

## ESTUDOS DE INTERAÇÃO DE ANÁLOGOS DA SEQUÊNCIA MUTAGÊNICA DA TOXINA BACTERIANA CcdB COM PEPTÍDEOS MODELO DA DNA GIRASE.

Camila Aparecida Cotrim, Reinaldo Marchetto, Eliane Trovatti. – Bioquímica – Química – Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química – Instituto de Química – Campus de Araraquara.

O combate de doenças infecciosas através de drogas, requer a identificação de um alvo, isto é, um componente celular, o qual, sob a ação de uma droga, leva a célula à morte, ou inibe seu crescimento. Um grupo de enzimas que se tornaram alvos efetivos para agentes terapêuticos são as topoisomerases. Estas enzimas estão presentes em todas as células (procariotas e eucariotas) e são responsáveis por catalisar, no DNA, mudanças topológicas imprescindíveis para seu metabolismo e, portanto, para a viabilidade das células. A estrutura em dupla-hélice do DNA, seu superenovelamento (torção da dupla hélice sobre seu próprio eixo) e a necessidade de separação das suas fitas durante a realização de suas funções metabólicas são a origem dos problemas topológicos solucionados pelas topoisomerases. Isso é feito através da introdução de uma quebra transitória em um segmento de DNA, seguida da passagem de outro segmento por essa abertura (Figura 1), de modo a reduzir as tensões presentes na molécula devido ao seu estado de compactação ou geradas pela separação das fitas.

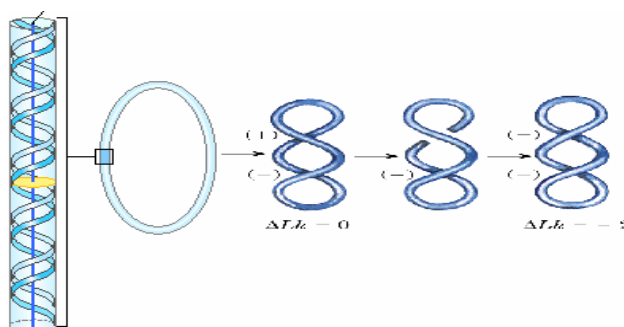


Figura 1: DNA circular relaxado, superenovelado e sob a ação de uma topoisomerase.

As topoisomerases estão divididas em dois tipos. As enzimas do tipo I quebram apenas um filamento do DNA, enquanto as do tipo II quebram as duas fitas complementares simultaneamente, permitindo a passagem de uma dupla hélice através da outra.

A DNA girase é um exemplo de topoisomerase do tipo II, ATP dependente, que consiste de duas subunidades A (GyrA) e B (GyrB), cuja forma ativa é um heterotetrâmero do tipo  $A_2B_2$ , e é encontrada em todas as bactérias e ausente em eucariotos. Diferentemente das demais topoisomerases, a DNA girase é capaz de mediar a introdução de superhélices negativas em um anel ou loop de DNA relaxado, desempenhando um papel essencial para os passos de iniciação e elongação durante a síntese do DNA, assim como também para os processos de condensação e segregação cromossômica, sendo, portanto, de fundamental importância para a manutenção celular [1]. Isso faz desta enzima um alvo importante para a ação de muitas drogas antibacterianas, incluindo a toxina CcdB.

A toxina bacteriana CcdB é uma pequena proteína de 11,7 kDa, composta por uma sequência de 101 resíduos de aminoácidos (Figura 2), codificada pelo locus *ccd* do Plasmídio F, e faz parte de um sistema de morte celular programada ou apoptose, em bactérias da espécie *Escherichia coli*.

<sup>1</sup>MQFKVYTYKRESRYRLFVDVQSDIIDTPGRRMVIPLASARLLSDKVSRELYPVVHIGDESWR  
MMTTDMASVPVSVIGEEVADLSHRENDIKNAINLMFWGI<sup>101</sup>

Figura 2. Estrutura primária da toxina bacteriana CcdB

De forma geral, um sistema de morte celular programada consiste de um processo ativo que resulta em suicídio celular, geralmente requerido para eliminação de células que perderam sua função ou células potencialmente perigosas. Em bactérias é mediado por um único sistema genético, que consiste de um par de genes que codifica a expressão de dois componentes, uma toxina estável e uma antitoxina instável que previne a ação letal da toxina [2].

Em *E. coli* o sistema de morte celular programada é formado pelas proteínas CcdA e CcdB, codificadas pelos genes *letA* e *letB*, respectivamente, no locus *ccd* (*control of cell death*) do plasmídeo F. A proteína CcdB é responsável pela morte celular, agindo como uma toxina de efeito letal sobre a célula hospedeira. Este efeito é neutralizado pela proteína CcdA, o antídoto, portanto, quando a ação do antídoto não é preventiva, o CcdB promove a inibição da divisão celular, levando à morte a população bacteriana [1].

A ação tóxica do CcdB provoca a morte celular através de um processo que converte a DNA girase em um agente citotóxico. Interferindo na atuação da enzima, o CcdB induz a clivagem do DNA, catalisada pela girase, ligando-se ao complexo “clivável” (DNA-enzima) e estabilizando-o, através de mecanismos ainda pouco conhecidos.

A estrutura cristalina do CcdB foi proposta em 1999 [3] e, empregando uma estrutura existente do domínio N-terminal de GyrA, um modelo para ação do CcdB foi proposto. Este modelo sugere a inserção de uma estrutura dimérica do CcdB no interior de uma cavidade formada por um dímero de GyrA, direcionando os três resíduos C-terminais (Trp99, Gly100 e Ile101) de CcdB, críticos para sua ação tóxica, em proximidade íntima do resíduo Arg462 da GyrA, o qual, quando mutado, tem conferido resistência à ação do CcdB.

Recentemente, uma estrutura do CcdB com um fragmento N-terminal de GyrA (GyrA14) foi publicada e mostrou a formação de um complexo globalmente simétrico, com um centro assimétrico, onde o resíduo Arg462 de GyrA está empilhado entre resíduos de Trp99 dos monômeros de CcdB [4]. Isso apóia o modelo proposto por Loris e colaboradores, o qual sugere que uma alteração conformacional envolvendo a abertura do segmento G do DNA é requerida para a ligação do CcdB. Porém, outros autores [5] sugerem que o CcdB e a Girase podem se ligar eficientemente sem alterações conformacionais.

Para contribuir com a elucidação do mecanismo de interação entre o CcdB e a DNA girase bacteriana iniciou-se recentemente, um trabalho que envolve a síntese química de fragmentos peptídicos análogos ao CcdB, como um meio de identificar os prováveis sítios de interação com a enzima e na expectativa de desenvolvimento de um novo grupo de moléculas com potencial antibacteriano. Neste contexto, uma série de fragmentos peptídicos análogos ao CcdB natural foi sintetizada pela metodologia da fase sólida (SPFS) e estratégia Fmoc/tBu. As seqüências sintetizadas foram projetadas tendo como base a estrutura cristalina do CcdB, incluindo uma  $\alpha$ -hélice C-terminal (resíduos Ser84 até Ile101), uma seqüência aparentemente importante para o reconhecimento do antídoto CcdA (resíduos Arg40 até Leu50) e uma seqüência N-terminal (Met1 até Lys9) que contém uma conformação tipo  $\beta$ , a qual acredita-se ser responsável pela inserção da molécula na membrana celular. Para avaliação da importância da região C-terminal do CcdB (Trp99-Gly100-Ile101), no processo de interação e conseqüentemente no processo de inibição da atividade da DNA girase, seqüências com mutação do resíduo Gly100 para Glu, também foram sintetizadas (Figura 3).

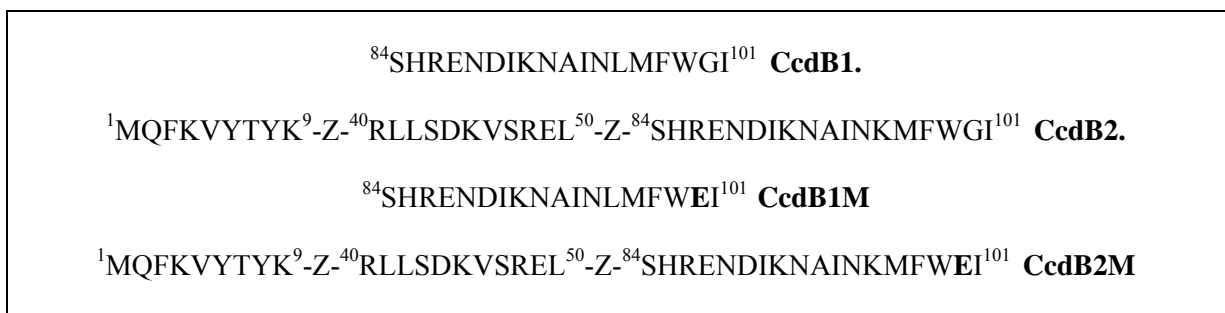


Figura 3. Seqüências peptídicas análogas ao CcdB, sintetizados por SPFS e estratégia Fmoc/tBu

Como uma aproximação para avaliar a interação dos análogos de CcdB com a DNA girase, também foi sintetizada uma sequência peptídica mimética da subunidade A da DNA girase de *Escherichia coli*. O peptídeo modelo *a9GyrAN* (Acetyl-LR<sup>462</sup> LQKLTGL-NH<sub>2</sub>) foi construído considerando as regiões que presumivelmente possuem relação direta com o processo de interação com o CcdB. Neste sentido, considerou-se o loop (Figura 4) formado pelos resíduos Leu461 a Leu469 da GyrA [6], no qual está inserido o resíduo Arg462, considerado fundamental para a formação do complexo CcdB-GyrA.

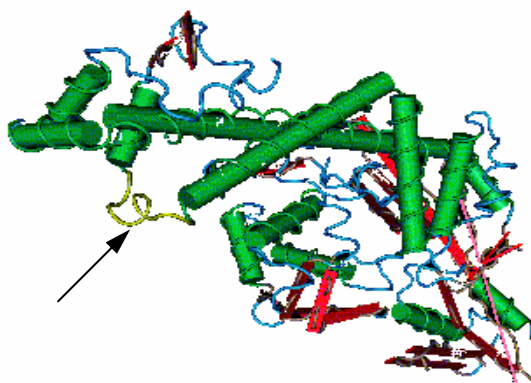


Figura 4. Estrutura tridimensional da GyrA59; destaque: “loop” onde está inserido o resíduo Arg462.

Para investigar a interação entre os análogos do CcdB com o peptídeo modelo *a9GyrAN*, primeiramente executou-se uma série de medidas de fluorescência dos análogos de CcdB (excitação a 280 nm) e analisou-se o efeito de *a9GyrAN* no respectivo espectro de emissão (emissão máxima em 350 nm). Um decréscimo na intensidade de fluorescência de CcdB1 e CcdB2, pôde ser observado, quando foram adicionadas quantidades crescentes de *a9GyrAN*. Esta supressão, entre outras, pode ser um indicativo de que tanto CcdB1 quanto CcdB2 esteja interagindo com *a9GyrAN*. Além disso, um discreto deslocamento do  $\lambda_{\text{max}}$  de emissão, de 2 nm, para comprimentos de onda de maior energia, evidenciam uma pequena variação conformacional das sequências peptídicas, resultando em uma menor exposição do resíduo de triptofano, após adição de *a9GyrAN*.

Por outro lado, ensaios de mesma natureza, empregando os análogos mutados CcdB1M e CcdB2M, mostraram uma menor variação na intensidade de fluorescência e ausência de deslocamento do  $\lambda_{\text{max}}$ , o que leva à conclusão de que os fatores envolvidos na supressão provocada por *a9GyrAN*, nos análogos mutados, são distintos daqueles ocasionados nas sequências naturais, pois as condições de análises empregadas foram as mesmas.

Considerando que a cromatografia de afinidade é um bom método de análise qualitativa, ensaios baseados nesta técnica foram projetados para identificar os processos de interação, complementando desta forma, os estudos de fluorescência, que não foram conclusivos neste caso. Os ensaios foram executados, usando o peptídeo modelo *a9GyrAN* imobilizado em uma resina tipo amino-Sepharose®, como fase estacionária [7]. O comportamento cromatográfico de CcdB1 e CcdB1M, usando uma coluna cromatográfica de 1 mL contendo *a9GyrAN* imobilizado está representado na Figura 5. CcdB1 apresentou afinidade pela coluna e foi eluído pela adição de NaCl 0,4 M em tampão Tris (Tris.HCl 10 mM/NaCl 20 mM/MgCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 7,2). Quando o resíduo Gly100 foi alterado para Glu100 (CcdB1M), uma mudança previamente encontrada em CcdB de vários isolados clínicos resistentes de *Escherichia coli*, a ligação de CcdB1 ao peptídeo *a9GyrAN* foi totalmente abolida. Ensaios com CcdB2 e CcdB2M, apresentaram este mesmo comportamento cromatográfico.

Os ensaios de cromatografia de afinidade, mostraram que a retenção de CcdB1 e CcdB2 na coluna foi dependente da presença de Mg<sup>2+</sup>, possivelmente porque este íon deve agir como uma ponte entre o grupo guanidino do resíduo Arg462 de *a9GyrAN* e o anel indólico do triptofano de ambos CcdB1 e CcdB2. Neste modelo, duas moléculas de água coordenadas ao Mg<sup>2+</sup> formam ligações de hidrogênio com o grupo guanidino da Arg462 e uma outra molécula com o nitrogênio do grupo indol. Outras moléculas de água coordenadas ao Mg<sup>+2</sup>, devem ser responsáveis pelo ajuste molecular entre

*a9GyrAN* e os dois peptídeos. Por outro lado, a substituição do resíduo Gly100 pelo ácido glutâmico, nas seqüências mutadas, não permite este tipo de interação, já que a carga negativa do grupo  $\gamma$ -carboxílico exerceria um maior poder atrativo sobre os íons  $Mg^{+2}$ , promovendo uma desestruturação molecular, não permitindo assim, a aproximação do resíduo Arg462 ao seu sítio de ligação nos peptídeos, o que explicaria a ausência de interação destas seqüências com a coluna cromatográfica.

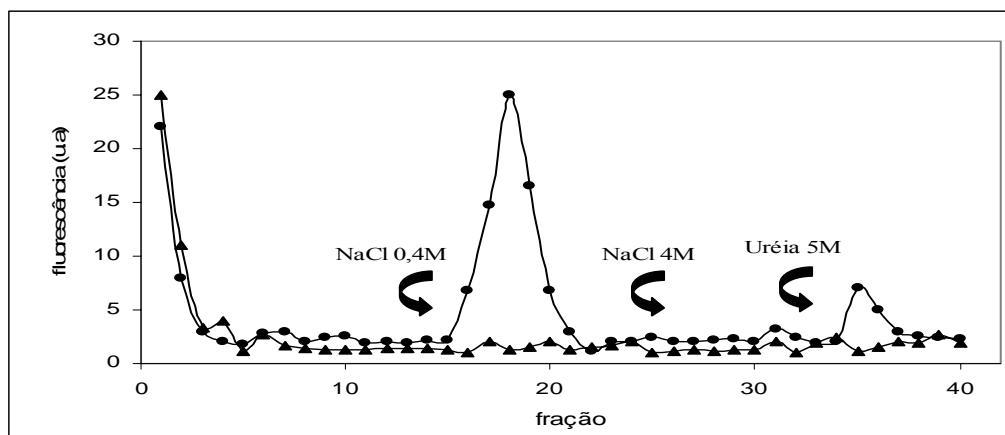


Figura 5. Cromatogramas de CcdB1 (●) e CcdB1M (▲), em coluna contendo *a9GyrAN* imobilizado

#### Referências Bibliográficas

- [1]. MAKI, S.; TAKIGUCHI, S.; HORIUCHI, T.; SEKIMIZU, K.; MIKI, T. Partner switching mechanisms in inactivation and rejuvenation of *Escherichia coli* DNA gyrase by F plasmid proteins LetD (CcdB) and LetA (CcdA). **J. Mol. Biol.**, v. 256, p. 473-482, 1996.
- [2]. ENGELBERG-KULKA, H.; GLASER, G. Addiction modules and programmed cell death and antideath in bacterial cultures. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 53, p. 43-50, 1999.
- [3]. LORIS, R.; DAO-THI, M. H.; BAHASSI, E. M.; VAN MELDEREN, L.; POORTMANS, F.; LIDDINGTON, R.; COUTURIER, M.; WYNS, L. Crystal structure of CcdB, a topoisomerase poison from *E. coli*. **J. Mol. Biol.** v. 285, p. 1667-1677, 1999.
- [4]. DAO-THI, M. H.; VAN MELDEREN, L.; DE GENST, E.; AFIF, H.; BUTS, L.; WYNS, L.; LORIS, R. Molecular basis of gyrase poisoning by the addiction toxin CcdB **J. Mol. Biol.**, v. 348, n. 5, p. 1091-1102, 2005.
- [5]. KAMPRANIS, S. C.; HOWELLS, A. J.; MAXWELL, A. The interaction of DNA gyrase with the bacterial toxin CcdB: evidence for the existence of two gyrase-CcdB complexes. **J. Mol. Biol.**, v. 293, p. 733-744, 1999.
- [6]. MORAIS CABRAL, J.H.; JACKSON, A.P.; SMITH, C.V.; SHIKOTRA, N.; MAXWELL, A.; LIDDINGTON, R.C. Crystal structure of the breakage-reunion domain of DNA gyrase. **Nature**, v. 388, p. 903 – 906.
- [7]. MARCHETTO, R.; NICOLÁS, E.; CASTILLO, N.; BACARDIT, J.; NAVIA, M.; VILA, J.; GIRALT, E. Two short peptides including segments of subunit A of *Escherichia coli* DNA Gyrase as potential probes to evaluate the antibacterial activity of quinolones. **J. Peptide Sci.**, v. 7, n. 1, p. 27-40, 2001.