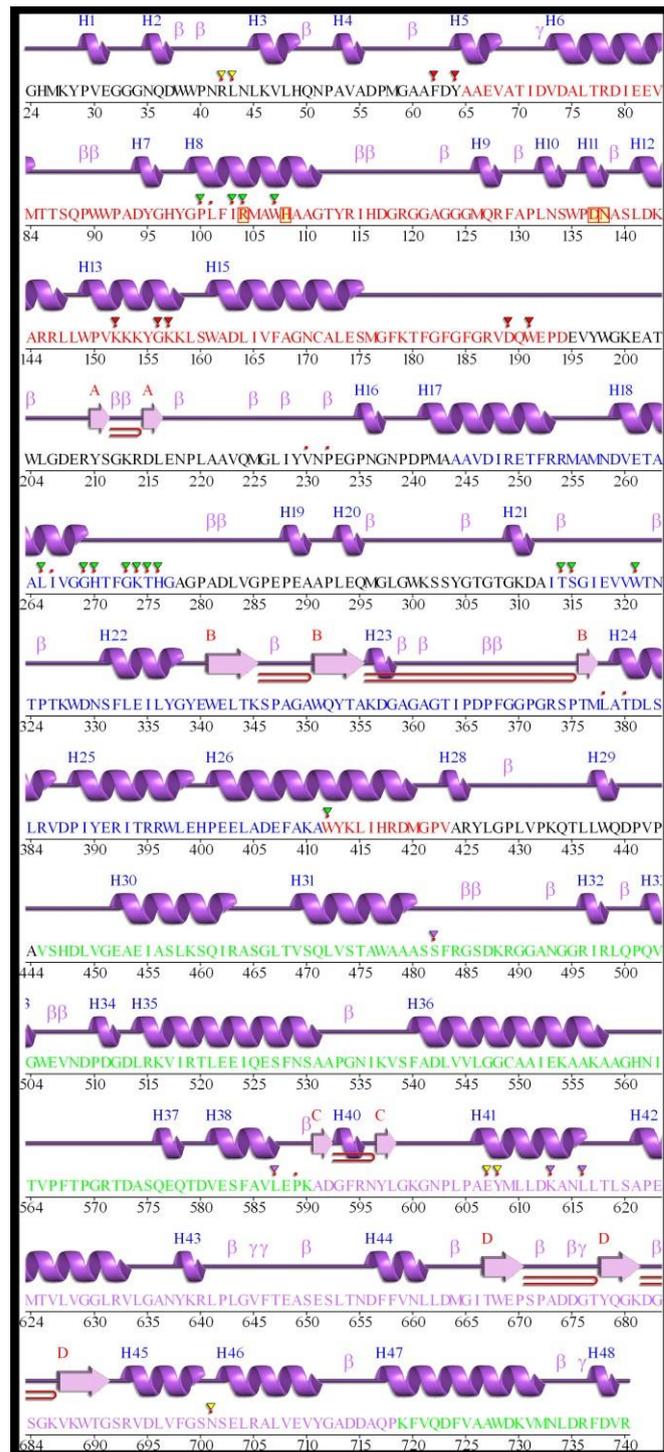


Fig. 2S Secondary structure plot for *MtKatG* (pdbid: 1sj2) by PDBsum [12]

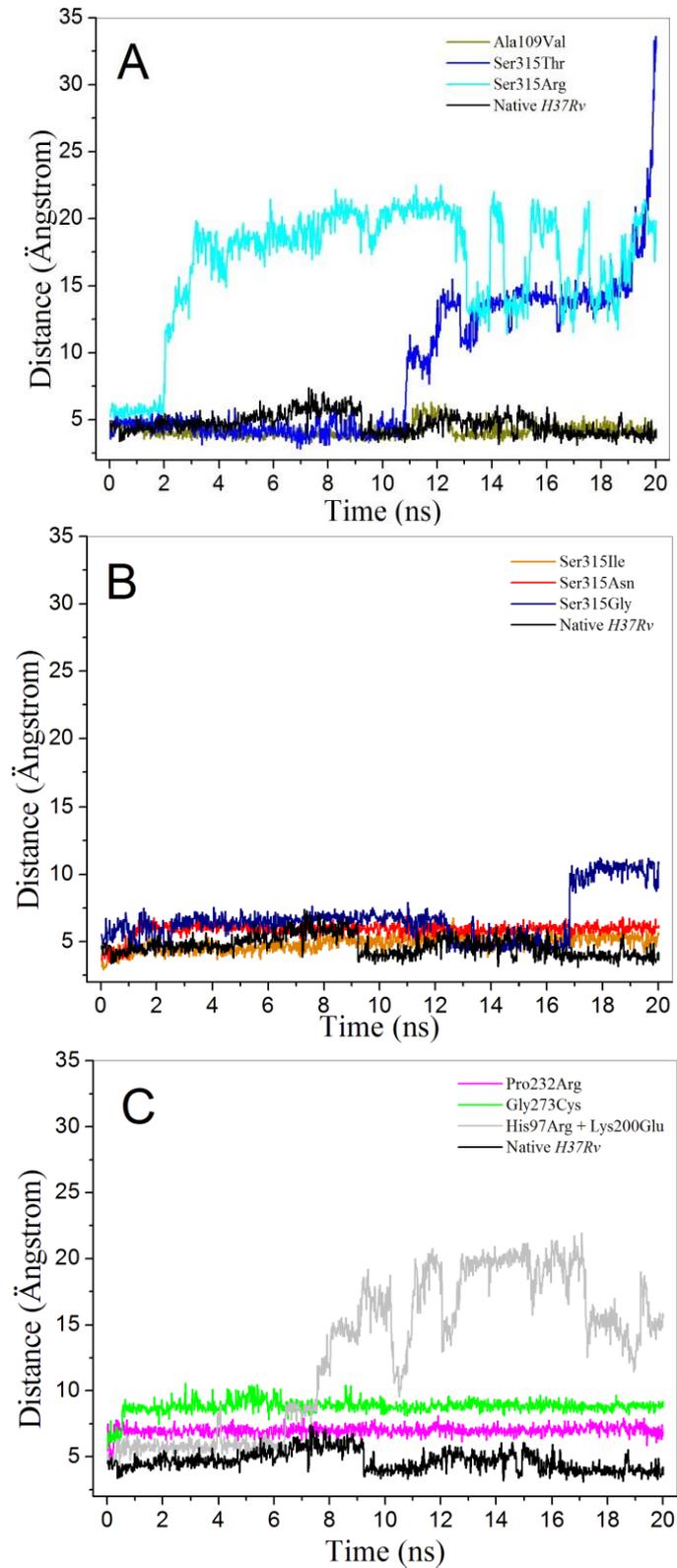


Fig. 3S Distance of the contact (INH)N3–Fe(Heme) due to *MtKatG* mutations (color lines) in comparison with the native structure (black line).




Fig. 4S Rmsf of C α atoms of *MtKatG* in the last five nanoseconds of simulation (equilibrium region). The small plots highlight the region around the mutated residues pointed by arrows.

**OUTRAS PRODUÇÕES EM AUTORIA OU CO-AUTORIA REALIZADAS
DURANTE O DOUTORADO**

29409161805318364

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 012453 6

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 79151312000156

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av Colombo, nº 5790 - Campus Universitário

Cidade: Maringa

Estado: PR

CEP: 87020-900

País: Brasil

Telefone: (44) 3011-3861

Fax: (44) 3011-3861

Email: nit@uem.br

Natureza **P**atente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção **ou** Modelo de Utilidade (54): COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA BASEADA NA MOLÉCULA (S)-2-AMMONIO-3-{{(6-BROMO-2-METHYLQUINOLIN-4-YL)THIO}PROPANOATE E SEU USO NA PREPARAÇÃO DE MEDICAMENTOS PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR MICRO-ORGANISMOS DO GÊNERO PARACOCCIDIOIDES SPP.

Resumo: A presente invenção se enquadra no contexto da química farmacêutica e se refere genericamente a composições farmacêuticas e uso de compostos químicos no combate à infecções causadas por fungos. Mais especificamente, a presente invenção trata-se de uma composição farmacêutica que é útil no tratamento de infecções causadas por microrganismos do gênero Paracoccidioides spp. A composição farmacêutica compreende a molécula (S)-2-ammonio-3-{{(6-bromo-2-methylquinolin-4-yl)thio}propanoate, também denominada na presente invenção como HS9 (molécula 99). A presente invenção descreve ainda o uso da composição, e da molécula HS9 na formulação de um medicamento, aditivo, agente ou formulação para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas, como a Paracoccidioidomicose.

Figura **a** publicar: 2

Dados **do** Procurador

Procurador:

Nome **ou** Razão Social: Fábía dos Santos Sacco

Numero **O**AB: 019543PR

Numero **A**PI:

CPF/CNPJ: 05153033805

Endereço: Av. Getúlio Vargas, 266, Conjunto 704/705, Centro

Cidade: Maringa

Estado: PR

CEP: 87013-130

Telefone: (44) 3226 4412

Fax:

Email: nit@uem.br

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 7

Nome: FLAVIO AUGUSTO VICENTE SEIXAS

CPF: 13342792841

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Paraiba, 5182

Cidade: Umuarama

Estado: PR

CEP: 87501-390

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: favseixas@gmail.com

Inventor 2 de 7

Nome: PAULO SÉRGIO ALVES BUENO

CPF: 07062495930

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Luís Ambrósio, nº 81

Cidade: Cambira

Estado: PR

CEP: 86890-000

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: psabueno@gmail.com

Inventor 3 de 7

3 d

Nome: ARETHUSA LOBO PIMENTEL

CPF: 04753209997

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Domingos Cano Lopes, nº2048

Cidade: Umuarama

Estado: PR

CEP: 87506-475

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: arethusa_lobo@hotmail.com

Inventor **4 de 7**

Nome: GISELE DE FREITAS GAUZE BANDOCH

CPF: 03515837930

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Ângelo Pelissari , 49

Cidade: Maringá

Estado: PR

CEP: 87080-126

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: gfgbandoch@uem.br

Inventor **5 de 7**

Nome: MARIANE CRISTOVÃO BAGATIN

CPF: 07136677963

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino médio

Endereço: Rua Pascoal Antonio, 54

Cidade: Terra Boa

Estado: PR

CEP: 87240-000

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: marianebagatin@gmail.com

Inventor **6 de 7**

Nome: ÉRIKA SEKI KIOSHIMA COTICA

CPF: 03883431923

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Benjamin Constant, 164

Cidade: Maringá

Estado: PR

CEP: 87020-060

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: eskcotica@uem.br

Inventor 7 de 7

Nome: FRANCIELE ABIGAIL VILUGRON RODRIGUES

CPF: 08435765962

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Tietê 645 - Apto. 10

Cidade: Maringá

Estado: PR

CEP: 87020-210

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: francieleavr@gmail.com

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	2271-18-PRO_GRU_cod200.pdf
Procuração	procuracao_UEM.pdf
Termo de posse	termo_de_posse.pdf
Diário oficial-nomeação Reitor	diario_oficial.pdf
Relatório Descritivo	2271-18- PRO_relatorio_descritivo_180618_vFINAL.pdf
Reivindicação	2271-18- PRO_reivindicacoes_180618_vFINAL.pdf
Desenho	2271-18-PRO_desenhos_180618_vFINAL.pdf
Resumo	2271-18-PRO_resumo_180618_vFINAL.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.



Contents lists available at ScienceDirect

Animal Reproduction Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/anireprosci

Purification, structural and biophysical characterisation of the major seminal plasma protein from Texel rams

Manoel Augusto Klemppovus Villela Condessa^a, Arethusa Lobo Pimentel^b,
Flávio Augusto Vicente Seixas^b, Antonio Campanha Martinez^{a,†}

^a Department of Veterinary Medicine, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Brazil

^b Department of Biochemistry, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Ovis aries
Spermadhesin
Protein folding

ABSTRACT

Spermadhesins are a group of low molecular weight proteins present in seminal plasma. In Texel rams, they represent more than 70% of the seminal plasma proteins. Although their functions have not yet been fully clarified, there is much discussion about the role of these proteins in maintaining sperm viability during and after the semen freezing process. This work sought to isolate the major component of the seminal plasma from rams of the Texel breed (*O. aries* SPD2) and to evaluate its structural and biophysical characteristics in order to better understand its role in spermatid viability. The protein was isolated by centrifugation and ion exchange chromatography and its biophysical properties were evaluated by circular dichroism spectrometry. Molecular dynamics simulations of the modelled protein compared to the homologous bovine protein were also carried out. The results showed that *O. aries* SPD2 has a transition temperature (T_m) of 65 °C and a ΔH_m of 322.5 kJ mol⁻¹, similar to the results for other spermadhesins described in the literature. The estimated composition of the secondary structure elements for the native protein is in agreement with that observed for the theoretical model. Its structural characteristics were preserved in simulations at temperatures of 27 °C and 40 °C, as was the case for bull spermadhesin. Taken together, these results suggest that the major component of the spermadhesins of Texel rams (*O. aries* SPD2) may play an important role in maintaining the viability of spermatozoa in fresh semen as well as after thawing.

1. Introduction

Semen is composed of spermatozoa and seminal plasma, a complex mixture rich in organic and inorganic elements produced by the testicles, epididymides and adjoining glands. These substances are important in the maintenance and viability of sperm, and the proteins are the major component of the seminal plasma. The composition of the seminal plasma proteins (SPPs) varies in different species and may also vary among individuals of the same species (Cardozo et al., 2006; Caballero et al., 2008). The seminal plasma has factors that influence both the sperm function and also the female genital tract during spermatid transport. Many of these factors are related to the activity of the seminal plasma proteins (Bergeron et al., 2005). SPPs may be divided into three families in ungulate animals: cysteine-rich secreted proteins (CRISPs), proteins containing the fibronectin type II domain (FN II), and proteins of the spermadhesin family (Bergeron et al., 2005; Haase et al., 2005).

[†] Corresponding author at: Universidade Estadual de Maringá – UEM, Laboratory of Animal Reproduction, Estrada da Paca, s/n, São Cristóvão, 87507-190, Umuarama, PR, Brazil.

E-mail address: acmartinez@uem.br (A.C. Martinez).

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.10.013>

Received 23 June 2017; Received in revised form 22 October 2017; Accepted 24 October 2017

0378-4320/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.



Targeting the Homoserine Dehydrogenase of *Paracoccidioides* Species for Treatment of Systemic Fungal Infections

Mariane C. Bagatin,^a Arethusa L. Pimentel,^b Débora C. Biavatti,^b Ernani A. Basso,^a Erika S. Kioshima,^c Flavio A. V. Seixas,^b Gisele de F. Gauze^a

Department of Chemistry, State University of Maringá, Maringá, PR, Brazil^a; Department of Biochemistry, State University of Maringá, Maringá, PR, Brazil^b; Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá, Maringá, PR, Brazil^c

ABSTRACT This work evaluated new potential inhibitors of the enzyme homoserine dehydrogenase (HSD) of *Paracoccidioides brasiliensis*, one of the etiological agents of paracoccidioidomycosis. The tertiary structure of the protein bonded to the analogue NAD, and L-homoserine was modeled by homology. The model with the best output was subjected to gradient minimization, redocking, and molecular dynamics simulation. Virtual screening simulations with 187,841 molecules purchasable from the Zinc database were performed. After the screenings, 14 molecules were selected and analyzed by the use of absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity criteria, resulting in four compounds for *in vitro* assays. The molecules HS1 and HS2 were promising, exhibiting MICs of 64 and 32 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, respectively, for the Pb18 isolate of *P. brasiliensis*, 64 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ for two isolates of *P. lutzii*, and also synergy with itraconazole. The application of these molecules to human-pathogenic fungi confirmed that the HSD enzyme may be used as a target for the development of drugs with specific action against paracoccidioidomycosis; moreover, these compounds may serve as leads in the design of new antifungals.

KEYWORDS homoserine dehydrogenase, antifungal, virtual screening, paracoccidioidomycosis

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic granulomatous mycosis and is considered the most important fungal infection in Latin America. Its etiologic agents are *Paracoccidioides brasiliensis* (1) and *P. lutzii* (2, 3). PCM is an important public health problem in Brazil and is the eighth leading cause of death from predominantly chronic or recurrent disease, falling between infectious and parasitic diseases as a leading cause of death, and among the systemic mycoses, the rate of mortality from PCM is the highest (4). The south of Brazil has shown the highest regional distribution of PCM, and the southeast is seeing a progressive decrease in the incidence of disease (5–7).

Although there are a variety of clinical forms of PCM, two main manifestations are well established: the acute or subacute form (which is seen in juveniles) and the chronic form (which is seen in adults) (8). The acute form primarily affects children and adolescents of both sexes, progresses rapidly through the lymphatic and/or hematogenous system, and has a high mortality rate as it compromises the reticuloendothelial system (spleen, liver, lymph nodes, and bone marrow) (9). The chronic form occurs in 90% of cases, especially in males, between 30 and 60 years of age, has a slow progression, and mainly affects the lungs but can be multifocal, spreading to any organ, especially mucocutaneous tissue. A patient with PCM may complain of insomnia, weakness, a lack of appetite, dysphagia, dyspnea, cough, hemoptysis, fever, weight loss,

Received 25 January 2017 Returned for modification 8 May 2017 Accepted 9 June 2017

Accepted manuscript posted online 26 June 2017

Citation Bagatin MC, Pimentel AL, Biavatti DC, Basso EA, Kioshima ES, Seixas FAV, Gauze GF. 2017. Targeting the homoserine dehydrogenase of *Paracoccidioides* species for treatment of systemic fungal infections. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e00165-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00165-17>.

Copyright © 2017 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Gisele de F. Gauze, giselegauze@yahoo.com.br.



THE ALANINE RACEMASE FROM *Vibrio cholerae* AS A TARGET AGAINST CHOLERA: MOLECULAR DOCKING AND MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS

Pimentel, A. L.¹; Biavatti, D. C.¹; Seixas, F. A. V.¹

¹Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brazil.

Cholera is a neglected disease with incidence worldwide. There are an increasing number of reports of *Vibrio cholerae* strains resistant to the current antibiotics, which demonstrate the urgency for new therapeutic alternatives. In this context, the enzyme alanine racemase is a well known protein present in this bacterium but absent in humans, making it an interesting target for the development of new drugs. The aim of this work was to modeling the structure of the enzyme alanine racemase from *V. cholerae* (*VcholeraeAR*) to use it as a drug target in virtual screening simulations (VS). The sequence of *VcholeraeAR* was obtained at UniProt database and modeled as a homodimer bonded to cofactor pyridoxal 5'-phosphate (PLP) and inhibitor D-cycloserine (4AX), through Modeller software. There were generated 1000 models and the best one was fully minimized by NAMD2 software for subsequent use in molecular dynamics simulations (MD) and VS. The library of natural products from Zinc database was used in VS through AutoDock and Molegro programs. The results of the 50ns MD for the protein in the Apo form or in the complex PLP-4AX, suggest that the presence of the ligands is needed to stabilize the quaternary fold and, the residues Arg128, Tyr341 and Met301 are the most important in the anchoring the inhibitor. The radius of gyration of protein-PLP-4AX complex remained stable throughout the simulation indicating that the presence of the ligands did not lead the protein to unfold. The virtual screening of 112,572 compounds with AutoDock program selected 317 of which six were found commonly by Molegro program. These six compounds were successfully filtered by ADMETox criteria and will be purchased for future *in vitro* tests. These results led to the identification of six drug hits with potential use against one of the most dispersed neglected diseases worldwide.

Key words: Alanine racemase; *Vibrio cholerae*; Molecular docking.

Acknowledgements: CAPES, Fundação Araucária and CENAPAD/SP.





**ALANINE RACEMASE FROM *Staphylococcus aureus* STRAIN MRSA MW2:
MOLECULAR DOCKING AND MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS.**

Biavatti, D. C.¹; Pimentel, A. L.¹; Seixas, F. A. V.¹

¹Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brazil.

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a bacterium present at several hospital environments. The resistance to many antibiotics of this microorganism makes the development of new drugs an urgent matter. In this context, the enzyme alanine racemase is an attractive target for the discovery of new drugs. Therefore, the aim of this work was to modeling the structure of the alanine racemase-1 from *S. aureus* (*SaureusAR1*) to be used in virtual screening techniques (VS) and molecular dynamics simulations (MD) in order to identify new drug hits against MRSA. The quaternary structure of the enzyme *SaureusAR1* strain MRSA MW2 (Uniprot P63481) was modeled in the presence of the cofactor pyridoxal phosphate (PLP) at active aldimine state, and the ligand *D*-cycloserine (4AX) by Modeller software. The best of 2500 models was fully minimized by NAMD2 program, and then, used in the VS of the Natural Products library from Zinc Database through Autodock and Molegro programs. The docking protocol was validated by redocking the 4AX. The MD simulations were performed through NAMD2 software by 50ns in NPT conditions for APO or bonded to inhibitor complexes. The VS selected five compounds best-ranked than 4AX by both programs, which were successfully filtered by ADMETox criteria by the program Osiris Property Explorer. The analysis of MD simulations showed that all complexes were stable and the presence of the ligands did not lead the protein to unfold. All the selected compounds interact with both protein chains through a greater number of hydrogen bonds, a fact that helps in stabilizing the quaternary structure and also suggests a greater affinity than 4AX. After the selection and validation procedures, the compounds were purchased for future *in vitro* assays. The results of this work provide five drug hits that may represent a direct biotechnology contribution against MRSA infections.

Key words: Alanine racemase; *Staphylococcus aureus*; Molecular docking.

Acknowledgements: CAPES, Fundação Araucária and CENAPAD/SP.





MODELAGEM POR HOMOLOGIA DA ENZIMA ALANINA RACEMASE DE *VIBRIO CHOLERAE* COMPLEXADA COM LIGANTES: SIMULAÇÕES DE ANCORAGEM E DINÂMICA MOLECULAR

Homology modeling of the enzyme Alanine racemase to Vibrio cholerae complexed with ligands: Docking and molecular dynamics simulations

PIMENTEL, Arethusa Lobo¹; BIAVATTI, Débora Carina¹; MORITZ, Cristiane Mengue Feniman²; SEIXAS, Flávio Augusto Vicente³.

¹Doutoranda, Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica – UEM
(arethusa_lobo@hotmail.com)

²Professora Adjunta, Departamento de Tecnologia – UEM

³Professor Associado, Departamento de Bioquímica – UEM

Introdução: A cólera é uma doença negligenciada que tem como agente etiológico o *Vibrio cholerae*, uma enterobactéria Gram-negativa causadora da infecção que apresenta, entre outros sintomas, diarreia e vômito, podendo levar o paciente a óbito, principalmente por desidratação. Devido às suas principais formas de transmissão, por via fecal-oral ou por meio da ingestão de água ou alimentos contaminados, os surtos de cólera são comuns em regiões tropicais, subtropicais e em países em desenvolvimento com condições sanitárias insalubres. Atualmente o tratamento inclui a reidratação por via oral ou endovenosa associada à administração de antibióticos. Contudo, cepas resistentes aos antibióticos disponíveis têm tornado a cólera um grave problema de saúde pública. A Alanina racemase (EC 5.1.1.1) é uma enzima presente em bactérias, mas ausente em humanos, o que a torna um importante alvo para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. **Objetivo:** Este trabalho teve por objetivo modelar a estrutura tridimensional da enzima Alanina racemase de *V. cholerae* (*VcholeraeAR*) por meio da técnica de modelagem por homologia para ser utilizada como alvo de drogas em simulações de ancoragem (docking), varredura virtual (VS) e dinâmica molecular (DM). **Método:** A sequência de aminoácidos da *VcholeraeAR* foi obtida a partir da base de dados UniProt (Q9KUY6) e modelada na forma de aldimina ativa ligada ao seu cofator Piridoxal 5'fosfato (PLP) e ao inibidor D-Cicloserina (4AX), por meio do software Modeller 9.13. Foram gerados 1.000 modelos e selecionado o melhor, que foi totalmente minimizado pelo software NAMD2 para posterior utilização em simulações de DM e VS. A biblioteca obtida a partir do Zinc Database foi utilizada para a VS através dos programas AutoDock-4.3.2 e Molegro 6.0. **Resultados:** Os resultados das simulações de DM ao longo de 50ns para a proteína na sua forma Apo ou do complexo PLP-4AX, sugerem que a presença dos ligantes é necessária para estabilizar sua estrutura quaternária e, que os resíduos Arg128, Tyr341 e Met301 são os mais importantes na ancoragem ao inibidor. O raio de giro do complexo proteína-PLP-4AX permaneceu estável durante a simulação, indicando que a presença dos ligantes não levou a proteína a se desenovelar. A VS de 112.572 compostos realizada através do programa AutoDock resultou na seleção de 317 compostos, os quais foram comumente encontrados pelo programa Molegro. Destes, cinco compostos foram filtrados com sucesso pelos critérios ADMETox por meio do servidor Osiris Property Explorer. Atualmente, ensaios *in vitro* estão sendo realizados com dois destes compostos, adquiridos para determinar seu possível potencial inibitório previamente observado nos estudos *in silico*. **Conclusão:** Nossos resultados levaram a identificação de cinco candidatos a drogas com potencial aplicação terapêutica contra uma doença negligenciada amplamente disseminada em todo o mundo.

Palavras-Chave: Alanina racemase, Cólera, Ancoragem molecular, Modelagem por homologia.

Keywords: Alanine racemase, Cholera, Molecular docking, Homology modeling.

Acknowledgements: CAPES, Fundação Araucária, CNPq and CENAPAD/SP



MODELAGEM POR HOMOLOGIA DA ENZIMA ALANINA RACEMASE DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* MRSA COMPLEXADA COM LIGANTES: SIMULAÇÕES DE ANCORAGEM E DINÂMICA MOLECULAR

Homology modeling of the enzyme Alanine racemase Staphylococcus aureus MRSA complexed with ligands: Docking and molecular dynamics simulations

BIAVATTI, Débora Carina¹; PIMENTEL, Arethusa Lobo¹, WOSIACKI, Sheila Rezler²; SEIXAS, Flávio Augusto Vicente³

¹Doutoranda, Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica – UEM (carina_biaivatti@hotmail.com)

²Professor Associado, Departamento de Medicina Veterinária – UEM

³Professor Associado, Departamento de Bioquímica – UEM

Introdução: O *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) é uma bactéria multiresistente aos agentes antimicrobianos disponíveis atualmente e constitui em uma importante causa de infecções, tanto em ambiente hospitalar quanto na comunidade. Diante disso, há a necessidade urgente do desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos contra tais patógenos. A alanina racemase é um atraente alvo de drogas contra o MRSA, pois é fundamental para sobrevivência da bactéria e está ausente em seres humanos. Tal enzima é responsável pela racemização da L-alanina em D-alanina, principal constituinte do peptidoglicano, componente essencial na biossíntese da parede celular bacteriana. **Objetivos:** Este trabalho teve por objetivo modelar a estrutura da enzima Alanina racemase-1 de *S. aureus* MRSA cepa MW2 (*SaureusAR1*), ligada ao inibidor (D-cicloserina) e ao seu cofator Piridoxal fosfato (PLP) pelo método de modelagem por homologia para sua posterior utilização na varredura virtual (VS) para seleção de ligantes com potencial ação inibitória contra o MRSA. **Materiais e Métodos:** A estrutura quaternária da enzima *SaureusAR1* cepa MW2 (Uniprot P63481) foi modelada como um homodímero na presença do cofator PLP e do ligante D-cicloserina (4AX) por meio do software Modeller v.9.13. O melhor de 2500 modelos foi minimizado pelo programa NAMD2 e, posteriormente, utilizado na VS da biblioteca de produtos naturais comercializáveis do Zinc database com 154.000 compostos, por meio dos programas AutoDock-4.3.2 e Molegro v.6.0. O protocolo de ancoragem foi validado por redocking do ligante 4AX. As simulações de dinâmica molecular (MD) foram realizadas por meio do software NAMD2 por 50ns e em condições NPT para a forma Apo e complexada com ligantes. Os 5 compostos melhor ranqueados pela VS foram filtrados com sucesso pelos critérios ADMETox por meio do programa Osiris Property Explorer. As análises das simulações de DM revelaram que os complexos foram estáveis na presença dos ligantes, sugerindo que estes, não conduzem a proteína a se desenovelar e são importantes na estabilização do dímero. Os valores de RMSD mostraram que todos os complexos atingiram o equilíbrio termodinâmico ao longo da simulação. Além disso, os compostos selecionados interagem com ambas as cadeias da proteína promovendo um maior número de pontes de hidrogênio, o que ajuda a estabilizar a estrutura quaternária e também sugere uma maior afinidade pela enzima do que a 4AX. Ensaio *in vitro* com os compostos selecionados e validados estão em andamento, a fim de determinar a possível atividade inibitória destes compostos identificados pelos estudos *in silico*. **Conclusões:** Os resultados deste trabalho forneceram cinco possíveis inibidores contra *SaureusAR1* que poderão representar uma contribuição biotecnológica direta para aumentar o arsenal de combate às infecções causadas pelo MRSA. **Palavras-Chave:** Ancoragem molecular, Alanina racemase, MRSA. **Keywords:** Molecular docking, Alanine racemase, MRSA. **Acknowledgements:** CAPES, Fundação Araucária, CNPq and CENAPAD/SP

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINAS (HP- β -CD) CONTRA *Staphylococcus* spp. MRS

PIMENTEL, Arethusa Lobo¹; WOSIACKI, Sheila Rezler²; FENELON, Vanderson Carvalho³; MATIOLI, Graciette⁴; MORITZ, Cristiane Mengue Feniman⁵; SEIXAS, Flávio Augusto Vicente⁶.

¹ Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – UEM. e-mail: arethusa_lobo@hotmail.com

² Docente do Departamento de Medicina Veterinária – UEM. e-mail: srwosiacki@uem.br

³ Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UEM. e-mail: vanderson2912@gmail.com

⁴ Docente do Departamento de Farmácia – UEM. e-mail: gracietteuem@gmail.com

⁵ Docente do Departamento de Tecnologia – UEM. e-mail: crisfeniman@yahoo.com.br

⁶ Docente do Departamento de Bioquímica – UEM. e-mail: favseixas@gmail.com

As ciclodextrinas possuem diversas aplicações em muitas áreas da indústria farmacêutica devido a sua grande capacidade de complexação. Através da conformação cônica peculiar de seu anel de açúcar, expressa uma cavidade lipofílica e uma superfície externa hidrofílica, permitindo sua complexação espontânea com compostos pouco solúveis em ambientes aquosos, entre outras características físico-químicas interessantes. As bactérias desenvolveram um arsenal de mecanismos de resistência aos antimicrobianos disponíveis. Em particular, o *Staphylococcus* spp. resistente a meticilina (MRS), uma bactéria multirresistente que é atualmente uma importante causa de infecções, constituindo um grave problema de saúde pública. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi determinar a atividade antimicrobiana das hidroxipropil- β -ciclodextrinas (HP- β -CD) contra *Staphylococcus* spp., para sua posterior utilização em estudos envolvendo a complexação com compostos candidatos a inibidores. Foram utilizadas duas cepas de *Staphylococcus* spp., o *S. aureus* ATCC 43300 e uma amostra clínica de *S. scheiferi* resistente à meticilina (MRS), caracterizada fenotipicamente por concentração inibitória mínima (MIC) para oxacilina ($\geq 64 \mu\text{g/mL}$) e por Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para o gene *mecA*, proveniente da coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia Animal da Universidade Estadual de Maringá (UEM) (Umuarama, Paraná, Brasil). Os testes foram realizados em triplicata, utilizando a metodologia de microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (MIC), bem como a da concentração bactericida mínima (CBM). A concentrações utilizadas nos testes foram determinadas com base na composição média de HP- β -CD contidas em dois complexos com compostos inibidores fornecidos pelo Laboratório de Biotecnologia Enzimática (LaBE) da UEM (Maringá, Paraná, Brasil), o qual representou 46.326, 23.163, 11.581, 5.790, 2.895, 1.447, 723, 361, 180 e 90 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Não foi observada inibição do crescimento dos *Staphylococcus* spp. pelas HP- β -CD nos testes para a determinação da MIC e CBM em nenhuma das concentrações testadas. Este resultado mostra que as HP- β -CD por si só não apresentam atividade bacteriostática ou bactericida, mesmo em altas concentrações, podendo sua utilização ser uma opção interessante em estudos posteriores envolvendo a complexação com compostos candidatos a inibidores, sem que haja interferência direta na possível atividade, porém como uma ferramenta no auxílio da solubilidade, estabilidade, segurança e/ou biodisponibilidade destes.

Palavras-chave: Ciclodextrinas; MIC; CBM; MRSA; Complexo de inclusão.

Agradecimentos: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES; Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná.

DESENVOLVIMENTO DE ANTIBACTERIANOS TENDO COMO ALVO A ESTRUTURA DA ENZIMA *D*-ALANIL, *D*-ALANINA LIGASE

MEZALIRA, Taniara Suelen¹; PIMENTEL, Arethusa Lobo²; MORITZ, Cristiane Mengue Feniman³; WOSIACKI, Sheila Rezler¹; SEIXAS, Flávio Augusto Vicente²

¹Depto. de Medicina Veterinária, ²Depto. de Bioquímica, ³Depto. de Tecnologia, Universidade Estadual de Maringá, Umuarama, PR.

A Salmonelose é uma das principais zoonoses de saúde pública em todo o mundo, causada por bactérias do gênero *Salmonella*, que estão entre as principais bactérias causadoras de Doenças Transmitidas por Alimentos. Em casos de intoxicação, além de fluidos para a hidratação e reposição de eletrólitos, muitas vezes é necessário a administração de antibióticos. Todavia, a principal preocupação na atualidade é o surgimento de sorotipos de *Salmonella* resistentes e/ou multirresistentes a diversas classes de antibióticos, justificando a busca por novas alternativas de tratamento. Nesse contexto, a enzima *D*-alanil *D*-alanina ligase (*DAI-DAI*-ligase) é essencial na biossíntese dos peptidoglicanos presentes em *Salmonella sp.* e ausentes em humanos, fato que a torna um interessante alvo de drogas. O objetivo deste trabalho foi determinar a estrutura da enzima *DAI-DAI*-ligase (EC 6.3.2.4) de *Salmonella sp.* para ser utilizada como alvo de drogas em simulações *in silico*. A sequência de aminoácidos da enzima foi obtida no Uniprot (uniprot_id: a0a0l2k6z1) e alinhada com o molde cristalográfico da enzima homóloga de *E. coli* (pdb_id: 4c5c) ligada ao substrato *D*-alanil *D*-alanina e cofatores ATP e Mg²⁺. A modelagem foi realizada por meio do Software Modeler. Foram gerados 1000 modelos onde o melhor foi utilizado em estudos de varredura virtual em larga escala por meio dos programas Autodock e Vina. Para isso, o protocolo de busca foi validado por redocking do substrato na enzima modelada e, duas bibliotecas, a de produtos naturais da base de dados Zinc e o catálogo da Sigma-Aldrich foram utilizados. Como resultados, a estrutura da enzima apresentou excelente qualidade estereoquímica. A partir dela, foram avaliadas 196.208 moléculas onde, duas delas, a Glicil-*D*-Phenilalanina e a Lys-Val-Hidrocloreto foram as mais bem avaliadas (scores: -7,2 e -11,7 Kcal.mol⁻¹) em comparação com o substrato *D*-Ala-*D*-ala. Estas duas moléculas foram adquiridas e aguardam a próxima etapa deste projeto onde serão testadas em cepas de enterobactérias, incluindo a *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Typhimurium, por meio de ensaios *in vitro* de Concentração Inibitória Mínima (MIC). Os resultados desta pesquisa identificaram duas moléculas candidatas a inibidores da enzima *DAI-DAI*-ligase, podendo contribuir para o desenvolvimento de novos antibióticos contra bactérias.

Palavras-chave: Desenvolvimento de fármacos, antibiótico, salmonelose.

Agradecimentos: CAPES, CNPq, Fundação Araucária, LNCC, CENAPAD-SP

EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA ENZIMA UREASE DE SOJA PARA APLICAÇÕES ANTIMICROBIANAS

ÂNGELO, Elisangela Andrade¹; PIMENTEL, Arethusa Lobo²; SEIXAS, Flávio Augusto Vicente²

¹IFPR, Umuarama, PR; ²Depto. de Bioquímica, UEM, Umuarama, PR.

As ureases (EC.3.3.1.5) são enzimas hidrolíticas dependentes de níquel, que catalisam a quebra da ureia em amônia e carbamato, o qual se decompõe espontaneamente em ambiente neutro em amônia e dióxido de carbono. Além da função enzimática, as ureases apresentam ação inseticida e fungitóxica, independentes de sua função catalítica. A atividade fungitóxica geralmente ocorre em níveis micromolares e já foi observada em diferentes ureases vegetais. A soja (*Glycine max*) apresenta duas isoformas principais da urease: a ubíqua, presente em praticamente todos os tecidos da planta, e a embrionária, encontrada nas sementes. O fato da urease ser uma proteína vegetal faz com que ela possa ser utilizada como conservante natural de alimentos, pois não há relatos de qualquer tipo de toxicidade por parte dos componentes da semente de soja, na alimentação de humanos ou de animais. Tendo em vista as potenciais aplicações antimicrobianas das ureases, o presente trabalho tem por objetivo estudar a ação fungitóxica da urease de soja e de polipeptídeos derivados da mesma sobre fungos filamentosos e leveduriformes patogênicos que afetam humanos e animais. Para isso, 15 gramas de semente de soja foram trituradas e lavadas com clorofórmio para remoção dos lipídeos. O extrato desengordurado foi utilizado para extração de proteínas por meio de agitação constante com tampão fosfato 20mM + 1mM β -mercaptoetanol, pH 7,5 à 4 °C por 12 horas. A fração protéica solúvel foi separada por meio de centrifugação à 30.000 g por 30 minutos. O extrato foi pré-purificado por meio de passagem em coluna de filtração em gel de Sephadex G25. A fração com atividade ureolítica foi extraída e concentrada para passagem em coluna de troca aniônica Q-HP (Ge Lifesciences) em sistema FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*). Como resultados, a extração em tampão se mostrou um excelente método de obtenção da enzima nativa, com manutenção da atividade ureolítica inalterada no extrato protéico durante dois meses. A passagem do extrato em resina de filtração em gel apresentou quatro picos distintos, onde somente o primeiro continha atividade ureolítica, o qual foi isolado e concentrado. A purificação por cromatografia de troca aniônica apresentou cinco picos de eluição em gradiente de 0,0, 0,1, 0,2, 0,3 e 1,0M de NaCl, sendo que as frações com atividade ureolítica foram eluídas com 0,1 e 0,3M de sal. Uma vez isoladas duas frações contendo duas enzimas diferentes com atividade ureolítica as mesmas serão testadas em experimentos de Concentração Inibitória Mínima com fungos filamentosos e leveduriformes para avaliar a atividade fungitóxica de cada uma. Os resultados poderão apresentar uma alternativa natural ao uso de fungicidas em alimentos.

Palavras-chave: Fungitóxico, produtos naturais, fungos patogênicos.

Agradecimentos: CAPES, CNPq, Fundação Araucária, FINEP.

**OUTRAS PRODUÇÕES EM CO-AUTORIA SUBMETIDAS DURANTE O
DOUTORADO**

Paulo Sérgio Alves Bueno, Franciele Abigail Vilugron Rodrigues, Débora Carina Biavatti, Arethusa Lobo Pimentel, Mariane Cristóvão Bagatin, Érika Seki Kioshima, Gisele de Freitas Gauze, Flavio Augusto Vicente Seixas. **New inhibitors of homoserine dehydrogenase from *Paracoccidioides brasiliensis* presenting antifungal activity.** *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 2018 (status: *under review*).

Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by fungi of the genus *Paracoccidioides* spp., which mainly affects workers from rural regions of Latin America. Although the antifungal agents currently available for the treatment of PCM are effective in controlling the disease, many months are needed for healing, making the side effects and drug interactions relevant. In addition, conventional treatments are not able to control the sequelae left by PCM, even after a cure, justifying the search for new therapeutic options against PCM. In this context, the enzyme homoserine dehydrogenase of *P. brasiliensis* (*PbHSD*) was used to screen a library of natural products from the ZINC database using three different software packages. Three molecules (ZINC codes: 2123137, 15967722 and 20611644) were better ranked than the homoserine substrate (HSE), which were obtained for *In vitro* trial by minimum inhibitory concentration (MIC) assays. All three molecules presented antifungal activity with MICs of 8, 32 and 128 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. The two most promising molecules presented satisfactory results with wide therapeutic ranges in the cytotoxicity assays. Molecular dynamics simulations of *PbHSD* indicated that the ligands remained bonded to the protein by a common mechanism throughout the simulation time. The molecule with the lowest MIC value presented the highest number of contacts with the protein, which may be interpreted as higher affinity. The results presented in this work suggest that the molecule ZINC2123137 may be considered as a hit in the development of new therapeutic options for PCM.