

Angela Camila Orbem Menegatti

**ESTUDOS DE INIBIÇÃO DE PROTEÍNAS TIROSINA
FOSFATASES DE *Mycobacterium tuberculosis* E *Yersinia
enterocolitica*, E CARACTERIZAÇÃO DE UMA PROTEÍNA
SERINA/TREONINA FOSFATASE DE *Mycoplasma synoviae***

Tese submetida ao Programa de Pós-
graduação em Bioquímica da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Doutor em Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Hernán Terenzi

Coorientador: Prof. Dr. Javier Vernal

Florianópolis

2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Menegatti, Angela Camila Orbem

Estudos de inibição de proteínas tirosina fosfatases de *Mycobacterium tuberculosis* e *Yersinia enterocolitica*, e caracterização de uma proteína serina/treonina fosfatase de *Mycoplasma synoviae* / Angela Camila Orbem Menegatti ; orientador, Hernán Terenzi ; co-orientador, Javier Vernal . - Florianópolis, SC, 2014.

211 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Proteínas fosfatases. 3. *Mycobacterium tuberculosis*. 4. *Yersinia enterocolitica*. 5. *Mycoplasma synoviae*. I. Terenzi, Hernán. II. Vernal, Javier. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. IV. Título.

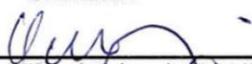
“Estudos de inibição de proteínas tirosina fosfatases de Mycobacterium tuberculosis e Yersina enterocolitica, e caracterização de uma proteína serina/treonina fosfatase de Mycoplasma synoviae”

por

Angela Camila Orbem Menegatti

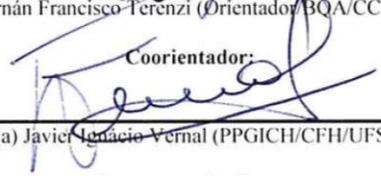
Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 02/PPGBQA/2014) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

Orientador:



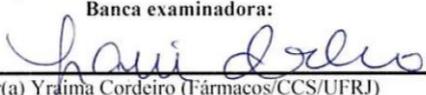
Dr(a) Hernán Francisco Terenzi (Orientador/BQA/CCB/UFSC)

Coorientador:



Dr(a) Javier Ignacio Vernal (PPGICH/CFH/UFSC)

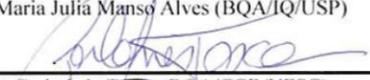
Banca examinadora:



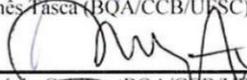
Dr(a) Yraima Cordeiro (Fármacos/CCS/UFRJ)



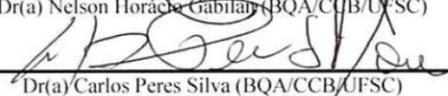
Dr(a) Maria Julia Manso Alves (BQA/IQ/USP)



Dr(a) Carla Inês Tasca (BQA/CCB/UFSC)

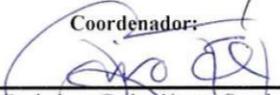


Dr(a) Nelson Horácha Gabilan (BQA/CUB/UFSC)



Dr(a) Carlos Peres Silva (BQA/CCB/UFSC)

Coordenador:



Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Florianópolis, 03 de fevereiro de 2014

*Dedico este trabalho à minha amada
mãe, Maria de Lourdes Orben.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Dr. Hernán Terenzi pela orientação, oportunidade, confiança, dedicação, pelos ensinamentos, pelo apoio, por acreditar em minha capacidade, pela oportunidade de crescer profissionalmente e por disponibilizar todos os recursos para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. Javier Vernal pela coorientação, pelos conselhos, incentivos, ensinamentos, pela amizade, paciência, confiança, dedicação, preocupação além da vida acadêmica, e por tornar o dia-a-dia do laboratório (e esses quatro anos) mais leve e bem-humorado.

À Dra. Louise D. Chiaradia-Delatorre pela participação e ajuda fundamental deste trabalho, pela dedicação, sugestões, paciência, amizade e pelo incentivo.

Aos meus queridos amigos e colegas do Centro de Biologia Molecular Estrutural ao longo desses quatro anos: Angélica Cavalett, Camila Matiollo, Carolina Botelho, Cristine Saibert, Deise Kolling, Douglas Norberto, Elis Coelho, Gabrielle Müller, Gabriela Ecco, Gabriel Kreft, Guilherme Razzera, Jean Bertoldo, Manuel Couto, Nathalia Castilho, Patrícia Severino, Patrícia Rabelo, Paulo Leal, Priscila Martins, Ricardo Delena e Tiago Bortolotto pelas contribuições, discussões, ideias, ajuda, paciência, amizade, pelo apoio, incentivo, companheirismo, ensinamentos, e sem dúvida pelas conversas descontraídas e boas risadas que tornaram a rotina do laboratório mais agradável e alegre. Em especial à Camila Matiollo, pela ajuda na correção ortográfica e gramatical desta tese, e ao clube da Lulu pela convivência, alegria e amizade incondicional.

À minha mãe por todo apoio e amor, por acreditar em mim, pelo incentivo, pela paciência, pela compreensão, e por todo sacrifício que você fez por mim até hoje. Ao meu pai e à vó Clara (*in memoriam*).

Aos meus amigos e familiares pelo apoio, pelo incentivo, pela amizade, por acreditarem em mim e sempre estarem ao meu lado mesmo que a distância.

Às servidoras do Laboratório Central de Biologia Molecular Estrutural, Elis Amaral Rosa, Vanessa Oliveira e Martina Blank, e às funcionárias Vânica e Tereza pela colaboração e amizade.

Aos colaboradores deste trabalho, o Laboratório de Sanidade Animal – Setor de Biotecnologia de Suínos da Embrapa Suínos e Aves – Concórdia/SC, o Laboratório Estrutura e Atividade do Departamento de

Química da UFSC, sob a coordenação do Prof. Dr. Ricardo José Nunes, o grupo NIQFAR (Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas) da UNIVALI e o Laboratório de Química Medicinal e Computacional do Instituto de Física de São Carlos - USP, sob a coordenação do Prof. Dr. Rafael V. C. Guido e do Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo.

À UFSC e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Ao CNPQ, pela concessão da bolsa de estudo, CAPES, MCT, FINEP, FAPESC e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biologia Estrutural e Bioimagem (INBEB).

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho, e que contribuíram à minha formação profissional e pessoal.

RESUMO

A fosforilação reversível de proteínas mediada por proteínas cinases e fosfatases tem uma função reguladora central em muitos processos celulares em eucariotos e procariotos. Especialmente, proteínas tirosina fosfatases (PTPs), que constituem uma família de enzimas de sinalização muito importante. Essas enzimas têm atraído grande interesse como uma nova classe de alvos terapêuticos, uma vez que diversas bactérias patogênicas, como *Yersinia* sp. e *Mycobacterium tuberculosis*, utilizam suas PTPs como fatores de virulência. Dessa forma, um dos objetivos deste trabalho foi a busca por compostos com ação inibitória de YopH de *Yersinia enterocolitica* e PtpA e PtpB de *Mycobacterium tuberculosis* em uma biblioteca de compostos orgânicos. Os compostos mais ativos frente à YopH foram duas sulfonamidas, K3 e K7, com valores de K_i de $36 \pm 2,5$ e $4,4 \pm 0,4$ μM , e mecanismo de inibição não-competitivo e competitivo, respectivamente. Estudos de modelagem molecular do composto K7 indicaram que o mesmo estabelece contatos polares e hidrofóbicos com resíduos chave do sítio catalítico da YopH. Além disso, aproximadamente 351 compostos foram analisados frente à atividade da PtpA e PtpB. Destes, chalconas e produtos naturais apresentaram os melhores resultados, com afinidade de ligação na ordem micromolar. A chalcona CH6 inibiu de modo não-competitivo a PtpA, com K_i de $7,1 \pm 1,0$ μM , e a PtpB, com K_i de $3,3 \pm 0,7$ μM . Já os compostos naturais EUFR163 e EUFR592 e a chalcona B85 inibiram competitivamente a PtpA, com valores de K_i de $5,7 \pm 0,8$, $1,3 \pm 0,3$ e $2,9 \pm 0,7$ μM , e a PtpB, com valores de K_i de $1,0 \pm 0,4$, $1,3 \pm 0,1$ e $3,3 \pm 0,6$ μM , respectivamente.

Proteínas serina/treonina fosfatases foram descritas em muitas bactérias patogênicas como enzimas essenciais nas vias de sinalização dependente de fosforilação, além de frequentemente estarem associadas à virulência desses organismos. As bactérias do gênero *Mycoplasma* são caracterizadas como os menores organismos com capacidade de autorreplicação e por um genoma muito reduzido, resultando na redução da sua capacidade codificante, na perda da parede celular e várias vias metabólicas. A análise do genoma do *M. synoviae*, patógeno de frangos e perus, revelou a presença de apenas um gene codificante de uma proteína Ser/Thr fosfatase da subfamília PP2C (*prpC*). Assim, o segundo objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização bioquímica dessa fosfatase, e em particular a função dos íons metálicos na relação estrutura-atividade. A análise da sequência de aminoácidos da PrpC

revelou que todos os resíduos envolvidos no centro metálico binuclear, conservados em fosfatases PP2C, estão presentes em PrpC. Além disso, os resíduos que coordenam o terceiro metal no sítio ativo de PP2C bacterianas, também estão conservados na PrpC. A PrpC recombinante é uma proteína monomérica capaz de desfosforilar fosfo-substratos na presença de íons Mn^{2+} . A análise de dicroísmo circular (CD) indicou uma mistura de estruturas α -hélice e folha- β , e que a presença de íons Mn^{2+} não afetou o conteúdo de estrutura secundária da PrpC. Já a análise de estabilidade térmica por CD e fluorescência demonstrou que a enzima apresenta estabilidade a temperaturas moderadas e que esta característica é influenciada pela presença de metal. As análises de espectrometria de massa e calorimetria de titulação isotérmica indicaram a ligação de três íons metálicos à PrpC, dois com alta afinidade e um com baixa afinidade (milimolar). A mutagênese sítio-dirigida dos resíduos que coordenam o provável terceiro íon metálico, Asp122 e Arg164, revelou que as proteínas mutantes, assim como a proteína WT, foram capazes de se ligar ao terceiro íon metálico, e que ambas as mutações afetaram a atividade enzimática da PrpC. De acordo com esses resultados, a PrpC é um membro da família PPM, que apresenta maior estabilidade na presença de metal e com um terceiro sítio de ligação a metal essencial à atividade catalítica.

Palavras-Chave: *Yersinia enterocolitica*. *Mycobacterium tuberculosis*. Proteínas tirosina fosfatases. YopH. PtpA. PtpB. Inibidores. *Mycoplasma synoviae*. Proteínas serina/treonina fosfatases. PP2C. Íon manganês.

ABSTRACT

Protein phosphorylation mediated by protein phosphatases has a central regulatory function in many cellular processes in eukaryotes and prokaryotes. Specially protein tyrosine phosphatases (PTPs), that constitute a family of important signaling enzymes, have attracting interest as a new class of drug targets, once in some pathogenic bacteria, such as *Yersinia* sp. and *Mycobacterium tuberculosis*, the tyrosine phosphatases act as main virulence factors. In this context, one of the objectives of this work was the search for compounds with inhibitory activity of *Yersinia enterocolitica* YopH and *Mycobacterium tuberculosis* PtpA and PtpB on an in-house library. The most active compounds against YopH were two sulfonamides, K3 e K7, with K_i values of 36 ± 2.5 and 4.4 ± 0.4 μM , respectively. Furthermore, these compounds were identified as non-competitive and competitive inhibitors of YopH, respectively. Molecular modeling investigations of the best YopH inhibitor (K7) indicated that this compound establishes polar and hydrophobic contacts with key residues of the YopH catalytic site. In addition, approximately 351 compounds were assayed against PtpA and PtpB, from these, chalcones derivatives and natural products showed the best results, with binding affinity in the low micromolar range. The chalcone CH6 was identified as non-competitive inhibitor of PtpA, with K_i value of 7.1 ± 1.0 μM , and of PtpB, with K_i value of 3.3 ± 0.7 μM . However, the natural compounds EUFR163 and EUFR592, and the chalcone B85 were identified as competitive inhibitors of PtpA, with K_i values of 5.7 ± 0.8 , 1.3 ± 0.3 and 2.9 ± 0.7 μM , and of PtpB, with K_i values of 1.0 ± 0.4 , 1.3 ± 0.1 and 3.3 ± 0.6 μM , respectively.

Serine/threonine protein phosphatases have been described in many pathogenic bacteria as essential enzymes involved in phosphorylation-dependent signal transduction pathways, and frequently associated to the virulence of these organisms. Mycoplasmas, bacteria of the class Mollicutes, are characterized by a drastic genome downsizing, which during evolution lead up to current mycoplasmas having a reduced coding capacity, no cell wall, and a limited number of metabolic pathways. An inspection of *M. synoviae* genome, a common pathogen of chickens and turkeys, revealed the presence of a gene (*prpC*) encoding a putative protein serine/threonine phosphatase of the PP2C subfamily. Thus, the second objective of this work was report the complete biochemical characterization of *M. synoviae* phosphatase (PrpC), and the particular role of metal ions in the structure-function relationship of

this enzyme. PrpC amino acid sequence analysis revealed that all the residues involved in the dinuclear metal center, conserved in PP2C phosphatases, are present in PrpC, and the putative third metal coordinating residues are also conserved, indicating that PrpC might bind to a third metal as other bacterial PP2C. Recombinant PrpC is a monomeric protein able to dephosphorylate phospho-substrates with Mn^{2+} ions dependence. Circular dichroism (CD) indicated a mixture of α -helix and β -sheet structure, and that PrpC secondary structure was not significantly altered in the presence of Mn^{2+} ions. Thermal stability analysis by CD and fluorescence spectroscopy demonstrated the enzyme stability at mild temperatures, and the influence of Mn^{2+} ions in this characteristic. Mass spectrometry and isothermal titration calorimetry analysis indicated three metals ions binding to PrpC, two of which with a high-affinity constant, and one, with millimolar affinity. Mutational analysis of the possible third metal ion coordinating residues, Asp122 and Arg164, revealed that these variants were also able to bind to the third metal ion, and that both mutations affected PrpC phosphatase activity. According to these results, PrpC is, indeed, a PPM member with an improved stability and activity in the holo form, and with a third metal-binding site essential to catalytic activity.

Keywords: *Yersinia enterocolitica*. *Mycobacterium tuberculosis*. Protein tyrosine phosphatase. YopH. PtpA. PtpB. Inhibitors. *Mycoplasma synoviae*. Protein Ser/Thr phosphatase. PP2C. Manganese ion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Proteínas cinases e fosfatases.....	26
Figura 2. Proteínas fosfatases na sinalização celular.....	26
Figura 3. O mecanismo geral da reação catalisada por PTP Cys- dependente	28
Figura 4. Famílias de Ser/Thr fosfatases	29
Figura 5. Estrutura e mecanismo catalítico de PPM.....	32
Figura 6. Estrutura cristalina da YopH em complexo com PVNS	35
Figura 7. Ciclo da infecção do <i>M. tuberculosis</i> durante a TB.....	37
Figura 8. Estrutura tridimensional das PTPs de <i>M. tuberculosis</i>	42
Figura 9. Mecanismo de ação da PtpA e PtpB na interrupção de processos celulares do macrófago hospedeiro.....	43
Figura 10. <i>Mycoplasma</i> ao microscópio.....	44
Figura 11. Mapa do vetor de expressão pET-28a.....	50
Figura 12. Mapa do vetor de expressão pT7-7	51
Figura 13. Conversão do <i>p</i> - nitrofenil fosfato (<i>p</i> NPP) em <i>p</i> -nitrofenol (<i>p</i> NP) e fosfato inorgânico por proteínas fosfatases.....	56
Figura 14. Estrutura tridimensional da YopH de <i>Y. enterocolitica</i> (PDB 1PA9)	59
Figura 15. Purificação da PtpA e PtpB.....	61
Figura 16. Purificação da YopH.....	62
Figura 17. Estrutura química geral dos compostos sintéticos avaliados frente à PtpA, PtpB e YopH.	63
Figura 18. Gráficos duplo-recíprocos de Lineweaver-Burk para os inibidores EUFR163 e EUFR592 frente à PtpA.	91
Figura 19. Gráficos duplo-recíprocos de Lineweaver-Burk para os inibidores EUFR163 e EUFR592 frente à PtpB	92
Figura 20. Gráficos duplo-recíprocos de Lineweaver-Burk para os inibidores B85 e CH6 frente à PtpA	93
Figura 21. Gráficos duplo-recíprocos de Lineweaver-Burk para os inibidores B85 e CH6 frente à PtpB	94
Figura 22. Gráficos duplo-recíprocos de Lineweaver-Burk para os inibidores K3 e K7 frente à YopH	97
Figura 23. Sobreposição da estrutura tridimensional do domínio fosfatase da YopH, PTP1B e SptP (<i>Salmonella</i>).....	98
Figura 24. Modelo de interação do inibidor K7 (magenta) no sítio ativo da YopH	100
Figura 25. Estrutura química de alguns inibidores da YopH	103
Figura 26. Estrutura química de alguns inibidores da PtpA e PtpB ...	106
Figura 27. Estrutura tridimensional da PtpA e PtpB	108

Figura 28. Estrutura química de três inibidores de PTP1B	109
Figura 29. Mapa do vetor de expressão pET-14b	118
Figura 30. Alinhamento múltiplo de sequência da PrpC e outros membros da subfamília PP2C	131
Figura 31. Modelo tridimensional da PrpC de <i>M. synoviae</i>	133
Figura 32. Modelo tridimensional da PrpC de <i>M. synoviae</i>	134
Figura 33. Amplificação do gene <i>prpC</i> de <i>M. synoviae</i>	135
Figura 34. Digestão dos plasmídeos com as enzimas <i>NdeI</i> e <i>BamHI</i>	136
Figura 35. Confirmação da inserção do fragmento <i>prpC</i> no vetor pET-14b	137
Figura 36. Mutação sítio-dirigida da PrpC.....	138
Figura 37. Teste de indução da expressão da PrpC.....	139
Figura 38. Purificação da PrpC e mutantes	140
Figura 39. Gráfico de cromatografia de exclusão molecular da PrpC	141
Figura 40. Espectros MALDI/TOF da massa intacta da PrpC e mutantes	142
Figura 41. Perfil da digestão triptica da PrpC e mutantes	143
Figura 42. Atividade enzimática da PrpC	145
Figura 43. Efeito de inibidores de fosfatases sobre a atividade enzimática da PrpC	146
Figura 44. Espectro MALDI/TOF do peptídeo RRA(pT)VA após ensaio enzimático	149
Figura 45. Espectro MALDI/TOF do peptídeo KR(pT)IRR após ensaio enzimático	150
Figura 46. Espectro MALDI/TOF do peptídeo RRA(pS)VA após ensaio enzimático	151
Figura 47. Espectro MALDI/TOF do peptídeo RRLIEDAE(pY)AARG após ensaio enzimático.....	152
Figura 48. Curvas Michaelis-Menten em função da concentração de substrato e íon metálico para PrpC e PrpC_R164A	155
Figura 49. Curvas Michaelis-Menten em função da concentração de substrato para PrpC	157
Figura 50. Ensaio de biotinylação da PrpC para detecção de proteínas S-nitrosiladas	159
Figura 51. Espectro de dicroísmo circular da PrpC e mutantes	161
Figura 52. Espectro de dicroísmo circular da PrpC (10 µM) na presença de vários metais (10 mM)	162
Figura 53. Análise do efeito do íon Zn^{2+} sobre a estrutura secundária de (A) PrpC e (B) PtpA.....	163
Figura 54. Análise da fluorescência intrínseca da PrpC e mutantes ..	165

Figura 55. Atividade enzimática da PrpC após ser pré-incubada em diferentes temperaturas na presença ou ausência de MnCl ₂	166
Figura 56. Perfil de desnaturação térmica da PrpC e mutantes	167
Figura 57. Perfil de desnaturação térmica da PrpC WT na presença de concentrações crescentes de MnCl ₂	168
Figura 58. Perfil de desnaturação térmica da PrpC WT na presença de 10 mM MnCl ₂ e 10 mM MgCl ₂	169
Figura 59. Análise da fluorescência intrínseca da PrpC e mutantes a 37 e 50 °C na presença e ausência de MnCl ₂	170
Figura 60. Espectro ESI-MS deconvoluído da PrpC na presença de concentrações crescentes de MnCl ₂	173
Figura 61. Espectro ESI-MS deconvoluído da PrpC_D122A e PrpC_R164A na presença de concentrações crescentes de MnCl ₂	174
Figura 62. Caracterização da ligação do íon Mn ²⁺ à PrpC e mutantes por ITC	176
Figura 63. Caracterização da ligação de baixa afinidade do íon Mn ²⁺ à PrpC e mutantes por ITC.....	178

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Inibição relativa da atividade enzimática da PtpA, PtpB e YopH, conferida por sulfonil-hidrazonas e sulfonamidas	64
Tabela 2. Inibição relativa da atividade enzimática da PtpA e PtpB, conferida por sulfonamidas e sulfoniltioureias derivadas da glibenclamida	66
Tabela 3. Inibição relativa da atividade enzimática da PtpA e PtpB, conferida por hidrazonas	68
Tabela 4. Inibição relativa da atividade enzimática da PtpA e PtpB, conferida por bis-chalconas e chalconas	71
Tabela 5. Inibição relativa da atividade enzimática da PtpA e PtpB, conferida por chalconas heterocíclicas	74
Tabela 6. Inibição relativa da atividade enzimática da PtpA e PtpB, conferida por tetralonas, benzosuberonas e indanonas	75
Tabela 7. Inibição relativa da atividade enzimática da PtpA e PtpB, conferida por tiazolidinonas	77
Tabela 8. Inibição relativa da atividade enzimática da PtpA e PtpB, conferida por oxadiazóis	81
Tabela 9. Inibição relativa da atividade enzimática da PtpA e PtpB, conferida por compostos naturais de diferentes classes	82
Tabela 10. Sumário da triagem da biblioteca de compostos orgânicos frente à atividade da PtpA, PtpB e YopH	86
Tabela 11. Valores de IC ₅₀ dos compostos mais ativos frente à PtpA, PtpB e YopH	86
Tabela 12. Parâmetros cinéticos para PtpA e PtpB frente aos melhores inibidores	95
Tabela 13. Parâmetros cinéticos para YopH frente aos melhores inibidores	96
Tabela 14. IC ₅₀ (µM) dos inibidores mais ativos frente à PTP1B	99
Tabela 15. Compostos descritos na literatura como inibidores da YopH	102
Tabela 16. Compostos descritos na literatura como inibidores da PtpA e PtpB	104
Tabela 17. Atividade enzimática da PrpC sobre fosfopeptídeos	147
Tabela 18. Parâmetros cinéticos da PrpC, PrpC_D122A e PrpC_R164A	154
Tabela 19. Parâmetros cinéticos da PrpC usando RRA(pT)VA e α-caseína como substrato	156

Tabela 20. Parâmetros termodinâmicos da ligação de alta afinidade do íon Mn^{2+} à PrpC e mutantes	177
Tabela 21. Parâmetros termodinâmicos da ligação de baixa afinidade do íon Mn^{2+} à PrpC e mutantes	179

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

Å	Ångström
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
Biotina-HPDP	N-[6-(Biotinamido)hexil]-3'-(2'-piridilditio) propionamida
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
cdc25	<i>Cell division cycle 25</i>
CHES	Ácido 2-(ciclohexilamino)etanosulfônico
ColE1	Colicina E1
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
DP	Desvio Padrão
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
FCP/SCP	<i>TFIIF-associating component of RNA polymerase II C-terminal domain CTD phosphatase/small CTD phosphatase</i>
GAF	<i>cGMP-specific phosphodiesterases, adenylyl cyclases and FhlA domain</i>
HAD	<i>Haloacid dehalogenase</i>
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPr	<i>Histidine-containing phosphocarrier protein</i>
HPrK	<i>HPr Kinase/phosphorylase</i>
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosideo
k_{cat}	Constante catalítica
k	<i>Kilo</i>
K_i	Constante de inibição
LAT	<i>Linker for activation of T cells</i>
Lck	<i>Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
LMW	<i>Low Molecular Weight</i>
Loop	Laço
m/z	Razão massa carga
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
TOF	<i>Time-of-flight</i>
MBP-C	<i>Mannose-binding proteins type-C</i>
MIC	Concentração inibitória mínima

MSPA	<i>Mycoplasma synoviae</i> C-terminal haemagglutinin protein
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MSPB	<i>Mycoplasma synoviae</i> N-terminal lipoprotein
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ORF	Open Reading Frame (Sequência de leitura aberta)
PAS	Per-Arnt-Sim domain
pb	Par de base
PBS	Phosphate buffered saline (Tampão fosfato-salina)
PDB	Protein Data Bank
pH	Potencial hidrogeniônico (-log [H ⁺])
pI	Ponto isoelétrico
HOPS	Homotypic Vacuole Fusion and Vacuole Protein Sorting
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PP2C	Proteína Ser/Thr fosfatase 2C
PPM	Fosfoproteína fosfatase metal-dependente
PtpA	Proteína tirosina fosfatase A de <i>M. tuberculosis</i>
PtpB	Proteína tirosina fosfatase B de <i>M. tuberculosis</i>
PVNS	Phenyl vinyl sulfonate
RMSD	Root-mean-square deviation (Desvio médio quadrático)
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (Eletroforese em gel de poliacrilamida usando dodecil sulfato de sódio)
SKAP-HOM	Small kinetochore-associated protein-homologue
SLP-76	Lymphocyte cytosolic protein 2 (SLP-76 tyrosine phosphoprotein)
TBE	Tris/Borato/EDTA
Tris	Tris-hidroximetilaminoetano
K_m	Constante de Michaelis–Menten
UV	Ultravioleta
WT	Wild type (selvagem)
YopH	<i>Yersinia outer protein H</i>
Ysc	<i>Yop secretion</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
1.1	FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS	23
1.2	<i>Yersinia enterocolitica</i> E YopH.....	32
2.2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , PtpA E PtpB	35
2.3	<i>Mycoplasma synoviae</i> E SER/THR FOSFATASES.....	43
2	INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE PROTEÍNAS TIROSINA FOSFATASES	49
2.2	OBJETIVOS	49
2.2.1	Objetivo Geral	49
2.2.2	Objetivos Específicos	49
2.2	MATERIAIS E MÉTODOS	50
2.2.1	Vetores de Expressão.....	50
2.2.2	Preparação e transformação das bactérias competentes..	51
2.2.3	Expressão das proteínas PtpA, PtpB, PTP1B e YopH.....	52
2.2.4	Purificação das proteínas PtpA, PtpB, PTP1B e YopH....	53
2.2.5	Avaliação da inibição enzimática (<i>in vitro</i>) da PtpA, PtpB e YopH	55
2.2.6	Avaliação da atividade residual da PtpA, PtpB e YopH frente a compostos naturais e/ou sintéticos.....	55
2.2.7	Determinação da IC ₅₀ dos compostos frente à PtpA, PtpB e YopH, e determinação da seletividade frente à PTP1B	56
2.2.8	Avaliação dos parâmetros cinéticos da PtpA, PtpB e YopH, e mecanismo de inibição dos compostos	57
2.2.9	Modelagem Molecular	58
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
2.3.1	Expressão e Purificação da PtpA, PtpB e YopH.....	60
2.3.2	Avaliação da inibição enzimática da PtpA, PtpB e YopH	62
2.3.3	Ensaio de atividade com os candidatos a inibidores	63
2.3.4	Determinação dos valores de IC ₅₀ dos compostos mais promissores	86
2.3.5	Determinação de K _i e mecanismo de inibição.....	88
2.3.6	Análise de seletividade frente à PTP1B.....	99
2.3.7	Modelagem Molecular do composto K7 no sítio ativo da YopH	99
2.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	110
2.5	PERSPECTIVAS.....	112
3	CARACTERIZAÇÃO DA ÚNICA SERINA/TREONINA FOSFATASE DO <i>Mycoplasma synoviae</i>, PrpC.....	113

3.1	OBJETIVOS.....	113
3.1.1	Objetivo Geral	113
3.1.2	Objetivos Específicos.....	113
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	115
3.2.1	Clonagem do gene <i>prpC</i> de <i>Mycoplasma synoviae</i>	115
3.2.2	Teste de indução da expressão da PrpC	118
3.2.3	Expressão e purificação da PrpC e mutantes.....	119
3.2.4	Identificação das proteínas por Espectrometria de Massa (MS)	121
3.2.5	Ensaio de atividade enzimática da PrpC.....	122
3.2.6	Avaliação dos parâmetros cinéticos da PrpC e mutantes	124
3.2.7	Ensaio de biotilação para detecção de proteínas S-nitrosiladas.....	125
3.2.8	Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) e Fluorescência Intrínseca da PrpC e mutantes	126
3.2.9	Avaliação da interação não covalente proteína-metal por espectrometria de massa com ionização por eletrospray.....	127
3.2.10	Análise de calorimetria de titulação isotérmica proteína-metal	128
3.2.11	Alinhamento múltiplo de sequências e modelagem molecular da PrpC.....	128
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	130
3.3.1	Homologia entre PrpC e outras fosfatases	130
3.3.2	Clonagem e mutação sítio-dirigida da PrpC	155
3.3.3	Teste de indução da expressão da PrpC	138
3.3.4	Expressão e purificação da PrpC e suas mutantes	139
3.3.5	Ensaio de atividade enzimática da PrpC.....	143
3.3.6	Parâmetros cinéticos da PrpC, PrpC_D122A e PrpC_R164A	153
3.3.7	Ensaio de biotilação da PrpC.....	158
3.3.8	Análise estrutural da PrpC por dicroísmo circular e fluorescência	160
3.3.9	Análise da estabilidade térmica da PrpC	166
3.3.10	Análise da ligação do metal à PrpC por ESI-MS e ITC...	171
3.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	184
3.5	PERSPECTIVAS	185
	REFERÊNCIAS	187
	ANEXO A – Artigos relacionados à tese	209

1 INTRODUÇÃO

1.1 FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS

No final de 1903 Carl e Gerty Cori descobriram que existem duas formas da proteína glicogênio fosforilase (chamadas “b” e “a”), a forma “b” era ativa na presença de 5' AMP, enquanto a forma “a” era ativa na ausência desse nucleotídeo. Eles argumentaram, na época, que a forma “a” estava ligada firmemente ao 5' AMP e que a enzima que convertia a forma “a” em “b” catalisava a remoção do 5' AMP. Embora a sua argumentação estivesse incorreta, o efeito do 5' AMP sobre a fosforilase “b” foi o primeiro exemplo de ativação alostérica descrito, todavia esse termo só seria cunhado 20 anos depois (CORI; GREEN, 1943; COHEN, 2002).

O conceito “fosforilação de proteínas”, cunhado por Edmond Fischer e Edwin Krebs em meados de 1950, surgiu a partir da demonstração da necessidade de ATP e de uma “enzima conversora”, mais tarde denominada de fosforilase-cinase, durante a conversão *in vitro* da fosforilase “b” em fosforilase “a”. Esse processo envolve a transferência do grupo fosfato do ATP à fosforilase “b”, resultando na sua forma ativada, fosforilase “a”. Embora a enzima que converte a fosforilase “a” em “b”, proteína fosfatase 1, tenha sido descoberta 10 anos antes por Cori e Green, a natureza dessa reação só foi compreendida quando o fosfato inorgânico foi descoberto como o produto da reação (FISCHER; KREBS, 1955; KREBS; FISCHER, 1956; COHEN, 2002; SHI, 2009). Mesmo após 15 anos da descoberta da fosforilase-cinase, a fosforilação ainda era considerada um mecanismo de controle especializado, envolvido na regulação de uma via metabólica, o metabolismo do glicogênio (COHEN, 2002). No entanto, segundo Johnson (2009), o isolamento e a purificação de PKA (proteína cinase A) em 1968 demonstraram que a fosforilação de proteínas era um fenômeno muito mais generalizado (WALSH et al., 1968).

Sendo assim, somente após décadas de pesquisas, das descobertas iniciais, o significado da fosforilação reversível de proteínas passou a ser valorizado, constituindo uma das principais formas de sinalização e um mecanismo de regulação essencial a todos os organismos vivos (SHI, 2009). Atualmente sabe-se que a fosforilação de proteínas, modificação covalente que ocorre nas proteínas em um processo pós-traducional no qual é adicionado um grupo fosfato a essas macromoléculas, é o tipo de modificação pós-traducional mais utilizada

na transdução de sinais. (COZZONE et al., 2004; UBERSAX; FERRELL JR, 2007). Dessa forma, a fosforilação reversível de proteínas controla diversos eventos celulares, incluindo regulação da divisão celular, crescimento, diferenciação, desenvolvimento, morte celular, regulação do metabolismo, expressão gênica, secreção, transporte de membrana, motilidade, interações celulares, resposta imune, aprendizado e memória (UBERSAX; FERRELL JR, 2007).

As proteínas podem ser fosforiladas em nove resíduos de aminoácidos, serina, treonina, tirosina, cisteína, arginina, lisina, aspartato, glutamato e histidina, mas, em células eucarióticas, a fosforilação ocorre, principalmente, em resíduos de Ser, Thr e Tyr (MOORHEAD et al., 2009; BRAUTIGAN, 2013). Em humanos, a fosforilação em Ser, Thr e Tyr corresponde a aproximadamente 86,4%, 11,8% e 1,8%, respectivamente, dos resíduos fosforilados. Embora menos comum, a fosforilação em resíduos de Tyr é extremamente importante à saúde e às doenças (JOHNSON, 2009).

A adição ou remoção do grupo fosfato de uma proteína pode ter profundas consequências sobre a sua atividade e características estruturais (BARFORD et al., 1998). Assim, a ligação do grupo fosfato a uma proteína pode desencadear tanto a sua ativação quanto a sua inibição, muitas vezes através de mudanças conformacionais (alostéricas), ou ainda, proporcionar sítios de reconhecimento para outras proteínas, e interferir na sua localização e na sua estabilidade (JOHNSON, 2009). A pH fisiológico, o grupo fosfato com pK_a de aproximadamente 6,7 está em sua maioria na forma dianiônica. Essa propriedade, juntamente com a capacidade dos átomos de oxigênio do grupo fosforil formarem redes de ligação de hidrogênio, lhe confere características especiais, assim dois tipos de interação predominam. Frequentemente, o grupo fosfato interage com a cadeia lateral de um ou mais resíduos de arginina, estabilizando a conformação. O segundo contato envolve a interação do grupo fosfato com átomos de nitrogênio no início de uma α -hélice, utilizando a carga positiva do dipolo da hélice. Além disso, outros resíduos polares também podem estar envolvidos no contato, como lisina, histidina, tirosina, serina e treonina (JOHNSON, 2009).

A transferência do grupo γ -fosforil do ATP à cadeia lateral da proteína alvo é catalisada por uma superfamília de proteínas chamadas de cinases. Por outro lado, esse grupo fosforil é removido pela ação de uma superfamília de proteínas chamadas de fosfatases (Figura 1). Deste modo, a fosforilação é um processo controlado pelo equilíbrio da ação

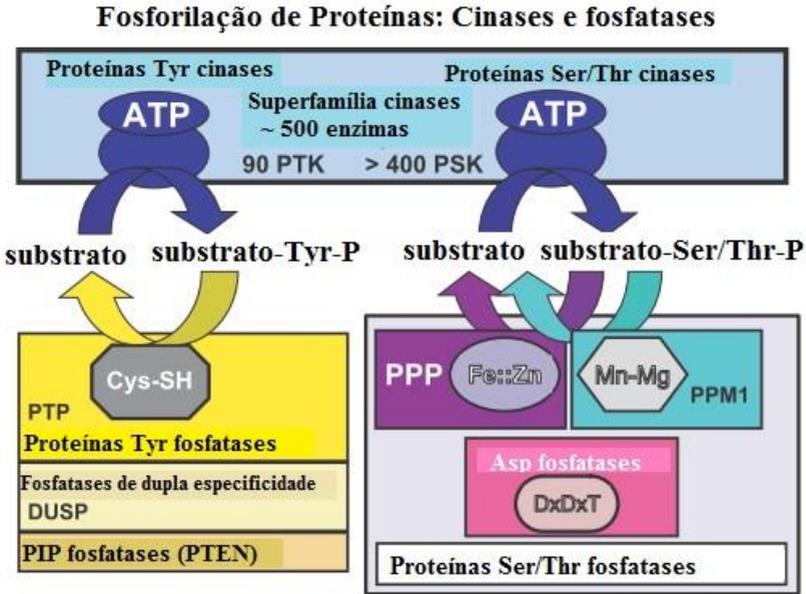
de proteínas cinases e fosfatases (SHI, 2009; BRAUTIGAN, 2013). As proteínas cinases representam uma das maiores famílias gênicas em eucariotos, por exemplo, o genoma humano contém aproximadamente 500 proteínas cinase, correspondendo a 2% do total de genes, sendo cerca de 90 Tyr cinases e o restante Ser/Thr cinases (SHI, 2009). A maioria das cinases, com raras exceções, compartilha uma estrutura tridimensional comum, composta por um domínio folha- β N-terminal que se liga ao ATP e um domínio α -hélice C-terminal que se associa ao substrato. Nesse sentido, a bioquímica da superfamília cinase é relativamente simples, uma vez que todas apresentam uma estrutura similar e possuem o mesmo mecanismo catalítico (BRAUTIGAN, 2013). Contudo, apesar da maioria da cinases clássicas compartilharem uma arquitetura comum, elas diferem nas cargas e hidrofobicidade dos seus resíduos de superfície, assim, essas diferenças são essenciais à especificidade de cada enzima (UBERSAX; FERRELL JR, 2007).

O genoma humano contém 107 genes que codificam proteínas Tyr fosfatases e muito menos proteínas Ser/Thr fosfatases, aproximadamente 30 genes (SHI, 2009). Ao contrário das proteínas cinases, as proteínas fosfatases desenvolveram uma bioquímica diversificada, com distintas famílias de enzimas que possuem estruturas tridimensionais, sítios ativos e mecanismos de hidrólise diferentes (BRAUTIGAN, 2013). De acordo com a sua especificidade de substrato, mecanismo catalítico, estrutura tridimensional e sequência de aminoácidos as proteínas fosfatases podem ser diferenciadas em quatro famílias, proteínas Ser/Thr fosfatases (PSTP), PPP (fosfoproteína fosfatase) e PPM (fosfoproteína fosfatase metal-dependente), proteínas Tyr fosfatases (PTP) e proteínas His fosfatases (PHP) (DOMBRÁDI et al., 2002; JOHNSON, 2009). No entanto, o envolvimento da fosforilação de histidina em eventos de transdução de sinal em eucariotos é uma área em expansão (DOMBRÁDI et al., 2002).

Segundo Barford e colaboradores (1998), a importância da fosforilação de resíduos de tirosina na sinalização celular é ressaltada pelo número e diversidade de proteínas tirosina cinases e fosfatases ao longo da evolução eucariótica (Figura 2). Dessa forma, a constatação de que a perturbação do equilíbrio celular da fosforilação de resíduos de tirosina causa um grande número de doenças humanas, exemplifica a importância do rigoroso controle da atividade de proteínas Tyr cinases e fosfatases (TIGANIS; BENNETT, 2007; HENDRIKS et al., 2013). Além disso, a fosforilação em resíduos de tirosina ocorre em uma ampla variedade de espécies bacterianas, e assim como em eucariotos, as PTPs

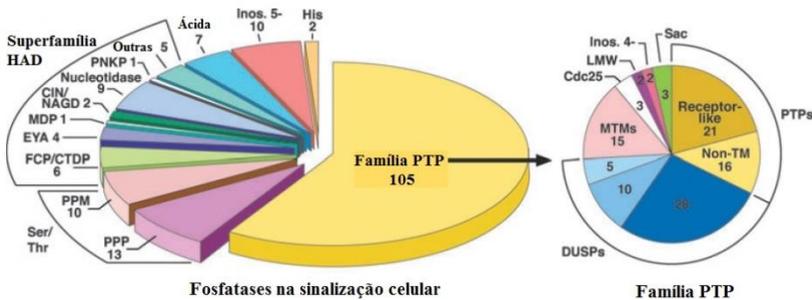
bacterianas são essenciais à regulação de diversos processos celulares (COZZONE et al., 2004).

Figura 1. Proteínas cinases e fosfatases.



Divisão das famílias proteicas, com as cinases (acima) separadas em duas famílias, Tyr e Ser/Thr cinases, representadas por dois domínios, o ATP indica o domínio N-terminal. As proteínas fosfatases (abaixo) separadas em duas famílias, Tyr fosfatases, subdividida em três famílias, e Ser/Thr fosfatases, subdivididas em três famílias. Adaptado de (BRAUTIGAN, 2013).

Figura 2. Proteínas fosfatases na sinalização celular.



As fosfatases que estão implicadas na regulação da transdução de sinal estão destacadas à esquerda. A divisão das PTPs em subfamílias está destacada à

direita. Os números representam os genes em humanos. Adaptado de (TONKS, 2013).

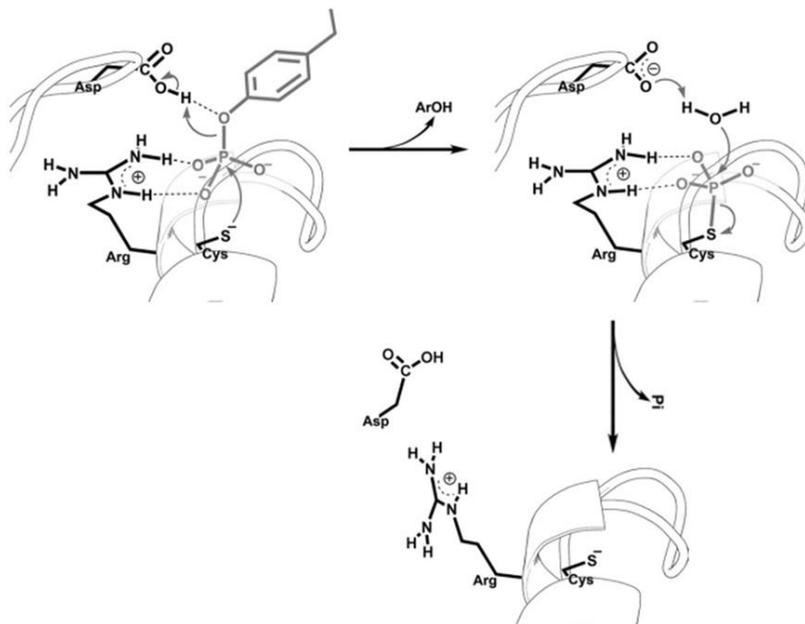
A superfamília PTP compreende proteínas estruturalmente diversas caracterizadas pela presença de um motivo assinatura conservado, representado por (H/V)C(X)₅R(S/T), o qual define o sítio ativo dessas enzimas. Dentro desse motivo, os resíduos invariantes de Cys e Arg são essenciais à catálise. Esse motivo, juntamente com outros dois motivos, *WPD-loop* e *Q-loop*, definem o núcleo catalítico. Assim, o domínio catalítico de PTPs clássicas, fosfotirosina específicas, abrange aproximadamente 280 resíduos de aminoácidos e contém 10 motivos conservados (TONKS, 2013).

Segundo Moorhead e colaboradores (2009), o motivo assinatura e o mecanismo catalítico de PTP evoluíram independentemente no mínimo três vezes, originando três classes de PTPs Cys-dependentes. A classe I compreende o maior grupo de PTPs, a qual inclui as PTPs clássicas e as de dupla especificidade (DUSP). As PTPs clássicas desfosforilam especificamente resíduos de fosfotirosina. Já as DUSP são mais diversas em termos de substratos e desfosforilam resíduos de fosfotirosina, fosfoserina e fosfotreonina, além de fosfoinosítídeos. As classes II e III são representadas pela LMW-PTP (PTP de baixa massa molecular) e *cdc25*, respectivamente. As LMW-PTPs são proteínas com aproximadamente 18 kDa, Tyr específicas e estruturalmente relacionadas às arsenato redutases bacterianas. Já as PTPs *cdc25* desfosforilam especificamente resíduos de fosfotirosina e fosfotreonina e provavelmente evoluíram de uma enzima bacteriana semelhante à rodanase (TONKS, 2013). No entanto, além das PTPs Cys-dependentes, as PTPs ainda podem ser classificadas como PTPs Asp-dependente, as quais desfosforilam resíduos de Tyr/Ser usando um resíduo de aspartato como nucleófilo em uma reação dependente de metal (ALONSO et al., 2004; KIM; RYU, 2012).

As PTPs Cys-dependentes, que serão abordadas neste trabalho, como o nome sugere, possuem um mecanismo catalítico baseado em um resíduo de cisteína, presente no motivo assinatura CX₅R, o qual forma o *loop* de ligação ao fosfato no sítio ativo (conhecido como *P-loop*). Como apresentado na figura 3, a reação enzimática se dá, inicialmente, pelo ataque nucleofílico do grupo tiolato da cisteína sobre o átomo de fosfato do substrato, resultando na formação do cisteinil-fosfato e a liberação do resíduo de tirosina. No segundo passo, ocorre a hidrólise do intermediário cisteinil-fosfato pelo ataque de uma molécula de água, liberando o fosfato inorgânico e a proteína regenerada. O resíduo de

arginina conservado está envolvido na ligação do substrato e na estabilização do intermediário da reação. Outro resíduo fundamental à reação é o Asp localizado no WPD-*loop*, que funciona como ácido geral na primeira etapa da catálise, e como base na segunda etapa (BRANDÃO et al., 2010).

Figura 3. O mecanismo geral da reação catalisada por PTP Cys-dependente.



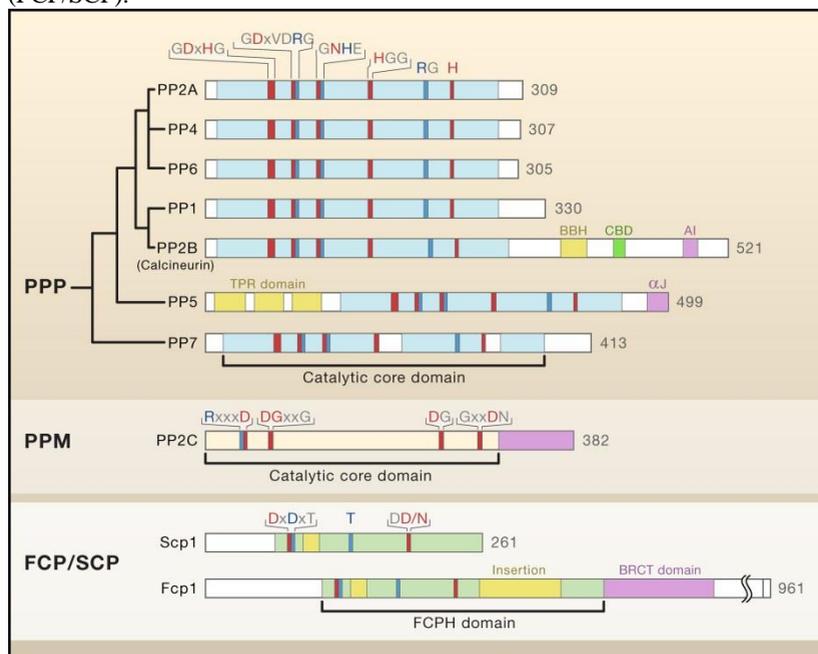
Os resíduos de Cys, Arg e Asp catalíticos estão destacados e o grupo fosfato é mostrado no sítio ativo. A arginina estabiliza o substrato enquanto o ataque nucleofílico é realizado pela cisteína. Na primeira etapa da reação ocorre o ataque nucleofílico do grupo tiolato da cisteína sobre o átomo de fósforo do resíduo de tirosina fosforilado, resultando na formação do intermediário cisteinil-fosfato. Além disso, há a protonação do átomo de oxigênio do substrato fenólico pela cadeia lateral do resíduo de aspartato. Na segunda etapa da reação uma molécula de água, deprotonada pelo aspartato, ataca o intermediário cisteinil-fosfato, liberando o fosfato inorgânico e a proteína regenerada. Adaptado de (BRANDÃO et al., 2010).

Curiosamente, apesar da grande demanda na desfosforilação de resíduos de serina e treonina, uma vez que juntos representam aproximadamente 97% dos resíduos fosforilados, e da sua importância

biológica, existem apenas 43 PSTPs no genoma humano, apenas 10% do número de cinases. Sendo assim, as PSTP desenvolveram diversas estratégias para coordenar suas funções com as das cinases e agir sobre uma grande variedade de substratos. Uma dessas estratégias envolve a combinação de poucas subunidades catalíticas com um grande número de subunidades regulatórias. Dessa forma, as subunidades reguladoras podem controlar a localização celular, a seleção de substrato e a atividade das subunidades catalíticas (ZHANG et al., 2013).

Nesse contexto, estudos de estrutura, função e regulação de subunidades catalíticas de PSTP organizaram a classificação dessas proteínas de acordo com suas propriedades bioquímicas e sua homologia de sequência. Assim a superfamília PSTP é dividida em três famílias gênicas: PPP, PPM e fosfatase Asp-dependente, representadas pelas enzimas FCP/SCP e HAD (Figura 4) (SHI, 2009).

Figura 4. Famílias de Ser/Thr fosfatases. PPP (fosfoproteína fosfatase) e PPM (fosfoproteína fosfatase metal-dependente) e fosfatase Asp-dependente (FCP/SCP).



Os domínios catalíticos de cada família estão indicados abaixo do diagrama. Os motivos conservados estão destacados acima do diagrama. Os resíduos

envolvidos na coordenação do metal e na ligação do fosfato estão em vermelho e azul, respectivamente. Adaptado de (SHI, 2009).

A família PPP é responsável pela maior parte da desfosforilação dos resíduos de serina e treonina nas células, além disso, as proteínas dessa família formam complexos de multi-subunidades, que compreendem uma subunidade catalítica e múltiplas subunidades reguladoras (ZHANG et al., 2013). A família PPP inclui as proteínas Ser/Thr fosfatases tipo 1 (PP1), PP2 (PP2A), PP3 (PP2B), PP4, PP5, PP6 e PP7, as quais estão relacionadas estruturalmente e sequencialmente, além de conservarem um mecanismo catalítico idêntico (UHRIG et al., 2013). A família PPM inclui as proteínas fosfatases dependentes de íons magnésio/manganês, como a PP2C e a piruvato desidrogenase fosfatase. Em contraste às PPP, os membros da família PPM não contêm subunidades reguladoras, apresentam uma única subunidade, mas por outro lado, essas proteínas contêm domínios adicionais e motivos assinatura conservados, que podem ajudar na especificidade de substrato. Em ambas as famílias PPP e PPM, os íons metálicos desempenham um papel essencial à catálise, ativando a molécula de água que age como nucleófilo, em contraste, FCP/SCP e HAD utilizam um mecanismo de catálise Asp-dependente (SHI, 2009).

Apesar dos membros da família PPP e PPM não apresentarem sequências primárias homólogas, e provavelmente, originarem-se de dois genes ancestrais diferentes, as estruturas dessas proteínas são profundamente semelhantes, sugerindo uma evolução convergente (MOORHEAD et al., 2009). Basicamente, o domínio catalítico dessas proteínas apresenta uma estrutura composta de um β -sanduíche central rodeado por α -hélices (BARFORD et al., 1998).

As PPMs, que serão abordadas neste trabalho, compartilham um domínio catalítico comum, com nove a onze motivos assinatura e oito resíduos de aminoácidos altamente conservados, entre eles estão os quatro resíduos de aspartato que coordenam dois íons metálicos necessários à catálise (Figura 5A) (MOORHEAD et al., 2009).

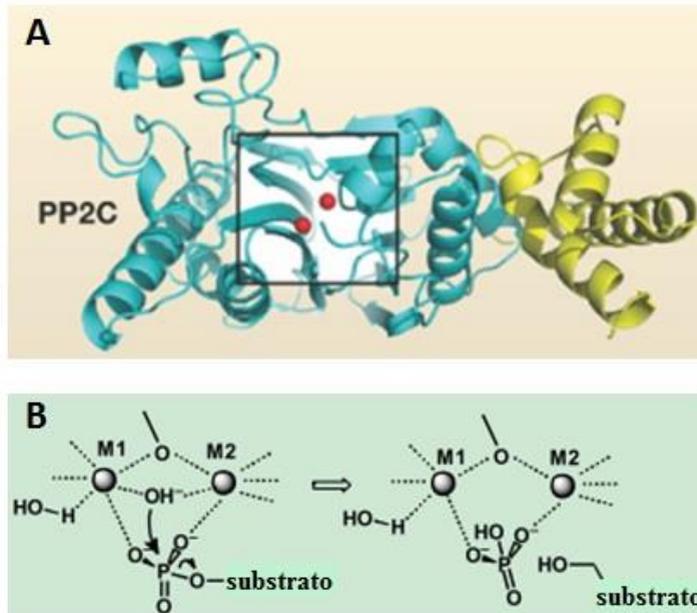
Membros da família PPM podem ser encontrados tanto em eucariotos quanto em procariotos, entretanto, a análise de diferentes genomas procarióticos revelou a ausência de homólogos de PPMs na maioria dos genomas de arqueas e duas subfamílias em bactérias (ZHANG; SHI, 2004). Os membros da subfamília I compartilham a mesma estrutura do domínio catalítico encontrado em PPM eucarióticas, enquanto a subfamília II não possui os motivos Va e Vb e contém

domínios sensoriais extras, como os domínios PAS e GAF (ZHANG; SHI, 2004; MOORHEAD et al., 2009).

A PP2C α humana é a proteína da subfamília PP2C mais estudada e caracterizada como um dos membros que define a família PPM. A análise da estrutura cristalina de PP2C α revelou um domínio catalítico composto de um β -sanduíche central, formado pela associação de duas folhas- β antiparalelas, rodeado por um par de α -hélices em cada lado (Figura 5A). O centro metálico binuclear localizado na fenda do β -sanduíche forma o sítio ativo, os dois íons de Mn²⁺ são coordenados por moléculas de água e resíduo de Asp e Glu (DAS et al., 1996). A análise da estrutura cristalina de PP2C bacterianas revelou a conservação do domínio catalítico apresentado pela PP2C α , bem como todos os resíduos do sítio ativo, mas em vez de apresentarem um centro metálico binuclear, elas apresentam um centro metálico trinuclear (PULLEN et al., 2004; BELLINZONI et al., 2007; RANTANEN et al., 2007; SCHLICKER et al., 2008). Posteriormente, a análise da estrutura cristalina de PP2C de plantas também revelou um terceiro íon metálico no sítio ativo (MELCHER et al., 2009; DUPEUX et al., 2011; SOON et al., 2012). Por conseguinte, a coordenação de um terceiro íon metálico no sítio catalítico pode ser uma característica comum de muitas fosfatases PP2C (TANOUE et al., 2013)

Semelhante aos membros da família de PPP, a reação enzimática de desfosforilação do substrato pelas PPMs envolve o ataque nucleofílico do átomo de fósforo por uma molécula de água metal-ativa através de um mecanismo S_N2 (Figura 5B) (SHI, 2009).

Figura 5. Estrutura e mecanismo catalítico de PPM.



(A) Estrutura da PP2C α , um dos membros que define a família PPM. O domínio fosfatase está em azul, o domínio C-terminal em amarelo e os dois íons metálicos em vermelho. Adaptado de (SHI, 2009) (B) Mecanismo catalítico de PPP e PPM. Os dois íons metálicos coordenados no sítio ativo promovem a transferência do grupo fosfato sem formar um intermediário. O íon hidroxila que liga os dois metais participa do ataque nucleofílico do substrato. Adaptado de (ZHANG et al., 2013).

1.2 *Yersinia enterocolitica* E YopH

Bactérias do gênero *Yersinia* são cocobacilos gram-negativas e anaeróbias facultativas, da família Enterobacteriaceae. Entre as dezessete espécies do gênero *Yersinia* conhecidas, somente três são virulentas e patogênicas ao homem e outros animais, os enteropatógenos *Yersinia enterocolitica* e *Yersinia pseudotuberculosis*, e o zoonótico patógeno *Yersinia pestis* (MIKULA et al., 2013). Desde a sua descoberta e isolamento pelo bacteriologista francês Yersin em 1894, este gênero tem sido o foco de estudo e interesse de muitos cientistas, além de ter se tornado um paradigma da evolução bacteriana (WILLIAMSON; OYSTON, 2013).

Y. enterocolitica e *Y. pseudotuberculosis* são responsáveis por uma ampla gama de doenças, incluindo diarreia leve, enterocolite, linfadenite e adenite mesentérica, artrite reativa (inflamação estéril das articulações) e irite. Em raros casos, ambas as espécies podem causar sepse. Normalmente, essas bactérias são transmitidas por água e comida contaminada. Imediatamente após a contaminação oral, as bactérias passam através do trato gastrointestinal até alcançar o íleo terminal. Nesse ponto, elas já apresentam as proteínas invasivas na superfície externa da membrana, facilitando a translocação através da barreira epitelial intestinal. As bactérias atravessam a barreira epitelial através das células M (células micropregas) que estão associadas com as placas de Payer no final do intestino delgado (VIBOUD; BLISKA, 2005; MIKULA et al., 2013). Infecções provocadas por *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*, normalmente, são tratadas com antibióticos, como trimetoprima-sulfametoxazol, tetraciclina, ácido nalidíxico, cloranfenicol, estreptomina ou sulfonamidas. No entanto, a taxa de resistência a esses antibióticos cresceu significativamente nos últimos anos, chegando até 90% para estreptomina e sulfonamidas (DRUMMOND et al., 2012).

Y. pestis é a mais virulenta e invasiva das três espécies, além de ser o agente causador da peste, uma das doenças infecciosas mais perigosas, que pode se manifestar de três formas: pneumônica, bubônica e septicêmica (MIKULA et al., 2013). A peste pneumônica é causada principalmente pela inalação de bactérias em aerossol, sendo a forma mais letal. Os sintomas incluem febre e o rápido desenvolvimento da pneumonia acompanhada por hemoptise (expectoração sanguínea). Se o tratamento não for iniciado durante as primeiras 24 horas após os primeiros sintomas, geralmente é fatal dentro de 48 horas. A peste bubônica é transmitida ao homem por roedores infectados através da picada de uma pulga infecta. Após alguns dias da infecção, 2 a 6 dias, provoca o inchaço e sensibilidade dos linfonodos. Frequentemente, a peste bubônica pode evoluir à peste septicêmica, as bactérias multiplicam-se no sangue, causando a formação de coágulos letais em todo o corpo (BAHTA; BURKE, 2012; MIKULA et al., 2013). Ambas as formas, bubônica e septicêmicas, se não tratadas, apresentam taxas de mortalidade entre 30 a 60% (MIKULA et al., 2013). O tratamento para a peste é realizado com altas doses de gentamicina, doxiciclina, ciprofloxacina ou cloranfenicol (CHRISTIAN, 2013).

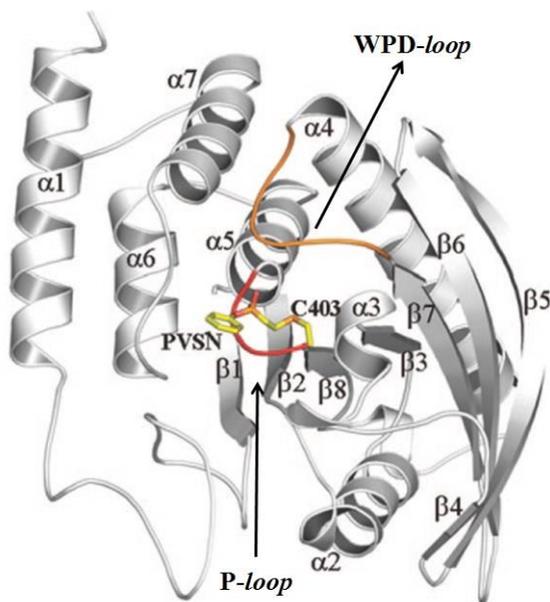
As três espécies patogênicas de *Yersinia* possuem em comum um plasmídeo de 70 kb essencial à virulência, o qual codifica um sistema de secreção tipo III, designado com Ysc, e várias proteínas efetoras,

chamadas de Yop (*Yersinia outer membrane protein*). O sistema de secreção tipo III (T3SS) é altamente conservado em bactérias patogênicas gram-negativas, sob o contato com a célula hospedeira esse sistema injeta um grupo de proteínas bacterianas no citoplasma da mesma. Dessa forma, a injeção dessas proteínas perturba a dinâmica do citoesqueleto envolvido na fagocitose. Seis proteínas Yop já foram identificadas: YopH, YopE, YopO/YopA, YopJ/P, YopT e YopM. Além disso, foi relatado que a expressão das Yops está correlacionada com a capacidade da bactéria de escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro (LIANG et al., 2003; BAHTA; BURKE, 2012).

Entre as seis Yops secretadas pela *Yersinia* através do T3SS, encontra-se uma proteína tirosina fosfatase, a YopH (*Yersinia outer protein H*). YopH, juntamente com outras três proteínas Yops (YopE, YopT e YopO/YpkA), estão envolvidas na supressão da fagocitose por perturbar o citoesqueleto de leucócitos polimorfonucleares e macrófagos (HENEBERG, 2012). Atualmente, sabe-se que a YopH desfosforila a cinase de adesão focal (FAK), paxilina, Lck, p85, a proteína de ligação Fyn (FYB), p130^{Cas}, SKAP-HOM, SLP-76 e LAT, dessa forma, interrompendo as adesões focais e suprimindo a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Todavia, a sua expressão não contribui apenas para a evasão da resposta imune inata, mas também, da resposta imune adaptativa, ao impedir a ativação dos linfócitos B e T, pelo menos *in vitro*. Além disso, a síntese da proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e a proliferação de linfócitos também são inibidas pela ação da YopH (AEPFELBACHER et al., 2007; HENEBERG, 2012).

A YopH de *Y. enterocolitica* foi a primeira PTP bacteriana caracterizada, há mais de vinte anos atrás (GUAN; DIXON, 1990; HENEBERG, 2012). A YopH é uma PTP de 468 resíduos de aminoácidos com dois domínios ligados entre si por uma sequência rica em prolina. O domínio N-terminal é importante à secreção/translocação e ao reconhecimento do substrato, e o domínio C-terminal possui a atividade catalítica (VIBOUD; BLISKA, 2005). A estrutura cristalina do domínio catalítico da YopH, uma das primeiras estruturas de PTP resolvidas, mostrou uma arquitetura similar às PTPs clássicas de eucariotos, tais como a PTP1B (BÖHMER et al., 2013), com o sítio ativo definido pelo motivo assinatura (H)CRAGVGR(T), composto pelos resíduos 403-410 (Figura 6) (BRANDÃO et al., 2008).

Figura 6. Estrutura cristalina da YopH em complexo com PVNS.



O P-loop e WPD-loop estão destacados em vermelho e laranja, respectivamente. Adaptado de (LIU et al., 2008).

Estudos utilizando *Y. enterocolitica* ou *Y. pseudotuberculosis* mutantes para o gene *yopH*, demonstraram que essa proteína é responsável por até 50% da atividade antifagocítica de *Yersinia* em neutrófilos e macrófagos J774, além de atenuar significativamente a virulência dessas bactérias (AEPFELBACHER et al., 2007). Sendo assim, a desfosforilação mediada por YopH fornece uma importante habilidade à *Yersinia* para modular a defesa imune do hospedeiro (LIANG et al., 2003). Considerando a importância da YopH para a virulência de *Yersinia*, a descoberta de possíveis inibidores específicos pode vir a servir como uma promissora intervenção terapêutica (TAUTZ; MUSTELIN, 2007).

2.2 *Mycobacterium tuberculosis*, PtpA E PtpB

O *M. tuberculosis* é o agente causador da tuberculose (TB), uma doença infectocontagiosa responsável por 1,3 milhões de mortes em 2012. Apesar de décadas de programas de controle e a disponibilidade de tratamento, a TB continua sendo um grande problema de saúde

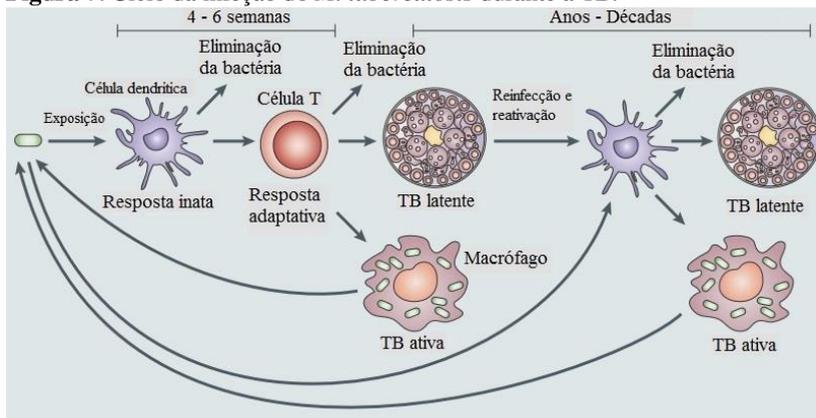
mundial, com aproximadamente 8,6 milhões de casos em 2012 (WHO, 2013).

A TB é uma doença infecciosa que afeta principalmente o sistema respiratório, mas pode afetar quase todos os sistemas, incluindo os linfonodos, sistema nervoso central, fígado, coração, ossos, pele, trato gênito-urinário e o trato gastrointestinal. Além de ser altamente transmissível através da inalação de gotículas de aerossol contendo bacilos viáveis (DUCATI et al., 2006; CRUZ-KNIGHT; BLAKE-GUMBS, 2013). A doença começa com o engolfamento do *M. tuberculosis* pelos alvéolos pulmonares. Uma vez inalado, os bacilos são fagocitados por macrófagos alveolares residentes (AMs) e células dendríticas (DCs). Desse modo, a bactéria pode ser imediatamente eliminada ou crescer no ambiente intracelular em lesões localizadas chamadas tubérculos (DUCATI et al., 2006). Os *M. tuberculosis* que escaparem da destruição inicial, multiplicam-se dentro dos macrófagos, o que resulta na sua ruptura, e assim manifesta-se a TB ativa (HOSSAIN; NORAZMI, 2013). Em seguida, os fagócitos infectados podem migrar para o interstício pulmonar e conseqüentemente, através das vias linfáticas e hematogênicas, disseminar-se para outros órgãos (GUIRADO et al., 2013).

No entanto, em cerca de 90% dos casos, a invasão do epitélio pulmonar induz uma resposta inflamatória localizada, que leva ao recrutamento de células mononucleares, proporcionando novas células hospedeiras. Nessa fase, a bactéria cresce logaritmicamente proporcionando danos teciduais. Porém, essa resposta imune desencadeia a formação do granuloma ou tubérculo, que inicialmente é uma massa amorfa de macrófagos, monócitos e neutrófilos infectados. Contudo, com o desenvolvimento da resposta imune e a chegada de linfócitos, o granuloma adquire uma estrutura mais organizada e estratificada, que pode ser rodeada por uma bainha fibrosa, que marca a periferia da estrutura. Eventualmente, o crescimento bacteriano cessa, esse estágio de infecção é conhecido como fase latente, na qual o *M. tuberculosis* continua contido dentro do granuloma onde pode permanecer por muitos anos. A reativação da TB latente pode ocorrer após meses ou anos, se algum fator comprometer a imunidade do hospedeiro (Figura 7), como no caso de coinfeção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (RUSSELL et al., 2010; HOSSAIN; NORAZMI, 2013). O risco de uma pessoa infectada desenvolver a tuberculose ativa é de cerca de 5% após o primeiro ano e de 10% durante a vida, sendo que esse número passa para 10% ao ano em

pessoas coinfectadas com HIV (DUCATI et al., 2006; GUIRADO et al., 2013).

Figura 7. Ciclo da infecção do *M. tuberculosis* durante a TB.



M. tuberculosis é transmitido pelo aerossol de indivíduos com doença ativa. As bactérias que atingem os alvéolos do pulmão são ingeridas por macrófagos, onde elas podem iniciar ciclos de replicação intracelular e lise celular. A liberação de citocinas pelas células dendríticas ao longo dos primeiros dias é importante para programar a resposta das células-T, que por sua vez, aumentam a atividade antibacteriana dos macrófagos através da liberação de citocinas, o que geralmente resulta na eliminação da infecção. Contudo, se a resposta de células-T for insuficiente para controlar a infecção inicial, os sintomas clínicos vão se desenvolver no período de um ano na forma de doença progressiva primária. A maioria dos indivíduos desenvolve uma resposta na ausência de quaisquer sintomas clínicos, a qual é definida como uma infecção latente e acarreta em um risco de doença secundária devido à reinfecção ou reativação da infecção inicial. Adaptado de (YOUNG et al., 2008).

Os típicos sintomas da TB são fraqueza, febre, perda de peso, suor à noite, dor no peito, insuficiência respiratória e tosse, todavia, a forma avançada da doença também pode causar a ruptura dos vasos sanguíneos, o que conduz a hemoptise (DUCATI et al., 2006).

Apesar de haver vacina para a tuberculose, a eficácia da mesma ainda é controversa. A vacina Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) é a única vacina aprovada, até o momento, contra a TB, porém apresenta proteção pouco confiável contra a TB pulmonar em adultos, sendo mais eficaz em casos de TB severa em crianças. Conseqüentemente, o desenvolvimento de novas vacinas contra a TB tem sido uma área de pesquisa em andamento por várias décadas. Mas só recentemente é que

os esforços resultaram no desenvolvimento de diversos candidatos à vacina em fase de avaliação pré-clínica (WANG et al., 2013).

O tratamento quimioterápico disponível, atualmente, é longo, de seis a nove meses de duração, e consiste inicialmente na combinação de vários fármacos: isoniazida, rifampicina, pirazinamida e estreptomicina (ou etambutol). Embora as taxas de recaída e falha para esse tratamento sejam menores que 5%, sob condições ideais, os principais desafios encontrados são a longa duração do tratamento, a perda de acompanhamento e a baixa adesão dos pacientes, o que é agravado por erros na prescrição, dosagem inconsistente e má qualidade dos medicamentos, resultando em falhas no tratamento e no surgimento de cepas Resistentes a Múltiplas Drogas (MDR) (quando apresentam resistência à isoniazida e rifampicina) e Extremamente Resistentes a Medicamentos (XDR) (quando também apresentam resistência à fluorquinolonas e a um dos três aminoglicosídeos injetáveis: capreomicina, canamicina ou ampicacina). Atualmente, 17% dos casos de *M. tuberculosis* diagnosticados são resistentes a um ou mais fármacos de primeira linha (CHIANG et al., 2013; CRUZ-KNIGHT; BLAKE-GUMBS, 2013).

O *M. tuberculosis* foi identificado em 1882 pelo pesquisador alemão Robert Koch como o agente causador da TB. Essa bactéria, sem mobilidade, em forma de bacilo, aeróbica obrigatória, não produtora de toxinas, nem de esporos e não encapsulada, é um patógeno obrigatório, que pode infectar várias espécies de animais, embora os seres humanos sejam os seus principais hospedeiros (LAWN; ZUMLA, 2011). O *M. tuberculosis* pertence ao gênero *Mycobacterium* que compreende mais de 60 espécies, sendo a maioria delas bactérias saprófitas. O *M. tuberculosis* pertence ao complexo *M. tuberculosis*, juntamente com outras quatro espécies que podem causar TB: *M. bovis* (infecta uma grande variedade de mamíferos, inclusive humanos), *M. africanum* (infecta humanos na África subsaariana), *M. microti* (infecta algumas espécies de roedores), *M. canetti* (uma espécie muito rara, encontrada em poucos casos de TB) (COLE, 2002; DUCATI et al., 2006; LAWN; ZUMLA, 2011).

Os macrófagos são as principais células hospedeiras do *M. tuberculosis*, nas quais as bactérias crescem e sobrevivem por longos períodos. Dessa forma, o segredo do sucesso do *M. tuberculosis* reside na sua capacidade de persistir dentro dos macrófagos. Uma vez que essas células são responsáveis pela ativação da resposta imune inata e adquirida, necessárias para controlar ou eliminar a invasão de microorganismos. Assim, as micobactérias patogênicas desenvolveram

estratégias para sobreviver dentro de um ambiente hostil sem serem destruídas (MUELLER; PIETERS, 2006; GUIRADO et al., 2013). Essas estratégias envolvem a inibição de diversos processos celulares, como a fusão do fagossoma com o lisossoma, apresentação de antígeno, apoptose e a estimulação da resposta bactericida desencadeada pela ativação das vias que envolvem a proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK), o interferon- γ (IFN- γ) e a sinalização do cálcio (Ca^{2+}) (KOUL et al., 2004; CHAO et al., 2010).

Assim sendo, a modulação dos mecanismos de sinalização do hospedeiro é um processo dinâmico que requer a síntese de moléculas bacterianas que sejam capazes de interferir com essas vias de sinalização. Em vista disso, várias bactérias patogênicas secretam moléculas virulentas necessárias à modulação da resposta imune do hospedeiro (KOUL et al., 2004). Nesse contexto, o *M. tuberculosis* secreta diversas proteínas imunogênicas que têm como função modular a resposta imune do hospedeiro, dentre elas estão proteínas serina/treonina cinases e fosfatases e proteínas tirosina fosfatases (CHAO et al., 2010; WONG et al., 2013).

A análise do genoma do *M. tuberculosis* revelou a presença de dois genes com seqüências características de PTPs, *mptpA* e *mptpB*. Posteriormente, estudos bioquímicos demonstraram que ambas as proteínas, codificadas por esses genes, são tirosina fosfatases ativas e secretadas pela micobactéria, sendo denominadas de PtpA e PtpB (KOUL et al., 2000). No entanto, o exato mecanismo de secreção, pelo qual as mesmas são exportadas, ainda não está bem esclarecido (WONG et al., 2011). Além disso, a deleção dos respectivos genes comprovou que ambas as proteínas são essenciais à virulência do *M. tuberculosis*, uma vez que elas promovem a sobrevivência da bactéria no hospedeiro (SILVA; TABERNERO, 2010).

A PtpA é uma LMW-PTP, com 17,5 kDa, secretada pelo *M. tuberculosis* no interior do macrófago, e que desfosforila especificamente resíduos de tirosina (KOUL et al., 2000). Ela é classificada como uma PTP Cys-dependente, com o motivo assinatura (V)CTGNICR(S), no qual o resíduo de Cys11 atua como o nucleófilo (WONG et al., 2013). A estrutura tridimensional da PtpA apresenta apenas um domínio com a típica arquitetura de LMW-PTP, composto por quatro-cadeias de folhas- β paralelas centrais, rodeadas por α -hélices. O sítio ativo (P-loop) situa-se entre a região C-terminal da primeira folha- β e a região N-terminal da primeira α -hélice (Figura 8A)

e contém a Cys catalítica e o DPYY-*loop*, que corresponde ao WPD-*loop* das PTP clássicas (SILVA; TABERNEIRO, 2010).

Segundo Wong e colaboradores (2013), a presença do resíduo de Cys16 dentro do sítio catalítico sugere que uma ligação dissulfeto pode ser formada com a cisteína catalítica, Cys11. Dessa forma, protegendo a Cys11 da oxidação e permitindo que a PtpA perceba e responda rapidamente ao estado redox do seu ambiente. Entretanto, o tratamento *in vitro* da PtpA com espécies reativas de nitrogênio ocasionou a nitrosilação da Cys53 e a redução da sua atividade (MATIOLLO, 2012). Assim, isso indica que a PtpA pode ser suscetível ao ambiente oxidativo nos macrófagos (WONG et al., 2013).

A secreção da PtpA pelo *M. tuberculosis* é aumentada durante a infecção dos macrófagos (CHAO et al., 2010). Após ser secretada, a PtpA perturba os principais componentes da via endocítica, resultando na inibição da maturação do fagossoma (WONG et al., 2013). Dentro do macrófago, a PtpA é capaz de desfosforilar a proteína VPS33B (*Human Class C Vacuolar Protein Sorting VPS33B*). A VPS33B é uma subunidade do complexo Vps-C (*class C vacuolar protein sorting complex*), o qual possui outras três subunidades VPS11, 16 e 18. Esse complexo é um regulador essencial do tráfego e fusão de membranas endossomais. Portanto, a inativação dessa proteína pela PtpA está diretamente envolvida na inibição da fusão entre o fagossoma e o lisossomo, uma característica fundamental na infecção da micobactéria (Figura 9) (BACH et al., 2008; WONG et al., 2013).

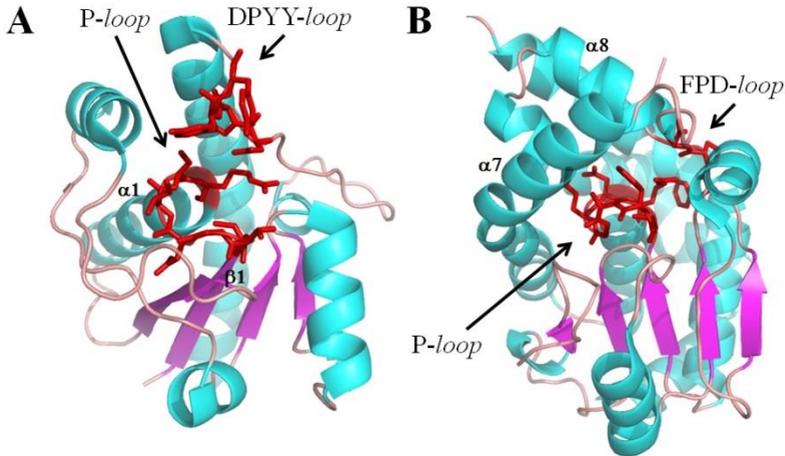
Além de desfosforilar a proteína VPS33B, a PtpA também é capaz de inibir a acidificação do fagossoma através da sua ligação à subunidade H do complexo V-ATPase durante a infecção (WONG et al., 2011). O complexo Vsp-C é recrutado ao complexo V-ATPase durante a infecção, indicando que a sua interação com o complexo V-ATPase é essencial ao sucesso da fusão fagossoma-lisossoma, em particular ao tráfego desse complexo ao fagossoma. Além disso, a ligação da PtpA ao complexo V-ATPase é pré-requisito à desfosforilação da proteína VPS33B, e posterior exclusão da V-ATPase do fagossoma durante a infecção. Dessa forma, a PtpA é uma proteína-chave à patogênese do *M. tuberculosis* (WONG et al., 2013).

A PtpB é uma proteína de 30 kDa classificada com uma PTP de DUSP Cys-dependente secretada no interior dos macrófagos, com o motivo assinatura (H)CFAGKDR(T), no qual o resíduo de Cys160 atua como o nucleófilo. A resolução da estrutura tridimensional da PtpB revelou duas características distintas: dois sítios de ligação ao fosfato e duas α -hélices que cobrem e protegem o sítio ativo como uma tampa

(*lid*) (Figura 8B). Apesar de possuir o motivo assinatura de PTP, a PtpB apresenta homologia de sequência e os motivos conservados AGK e DRT encontrados em fosfatases lipídicas, tal como PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) e MTM (*myotubularin phosphoinositide phosphatase*) (WONG et al., 2013). Além do mais, foi descoberto que essa enzima exibe atividade sobre resíduos fosforilados em tirosina/serina/treonina e sobre vários fosfoinosítídeos, assim, a PtpB pode ser considerada uma PTP de tripla especificidade (BERESFORD et al., 2007). Baseando-se na atividade da PtpB sobre fosfoinosítídeos, Chao e colaboradores (2010) argumentam que a PtpB poderia ser capaz de perturbar o metabolismo de fosfoinosítídeos do hospedeiro e as suas vias de sinalização, e assim, auxiliar na inibição da fusão fagossoma-lisossoma, uma vez que essas vias desempenham uma função importante na maturação do fagossoma.

Embora a PtpB seja importante para a sobrevivência do *M. tuberculosis* no hospedeiro, uma vez que a deleção do gene *mptpB* leva à queda da sobrevivência da micobactéria em macrófagos murinos ativados com INF- γ e à redução da carga de bacilos no baço de cobaias infectadas, os seus substratos específicos ainda não foram identificados. No entanto, sabe-se que a atividade da PtpB em macrófagos ativados resulta na redução da fosforilação da ERK1/2 (*extracellular-signal-regulated kinases 1/2*) e da p38 MAPK, assim bloqueando a produção de interleucina-6 (IL-6) estimulada pelo IFN- γ . Dessa forma, a PtpB seria capaz de suprimir a resposta imune inata durante a infecção. Além disso, a PtpB também previne a morte celular do macrófago infectado por apoptose, ativando a via de sinalização da Akt (proteína cinase B) e bloqueando a atividade da caspase-3 (Figura 9) (ZHOU et al., 2010; WONG et al., 2013). De acordo com Wong e colaboradores (2013), ainda que ERK1/2 e p38 não sejam os substratos específicos da PtpB, esses resultados sugerem que a PtpB interfere com a transdução de sinais do hospedeiro, resultando na subversão da resposta imune.

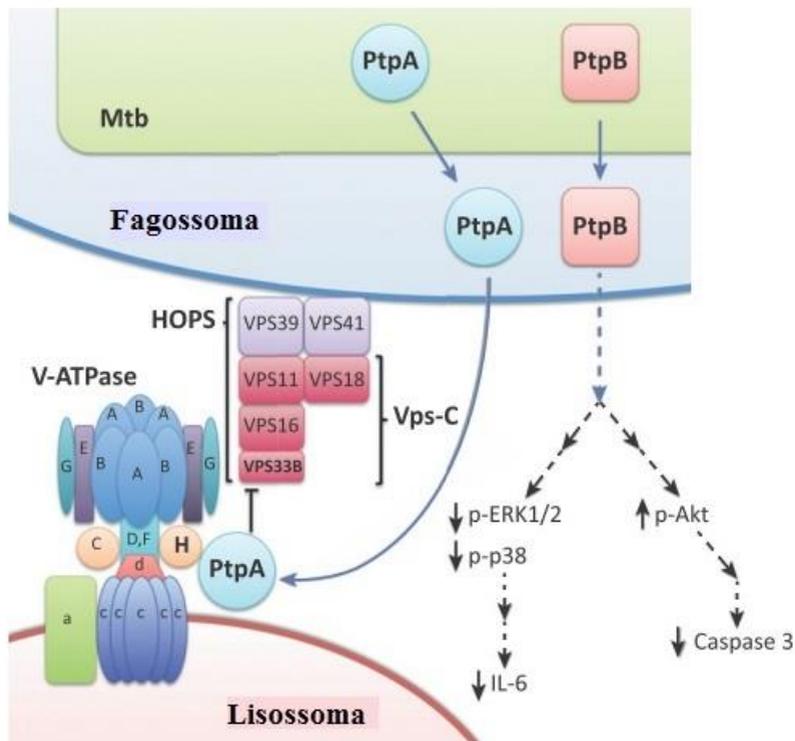
Figura 8. Estrutura tridimensional das PTPs de *M. tuberculosis*.



(A) Estrutura tridimensional da PtpA (PDB 1U2P). Os resíduos de aminoácidos do P-loop e do DPYY-loop estão indicados como varetas vermelhas. (B) Estrutura tridimensional da PtpB (PDB 1YWF). Os resíduos de aminoácidos do P-loop e do FPD-loop estão indicados como varetas vermelhas. As α -hélices 7 e 8 formam a tampão (*lid*) sobre o sítio ativo da PtpB. As figuras foram geradas com o programa PyMOL.

Uma vez que a PtpA e a PtpB, são fatores essenciais à virulência e à sobrevivência do *M. tuberculosis* durante a infecção de macrófagos, essas enzimas tornaram-se alvos promissores ao desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas contra a tuberculose. Além disso, a PtpA e a PtpB apresentam a vantagem de serem secretadas, assim as novas intervenções não precisam ter ação bactericida, o que reduz as chances do desenvolvimento de resistência ao medicamento, bem como, não precisam apresentar permeabilidade à parede celular bacteriana, uma vez que seus alvos estão no citoplasma do macrófago infectado (SILVA; TABERNEIRO, 2010).

Figura 9. Mecanismo de ação da PtpA e PtpB na interrupção de processos celulares do macrófago hospedeiro.



A PtpA é secretada para o citosol do macrófago, onde se liga à subunidade H da V-ATPase de forma a localizar especificamente o seu substrato, a VPS33B na interface de fusão do fagossoma-lisossoma. VPS33B é uma subunidade do complexo Vps-C, que serve como o núcleo de fusão homotípica e triagem de proteínas (HOPS) e regula o tráfico de membrana ao longo da via endocítica. A desfosforilação de VPS33B, finalmente, resulta na exclusão de V-ATPase a partir do fagossoma micobacteriano. A atividade da PtpB secretada no citosol do macrófago leva à diminuição da fosforilação de ERK1/2 e p38, e aumento da fosforilação da Akt, resultando na diminuição da produção de IL-6 e da atividade apoptótica. Adaptado de (WONG et al., 2013).

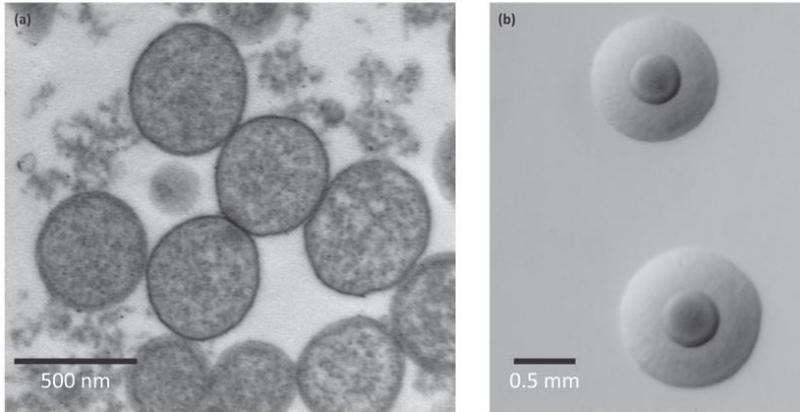
2.3 *Mycoplasma synoviae* E SER/THR FOSFATASES

O gênero *Mycoplasma*, um dos principais táxons da classe Mollicutes, atualmente compreende aproximadamente 200 espécies (RAZIN; HAYFLICK, 2010; SCHNEE et al., 2012). Esse gênero foi

identificado pela primeira vez em 1898 pelos pesquisadores Nocard e Roux, como o agente etiológico da pleuropneumonia contagiosa bovina (PPCB), sendo mais tarde identificado como o *Mycoplasma mycoides* (RAZIN, 2010; RAZIN; HAYFLICK, 2010).

Os micoplasmas, os quais são considerados os menores organismos conhecidos com habilidade de autorreplicação (0,3 a 0,8 μM), possuem características únicas, como um genoma muito reduzido, envolvendo a perda de genes não essenciais, a falta de parede celular e um número limitado de vias metabólicas (Figura 10) (SCHNEE et al., 2012; CITTI; BLANCHARD, 2013). Devido a essa característica, eles são micro-organismos fastidiosos, que possuem um complexo requerimento nutricional (RAZIN; HAYFLICK, 2010). Além de serem considerados o modelo de célula mínima ou organismo mínimo (RAZIN; HAYFLICK, 2010; SCHNEE et al., 2012).

Figura 10. *Mycoplasma* ao microscópio.



(A) Microscopia eletrônica de transmissão do *M. agalactiae* ilustrando o tamanho e a morfologia dos micoplasmas. (B) Colônias de *Mycoplasma*, em meio sólido após dias de incubação, exibindo a típica forma de “ovo frito”. Apesar da maioria dos micoplasmas apresentarem colônias com tamanho e morfologia semelhante, a forma das suas células pode variar de acordo com a espécie. Adaptado de (CITTI; BLANCHARD, 2013).

Apesar da sua aparente simplicidade, várias espécies de *Mycoplasma* são complexos patógenos de humanos, animais e plantas (RAZIN et al., 1998; SCHNEE et al., 2012), causando grandes preocupações à área médica e veterinária (CITTI; BLANCHARD, 2013).

As bactérias do gênero *Mycoplasma* evoluíram a partir de um ancestral comum de bactérias gram-positivas com baixo conteúdo G/C no seu genoma, através de uma evolução degenerativa, envolvendo uma perda significativa de genes. Dessa forma, o genoma dessas bactérias compreende aproximadamente de 580 a 1400 kbp (CITTI; BLANCHARD, 2013). Assim, para contrapor a sua limitada capacidade codificante e garantir a sobrevivência dentro do hospedeiro, uma das principais características desse gênero é a sua grande flexibilidade genômica. Os cromossomos desses organismos são estruturas dinâmicas, que frequentemente passam por rearranjos, inserções e deleções, sendo a maioria induzida por recombinação homóloga, mediada pela proteína RecA (FONSECA et al., 2007).

Segundo Razin e Hayflick (2010), as infecções causadas por *Mycoplasma* raramente são letais, mas seguem um curso crônico que resulta em morbidez. Dessa forma, pode-se dizer que os micoplasmas estão próximos do conceito de “parasitas ideais”, normalmente vivendo em harmonia com o seu hospedeiro. A maioria dos micoplasmas que infectam humanos e animais aderem firmemente às mucosas do trato respiratório ou urogenital, raramente invadindo outros tecidos. Sendo assim, a adesão das bactérias às células hospedeiras é um pré-requisito à colonização e à infecção (RAZIN; HAYFLICK, 2010). Com relação ao processo de infecção, o quadro clínico da infecção por micoplasma geralmente deve-se mais aos danos provocados pelas respostas imunológicas e inflamatórias do hospedeiro, do que propriamente pelo efeito de componentes da célula do micoplasma (RAZIN; HAYFLICK, 2010).

Dessa forma, para escapar do sistema imune do hospedeiro e adaptarem-se as mudanças do ambiente, os micoplasmas desenvolveram sofisticados mecanismos de fuga, tais como a mudança reversível da expressão e a modificação das principais proteínas de membrana, resultando em alta variabilidade antigênica dentro da população (RAZIN; HAYFLICK, 2010).

Apesar do conhecimento adquirido até o momento, através dos avanços em biologia molecular, genômica e proteômica, as bases moleculares envolvidas na colonização do hospedeiro, virulência e patogênese dos micoplasmas permanecem largamente desconhecidas (CITTI et al., 2010).

O *Mycoplasma synoviae* é um importante patógeno de aves domésticas, frangos e perus, em todo o mundo, sendo frequentemente responsável por infecções subclínicas no trato respiratório superior. No

entanto, essa condição pode levar ao desenvolvimento de uma infecção sistêmica, além de uma sinovite infecciosa (OVEN et al., 2013).

Apesar da infecção por *M. synoviae* ser assintomática, os animais apresentam problemas respiratórios, tosse, respiração ofegante, aerossaculite, comprometimento do crescimento, sinusite e sinovite. Sendo assim, as infecções crônicas e assintomáticas causam grandes prejuízos à produção industrial de aves. A transmissão do *M. synoviae* em aves ocorre horizontalmente, pelo convívio com animais doentes, e verticalmente, dos pais a sua prole, pela contaminação dos ovos. Normalmente, o diagnóstico é baseado em dados epidemiológicos, sinais clínicos, análise de lesões macro e microscópicas, e sorologia para micoplasma e/ou isolamento e identificação dos mesmos (LUCIANO et al., 2011; EL-GAZZAR et al., 2012). O *M. synoviae* é suscetível a vários antibióticos, incluindo tetraciclina, macrolídeo (exceto eritromicina) e fluoroquinolonas. Entretanto, apesar do tratamento diminuir os sintomas, ele não elimina a infecção (CARROU et al., 2006). Desta forma, a recomendação em casos de ocorrência de micoplasmoses no rebanho é a erradicação dos animais infectados (BUIM et al., 2009).

Na ausência de parede celular, a maioria dos antígenos de superfície dos micoplasmas são lipoproteínas, e portanto elas possuem grande importância na interação do *Mycoplasma* com o seu hospedeiro. No *M. synoviae*, a principal lipoproteína imunogênica é a hemaglutinina A de fase variável (VlhA). Acredita-se que essa proteína desempenha uma função essencial à patogênese, por mediar a adesão e a evasão do sistema imune do hospedeiro (OVEN et al., 2013). Segundo May e colaboradores (2011), a citaderência (*cytadherence*: adesão ao epitélio) mediada pela VlhA é o precursor da virulência do *M. synoviae*. O produto do gene *vlhA* é clivado gerando dois fragmentos, as proteínas MSPB e MSPA, porção N e C-terminal, respectivamente. A ligação aos receptores celulares e a citaderência é atribuída à MSPA, enquanto a MSPB induz uma forte resposta imune e inflamatória, contudo, o mecanismo pelo qual é gerada essa resposta ainda não está esclarecido (MAY; BROWN, 2011; OVEN et al., 2013).

Além da adesão à superfície de mucosas, o *M. synoviae* também é capaz de invadir células não fagocitárias, como eritrócitos, condrócitos e células embrionárias de frangos *in vitro*. Dessa forma, a localização intracelular poderia, em parte, explicar a persistência da infecção do *M. synoviae*, apesar da forte resposta imune do hospedeiro (DUŠANIĆ et al., 2009; BUIM et al., 2011). Outra estratégia utilizada pelo *M. synoviae* para escapar da resposta imune do hospedeiro envolve a

expressão de uma cisteína protease, CysP, capaz de clivar a imunoglobulina G (IgG) do hospedeiro (CIZELJ et al., 2011).

Segundo Dusanic e colaboradores (2012), a interação do *M. synoviae* e condrócitos de frangos, leva à redução da respiração dos condrócitos, à condensação citoplasmática e nuclear, altera a sua morfologia, e causa a formação de invaginações na membrana plasmática. Em concordância com esses eventos, a infecção induz a regulação positiva de vários genes pró-apoptóticos, como *nos2*, *mapk11*, *casp8* e *casp3*, assim os condrócitos infectados morrem por apoptose, devido a produção de óxido nítrico, ativação da caspase-3 e inativação da mitocôndria.

Recentemente, foi demonstrado que o *M. synoviae*, mais especificamente o lipopeptídeo diacilado (MDLP), induz a expressão do TLR15 (receptor do tipo Toll 15) em macrófagos de frangos. A ativação do TLR15 provoca o aumento da expressão do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ b) e a produção de óxido nítrico, e conseqüentemente, a ativação da resposta imune inata do hospedeiro (OVEN et al., 2013).

Dessa forma, para sobreviver e replicar-se nas células hospedeiras, muitos patógenos desenvolveram diferentes estratégias para escapar das defesas do hospedeiro. Um dessas estratégias envolve as vias de transdução de sinal, uma vez que o sistema de transdução de sinal é essencial para responder e adaptar-se as mudanças ambientais. A adaptação ambiental em procariotos foi por longa data atribuída exclusivamente a eventos de sinalização mediados pelo sistema dois-componentes, o qual consiste de proteínas cinases e reguladores de resposta. Contudo, as proteínas Ser/Thr cinases e suas cognatas fosfatases também desempenham um papel central na transdução de sinal em bactérias, regulando a fosforilação reversível de proteínas (BURNSIDE; RAJAGOPAL, 2011).

O *Mycoplasma pneumoniae*, bactéria patogênica causadora da pneumonia atípica, é uma das espécies de *Mycoplasma* mais investigadas. Todavia, além de possuir uma redução metabólica, como as demais espécies de *Mycoplasma*, o *M. pneumoniae* também exibe uma limitada capacidade regulatória, uma vez que apenas 0,5% dos seus genes correspondem a fatores de transcrição. Por essa razão, a regulação da atividade de suas proteínas através de modificações pós-traducionais assume uma função importante à sobrevivência dessa bactéria (SCHMIDL et al., 2010a).

Dentre as mais de 200 modificações pós-traducionais diferentes, a fosforilação reversível de proteínas é a modificação de proteínas mais

comum e importante à transdução de sinal (BURNSIDE; RAJAGOPAL, 2011). Nesse sentido, o *M. pneumoniae* possui apenas uma proteína Ser/Thr fosfatase da subfamília PP2C (PrpC) e duas proteínas cinases (HPrK e PrkC). A HPrK fosforila a proteína HPr, proteína reguladora do transporte de açúcares e membro do sistema fosfotransferase (PTS), no resíduo Ser46, sendo a proteína PrpC a responsável por realizar a sua desfosforilação (HALBEDEL et al., 2006). O fosfoproteoma do *M. pneumoniae* identificou quatro proteínas alvo da proteína Ser/Thr cinase C (PrkC), sendo elas proteínas de adesão celular e de superfície, além de confirmar a função antagonista da PrpC sobre os alvos de PrkC. Além disso, quando a PrkC não é expressa pela bactéria, ela perde a sua habilidade de crescimento aderente e citotoxicidade. Portanto, a fosforilação das proteínas de citaderência é afetada pela ausência da cinase, o que sugere que essa proteína é essencial à patogenicidade do *M. pneumoniae* (SCHMIDL et al., 2010a; SCHMIDL et al., 2010b).

Assim como o *M. pneumoniae*, a análise do genoma do *M. synoviae* identificou apenas um gene assinalado como uma putativa proteína Ser/Thr fosfatase da subfamília PP2C (*prpC*) (VASCONCELOS et al., 2005). Similar a outros micoplasmas e muitas bactérias gram-positivas, esse gene é agrupado com um gene que codifica uma proteína cinase (*pknB* no *M. synoviae*). Por esta razão, essas proteínas podem atuar como um par com atividades opostas, como relatado para o *Bacillus anthracis* e *B. subtilis* (OBUCHOWSKI et al., 2000; SCHMIDL et al., 2010a; SHAKIR et al., 2010).

Tendo em vista a variedade de processos biológicos em que as proteínas fosfatases estão envolvidas, bem como sua participação direta na patogenicidade de diversos micro-organismos, a caracterização proteica e a busca de moléculas reguladoras de fosfatases tornam-se fundamentais para um melhor entendimento do metabolismo desses patógenos. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho é aprofundar os conhecimentos acerca da fosfatase (PrpC) de *M. synoviae* e do efeito de compostos orgânicos frente à atividade da PtpA e PtpB de *M. tuberculosis* e YopH de *Y. enterocolitica*.

2 INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE PROTEÍNAS TIROSINA FOSFATASES

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar uma biblioteca de compostos orgânicos buscando identificar novas moléculas com potencial inibitório das proteínas tirosina fosfatases envolvidas na patogenicidade de *Mycobacterium tuberculosis*, PtpA e PtpB, e de *Yersinia enterocolitica*, YopH.

2.2.2 Objetivos Específicos

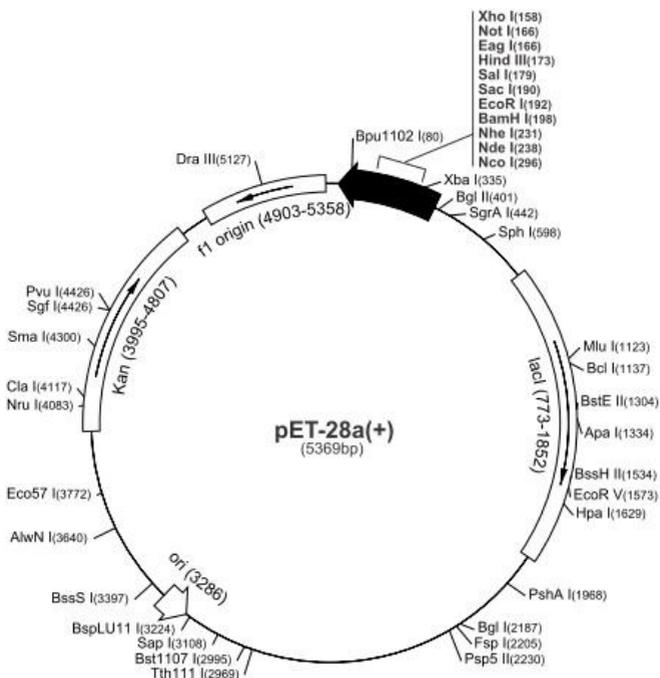
- Avaliar a ação *in vitro* dos compostos orgânicos frente à atividade das proteínas tirosina fosfatases - PTPs;
- Determinar a IC₅₀ (concentração necessária para um composto inibir 50% da atividade da enzima) dos compostos mais ativos;
- Determinar os parâmetros cinéticos, bem como o mecanismo de inibição, dos compostos mais promissores;

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Vetores de Expressão

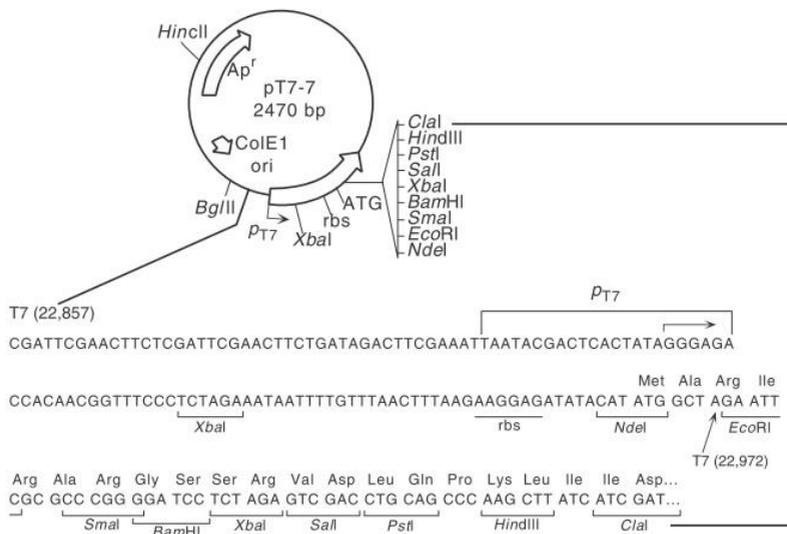
O plasmídeo contendo o gene da PtpA de *Mycobacterium tuberculosis* (pET28a-Mt_PtpA) e o plasmídeo contendo o gene da PtpB (pET28a-Mt_PtpB) foram cedidos pelo Dr. Pedro Alzari (*Unité de Biochimie Structurale, Institut Pasteur, Paris, França*) (Figura 11). O plasmídeo contendo o gene da YopH de *Yersinia enterocolitica* (pT7-7Yop51* Δ 162) (Figura 12) e o plasmídeo contendo o gene da PTP1B humana (pET19b-Hs_PTP1B) foram cedidos pelo Dr. Tiago A. S. Brandão da Universidade Federal de Minas Gerais (Departamento de Química, UFMG).

Figura 11. Mapa do vetor de expressão pET-28a.



São mostrados os sítios de clivagem para as endonucleases, origens de replicação, genes marcadores de seleção e região promotora. Fonte: www.novagen.com.

Figura 12. Mapa do vetor de expressão pT7-7.



O vetor contém um promotor para a T7 RNA polimerase, o gene que codifica a resistência ao antibiótico ampicilina e a origem de replicação ColE1. Adaptado de: <http://www.currentprotocols.com>.

2.2.2 Preparação e transformação das bactérias competentes

O preparo das bactérias competentes e a transformação bacteriana foram baseados no protocolo descrito por Ausubel e colaboradores (1992). Para tornar as células de *E. coli* BL21 (DE3) aptas a receber facilmente os vetores de expressão, as mesmas foram submetidas a um tratamento químico com cálcio. Bactérias *E. coli* BL21 (DE3) foram semeadas por esgotamento em meio Luria Bertani (LB) sólido (NaCl 1%, peptona 1%, extrato de levedura 0,5% e ágar 1,5%, pH 7,5) e cultivadas a 37 °C por 15 horas. Em seguida, as células foram cultivadas em 50 mL de meio LB líquido (NaCl 1%, peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, pH 7,5) a 37 °C, sob agitação, até alcançar a densidade óptica (DO) de 0,4 em 600 nm. As células foram então centrifugadas a 2.600 x g por 20 min a 4 °C. O sedimento celular foi homogeneizado com 25 mL de uma solução de cálcio (CaCl₂ 100 mM) gelada, incubado por 1 hora em gelo e centrifugado novamente a 2.600 x g durante 20 min a 4 °C. O sedimento celular foi finalmente homogeneizado em 5 mL de solução de cálcio contendo glicerol 20% e as células formam

incubadas em gelo por 30 min (AUSUBEL et al., 1992). Por fim, as bactérias competentes foram separadas em alíquotas e armazenadas a -80 °C.

Para transformar as bactérias competentes, 100 µL de células de *E. coli* BL21 (DE3) foram incubadas com 50 ng do vetor de expressão de interesse em gelo por 20 min. Após o período de incubação, as células sofreram um choque térmico: 1 min e 30 segundos a 42 °C e 2 min a 0 °C. Em seguida, as células foram estabilizadas com a adição de 500 µL de meio LB líquido, sendo mantidas a 37 °C durante 1 hora. Por fim, as células foram semeadas em meio LB sólido suplementado com o antibiótico para o qual o plasmídeo confere resistência (vetor pT7-7 e vetor pET19b, 100 µg/mL de ampicilina e vetor pET28a, 50 µg/mL de canamicina) e cultivadas a 37 °C durante 15 horas (AUSUBEL et al., 1992). Como controle negativo, foi realizado o mesmo procedimento com células de *E. coli* BL21 (DE3) competentes que não receberam vetor de expressão.

2.2.3 Expressão das proteínas PtpA, PtpB, PTP1B e YopH

Os vetores de expressão pET28a-Mt_PtpA e pET28a-Mt_PtpB foram utilizados para transformar bactérias *E. coli* BL21(DE3). Uma colônia recombinante, selecionada por resistência à canamicina (50 µg/mL), foi utilizada para inocular 10 mL de meio LB líquido suplementado com 50 µg/mL de canamicina. Os cultivos foram mantidos sob agitação a 37 °C durante 15 h. Desse pré-inóculo, 5 mL foram transferidos para 250 mL de meio LB novo, suplementado com canamicina (50 µg/mL), onde as bactérias continuaram crescendo sob agitação a 37 °C até alcançar DO_{600nm} entre 0,6 e 0,7, medida através de leitura espectrofotométrica. Em seguida, a expressão da proteína recombinante foi induzida pela adição de IPTG 0,5 mM e o cultivo mantido sob agitação a 15 °C durante 15 h (PURIFICAÇÃO, 2008). Após a expressão das proteínas, os cultivos foram centrifugados a 6.000 x g por 30 min a 4 °C e o sedimento celular (aproximadamente 3 gramas a partir de 1 L de cultivo) foi homogeneizado com 10 mL de tampão de lise (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 0,5 M, imidazol 10 mM e glicerol 10%) suplementado com inibidor de proteases (PMSF 40 µg/mL).

O vetor de expressão pT7-7Yop51*Δ162 foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* BL21(DE3). Uma colônia recombinante, selecionada por resistência à ampicilina (100 µg/mL), foi utilizada para inocular 10 mL de meio LB líquido suplementado com 100 µg/mL de

ampicilina. Os cultivos foram mantidos sob agitação a 37 °C durante 15 h. Desse pré-inóculo, 5 mL foram transferidos para 250 mL de meio LB novo, suplementado com ampicilina (100 µg/mL), onde as bactérias continuaram crescendo sob agitação a 37 °C até alcançar DO_{600nm} entre 0,7 e 0,8, medida através de leitura espectrofotométrica. Em seguida, a expressão da proteína recombinante foi induzida pela adição de IPTG 0,4 mM e o cultivo mantido sob agitação a 25 °C durante 15 h (BRANDÃO et al., 2008). Após a expressão da YopH, o cultivo foi centrifugado a 6.000 x g por 30 min a 4 °C e o sedimento celular (aproximadamente 3 gramas a partir de 1 L de cultivo) foi homogeneizado com 10 mL de tampão de lise (acetato de sódio 100 mM pH 5,7, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM e DTT 1 mM) suplementado com inibidor de proteases (PMSF 40 µg/mL).

O vetor de expressão pET19b-Hs_PTP1B foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* BL21(DE3). Uma colônia recombinante, selecionada por resistência à ampicilina (100 µg/mL), foi utilizada para inocular 10 mL de meio LB líquido suplementado com 100 µg/mL de ampicilina. Os cultivos foram mantidos sob agitação a 37 °C durante 15 h. Desse pré-inóculo, 5 mL foram transferidos para 250 mL de meio LB novo, suplementado com ampicilina (100 µg/mL), onde as bactérias continuaram crescendo sob agitação a 37 °C até alcançar DO_{600nm} entre 0,7 e 0,8, medida através de leitura espectrofotométrica. Em seguida, a expressão da proteína recombinante foi induzida pela adição de IPTG 0,6 mM e o cultivo mantido sob agitação a 25 °C durante 20 h (BRANDÃO et al., 2010). Após a expressão da PTP1B, o cultivo foi centrifugado a 6.000 x g por 30 min a 4 °C e o sedimento celular (aproximadamente 3 gramas a partir de 1 L de cultivo) foi homogeneizado com 10 mL de tampão de lise (imidazol 20 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, DTT 1 mM e glicerol 10%) suplementado com inibidor de proteases (PMSF 40 µg/mL).

Por fim, as células foram rompidas por sonicação em gelo (7 ciclos de 20 segundos, com intervalos de 40 segundos) e os homogeneizados foram centrifugados (16.000 x g por 30 min a 4 °C) para obter as frações solúveis, que posteriormente foram utilizadas para a purificação das proteínas recombinantes.

2.2.4 Purificação das proteínas PtpA, PtpB, PTP1B e YopH

As proteínas PtpA e PtpB, expressas com uma cauda de seis resíduos de histidinas na porção N-terminal, foram purificadas em condições nativas por cromatografia de afinidade por metal imobilizado

(IMAC) com colunas carregadas com níquel (HisTrap HP 1 mL, GE Healthcare) conectadas a um cromatógrafo ÄKTA (GE Healthcare). Antes de ser carregada com a amostra, a coluna foi previamente equilibrada com Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 0,5 M, imidazol 10 mM e glicerol 10%. As proteínas que ligaram à coluna, devido à interação dos resíduos de histidinas da cauda N-terminal com os íons de níquel, foram eluídas com um gradiente de imidazol 10 a 500 mM, o qual compete quimicamente com as cadeias laterais dos resíduos de histidinas, em um fluxo de 1 mL/min e em frações de 1 mL. Alíquotas de cada fração foram coletadas para visualização em SDS-PAGE 10%, sob condições desnaturantes e redutoras, que foi corado com azul de Coomassie R-250 0,25%. Após a purificação, as frações contendo a proteína de interesse foram reunidas e submetidas a diálises para a retirada gradual do imidazol da solução: *i*) 2 horas com o tampão A (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 0,5 M, DTT 5 mM, glicerol 10%) suplementado com imidazol 75 mM, *ii*) 2 com o tampão A suplementado com imidazol 35 mM, *iii*) 15 horas com Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 50 mM, DTT 5 mM, glicerol 20% e EDTA 5 mM. Em seguida, as proteínas foram concentradas por centrifugação (Amicon 10 kDa Ultra-15 Millipore), separadas em alíquotas e estocadas a -80 °C.

A proteína YopH foi purificada em condições nativas por cromatografia de troca iônica com uma coluna catiônica carregada com radicais $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3$ (HiTrap SP HP 5 mL, GE Healthcare) conectada a um cromatógrafo ÄKTA (GE Healthcare). Antes de ser carregada com a amostra, a coluna foi previamente equilibrada com acetato de sódio 100 mM pH 5,7, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM e DTT 1 mM. As proteínas que ligaram à coluna, devido à atração das cargas positivas (pH abaixo do ponto isoelétrico de YopH) pelos radicais $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3$, foram eluídas com um gradiente de NaCl 10 a 500 mM, o qual compete pelos radicais $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3$, em um fluxo de 2,5 mL/min e em frações de 2 mL. Alíquotas de cada fração foram coletadas para visualização em SDS-PAGE 10%, sob condições desnaturantes e redutoras, que foi corado com azul de Coomassie R-250 0,25%. Em seguida, as frações contendo a proteína de interesse foram reunidas, concentradas por centrifugação (Amicon 10 kDa Ultra-15 Millipore), separadas em alíquotas e estocadas a -80 °C.

A proteína PTP1B (forma truncada da proteína WT, 37 kDa, contendo apenas os primeiros 312 resíduos da região N-terminal) foi purificada por cromatografia de troca iônica seguindo o protocolo descrito por Brandão e colaboradores (2010). A PTP1B heteróloga foi utilizada nos ensaios de seletividade.

A quantificação do conteúdo proteico foi estimada através do método de Bradford (BRADFORD, 1976) com albumina de soro bovino como padrão ou espectrofotometricamente a 280 nm na presença de 6 M de hidrocloreto de guanidina (EDELHOCH, 1967; PACE et al., 1995), levando em consideração a absorvidade molar de cada proteína. O valor da absorvidade molar foi determinado a partir da sequência primária de cada proteína no site www.expasy.ch/tools/protparam.html.

2.2.5 Avaliação da inibição enzimática (*in vitro*) da PtpA, PtpB e YopH

A síntese e a caracterização dos compostos sintéticos avaliados neste trabalho foram realizadas pelos alunos do Laboratório Estrutura e Atividade do Departamento de Química da UFSC, sob a coordenação do Prof. Dr. Ricardo José Nunes, e os compostos naturais avaliados foram isolados no NIQFAR (Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas) da UNIVALI ou no *Dipartimento di Chimica e Technologie del Farmaco, Università di Roma La Sapienza, Roma, Itália*.

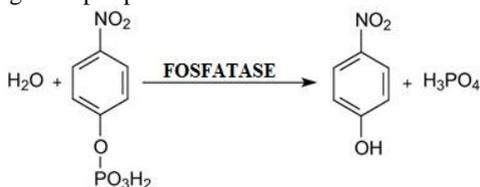
Foi avaliada a atividade de uma biblioteca de 351 compostos orgânicos, das seguintes classes: chalconas, sulfonamidas, sulfonil-hidrazonas, sulfoniltioureas, hidrazonas, tetralonas, oxadiazóis, benzosuberonas, indanonas, tiazolidinonas e compostos naturais, como inibidores das proteínas PtpA e PtpB de *M. tuberculosis*. Foi avaliada uma biblioteca de 19 compostos orgânicos sintéticos (sulfonil-hidrazonas e sulfonamidas) como inibidores da proteína YopH de *Y. enterocolitica*.

2.2.6 Avaliação da atividade residual da PtpA, PtpB e YopH frente a compostos naturais e/ou sintéticos

Os testes de avaliação da inibição enzimática pelos compostos foram realizados de acordo com metodologia já descrita (CHIARADIA et al., 2008) com algumas modificações. Os compostos naturais ou sintéticos avaliados neste trabalho foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO). A atividade enzimática da PtpA, PtpB e YopH foi mensurada por espectrofotometria (leitor de microplaca TECAN Infinite M200) monitorando a hidrólise do substrato artificial *p*-nitrofenil fosfato (*p*NPP) (Figura 13) a 37 °C na ausência ou presença de 25 µM de cada composto. Os ensaios foram realizados em uma reação de 200 µL contendo 20 µL de imidazol 200 mM pH 7,0 (20 mM final),

10 μL de *p*NPP 400 mM (20 mM final), 5 μL de composto 1 M (25 μM final - 2,5% DMSO final), 2 μL de enzima (50 nM PtpA, 30 nM PtpB ou 14 nM YopH final) e 163 μL de água ultrapura. A reação foi iniciada pela adição do substrato (20 mM *p*NPP) após a pré-incubação da enzima com o composto por 10 min a temperatura ambiente para PtpA e a 37 °C para PtpB e YopH. A quantidade de *p*-nitrofenol (*p*NP) produzida foi medida a 410 nm, durante 10 min (com leituras a cada um minuto) a 37 °C. Controles negativos foram realizados na ausência de enzima e controles positivos foram realizados na presença de enzima com 2,5% DMSO final. A atividade foi expressa em porcentagem de atividade residual, comparando-se a atividade enzimática na presença e ausência dos compostos. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

Figura 13. Conversão do *p*-nitrofenil fosfato (*p*NPP) em *p*-nitrofenol (*p*NP) e fosfato inorgânico por proteínas fosfatases.



Adaptado de: www.biopanda-diagnostics.com

2.2.7 Determinação da IC_{50} dos compostos frente à PtpA, PtpB e YopH, e determinação da seletividade frente à PTP1B

De acordo com a seleção inicial, os compostos com inibição da atividade enzimática superior a 50% foram selecionados para os ensaios de determinação da IC_{50} (concentração necessária de um composto para ele inibir 50% da atividade da enzima). A IC_{50} foi determinada em uma reação de 200 μL contendo 20 μL de imidazol 200 mM pH 7,0 (20 mM final), 10 μL *p*NPP 400 mM (20 mM final), 2 μL de enzima (50 nM PtpA, 30 nM PtpB ou 14 nM YopH final) e 8 μL de concentrações crescentes de cada composto (5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 65, 80 e 100 μM final - 4% DMSO final), como descrito no item anterior. Controles negativos foram realizados na ausência de enzima e controles positivos foram realizados na presença de enzima com 4% DMSO final. Os valores de IC_{50} foram calculados a partir do gráfico de concentrações de composto *versus* atividade residual (escala logarítmica) através da regressão linear de melhor ajuste. A atividade foi expressa em porcentagem de atividade residual, comparando-se a atividade

enzimática na presença e ausência do composto inibidor. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

Os ensaios de seletividade para os compostos mais ativos frente à PTP1B (20 nM) foram realizados da mesma maneira.

2.2.8 Avaliação dos parâmetros cinéticos da PtpA, PtpB e YopH, e mecanismo de inibição dos compostos

Para determinar os parâmetros cinéticos da PtpA, PtpB e YopH, e o mecanismo de inibição dos compostos, concentrações crescente de *p*NPP foram avaliadas para cada concentração de composto. Os ensaios foram realizados em uma reação de 200 μ l contendo 20 μ L de imidazol 200 mM pH 7,0 (20 mM final), 2 μ L de enzima (50 nM PtpA, 30 nM PtpB ou 14 nM YopH final), 10 μ L de *p*NPP (0,2 a 30 mM final), e 8 μ L de três concentrações de composto (4% DMSO final), como descrito anteriormente. As concentrações de cada composto foram estipuladas a partir do valor obtido pelo cálculo de IC_{50} . A velocidade da reação foi expressa em atividade específica, definida como a liberação de 1 μ mol *p*NP $min^{-1} mg^{-1}$ de proteína a 37 °C. Sob essas condições, a atividade específica foi calculada utilizando-se a absorvidade molar de 4.940 $M^{-1} cm^{-1}$ (determinada experimentalmente). Para determinar a constante de inibição (K_i) dos compostos, construiu-se o gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk plotando o inverso dos valores correspondente às concentrações de *p*NPP *versus* o inverso dos valores de velocidade (Equação 1). A partir do gráfico duplo-recíproco obteve-se o K_m aparente e a $V_{m\acute{a}x}$ aparente para cada concentração de composto. A inibição competitiva foi calculada pela Equação 2 e a inibição não competitiva foi calculada pela Equação 3:

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (\text{equação 1})$$

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (\text{equação 2})$$

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \quad (\text{equação 3})$$

Onde K_m é a constante de Michaelis-Menten, $[S]$ é concentração de substrato, $V_{m\acute{a}x}$ é a velocidade máxima, $[I]$ é a concentração de inibidor e K_i é a constante de inibição.

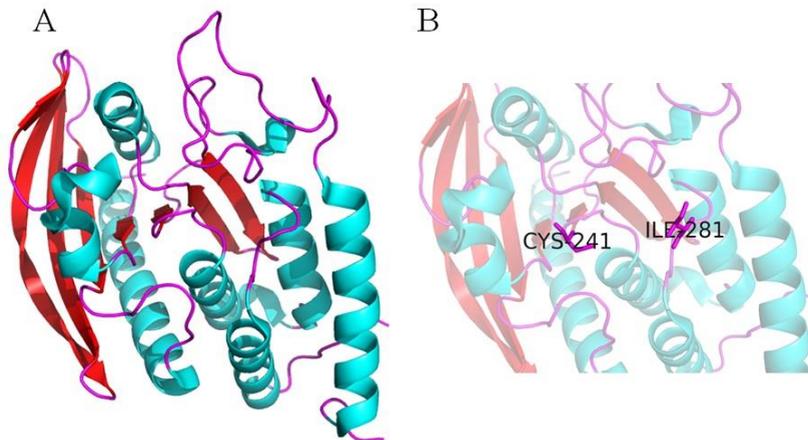
O valor de K_i para os inibidores competitivos foi determinado plotando-se os valores de K_m aparente *versus* a concentração de composto, a interceptação da linha de tendência no eixo x corresponde ao valor de menos K_i . O valor de K_i para os inibidores não competitivos foi determinado plotando-se os valores de $1/V_{m\acute{a}x}$ aparente *versus* a concentração de composto, a interceptação da linha de tendência no eixo x corresponde ao valor de menos K_i . As constantes catalíticas foram determinadas com o programa GraphPad Prism 5.0. Todas as reações foram realizadas em triplicatas.

2.2.9 Modelagem Molecular

As análises de docagem molecular (*molecular docking*) foram realizadas no Laboratório de Química Medicinal e Computacional do Instituto de Física de São Carlos - USP, em colaboração com os professores Dr. Rafael V. C. Guido e Dr. Adriano D. Andricopulo. As estruturas tridimensionais (3D) dos inibidores foram geradas com parâmetros geométricos padrões pelo programa de modelagem molecular SYBYL 8.0. A conformação de cada molécula no conjunto de dados foi energeticamente minimizada empregando o campo de força Tripos e o algoritmo de gradiente conjugado Powell (POWELL, 1977) com um critério de convergência de 0,05 kcal/mol•Å e cargas Gasteiger-Huckel (GASTEIGER; MARSILI, 1980). A docagem molecular e protocolos de pontuação (*scoring protocols*) gerados pelo programa GOLD (JONES et al., 1997) foram aplicados para investigar as possíveis conformações de ligação dos compostos dentro do sítio de ligação da YopH. Os dados cristalográficos da YopH (código PDB 1PA9, resolução a 2 Å) foram usados como alvo molecular para as simulações de docagem (SUN et al., 2003b). Os átomos de hidrogênio foram adicionados na geometria utilizando o módulo Biopolymer em SYBYL 8.0. Possíveis inversões de orientação, protonações e estados tautoméricos dos resíduos de histidina, ácido glutâmico e ácido aspártico dentro do sítio de ligação da YopH foram cuidadosamente verificados com o programa PyMOL (DELANO, 2002). O sítio de ligação utilizado nas análises de docagem molecular envolveu todos os aminoácidos presentes no interior de uma esfera de 20 Å de raio centrado no átomo do C β do resíduo Ile281 (Figura 14). A docagem

molecular foi repetida 30 vezes para cada molécula. A pontuação gerada pelo programa GOLD e uma inspeção visual foi empregada para selecionar a melhor conformação de cada composto.

Figura 14. Estrutura tridimensional da YopH de *Y. enterocolitica* (PDB 1PA9).



(A) Visão completa da estrutura 3D do domínio catalítico da YopH (resíduos 163 a 468). (B) Visão ampliada do sítio de ligação explorado pela docagem molecular. Os resíduos de aminoácidos Ile281 e Cys241 (cisteína catalítica) estão representados como varetas (magenta). As figuras foram geradas com o programa PyMOL.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Expressão e Purificação da PtpA, PtpB e YopH

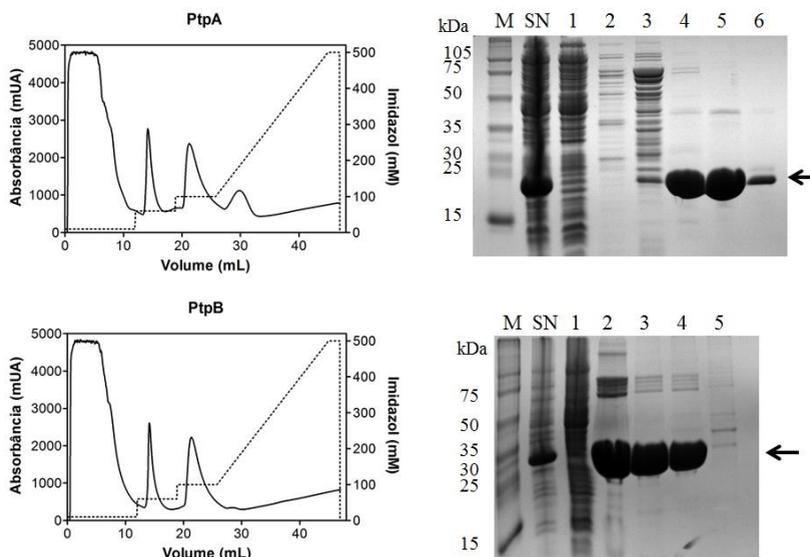
As proteínas PtpA (número de acesso NCBI: NP_216750) e PtpB (NCBI: NP_214667) de *M. tuberculosis* e YopH (NCBI: AAA19860) de *Y. enterocolitica* foram expressas em *E. coli* BL21(DE3) a partir dos vetores de expressão pET28a-Mt_PtpA, pET28a-Mt_PtpB e pT7-7Yop51* Δ 162, respectivamente.

Uma vez que o vetor pET-28a confere uma sequência N-terminal de 6 His, as proteínas PtpA e PtpB recombinantes, expressas na fração solúvel bacteriana, foram purificadas por IMAC, sendo o níquel o metal utilizado. As proteínas PtpA (massa teórica de 20.055 Da e pI de 6,4) e PtpB (massa teórica de 32.317 Da e pI de 6,6) foram eluídas com concentrações crescente de imidazol 100 mM a 200 mM e as eluições analisadas em gel SDS-PAGE 10% corado com azul de Coomassie (Figura 15). Após as diálises para retirada do imidazol, o rendimento final de cada purificação foi de aproximadamente 19 mg de proteína por litro de cultivo para PtpA e 15 mg para PtpB, corroborando os resultados previamente descritos para ambas as proteínas (ECCO, 2010; MATIOLLO, 2012).

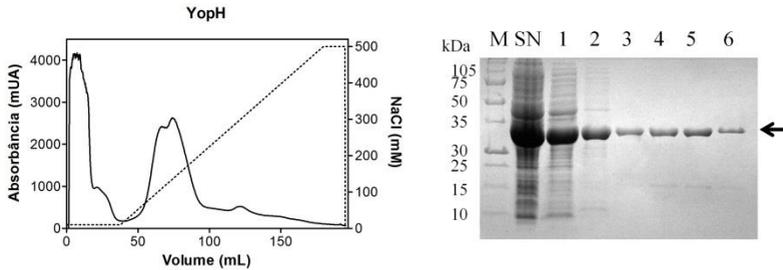
A proteína YopH expressa pela *Y. enterocolitica* contém 468 resíduos de aminoácidos, massa molecular de 50.939 Da, e exibe um pI de 8,92. No entanto, a proteína YopH codificada pelo vetor pT7-7Yop51* Δ 162 não possui os primeiros 162 resíduos de aminoácidos na região N-terminal e contém uma mutação pontual na Cys235: no lugar do resíduo de cisteína encontra-se um resíduo de arginina (ZHANG et al., 1992). A proteína truncada expressa pelo vetor pT7-7Yop51* Δ 162 tem uma massa molecular teórica de 33.512 Da, 306 resíduos de aminoácidos e um pI de 8,99. Segundo Zhang e colaboradores (1992), a deleção dos primeiros 162 aminoácidos e a mutação pontual (C235R) resultou em um aumento significativo na expressão recombinante da YopH em *E. coli*.

A proteína YopH foi expressa na fração solúvel bacteriana e purificada por cromatografia de troca iônica, sendo eluída com concentrações crescentes de NaCl. As frações eluídas analisadas em gel SDS-PAGE 10% corado com azul de Coomassie, mostram que a YopH foi eluída com concentrações a partir de 60 mM de NaCl (Figura 16). O rendimento final de cada purificação foi de aproximadamente 19 mg de proteína por litro de cultivo.

Figura 15. Purificação da PtpA e PtpB.



À esquerda, gráfico da eluição das proteínas com concentrações crescentes de imidazol. No eixo das ordenadas esquerdo, está representada a absorbância a 280 nm (linha cheia) de cada volume de eluição. No eixo das ordenadas direito, está representada a concentração de imidazol (mM) em cada volume de eluição (linha pontilhada): O primeiro passo corresponde a 10 mM, o segundo passo a 60 mM, o terceiro passo a 100 mM e o quarto passo de 100 a 500 mM de imidazol. À direita, SDS-PAGE 10% da purificação das proteínas. 15 μ L de cada amostra foram aplicados em cada canaleta. PtpA: M, marcador de massa molecular. SN, fração solúvel do lisado bacteriano. 1-6, frações eluídas coletadas. 1 e 2, eluição com 10 mM de imidazol. 3, eluição com 60 mM de imidazol. 4 e 5 eluição com 100 mM de imidazol. 6, eluição com 200 mM de imidazol. PtpB: M, marcador de massa molecular. SN, fração solúvel do lisado bacteriano. 1-5, frações eluídas coletadas. 1, eluição com 10 mM de imidazol. 2, 3 e 4 eluição com 100 mM de imidazol. 5, eluição com 200 mM de imidazol. Gráficos e géis representativos de experimentos realizados em quadruplicata.

Figura 16. Purificação da YopH.

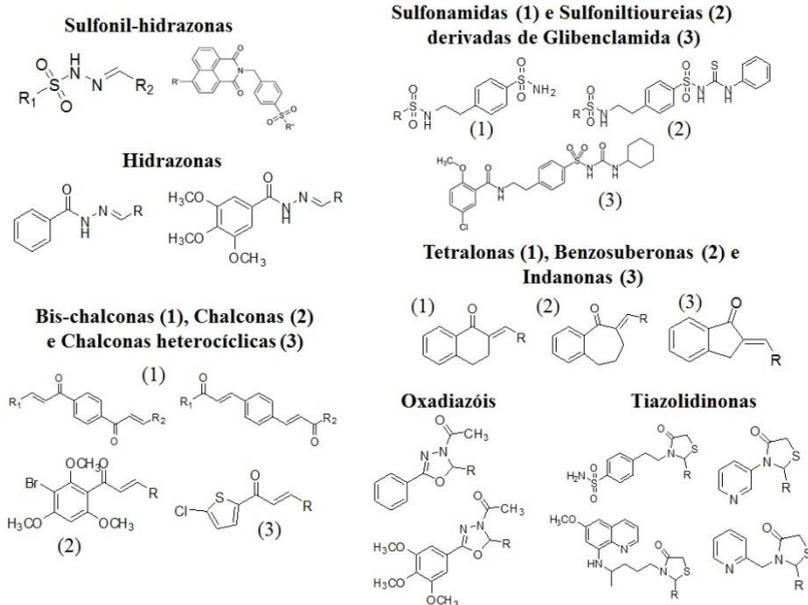
À esquerda, gráfico da eluição da proteína com concentrações crescentes de NaCl. No eixo das ordenadas esquerdo, está representada a absorvância a 280 nm (linha cheia) de cada volume de eluição. No eixo das ordenadas direito, está representada a concentração de NaCl (mM) em cada volume de eluição (linha pontilhada): O primeiro passo corresponde a 10 mM e o segundo passo de 10 a 500 mM de NaCl. À direita, SDS-PAGE 10% da purificação da proteína. 15 μ L de cada amostra foram aplicados em cada canaleta. M, marcador de massa molecular. SN, fração solúvel do lisado bacteriano. 1-6, frações eluídas coletadas. 1, eluição com 60 mM de NaCl. 2, eluição com 70 mM de NaCl. 3, eluição com 90 mM de NaCl. 4, eluição com 120 mM de NaCl. 5, eluição com 160 mM de NaCl. 6, eluição com 300 mM de NaCl. Gráficos e géis representativos de experimentos realizados em duplicata.

2.3.2 Avaliação da inibição enzimática da PtpA, PtpB e YopH

A patogenicidade de *M. tuberculosis* e *Y. enterocolitica* é absolutamente dependente da ação de seus fatores de virulência, entre os quais encontram-se proteínas tirosina fosfatases. As proteínas PtpA e PtpB do *M. tuberculosis* e YopH de *Y. enterocolitica* são secretadas no citosol da célula infectada e interrompem as defesas imunitárias do hospedeiro, por interferir nos processos de transdução de sinais dos mesmos (LEE et al., 2003; SINGH et al., 2003; BACH et al., 2008). A deleção gênica de ambas as PTPs do *M. tuberculosis* atenuam o crescimento da bactéria em macrófagos infectados (SINGH et al., 2003; BACH et al., 2008). Dessa forma, as proteínas PtpA e PtpB desempenham uma função crucial à sobrevivência do *M. tuberculosis* durante a infecção (GRUNDNER et al., 2008). De maneira similar, cepas de *Yersinia* que não contêm o gene *yopH* ou apresentam a deleção do mesmo não são virulentas (LIANG et al., 2003; SUN et al., 2003b). Conseqüentemente, essas enzimas são alvos terapêuticos promissores para o desenvolvimento de agentes antibacterianos.

Na busca por novas moléculas inibidoras de proteínas tirosina fosfatases, realizou-se a triagem de uma biblioteca de moléculas orgânicas sintéticas e naturais frente à atividade da PtpA, da PtpB e da YopH. A biblioteca avaliada consistiu de 351 compostos pertencentes às seguintes classes químicas: chalconas (bis-chalconas e chalconas heterocíclicas), sulfonamidas, sulfonyl-hidrazonas, sulfonyl-tioureas, hidrazonas, tetralonas, oxadiazóis, benzosuberonas, indanonas, tiazolidinonas e compostos naturais (Figura 17).

Figura 17. Estrutura química geral dos compostos sintéticos avaliados frente à PtpA, PtpB e YopH.



2.3.3 Ensaio de atividade com os candidatos a inibidores

Os ensaios de atividade enzimática da PtpA, PtpB e YopH, para a seleção dos candidatos a inibidores, foram realizados na presença de uma única concentração de cada composto, 25 μM final, como descrito em Chiaradia e colaboradores (2008). A capacidade das 351 moléculas inibirem a hidrólise do *p*NPP pelas enzimas foi avaliada a 37 °C em 20 mM de imidazol pH 7,0.

Inicialmente, avaliou-se o efeito inibitório de sulfonamidas e sulfonyl-hidrazonas frente à atividade da PtpA, PtpB e YopH. O efeito

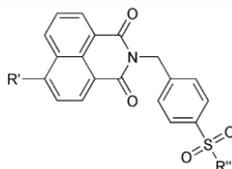
antibacteriano de ambas as classes foi previamente descrito para *E. coli* e *Staphylococcus aureus* (OLIVEIRA et al., 2011). Dentre as sulfonamidas, o composto (oxalilamino-metileno)-tiofeno sulfonamida (OMTS) foi relatado como um potente inibidor competitivo da PtpB, o qual apresentou IC_{50} de 440 ± 50 nM e especificidade de 60 vezes para a PtpB, comparando-se a outras PTPs humanas (GRUNDNER et al., 2007). Além da OMTS, outros derivados de sulfonamidas foram relatados como agentes antituberculose, uma vez que foram capazes de inibir a atividade da PtpB *in vivo* (CHEN et al., 2010). A partir da triagem de uma biblioteca de 7.500 compostos, Chen e colaboradores (2010) identificaram duas classes distintas de inibidores de PtpB, derivados de sulfonamidas e oxalamidas, sendo que ambas as classes foram capazes de bloquear a inativação de ERK1/2 mediada pela PtpB e o crescimento do *M. tuberculosis* em macrófagos. Nosso grupo de pesquisa também relatou previamente quatro derivados de sulfonil-hidrazonas como potentes inibidores de PtpB, os quais apresentaram inibição competitiva com valores de K_i na faixa de micromolar ($K_i = 2,5$ a $15 \mu\text{M}$) (OLIVEIRA et al., 2011).

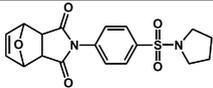
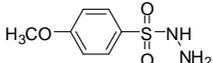
Neste trabalho, a partir dos ensaios de triagem de uma biblioteca de 19 compostos (Tabela 1), duas sulfonamidas apresentaram atividade inibitória superior a 50% da atividade da YopH. Por outro lado, nenhuma molécula apresentou inibição significativa da atividade da PtpA e da PtpB, comparando-se a atividade enzimática na ausência de composto (Tabela 1).

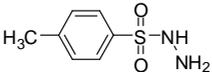
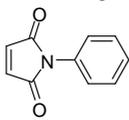
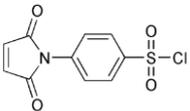
Tabela 1. Inibição relativa da atividade enzimática da PtpA, PtpB e YopH, conferida por sulfonil-hidrazonas e sulfonamidas.

Sulfonil-hidrazonas	Radical	Atividade (%) PtpA	Atividade (%) PtpB	Atividade (%) YopH
K141	R1 = 4-OCH ₃ -fenil R2 = 1-naftil	>100	>100	>100
K142	R1 = 4-CH ₃ -fenil R2 = 1-naftil	94,11 ± 7,26	>100	90,35 ± 6,3
K145	R1 = 4-CH ₃ -fenil R2 = 2-OH-1-naftil	>100	93,98 ± 1,66	>100
K160	R1 = 4-CH ₃ -fenil R2 = 4-OCH ₃ -fenil	87,93 ± 3,16	82,28 ± 0,89	>100
K147	R1 = 4-CH ₃ -fenil	87,38 ±	67,20 ±	90,5 ±

K148	R2 = 2-naftil	7,08	0,92	10,7
	R1 = 4-CH ₃ -fenil	>100	83,39 ±	>100
K149	R2 = 3,4,5-triOCH ₃ -fenil		9,93	
	R1 = 4-OCH ₃ -fenil	>100	84,39 ±	>100
PF8QSO	R2 = 3,4,5-triOCH ₃ -fenil		1,64	
		79,35 ±	79,71 ±	>100
PBR8QSO	R1 =	9,13	1,89	
	R2 = 4-F-fenil			
1naftil8Q	R1 =	62,43 ±	86,13 ±	>100
	R2 = 4-Br-fenil	2,95	5,44	
PH8Q	R1 =	61,67 ±	61,55 ±	83,6 ±
	R2 = 1-naftil	1,3	1,55	0,52
PH8Q	R1 =	59,43 ±	68,82 ±	77,47 ±
	R2 = fenil	3,74	4,05	6,34



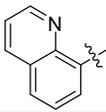
Sulfonamidas	Radical	Atividade (%) PtpA	Atividade (%) PtpB	Atividade (%) YopH
K1	R' = H	>100	>100*	70,29 ±
K2	R'' = N-pirrolidina			6,61
K3	R' = H	>100	>100*	62,66 ±
	R'' = N-morfolina			5,87
Estruturas relacionadas	R' = Cl	>100	>100*	17,9 ± 1,2
	R'' = N-morfolina			
K7		>100	>100*	23,6 ± 5,9
POCH3SH		69,02 ±	91,04 ±	98,11 ±
		1,39	0,9	1,6

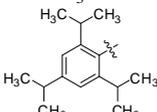
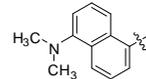
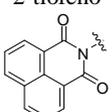
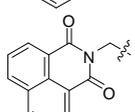
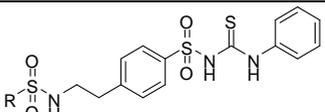
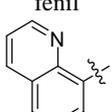
SHK140		72,08 ± 1,5	73,93 ± 1,21	96,64 ± 2,95
NFM		>100	72,9 ± 3*	87,52 ± 9,44
KC11		>100	85,5 ± 5*	92,04 ± 6,61

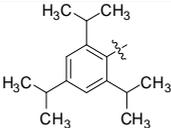
Compostos em negrito apresentaram inibição da atividade residual superior a 50%. *Compostos avaliados frente à PtpB em trabalhos anteriores (OLIVEIRA et al., 2011). Os dados representam a média ± DP de três experimentos independentes.

Com base nos resultados descritos na literatura e a atividade inibitória apresentada pelas sulfonamidas neste trabalho (Tabela 1), novos derivados de sulfonamidas, bem como de sulfoniltioureias foram avaliados frente à PtpA e PtpB. Através de estudos computacionais realizados como parte do trabalho de tese da Dra. Alessandra Mascarello (MASCARELLO, 2012), sulfonamidas e sulfoniltioureias derivadas da glibenclamida foram identificadas como promissores inibidores de PtpB. Na tentativa de validar os resultados obtidos pela análise computacional, as moléculas foram sintetizadas e avaliadas. Das 24 moléculas analisadas, um composto (Gli 1c) apresentou atividade inibitória da PtpB superior a 50%, comparando-se à atividade enzimática na ausência de composto (Tabela 2). Nenhum dos compostos foi capaz de inibir significativamente a atividade da PtpA (Tabela 2).

Tabela 2. Inibição relativa da atividade enzimática da PtpA e PtpB, conferida por sulfonamidas e sulfoniltioureias derivadas da glibenclamida.

Sulfonamidas	Radical	Atividade (%)	
		PtpA	PtpB
Gli 1a	fenil	81,03 ± 5,92	94,53 ± 5,81
Gli 2a		85,31 ± 2,63	74,22 ± 2,49

Gli 3a	4-F-fenil	78,74 ± 4,32	>100
Gli 4a	4-CH ₃ -fenil	94,70 ± 2,68	>100
Gli 5a		97,50 ± 0,29	90,79 ± 2,13
Gli 6a	4-Cl-fenil	78,01 ± 3,62	>100
Gli 7a	3,4-Cl ₂ -fenil	85,78 ± 4,35	>100
Gli 8a		>100	>100
Gli 9a	 	85,27 ± 4,57	90,49 ± 1,80
Gli 10a		>100	>100
Gli 12a	4-NO ₂ -fenil	92,57 ± 3,00	74,41 ± 5,59
Gli 13a	4-Br-fenil	98,61 ± 1,82	87,72 ± 0,40
Gli 14a	4-OCH ₃ -fenil	97,76 ± 6,59	>100
Gli 15a	2-tiofeno	93,78 ± 0,16	>100
Gli 18a		83,41 ± 4,29	72,00 ± 1,79
Gli 20a		>100	61,46 ± 6,39
			
Sulfonilthioureias	Radical	Atividade (%) PtpA	Atividade (%) PtpB
Gli 1c	fenil	99,94 ± 4,28	53,22 ± 9,21
Gli 2c		91,10 ± 5,97	78,18 ± 0,78
Gli 3c	4-F-fenil	>100	83,90 ± 3,82
Gli 4c	4-CH ₃ -fenil	86,50 ± 4,21	75,17 ± 0,86

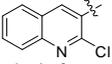
Gli 5c		83,88 ± 7,41	55,44 ± 1,19
Gli 6c	4-Cl-fenil	92,26 ± 4,79	76,06 ± 1,25
Gli 14c	4-OCH ₃ -fenil	86,49 ± 2,39	72,20 ± 3,24
Gli 15c	2-tiofeno	82,31 ± 1,69	66,22 ± 3,84

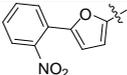
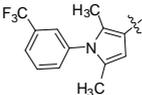
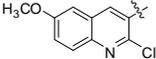
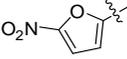
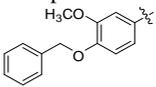
Compostos em negrito apresentaram inibição da atividade residual superior a 50%. Os dados representam a média ± DP de três experimentos independentes.

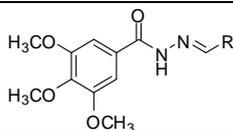
As hidrazonas, caracterizadas pela presença do grupo –NH–N=C–, são bem conhecidas por desempenhar uma função importante quanto à atividade antimicrobiana (BEDIA et al., 2006; MORE et al., 2014). Hidrazonas derivadas de benzofenonas e 1,2-dicetonas demonstraram significativa atividade antileishmania, antibacteriana e antifúngica (AL-KAHRAMAN et al., 2012). Além disso, diversos estudos têm ressaltado a ação de compostos derivados de hidrazonas como potenciais candidatos a agentes antituberculose: as hidrazonas 2-azetidionas e 4-tiazolidinonas com MIC entre 0,35–3,15 µg/mL (PATHAK et al., 2012); o derivado de hidrazida-hidrazonas ácido 4-fluorobenzoico [(5-nitro)-tiofen-2-il]-metileno]-hidrazida com MIC de 3,13 µg/mL (BEDIA et al., 2006); e os derivados de pirrol hidrazonas, com valores de MIC entre 0,2 a 0,8 µg/mL para os compostos mais ativos (MORE et al., 2014).

Neste estudo, foi avaliada a ação de 60 hidrazonas frente à atividade da PtpA e PtpB. Dentre esses compostos, apenas uma molécula apresentou atividade inibitória da PtpB superior a 50% (G21). Para PtpA, nenhuma molécula apresentou inibição significativa da sua atividade, comparando-se a atividade enzimática na ausência de composto (Tabela 3).

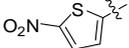
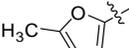
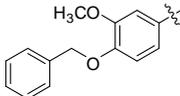
Tabela 3. Inibição relativa da atividade enzimática da PtpA e PtpB, conferida por hidrazonas.

Hidrazonas	Radical	Atividade (%)	
		PtpA	PtpB
G1		90,52 ± 3,40	88,86 ± 2,38
G2	2-tiofeno	>100	77,74 ± 2,88

G3		>100	99,10 ± 2,38
G4		>100	92,05 ± 2,96
G5		95,58 ± 5,33	71,55 ± 6,11
G6		95,92 ± 0,63	72,06 ± 6,61
G7	3-NO ₂ ,4-OH-fenil	98,64 ± 2,82	78,78 ± 4,10
G8	3-piridina	97,53 ± 2,84	>100
G9	3,5-diOCH ₃ ,4-OH-fenil	>100	77,68 ± 3,40
G10	4-piridina	>100	90,54 ± 4,49
G11		77,86 ± 1,30	83,21 ± 3,07
G12	3,4-diOCH ₃ -fenil	88,44 ± 0,96	>100
G13	fenil	94,68 ± 0,01	89,30 ± 8,48
G14	2-CN-fenil	89,54 ± 6,26	82,73 ± 5,18
G15	3-CN-fenil	76,35 ± 7,33	91,81 ± 0,51
G16	4-CN-fenil	82,90 ± 4,01	74,62 ± 3,40
G17	3,4-OCH ₂ O-fenil	79,79 ± 8,87	85,70 ± 3,96
G18	2-NO ₂ -fenil	75,74 ± 2,69	>100
G19	4-Br-fenil	82,69 ± 0,47	>100
G20	4-CH ₃ -fenil	74,33 ± 5,16	86,32 ± 8,66
G21	1-naftil	92,10 ± 2,06	56,79 ± 6,32
G22	2-naftil	90,74 ± 3,16	59,58 ± 7,55
G23	2-OH,5-Br-fenil	>100	74,15 ± 4,06
G24	4- CF ₃ -fenil	>100	79,34 ± 3,10



Hidrazonas	Radical	Atividade (%)	
		PtpA	PtpB
F1	fenil	>100	>100
F2	4-Br-fenil	>100	>100
F3	4-NO ₂ -fenil	90,17 ± 0,3	96,42 ± 1,13
F4	4-OCH ₃ -fenil	>100	87,80 ± 3,40
F5	3-Br,4-OH,5-OCH ₃ -fenil	>100	96,64 ± 2,22
F6	3-I,4-OH,5-OCH ₃ -fenil	>100	99,87 ± 2,58
F7	3-OCH ₃ ,4-OH-fenil	81,18 ± 4,63	79,29 ± 0,60
F8	1-naftil	>100	>100
F9	2-naftil	89,01 ± 0,1	93,69 ± 2,73

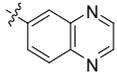
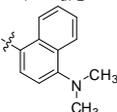
F10	4-Cl-fenil	88,15 ± 1,23	84,45 ± 3,98
F11	3,4-OCH ₂ O-fenil	89,26 ± 4,7	>100
F12	2-Cl-fenil	73,45 ± 2,88	>100
F13	2,5-diOCH ₃ -fenil	82,87 ± 7,12	80,53 ± 5,40
F14	2-F-fenil	76,70 ± 2,28	>100
F16	2,4,5-triOCH ₃ -fenil	75,89 ± 1,13	88,96 ± 0,83
F17	4-F-fenil	79,33 ± 3,24	92,99 ± 1,15
F18	4-butoxi-fenil	57,12 ± 1,72	95,81 ± 1,55
F19	4-CH ₃ -fenil	79,96 ± 1,34	89,68 ± 0,85
F20		90,30 ± 0,6	83,62 ± 1,96
F21	2-NO ₂ -fenil	>100	92,83 ± 0,91
F23	4-N(CH ₃) ₂ -fenil	>100	>100
F24	2,6-Cl ₂ -fenil	>100	>100
F25	3-Cl-fenil	>100	>100
F29		>100	>100
F30	2-COOH-fenil	>100	>100
F31	2-OH-fenil	>100	>100
F32		>100	>100
F35	3-CH ₂ CH ₃ ,4-OH-fenil	>100	90,44 ± 4,26
F38		>100	>100
F39	3-OCH ₃ -fenil	>100	>100
F41	2-OH,5-Br-fenil	>100	>100
F42		>100	>100
F43	2,4-Cl ₂ -fenil	>100	>100
F44	3,4,5-triCH ₃ O-fenil	95,06 ± 3,52	>100
F46	4-CF ₃ -fenil	>100	>100
F47	3,5-Cl ₂ -fenil	>100	>100
F48	3-CF ₃ -fenil	>100	>100

Compostos em negrito apresentaram inibição da atividade residual superior a 50%. Os dados representam a média ± DP de três experimentos independentes.

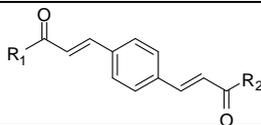
Chalconas são precursores da biossíntese de vários compostos, como flavonoides e isoflavonoides, além de atuarem como precursores na síntese de diversos compostos terapêuticos (BUKHARI et al., 2012). As chalconas exibem um amplo espectro de atividades biológicas, incluindo propriedades anti-inflamatória, antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, citotóxica, antitumoral e anticancerígena (KUETE;

SANDJO, 2012). Trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa relataram o potencial antituberculose de chalconas, uma vez que cinco compostos foram capazes de inibir a atividade da PtpA *in vitro*, bem como reduzir a sobrevivência do *M. tuberculosis* em macrófagos humanos infectados e a desfosforilação da proteína VPS33B, um dos substratos naturais da PtpA conhecidos (CHIARADIA et al., 2008; MASCARELLO et al., 2010). Devido aos excelentes resultados das chalconas como inibidores da PtpA de *M. tuberculosis*, novas estruturas foram planejadas com diferentes substituintes (R₁ e R₂). Um total de 55 derivados de chalconas (incluindo chalconas naturais e sintéticas, e bis-chalconas sintéticas) foram avaliados frente à atividade da PtpA e PtpB. Destes compostos, 12 moléculas apresentaram atividade inibitória da PtpA superior a 50% e 14 da PtpB (Tabela 4).

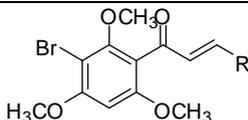
Tabela 4. Inibição relativa da atividade enzimática da PtpA e PtpB, conferida por bis-chalconas e chalconas.

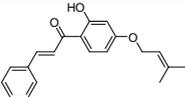
Bis-chalconas	Radical R1 = R2	Atividade (%) PtpA	Atividade (%) PtpB
BC1	4-OCH ₃ -fenil	64,55 ± 7,50	60,87 ± 4,71
BC2	3,4,5-triOCH ₃ -fenil	85,75 ± 1,09	98,05 ± 7,19
BC4	3,4-diOCH ₃ -fenil	80,08 ± 5,01	91,82 ± 3,19
BC6	R1= 3,4-OCH ₂ O- fenil	65,77 ± 0,31	57,94 ± 1,93
BC7	2,5-diOCH ₃ -fenil	67,58 ± 1,32	59,11 ± 2,48
BC8	2-naftil	64,70 ± 0,53	52,33 ± 7,93
BC10	1-naftil	59,63 ± 4,62	49,01 ± 5,19
BC11	fenil	39,58 ± 1,60	22,91 ± 1,04
BC13	2,4,5-triOCH ₃ -fenil	98,46 ± 2,87	>100
BC14	4-COOH-fenil	35,58 ± 1,65	68,62 ± 1,25
BC15	2,4,6-triOCH ₃ -fenil	94,44 ± 4,09	90,68 ± 6,61
BC16	3-OCH ₃ ,4-OH-fenil	98,92 ± 2,94	98,98 ± 5,14
BC17		77,45 ± 2,47	70,65 ± 0,79
BC18	4-N(CH ₃) ₂ -fenil	46,47 ± 2,79	39,64 ± 0,97
BC19		26,85 ± 1,18	17,33 ± 4,37
BC20	2,6-diOCH ₃ -fenil	75,13 ± 0,22	63,68 ± 0,55

BC21	2,3,4-triOCH ₃ -fenil	87,40 ± 1,36	76,80 ± 0,52
-------------	----------------------------------	--------------	--------------



Bis-chalconas	Radical R1 = R2	Atividade (%)	
		PtpA	PtpB
PM1	4-OCH ₃ -fenil	32,69 ± 1,65	17,94 ± 0,48
PM2	3,4,5-triOCH ₃ -fenil	83,70 ± 1,74	>100
PM3	3-OCH ₃ -fenil	85,71 ± 4,45	94,26 ± 0,21
PM4	3,4-diOCH ₃ -fenil	86,95 ± 4,66	>100
PM5	2,4-diOCH ₃ -fenil	92,59 ± 3,88	>100
PM6	3,4-OCH ₂ O--fenil	53,31 ± 1,92	45,33 ± 4,37
PM7	2,5-diOCH ₃ -fenil	86,31 ± 6,31	79,41 ± 1,07
PM8	2-naftil	32,24 ± 0,56	23,88 ± 2,52
PM9	3,5-diOCH ₃ -fenil	92,28 ± 4,57	76,37 ± 11,06
PM10	1-naftil	77,33 ± 2,32	72,93 ± 2,42
PM11	fenil	46,41 ± 1,01	40,00 ± 3,07
PM12	2-OCH ₃ -fenil	>100	85,75 ± 2,34
PM13	2,4,5-triOCH ₃ -fenil	95,99 ± 0,59	92,39 ± 3,48
PM14	4-COOH-fenil	70,78 ± 2,88	81,92 ± 0,17
PM15	2,4,6-triOCH ₃ -fenil	74,07 ± 0,13	59,40 ± 3,16
PM16	3-OCH ₃ ,4-OH-fenil	84,31 ± 2,03	81,63 ± 2,20



Chalconas	Radical	Atividade (%)	
		PtpA	PtpB
B65	1-naftil	79,58 ± 6,11	76,25 ± 2,75
B66	2,6-diOCH ₃ -fenil	79,18 ± 0,01	85,45 ± 4,11
B67	4-butoxi-fenil	92,04 ± 3,57	84,79 ± 3,74
B74	4-CH ₃ -fenil	74,82 ± 0,04	81,49 ± 11,94
B75	3-NO ₂ -fenil	42,21 ± 4,30	23,35 ± 2,90
B77	4-OCH ₃ -fenil	85,30 ± 8,81	>100
B78	4-Cl-fenil	49,23 ± 15,38	33,45 ± 1,12
B81	2-COOH-fenil	80,93 ± 1,01	96,19 ± 2,92
B85	2-naftil	35,56 ± 9,77	25,48 ± 3,72
B89	fenil	87,00 ± 5,00	90,24 ± 6,29
Chalconas naturais	Estrutura	Atividade (%)	
CH1		81,09 ± 3,22	>100

CH2		73,35 ± 5,90	96,93 ± 8,07
CH3		64,55 ± 2,17	71,69 ± 14,94
CH4		51,54 ± 1,62	84,04 ± 3,09
CH5		64,85 ± 2,49	52,34 ± 1,46
CH6		1,29 ± 0,01	57,38 ± 5,81
CH7		80,46 ± 0,56	>100
CH8		76,60 ± 0,19	>100
CH9		84,02 ± 0,23	>100
CH10		66,08 ± 1,00	94,66 ± 13,88
CH11		75,38 ± 2,84	>100
CH12		66,33 ± 1,86	>100

Compostos em negrito apresentaram inibição da atividade residual superior a 50%. Os dados representam a média ± DP de três experimentos independentes.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa também obteve excelentes resultados de inibição da atividade da PtpA e da PtpB pela ação de chalconas (CHIARADIA et al., 2012). Segundo Chiaradia e colaboradores (2012), a análise de uma biblioteca de 100 chalconas inéditas possibilitou a identificação de uma nova série de inibidores competitivos e seletivos para PtpA e PtpB, sendo que alguns dos melhores resultados foram obtidos com derivados de chalconas heterocíclicas. Dessa forma, chalconas heterocíclicas aparecem como

compostos promissores para o desenvolvimento de novas estratégias de combate à tuberculose. Para investigar o efeito inibitório de novas chalconas heterocíclicas frente às PTPs, 20 moléculas foram avaliadas frente à atividade da PtpA e PtpB. Dentre estes compostos, quatro apresentaram atividade inibitória da PtpA superior a 50%, para PtpB nenhuma molécula apresentou inibição significativa da sua atividade, comparando-se a atividade enzimática na ausência de composto (Tabela 5).

Tabela 5. Inibição relativa da atividade enzimática da PtpA e PtpB, conferida por chalconas heterocíclicas.

Chalconas heterocíclicas	Radical	Atividade (%) PtpA	Atividade (%) PtpB
H1A	fenil	75,28 ± 4,9	>100
H2	4-Cl-fenil	46,0 ± 2,05	>100
H3	4-OCH ₃ -fenil	94,82 ± 5,47	86,65 ± 7,62
H4	4-CH ₃ -fenil	92,99 ± 7,43	>100
H6	3-NO ₂ -fenil	21,91 ± 1,48	71,19 ± 3,02
H7	4-F-fenil	64,65 ± 6,5	>100
H11	2,4,5-triOCH ₃ -fenil	74,13 ± 7,74	>100
H12	2,4,6-triOCH ₃ -fenil	55,38 ± 2,43	94,32 ± 3,83
H14	3,4-diOCH ₂ O-fenil	34,70 ± 6,4	92,20 ± 2,48
H15	1-naftil	89,0 ± 5,53	>100
H16	4-OBu-fenil	>100	>100
H17	3-OCH ₃ ,4-OH-fenil	83,23 ± 13,4	>100
H19		96,86 ± 3,14	>100
H21		56,24 ± 4,26	>100
H22		31,34 ± 3,59	58,77 ± 4, 51
H24	2,5-diOCH ₃ -fenil	>100	>100
H26	4-N(CH ₃) ₂	79,02 ±	>100
H28	4-COOH	79,10 ± 0,7	78,81 ± 1,38
H29	2,3,4-OCH ₃	>100	>100

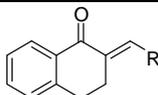
H30	2,6-OCH ₃	94,07 ± 4,34	>100
------------	----------------------	--------------	------

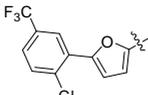
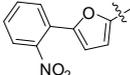
Compostos em negrito apresentaram inibição da atividade residual superior a 50%. Os dados representam a média ± DP de três experimentos independentes.

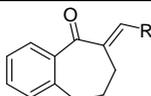
Indanonas, tetralonas e benzosuberonas são derivados cíclicos de chalconas, estruturalmente muito semelhantes aos flavonoides, e têm despertado grande interesse como potenciais agentes antileishmania, antifúngicos, antitumorais e anti-*Trypanosoma cruzi* (FOURNET et al., 1994; MONOSTORY et al., 2003; HALLGAS et al., 2005; CAPUTTO et al., 2012; NAGARAPU et al., 2014). Tendo em vista a vasta gama de atividades biológicas e os trabalhos prévios do grupo com chalconas, avaliou-se a ação de análogos exocíclicos de chalconas, sendo 21 tetralonas, 10 benzosuberonas e 21 indanonas, frente à atividade da PtpA e PtpB. Dos compostos avaliados, uma tetralona e três indanonas apresentaram atividade inibitória da PtpB superior a 50%, comparando-se a atividade enzimática na ausência de composto (Tabela 6). Nenhum dos compostos de foi capaz de inibir significativamente a atividade da PtpA (Tabela 6).

Tabela 6. Inibição relativa da atividade enzimática da PtpA e PtpB, conferida por tetralonas, benzosuberonas e indanonas.

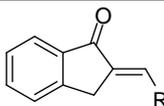
Tetralonas	Radical	Atividade (%)	
		PtpA	PtpB
GSQ-01	4-Cl-fenil	>100	85,29 ± 7,36
GSQ-02	4-NO ₂ -fenil	81,44 ± 6,30	57,46 ± 1,90
GSQ-04	4-butoxi-fenil	94,07 ± 1,32	99,15 ± 9,07
GSQ-06	3-Br-fenil	85,24 ± 5,38	>100
GSQ-07	4-OCH ₃ -fenil	88,45 ± 9,24	>100
GSQ-08	fenil	>100	>100
GSQ-10	4-Br-fenil	>100	99,27 ± 6,01
GSQ-11	4-N(CH ₃) ₂ -fenil	>100	>100
GSQ-12	4-F-fenil	>100	>100
GSQ-13	3-NO ₂ -fenil	>100	>100
GSQ-14	3-Cl-fenil	80,54 ± 5,26	93,57 ± 4,80
GSQ-16	4-CH ₃ -fenil	82,63 ± 6,32	91,56 ± 0,94
GSQ-17	3,4-Cl ₂ -fenil	82,42 ± 4,38	87,29 ± 0,02
GSQ-19	4-CF ₃ -fenil	90,10 ± 3,26	79,67 ± 0,16
GSQ-20	3,5-Cl ₂ -fenil	83,89 ± 7,09	93,39 ± 1,73
GSQ-22	2,4-Cl ₂ -fenil	>100	87,71 ± 0,44
GSQ-24	3,4-OCH ₂ O-fenil	83,68 ± 5,32	93,16 ± 3,11



GSQ-30		98,25 ± 2,61	50,16 ± 9,48
GSQ-32	2-naftil	>100	97,19 ± 1,21
GSQ-33		92,49 ± 7,92	81,56 ± 5,68
GSQ-39		95,63 ± 1,29	77,48 ± 1,49



Benzosuberonas	Radical	Atividade (%)	
		PtpA	PtpB
GSQ-51	4-Cl-fenil	>100	>100
GSQ-52	4-OCH ₃ -fenil	>100	>100
GSQ-53	4-butixi-fenil	98,92 ± 8,91	>100
GSQ-54	3-Br-fenil	93,94 ± 1,66	>100
GSQ-56	4-CH ₃ -fenil	>100	>100
GSQ-57	4-F-fenil	>100	>100
GSQ-58	3-NO ₂ -fenil	94,99 ± 3,33	>100
GSQ-59	4-NO ₂ -fenil	92,75 ± 3,73	>100
GSQ-60	4-N(CH ₃) ₂ -fenil	87,66 ± 3,15	>100
GSQ-61	fenil	92,75 ± 8,78	>100



Indanonas	Radical	Atividade (%)	
		PtpA	PtpB
GSQ-151	fenil	>100	83,77 ± 7,98
GSQ-152	4-NO ₂ -fenil	75,39 ± 7,91	49,93 ± 3,42
GSQ-153	4-Cl-fenil	>100	94,44 ± 2,63
GSQ-154	4-N(CH ₃) ₂ -fenil	99,16 ± 6,09	96,42 ± 5,15
GSQ-155	4-OCH ₃ -fenil	98,96 ± 2,47	>100
GSQ-156	4-CH ₃ -fenil	88,28 ± 16,80	>100
GSQ-157	3-NO ₂ -fenil	65,09 ± 9,11	51,90 ± 14,84
GSQ-158	3,4-Cl ₂ -fenil	76,64 ± 2,17	54,70 ± 2,10
GSQ-159	3-Cl-fenil	74,64 ± 4,56	52,10 ± 9,81
GSQ-160	4-Br-fenil	81,38 ± 15,42	90,85 ± 26,18
GSQ-161	4-F-fenil	>100	>100
GSQ-162	4-CF ₃ -fenil	86,63 ± 4,36	87,07 ± 6,79
GSQ-163	3-CF ₃ -fenil	81,02 ± 10,08	90,29 ± 12,39
GSQ-164	3-Br-fenil	84,39 ± 10,26	>100
GSQ-165	4-butixi-fenil	92,32 ± 16,28	>100

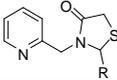
GSQ-166	2,6-diOCH ₃ -fenil	83,80 ± 7,45	>100
GSQ-167	3,4-diOCH ₃ -fenil	95,66 ± 1,52	>100
GSQ-168	2,5-diOCH ₃ -fenil	>100	>100
GSQ-170	1-naftil	93,18 ± 1,37	>100
GSQ-171	2-naftil	82,62 ± 10,14	>100
GSQ-172		95,58 ± 0,64	>100

Compostos em negrito apresentaram inibição da atividade residual superior a 50%. Os dados representam a média ± DP de três experimentos independentes.

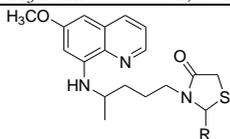
Tiazolidinonas são derivados da tiazolidina, que é composta de um anel heterocíclico de cinco membros com um grupo tioéter e um grupo amina (Figura 17). Esse grupo está presente em uma grande variedade de compostos bioativos, especialmente em compostos anti-HIV, antibacterianos, antituberculose, antitumorais, anti-histamínicos, anticonvulsivantes, antifúngicos e anti-inflamatórios (HU et al., 2013a). Recentemente, análogos de tiazolidinonas têm sido descritos como inibidores de proteínas tirosina fosfatases. Derivados benzilideno-2,4-tiazolidinodiona e 5-arilideno-4-tiazolidinona foram relatados como potentes e seletivos inibidores da PTP1B, proteína envolvida no desenvolvimento de intolerância à glicose, além de ambos ativarem a via metabólica da insulina e, conseqüentemente, melhorarem a tolerância à glicose (BHATTARAI et al., 2009; OTTANÀ et al., 2014).

No que diz respeito à ação antituberculose, 4-tiazolidinonas mostraram-se eficazes e seletivas no combate ao crescimento do *M. tuberculosis*, com inibição de 90 a 98% em uma concentração de 6,25 µg/mL (KÜÇÜKGÜZEL et al., 2002). Além disso, uma nova classe de inibidores seletivos e competitivos de PtpB, com K_i entre 2 a 7,5 µM, foi identificada a partir de derivados de tiazolidinonas (VINTONYAK et al., 2010). Baseando-se nesses resultados da literatura, uma biblioteca de 81 derivados de tiazolidinonas foi avaliada frente à atividade da PtpA e PtpB. Em nosso trabalho, apenas três compostos apresentaram atividade inibitória da PtpB superior a 50% e um composto da atividade da PtpA (Tabela 7).

Tabela 7. Inibição relativa da atividade enzimática da PtpA e PtpB, conferida por tiazolidinonas.

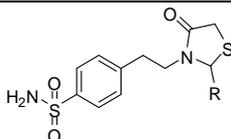
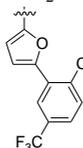
Tiazolidinonas	Radical	Atividade (%)	
		PtpA	PtpB
			

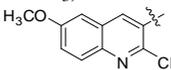
PDN-B27	4-F-fenil	>100	46,67 ± 2,06
PDN-N02	3-Cl-fenil	76,99 ± 6,07	63,26 ± 4,94
PDN-N03	4-CN-fenil	85,00 ± 7,46	84,91 ± 1,28
PDN-N04	4-OCH ₃ -fenil	98,62 ± 3,57	92,96 ± 8,20
PDN-N05	2-OCH ₃ -fenil	>100	63,82 ± 3,40
PDN-N12	2-OH-fenil	>100	76,28 ± 3,25
PDN-N15	3-OH-fenil	>100	68,13 ± 3,81
PDN-N16	3-F-fenil	75,16 ± 6,67	84,31 ± 1,41
PDN-N20	2-CN-fenil	>100	>100
PDN-N23	2-NO ₂ -fenil	>100	90,08 ± 0,36
PDN-N24	3-NO ₂ -fenil	>100	91,43 ± 3,56
PDN-N27	2-F-fenil	84,43 ± 11,28	>100
PDN-P74	4-Cl-fenil	>100	78,08 ± 1,49
PDN-P76	2-Cl-fenil	>100	>100
PDN-P77A	4-NO ₂ -fenil	80,39 ± 2,69	81,25 ± 1,01
PDN-P77B	4-NO ₂ -fenil	91,69 ± 4,20	93,05 ± 0,68
PDN-P79	4-CH ₃ -fenil	84,61 ± 6,52	>100
PDN-P80	3-OCH ₃ -fenil	81,62 ± 9,92	>100
PDN-P81	2-piridina	>100	>100
PDN-P92	3-piridina	>100	92,86 ± 2,00
PDN-V32	2,4-diOCH ₃ -fenil	87,73 ± 2,36	>100
PDN-V33	2,3-diOCH ₃ -fenil	90,80 ± 6,59	>100
PDN-V34	3,4-diOCH ₃ -fenil	91,47 ± 4,26	>100
PDN-V35	4-N(CH ₃) ₂ -fenil	96,98 ± 6,77	96,93 ± 7,02
PDN-100	2,4,5-triOCH ₃ -fenil	88,04 ± 0,40	>100
PDN-102	3,4,5-triOCH ₃ -fenil	89,55 ± 9,57	98,93 ± 0,98
PDN-103	2,4,6-triOCH ₃ -fenil	89,26 ± 3,87	>100
PDN-104	1-naftil	87,74 ± 6,27	99,91 ± 1,44
PDN-105	2,3,4-triOCH ₃ -fenil	87,06 ± 2,93	>100
PDN-106	2-naftil	84,72 ± 3,03	98,53 ± 8,79
PDN-107	3-OCH ₃ ,4-OH-fenil	84,56 ± 5,48	86,67 ± 6,29
PDN-108	4-COOH-fenil	77,50 ± 5,22	93,72 ± 1,24
PDN-109	3,4-OCH ₂ O-fenil	87,06 ± 1,98	93,84 ± 1,53
PDN-110	2,6-diOCH ₃ -fenil	90,91 ± 0,18	91,23 ± 1,44
PDN-111	2,5-diOCH ₃ -fenil	82,79 ± 0,10	82,28 ± 3,79

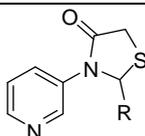


Tiazolidinonas	Radical	Atividade (%)	
		PtpA	PtpB
PQ1	3-Cl-fenil	>100	85,58 ± 4,47
PQ2	4-Cl-fenil	97,80 ± 7,98	89,75 ± 2,54
PQ3	2-Cl-fenil	95,49 ± 4,79	91,19 ± 11,25
PQ4	3,4-OCH ₂ O-fenil	>100	98,22 ± 9,69
PQ5	1-naftil	86,57 ± 4,40	88,64 ± 27,21

PQ6	2-naftil	83,51 ± 7,52	88,07 ± 19,56
PQ7	fenil	99,39 ± 0,91	97,83 ± 10,22
PQ8	2-OCH ₃ -fenil	90,49 ± 4,48	85,92 ± 3,77
PQ9	3-OCH ₃ -fenil	94,24 ± 6,88	77,22 ± 13,52
PQ10	4-OCH ₃ -fenil	82,31 ± 2,98	84,66 ± 8,92
PQ11	4-CH ₃ -fenil	77,71 ± 6,87	88,99 ± 9,83
PQ12	4-butoxi-fenil	>100	>100
PQ13	2-F-fenil	>100	99,92 ± 1,86
PQ14	3-F-fenil	99,63 ± 27,34	>100
PQ15	4-F-fenil	99,67 ± 33,14	>100
PQ16	3-OH,4-OCH ₃ -fenil	92,52 ± 32,92	98,68 ± 2,22
PQ17	2-NO ₂ -fenil	93,67 ± 16,47	87,61 ± 9,44
PQ18	3-NO ₂ -fenil	91,68 ± 27,45	90,81 ± 3,64
PQ19	4-NO ₂ -fenil	89,93 ± 13,14	99,22 ± 6,81
PQ20		50,93 ± 8,21	57,67 ± 1,31



Tiazolidinonas	Radical	Atividade (%)	
		PtpA	PtpB
JO1	4-OCH ₃ -fenil	93,79 ± 0,47	>100
JO2	fenil	>100	>100
JO3	4-Cl-fenil	>100	>100
JO4	3,4-Cl ₂ -fenil	>100	96,42 ± 15,41
JO5	4-CH ₃ -fenil	94,28 ± 2,97	>100
JO6	1-naftil	84,02 ± 2,99	6,67 ± 5,05
JO7	2-naftil	81,00 ± 3,42	>100
JO8	4-Br-fenil	79,87 ± 1,25	65,19 ± 6,13
JO9	4-NO ₂ -fenil	92,89 ± 4,30	>100
JO10	3,4-OCH ₂ O-fenil	71,13 ± 3,00	96,36 ± 23,46
JO12	2,5-diOCH ₃ -fenil	85,83 ± 1,32	49,72 ± 14,84
JO13	3-OCH ₃ ,4-OH-fenil	97,81 ± 2,46	>100
JO14		99,99 ± 0,64	>100
JO15	2-tiofeno	92,18 ± 2,60	97,57 ± 5,73



Tiazolidinonas	Radical	Atividade (%) PtpA	Atividade (%) PtpB
D 84	4-Cl-fenil	91,30 ± 4,13	89,55 ± 14,81
D 85	4-F-fenil	79,64 ± 0,76	88,34 ± 12,83
D 98	2-Cl-fenil	84,79 ± 4,31	94,26 ± 9,15
DG 15	2-NO ₂ -fenil	91,63 ± 7,23	88,45 ± 4,35
DG 16	3-NO ₂ -fenil	98,01 ± 5,11	90,07 ± 0,15
DG 21	4-OCH ₃ -fenil	>100	93,07 ± 8,54
DG 22	2-OCH ₃ -fenil	97,32 ± 1,17	90,80 ± 4,65
DG 23	3-OCH ₃ -fenil	91,45 ± 5,34	86,06 ± 14,34
DG 24	3-OH-fenil	87,61 ± 1,93	79,61 ± 14,06
DG 25	2-OH-fenil	95,13 ± 8,85	98,27 ± 16,30
DG 27	4-CH ₃ -fenil	95,72 ± 5,88	75,09 ± 10,05
DG 36	2-F-fenil	88,27 ± 6,44	99,99 ± 20,44

Compostos em negrito apresentaram inibição da atividade residual superior a 50%. Os dados representam a média ± DP de três experimentos independentes.

Anéis heterocíclicos de cinco membros contendo dois átomos de carbono, um de oxigênio e dois de nitrogênio são classificados como oxadiazóis. Compostos como estes possuem grande importância tanto para a medicina quanto para a indústria, e dessa forma, o nível de interesse em moléculas derivadas de oxadiazóis vem crescendo nos últimos anos, o que pode ser comprovado pelo considerável número de pedidos de patentes (KHAN et al., 2013). Oxadiazóis apresentam uma ampla variedade de aplicações biológicas, como agentes antivirais, anti-HIV, antibacterianos, antitumorais, antineoplásicos, antifúngicos, anticonvulsivante, anti-inflamatórios e hipoglicemiantes (KHAN et al., 2013).

Além disso, compostos derivados de oxadiazóis têm demonstrado potente atividade contra o *M. tuberculosis*, inclusive contra cepas Resistentes a Múltiplas Drogas (MDR) e Extremamente Resistentes a Medicamentos (XDR) (BAKAL; GATTANI, 2012). Recentemente, o composto 5-metoxi-N-3-(meta-fenoxifenil)-1,3,4-oxadiazol-2 (3H)-ona (*MmPPOX*) foi relatado como um potente e seletivo inibidor competitivo de enzimas lipolíticas da família Lipase Hormônio-Sensível (Lip-HSL) do *M. tuberculosis*, com valores de $K_i < 8 \mu\text{M}$, além de inibir o crescimento bacteriano (DELORME et al., 2012).

Em nosso trabalho, foi avaliado o efeito de 10 oxadiazóis frente à atividade da PtpA e PtpB. Dois compostos apresentaram atividade inibitória da PtpA superior a 50%, para PtpB nenhuma molécula apresentou inibição significativa da sua atividade, comparando-se a atividade enzimática na ausência de composto (Tabela 8).

Tabela 8. Inibição relativa da atividade enzimática da PtpA e PtpB, conferida por oxadiazóis.

Oxadiazóis	Radical	Atividade (%)	
		PtpA	PtpB
Z5	3-Br,4-OH,5-OCH ₃ -fenil	83,04 ± 4,01	78,46 ± 3,01
Z7	3-OCH ₃ ,4-OH-fenil	78,39 ± 1,59	79,57 ± 1,10
Z8	1-naftil	62,99 ± 6,18	82,36 ± 9,94
Z43	2,4-Cl ₂ -fenil	37,54 ± 3,66	71,94 ± 1,14
Z47	3,5-Cl ₂ -fenil	31,88 ± 2,48	75,87 ± 2,19

Oxadiazóis	Radical	Atividade (%)	
		PtpA	PtpB
Y1		71,96 ± 0,5	74,64 ± 0,6
Y7	3-NO ₂ ,4-OH-fenil	84,42 ± 2,78	88,41 ± 2,77
Y13	fenil	>100	82,75 ± 5,64
Y17	3,4-OCH ₂ O-fenil	86,48 ± 1,56	84,46 ± 1,85
Y18	2-NO ₂ -fenil	78,40 ± 2,65	86,08 ± 7,33

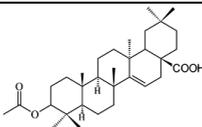
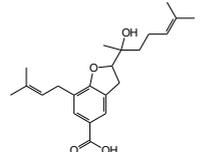
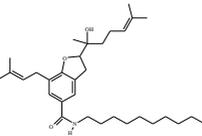
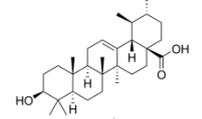
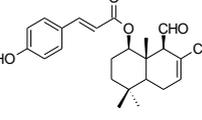
Compostos em negrito apresentaram inibição da atividade residual superior a 50%. Os dados representam a média ± DP de três experimentos independentes.

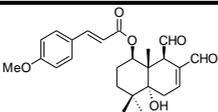
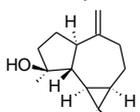
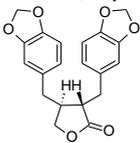
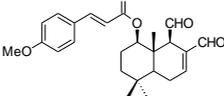
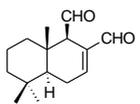
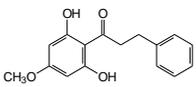
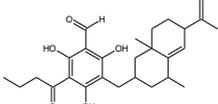
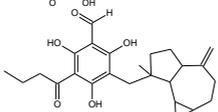
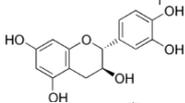
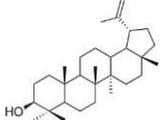
Os produtos naturais têm sido considerados, há muito tempo, uma classe de compostos com propriedades moleculares especiais e distintas características estruturais, além de formarem um grupo de compostos bastante heterogêneo, com grande impacto na descoberta de antibióticos e fármacos contra o câncer (LACHANCE et al., 2012). Outra vantagem é que os produtos naturais biologicamente ativos geralmente são moléculas pequenas com propriedades farmacológicas. Assim, eles são capazes de serem absorvidos e metabolizados pelo organismo mais facilmente, diminuindo os custos de produção de medicamentos ativos por via oral (HARVEY, 2000).

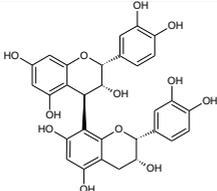
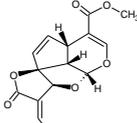
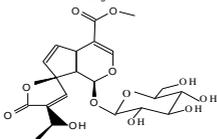
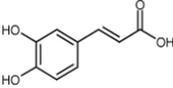
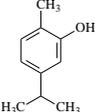
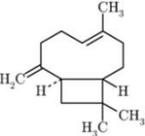
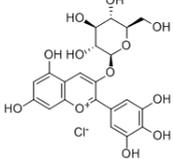
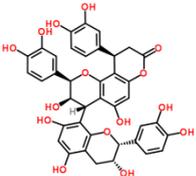
Na busca por novas moléculas com potencial antituberculose, recentemente o nosso grupo de pesquisa identificou uma série de compostos naturais com atividade inibitória da PtpB (MASCARELLO et al., 2013). Segundo Mascarello e colaboradores (2013), a partir de estudos computacionais e filtros moleculares aplicados a uma biblioteca de 816 compostos naturais, foi possível identificar seis estruturas com significante inibição da PtpB, com $IC_{50} < 30 \mu M$, e dentre eles o melhor efeito inibitório foi alcançado com o composto KuwE (K_i de $1,6 \mu M$), um metabólito isolado da (Rosales, Moraceae) *Morus nigra*.

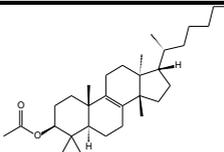
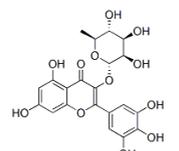
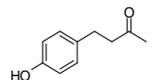
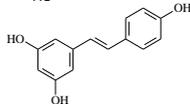
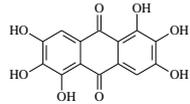
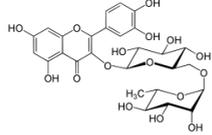
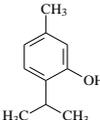
Assim, neste trabalho foi avaliada uma série de compostos naturais frente à atividade da PtpA e PtpB. Dos 30 compostos analisados, 8 apresentaram atividade inibitória da PtpA superior a 50% e 5 da PtpB (Tabela 9).

Tabela 9. Inibição relativa da atividade enzimática da PtpA e PtpB, conferida por compostos naturais de diferentes classes.

Compostos Naturais	Estrutura	Atividade (%) PtpA	Atividade (%) PtpB
Ácido Acetil Aleurítico (AAA)		46,80 ± 13,91	41,25 ± 16,80
Ácido Mirsinoico B (119-148)		97,29 ± 11,88	>100
Ácido Mirsinoico B 12C		95,35 ± 18,84	86,47 ± 5,94
Ácido Ursólico		79,74 ± 10,08	91,90 ± 8,05
<i>Drimys brasiliensis</i> 1-β-(p-umaroiloxi)- poligodial		97,36 ± 12,12	94,64 ± 15,51

<i>Drimys brasiliensis</i> Drimanial		>100	91,07 ± 4,08
<i>Drimys brasiliensis</i> Espatulanol		>100	92,17 ± 12,36
<i>Drimys brasiliensis</i> Hinoquinina		93,34 ± 2,59	93,65 ± 12,35
<i>Drimys brasiliensis</i> 1-B-(p-etoxicinamil)- poligodial		84,00 ± 5,49	89,26 ± 2,52
<i>Drimys brasiliensis</i> Poligodial		83,72 ± 1,98	84,24 ± 1,08
Diidrochalcona <i>Piper sp.</i>		93,71 ± 0,71	>100
<i>Eugenia umbelliflora</i> fração 163 (EUF163)		5,32 ± 1,63	2,97 ± 0,92
<i>Eugenia umbelliflora</i> fração 592 (EUF592)		5,12 ± 1,54	2,99 ± 0,97
<i>Litchia chinensis</i> epicatequina 198		93,19 ± 8,22	90,15 ± 1,06
Lupeol		57,41 ± 11,97	41,09 ± 3,16

<i>Litchia chinensis</i> procianidina B2 59		37,32 ± 7,60	68,09 ± 2,80
Plumericina		97,71 ± 7,03	83,81 ± 0,24
Plumierideo		84,63 ± 2,41	94,85 ± 5,86
Ácido cafeico		75,96 ± 7,81	>100
Carvacrol		>100	>100
Cariofileno		84,04 ± 20,66	99,87 ± 0,64
Delfinidina		5,94 ± 0,46	13,87 ± 0,84
Cinchonaina IIb		33,97 ± 2,21	78,59 ± 4,56

Acetato de eufol		>100	48,67 ± 1,49
Miricetrina		59,02 ± 16,83	86,16 ± 23,60
Cetona de framboesa		83,85 ± 12,47	>100
Resveratrol		98,28 ± 3,99	68,03 ± 1,13
Rufigallol		67,08 ± 1,88	66,57 ± 0,32
Rutina		76,57 ± 23,41	90,38 ± 3,02
Timol		>100	58,49 ± 4,86

Compostos em negrito apresentaram inibição da atividade residual superior a 50%. Os dados representam a média ± DP de três experimentos independentes.

Com base nos resultados obtidos nos ensaios de triagem da biblioteca de compostos orgânicos avaliados, foram selecionados 42 compostos para a determinação dos valores de IC₅₀, sendo 27 compostos os que apresentaram promissores resultados frente à atividade de PtpA, 28 compostos frente à atividade de PtpB e 2 compostos frente à atividade de YopH (Tabela 10).

Tabela 10. Sumário da triagem da biblioteca de compostos orgânicos frente à atividade da PtpA, PtpB e YopH.

Classe Química	Total de compostos	Inibidor da PtpA	Inibidor da PtpB	Inibidor da YopH
Sulfonil-hidrazonas e sulfonamidas	19	0	0	2 sulfonamidas
Sulfonamidas e sulfoniltioureas derivadas da glibenclamida	24	0	1 sulfoniltioureia (53,2 ± 9,2%)	nd
Hidrazonas	60	0	1 (56,7 ± 6,3%)	nd
Bis-chalconas e Chalconas	55	12 (1,2 a 50%) 7 bis-chalconas 5 chalconas	4 (17 a 50%) 9 bis-chalconas 5 chalconas	nd
Chalconas heterocíclicas	20	4 (21 a 46%)	0	nd
Tetralonas, Benzosuberonas e Indanonas	52	0	4 (50%) 1 tetralona 3 indanonas	nd
Tiazolidinonas	81	1 (50,9 ± 8,2%)	3 (6 a 47%)	nd
Oxadiazóis	10	2 (31 e 37%)	0	nd
Compostos Naturais	30	8 (5 a 50%)	5 (3 a 41%)	nd
Total	351	27	28	2

ND: não determinado.

2.3.4 Determinação dos valores de IC₅₀ dos compostos mais promissores

Para avaliar de maneira mais adequada os compostos que apresentaram inibição da atividade das PTPs superior a 50%, os valores de IC₅₀ foram determinados em novos ensaios, utilizando no mínimo 10 concentrações de cada composto e *p*NPP como substrato. Os resultados estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Valores de IC₅₀ dos compostos mais ativos frente à PtpA, PtpB e YopH

Composto	PtpA IC ₅₀ (µM)	PtpB IC ₅₀ (µM)	YopH IC ₅₀ (µM)
K3	nd	nd	15,5 ± 3,7
K7	nd	nd	9,0 ± 1,4
Gli 1c	nd	84,5 ± 9,70	

G21	nd	>100
BC8	nd	96,83 ± 5,40
BC10	nd	48,10 ± 1,76
BC11	42,32 ± 5,89	56,51 ± 4,23
BC14	39,11 ± 7,59	nd
BC18	22,86 ± 2,26	34,19 ± 4,43
BC19	19,55 ± 5,02	16,88 ± 0,81
PM1	18,03 ± 1,10	15,01 ± 2,83
PM6	nd	34,33 ± 1,51
PM8	27,93 ± 3,46	21,49 ± 2,04
PM11	31,72 ± 4,55	45,2 ± 6,59
B75	16,67 ± 0,17	17,70 ± 3,13
B78	23,28 ± 1,41	19,60 ± 4,10
B85	13,62 ± 1,25	6,47 ± 0,20
CH4	75,37 ± 7,54	nd
CH5	nd	20,76 ± 2,96
CH6	3,76 ± 0,63	4,49 ± 0,08
H2	51,42 ± 11,23	nd
H6	>100	nd
H14	>100	nd
H22	50,50 ± 9,73	nd
GSQ30	nd	>100
GSQ152	nd	22,62 ± 5,27
GSQ157	nd	49,70 ± 1,15
GSQ159	nd	40,05 ± 0,64
PDN-B27	nd	54,60 ± 5,20
PQ20	23,77 ± 2,70	nd
JO6	nd	45,08 ± 2,17
J012	nd	36,05 ± 4,86
Z43	>100	nd
Z47	>100	nd
AAA	11,75 ± 2,72	11,78 ± 0,79
EUFR163	12,10 ± 1,62	1,21 ± 0,08
EUFR592	4,02 ± 1,23	3,07 ± 0,18
Lupeol	27,43 ± 8,42	27,68 ± 0,53
<i>L. chinensis</i> procianidina B2 59	57,88 ± 7,57	nd
Cinchonaina IIb	32,93 ± 7,48	nd
Delfinidina	5,67 ± 1,29	5,80 ± 0,06
Miricetrina	>100	nd

Compostos em negrito foram selecionados para a determinação do K_i . nd - valores de IC_{50} não determinados, pois não apresentaram inibição da atividade residual superior a 50%. Os dados representam a média ± DP de três experimentos independentes.

Os resultados de IC_{50} mostraram que 16 compostos inibiram significativamente a atividade da PtpA, com $IC_{50} < 30 \mu M$, sendo eles chalconas (B75, B78, B85 e CH6), bis-chalconas (BC18, BC19, PM1, PM8 e PM11), tiazolidinona (PQ20) e compostos naturais (EUFR 163 e 592, AAA, Lupeol, Cinchonina Iib e Delfinidina). Seis compostos apresentaram moderada inibição da atividade da PtpA, IC_{50} entre 30 a $100 \mu M$, sendo eles chalcona (CH4), bis-chalconas (BC11 e BC14), chalconas heterocíclicas (H2 e H22) e composto natural (*L. chinensis* procianidina B2 59). Cinco compostos apresentaram valores baixos de inibição da atividade da PtpA, com $IC_{50} > 100 \mu M$, sendo eles chalconas heterocíclicas (H6 e H14), oxadiazóis (Z43 e Z47) e composto natural (Miricetrina). Entre os 16 inibidores mais ativos, o composto com melhor efeito inibitório de PtpA foi a chalcona CH6 ($IC_{50} = 3,76 \pm 0,63 \mu M$).

No caso da PtpB, os resultados de IC_{50} mostraram que 15 compostos inibiram significativamente a atividade da enzima, com $IC_{50} < 30 \mu M$, sendo eles chalconas (B75, B78, B85, CH5 e CH6), bis-chalconas (BC18, BC19, PM1 e PM8), indanona (GSQ152) e compostos naturais (EUFR 163 e 593, AAA, Lupeol e Delfinidina). Além disso, 11 compostos apresentaram moderada inibição da atividade, sendo eles sulfoniltioureia (Gli 1c), bis-chalconas (BC8, BC10, BC11, PM6 e PM11), indanonas (GSQ157 e GSQ159) e tiazolidinonas (PDN-B27, JO6 e JO12). Dois compostos apresentaram valores baixos de inibição da atividade da PtpB, com $IC_{50} > 100 \mu M$, sendo eles hidrazona (G21) e tetralona (GSQ30). Entre os 15 inibidores mais ativos, o que apresentou melhor efeito inibitório de PtpB foi o composto natural extraído de (Myrtales, Myrtaceae) *Eugenia umbeliflora* –fração 163 (EUFR163 $IC_{50} = 1,21 \pm 0,08 \mu M$).

Quanto à YopH, os dois compostos avaliados (K3 e K7) inibiram significativamente a atividade da enzima, com $IC_{50} < 30 \mu M$, sendo eles sulfonamidas. O composto mais ativo foi o K7 ($IC_{50} = 9,0 \pm 1,4 \mu M$).

2.3.5 Determinação de K_i e mecanismo de inibição

Tendo estabelecido os valores de IC_{50} , foram realizados os ensaios cinéticos com os compostos mais ativos frente à PtpA, PtpB e YopH. Os parâmetros cinéticos foram determinados com no mínimo sete concentrações de substrato (*p*NPP) e três concentrações de cada um dos compostos, sendo as mesmas escolhidas em função dos valores de IC_{50} .

Os valores de K_i e o mecanismo de inibição foram determinados, para as chalconas **CH6** e **B85**, e para os compostos naturais **E. umbelliflora fração 163 (EUFR163)** e **592 (EUFR592)**, frente à PtpA e PtpB, e para as sulfonamidas **K3** e **K7** frente à YopH. Para definir o mecanismo de ação, o gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk foi empregado para linearizar as curvas de Michaelis-Menten, no qual a velocidade da reação foi medida em relação à concentração de substrato, na presença e ausência de inibidores. Os resultados dessa análise estão apresentados nas figuras 18 a 22.

Os gráficos duplo-recíprocos de Lineweaver-Burk para os compostos naturais **EUFR163** e **EUFR592** apresentaram um mecanismo de inibição competitiva para PtpA e para PtpB (Figura 18 e 19). Na presença de inibidor, todas as retas convergiram no eixo-y ($1/V_{\text{máx}}$), enquanto a inclinação das retas ($K_m \text{ aparente} / V_{\text{máx}}$) e intercepção das retas no eixo-x ($1/K_m \text{ aparente}$) variaram de acordo com a concentração de inibidor.

As constantes cinéticas para PtpA e PtpB, K_i , $K_m \text{ aparente}$ e $V_{\text{máx}}$, estão apresentadas na tabela 11. Para os compostos **EUFR163** e **EUFR592** observou-se que os valores de $K_m \text{ aparente}$ aumentam na presença de concentrações crescentes de inibidor e que os valores de $V_{\text{máx}}$ se mantêm constantes, confirmando um tipo de inibição competitiva. O K_i foi calculado a partir do replote do gráfico de Lineweaver-Burk.

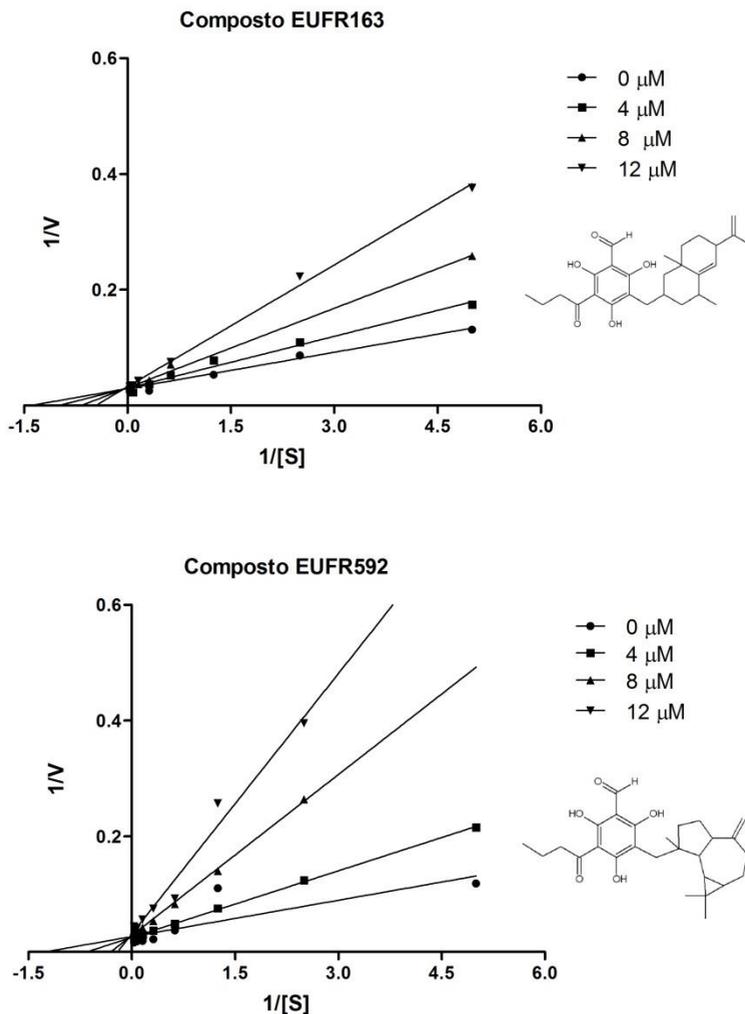
O gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk para o composto **CH6** apresentou um mecanismo de inibição não-competitivo para PtpA e para PtpB (Figura 20 e 21). Na presença de inibidor, todas as retas convergiram no eixo-x ($1/K_m \text{ aparente}$), enquanto a intercepção das retas no eixo-y ($1/V_{\text{máx}}$) variaram em função da concentração de inibidor. Por outro lado, o gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk para o composto **B85** apresentou um mecanismo de inibição competitivo para PtpA e para PtpB (Figura 20 e 21). Na presença de inibidor, todas as retas convergiram no eixo-y ($1/V_{\text{máx}}$), enquanto a inclinação das retas ($K_m \text{ aparente} / V_{\text{máx}}$) e intercepção das retas no eixo-x ($1/K_m \text{ aparente}$) variaram de acordo com a concentração de inibidor.

As constantes cinéticas para PtpA e PtpB, K_i , $K_m \text{ aparente}$ e $V_{\text{máx}}$, estão apresentadas na tabela 12. Para o composto **CH6** observou-se que os valores de $V_{\text{máx}}$ diminuem na presença de concentrações crescentes de inibidor e que os valores de K_m se mantêm constantes, confirmando um tipo de inibição não-competitiva. Já para composto **B85**, observou-se o inverso, confirmando um tipo de inibição competitiva.

Os resultados de inibição da PtpA e PtpB pelos compostos naturais (EUFR163, $K_i = 5,7 \pm 0,8$ e $1,0 \pm 0,4 \mu\text{M}$ e EUFR592, $K_i = 1,3 \pm 0,3$ e $1,3 \pm 0,1 \mu\text{M}$, respectivamente) sugerem que a substituição da parte da molécula que contém o grupo decahidropropano azuleno (composto EUFR592) pelo substituinte que contém o grupo octahidro naftaleno (composto EUFR163) foi bem tolerada pelo sítio de ligação de ambas as proteínas, sugerindo que interações hidrofóbicas são importantes para a atividade inibitória dos mesmos. No entanto, pode-se observar que o composto EUFR163 apresentou uma potência de inibição menor para PtpA, diminuindo aproximadamente 4 vezes a atividade inibitória.

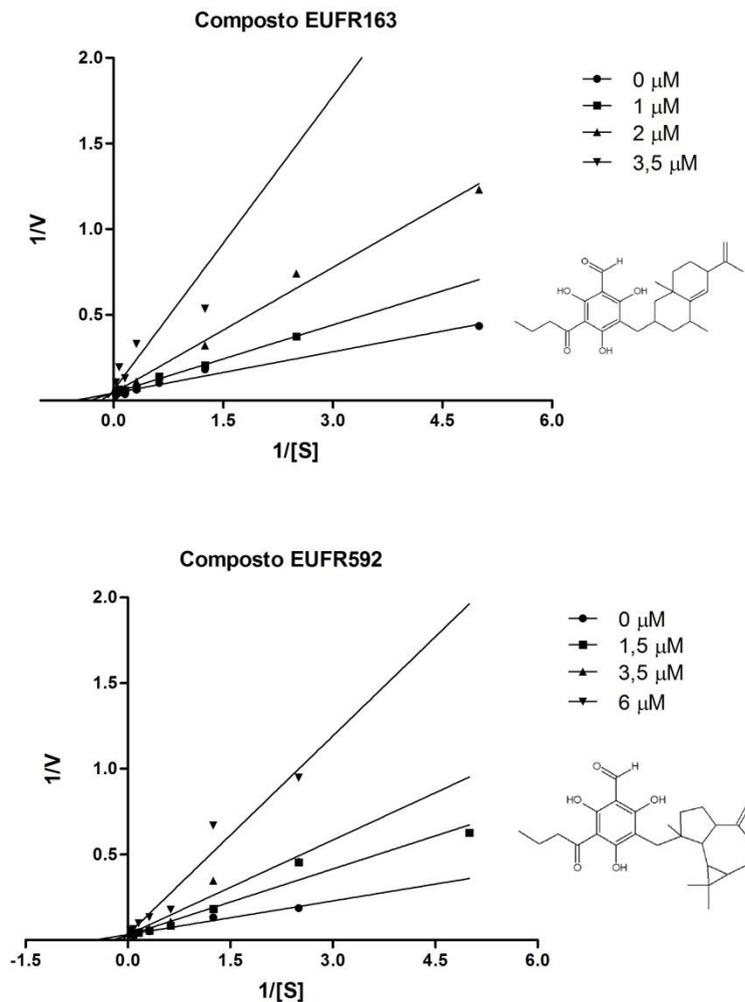
Os resultados de inibição da PtpA e PtpB pelas chalconas (CH6, $K_i = 7,1 \pm 1,0$ e $3,3 \pm 0,7 \mu\text{M}$ e B85, $K_i = 2,9 \pm 0,7$ e $3,3 \pm 0,6 \mu\text{M}$, respectivamente) indicam que substituição dos grupos 2-hidroxi, 3-bromo e 4,6-dimetoxi no anel A e do grupo 2-naftil no anel B (composto B85) pelos grupos 2,4-dihidroxi-3-geranil no anel A e do grupo 4-hidroxifenil no anel B (composto CH6) foi bem tolerada pelo sítio de ligação de ambas as proteínas, sugerindo que interações polares, hidrofóbicas e efeitos estéricos são importantes para a atividade inibitória dos compostos. Entretanto, pode-se observar que o composto CH6 alterou o modo de inibição para ambas as proteínas e a apresentou uma potência de inibição menor para PtpA, diminuindo aproximadamente 2 vezes a atividade inibitória.

Figura 18. Gráficos duplo-recíprocos de Lineweaver-Burk para os inibidores EUFR163 e EUFR592 frente à PtpA.



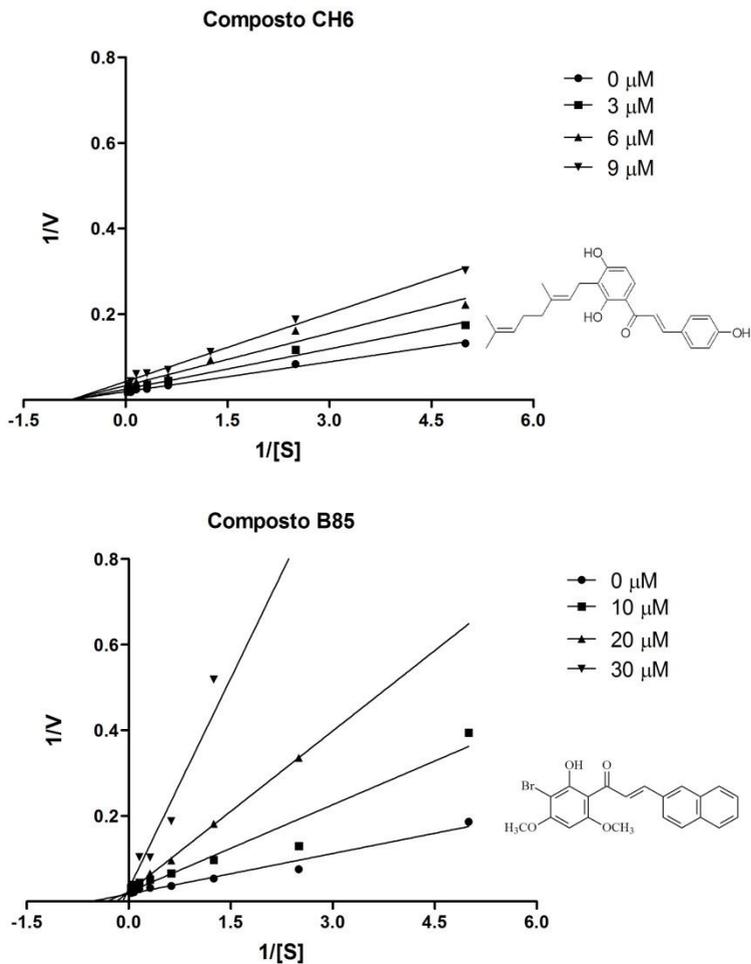
Os ensaios foram realizados com 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; 12,8; 30 mM de *p*NPP e três concentrações de cada composto em 20 mM de imidazol pH 7,0 a 37 °C. $1/V - 1/\mu\text{mol } p\text{NPP}\cdot\text{mim}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. $1/[S] - \text{mM } p\text{NPP}$. Gráfico representativo de experimentos realizados em triplicata.

Figura 19. Gráficos duplo-recíprocos de Lineweaver-Burk para os inibidores EUFR163 e EUFR592 frente à PtpB.



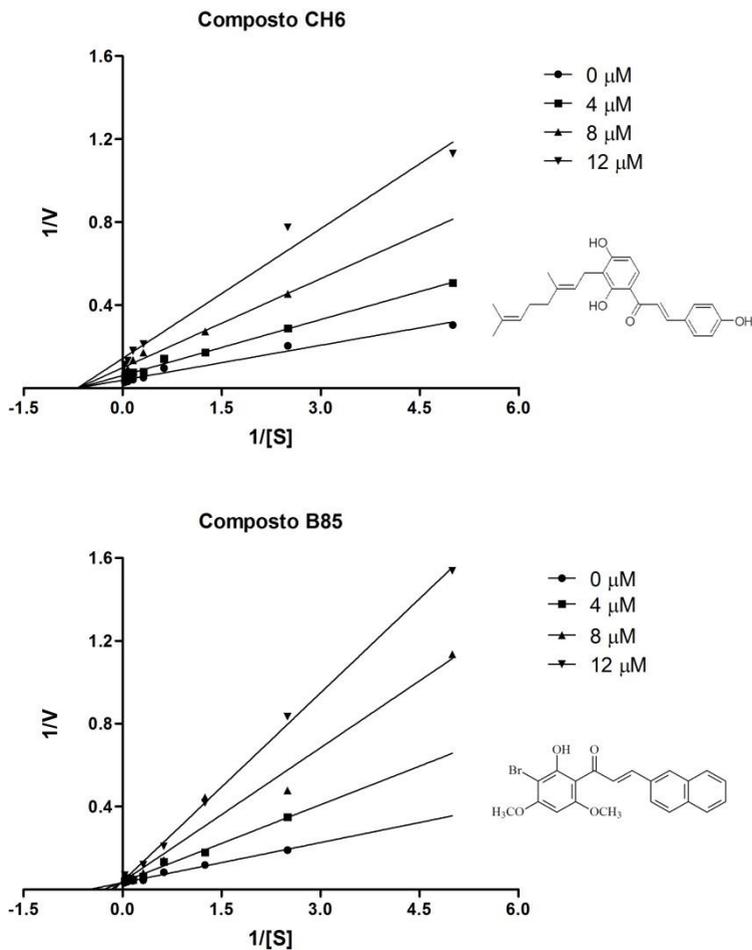
Os ensaios foram realizados com 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; 12,8; 30 mM de *p*NPP e três concentrações de cada composto em 20 mM de imidazol pH 7,0 a 37 °C. $1/V - 1/\mu\text{mol } p\text{NP} \cdot \text{mim}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. $1/[S] - \text{mM } p\text{NPP}$. Gráfico representativo de experimentos realizados em triplicata.

Figura 20. Gráficos duplo-recíprocos de Lineweaver-Burk para os inibidores **CH6** e **B85** frente à **PtpA**.



Os ensaios foram realizados com 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; 12,8; 30 mM de *p*NPP e três concentrações de cada composto em 20 mM de imidazol pH 7,0 a 37 °C. $1/V - 1/\mu\text{mol } p\text{NP} \cdot \text{mim}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. $1/[S] - \text{mM } p\text{NPP}$. Gráfico representativo de experimentos realizados em triplicata.

Figura 21. Gráficos duplo-recíprocos de Lineweaver-Burk para os inibidores CH6 e B85 frente à PtpB.



Os ensaios foram realizados com 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; 12,8; 30 mM de *p*NPP e três concentrações de cada composto em 20 mM de imidazol pH 7,0 a 37 °C. $1/V - 1/\mu\text{mol } p\text{NP}\cdot\text{mim}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. $1/[S] - \text{mM } p\text{NPP}$. Gráfico representativo de experimentos realizados em triplicata.

Tabela 12. Parâmetros cinéticos para PtpA e PtpB frente aos melhores inibidores.

PtpA				
Composto	[I] (μM)	$V_{\text{máx}}$ $\mu\text{mol } p\text{NP.mim}^{-1}.\text{mg}^{-1}$	$K_{\text{m}} \text{ aparente}$ (mM)	K_{i} (μM)
EUFR163	0	51 \pm 10,8	1 \pm 0,3	5,7 \pm 0,8
	4	48 \pm 10,2	1,5 \pm 0,5	
	8	48 \pm 9,8	2,09 \pm 0,6	
	12	45 \pm 9,3	3 \pm 1,0	
EUFR592	0	43 \pm 2,9	1 \pm 0,2	1,3 \pm 0,3
	4	40 \pm 3,2	1,9 \pm 0,3	
	8	36 \pm 5,7	3,8 \pm 0,6	
	12	31 \pm 6,4	6 \pm 0,9	
B85	0	45 \pm 10,8	1,6 \pm 0,2	2,9 \pm 0,7
	10	40 \pm 5,0	2,5 \pm 0,6	
	20	40 \pm 8,8	5,4 \pm 0,5	
	30	35 \pm 5,6	9,5 \pm 1,3	
CH6	0	49 \pm 3,2	1,4 \pm 0,4	7,1 \pm 1,0
	3	38 \pm 2,4	1,4 \pm 0,4	
	6	29 \pm 2,5	1,4 \pm 0,4	
	9	22 \pm 2,7	1,4 \pm 0,4	
PtpB				
Composto	[I] (μM)	$V_{\text{máx}}$ $\mu\text{mol } p\text{NP.mim}^{-1}.\text{mg}^{-1}$	$K_{\text{m}} \text{ aparente}$ (mM)	K_{i} (μM)
EUFR163	0	36 \pm 7,0	2,2 \pm 0,3	1,0 \pm 0,4
	1	35 \pm 0,7	3,8 \pm 0,7	
	2	32 \pm 1,5	2,1 \pm 0,5	
	3,5	26 \pm 1,6	6,2 \pm 0,6	
EUFR592	0	30 \pm 4,7	2,3 \pm 0,3	1,3 \pm 0,1
	1	28 \pm 4,4	4 \pm 0,9	
	3,5	25 \pm 1,9	5,8 \pm 0,9	
	6	20 \pm 4,3	13 \pm 3,6	
B85	0	27 \pm 5,1	2,2 \pm 0,3	3,3 \pm 0,6
	4	27 \pm 4,8	4 \pm 0,6	
	8	30 \pm 4,8	5,2 \pm 0,3	
	12	29 \pm 4,5	9 \pm 0,8	
CH6	0	34 \pm 6,3	2,4 \pm 0,6	3,3 \pm 0,7
	4	19 \pm 2,8	2,4 \pm 0,5	
	8	13 \pm 2,7	2,3 \pm 0,5	
	12	9 \pm 2,3	2,4 \pm 0,5	

O gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk para o composto **K7** apresentou um mecanismo de inibição competitiva para YopH (Figura 22). Na presença de inibidor, todas as retas convergiram no eixo-y ($1/V_{\text{máx}}$), enquanto a inclinação das retas ($K_m \text{ aparente} / V_{\text{máx}}$) e intercepção das retas no eixo-x ($1/K_m \text{ aparente}$) variaram de acordo com a concentração de inibidor. Por outro lado, o gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk para o composto **K3** apresentou um mecanismo de inibição não-competitivo para YopH (Figura 22). Nesse caso, todas as retas na presença de inibidor convergiram no eixo-x ($1/K_m \text{ aparente}$), enquanto a intercepção das retas no eixo-y ($1/V_{\text{máx}}$) variaram em função da concentração de inibidor.

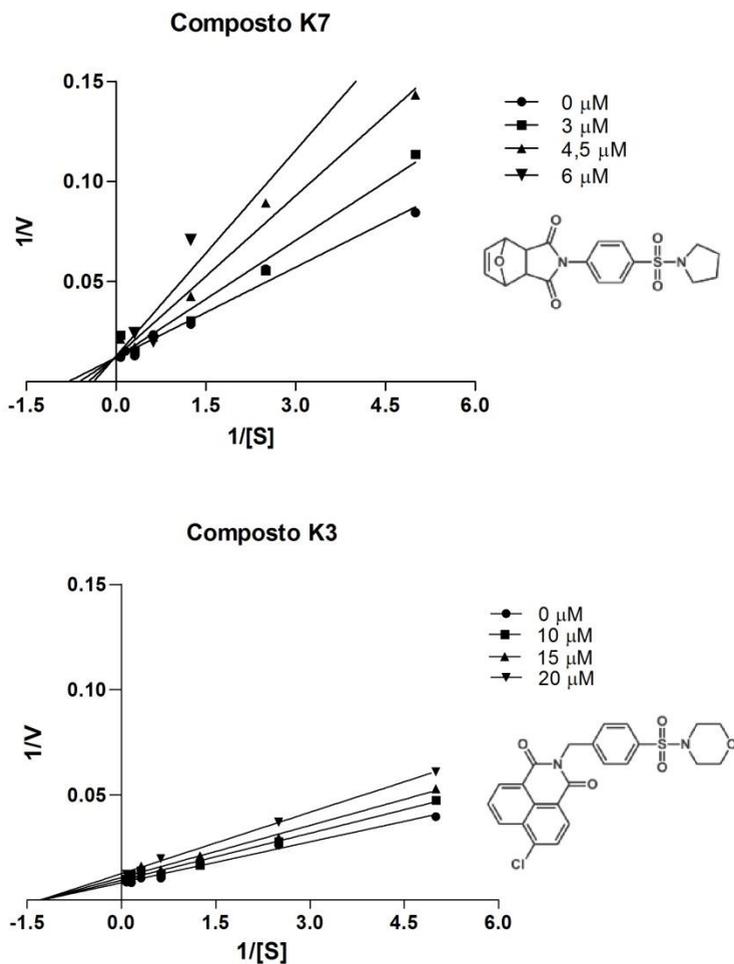
As constantes cinéticas para YopH, K_i , $K_m \text{ aparente}$ e $V_{\text{máx}}$, estão apresentadas na tabela 13. Para o composto **K7** observou-se que os valores de $K_m \text{ aparente}$ aumentam na presença de concentrações crescentes de inibidor e que os valores de $V_{\text{máx}}$ se mantêm constantes, confirmando um tipo de inibição competitiva. Já para composto **K3**, observou-se o inverso, confirmando um tipo de inibição não competitiva.

Segundo Hu e colaboradores (2004), assim como a PTP1B, a YopH possui um segundo sítio de ligação ao fosfato, fato que facilitaria o desenvolvimento de inibidores mais seletivos, uma vez que o inibidor poderia interagir simultaneamente com o sítio catalítico e o sítio periférico adjacente (Figura 23). Dessa forma, a descoberta de inibidores não-competitivos está de acordo com a presença de um sítio alostérico em YopH.

Tabela 13. Parâmetros cinéticos para YopH frente aos melhores inibidores.

Sulfonamidas	[I] μM	V_{max} μmol pNP.mim ¹ .mg ⁻¹	$K_m \text{ aparente}$ mM	K_i μM
K7	0	119 ± 3,4	1,12 ± 0,20	4,4 ± 0,4
	3	112 ± 8,7	1,15 ± 0,17	
	4,5	107 ± 4,7	2,20 ± 0,08	
	6	115 ± 3,6	2,50 ± 0,30	
K3	0	129 ± 8,7	1,24 ± 0,05	36 ± 2,5
	10	115 ± 5,7	1,22 ± 0,07	
	15	96 ± 9,7	1,22 ± 0,06	
	20	85 ± 9,4	1,23 ± 0,06	

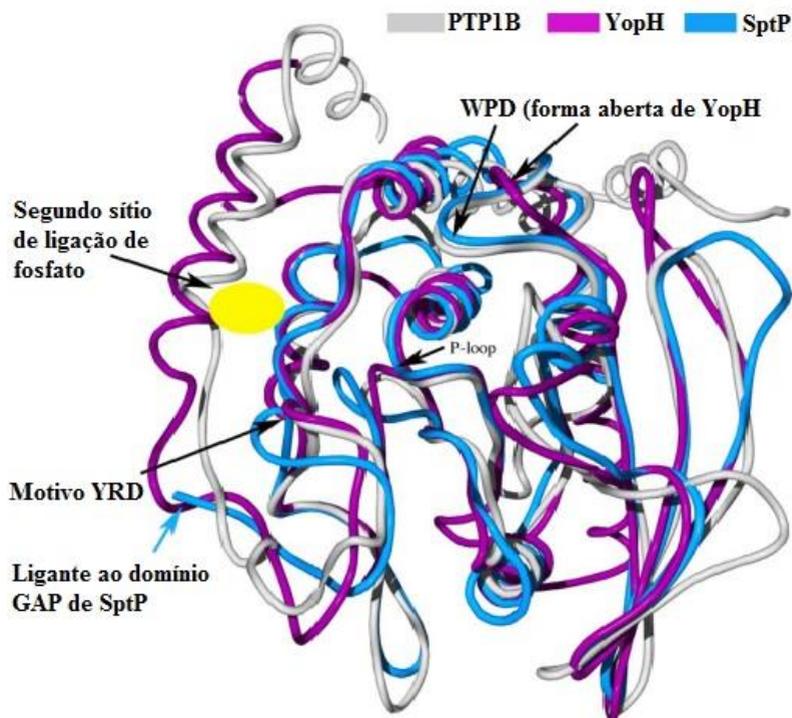
Figura 22. Gráficos duplo-recíprocos de Lineweaver-Burk para os inibidores **K3** e **K7** frente à **YopH**.



Os ensaios foram realizados com 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; 12,8 mM de *p*NPP e três concentrações de cada composto em 20 mM de imidazol pH 7,0 a 37 °C. $1/V - 1/\mu\text{mol } p\text{NP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. $1/[S] - \text{mM } p\text{NPP}$. Gráfico representativo de experimentos realizados em triplicata.

Os resultados de inibição da YopH pelas sulfonamidas (K3, $K_i = 36 \pm 2,5 \mu\text{M}$ e K7, $K_i = 4,4 \pm 0,4 \mu\text{M}$) indicam que a substituição do grupo pirrolidina (composto K7) pelo grupo morfolina (composto K3), bem como a presença de grupos volumosos na posição 4-fenilsulfonil, como fenilmaleimida e naftalimida, são bem tolerados pela YopH, sugerindo que interações polares e hidrofóbicas são importantes para a atividade inibitória. Entretanto, pode-se observar que a presença dos grupos morfolina e naftalimida (composto K3) alteraram tanto a potência quanto o modo de inibição.

Figura 23. Sobreposição da estrutura tridimensional do domínio fosfatase da YopH, PTP1B e SptP (*Salmonella*).



O segundo sítio de ligação está destacado em amarelo. Adaptado de (HU et al., 2004).

2.3.6 Análise de seletividade frente à PTP1B

Uma vez que a família das PTPs possui um domínio catalítico altamente conservado, a busca de inibidores seletivos para as mesmas se torna um ponto crucial e desafiador ao desenvolvimento de novas moléculas inibidoras (HU et al., 2004). Para determinar a seletividade dos inibidores mais ativos frente à PtpA, PtpB e YopH, determinou-se o valor de IC_{50} dos mesmos frente à atividade de PTP1B, uma PTP humana envolvida na regulação da homeostase da glicose e do peso corporal (JOHNSON et al., 2002). O índice de seletividade (SI) está representado na Tabela 14. Os resultados de SI indicam que os compostos não são seletivos, já que apresentaram valores de IC_{50} para PTP1B similares aos encontrados para PtpA, PtpB e YopH.

Tabela 14. IC_{50} (μ M) dos inibidores mais ativos frente à PTP1B.

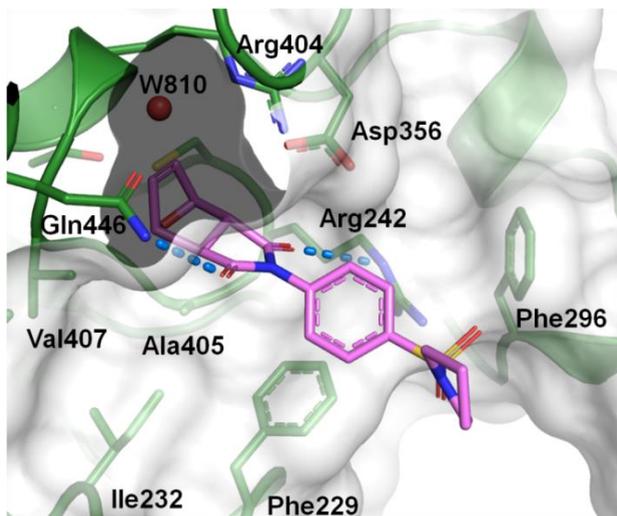
Composto	PtpA	PtpB	YopH	PTP1B	SI
K3	nd	nd	15,5 \pm 3,7	17,1 \pm 1,6	1,1
K7	nd	nd	9,0 \pm 1,4	11,4 \pm 1,3	1,3
CH6	3,76 \pm 0,63	4,49 \pm 0,08	nd	3,53 \pm 0,51	0,93/0,79
B85	13,62 \pm 1,2	6,47 \pm 0,20	nd	2,77 \pm 0,33	0,20/0,42
EUFR163	12,10 \pm 1,6	1,21 \pm 0,08	nd	2,85 \pm 0,25	0,23/2,40
EUFR592	4,02 \pm 1,23	3,07 \pm 0,18	nd	1,94 \pm 0,17	0,48/0,63

nd, valores não determinados. Índice de seletividade (SI), determinado pelo IC_{50} PTP1B/ IC_{50} PtpA ou PtpB ou YopH. Os dados representam a média \pm DP de três experimentos independentes.

2.3.7 Modelagem Molecular do composto K7 no sítio ativo da YopH

No intuito de melhor compreender as interações moleculares entre o inibidor competitivo **K7** e a YopH, análises de docagem molecular foram realizadas com o programa GOLD, baseando-se na estrutura cristalina da YopH ligada ao inibidor *p*NCS (*p*-nitrocatecol sulfato), como descrito nos materiais e métodos. O modelo de interação do inibidor **K7** (K_i 4,4 \pm 0,4 μ M) no sítio ativo da YopH está representado na figura 24.

Figura 24. Modelo de interação do inibidor **K7** (magenta) no sítio ativo da YopH.



Resíduos e moléculas de água envolvidos na ligação do inibidor estão representados como varetas verdes e esperas vermelhas, respectivamente. As ligações de hidrogênio estão indicadas como linhas tracejadas azuis.

Analisando o modelo de interação proposto na figura 24, pode-se observar que o grupo 7-oxabicyclo[2.2.1]hepteno se encaixa no sítio catalítico (*P-loop*). Além disso, a porção imida está em uma orientação favorável para aceitar duas ligações de hidrogênio das cadeias laterais dos resíduos Gln446 e Arg242, o anel fenil central faz interações hidrofóbicas com o resíduo Phe229 e o grupo sulfonyl-pirrolidina está exposto ao solvente.

Considerando-se a diversidade de PTPs encontradas em mamíferos, bem como o reconhecimento de que essas enzimas estão envolvidas em eventos de sinalização essenciais ao controle adequado de várias atividades celulares, não é surpreendente que a deficiência na sua atividade enzimática desencadeie diversas doenças (HALLÉ et al., 2007). Atualmente, sabe-se que a disfunção da atividade de PTPs humanas está ligada a doenças autoimunes, câncer, doenças infecciosas, metabólicas, cardiovasculares, neurológicas, diabetes, osteoporose e obesidade (BIALY; WALDMANN, 2005; BARR, 2010). Dessa forma, as PTPs representam novos alvos moleculares para o desenvolvimento de medicamentos com distintos modos de ação (ZHANG, 2001).

Segundo Barr (2010), a desregulação da função de PTPs específicas em diversas doenças, devido a desequilíbrios de expressão ou pelo polimorfismo de apenas um aminoácido, ressalta o potencial dessas proteínas como possíveis alvos terapêuticos. No entanto, foi a constatação de que camundongos *knockout* para *PTP1B* apresentavam sensibilidade à insulina melhorada e resistência à obesidade que proporcionou um grande estímulo e interesse na inibição dessas proteínas, e consequentemente, na busca de novos fármacos (BARR, 2010).

Além disso, a importância das PTPs na fisiologia celular é ressaltada pelo fato dessas enzimas serem exploradas e subvertidas por bactérias patogênicas durante a colonização do hospedeiro (ZENG et al., 2013). Dessa forma, as etapas da sinalização celular são alvos de modulação por diversos patógenos, como por exemplo, *Salmonella* sp, *Shigella* sp, *E. coli*, *Yersinia* spp. e *Mycobacterium* spp. (BLACK; BLISKA, 1997; KOUL et al., 2000). Por outro lado, algumas bactérias são capazes de interferir nas etapas de sinalização do hospedeiro por meio da ação de suas próprias PTPs, e assim essas proteínas têm um papel essencial na patogênese desses organismos. São exemplos de PTPs bacterianas envolvidas na interação patógeno-hospedeiro e essenciais à virulência a YopH de *Yersinia* spp., a PtpA e PtpB de *M. tuberculosis* (BRANDÃO et al., 2008; GRUNDNER et al., 2008).

Analisando os resultados da inibição da proteína YopH de *Y. enterocolitica* e das proteínas PtpA e PtpB de *M. tuberculosis* frente à biblioteca de compostos orgânicos (chalconas, bis-chalconas e chalconas heterocíclicas, sulfonamidas, sulfonil-hidrazonas, sulfoniltioureas, hidrazonas, tetralonas, oxadiazóis, benzosuberonas, indanonas, tiazolidinonas e compostos naturais), pode-se observar que os compostos mais ativos pertencem à classe química das sulfonamidas para YopH, e das chalconas, bis-chalconas, indanonas, tetralonas e compostos naturais para PtpA e PtpB (Tabela 10).

Em geral, o desenvolvimento de inibidores de PTPs tem explorado a interação de pequenas moléculas ou de compostos que mimetizam peptídeos dentro do sítio catalítico, acopladas a grupos funcionais adicionais, os quais interagem com regiões externas ao bolsão catalítico (BAHTA; BURKE, 2012). Dessa forma, as estratégias usadas no desenvolvimento de inibidores vêm evoluindo ao longo dos anos, em conformidade com o conhecimento adquirido tanto da química quanto da atividade biológica dessas moléculas (SILVA; TABERNERO, 2010).

Considerando a importância da YopH para a virulência de *Yersinia* spp., a descoberta de possíveis inibidores específicos pode vir a servir como uma promissora intervenção terapêutica (LIANG et al., 2003). Visando a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos e de vacinas para as doenças causadas por bactérias desse gênero, diversos grupos de pesquisa têm se dedicado a estudar a inibição da YopH, como pode-se observar pelo número de inibidores identificados (Tabela 15 e Figura 25). Dentre esses trabalhos, o nosso grupo de pesquisa relatou pela primeira vez chalconas, bem como sulfonamidas, como promissores inibidores da YopH (MARTINS et al., 2013).

Tabela 15. Compostos descritos na literatura como inibidores da YopH

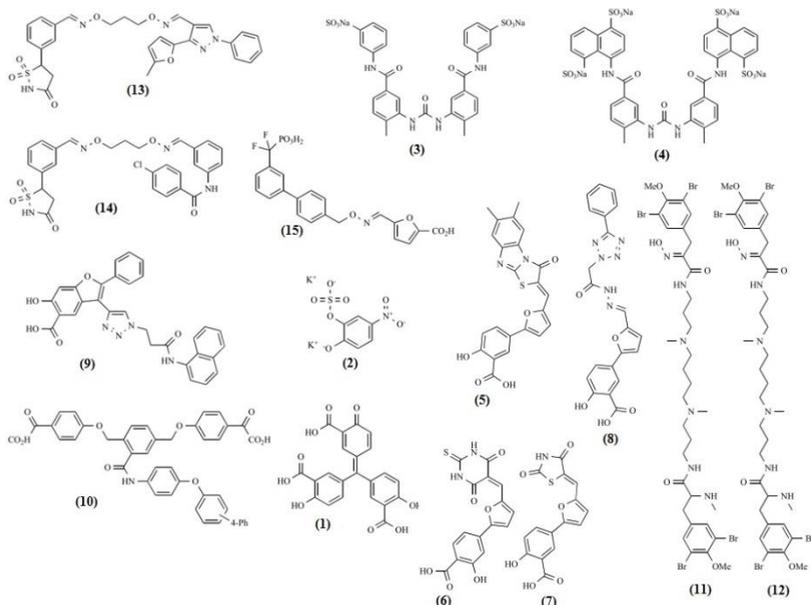
Inibidor	YopH IC ₅₀	Referências
Derivados bivalente e trivalente do ácido α -cetocarboxílico	0,7 μ M	(CHEN; SETO, 2002)
Ácido aurintricarboxílico (1)	0,010 μ M	(LIANG et al., 2003)
Sulfato de <i>p</i> -nitrocatecol (2)	25 μ M*	(SUN et al., 2003a)
Tripeptídeos	1,8 μ M	(LEE et al., 2005)
Dois análogos da suramina (3-4)	4,2 e 30 μ M	(MCCAIN et al., 2004)
Derivados furanil-salicilato (5-8)	0,18 μ M	(TAUTZ et al., 2005)
Derivados furanil-salicilato-nitróxido	3 μ M	(VAZQUEZ et al., 2007)
Derivados do ácido salicílico (9)	1,2 - 20 μ M	(HUANG et al., 2010)
Derivados de aldeído ligados a oximas	2,4 μ M	(LIU et al., 2010)
Derivados fosfonatos de calixarenos	0,22 μ M*	(VOVK et al., 2010)
Derivados bidentados do ácido α -cetocarboxílico (10)	0,043 μ M	(COMEAU et al., 2010)
Pseudoceramina e Spermatinamina (11-12)	33 e 6 μ M	(YIN et al., 2011)
Derivados de isotiazolidinona (13-14)	2 μ M	(KIM et al., 2011)
Derivados de nitrofenilfosfato ligados a oximas (15)	0,19 μ M	(BAHTA et al., 2011)
Derivado de ácido salicílico	0,38 μ M	(HU et al., 2013b)
Chalconas e sulfonamidas	9,0 μ M	(MARTINS et al., 2013)

* Valores de K_i . Os números entre parênteses indicam as moléculas na figura 25.

A YopH é considerada o padrão-ouro da pesquisa de PTPs microbianas. Ela foi a primeira PTP bacteriana caracterizada, há mais de

duas décadas, é extremamente conservada entre *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis*, e *Y. enterocolitica*, além de ser uma das PTPs conhecidas mais ativas (k_{cat}/K_m 514 $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$) (HENEBERG, 2012). Como uma PTP clássica, a YopH compartilha com outros membros dessa classe uma topologia catalítica e um mecanismo de ação comum. O sítio ativo é caracterizado por dois *loops*, o *loop* de ligação ao fosfato, *P-loop*, representado pelo motivo assinatura [(H/V)CX5R(S/T)], e o flexível WPD-*loop* (BAHTA; BURKE, 2012). Embora PTPs apresentem alta homologia dentro do sítio catalítico, características de superfícies próximas à região do bolsão catalítico podem apresentar propriedades distintas, assim favorecendo o desenvolvimento de inibidores seletivos. De fato, a YopH apresenta um núcleo catalítico muito similar a outras PTPs, porém fora do sítio catalítico ela difere na topologia de superfície, nas características lipofílicas e no potencial eletrostático. Além dessas diferenças, a proteína apresenta três regiões bem definidas, P1, P2 e P3, sendo P1 a fenda catalítica (BAHTA; BURKE, 2012).

Figura 25. Estrutura química de alguns inibidores da YopH.



Os números correspondem à tabela 15. Adaptado de (HENEBERG, 2012).

A adaptação do *M. tuberculosis* ao hospedeiro é dependente da ação do seu sistema de transdução de sinal, que inclui 11 sistemas dois-

componentes, 11 proteínas serina/treonina cinases, uma proteína serina/treonina fosfatase, duas PTPs e uma proteína tirosina cinase. Entre as proteínas secretadas pelo *M. tuberculosis* no interior do macrófago, pelo menos duas fosfatases, PtpA e PtpB, são essenciais à sua patogênese (WONG et al., 2013). A PtpA inibe o tráfico do fagossoma e a fusão fagossoma-lisossoma, e a PtpB tem uma possível função na subversão da resposta imune do hospedeiro, assim favorecendo a infecção (WONG et al., 2013). Como proteínas-chave à patogênese, hoje elas são consideradas alvos moleculares promissores na descoberta de novos fármacos antituberculose (WONG et al., 2013).

Através dos esforços de diversos laboratórios foram identificadas diversas moléculas capazes de inibir especificamente a atividade da PtpA e PtpB, além de impedir a sobrevivência intracelular do *M. tuberculosis* (Tabela 16 e Figura 26). Entre essas moléculas, foram identificados como inibidores chalconas e produtos naturais (Tabela 16). Dessa forma, os compostos identificados como potenciais inibidores de PtpA e PtpB neste trabalho, estão de acordo com as classes químicas já descritas na literatura (Tabela 11).

Tabela 16. Compostos descritos na literatura como inibidores da PtpA e PtpB

Inibidor	PtpA IC ₅₀	PtpB IC ₅₀	Referência
Análogos de estevastelinas, roseofilinas e prodigiosinas (1)	8,8 - 28,7 μ M		(MANGER et al., 2005)
Derivados de indoloquinolizidinas (2)	>100 μ M	0,36 μ M	(NÖREN-MÜLLER et al., 2006)
Hexapeptídeos cíclicos brunsvicamida (3)	>100 μ M	7,3 μ M	(MÜLLER et al., 2006)
Derivados de indolizina (4)	80 μ M	7,5 μ M	(WEIDE et al., 2006)
Oxalilamino-metileno-tiofeno sulfonamida (OMTS) (5)		0,44 μ M	(GRUNDNER et al., 2007)
Derivado de isoxazol carboxilato (6)	>50 μ M	0,22 μ M	(SOELLNER et al., 2007)
Chalconas (7)	8,4 μ M	12 μ M	(CHIARADIA et al., 2008; CHIARADIA et al., 2012)
Análogos difluoreto do ácido metilfosfônico (8)	1,4 μ M*	>100 μ M*	(RAWLS et al., 2009)
Derivados azida-isoxazol (9)		0,55 μ M	(TAN et al., 2009)
Derivados salicilato-		7,0 μ M	(BERESFORD et al.,

isoxazol (10)			2009)
Derivados benzofurano do ácido salicílico (11)	77,3 μM	1,26 μM	(ZHOU et al., 2010)
Derivados de sulfonamida e oxalamida (12)		1,2 e 4,8 μM	(CHEN et al., 2010)
Derivados de isotiazolidinona		3,7 μM	(RAWLS et al., 2010)
Peptídeos cíclicos	8,0 μM		(CHANDRA et al., 2010)
Derivados de tiazolidinonas		0,32 μM	(VINTONYAK et al., 2010)
Derivados de sulfonil-hidrazonas		18 μM	(OLIVEIRA et al., 2011)
Conjugados de ácido malonâmico (13)	22, 5 μM*		(CHANDRA et al., 2011)
Compostos naturais (14)		1,9 μM	(MASCARELLO et al., 2013)
Derivados de pirrol	180 μM	1,5 μM	(HE et al., 2013b)
Derivados do ácido carboxílico hidroxindol (15)	7,8 μM	0,079 μM	(ZENG et al., 2013)
Asperterpenóide A		2,2 μM	(HUANG et al., 2013)
Derivados benzofurano do ácido salicílico (16)	2,5 μM	0,038 μM	(HE et al., 2013c)

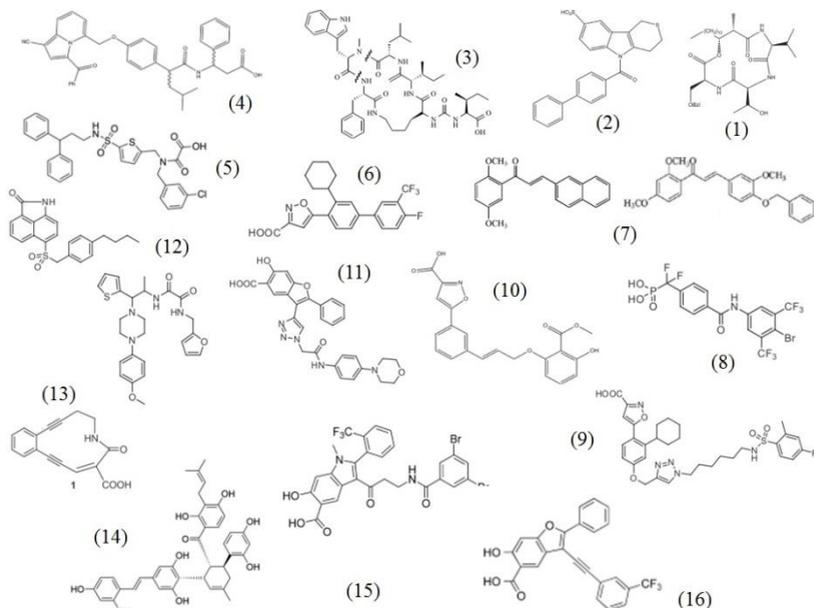
* Valores de K_i . Os números entre parênteses indicam as moléculas na figura 26.

A PtpA do *M. tuberculosis* cepa H37Rv foi identificada, pela primeira vez, através da sua homologia com PTPs de baixa massa molecular eucariotas. A PtpA do *M. tuberculosis* apresenta 37% de identidade e 57% de similaridade com a LMW-PTPA humana (SILVA; TABERNEIRO, 2010; WONG et al., 2013). Além disso, a estrutura 3D da PtpA se sobrepõe perfeitamente sobre a estrutura de hLMW-PTPA, inclusive a conformação do sítio ativo, *P-loop*, que contém a cisteína (Cys11) catalítica, e do DPYY-*loop* (Figura 27). No entanto, a comparação da superfície molecular entre as duas proteínas revelou que os resíduos conservados, exceto pelo *P-loop*, estão localizados na região externa do sítio ativo formado pelo DPYY-*loop* e que o resto da superfície molecular da PtpA apresenta baixa similaridade de sequência e forma com a proteína humana (SILVA; TABERNEIRO, 2010).

Ainda que a estrutura 3D da PtpA e de hLMW-PTPA apresentem similaridades, as diferenças de superfície e distribuição de cargas entre elas podem ser exploradas no planejamento e desenvolvimento de

inibidores seletivos para PtpA (SILVA; TABERNERO, 2010; WONG et al., 2013). Entretanto, apesar dos diversos inibidores de PtpA identificados (Tabela 16) até o momento, não se tem o relato do modo de ligação de nenhuma dessas moléculas à estrutura da PtpA (SILVA; TABERNERO, 2010). Recentemente, a estrutura da PtpA foi determinada na presença de íons de fosfato, um inibidor competitivo de fosfatases, assim caracterizando o sítio de ligação e elucidando o envolvimento do *P-loop* e *D-loop* na ligação do fosfato à PtpA (STEHLE et al., 2012). Desse modo, a determinação da estrutura 3D da PtpA em complexo com inibidores poderia contribuir significativamente no planejamento de inibidores mais potentes e seletivos (SILVA; TABERNERO, 2010).

Figura 26. Estrutura química de alguns inibidores da PtpA e PtpB



Os números correspondem à tabela 16. Adaptado de (SILVA; TABERNERO, 2010; HE et al., 2013a).

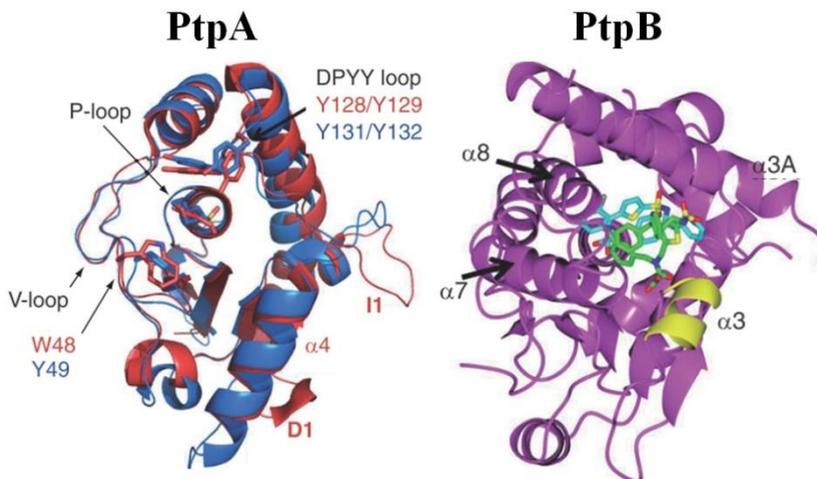
Similarmente à PtpA, a PtpB foi identificada devido a sua homologia com PTPs eucarióticas, especialmente pela presença do motivo assinatura [(H/V)CX5R(S/T)], uma vez que apresenta baixa similaridade de sequência com PTPs humanas, por exemplo, 6% de

similaridade com a PTP1B (SILVA; TABERNERO, 2010; WONG et al., 2013). Além de ser um fator de virulência essencial ao *M. tuberculosis*, a falta de homólogos humanos ressalta o potencial da PtpB como um alvo para o desenvolvimento de novos fármacos antituberculose, devido aos prováveis efeitos colaterais dos inibidores ao hospedeiro serem minimizados (CHEN et al., 2010).

A estrutura 3D da PtpB revelou que, embora ela contenha um típico domínio PTP, uma folha- β central rodeada por α -hélices, comparando-se a outras proteínas da família a PtpB possui uma arquitetura incomum (Figura 27). Essa diferença se deve ao fato de que o seu domínio catalítico apresenta duas inserções, uma α -hélice chamada 3A e outras duas α -hélices (α -7 e 8) que formam uma tampa (*lid*) dinâmica sobre o sítio ativo (SILVA; TABERNERO, 2010). Dessa forma, essa estrutura protege o sítio ativo da enzima em um ambiente oxidativo (ECCO et al., 2010; WONG et al., 2013). Além disso, uma análise estrutural confirmou que a PtpB, além de desfosforilar resíduos de Ser/Thr/Tyr e fosfoinosítídeos *in vitro*, tem características estruturais similares a proteínas fosfatases de dupla-especificidade, as quais apresentam um sítio ativo mais amplo que as PTPs específicas (SILVA; TABERNERO, 2010).

Grundner e colaboradores (2007) relataram pela primeira vez a estrutura da PtpB cocristalizada com um inibidor específico, a OMTS. Através da estrutura do complexo PtpB-OMTS pôde-se observar duas moléculas de OMTS ligadas à PtpB, uma no sítio ativo da enzima e a outra em um segundo sítio de ligação criado pela α -hélice 3 (GRUNDNER et al., 2007). A α -hélice 3 corresponde a uma região que só aparece na forma helicoidal em LMW-PTPs e na PtpB, assim, essa região forma um segundo sítio de ligação rico em Arg e torna-se um ponto de acesso (*hotspot*) ao desenvolvimento de inibidores seletivos para PtpB (SILVA; TABERNERO, 2010).

Similar aos resultados obtidos com a OMTS, Beresford e colaboradores (2009) identificaram um inibidor seletivo de PtpB (com duplo-sítio de ligação), contendo um grupo isoxasol e um salicilato, sendo que o grupo isoxasol provavelmente interage com o sítio ativo da enzima e o grupo salicilato com o segundo sítio de ligação, proposto por Grundner e colaboradores (2007). Além disso, esse inibidor reduziu significativamente a sobrevivência do *M. bovis* (BCG) em macrófagos infectados, demonstrando que a inibição da PtpB por moléculas pequenas é eficaz na redução da infecção do *Mycobacterium* sp. (BERESFORD et al., 2009).

Figura 27. Estrutura tridimensional da PtpA e PtpB.

PtpA, sobreposição da estrutura da PtpA (vermelho, PDB 1U2Q) e LMW-PTPA humana (azul, PDB 5PNT). *Loops* e resíduos funcionais estão destacados na figura. PtpB, o complexo de PtpB e OMTS (PDB 2OZ5) é apresentado em magenta com as moléculas proximal e distal do inibidor em ciano e verde, respectivamente. As estruturas secundárias comentadas no texto estão destacadas na figura. Adaptado de (SILVA; TABERNEIRO, 2010).

Os resultados de seletividade demonstraram que os compostos identificados neste trabalho, com efeito inibitório da atividade de PtpA, PtpB e YopH (Tabela 14), não são específicos, uma vez que foram capazes de inibir significativamente a atividade de PTP1B. De acordo com He e colaboradores (2013), o desenvolvimento de inibidores potentes e seletivos de PTPs é uma tarefa excepcionalmente desafiadora.

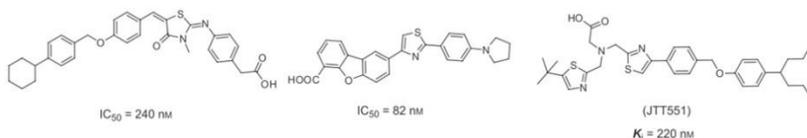
Segundo Barr e colaboradores (2010), os principais desafios da química medicinal ao desenvolvimento de inibidores de PTPs são a seletividade e a biodisponibilidade das moléculas. O desafio de desenvolver inibidores seletivos de PTPs é devido ao sítio ativo dessas enzimas serem altamente conservados, pois a maioria das PTPs de interesse farmacêutico possui um homólogo próximo, que se inibido teria efeitos negativos. Assim, os inibidores de PTPs tendem a apresentar uma inibição não-específica, tornando a probabilidade de obtenção de inibidores seletivos muito reduzida (ZHANG, 2001; BARR, 2010). No que diz respeito à permeabilidade celular, uma vez que o sítio ativo das PTPs é carregado positivamente, altamente polar e possui uma cisteína catalítica conservada, a maioria dos compostos

inibidores mimetiza o grupo fosfato, carregado negativamente, ou contém grupos oxidantes que interagem com a Cys catalítica. Assim, essas moléculas apresentam dificuldades para atravessar a membrana celular (HE et al., 2013a). Segundo Wong e colaboradores (2013), a falta de permeabilidade celular é a principal razão para o pequeno número de inibidores da PtpA e PtpB com atividade celular, apesar da abundância de moléculas descritas.

Apesar dessas dificuldades, os recentes avanços em tecnologias de triagem de alta produtividade (*high-throughput screening*), biologia estrutural, modelagem computacional e em química combinatória e medicinal, permitiram a identificação de potentes e seletivos inibidores de algumas PTPs. Como exemplo, três inibidores potentes e seletivos de PTP1B (Figura 28), com IC_{50} abaixo de 240 nM, seletividade para PTP1B acima de 20 vezes e com excelentes resultados *in vivo*, redução de peso corporal e do nível de glicose e do colesterol no plasma (HE et al., 2013a).

Dessa forma, as abordagens mais recentes têm buscado desenvolver inibidores bivalentes, que interagem tanto com o sítio ativo quanto com regiões não conservadas da enzima, explorar conformações estruturais atípicas, desenvolver inibidores alostéricos e planejar novas moléculas que mimetizam o grupo fosfato, porém que não sejam altamente carregadas (BARR, 2010).

Figura 28. Estrutura química de três inibidores de PTP1B.



Adaptado de (HE et al., 2013a).

2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido aos esforços de instituições acadêmicas e empresas farmacêuticas, ativamente envolvidas na pesquisa de inibidores de PTPs, foi possível avançar significativamente no desenvolvimento de inibidores potentes e seletivos (SOBHIA et al., 2012). Entretanto, apenas alguns desses inibidores chegaram a ensaios clínicos iniciais, sendo que nenhum deles evoluiu para ensaios finais ou registro (BARR, 2010). Apesar das adversidades, o potencial terapêutico de diversas PTPs, essenciais a distintas vias de sinalização, juntamente com o empenho de instituições acadêmicas e farmacêuticas proporcionam a confiança que, eventualmente, um inibidor de PTPs se tornará um candidato clínico bem-sucedido (BLASKOVICH, 2009).

O presente trabalho apresentou a avaliação de uma biblioteca de 351 compostos orgânicos naturais e sintéticos frente à atividade da PtpA, PtpB e YopH.

Dentre as moléculas testadas, duas sulfonamidas apresentaram inibição significativa da atividade da YopH (K3 e K7). O composto K3 apresentou modo de inibição não-competitivo e K_i de $36 \pm 2,5 \mu\text{M}$, e o composto K7 apresentou modo de inibição competitivo e K_i de $4,4 \pm 0,4 \mu\text{M}$.

Dentre as 27 moléculas que apresentaram inibição da atividade da PtpA superior a 50%, 16 apresentaram valores de $\text{IC}_{50} < 30 \mu\text{M}$. Os compostos com melhor inibição da PtpA foram B85, CH6, Ácido Acetil-Aleurítico, EUFR163, EUFR592 e delfinidina. De acordo com os estudos cinéticos, os compostos B85, EUFR163 e EUFR592 inibem competitivamente a PtpA, com valores de K_i de $2,9 \pm 0,7$, $5,7 \pm 0,8$ e $1,3 \pm 0,3 \mu\text{M}$, respectivamente. O composto CH6 é um inibidor não-competitivo da PtpA, com K_i de $7,1 \pm 1,0 \mu\text{M}$.

Das 28 moléculas que apresentaram inibição da atividade da PtpB superior a 50%, 15 apresentaram valores de $\text{IC}_{50} < 30 \mu\text{M}$. Os compostos com melhor inibição da PtpB foram PM1, B85, CH6, Ácido Acetil-Aleurítico, EUFR163, EUFR592 e delfinidina. De acordo com os estudos cinéticos, os compostos B85, EUFR163 e EUFR592 inibem competitivamente a PtpB, com valores de K_i de $3,3 \pm 0,6$, $1,0 \pm 0,4$ e $1,3 \pm 0,1 \mu\text{M}$ respectivamente. O composto CH6 é um inibidor não-competitivo da PtpB, com K_i de $3,3 \pm 0,6 \mu\text{M}$.

Dessa forma, os resultados demonstraram que os compostos com maior potencial inibitório de PtpA e PtpB são derivados de chalconas e produtos naturais.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, espera-se identificar as características estruturais importantes desses compostos, a fim de modificar as estruturas para obter inibidores potentes e seletivos para PtpA, PtpB e YopH.

2.5 PERSPECTIVAS

Para darmos continuidade aos resultados apresentados nesta tese, as perspectivas são:

Realizar a triagem de novos compostos orgânicos frente às enzimas abordadas neste trabalho.

Prever o modo de interação dos inibidores no sítio ativo da PtpB através de modelagem molecular.

Dar continuidade aos estudos com os compostos mais ativos, incluindo Ácido Acetil-Aleurítico, PM1 e delphinidina, que também apresentaram bons resultados de inibição (IC_{50}).

Concentrar esforços na caracterização físico-química dos complexos enzima-inibidor, através de técnicas específicas como espectrometria de massa, ressonância plasmônica de superfície e calorimetria de titulação isotérmica.

A partir das estruturas já identificadas como inibidores, planejar novos análogos, com o intuito de melhorar a potência e a especificidade.

Avaliar através de análises *in vivo* e citotóxicas os melhores inibidores frente às PTPs.

3 CARACTERIZAÇÃO DA ÚNICA SERINA/TREONINA FOSFATASE DO *Mycoplasma synoviae*, PrpC

3.1 OBJETIVOS

3.1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral foi clonar e realizar a caracterização molecular e bioquímica da única proteína serina/treonina fosfatase anotada no genoma do *Mycoplasma synoviae*, PrpC.

3.1.2 Objetivos Específicos

- Analisar comparativamente a estrutura primária da proteína PrpC de *M. synoviae*;
- Obter o modelo de homologia estrutural da PrpC;
- Clonar o gene *prpC* do *M. synoviae* e inseri-lo no vetor de expressão pET-14b;
- Expressar de maneira heteróloga a PrpC de *M. synoviae* e purificá-la por cromatografia;
- Determinar as condições de atividade ótima da fosfatase, como pH ótimo, dependência por metal e especificidade por substrato, bem como o efeito de inibidores específicos de fosfatases frente à atividade enzimática;
- Mensurar os parâmetros cinéticos da PrpC;
- Avaliar a estrutura secundária e tridimensional da PrpC na ausência e presença de íons metálicos por espectroscopia de dicroísmo circular e fluorescência intrínseca;
- Avaliar o efeito de íons metálicos na estabilidade térmica da PrpC por espectroscopia de dicroísmo circular, fluorescência intrínseca e atividade enzimática;

- Investigar a possibilidade da existência de um terceiro sítio de ligação a metal na estrutura da PrpC por meio de mutação sítio-dirigida;
- Clonar, expressar e purificar as proteínas mutantes (PrpC_D122A e PrpC_R164A) e avaliar o efeito das mutações sobre a atividade enzimática, estrutura secundária, estrutura tridimensional e estabilidade térmica;
- Mensurar os parâmetros cinéticos das proteínas mutantes;
- Avaliar o efeito do íon manganês sobre as proteínas mutantes por espectroscopia de dicroísmo circular e fluorescência intrínseca, bem como na desnaturação térmica;
- Determinar a estequiometria de ligação proteína/metal na proteína WT e mutantes por espectrometria de massa e calorimetria de titulação isotérmica.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Clonagem do gene *prpC* de *Mycoplasma synoviae*

As células de *Mycoplasma synoviae* cepa 53 (AE017245) foram fornecidas pelo Laboratório de Genética e Sanidade Animal, Departamento de Bacteriologia de Suínos, Embrapa Suínos e Aves. O DNA genômico foi extraído a partir das células com o kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega), seguindo as instruções do fabricante. O DNA extraído foi visualizado em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídio (0,3 µg/mL) por meio de um transiluminador acoplado a um sistema de vídeo (*UVP Bioimaging System*).

A sequência do gene *prpC* (MS53_0122) foi amplificada pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a partir do DNA do *M. synoviae* usando oligonucleotídeos específicos. O gene MS53_0122 possui um códon TGA na posição 74 o qual codifica um resíduo de triptofano em *Mycoplasma*, porém, em *E. coli* esse códon é reconhecido como um códon de terminação. Assim primeiramente foi necessária uma mutação sítio-dirigida para substituir o códon TGA pelo TGG, o qual corresponde ao triptofano em *E. coli*. As sequências dos oligonucleotídeos usados foram: iniciador 5' (W-For 5'-GAA ACT TCG CTG **TGG** CTT AAA AAC GTA GTT- 3') e iniciador 3' (W-Rev 5'-AAC TAC **GTT** TTT AAG CCA CAG CGA AGT TTC- 3'), a letra em negrito e sublinhada representa a troca de nucleotídeo. Para realizar a troca do códon TGA pelo TGG, duas PCRs foram realizadas para produzir duas metades do gene *prpC* contendo sequências sobrepostas e a mutação desejada. Os segundos oligonucleotídeos usados em cada reação representam as extremidades 5' e 3' (PrpC-For e PrpC-Rev, respectivamente) da sequência do gene *prpC*. O iniciador 5' contém o sítio de restrição para a enzima *NdeI* (PrpC-For 5'-GGA TTA CAT ATG ATT AGT CTT AAA AGC ATT TC- 3') e o iniciador 3' contém o códon de terminação e o sítio de restrição para *BamHI* (PrpC-Rev 5'-GTT TTA GGA TCC TTA CTC TCC AAG CTT TAT AAC AAT AC- 3'), os sítios de restrição estão sublinhados.

A PCR da mutação sítio-dirigida conteve 100 ng de DNA genômico, 50 pmoles de cada iniciador (PrpC-For mais W-Rev ou PrpC-Rev mais W-For), 200 pmoles de dNTPs, 1 U de Taq DNA polimerase, 1,5 mmol/L de MgCl₂, 5 µL de tampão (5x) e água ultrapura para um volume final de 25 µL. Uma reação contendo todos os reagentes, com exceção do DNA genômico, foi realizada como controle

negativo. A amplificação foi realizada em um termociclador (MiniCycler), iniciando com um passo de desnaturação a 95 °C por 5 min, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 45 s, pareamento a 45 °C por 35 s, extensão a 72 °C por 1 min, finalizando com um passo de extensão a 72 °C por 10 min. Ao término da PCR, os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2 % (tampão da eletroforese: TBE 0,5%) corado com brometo de etídio (0,3 µg/mL), sendo visualizados em transiluminador e os resultados digitalizados. Os dois fragmentos mutados obtidos foram extraídos do gel e purificados com o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), sendo utilizados na terceira reação de PCR como DNA molde. A união dos fragmentos por PCR foi realizada com 100 ng de cada fragmento e 50 pmoles de cada iniciador (PrpC-For e PrpC-Rev), da mesma forma como descrito acima. O controle negativo continha todos os reagentes, com exceção do DNA molde, e o controle positivo continha DNA genômico em vez dos fragmentos mutados como DNA molde. O produto único de 768 pb foi extraído do gel de agarose e purificado com o kit mencionado anteriormente. A purificação do fragmento de 768 pb foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,2 %.

O produto obtido após a purificação foi clonado com o kit *pGEM®-T Easy Vector System* (Promega) e a reação resultante da clonagem foi utilizada para transformar bactérias *E. coli* DH5α competentes. As bactérias *E. coli* DH5α se tornaram competentes através de tratamento químico seguindo o protocolo descrito por Tu e colaboradores (TU et al., 2005). Para transformar as bactérias competentes, toda a reação de ligação foi incubada com 100 µL de células competentes em gelo por 30 min. Após a incubação as células sofreram choque térmico: 1 min e 30 segundos a 42 °C e 2 min a 0 °C. Em seguida, as células foram estabilizadas com a adição de 500 µL de meio LB líquido, sendo mantidas a 37 °C durante 1 hora. Por fim, as células foram semeadas em meio LB sólido (Peptona 1 %, extrato de levedura 0,5 %, NaCl 1 %, Ágar 1,5 %, pH 7,5) suplementado com o antibiótico para o qual o plasmídeo confere resistência, 100 µg/mL de ampicilina, e cultivadas a 37 °C durante 15 horas. O controle negativo da transformação bacteriana seguiu o mesmo protocolo, mas na ausência de produto de ligação (plasmídeo).

As colônias resistentes à ampicilina foram selecionadas por PCR contendo um lisado da colônia bacteriana como DNA molde e 50 pmoles de cada iniciador (PrpC-For e PrpC-Rev), seguindo a reação

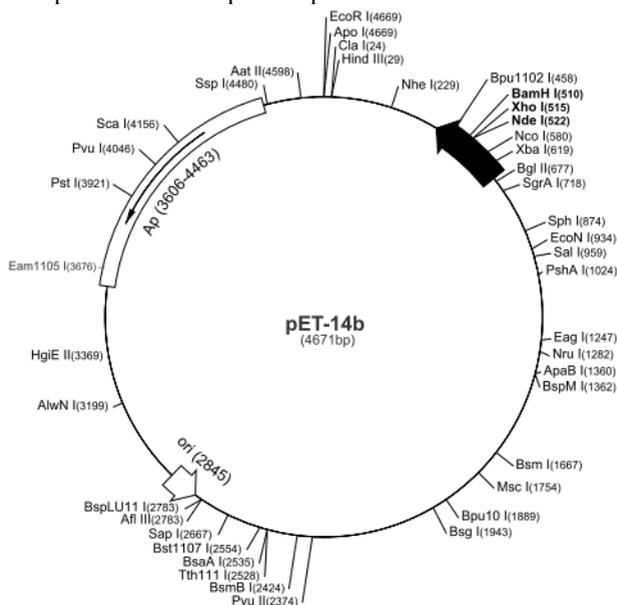
descrita acima. O controle positivo continha DNA genômico como molde em vez do DNA proveniente da colônia. As colônias positivas para a presença do inserto foram propagadas separadamente em 10 mL de meio LB contendo ampicilina (100 µg/mL) a 37 °C por 15 h. Posteriormente, o DNA plasmidial foi extraído e purificado das células bacterianas com o kit *Wizard® Plus SV Minipreps* (Promega). O mesmo procedimento de propagação e purificação foi realizado para obter o vetor de expressão pET-14b íntegro (Invitrogen) (Figura 29).

O plasmídeo pGEM contendo a sequência do gene *prpC* e o vetor pET-14b íntegro foram digeridos com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* por 16 h a 37 °C. Após a digestão, os produtos foram separados através de eletroforese em gel de agarose 0,8 % e as bandas de interesse extraídas e purificadas. A ligação do inserto no vetor de expressão pET-14b foi realizada com a enzima T4 DNA ligase, no tampão do fabricante, por uma hora a temperatura ambiente, seguindo a ligação por 16 h a 4 °C. O produto da ligação foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* DH5α competentes. As colônias resistentes à ampicilina foram submetidas à PCR, como descrito acima, com o intuito de selecionar os plasmídeos contendo o inserto e excluir falso-positivos. As colônias contendo o vetor de expressão pET-14b-PrpC foram propagadas separadamente em meio LB, e posteriormente o DNA plasmidial foi extraído e purificado, como descrito anteriormente. Uma vez obtido o plasmídeo recombinante, este foi submetido novamente à digestão com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* para confirmar a presença do inserto no vetor. Em seguida, a reação foi separada por eletroforese em gel de agarose 0,8 % e confirmada a presença do inserto de 768 pb. O plasmídeo recombinante obtido a partir da clonagem do gene no vetor pET-14b foi sequenciado pelo Laboratório SONDA – UFRJ com o objetivo de confirmar a integridade da sequência, a orientação do inserto e a troca do códon TGA pelo TGG.

Com o objetivo de estudar o sítio de ligação do terceiro metal na estrutura da proteína codificada pelo gene *prpC*, os códons dos possíveis aminoácidos envolvidos na ligação foram substituídos por um resíduo de alanina, gerando os seguintes mutantes: D122A e R164A. A inserção de mutações sítio-dirigidas no plasmídeo pET-14b-PrpC foi realizada utilizando o kit *QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent). As sequências dos oligonucleotídeos usadas para gerar os vetores pET-14b-PrpC mutantes foram: D122A 5'- TTT CAC ATC GGT **GCT** AGT AGA TGT TAT TTT TAC-3' e R164A 5'-AAT CCT AAA GGA **GCA** CTT TTA ACT AGC-3', os códons destacados em

negrito correspondem aos nucleotídeos mutados. O procedimento para a obtenção dos vetores contendo as mutações foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Os plasmídeos mutantes foram submetidos ao sequenciamento de DNA para confirmar a presença da mutação. O sequenciamento do gene *prpC* contendo as mutações foi realizado pela empresa ACTGene Análises Moleculares, Ludwig Biotecnologia LTDA, Alvorada, Rio Grande do Sul.

Figura 29. Mapa do vetor de expressão pET-14b.



São mostrados os sítios de clivagem para as endonucleases *NdeI*, *BamHI* e *XhoI*, origens de replicação; genes marcadores de seleção e região promotora. Fonte: www.novagen.com.

3.2.2 Teste de indução da expressão da PrpC

Para determinar as melhores condições de expressão proteica, foram avaliadas duas cepas bacterianas (*E. coli* BL21 (DE3) e *E. coli* BL21 (DE3) pLysS), diferentes temperaturas (15 e 37 °C) e diferentes tempos de indução (5 e 15 h).

As células de *E. coli* BL21 (DE3) e *E. coli* BL21(DE3) pLysS foram tratadas quimicamente e transformadas da mesma forma descrita

para as células *E. coli* DH5 α . As colônias selecionadas por resistência ao antibiótico, ampicilina 100 $\mu\text{g/mL}$ (pET-14b) e cloranfenicol 50 $\mu\text{g/mL}$ para *E. coli* BL21(DE3) pLysS, foram inoculadas separadamente em 10 mL de meio LB líquido suplementado com 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina e/ou 50 $\mu\text{g/mL}$ cloranfenicol e cultivadas sob agitação a 37 °C por 15 h. Desse pré-inóculo, 2 mL foram transferidos para 100 mL de meio LB novo, suplementado com os mesmos antibióticos, e cultivados sob agitação a 37 °C, até alcançar DO_{600nm} entre 0,6 e 0,7, medida através de leitura espectrofotométrica. Para cada cepa foram testadas as temperaturas de indução da expressão de 15 e 37 °C, com tempos de indução de 5 e 15 horas, após a adição de 1 mM de IPTG. Após a indução da expressão proteica, os cultivos foram centrifugados (6.000 x g por 20 min a 4 °C), as células foram homogeneizadas com tampão de lise (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 0,5 M, imidazol 10 mM, Triton X-100 0,1 % e glicerol 10%) suplementado com PMSF (40 $\mu\text{g/mL}$), rompidas por sonicação em gelo (7 ciclos de 20 segundos, com intervalos de 40 segundos entre cada um) e o homogeneizado foi novamente centrifugado (16.000 x g por 30 min a 4 °C). As frações solúvel e insolúvel (sedimento) foram analisadas por SDS-PAGE 10% e a cepa/temperatura/tempo de indução que apresentou melhor expressão foi selecionada para dar continuidade à purificação da PrpC. Como controle negativo foi realizado o mesmo teste com bactérias transformadas com o plasmídeo pET-14b íntegro sem o inserto.

3.2.3 Expressão e purificação da PrpC e mutantes

O vetor de expressão pET-14b-PrpC e os vetores mutantes (PrpC_D112A e PrpC_R164A) foram utilizados para transformar bactérias *E. coli* BL21 (DE3). Uma colônia recombinante, selecionada por resistência à ampicilina (100 $\mu\text{g/mL}$), foi utilizada para inocular 10 mL de meio LB líquido suplementado com 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina. Os cultivos foram mantidos sob agitação a 37 °C durante 15 h. Desse pré-inóculo, 5 mL foram transferidos para 250 mL de meio LB novo, suplementado com ampicilina (100 $\mu\text{g/mL}$), onde as bactérias continuaram crescendo sob agitação a 37 °C até alcançar DO_{600nm} entre 0,6 e 0,7, medida através de leitura espectrofotométrica. Em seguida, a expressão da proteína recombinante foi induzida pela adição de IPTG 1 mM e o cultivo mantido sob agitação a 15 °C durante 15 h, sendo essa a melhor condição de expressão proteica obtida através dos testes de indução. Após a expressão das proteínas, os cultivos foram

centrifugados a 6.000 x g por 30 min a 4 °C, e o sedimento celular (aproximadamente 3 gramas a partir de 1 L de cultivo) foi homogeneizado com 10 mL de tampão de lise (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 0,5 M, imidazol 10 mM, Triton X-100 0,1 % e glicerol 10%) suplementado com inibidor de proteases (PMSF 40 µg/mL). As células foram rompidas por sonicação em gelo (7 ciclos de 20 segundos, com intervalos de 40 segundos) e o homogeneizado foi centrifugado (16.000 x g por 30 min a 4 °C) para obter a fração proteica solúvel.

A proteína PrpC e suas mutantes, com a cauda de histidina na porção N-terminal, foram purificadas em condições nativas por cromatografia de afinidade por metal imobilizado (IMAC) com colunas carregadas com níquel (HisTrap HP 1 mL, GE Healthcare) conectadas a um cromatógrafo ÄKTA (GE Healthcare). Antes de ser carregada com a amostra, a coluna foi previamente equilibrada com Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 0,5 M, imidazol 10 mM e glicerol 10%. As proteínas que ligaram à coluna foram eluídas com um gradiente de imidazol 20 a 500 mM, em um fluxo de 1 mL/min e em frações de 1 mL. Alíquotas de cada fração foram coletadas para visualização em SDS-PAGE 10%, que foi corado com azul de Coomassie R-250 0,25%. Após a purificação, as frações, contendo a proteína de interesse foram reunidas e submetidas à cromatografia de exclusão molecular usando a coluna Superdex 200 16/60 (GE Healthcare) conectada ao ÄKTA (GE Healthcare). A coluna foi previamente equilibrada com Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, glicerol 10% e DTT 1 mM (o tampão foi previamente tratado com Chelex 100 para remover resquícios de íons metálicos). Após a injeção da amostra, a proteína foi eluída em frações de 8 mL (fluxo 1 mL/min). Alíquotas de cada fração foram novamente coletadas para visualização em SDS-PAGE 10%, corado com azul de Coomassie R-250 0,25%. Em seguida, as frações, contendo a proteína de interesse foram reunidas, concentradas por centrifugação (Amicon 10 kDa Ultra-15 Millipore), separadas em alíquotas e estocadas a -80 °C.

A quantificação do conteúdo proteico foi estimada espectrofotometricamente a 280 nm na presença de 6 M de hidrócloro de guanidina, levando em consideração a absorvidade de molar 15.940 M⁻¹ cm⁻¹, calculada a partir da sequência primária da PrpC no site www.expasy.ch/tools/protparam.html.

3.2.4 Identificação das proteínas por Espectrometria de Massa (MS)

Para confirmar a identidade da PrpC e suas mutantes, foi realizada a digestão enzimática *in-gel* (MENEGATTI et al., 2010) seguida de espectrometria de massa MALDI/TOF. As bandas contendo as proteínas foram excisadas do gel (SDS-PAGE) e descoradas com 500 μL de uma solução de descoloração contendo 50% de acetonitrila (ACN) em 25 mM de bicarbonato de amônio pH 8,0 sob agitação até a completa descoloração. Em seguida, foram desidratadas com 100 μL de ACN por 15 minutos, após, a ACN foi removida e os resíduos remanescentes do gel foram secos em sistema de centrifugação a vácuo (Speed Vac/Eppendorf) durante 10 minutos. As bandas de gel foram reidratadas com 10 μL de tripsina (Promega) em 25 mM de bicarbonato de amônio pH 8,0, na concentração final de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, durante 30 min em gelo, em seguida foram colocadas em estufa a 37 °C durante 12 horas.

Após a digestão enzimática, os peptídeos foram eluídos do gel com 30 μL de solução de extração contendo 50% de ACN e 5% de ácido trifluoroacético (TFA). Foram realizadas três etapas de extração durante 30 minutos em sob agitação, em cada etapa o sobrenadante foi transferido a um novo microtubo. Todas as alíquotas de sobrenadante foram reunidas e concentradas durante 1 hora em um sistema a vácuo até secagem completa.

As análises de espectrometria de massa foram realizadas em um espectrômetro de massa tipo MALDI-TOF/TOF modelo Autoflex III Smartbean (Bruker Daltonics). Os peptídeos extraídos foram solubilizados em 10 μL 0,1 % de TFA. Uma amostra de 1 μL de cada banda foi homogeneizada com 1 μL da solução saturada da matriz ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (5 mg/mL em ACN 50%, TFA 0,1%). Em seguida, 1 μL dessa mistura foi aplicada diretamente na placa do espectrômetro MALDI/TOF e submetida à cristalização à temperatura ambiente. Após a cristalização da amostra foram realizadas as análises espectrométricas em modo positivo. A calibração externa foi realizada usando o kit *Peptide Standard* (Bruker Daltonics). Os espectros gerados foram analisados com o programa FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics). As proteínas foram identificadas por comparação com a lista de peptídeos da digestão teórica (ProteinProspector MS-Digest www.prospector.ucsf.edu) com o perfil de *peptide mass fingerprinting* obtido por MS.

A massa molecular das proteínas foi confirmada por MS de massa intacta. Uma amostra solúvel da PrpC e suas mutantes (1 μL), concentração final de 6 μM , foi homogeneizada com 1 μL de matriz (ácido sinapínico: 10 mg/mL em ACN 30%, TFA 0,1%) e analisada como descrito acima. A calibração externa foi realizada usando o kit *Protein Standard II* (Bruker Daltonics).

3.2.5 Ensaios de atividade enzimática da PrpC

A atividade enzimática da PrpC foi mensurada por espectrofotometria (leitor de microplaca TECAN Infinite M200) monitorando a hidrólise do substrato artificial *p*-nitrofenil fosfato (*p*NPP) a 30 °C. Para determinar o pH ótimo de atividade foram usados os seguintes tampões: Tris-HCl 20 mM (pH 7,0 - 7,5 - 8,0 - 8,5 - 9,0), HEPES 20 mM (pH 7,0 - 7,5 - 8,0) e CHES 20 mM (pH 9,0 - 9,5 - 10,0), contendo NaCl 50 mM, DTT 1 mM, *p*NPP 10 mM e MnCl_2 1 mM ou MgCl_2 . A reação de 200 μL (20 μL tampão 10 vezes concentrado, 10 μL de *p*NPP 200 mM, 10 μL de proteína 3 μM , 10 μL de MnCl_2 20 mM ou MgCl_2 e 150 μL de água ultrapura) foi iniciada pela adição da enzima (150 nM final) e a quantidade de *p*-nitrofenol (*p*NP) produzida foi medida a 410 nm, durante 5 min (com leituras a cada 30 segundos). A atividade específica definida como a liberação de 1 $\mu\text{mol pNP min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ a 30 °C foi calculada utilizando a absorvidade molar do *p*NP determinada em cada condição. Controles negativos foram realizados na ausência de enzima para monitorar a hidrólise espontânea de *p*NPP. Para determinar a dependência de metal na atividade enzimática, as reações foram realizadas em CHES 20 mM pH 9,0, NaCl 50 mM, DTT 1 mM, *p*NPP 10 mM, 150 nM de enzima, MnCl_2 1 mM, MgCl_2 , CaCl_2 , CuSO_4 , ZiSO_4 ou NiCl_2 (Reação de 200 μL : 20 μL tampão 10 vezes concentrado, 10 μL de *p*NPP 200 mM, 10 μL de proteína 3 μM , 10 μL da solução metálica 20 mM e 150 μL de água ultrapura). Sob essas condições, a atividade específica foi calculada utilizando-se a absorvidade molar de $13.600 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

Para confirmar que a PrpC é uma fosfatase membro da família PPM, foi avaliado o efeito de vários compostos inibidores de fosfatases sobre a atividade enzimática da PrpC. Os compostos avaliados foram: ácido ocadáico, trifluoroperazina, levamisol, tartarato de sódio, molibdato de amônio, pirofosfato de sódio, fosfato de sódio, fluoreto de sódio e EDTA. As reações continham CHES 20 mM pH 9,0, NaCl 50 mM, DTT 1 mM, *p*NPP 10 mM, 150 nM de enzima, MnCl_2 1 mM e o

composto (Reação de 200 μL : 20 μL tampão 10 vezes concentrado, 10 μL de *p*NPP 200 mM, 10 μL de proteína 3 μM , 10 μL da solução metálica 20 mM. 5 μL de composto e 145 μL de água ultrapura). A atividade foi expressa em porcentagem de atividade residual, comparando-se a atividade na presença e ausência do composto inibidor. As leituras foram realizadas como descrito acima.

Para determinar o efeito do íon manganês na estabilidade térmica da atividade enzimática da PrpC, foram realizados ensaios no qual a reação enzimática foi pré-incubada durante 5 min em diferentes temperaturas na presença ou ausência de metal. As reações de 200 μL contendo CHES 20 mM pH 9,0, NaCl 50 mM, DTT 1 mM, 150 nM de enzima na presença ou ausência de MnCl_2 1 mM foram pré-incubadas a 25, 30, 40, 45, 50, 55, 60 e 70 °C antes da adição de *p*NPP 10 mM. Quando a reação foi incubada na ausência do metal, MnCl_2 1 mM foi adicionado antes de iniciar a reação com o substrato. As leituras foram realizadas como descrito acima. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

A atividade enzimática da PrpC sobre fosfopeptídeos foi mensurada por espectrofotometria (leitor de microplaca TECAN Infinite M200) monitorando a hidrólise do grupo fosfato com o kit *serine/threonine phosphatase assay system* (Promega). Os fosfopeptídeos sintéticos utilizados como substrato foram: RRA(pT)VA (Promega), KR(pT)IRR, RRLIEDAE(pY)AARG e RRA(pS)VA (AminoTech). Para determinar o pH ótimo de atividade foram usados os seguintes tampões: Tris-HCl 20 mM (pH 7,0 - 7,5 - 8,0 - 8,5 - 9,0) e CHES 20 mM (pH 9,0 - 9,5 - 10,0), contendo NaCl 50 mM, fosfopeptídeo 200 μM e MnCl_2 1 mM ou MgCl_2 . As reações de 50 μL (10 μL tampão 5 vezes concentrado, 10 μL de fosfopeptídeo 1 mM, 2,5 μL de proteína 3 μM , 2,5 μL de MnCl_2 20 mM ou MgCl_2 e 25 μL de água ultrapura) foram iniciadas pela adição da enzima (150 nM final), incubadas por 5 min a 30 °C e paralisadas pela adição de 50 μL de verde de malaquita. Após 15 min de incubação a temperatura ambiente a quantidade de fosfato inorgânico produzido foi medida a 600 nm. A atividade específica definida como a liberação de 1 nmol P_i min^{-1} mg^{-1} a 30 °C, foi calculada utilizando uma curva padrão de fosfato. Controles negativos foram realizados na ausência de enzima para monitorar a hidrólise espontânea de grupo fosfato. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

3.2.6 Avaliação dos parâmetros cinéticos da PrpC e mutantes

Para determinar os parâmetros cinéticos da PrpC e suas mutantes usando *p*NPP como substrato, concentrações crescentes de *p*NPP foram avaliadas. Os ensaios foram realizados em 200 μ L (20 μ L tampão 10 vezes concentrado, 10 μ L de *p*NPP, 10 μ L de proteína 3 μ M, 10 μ L de $MnCl_2$ 20 mM e 150 μ L de água ultrapura) com CHES 20 mM pH 9,0, NaCl 50 mM, DTT 1 mM, 150 nM de enzima, $MnCl_2$ 1 mM e *p*NPP 0,1 a 20 mM por 5 min a 30 °C. Para determinar a constante catalítica do íon metálico, as reações foram realizadas nas mesmas condições, exceto pela concentração de substrato fixa em 10 mM de *p*NPP e a concentração de metal variando entre 0,1 a 10 mM de $MnCl_2$. As leituras foram realizadas como descrito no item anterior. Para determinar os parâmetros cinéticos da PrpC WT usando o fosfopeptídeo RRA(pT)VA como substrato, concentrações crescentes de RRA(pT)VA foram avaliadas. Os ensaios foram realizados em 50 μ L com CHES 20 mM pH 9,0, NaCl 50 mM, 150 nM de enzima, $MnCl_2$ 1 mM e RRA(pT)VA 40 a 700 μ M por 5 min a 30 °C. A liberação de P_i foi monitorada como descrito no item anterior. Para determinar os parâmetros cinéticos da PrpC WT usando uma fosfoproteína como substrato, concentrações crescentes de α -caseína do leite bovino (Sigma C6780) foram avaliadas (FATHI et al., 2002). A α -caseína foi dissolvida em Tris-HCl 20 mM pH 7,5 (concentração final de 2,6 mM) e estocada a -80 °C. Os ensaios foram realizados em 200 μ L (40 μ L tampão 5 vezes concentrado, 10 μ L de α -caseína, 10 μ L de proteína 3 μ M, 10 μ L de $MnCl_2$ 20 mM e 150 μ L de água ultrapura) com CHES 20 mM pH 9,0, NaCl 50 mM, 150 nM de enzima, $MnCl_2$ 1 mM e α -caseína 0,1 a 50 μ M por 5 min a 30 °C. A liberação de P_i foi monitorada através do método do verde de malaquita a 600 nm como descrito por Fathi e colaboradores (2002), usando uma reação sem adição de PrpC como controle negativo. A quantidade de P_i liberado foi determinada usando uma curva padrão. As constantes catalíticas foram determinadas pela equação de Michaelis-Menten usando uma análise de regressão não linear no programa GraphPad Prism 5.0. Todas as reações foram realizadas em triplicatas.

3.2.7 Ensaio de biotilação para detecção de proteínas S-nitrosiladas

Com o intuito de investigar se a PrpC é S-nitrosilada foi realizado o ensaio de biotilação (*biotin switch*) segundo Jaffrey e Snyder (JAFFREY; SNYDER, 2001), com algumas modificações. Para a realização desses experimentos trocou-se o tampão proteico para o tampão HEN (HEPES 250 mM pH 7,7, EDTA 1 mM, neocuproína 0,1 mM) por meio de centrifugação com filtros Microcon 10 kDa (Millipore). Em seguida, a concentração de proteína foi ajustada a 0,8 mg/mL e a amostra proteica tratada foi com 1 mM de S-nitrosoglutationa (GSNO) por 30 min, na ausência de luz, em temperatura ambiente. Após a nitrosilação, as amostras foram incubadas por 30 min com quatro volumes de tampão de bloqueio (HEN, SDS 2,5 %, metil-metano-tiosulfonato – MMTS 27 mM) a 50 °C, sob frequente agitação. O MMTS residual foi removido por precipitação com 10 volumes de acetona gelada (-20 °C) e a amostra foi ressolubilizada em tampão HENS (HEN mais SDS 1 %). O MMTS é utilizado para bloquear os resíduos de cisteína que não foram nitrosilados pelo óxido nítrico. Em seguida, as S-nitrosilações foram novamente reduzidas com 1 mM de ascorbato de sódio por 10 min, a temperatura ambiente. Após a redução, as cisteínas livres foram biotinizadas com 2 mM de biotina-HPDP (Thermo Scientific) por 1h, a temperatura ambiente. Como controle negativo, as amostras foram tratadas com 1mM de glutationa reduzida (GSH) ao invés de GSNO, e como controle positivo, realizou-se a S-nitrosilação da PtpA de *M. tuberculosis* (MATIOLLO et al., 2013).

Para detectar a biotilação por *Western blot*, as proteínas do ensaio de biotina foram separadas por SDS-PAGE 10%, transferidas à membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF). Em seguida, a membrana foi bloqueada com 25 mL da solução de PBS-T (PBS mais Tween 20 0,1%) suplementado com leite em pó desnatado (5%) durante 12 horas a 4 °C. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com 25 mL PBS-T contendo o anticorpo de camundongo antibiotina (diluição 1:10.000) (Sigma) por 1 h sob agitação, em temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada com PBS-T e incubada em temperatura ambiente por 1 h sob agitação com 25 mL PBS-T contendo o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo do kit *Amersham ECL Western Blotting Analysis System* (GE Healthcare), diluição 1: 30.000. Para detecção da fluorescência do anticorpo secundário foi usado o scanner de fluorescência FLA-9000 (GE Healthcare).

3.2.8 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) e Fluorescência Intrínseca da PrpC e mutantes

As análises de espectroscopia da PrpC e suas mutantes foram realizadas em um espectropolarímetro JASCO J-815 equipado com um controlador de temperatura e uma unidade de fluorescência. Para avaliar o conteúdo de estrutura secundária das proteínas, espectros de CD UV-distante foram obtidos em um intervalo de comprimento de onda entre 190 a 260 nm, a 20 °C, com 10 µM de proteína em tampão contendo Tris-HCl 10 mM pH 8,0 na presença ou ausência de diferentes íons metálicos 10 mM de MnCl₂, MgCl₂, CaCl₂, CuSO₄, ZrSO₄ ou NiCl₂ (as mutantes só foram avaliadas na presença de MnCl₂). Os experimentos foram realizados em cubeta de quartzo com caminho óptico de 0,5 nm, com velocidade de varredura de 50 nm/min, resolução de 0,1 nm, resposta de 8 segundos e largura de faixa de 2 nm. Em cada experimento, foram obtidos a média de 3 espectros consecutivos e de cada espectro de proteína foi subtraído o espectro do tampão ou tampão mais metal. Os cálculos das porcentagens de conteúdo de estrutura secundária foram realizados com o programa DichroWeb (*online CD analysis*) (WHITMORE; WALLACE, 2008), usando os métodos Contin e CDSSTR, e o grupo de referência proteica número 4.

A estabilidade térmica da PrpC e suas mutantes foi avaliada por CD monitorando a elipticidade a 222 nm em uma faixa de temperatura de 20 a 80 °C, com aumento gradual de 1 °C, com um período inicial de equilíbrio de 10 min a 20 °C, na presença ou ausência de 10 mM de MnCl₂ ou MgCl₂ (as mutantes só foram avaliadas na presença de MnCl₂). Os experimentos foram realizados com 10 µM de proteína em tampão contendo Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, DTT 1 mM e glicerol 10% em uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 0,5 nm. As temperaturas médias de desnaturação (T_m) para cada proteína foram calculadas a partir das curvas de elipticidade a 222 nm *versus* a temperatura por regressão não linear (curva sigmoidal de Boltzmann) no programa GraphPad Prism 5.0.

Para obter informação sobre a conformação estrutural da PrpC e suas mutantes, espectros de fluorescência intrínseca foram obtidos com 10 µM de proteína em tampão contendo Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, DTT 1 mM e glicerol 10%, na presença ou ausência de MnCl₂ 10 mM, com um período inicial de equilíbrio de 5 min em diferentes temperaturas: 20 °C, 37 °C e 50 °C. Os experimentos foram realizados em cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm, com um

comprimento de onda de excitação de 280 ou 295 nm, espectros de emissão entre 260 e 400 nm e largura de faixa de 10 nm. Em cada experimento, foram obtidos a média de 3 espectros consecutivos e de cada espectro de proteína foi subtraído o espectro do tampão ou tampão mais metal. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

3.2.9 Avaliação da interação não covalente proteína-metal por espectrometria de massa com ionização por *eletrospray*

Para estimar a estequiometria da ligação de íons de manganês a PrpC e suas mutantes, foi empregada a técnica de espectrometria de massa nativa. A espectrometria de massa com ionização por *eletrospray* (MS-ESI) tem-se mostrado uma técnica de grande utilidade no estudo de conformação proteica, dinâmica proteica, interação metal-proteína, bem como outras interações não covalentes (MOINI, 2010). Primeiramente, o tampão proteico foi trocado para bicarbonato de amônio 10 mM pH 8,0 com colunas *Micro Bio-Spin 6 chromatography columns* (Bio-Rad) a 4 °C. Para a análise na qual a cauda de histidina das proteínas foi retirada, as proteínas foram previamente incubadas com 1U/ μ L de trombina humana a 18 °C durante 15 h, e depois realizada a troca de tampão. A concentração final de proteína foi determinada a 280 nm após a troca de tampão como descrito no item 3.2.3. A titulação de metal ($MnCl_2$) foi realizada incubando 2 ou 0,5 μ M de proteína com três concentrações de $MnCl_2$ por 30 min no gelo, antes de injetar no MS-ESI. As análises de ESI-MS da forma apo das proteínas e sob titulação de metal foram determinadas em modo positivo usando um espectrômetro de massa MicrOTOF-Q II (Bruker Daltonics). A calibração do equipamento foi realizada com o kit *ESI-L low concentration tuninig mix* (Agilent). Os espectros de massa foram examinados na faixa de massa entre m/z 300 a 7.000. A fonte ESI foi operada com os seguintes parâmetros: voltagem do capilar, 4 kV; nebulizador, 1 bar; aquecimento, 140 °C; gás seco, 3 L/min. A amostra proteica foi injetada na fonte ESI com uma velocidade de 6 μ L/min usando uma bomba de seringa externa. Os espectros foram obtidos com o programa MicrOTOF control 3.0 e analisados com o programa Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonics).

3.2.10 Análise de calorimetria de titulação isotérmica proteína-metal

Os experimentos de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) foram realizados em um calorímetro VP-ITC (Microcal, GE Healthcare) conforme descrito por Tanoue e colaboradores (2013), com algumas modificações. Para remover qualquer resquício de metal das proteínas purificadas, as proteínas foram dialisadas duas vezes por 1h a 4 °C com o tampão ITC (Tris-HCl 50 mM pH 9,0, NaCl 150 mM, glicerol 10%, β -ME 1 mM) suplementado com EDTA 5 mM. Para retirar o EDTA, as proteínas foram dialisada mais duas vezes durante 1h a 4 °C com o tampão ITC sem EDTA, e por último foi realizada uma diálise por 15h a 4 °C no tampão ITC. Após a diálise a concentração proteica foi determinada a 280 nm como descrito no item 3.2.3. As titulações foram realizadas no tampão ITC, a 20 °C, com 35 injeções e os seguintes parâmetros: uma injeção de 2 μ L (durante 2 segundos) seguida de 34 injeções de 8 μ L (durante 16 segundos cada); um intervalo de 240 ou 300 segundos entre cada injeção; a velocidade de agitação da seringa de 351 rpm; e a potência de referência configurada em 15 μ cal/segundo. O $MnCl_2$ foi dissolvido na concentração desejada com o mesmo tampão de diálise e na hora do uso. Para a análise da ligação do metal com alta afinidade, a proteína (15 μ M) foi titulada na célula de amostra com 35 injeções de $MnCl_2$ 200 μ M. Para a análise da ligação do metal com baixa afinidade, a proteína (15 μ M) com 2 equivalentes de $MnCl_2$ foi titulada na célula de amostra com 35 injeções de $MnCl_2$ 3 mM. O calor de diluição do ligante ($MnCl_2$) no tampão ITC foi mensurado separadamente e os valores subtraídos dos resultados obtidos com a titulação metal-proteína antes da análise dos dados. A primeira injeção de 2 μ L foi omitida da análise final dos resultados. As análises foram realizadas com o programa Origin 7.0 fornecido pelo fabricante. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas.

3.2.11 Alinhamento múltiplo de seqüências e modelagem molecular da PrpC

A seqüência proteica da PrpC foi obtida a partir do banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, número de acesso YP_278254.1) e comparada com a base de dados de seqüências não-redundantes depositadas no NCBI utilizando o algoritmo BLAST (ALTSCHUL et al., 2005). O alinhamento de múltiplas

sequências foi realizado com o programa ClustalW (THOMPSON et al., 1994), sendo que as sequências das três fosfatases PP2C bacterianas utilizadas no alinhamento foram obtidas a partir do banco de dados PDB. A estrutura tridimensional da PrpC foi construída utilizando como modelo de homologia a estrutura de SaSTP de *Streptococcus agalactiae* (código PDB 2PK0), utilizando o programa SWISS-PDB Viewer em combinação com o programa SWISS-MODEL (ARNOLD et al., 2006). A qualidade do modelo gerado pelo SWISS-MODEL foi avaliada através do arquivo PDB gerado para PrpC *versus* o arquivo PDB da proteína modelo usando o programa Dali (HASEGAWA; HOLM, 2009) e SSM (*Secondary Structure Matching*) (KRISSEL; HENRICK, 2004). As figuras foram geradas pelo programa PyMOL (DELANO, 2002).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Homologia entre PrpC e outras fosfatases

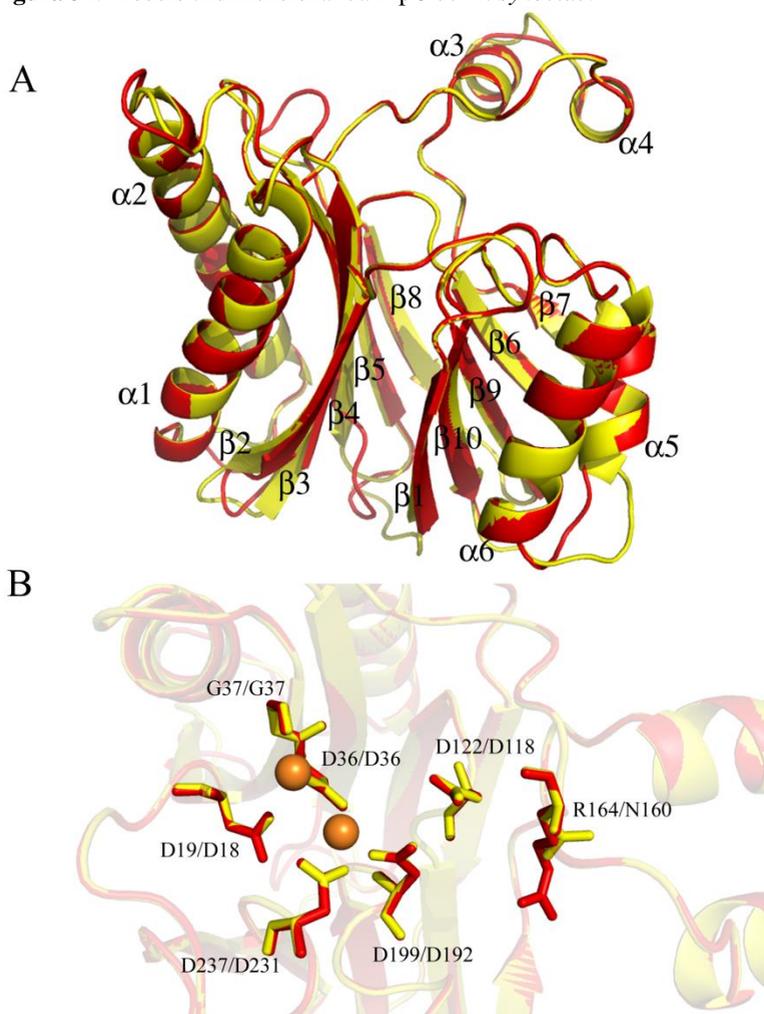
De acordo com o genoma do *M. synoviae* cepa 53, há um único gene anotado como uma proteína fosfatase, classificada como uma proteína serina/treonina fosfatase 2C (PP2C) (VASCONCELOS et al., 2005). O gene *prpC* constitui uma ORF de 747 pb que codifica uma proteína, aqui nomeada como PrpC, de 248 aminoácidos, com uma massa molecular de 28 kDa e um ponto isoeletrico (pI) de 8,25. Como o domínio catalítico das proteínas serina/treonina fosfatases 2C consiste de aproximadamente 290 resíduos de aminoácidos, a análise da sequência aminoacídica sugere que esta ORF codifica apenas um domínio catalítico PP2C, ao contrário de outras proteínas da família que apresentam estruturas mais complexas, como a PP2C α humana, que além do domínio fosfatase possui um domínio C-terminal (DAS et al., 1996; OBUCHOWSKI et al., 2000). A comparação da sequência primária da PrpC com a base de dados de sequências não-redundantes, usando o algoritmo BLAST, revelou similaridade com proteínas fosfatases de procariotos, especialmente espécies gram-positivas. Além disso, a comparação da sequência primária da PrpC com a base de dados do PDB mostrou homologia com fosfatases pertencentes à subfamília PP2C, sendo que a identidade encontrada variou de 25 a 29% (similaridade entre 40 a 50%). Em comparação com a PP2C α , a proteína mais estudada e caracterizada da subfamília PP2C, a PrpC apresentou 25% de identidade e 41% de similaridade sequencial. O alinhamento de múltiplas sequências, com três PP2C bacterianas, revelou a presença dos 11 motivos conservados da subfamília PP2C na sequência primária da PrpC, incluindo o motivo Va e Vb (Figura 30), bem como, 13 dos 15 resíduos de aminoácidos altamente conservados nessa subfamília proteica (BORK et al., 1996). O alinhamento também destacou a conservação dos resíduos de aminoácidos do sítio ativo na sequência da PrpC, incluindo os resíduos de ácido aspártico envolvidos na ligação do terceiro metal ao sítio ativo da proteína.

O modelo estrutural da PrpC construído através de modelagem por homologia, pelo programa SWISS-MODEL (*Automated mode*), baseou-se na estrutura tridimensional da SaSTP de *S. agalactiae* (2PK0 monômero B, SaSTP apresenta 29% de identidade e 51% de similaridade sequencial com a PrpC). O modelo gerado revelou que a PrpC apresenta as características estruturais do domínio catalítico da

Como demonstrado na Figura 31A, existem algumas diferenças entre as duas estruturas. Na base da estrutura da PrpC (lado oposto ao sítio catalítico) as fitas- β 1, β 2, β 3 e β 4 são menores e menos torcidas, além disso, a α -hélice 5 é menos prolongada aproximadamente meia-volta. Por outro lado, podemos observar que no sítio ativo da PrpC (Figure 31B), localizado na parte superior da estrutura β -sanduíche, todos os resíduos de aminoácidos, exceto o resíduo Arg164, apresentaram alto grau de conservação. Portanto, de acordo com o alinhamento entre sequências primárias e o modelo estrutural da PrpC os resíduos Asp19, Asp36 e Gly37 são responsáveis pela coordenação do M1 (primeiro íon metálico) e os resíduos Asp36, Asp199 e Asp237 pela coordenação do M2 (segundo íon metálico) (Figuras 30 e 31). Uma vez que PP2C bacterianas com estruturas tridimensionais resolvidas apresentam um terceiro íon metálico no sítio ativo, buscou-se identificar quais resíduos da PrpC corresponderiam ao terceiro sítio de ligação ao metal. Através do alinhamento de sequências e do modelo estrutural foram identificados dois resíduos estritamente conservados em PrpC que podem compor o sítio de ligação do M3 (terceiro íon metálico), sendo eles os resíduos Asp122 e Asp199 (Figuras 30 e 31). No entanto, o terceiro resíduo envolvido na coordenação do M3 em PstP de *M. tuberculosis* (PULLEN et al., 2004) e MspP de *Mycobacterium smegmatis* (BELLINZONI et al., 2007), equivalente ao resíduo Arg164 em PrpC, apresentou alto grau de variabilidade entre as sequências primárias analisadas. Como pode ser visualizado na figura 30, resíduos de Arg, His, Ser e Asn são encontrados nessa posição entre proteínas homólogas.

A estrutura cristalina de SaSTP de *S. agalactiae* (2PK0) depositada no PDB contém quatro monômeros em duas conformações distintas, sendo as principais diferenças entre eles: a conformação do subdomínio Flap e o conteúdo de íons metálicos no sítio ativo (RANTANEN et al., 2007). O modelo de homologia estrutural da PrpC foi construído automaticamente pelo programa SWISS-MODEL utilizando como molde o monômero B de SaSTP, o qual apresenta apenas dois íon metálicos no sítio ativo, similar ao monômero A. Por outro lado, nos outros dois monômeros, C e D, o subdomínio Flap encontra-se mais afastado do núcleo catalítico, e assim, favorecendo a ligação do M3 ao sítio ativo. Os resíduos Asp118 e Asp192 e quatro moléculas de água são responsáveis pela coordenação do M3 nos monômeros C e D (RANTANEN et al., 2007).

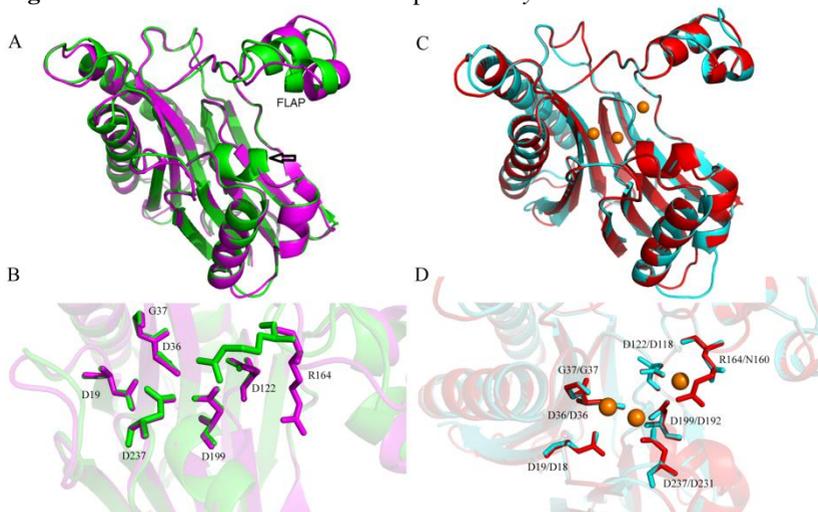
Figura 31. Modelo tridimensional da PrpC de *M. synoviae*.



A modelagem molecular foi construída a partir da estrutura da SaSTP de *S. agalactiae* (2PK0B) usando o programa SWISS-MODEL. (A) Sobreposição da estrutura da PrpC (vermelho) e SaSTP (amarelo). (B) Sobreposição do sítio catalítico da PrpC (vermelho) e SaSTP (amarelo). As varetas representam os resíduos conservados do sítio do M1 e M2 (PrpC Asp19, Asp36, Gly37, Asp199 e Asp237) e o possível sítio do M3 (PrpC Asp122, Asp199 e Arg164). Os íons Mn²⁺ 1 e 2 estão representados com esferas. A sobreposição das estruturas e as figura foram gerada com o programa PyMOL.

O modelo estrutural da PrpC construído, especificamente, a partir da estrutura tridimensional da SaSTP monômero C de *S. agalactiae* usando o programa SWISS-MODEL apresenta um valor de RMSD de 1,3 Å usando o programa Dali (HASEGAWA; HOLM, 2009) e 0,93 Å usando o programa SSM (KRISSEL; HENRICK, 2004) quando comparado ao modelo construído a partir do monômero B (Figura 32). As principais diferenças entre os dois modelos da PrpC são a conformação do subdomínio Flap e a presença de uma α -hélice adicional após a fita- β 9 no modelo de homologia ao monômero C. Devido ao rearranjo da conformação do subdomínio Flap no modelo estrutural da PrpC baseado na estrutura do monômero C da SaSTP, observa-se uma mudança significativa na posição do resíduo Arg164, o qual está mais próximo ao sítio ativo da enzima.

Figura 32. Modelo tridimensional da PrpC de *M. synoviae*.



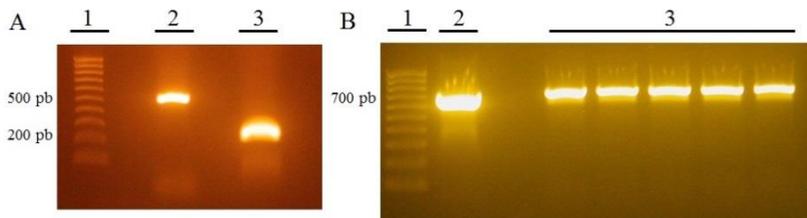
A modelagem molecular foi construída a partir da estrutura da SaSTP monômero C de *S. agalactiae* (2PK0C) usando o programa SWISS-MODEL. (A) Sobreposição da estrutura da PrpC baseada no monômero B (magenta) e no monômero C (verde). Principais diferenças: Flap e α -hélice adicional (flecha) (B) Sobreposição do sítio catalítico dos dois modelos da PrpC (a partir do monômero B em magenta e do monômero C em verde). (C) Sobreposição da estrutura da PrpC (vermelho) e SaSTP monômero C (turquesa). A sobreposição das estruturas usando o programa Dali e SSM revelou um RMSD de 0,8 Å e 1,08 Å, respectivamente. (D) Sobreposição do sítio catalítico da PrpC (vermelho) e SaSTP (turquesa). As varetas representam os resíduos conservados do sítio do M1 e M2 (PrpC Asp19, Asp36, Gly37, Asp199 e Asp237) e o

possível sítio do M3 (PrpC Asp122, Asp199 e Arg164). Os três íons de Mn^{2+} estão representados com esferas. A sobreposição das estruturas e as figura foram geradas com o programa PyMOL.

3.3.2 Clonagem e mutação sítio-dirigida da PrpC

Para determinar se o gene *prpC* codifica uma proteína fosfatase funcional, a sua ORF foi amplificada por PCR a partir do DNA genômico do *M. synoviae* cepa 53. Inicialmente, foi realizada uma mutação sítio-dirigida para substituir o códon TGA pelo TGG (como descrito na metodologia). O fragmento gênico de *prpC* foi amplificado com dois grupos de iniciadores, gerando dois fragmentos: A com 246 pb e B com 522 pb (Figura 33A). Posteriormente, foi realizada uma PCR para unir os fragmentos A e B, gerando a sequência completa do fragmento gênico de *prpC*, o qual possui 768 pb (Figura 33B).

Figura 33. Amplificação do gene *prpC* de *M. synoviae*.

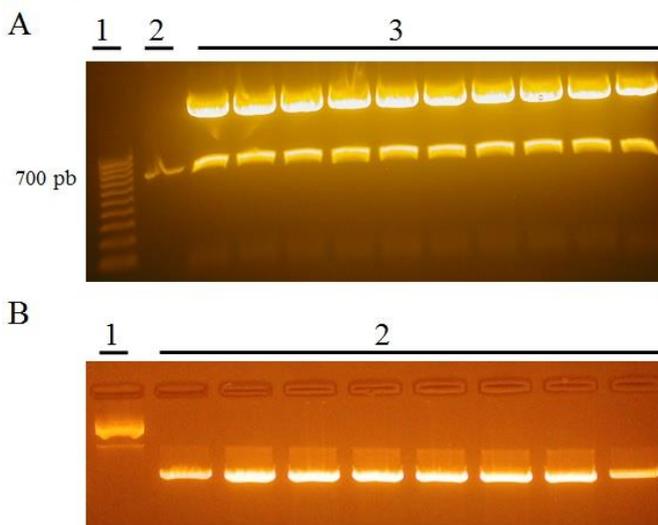


(A) Mutação sítio-dirigida da PrpC W74. 1, marcador de massa molecular. 2, fragmento B, 522 pb. 3, fragmento A, 246 pb. (B) União dos fragmentos da mutação-sítio dirigida. 1, marcador de massa molecular. 2, fragmento selvagem (controle positivo). 3, fragmento mutado, união de A e B, 768 pb. Eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio. Géis representativos de experimentos realizados em duplicata.

Após a ligação do fragmento gênico ao vetor pGEM T-*easy*, através das suas adeninas livres nas extremidades 5' complementares às timidinas livres nas extremidades 3' do pGEM, este foi digerido com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*. O fragmento gênico digerido, contendo extremidades coesivas, foi clonado no vetor pET-14b digerido com as mesmas enzimas de restrição (Figura 34). Após a clonagem, o pET-14b-PrpC foi usado para transformar bactérias *E. coli* DH5 α , e a partir das colônias recombinantes foi realizada uma reação de PCR diretamente das colônias transformadas. Os fragmentos amplificados apresentaram aproximadamente 768 pb que correspondem ao fragmento

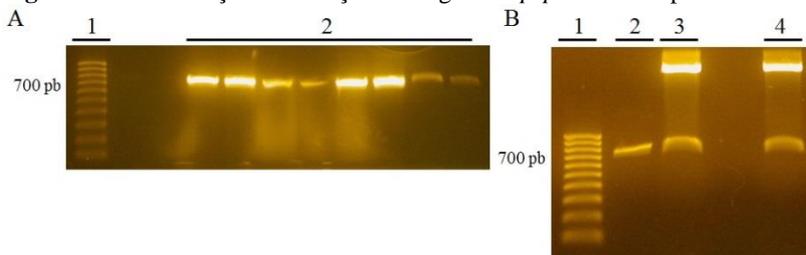
do gene inserido ao vetor pET-14b (Figura 35A). As colônias positivas foram cultivadas em meio LB para realizar a extração dos plasmídeos contendo o inserto de interesse. Após a extração, os plasmídeos foram digeridos com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* para averiguar se os fragmentos de *prpC* estavam inseridos nos vetores. A digestão liberou um fragmento de aproximadamente 768 pb de acordo ao esperado (Figura 35B). Os plasmídeos foram sequenciados e foi confirmada a presença do gene que codifica a PrpC, bem como a troca do códon TGA pelo TGG.

Figura 34. Digestão dos plasmídeos com as enzimas *NdeI* e *BamHI*.



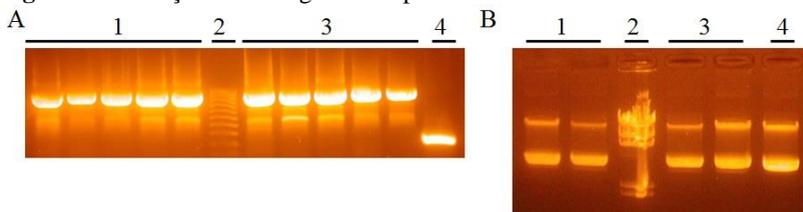
(A) Digestão do pGEM-PrpC. 1, marcador de massa molecular. 2, inserto controle (768 pb), 3, plasmídeo digerido. (B) Digestão do pET-14b íntegro. 1, plasmídeo não digerido. 2, plasmídeo digerido. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. Géis representativos de experimentos realizados em triplicata.

Figura 35. Confirmação da inserção do fragmento *prpC* no vetor pET-14b.



(A) PCR de colônias de *E. coli* DH5 α transformadas com o vetor pET-14b-PrpC. 1, marcador de massa molecular. 2, PCR das colônias - amplificação do fragmento que codifica PrpC. (B) Digestão do pET-14b-PrpC com as enzimas *NdeI* e *Bam*HI. 1, marcador de massa molecular. 2, inserto controle (768 pb). 3 e 4, plasmídeos digeridos - fragmento de 768 pb liberado após a clivagem. Eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio. Géis representativos de experimentos realizados em duplicata.

Para investigar os resíduos envolvidos na ligação do terceiro metal ao sítio ativo da PrpC, os resíduos Asp122 e Arg164, correspondentes à Ser160 e ao Asp118 da PstP de *M. tuberculosis* (PULLEN et al., 2004) foram substituídos por um resíduo de alanina. Os plasmídeos mutantes, PrpC_D122A e PrpC_R164A, foram construídos através de mutação sítio-dirigida, com o uso do kit *QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent), e transformados em bactérias *E. coli* XL10-Gold (fornecidas juntamente com o kit). As colônias recombinantes foram selecionadas e submetidas a uma reação de PCR, usando os iniciadores T7 5' e 3', para verificar a presença do inserto (Figura 36A). As colônias positivas foram cultivadas em meio LB para realizar a extração dos plasmídeos. Os plasmídeos obtidos apresentaram um tamanho correspondente ao tamanho do vetor pET-14b-PrpC (5.439 pb) (Figura 36B). A sequência do inserto em cada plasmídeo foi avaliada por meio de sequenciamento de DNA, confirmando pelo menos um plasmídeo contendo a mutação D122A ou a mutação R164A em PrpC.

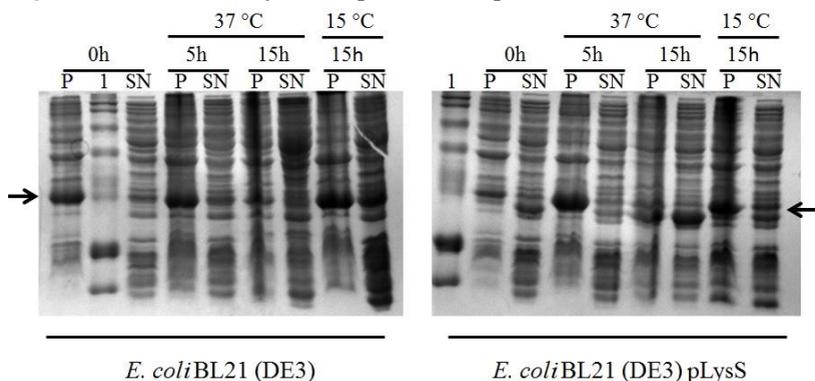
Figura 36. Mutação sítio-dirigida da PrpC.

(A). PCR de colônias de *E. coli* XL10-Gold transformadas com o produto de PCR. 1, PCR das colônias - amplificação do fragmento que codifica PrpC_D122A (976 pb). 2, marcador de massa molecular, 3, PCR das colônias - amplificação do fragmento que codifica PrpC_R164A (976 pb). 4, controle da PCR, pET-14b íntegro (208 pb). (B) Extração dos plasmídeos mutados após propagação em bactérias *E. coli* XL10-Gold. 1, pET-14b-PrpC_D122A. 2, marcador de massa molecular. 3, pET-14b-PrpC_R164A. 4, pET-14b-PrpC. Eletroforese em gel de agarose (A) 1,2 e (B) 0,8% corado com brometo de etídio.

3.3.3 Teste de indução da expressão da PrpC

O vetor pET-14b-PrpC foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* BL21(DE3) e *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, sendo a indução da expressão da proteína heteróloga realizada a 15 e 37 °C, por 5 e 15 h, com IPTG 1 mM. Segundo o teste de indução, a PrpC, foi expressa na fração insolúvel do lisado bacteriano em todas as condições de expressão, banda correspondente a 30 kDa (Figura 37). Entretanto, esse resultado não se repetiu nas expressões seguintes, nas quais a proteína foi expressa em grande maioria na fração solúvel. Provavelmente, esse resultado se deve a um problema durante o processo de lise bacteriana. Pôde-se observar na figura 37 que a PrpC foi expressa em maior quantidade em cepas *E. coli* BL21 (DE3) do que em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS e que a temperatura ótima de expressão foi 15 °C durante 15 horas.

Figura 37. Teste de indução da expressão da PrpC.



Gel SDS-PAGE 10%. 10 μ L de cada amostra foram aplicados em cada canaleta. 1, marcador de massa molecular. P, *pellet* – fração insolúvel do lisado bacteriano ressolubilizado com 2% de SDS. SN, sobrenadante, fração solúvel do lisado bacteriano. A seta indica a posição correspondente à PrpC (aproximadamente 30 kDa).

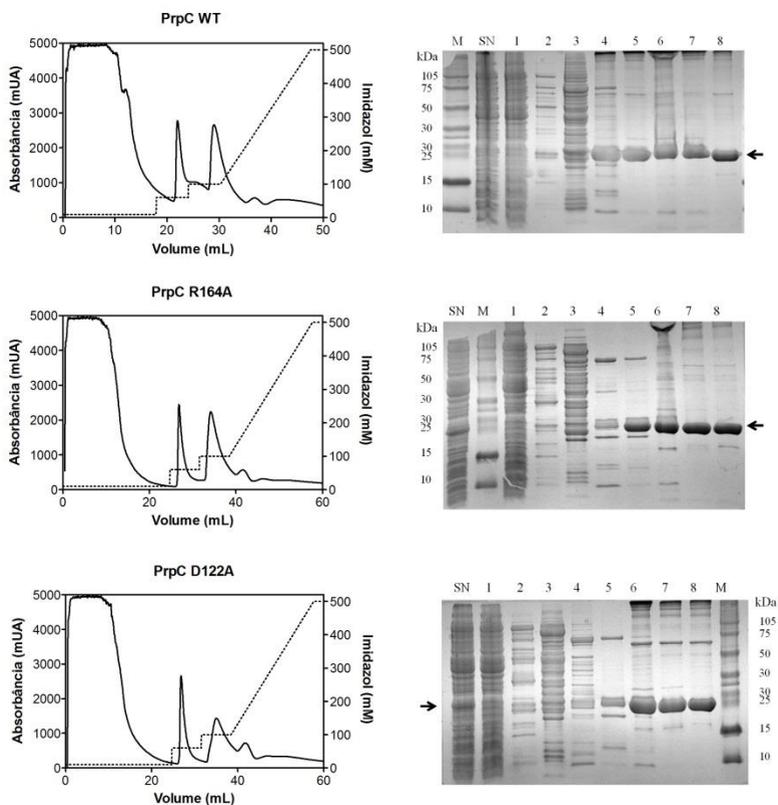
3.3.4 Expressão e purificação da PrpC e suas mutantes

A proteína PrpC de *M. synoviae* e suas mutantes foram expressas em *E. coli* BL21(DE3) a partir dos vetores de expressão pET-14b-PrpC, pET-14b-PrpC_D122A e pET-14b-PrpC_R164A. As células transformadas de *E. coli* BL21(DE3) foram cultivadas em meio LB suplementado com ampicilina até alcançarem o crescimento exponencial, a indução da expressão proteica aconteceu a 15 °C por 15 h com IPTG 1 mM. Uma vez que o vetor pET-14b confere uma sequência N-terminal de 6 His, as proteínas recombinantes, contidas na fração solúvel bacteriana, foram purificadas por IMAC, sendo o níquel o metal utilizado. As proteínas PrpC WT (massa teórica de 30.167 Da), PrpC_D122A (massa teórica de 30.123 Da) e PrpC_R164A (massa teórica de 30.082 Da) foram eluídas com concentração crescente de imidazol 60 mM a 250 mM e as eluições analisadas em gel SDS-PAGE 10% (Figura 38). O rendimento final de cada purificação foi de aproximadamente 13 mg de proteína por litro de cultivo para PrpC WT, 12 mg para a PrpC_R164A e 9 mg para a PrpC_D122A.

As frações contendo as proteínas recombinantes purificadas por IMAC foram reunidas e submetidas à cromatografia de exclusão molecular no intuito de completar a purificação e avaliar o estado oligomérico da PrpC. O resultado mostra que a PrpC foi eluída em

aproximadamente 93 mL, similar ao volume de eluição da anidrase carbônica (92 mL, 29 kDa). Este resultado indica que a PrpC é um monômero de aproximadamente 29 kDa (Figura 39). Este resultado está de acordo com os resultados observados para outras fosfatases PP2C (ARIÑO et al., 2011).

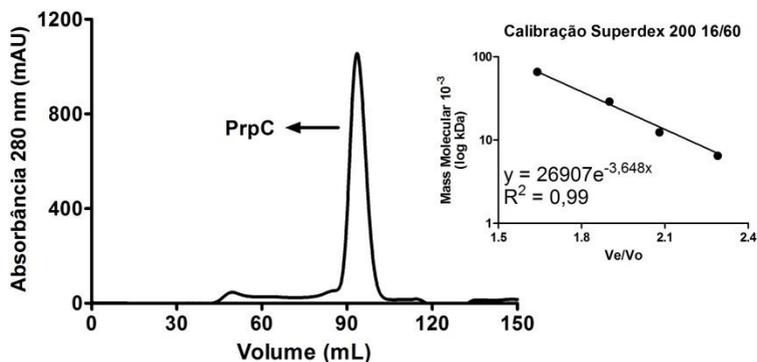
Figura 38. Purificação da PrpC e mutantes.



À esquerda, gráfico da eluição das proteínas com concentrações crescentes de imidazol. No eixo das ordenadas esquerdo está representada a absorvância a 280 nm (linha cheia) de cada volume de eluição. No eixo das ordenadas direito está representada a concentração de imidazol (mM) em cada volume de eluição (linha pontilhada): O primeiro passo corresponde a 20 mM, o segundo passo a 60 mM, o terceiro passo a 100 mM e o quarto passo de 100 a 500 mM de imidazol. À direita, SDS-PAGE 10% da purificação das proteínas. 15 μ L de cada amostra foram aplicados em cada canaleta. M, marcador de massa

molecular. SN, fração solúvel do lisado bacteriano. 1-8, frações eluídas coletadas. 1 e 2, eluição com 10 mM de imidazol. 3 e 4, eluição com 60 mM de imidazol. 5, 6 e 7, eluição com 100 mM de imidazol. 8, eluição com 250 mM de imidazol. Gráficos e géis representativos de experimentos realizados em sextuplicata.

Figura 39. Gráfico de cromatografia de exclusão molecular da PrpC.

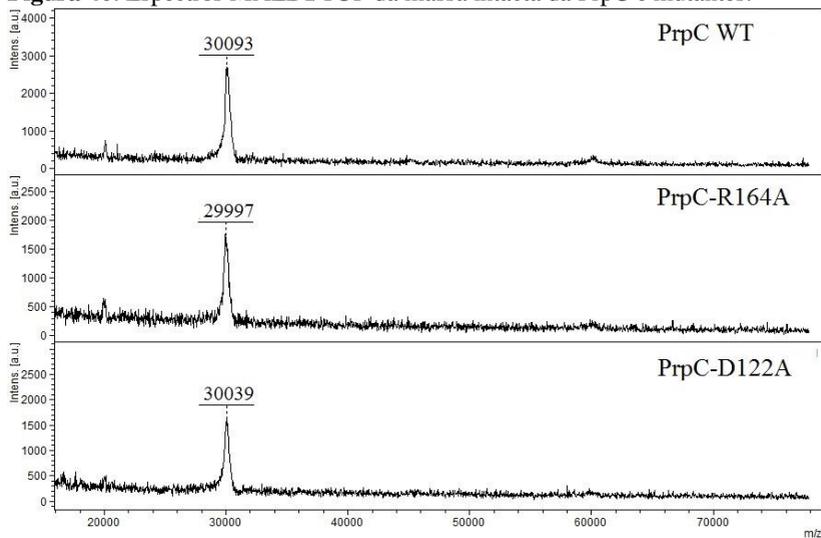


A análise foi realizada com a coluna Superdex 200 16/60 como descrito em materiais e métodos. O volume de eluição da PrpC foi de aproximadamente 93 mL. Gráfico representativo de experimentos realizados em sextuplicata. A coluna foi previamente calibrada com azul de dextrano (2000 kDa), Albumina (66 kDa), Anidrase carbônica (29 kDa), Citocromo C (12,4 kDa) e Aprotinina (6,5 kDa). Inserto: Curva padrão da calibração da coluna Superdex 200 16/60. As proteínas PrpC_D122A e PrpC_R164A apresentaram o mesmo perfil cromatográfico da PrpC WT.

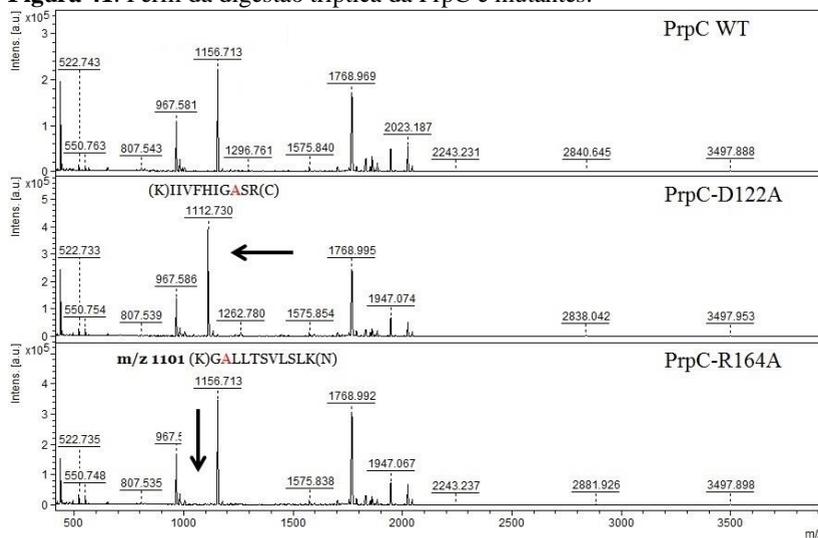
A identidade da proteína PrpC WT, PrpC_D122A e PrpC_R164A foi confirmada por espectrometria de massa MALDI-TOF, avaliando a massa intacta das proteínas, bem como os peptídeos trípticos gerados através da digestão enzimática realizada pela tripsina. Como podemos observar no espectro de massa intacta (Figura 40), a proteína WT apresentou uma massa de 30.093 Da, a PrpC_D122A apresentou uma massa de 30.039 Da e a PrpC_R164A apresentou uma massa de 29.997 Da. Esses valores estão de acordo com a massa teórica sem a metionina N-terminal (WT 30.036 Da, D122A 29.992 Da e R164A 29.951 Da) (XIAO et al., 2010). Através da análise do perfil da digestão tríptica das proteínas, o *peptide mass fingerprinting* (PMF), foi confirmada a cobertura de aproximadamente 86% da sequência de aminoácidos das

proteínas, incluindo os peptídeos que contém a mutação D122A m/z 1112 e R164A m/z 1101 (Figura 41).

Figura 40. Espectros MALDI/TOF da massa intacta da PrpC e mutantes.



Eixos: intensidade [a.u.] versus m/z . A massa observada para cada proteína está rerepresentada em Daltons. Massa teórica das proteínas sem a metionina N-terminal (XIAO et al., 2010): PrpC WT: 30.036 Da; PrpC_D122A: 29.992 Da; e PrpC_R164A: 29.951 Da. Espectros representativos de experimentos realizados em duplicata.

Figura 41. Perfil da digestão triptica da PrpC e mutantes.

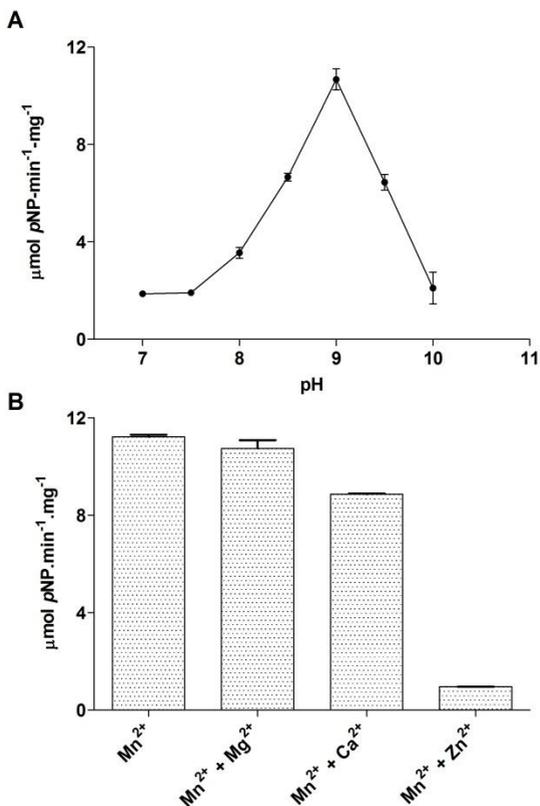
GSSHHHHHSSGLVPRGSHMISLKSISITGAYRKKNDDRVSHFENDDFLV
ALVCDGMGGHLHGDIAAEETAKIFTNQFSKNFSYISFQETSLWLKNVVN
LVK~~K~~R~~F~~K~~D~~L~~I~~K~~S~~DFSKERM~~G~~T~~T~~L~~T~~G~~V~~L~~L~~K~~K~~I~~O~~K~~I~~I~~V~~F~~H~~I~~G~~D~~S~~R~~C~~Y~~F~~Y~~T~~K~~E~~
KKLVQITQDHSYENKLLSAGISLEEAKSNPKGRLLTSVLSLKNK~~I~~T~~F~~N~~I~~Y~~D~~
LD~~O~~I~~D~~Y~~A~~K~~V~~D~~K~~I~~L~~T~~S~~D~~G~~A~~H~~E~~F~~I~~S~~S~~E~~E~~F~~K~~A~~E~~L~~K~~S~~S~~S~~S~~E~~K~~I~~V~~N~~S~~L~~V~~E~~I~~A~~O~~K~~N~~D~~
STDNISCIVIKLGE

Painel superior, espectros MALDI/TOF do conjunto de peptídeos das proteínas após a digestão com tripsina. Eixos: intensidade [a.u] versus m/z . A sequência de aminoácidos e as setas correspondem aos peptídeos nos quais encontramos as mutações. m/z 1.112 (K)IIVFHIG~~A~~SR(C) e m/z 1.101 (K)~~G~~ALLTSVLSLK(N). O peptídeo m/z 1.101 possui uma intensidade de 4.000 a.u., sendo visualizado somente pela ampliação do espectro PrpC-R164A. Painel inferior, cobertura da sequência de aminoácidos da PrpC WT. Os resíduos de aminoácidos encontrados através do PMF estão destacados em negrito e sublinhados. Número de acesso do NCBI: YP_278254. Espectros representativos de experimentos realizados em duplicata.

3.3.5 Ensaios de atividade enzimática da PrpC

Uma vez que a proteína PrpC é predita, segundo o genoma, como membro da família PPM, primeiramente testou-se a atividade enzimática da mesma na presença de $MnCl_2$ ou $MgCl_2$, em diferentes valores de pH, usando o substrato artificial *p*NPP. Os resultados obtidos

mostram que a PrpC foi capaz de desfosforilar o *p*NPP com um pH ótimo de 9,0 a 30 °C e que sua atividade foi estritamente dependente de íons Mn^{2+} (Figura 42A), visto que na presença de íons Mg^{2+} a PrpC não apresentou atividade enzimática sobre o *p*NPP (dados não mostrados). O fato da PrpC apresentar atividade apenas na presença de íons Mn^{2+} é contrastante com a maioria dos resultados obtidos para essa família de proteínas, pois grande parte delas apresenta atividade enzimática com ambos os metais ($MnCl_2$ e $MgCl_2$). Com o objetivo de avaliar o efeito de outros metais divalentes na atividade enzimática da PrpC, os ensaios de atividade foram realizados primeiramente somente na presença de $CaCl_2$ 1mM, $CuSO_4$ 1mM, $NiCl_2$ 1mM e $ZnSO_4$ 1mM, e posteriormente em combinação com $MnCl_2$: $MnCl_2$ 1mM mais $MgCl_2$ 1mM ou $MnCl_2$ 1mM mais $CaCl_2$ 1mM ou $MnCl_2$ 1mM mais $ZnSO_4$ 1mM. No entanto, na presença de apenas $CaCl_2$, $CuSO_4$, $NiCl_2$ e $ZnSO_4$ a PrpC não apresentou atividade enzimática sobre o *p*NPP (dados não mostrados). Por outro lado, quando o $MnCl_2$ foi combinado com outros íons metálicos, o $CaCl_2$ e o $ZnSO_4$ demonstraram um efeito inibitório sobre a atividade da PrpC, aproximadamente 20 e 90% de inibição, respectivamente (Figura 42B), quando comparados ao resultado da atividade enzimática na presença de $MnCl_2$ 1mM. Esses dados corroboram os resultados relatados para a PrpC de *Bacillus subtilis*, uma vez que a atividade da PrpC foi significativamente inibida por íons de Ca^{2+} e Zn^{2+} (OBUCHOWSKI et al., 2000), assim como para a PP2C α humana, onde na presença de íons de Ca^{2+} e Zn^{2+} não foi detectada atividade enzimática sobre o *p*NPP. Além disso, esses íons foram capazes de inibir a enzima de modo competitivo (Mn^{2+} como substrato metálico), com K_i de $4,45 \pm 0,54$ mM para o íon Ca^{2+} e de $12 \pm 1,8$ μ M para o íon Zn^{2+} (FJELD; DENU, 1999).

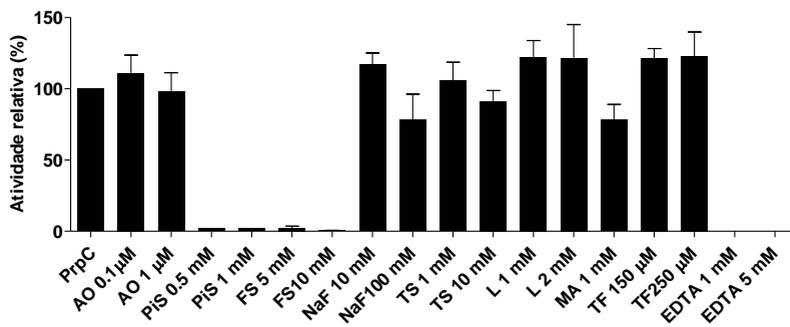
Figura 42. Atividade enzimática da PrpC.

Os ensaios de atividade foram realizados a 30 °C com 150 nM de proteína. (A) Influência do pH sobre a atividade enzimática da PrpC foi avaliada em Tris-HCl 20 mM (pH 7,0 - 9,0), HEPES 20 mM (pH 7,0 - 8,0) e CHES 20 mM (pH 9,0 - 10,0), contendo NaCl 50 mM, DTT 1 mM, pNPP 10 mM e MnCl_2 1 mM. (B) Efeito de íons divalentes sobre a atividade enzimática da PrpC. Os ensaios de atividade foram realizados em CHES 20 mM pH 9,0 com MnCl_2 1 mM (controle: primeira barra) e com MnCl_2 1 mM mais MgCl_2 1 mM ou mais CaCl_2 1 mM ou mais ZnSO_4 1 mM. Os dados representam a média \pm DP de três experimentos independentes.

A propriedade da PrpC como um membro da família PPM foi, adicionalmente, confirmada avaliando o efeito de diversos compostos inibidores de fosfatases (LAI; MOUAL, 2005) frente à atividade

enzimática da PrpC (Figura 43). O primeiro inibidor avaliado foi o ácido ocadáico, um inibidor clássico de proteínas PP1A e PP2A da família PPP. Como podemos observar na figura 43, ele não apresentou atividade inibitória sobre a atividade enzimática da PrpC. O mesmo resultado foi observado para a trifluoroperazina, um inibidor de proteínas PP2B, o levamisol, um inibidor de fosfatases alcalinas, e o tartarato de sódio, um inibidor de fosfatases ácidas. Por outro lado, a atividade enzimática da PrpC foi consideravelmente inibida na presença de inibidores não específicos de fosfatases como: pirofosfato de sódio e fosfato de sódio. A atividade da PrpC foi moderadamente inibida na presença de fluoreto de sódio (25% a 100 mM), um inibidor de serina/treonina fosfatases e fosfatases ácidas, e de molibdato de amônio (25% a 1 mM), um inibidor de PTPs e fosfatases ácidas. A inibição total da atividade enzimática da PrpC foi observada com o EDTA, um composto quelante de íons metálicos, sendo usado como um inibidor de metaloproteínas.

Figura 43. Efeito de inibidores de fosfatases sobre a atividade enzimática da PrpC.



Os ensaios de atividade foram realizados em CHES 20 mM pH 9,0, NaCl 50 mM, DTT 1 mM com *p*NPP 10 mM, MnCl₂ 1 mM, 150 nM de enzima e o inibidor a 30 °C. Os resultados estão apresentados como porcentagem de atividade relativa (comparado a uma reação na ausência de inibidor: primeira barra). AO – ácido ocadáico, PiS – pirofosfato de sódio, FS – fosfato de sódio, NaF- fluoreto de sódio, TS - tartarato de sódio, L – levamisol, MA – molibdato de amônio, TF – trifluoroperazina. Os dados representam a média e ± DP de dois experimentos independentes.

Em seguida, a atividade enzimática da PrpC foi investigada usando fosfopeptídeos como substrato. Os fosfopeptídeos analisados foram: fosfotreonina KR(pT)IRR e RRA(pT)VA, fosfoserina RRA(pS)VA e fosfotirosina RRLIEDAE(pY)AARG. A atividade

enzimática da PrpC frente aos fosfopeptídeos foi dependente de íons Mn^{2+} , na presença de íons Mg^{2+} a proteína não apresentou atividade, e a atividade ótima foi observada a pH 9,0, como visto anteriormente para o pNPP. Na presença de $MnCl_2$ 1 mM a PrpC foi capaz de desfosforilar os quatro fosfopeptídeos avaliados (Tabela 17), incluindo o resíduo de fosfotirosina, o qual não é um substrato comum da subfamília PP2C, porém a atividade sobre fosfotirosina já foi descrita para a PrpZ de *Salmonella enterica* serovar Typhi e a PphA de *Synechocystis* PCC 6803 (LAI; MOUAL, 2005). Como podemos observar na tabela 17, a hidrólise do grupo fosfato foi mais evidente para o fosfopeptídeo RRA(pT)VA. Frequentemente, proteínas PP2C exibem preferência por substratos fosforilados em resíduos de treonina em vez de serina (LAI; MOUAL, 2005). Como descrito para a PrpC da *S. enterica* serovar Typhi (LAI; MOUAL, 2005) e para a tPphA de *T. elongatus* (SU et al., 2011).

Tabela 17. Atividade enzimática da PrpC sobre fosfopeptídeos

	KR(pT)IRR	RRA(pT)VA	RRA(pS)VA	RRLIEDAE(pY)AARG
PrpC	0,79 ± 0,05	61,2 ± 10,6	17,6 ± 1,4	27,05 ± 3,3

A atividade específica está representada em $nmol P_i \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$. Os dados representam a média ± DP de três experimentos independentes.

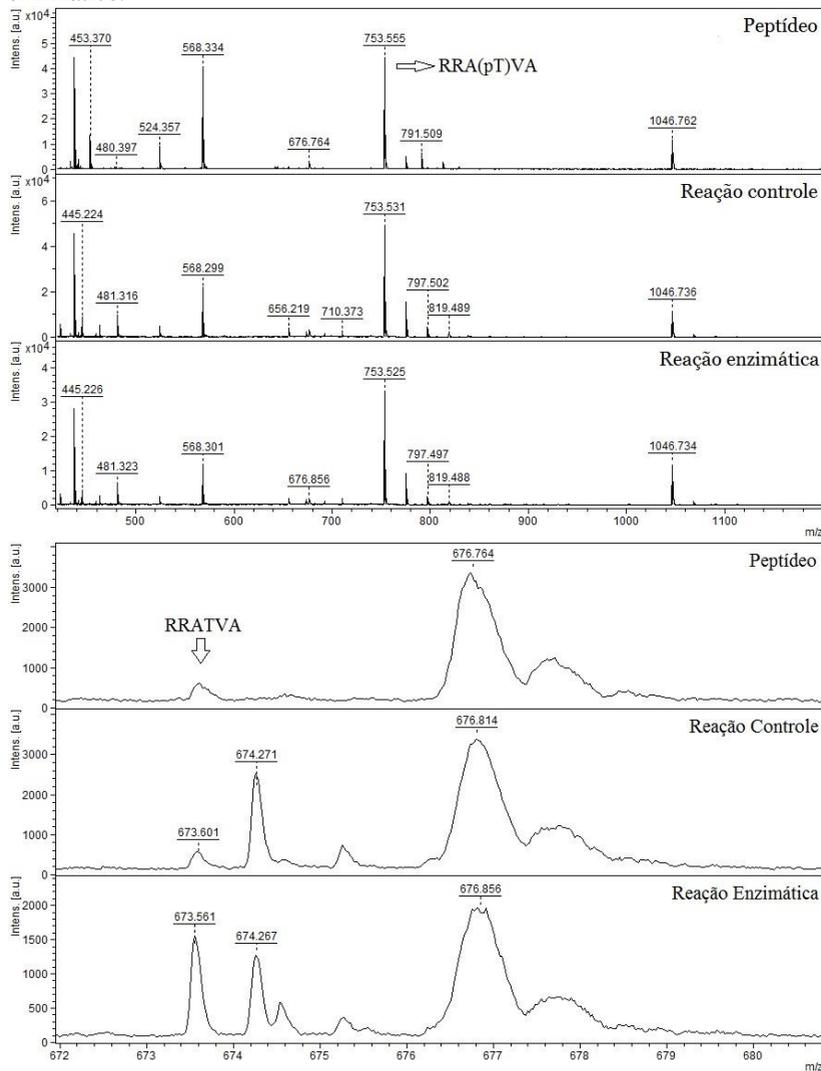
No entanto, pôde-se observar que apesar da PrpC preferir o resíduo de fosfotreonina como substrato, a atividade sobre o fosfopeptídeo RRA(pT)VA foi significativamente maior quando comparada a atividade sobre o fosfopeptídeo KR(pT)IRR. Essa diferença sugere que a PrpC foi capaz de distinguir entre dois peptídeos diferentes fosforilados no mesmo resíduo e que ela prefere um ambiente mais hidrofóbico para realizar a hidrólise do grupo fosfato. Deana e colaboradores (1990) relataram um comportamento similar para a PP2C₂, dentre os fosfopeptídeo avaliados a proteína apresentou atividade sobre RRA(pT)VA, RRP(pT)VA e RR(pS)(pT)VA, sendo o RRA(pT)VA substrato mais efetivo. Enquanto que com os substratos RRA(pT)PA, RRP(pT)PA e RRREEE(pT)EEEEAA a PP2C₂ não apresentou atividade enzimática (DEANA et al., 1990).

Além de avaliar a hidrólise do grupo fosfato dos fosfopeptídeos por meios espectrofotométricos, a capacidade da PrpC para desfosforilar os quatro fosfopeptídeos também foi analisada por MS-MALDI/TOF. O ensaio de atividade enzimática foi realizado em CHES 20 mM pH 9,0, NaCl 50 mM, $MnCl_2$ 1 mM, 150 nM de enzima e 200 μ M de cada fosfopeptídeo durante 10 min a 30 °C. Após 10 min de hidrólise, 2 μ L

da reação enzimática ou da reação controle (sem enzima) foi homogeneizada com uma solução saturada de matriz ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico. Um controle adicional foi realizado com uma alíquota do estoque dos fosfopeptídeos, sendo o espectro do produto de síntese dos fosfopeptídeos (sem nenhum tratamento). Angiotensina II ($[M+H]^+$ 1046.54) a 0,1 pmol/ μ L foi adicionada as amostras como um controle interno de intensidade.

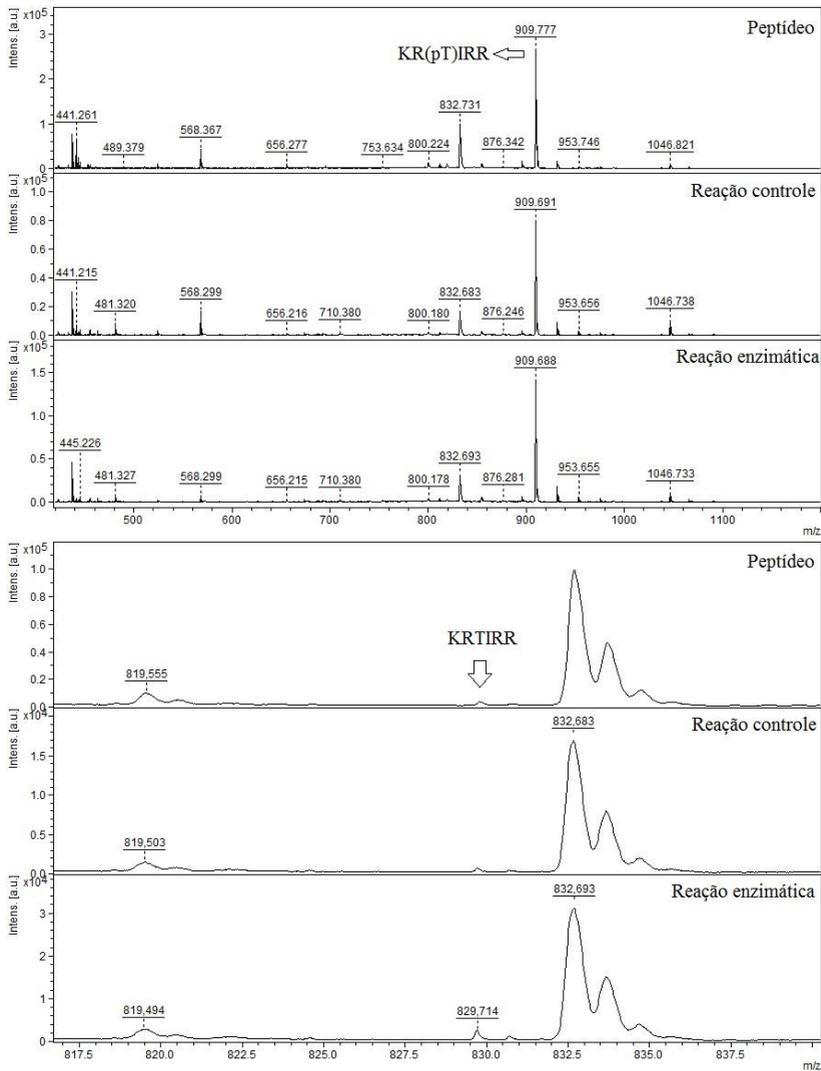
Comparando o espectro de massa da reação controle com o da reação na presença da PrpC (reação enzimática) pôde-se observar um aumento de intensidade de peptídeos com uma diferença de massa de 80 Da em relação aos quatro fosfopeptídeos analisados (Figuras 44 a 47). No ensaio de desfosforilação do fosfopeptídeos RRA(pT)VA as diferenças de intensidade entre o fosfopeptídeo RRA(pT)VA (m/z 753,5) e o peptídeo RRATVA (m/z 673) foram as seguintes: no espectro peptídeo de 44.409 e 621 a.u.; no espectro controle de 49.110 e 569 a.u.; e no espectro da reação enzimática de 33.158 e 1.559 a.u. (Figura 44). No ensaio de desfosforilação dos fosfopeptídeos KR(pT)IRR as diferenças de intensidade entre o fosfopeptídeo KR(pT)IRR (m/z 909) e o peptídeo KRTIRR (m/z 829) foram as seguintes: no espectro peptídeo de 266.639 e 3.757 a.u.; no espectro controle de 79.334 e 665 a.u.; e no espectro da reação enzimática de 141.358 e 2.533 a.u. (Figura 45). No ensaio de desfosforilação dos fosfopeptídeos RRA(pS)VA as diferenças de intensidade entre o fosfopeptídeo RRA(pS)VA (m/z 739,5) e o peptídeo RRASVA (m/z 659,5) foram as seguintes: no espectro peptídeo de 44.981 e 613 a.u.; no espectro controle de 298.584 e 5.308 a.u.; e no espectro da reação enzimática de 114.807 e 6.126 a.u. (Figura 46). No ensaio de desfosforilação dos fosfopeptídeos RRLIEDAE(pY)AARG as diferenças de intensidade entre o fosfopeptídeo RRLIEDAE(pY)AARG (m/z 1.600) e o peptídeo RRLIEDAEYAARG (m/z 1.520) foram as seguintes: no espectro peptídeo de 54.046 e 619 a.u.; no espectro controle de 100.291 e 1.857 a.u.; e no espectro da reação enzimática de 103.114 e 12.686 a.u. (Figura 47). Em conjunto, esses dados corroboram os resultados de atividade enzimática.

Figura 44. Espectro MALDI/TOF do peptídeo RRA(pT)VA após ensaio enzimático.



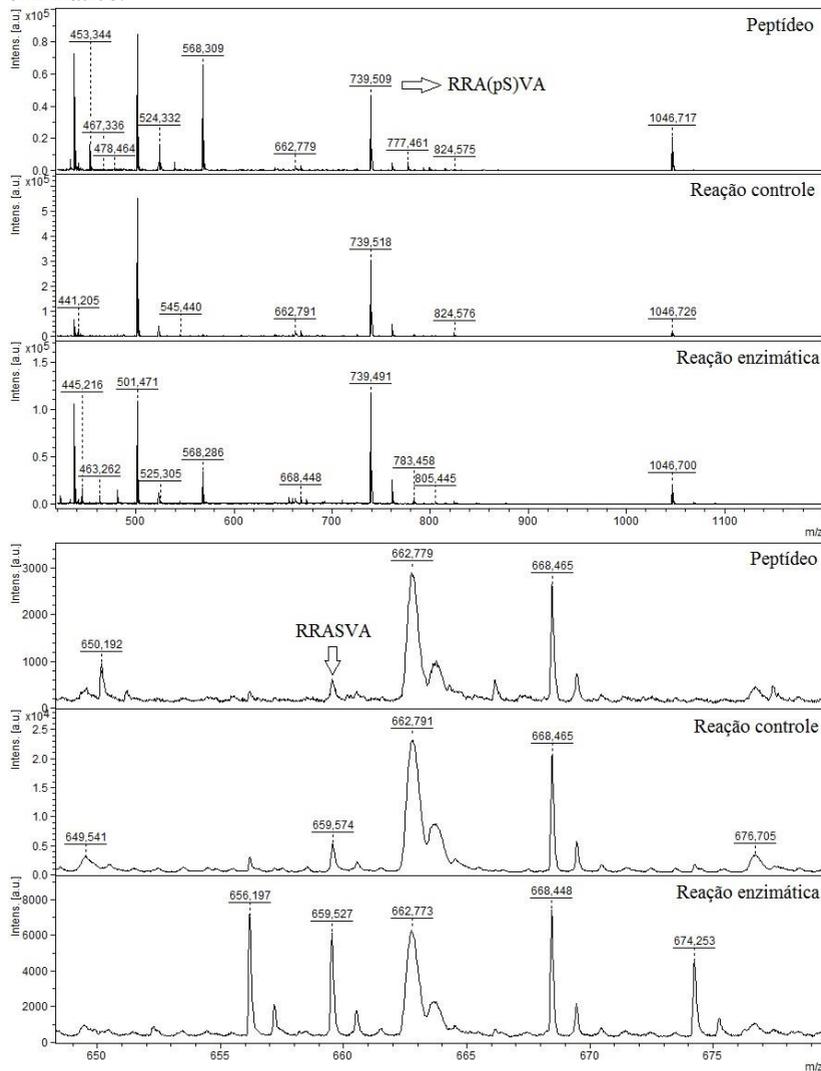
Eixos: intensidade [a.u.] versus m/z . Pannel superior, espectro total do ensaio de desfosforilação de RRA(pT)VA (flecha). Pannel inferior, visão ampliada do espectro de RRA(pT)VA. Os picos m/z 753,5 e 673 representam os peptídeos RRA(pT)VA e RRATVA (flechas), respectivamente.

Figura 45. Espectro MALDI/TOF do peptídeo KR(pT)IRR após ensaio enzimático.



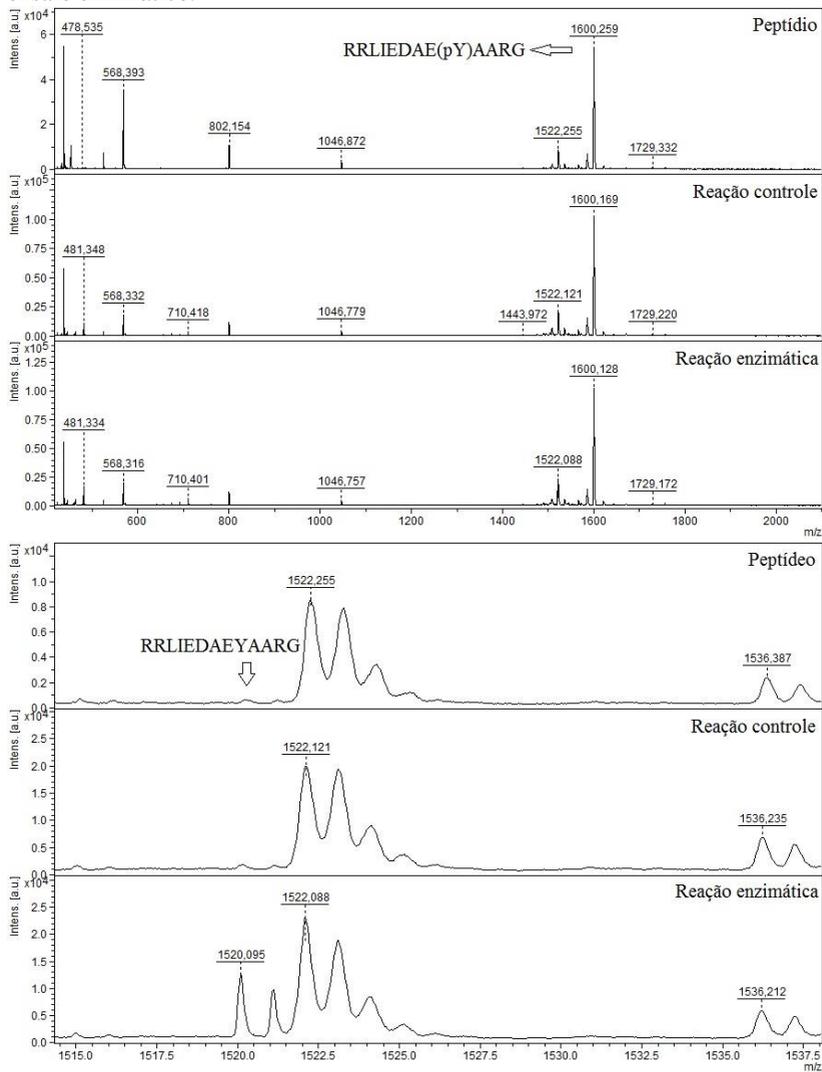
Eixos: intensidade [a.u.] versus m/z . Painel superior, espectro total do ensaio de desfosforilação de KR(pT)IRR (flecha). Painel inferior, visão ampliada do espectro de KR(pT)IRR. Os picos m/z 909 e 829 representam os peptídeos KR(pT)IRR e KRTIRR (flechas), respectivamente.

Figura 46. Espectro MALDI/TOF do peptídeo RRA(pS)VA após ensaio enzimático.



Eixos: intensidade [a.u.] versus m/z . Pannel superior, espectro total do ensaio de desfosforilação de RRA(pS)VA (flecha). Pannel inferior, visão ampliada do espectro de RRA(pS)VA. Os picos m/z 739,5 e 659,5 representam os peptídeos RRA(pS)VA e RRASVA (flechas), respectivamente.

Figura 47. Espectro MALDI/TOF do peptídeo RRLIEDAE(pY)AARG após ensaio enzimático.



Eixos: intensidade [a.u.] versus m/z . Painel superior, espectro total do ensaio de desfosforilação de RRLIEDAE(pY)AARG (flechas). Painel inferior, visão ampliada do espectro de RRLIEDAE(pY)AARG. Os picos m/z 1.600 e 1.520 representam os peptídeos RRLIEDAE(pY)AARG e RRLIEDAEYAARG (flechas), respectivamente.

3.3.6 Parâmetros cinéticos da PrpC, PrpC_D122A e PrpC_R164A

Primeiramente, as velocidades iniciais foram determinadas usando *p*NPP como substrato. O perfil cinético da PrpC WT, tanto para concentrações do substrato quanto para a dependência do íon metálico, exibiu um típico comportamento Michaelis-Menten (Figura 48). Na presença de MnCl_2 1 mM, a PrpC WT apresentou um K_m de $1,21 \pm 0,1$ mM e um $V_{\text{máx}}$ de $14,5 \pm 0,3 \mu\text{mol } p\text{NP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (Tabela 18). Parâmetros cinéticos similares foram relatados para outras fosfatases PP2C, a PstP de *M. tuberculosis* exibe um K_m de 1,7 mM (PULLEN et al., 2004), a tPphA de *T. elongatus* exibe um K_m de 0,75 mM e um $V_{\text{máx}}$ de $20 \mu\text{mol } p\text{NP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (SCHLICKER et al., 2008), e a PrpC de *M. pneumoniae* exibe um K_m de 1,14 mM e um $V_{\text{máx}}$ de $2,41 \mu\text{mol } p\text{NP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (HALBEDEL et al., 2006). Na presença de *p*NPP 10 mM, a PrpC WT apresentou (K_m aparente) um K_{metal} de $0,22 \pm 0,04$ mM (Tabela 18), similar aos dados relatados para a tPphA de *T. elongatus* e para a PrpC de *Bacillus subtilis*, com um K_{metal} para MnCl_2 de 0,58 e 0,5 mM, respectivamente (OBUCHOWSKI et al., 2000; SU et al., 2011). Nesse estudo não foi detectado atividade de fosfatase para a PrpC na ausência de íons manganês.

Como a análise do alinhamento de múltiplas sequências indicou que dois resíduos de aminoácido envolvidos na coordenação do terceiro íon metálico em outras fosfatases PP2C bacterianas são conservados em PrpC, supõem-se que a PrpC poderia coordenar três íons metálicos no sítio ativo. Para investigar essa hipótese, foi determinado o efeito das mutações D122A e R164A sobre a atividade enzimática da PrpC. A substituição do resíduo ácido aspártico pela alanina na posição 122 gerou uma proteína completamente inativa, nenhuma atividade foi detectada sobre o *p*NPP (Tabela 18), indicando que esse resíduo, Asp122, é essencial para a atividade catalítica da PrpC. Além disso, esse resultado está de acordo com os dados previamente relatados para a mesma mutação em um resíduo homólogo da tPphA de *T. elongatus* (SU et al., 2011) e da PP2C α humana (TANOUE et al., 2013).

Em contrapartida, a substituição do resíduo de arginina pela alanina na posição 164 não afetou a capacidade da PrpC para hidrolisar o *p*NPP, mas comparada à enzima WT, a atividade catalítica da PrpC_R164A foi moderadamente reduzida (Tabela 18 e Figura 48). Apesar da PrpC_R164A exibir valores de K_m e k_{cat} similares aos da enzima WT, o K_{metal} foi 2,5 maior e as constantes de especificidade k_{cat}/K_m e $k_{\text{cat}}/K_{\text{metal}}$ foram 2,3 e 2,9 vezes menores, respectivamente. Esse

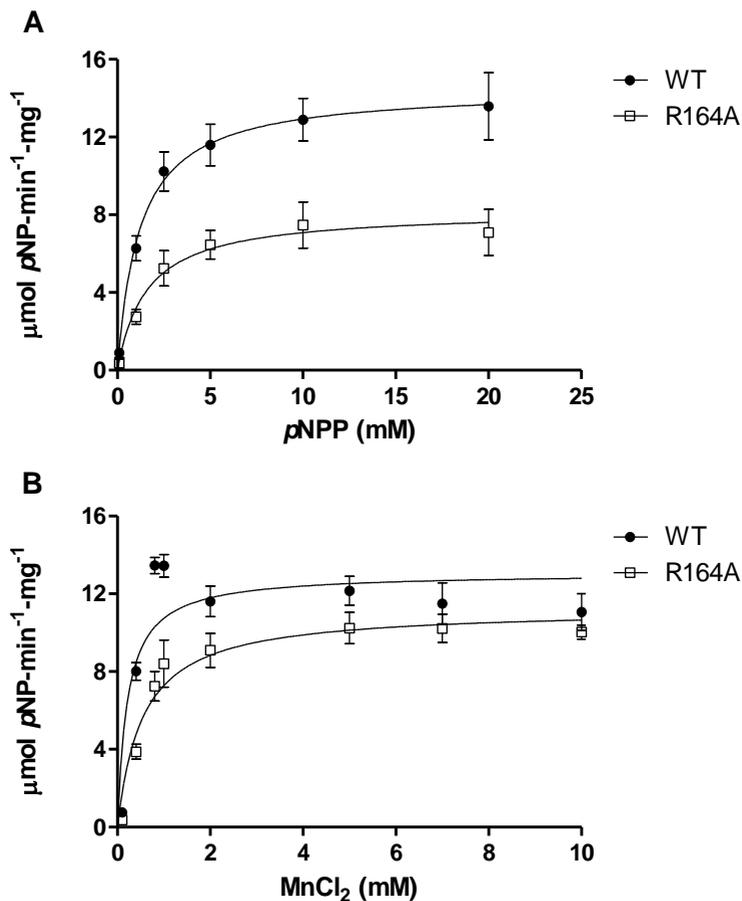
resultado sugere que a mutação R164A enfraqueceu a ligação do metal à proteína e que esse resíduo também está implicado na catálise enzimática. A mutação do resíduo Ser160 para uma alanina em PstP de *M. tuberculosis* (resíduo homólogo à Arg164) não afetou significativamente a atividade enzimática da PstP, nesse caso houve apenas um pequeno aumento dos valores de K_m e K_{metal} (PULLEN et al., 2004). O resultado obtido neste trabalho está de acordo com os dados relatados para a tPphA de *T. elongatus*, visto que a mutação do resíduo His161 para uma alanina (resíduo homólogo à Arg164) reduziu moderadamente a atividade enzimática da tPphA frente aos substratos *p*NPP e fosfopeptídeos (SU et al., 2011; SU; FORCHHAMMER, 2013).

Tabela 18. Parâmetros cinéticos da PrpC, PrpC_D122A e PrpC_R164A

PrpC	K_m , mM	k_{cat} , s ⁻¹	k_{cat}/K_m , M ⁻¹ s ⁻¹
WT	1,21 ± 0,1	7,29 ± 0,86	6.128 ± 779
R164A	1,6 ± 0,2	4,12 ± 0,66	2.612 ± 387
D122A	n.d	n.d	n.d
PrpC	K_{metals} , mM	k_{cat} Mn ²⁺ , s ⁻¹	k_{cat}/K_{metals} , M ⁻¹ s ⁻¹
WT	0,22 ± 0,04	6,58 ± 0,43	30.260 ± 1.349
R164A	0,55 ± 0,05	5,63 ± 0,35	10.417 ± 1.896
D122A	n.d	n.d	n.d

Para determinar os parâmetros cinéticos os ensaios foram realizados com 0,1;1; 2,5; 5; 10 e 20 mM de *p*NPP, e 0,1; 0,4; 0,8; 1; 2; 5; 7 e 10 mM de MnCl₂ como descrito nos materiais e métodos. n.d., não detectado. Os dados representam a média e ± DP de oito experimentos independentes.

Figura 48. Curvas Michaelis-Menten em função da concentração de substrato e íon metálico para PrpC e PrpC_R164A.



Os ensaios de atividade foram realizados a 30 °C com 150 nM de proteína como descrito em materiais e métodos. (A) Dependência da concentração de $p\text{NPP}$ sobre a atividade enzimática. Atividade foi mensurada com 0,1 a 20 mM de $p\text{NPP}$ na presença de 1 mM de MnCl_2 . (B) Dependência da concentração de MnCl_2 sobre a atividade enzimática. Atividade foi mensurada com 0,1 a 10 mM de MnCl_2 na presença de 10 mM de $p\text{NPP}$. Os experimentos foram realizados em oituplicata.

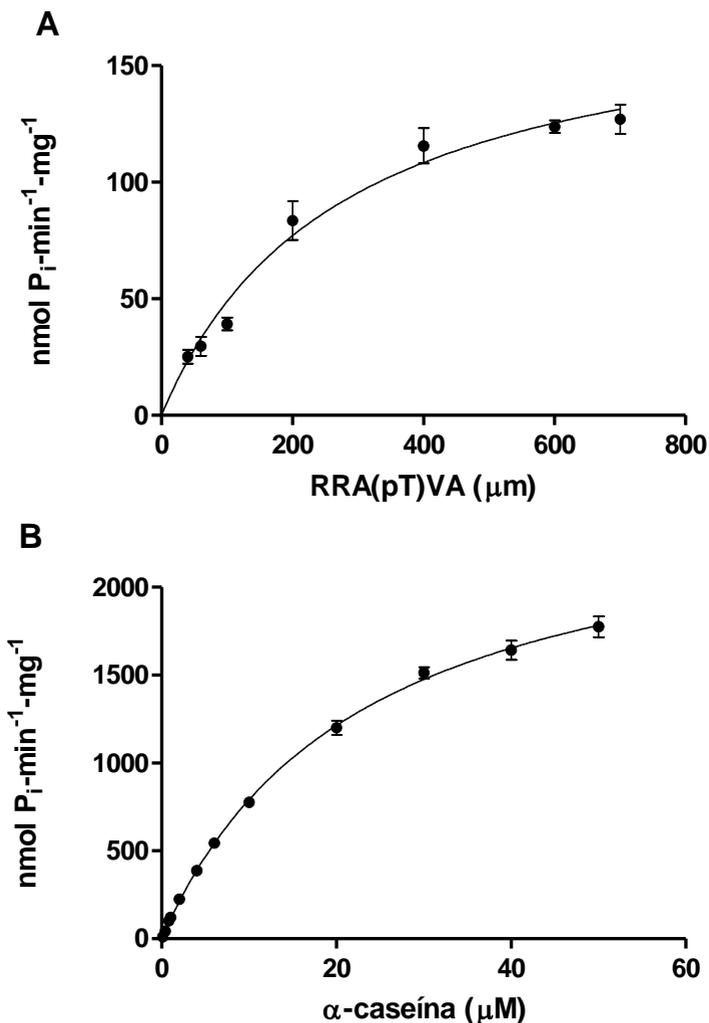
Para o substrato RRA(pT)VA, as constantes catalíticas da PrpC WT revelaram um K_m de $308 \pm 24 \mu\text{M}$ e um $V_{m\acute{a}x}$ de $183.6 \pm 14 \text{ nmol P}_i \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (Tabela 18 e Figura 49A), similar aos resultados relatados para a PphA de *Synechocystis* PCC 6803 (RUPPERT et al., 2002). Além da atividade catalítica sobre o resíduo fosfotreonina do peptídeo RRA(pT)VA, a atividade enzimática da PrpC foi avaliada utilizando a proteína α -caseína do leite bovino como substrato. Na presença de MnCl_2 1 mM, a PrpC WT apresentou um K_m de $22,82 \pm 1,3 \mu\text{M}$ e um $V_{m\acute{a}x}$ de $2,6 \pm 0,2 \mu\text{mol P}_i \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (Tabela 19 e Figura 49B). De acordo com as constantes de especificidade apresentadas nas tabelas 18 e 19, o valor de k_{cat}/K_m para α -caseína é aproximadamente 9 vezes maior que o do *p*NPP e 190 vezes maior que o do RRA(pT)VA. Deste modo, esses resultados indicam que a PrpC tem preferência por substratos proteicos em vez de artificiais como o *p*NPP e o fosfopeptídeo sintético. Segundo Ruppert e colaboradores (2002), a PphA de *Synechocystis* PCC 6803 também apresenta preferência por substratos proteicos em vez de substrato artificiais, como os fosfopeptídeos.

Tabela 19. Parâmetros cinéticos da PrpC usando RRA(pT)VA e α -caseína como substrato

Substrato	$K_m, \mu\text{M}$	k_{cat}, s^{-1}	$k_{cat}/K_m, \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
RRA(pT)VA	308 ± 24	$0,093 \pm 0,006$	303 ± 40
α -caseína	$22,82 \pm 1,3$	$1,3 \pm 0,2$	57.865 ± 6639

Para determinar os parâmetros cinéticos os ensaios foram realizados com 40, 60, 100, 200, 400, 600 e 700 μM de RRA(pT)VA, e 0,1; 0,4; 0,8; 1; 2; 4; 6; 10; 20; 30; 40 e 50 μM de α -caseína como descrito nos materiais e métodos. Os dados representam a média \pm DP de três experimentos independentes.

Figura 49. Curvas Michaelis-Menten em função da concentração de substrato para PrpC.



Os ensaios de atividade foram realizados a 30 °C com 150 nM de proteína como descrito nos materiais e métodos. (A) Dependência da concentração de RRA(pT)VA sobre a atividade enzimática. (B) Dependência da concentração de α -caseína sobre a atividade enzimática. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.3.7 Ensaios de biotilação da PrpC

A infecção de condrócitos de frango pela bactéria *M. synoviae*, durante a indução de artrite infecciosa, desencadeia eventos celulares pró-apoptóticos. Dessa forma, condrócitos infectados por *M. synoviae* morrem por apoptose devido à produção de óxido nítrico, ativação da caspase-3 e inativação mitocondrial (DUSANIC et al., 2012). O óxido nítrico (NO) e outras espécies reativas de nitrogênio (ERN) são moléculas importantes de sinalização em diversos processos celulares, entre eles, na resposta imune e inflamatória, e na regulação de proteínas por meio de modificações pós-traducionais (ECCO et al., 2010). A S-nitrosilação é uma modificação pós-traducional, na qual ocorre a adição covalente de um grupo NO ao átomo de enxofre de um resíduo de cisteína em proteínas e peptídeos (MATIOLLO et al., 2013). A modulação proteica pela ação do NO tem sido investigada e descrita em diversas proteínas, além disso, a S-nitrosilação de proteínas está relacionada à atividade microbicida desenvolvida pelo hospedeiro contra diversos patógenos (ECCO et al., 2010).

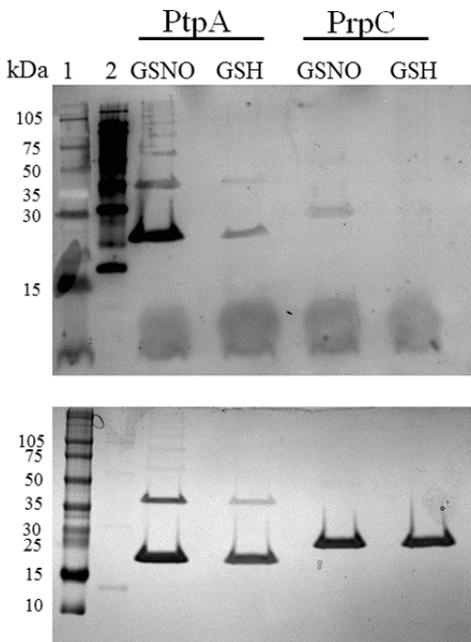
Com o objetivo de verificar se a PrpC sofre S-nitrosilação por ação do óxido nítrico, a proteína pura em tampão HEN foi submetida a ensaios de biotilação para detecção de proteínas S-nitrosiladas. O ensaio de biotilação detecta se uma proteína é S-nitrosilada por meio da substituição da S-nitrosilação por uma biotilação. Para tanto, as proteínas são expostas a um doador de NO, em seguida as cisteínas que forem S-nitrosiladas incorporam uma molécula de biotina, sendo esta modificação detectada por *Western blot*. A PrpC possui três cisteínas, Cys35, Cys125, Cys241, próximas aos resíduos Asp36, Asp122 e Asp237 do sítio catalítico.

Como controle positivo de S-nitrosilação foi utilizada a proteína PtpA de *M. tuberculosis*. A PtpA é S-nitrosilada no resíduo de Cys53. Embora a S-nitrosilação não aconteça no resíduo catalítico, Cys11, essa modificação pós-traducional diminui a atividade enzimática, bem como a estabilidade térmica da PtpA (MATIOLLO et al., 2013). Quando a PrpC foi tratada com GSNO 1 mM (doador de NO) não foi detectada uma banda intensa no *Western blot* correspondente a essa proteína biotilada, como foi detectado para PtpA, o controle positivo (Figura 50). Nos controles negativos, as proteínas foram tratadas com GSH 1 mM em vez de GSNO, observou-se uma banda de intensidade muito menor para a PtpA e uma banda de intensidade semelhante à banda da PrpC correspondente ao tratamento com GSNO (Figura 50). Portanto, esses resultados sugerem que a PrpC não sofre S-nitrosilação na

presença de GSNO. Todavia, esses resultados ainda precisam ser confirmados por meio de outros doadores de NO e pela análise do efeito do NO na atividade enzimática da PrpC.

Segundo a literatura, até o momento não se tem nenhum relato de proteínas serina/treonina fosfatases reguladas por S-nitrosilação. Por outro lado, Yasukawa e colaboradores (2005) relataram que a proteína serina/treonina cinase Akt/PKB sofre regulação por S-nitrosilação. Na presença de doador de NO, a Akt/PKB é inativada pela S-nitrosilação da Cys224, tanto *in vitro* quanto em células intactas, o que contribui para o processo de resistência à insulina mediado pela proteína óxido nítrico-sintase induzível (iNOS) (YASUKAWA et al., 2005).

Figura 50. Ensaio de biotinição da PrpC para detecção de proteínas S-nitrosiladas.



A PrpC em tampão HEN foi tratada com 1 mM de GSNO (doador de NO) ou 1 mM de GSH (controle negativo). Em seguida, as amostras foram incubadas com MMTS para bloqueio dos resíduos de cisteínas livres, reduzidas com ascorbato de sódio e posteriormente submetidas à biotinição. Na figura superior está a revelação do *Western blot* com anticorpo anti-biotina e abaixo está o SDS-PAGE das mesmas amostras. A PtpA (20 kDa) foi utilizada como controle

positivo nos ensaios de biotilação. 1, marcador de massa molecular pré-corado; 2, marcador de massa molecular biotinilado. Os experimentos foram realizados em duplicata.

3.3.8 Análise estrutural da PrpC por dicroísmo circular e fluorescência

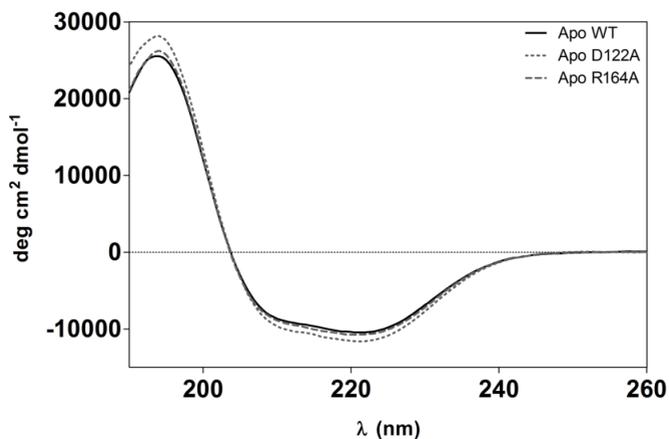
A estrutura secundária da PrpC WT, PrpC_D122A e PrpC_R164A, na forma apo e holo, foi avaliada por espectroscopia de dicroísmo circular (CD). O espectro de CD UV-distante da forma apo da PrpC exibe um pico negativo em 222 nm e um pico positivo em 195 nm, sugerindo um perfil de estrutura secundária combinado de α -hélice e folha- β (Figura 51A). Esse resultado está de acordo com o perfil esperado, uma vez que as proteínas PP2C apresentam uma estrutura conformacional composta de duas folhas- β antiparalelas (5 fitas- β cada) cercada por dois pares de α -hélices antiparalelas. A análise do espectro com o servidor *online* DichroWeb (WHITMORE; WALLACE, 2008) sugere uma mistura de conteúdo secundário de α -hélice ($31,23 \pm 5,15\%$) e folha- β ($24,65 \pm 2,43\%$). Esses valores estão de acordo com a estrutura secundária teórica predita pelo programa SWISS-MODEL, sendo 32% α -hélice (79 resíduos) e 28% folha- β (69 resíduos). Além disso, esse resultado é similar à SaSTP de *S. agalactiae* cadeia B (2PK0B), com 33% α -hélice (81 resíduos) e 30% folha- β (75 resíduos) (RANTANEN et al., 2007). As proteínas mutantes PrpC_D122A e PrpC_R164A, na forma apo, apresentaram um perfil de CD muito semelhante à proteína WT, dessa forma a substituição dos resíduos Asp122 e Arg164 por alanina não perturbou a estrutura secundária da PrpC. Os espectros deconvoluídos indicam um conteúdo de α -hélice de $31,83 \pm 3,32\%$ e de folha- β de $24,43 \pm 1,23\%$ para a PrpC_R164A e um conteúdo de α -hélice de $35,33 \pm 3,06\%$ e folha- β de $22,31 \pm 1,36\%$ para a PrpC_D122A (Figura 51A).

Para avaliar se a ligação do metal à proteína afeta a estrutura secundária da PrpC, foi avaliado o perfil de dicroísmo circular na presença de vários metais. Observa-se na Figura 51B e 52, que mesmo em alta concentração, a adição dos íons Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} e Mn^{2+} não alterou, consideravelmente, o conteúdo de estrutura secundária da PrpC. Por outro lado, na presença de $ZnSO_4$ 10 mM observa-se um perfil de CD completamente diferente, consistente com uma estrutura secundária desordena (Figura 52). Esse dado corrobora os resultados de atividade enzimática na presença do íon Zn^{2+} , dessa forma a inibição da

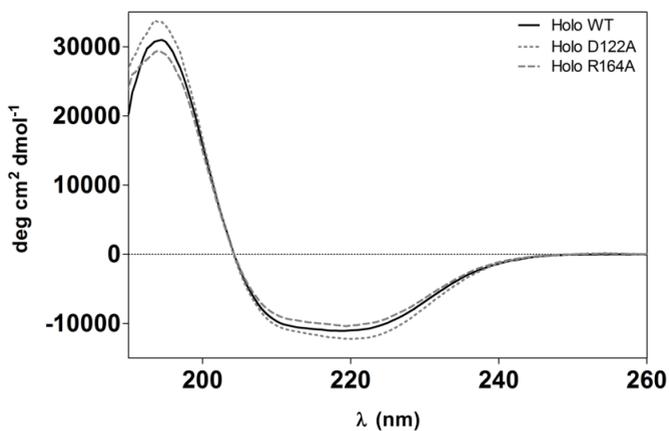
atividade provocada por este metal pode ser atribuída à desestabilização da estrutura conformacional, e conseqüentemente a precipitação da PrpC.

Figura 51. Espectro de dicroísmo circular da PrpC e mutantes.

A

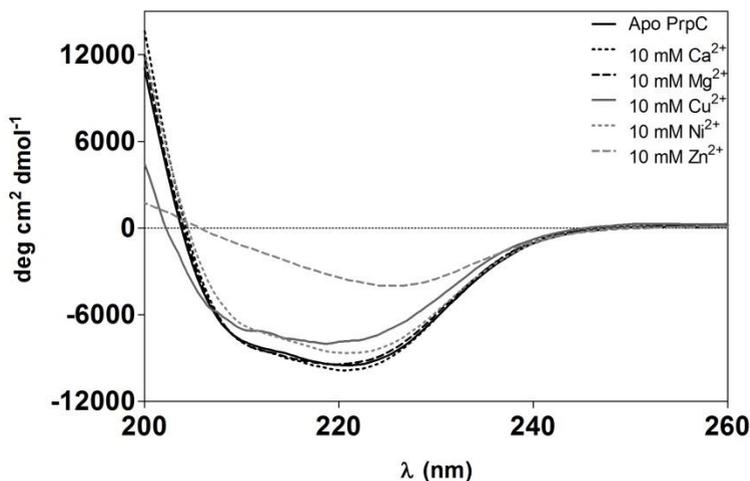


B



(A) espectro UV-distante das proteínas na forma apo e (B) na forma holo a $10 \mu\text{M}$. Para avaliar a forma holo, antes das medições a proteína foi incubada com MnCl_2 10 mM por 5 min .

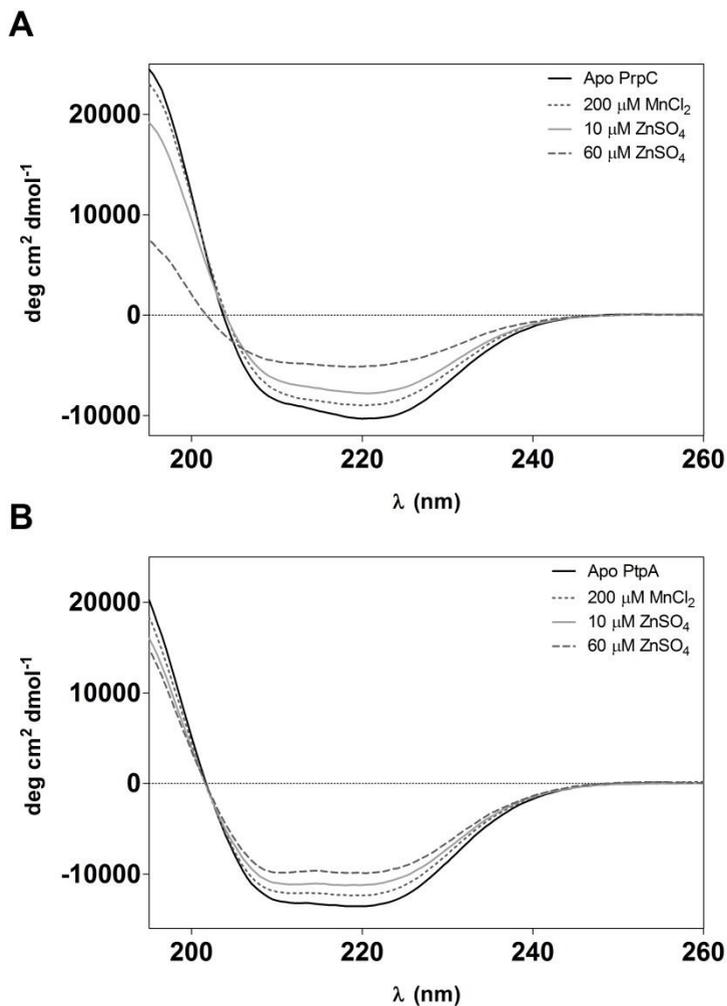
Figura 52. Espectro de dicroísmo circular da PrpC (10 μ M) na presença de vários metais (10 mM).



Com o objetivo de explorar o efeito do íon de zinco sobre a estrutura secundária da PrpC, realizaram-se experimentos de dicroísmo circular em concentrações menores de ZnSO_4 e na presença do íon Mn^{2+} tanto para a PrpC quanto para a PtpA de *M. tuberculosis*. A PtpA foi usada como controle. Na presença de MnCl_2 200 μ M e MnCl_2 200 μ M mais ZnSO_4 10 μ M não houve alterações drásticas no conteúdo de estrutura secundária da PrpC e da PtpA (Figura 53). Entretanto, na presença de MnCl_2 200 μ M mais ZnSO_4 60 μ M a PrpC apresentou uma grande perda de estrutura secundária, corroborando o dado anterior (Figura 53A), sendo que o mesmo não foi observado, nas mesmas proporções, para a PtpA (Figura 53B).

Apesar do íon Mn^{2+} ser essencial à catálise, o perfil de CD da PrpC (WT e mutantes) na presença de MnCl_2 indica que a ligação do metal ao sítio catalítico não induz mudanças na estrutura secundária e nem está envolvido no correto envelhecimento da proteína (Figuras 51B). Os espectros deconvoluídos na presença de íon Mn^{2+} indicam um conteúdo de α -hélice de $32,55 \pm 5,38\%$ e de folha- β de $25,88 \pm 1,23\%$ para a PrpC WT, um conteúdo de α -hélice de $32,39 \pm 2,79\%$ e de folha- β de $25,88 \pm 1,23\%$ para a PrpC_R164A e um conteúdo de α -hélice de $36,52 \pm 6,82\%$ e folha- β de $23,65 \pm 4,16\%$ para a PrpC_D122A (Figura 51B).

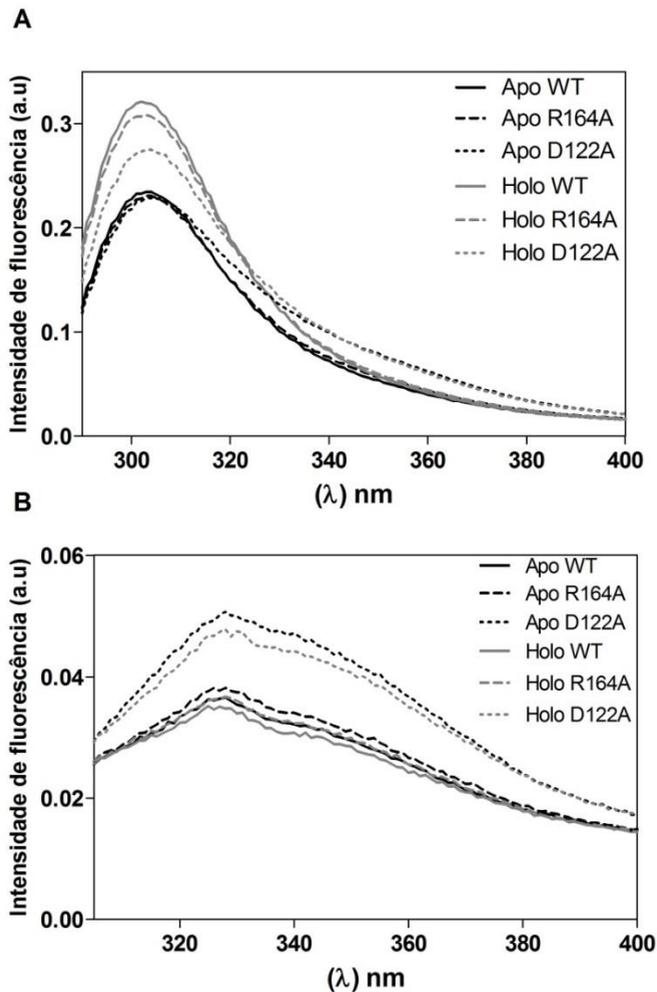
Figura 53. Análise do efeito do íon Zn^{2+} sobre a estrutura secundária da (A) PrpC e (B) PtpA.



No ensaio de CD as proteínas (10 μM) foram tituladas com 200 μM de $MnCl_2$, 10 μM de $ZnSO_4$ e 60 μM de $ZnSO_4$ a 20 °C.

Para complementar os dados de dicroísmo circular, as estruturas terciárias da PrpC, PrpC_D122A e PrpC_R164A, nas formas apo e holo, foram analisadas através da fluorescência intrínseca. A PrpC possui um resíduo de Trp localizado na α -hélice 2 (Trp74) e 7 resíduos de Tyr localizados em diversas regiões da estrutura. Como demonstrado na figura 54, quando a amostra proteica é excitada a 280 nm (emissão Trp e Tyr) o espectro de fluorescência da PrpC, forma apo, apresenta uma emissão máxima (λ_{\max}) a 303 nm, e quando excitada a 295, para verificar apenas a contribuição da fluorescência do resíduo de Trp, o espectro apresenta uma λ_{\max} a 328 nm. Ambas as proteínas mutantes apresentam valores de λ_{\max} similares à proteína WT, a PrpC_R164A apresenta uma λ_{\max} a 303 nm (ex. 280 nm) e 328 nm (ex. 295 nm), e a PrpC_D122A apresenta uma λ_{\max} a 304 nm (ex. 280 nm) com o pequeno aumento de intensidade de fluorescência na região de emissão do Trp (aproximadamente 330 nm) e 328 nm (ex. 295 nm) (Figura 54).

O espectro de fluorescência da PrpC na presença de MnCl_2 10 mM mostrou que na forma holo as proteínas não apresentam diferenças conformacionais quando comparadas à forma apo, visto que não houve deslocamento do comprimento de onda de emissão máxima (Figura 54). A excitação da amostra proteica na forma holo a 280 nm apresentou valores de λ_{\max} similares à forma apo, entre 303 e 304 nm. No entanto, na presença de íons Mn^{2+} os espectros de fluorescência apresentam um valor de intensidade maior quando comparado aos espectros da forma apo (Figura 54A). Resultados similares foram relatados para o fator de anticoagulação II (ACF II) de *Agkistrodon acutus* (espécie de serpente), a adição de íons de Ca^{2+} , Sr^{2+} e Ba^{2+} à apo ACF II induziu o aumento na intensidade da fluorescência do Trp sem deslocamento na emissão máxima, indicando a ligação dos íons à proteína e possíveis rearranjos no microambiente ao redor dos resíduos de Trp (SHEN et al., 2011). A excitação da amostra proteica a 295 nm, tanto na forma holo quanto na forma apo, apresentou uma λ_{\max} de 328 nm, indicando que o único Trp presente na PrpC encontra-se em ambiente hidrofóbico, geralmente resíduos de Trp expostos apresentam uma λ_{\max} entre 340 e 350 nm (CHI et al., 2010), e que a ligação dos íon Mn^{2+} à proteína não causa mudanças conformacionais na estrutura terciária da PrpC (Figura 54B), corroborando os resultados de dicroísmo circular.

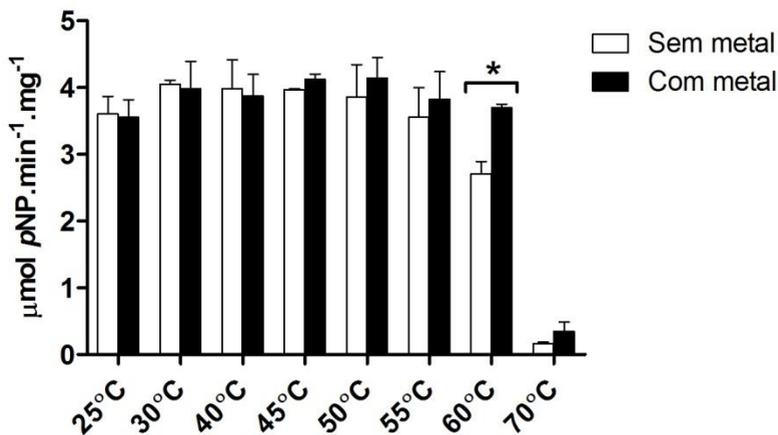
Figura 54. Análise da fluorescência intrínseca da PrpC e mutantes.

Espectro de emissão de fluorescência da PrpC WT e mutantes (PrpC_R164A e PrpC_D122A) a 10 μ M na forma apo e holo com excitação a 280 nm (A) e 295 nm (B). Para avaliar a forma holo, antes das medições a proteína foi incubada com $MnCl_2$ 10 mM por 5 min. Os espectros foram adquiridos a 20 °C.

3.3.9 Análise da estabilidade térmica da PrpC

Para investigar a estabilidade térmica da PrpC na presença e ausência de metal foram realizados ensaios de atividade enzimática, desnaturação térmica e fluorescência intrínseca sob diversas temperaturas. Inicialmente, avaliou-se a estabilidade da PrpC pré-incubando a reação enzimática em diversas temperaturas, na presença e ausência de íons Mn^{2+} , antes de medir a atividade enzimática. A reação enzimática foi pré-incubada a 25, 30, 40, 45, 50, 55, 60 e 70 °C por 5 min na ausência ou presença de $MnCl_2$ 1 mM e iniciada com o substrato *p*NPP. Embora tenha ocorrido uma redução da atividade específica da PrpC após 5 min de pré-incubação, comparado aos resultados anteriores, a enzima foi capaz de hidrolisar o *p*NPP mesmo após uma pré-incubação a 55 e 60 °C, em ambas as condições (Figura 55). No entanto, pôde-se observar que a enzima pré-incubada na presença de $MnCl_2$ 1 mM tende a ser mais ativa ou a conservar a sua atividade do que a enzima pré-incubada na ausência de metal em temperaturas acima de 45 °C (Figura 55).

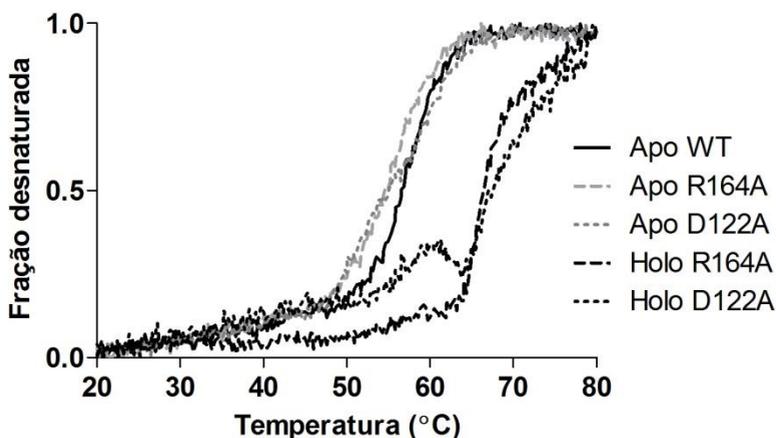
Figura 55. Atividade enzimática da PrpC após ser pré-incubada em diferentes temperaturas na presença ou ausência de $MnCl_2$.



Os ensaios foram realizados em CHES 20 mM pH 9,0, NaCl 50 mM, DTT 1 mM com *p*NPP 10 mM, $MnCl_2$ 1 mM, 150 nM de enzima a 30 °C. Two-Way ANOVA (*) $p \leq 0.05$. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Com base nesse resultado, a temperatura média de desnaturação (T_m) da PrpC foi determinada por espectroscopia de dicroísmo circular. A perda de sinal de CD a 222 nm foi monitorada entre 20 e 80 °C. O perfil de desnaturação térmica da PrpC WT apresenta uma curva sigmóide com um valor de T_m de $56,5 \pm 0,4$ °C, enquanto a PrpC_D122A e a PrpC_R164A apresentam um valor de T_m de $55,8 \pm 0,1$ °C e de $54,8 \pm 0,3$ °C, respectivamente (Figura 56). Em relação com a proteína WT, o valor de T_m da PrpC_D122A e da PrpC_R164A diminui cerca de 0,7 e 1,7 °C, respectivamente.

Figura 56. Perfil de desnaturação térmica da PrpC e mutantes.

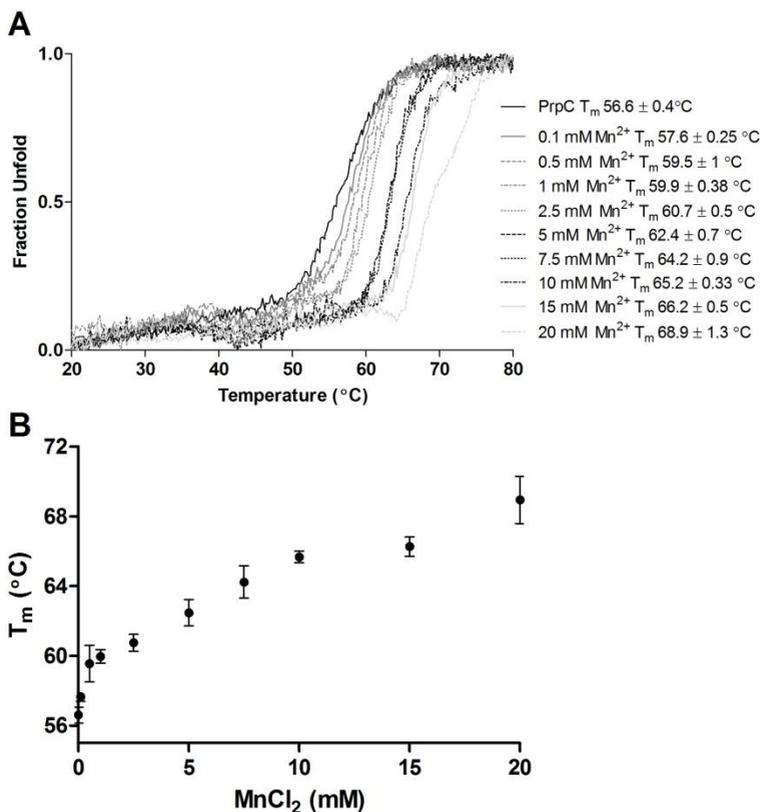


Os ensaios foram realizados com 10 μ M de proteína na ausência de metal, forma apo, ou com $MnCl_2$ 10 mM, forma holo.

Na presença de concentrações crescentes de íon Mn^{2+} , de 0,1 a 20 mM, observou-se um aumento nos valores de T_m da PrpC WT (forma holo), entre $57,6 \pm 0,25$ °C com $MnCl_2$ 0,1 mM e $68,9 \pm 1,3$ °C com $MnCl_2$ 20 mM (Figura 57). Similar à proteína WT, ambas as mutantes apresentaram valores de T_m maiores na presença de íons Mn^{2+} , com $MnCl_2$ 10 mM os valores de T_m da PrpC_D122A e da PrpC_R164A foram de $73,6 \pm 0,9$ °C e $67,5 \pm 0,7$ °C, respectivamente (Figura 56). Além disso, nós comparamos o perfil de desnaturação térmica da PrpC WT na presença de $MnCl_2$ 10 mM e $MgCl_2$ 10 mM. A comparação entre os dois perfis mostrou que na presença de íon Mn^{2+} o valor de T_m da PrpC WT foi cerca de 5 °C maior que na presença de íon Mg^{2+} , T_m de $60,6 \pm 0,2$ °C com $MgCl_2$ e de $65,2 \pm 0,33$ °C com $MnCl_2$ (Figura 58).

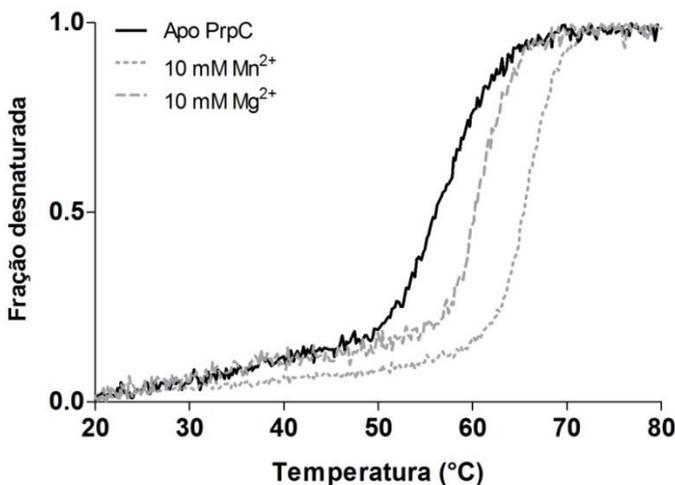
Esses resultados indicam que na ausência de metal a PrpC (forma apo) é mais suscetível à desnaturação, dessa forma, a ligação do metal ao sítio ativo aumenta a estabilidade proteica.

Figura 57. Perfil de desnaturação térmica da PrpC WT na presença de concentrações crescentes de MnCl_2 .



(A) Os valores de T_m representam a média \pm DP de três experimentos independentes. (B) Valores de T_m (°C) *versus* a concentração de MnCl_2 (mM).

Figura 58. Perfil de desnaturação térmica da PrpC WT na presença de MnCl_2 10 mM e MgCl_2 10 Mm.

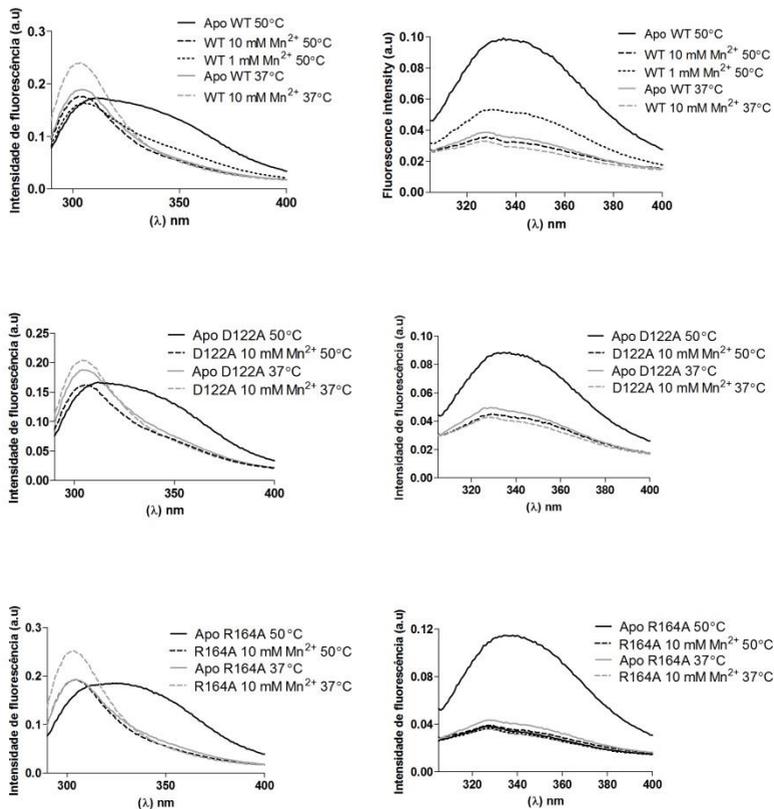


Em seguida, a termoestabilidade da PrpC (WT e mutantes) na presença do íon Mn^{2+} foi avaliada por fluorescência intrínseca a 37 e 50 °C. A 37 °C, excitação a 280 nm, a PrpC WT, a PrpC_D122A e a PrpC_R164A na forma apo apresentaram uma λ_{max} de 304, 305 e 304 nm, respectivamente, similar ao relatado acima para 20 °C. Na presença do íon Mn^{2+} , os valores de λ_{max} permaneceram os mesmos (304-305 nm), ao contrário dos valores de intensidade, que na presença de metal foram maiores que os valores das proteínas na forma apo (Figura 59). A 50 °C, observa-se no espectro das proteínas na forma apo um deslocamento da emissão máxima para o vermelho, o que pode ser atribuído à desnaturação proteica parcial, o valor de λ_{max} para a proteína WT e para a PrpC_D122A foi de 314 nm e para a PrpC_R164A de 325 nm. Na presença do íon Mn^{2+} , os valores de λ_{max} foram de 304 nm para WT e PrpC_R164A e 306 para PrpC_D122A. Dessa forma, na presença de metal as proteínas exibiram maior resistência ao aumento da temperatura.

A 37 °C, excitação a 295 nm, a PrpC WT, a PrpC_D122A e a PrpC_R164A exibiram o mesmo valor de λ_{max} , 328 nm, tanto na ausência como na presença de MnCl_2 (Figura 59). A 50 °C, na ausência de metal, o valor de λ_{max} das proteínas novamente sofreu um deslocamento para o vermelho, passando de 328 nm para 336 nm

(Figura 59). Assim, a 50 °C o resíduo de Trp das proteínas na forma apo encontra-se mais exposto ao solvente, 336 nm, quando comparado às proteínas na forma holo, 328 nm. Em conjunto, os dados de desnaturação térmica, atividade e fluorescência demonstram que a ligação do íon Mn^{2+} estabiliza a estrutura da PrpC.

Figura 59. Análise da fluorescência intrínseca da PrpC e mutantes a 37 e 50 °C na presença e ausência de $MnCl_2$.



Espectro de emissão de fluorescência da PrpC WT, PrpC_D122A e PrpC_R164A (10 μ M) na forma apo e holo com excitação a 280 nm (coluna à esquerda) e 295 nm (coluna à direita).

3.3.10 Análise da ligação do metal à PrpC por ESI-MS e ITC.

Uma vez que os resíduos de aminoácidos envolvidos na coordenação do terceiro metal ao sítio ativo de proteínas PP2C são conservados e importantes à atividade enzimática da PrpC, a interação não-covalente proteína-metal foi estudada por espectrometria de massa com ionização por *electrospray*. A técnica de ESI-MS se tem demonstrado de grande utilidade nos estudos de interações não-covalentes, como a ligação de metais a proteínas (LOO, 2001). A ESI-MS já foi empregada no estudo de uma série de metaloproteínas, por exemplo, para determinar o conteúdo de íons de cobre e zinco na superóxido dismutase, SOD1, direto do tecido do cordão espinhal de ratos transgênicos (RHOADS et al., 2011). Além disso, a ESI-MS foi utilizada para estudar a estequiometria da interação de íons de Mg^{2+} e Mn^{2+} com a enolase de levedura, bem com a interação de íons de Zn^{2+} com a proteína do nucleocapsídeo do vírus HIV, a NCp7 (LOO, 2001).

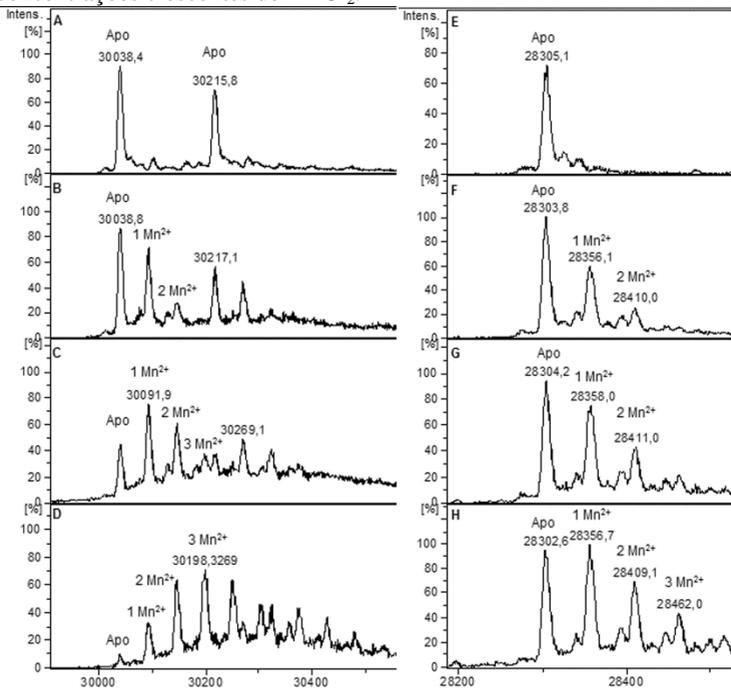
Os espectros de massa da PrpC WT, PrpC_D122A e PrpC_R164A foram adquiridos com concentrações crescentes de $MnCl_2$. O espectro de massa deconvoluído da PrpC WT sem adição de metal exibiu duas populações de proteína, ambas na forma apo. A primeira população corresponde à forma apo sem a metionina N-terminal (m/z 30.038) e a segunda população (m/z 30.215) corresponde à primeira com uma modificação pós-traducional na cauda de histidina N-terminal (Figura 60A-D). A α -N-gluconoilação da cauda de His N-terminal causa uma massa extra de 178 Da em proteínas heterólogas expressas em *E. coli* (GEOGHEGAN et al., 1999). Com a adição de 50 μM $MnCl_2$ (1:25 razão molar) observaram-se mais duas populações (m/z 30.091 e 30.145), além das anteriores, indicando a ligação de 1 e 2 íons de Mn^{2+} à proteína. Com a adição de 100 μM $MnCl_2$ (1:50 razão molar) observou-se uma terceira população (m/z 30.198), além das anteriores, correspondendo a uma população com 3 íons de Mn^{2+} ligados à proteína. Com a adição de $MnCl_2$ 200 μM (1:100 razão molar) a PrpC foi detectada principalmente na forma holo, com 1 a 3 íons Mn^{2+} ligados (Figura 60D). A ligação do metal à PrpC aumenta com o aumento da concentração de $MnCl_2$, porém só observamos a maioria da proteína na forma holo com excesso de metal, a partir de $MnCl_2$ 100 μM . Esse fato é condizente com a necessidade de concentrações em milimolar de $MnCl_2$ ou $MgCl_2$ para a atividade enzimática *in vitro* de proteínas PP2C (TANOUE et al., 2013).

Para investigar se a cauda de His N-terminal poderia interferir nas análises de MS, uma vez que ela tem afinidade por metais divalentes, a cauda de His foi removida da PrpC e novos experimentos foram realizados. Após a proteólise, o espectro de massa deconvoluído da PrpC sem adição de metal exibiu apenas uma população, a PrpC na forma apo sem cauda de His (m/z 28.305). Com a adição de $MnCl_2$ 12,5 μM (1:25 razão molar) nós identificamos outras duas populações, indicando a ligação de 1 e 2 íons de Mn^{2+} à proteína. Com a adição de $MnCl_2$ 25 μM (1:50 razão molar) observou-se uma terceira população, correspondendo à população com 3 íons de Mn^{2+} ligados à proteína. Com a adição de $MnCl_2$ 50 μM (1:100 razão molar) a PrpC não foi detectada principalmente na forma holo, como observado anteriormente, mas a população predominante do espectro corresponde à proteína ligada a um íon de Mn^{2+} (Figura 60E-H). Apesar da PrpC sem cauda não ter sido observada predominantemente na forma apo, o resultado de MS demonstra a ligação de três íons de manganês, sugerindo um sítio catalítico com três metais, como descrito em outros PP2C bacterianas.

A enolase de levedura é uma proteína homodimérica que requer íons divalentes para sua atividade, Mg^{2+} e Mn^{2+} . Na presença de metais, as análises de ESI-MS da enolase na forma holo comprovaram a ligação de um único íon de metal, com alta afinidade, por monômero de proteína (LOO, 2001).

De acordo com os estudos de μ ESI-MS da centrina-2 humana (HsCen-2) realizados por Craing e colaboradores (2006), a apo HsCen-2 encontra-se principalmente no estado monomérico com duas conformações diferentes. Sob titulações crescentes de íons de Ca^{2+} e Mg^{2+} , os espectros de MS de HsCen-2 revelaram a ligação de 4 mols de cálcio por mol de proteína, sendo o mesmo resultado para os íons de Mg^{2+} , mas com uma afinidade de ligação menor comparado ao Ca^{2+} (CRAIG et al., 2006).

Figura 60. Espectro ESI-MS deconvolvido da PrpC na presença de concentrações crescentes de $MnCl_2$.

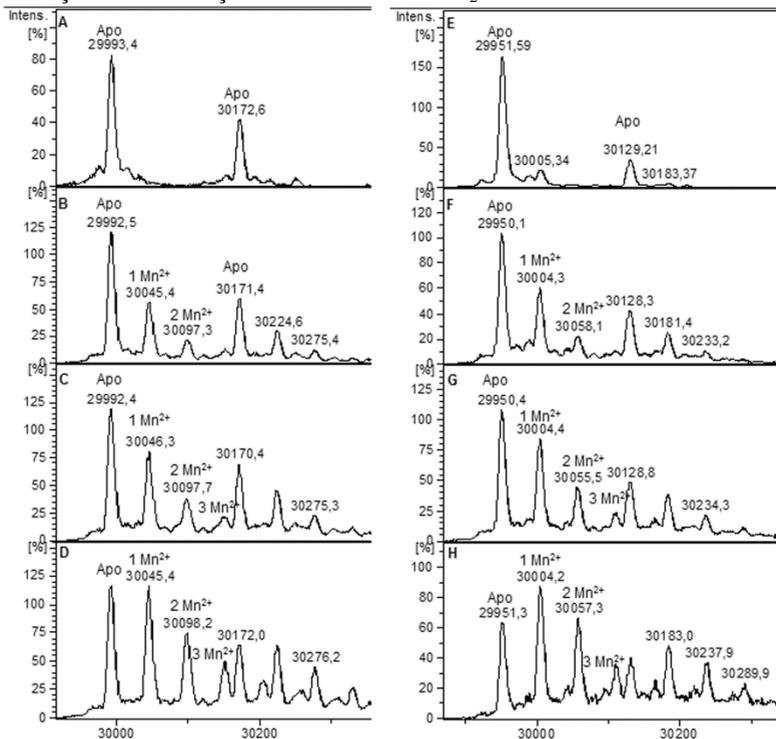


(A) Apo PrpC (2 μM em bicarbonato de amônio 10 mM pH 8,0). PrpC com (B) 1:25, (C) 1:50 e (D) 1:100 razão molar de $MnCl_2$. (E) Apo PrpC sem His-tag (0,5 μM em bicarbonato de amônio 10 mM pH 8,0). PrpC sem His-tag (F) 1:25, (G) 1:50 e (H) 1:100 razão molar de $MnCl_2$.

O espectro de massa deconvolvido da PrpC_D122A e da PrpC_R164A sem adição de metal exibiu duas populações distintas, como observado para a proteína WT, ambas na forma apo (mutante R164 m/z 29.951 e 30.129, e mutante D122A m/z 29.993 e 30.172) (Figura 61). Os resultados de titulação de $MnCl_2$ para ambas as mutantes foram similares aos resultados encontrados para a PrpC WT. Com a adição de $MnCl_2$ 12,5 μM (1:25 razão molar) nós identificamos outras duas populações, indicando a ligação de 1 e 2 íons de Mn^{2+} à PrpC_D122A e PrpC_R164A. Com a adição de $MnCl_2$ 25 μM (1:50 razão molar) observou-se uma terceira população, correspondendo à população com 3 íons de Mn^{2+} ligados à proteína. Aumentando a concentração de $MnCl_2$ para 50 μM (1:100 razão molar), observou-se a predominância das proteínas na forma holo e a principal população do

espectro correspondente à forma ligada a 1 íon de Mn^{2+} (Figura 61D e H). Apesar dos resultados de atividade enzimática demonstrarem que os resíduos Asp122 e Arg164 são importantes à catálise, os resultados de ESI-MS sugerem que mesmo na ausência desses resíduos a PrpC é capaz de se ligar a três íons de manganês.

Figura 61. Espectro ESI-MS deconvolvido da PrpC_D122A e PrpC_R164A na presença de concentrações crescentes de $MnCl_2$.



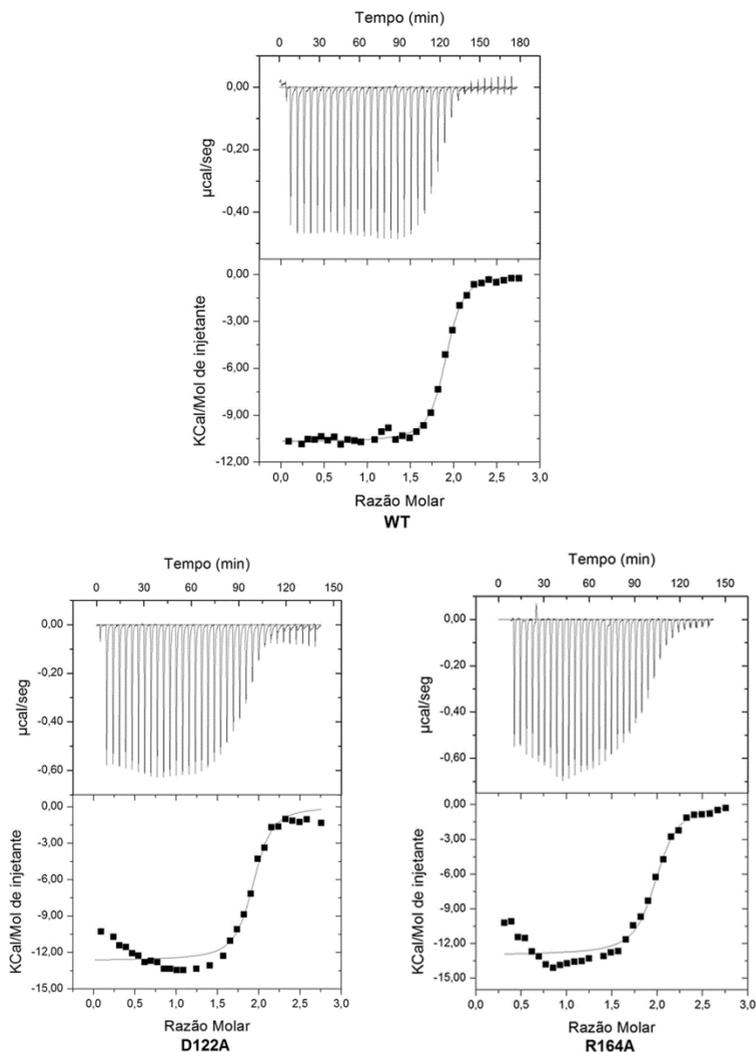
(A) Apo PrpC_D122A (0,5 μM em bicarbonato de amônio 10 mM pH 8,0). PrpC_D122A com (B) 1:25, (C) 1:50 e (D) 1:100 razão molar de $MnCl_2$. (E) Apo PrpC_R164A (0,5 μM em bicarbonato de amônio 10 mM pH 8,0). PrpC_R164A com (F) 1:25, (G) 1:50 e (H) 1:100 razão molar de $MnCl_2$.

Com o intuito de complementar a caracterização da interação não-covalente proteína-metal, a ligação dos íons de manganês à PrpC (WT e mutantes) foi examinada por ITC. Baseado no estudo da ligação do íon magnésio a PP2C α humana por microcalorimetria (TANOUE et al., 2013), avaliou-se a ligação de alta e baixa afinidade metal-proteína.

Embora as análises de microcalorimetria de MspP de *M. smegmatis*, PP2C α humana e tPphA de *T. elongatus* relatarem ajustes matemáticos de interação ligante-proteína com modelos de ‘sítios diferentes e independentes’ e de ‘três sítios sequencias’ (WEHENKEL et al., 2007; SU et al., 2011; TANOUE et al., 2013), no presente estudo o melhor ajuste matemático encontrado para as curvas de titulação, com menor valor de χ^2/DoF , foi com o modelo de ‘sítios idênticos e independentes’ (*one set of sites*). A partir dessa análise foram estimados os valores aproximados dos parâmetros termodinâmicos: variação de entalpia (ΔH), variação de entropia (ΔS), afinidade de ligação (K_d), e o mais importante neste estudo, estequiometria de ligação (N).

Os ensaios iniciais de ITC mostraram que a interação de alta afinidade entre o íon manganês e a PrpC WT é exotérmica, entalpia negativa, portanto, uma entalpia favorável deve estar associada com a ligação do íon Mn^{2+} à PrpC WT (Figura 62 e Tabela 20). De acordo com a análise, o valor estimado de estequiometria está próximo de dois ligantes por molécula, o que sugere a ligação de dois íons de Mn^{2+} com alta afinidade à PrpC WT. Os resultados de ITC para PP2C α humana e MspP de *M. smegmatis* (WEHENKEL et al., 2007; TANOUE et al., 2013), relataram a interação de dois íons metálicos independentes com alta afinidade por molécula de proteína, similar ao resultado encontrado neste estudo, e que a ligação do terceiro íon metálico à proteína na presença de uma baixa relação molar de proteína-ligante não pôde ser observada, indicando que a ligação ao terceiro sítio de metal possui baixa afinidade.

A quantidade de calor liberado pela ligação do íon Mn^{2+} e o valor de estequiometria para ambas as mutantes, foi similar aos valores observados para a PrpC WT (Figura 62 e Tabela 20). Dessa forma, os resultados de interação entre o íon Mn^{2+} e a PrpC_D122A e a PrpC_R164A devem representar a ligação do primeiro e segundo íon metálico ao sítio ativo da PrpC, visto que os resíduos Asp122 e Arg164 correspondem ao provável terceiro sítio metálico da PrpC. Comparada à PrpC WT, os valores de entropia observados (ΔS) para ambas as mutantes foi cerca de 5 vezes maior. Porém, o valor de ΔS das mutantes PrpC_D122A e PrpC_R164A foi muito similar, cerca de $-10 \text{ cal mol}^{-1} \text{ deg}^{-1}$, o que sugere que os íon de Mn^{2+} ligam-se às mutantes do mesmo modo. Embora a substituição dos resíduos Asp122 e Arg164 por uma alanina não impediu a ligação do primeiro e segundo íon metálico ao sítio ativo, a afinidade de ligação foi afetada em ambas as mutantes, sendo aproximadamente 10 vezes menor (Tabela 20).

Figura 62. Caracterização da ligação do íon Mn^{2+} à PrpC e mutantes por ITC.

As titulações foram realizadas a 20 °C com 15 μM de proteína na célula e 200 μM de $MnCl_2$ na seringa. Na figura representativa, o painel superior apresenta os dados brutos de ITC ($\mu\text{cal/seg}$ pelo tempo (min) e razão molar), enquanto o painel inferior mostra os dados integrados (Kcal/mol de injetante pelo tempo (min) e razão molar).

Tabela 20. Parâmetros termodinâmicos da ligação de alta afinidade do íon Mn^{2+} à PrpC e mutantes

PrpC	N, sítios	K_d, M^{-1}	$\Delta H,$ $Kcal.mol^{-1}$	$\Delta S,$ $Cal.mol^{-1}.deg^{-1}$
WT	$1,7 \pm 0,22$	$1,5 \pm 0,09 \times 10^7$	$-10,5 \pm 0,26$	$-2,6 \pm 0,67$
R164A	$1,6 \pm 0,51$	$8,8 \pm 1,2 \times 10^6$	$-12,3 \pm 0,8$	$-10,6 \pm 2,7$
D122A	$2,2 \pm 0,42$	$9,4 \pm 2,2 \times 10^6$	$-12,5 \pm 0,12$	$-10,8 \pm 0,07$

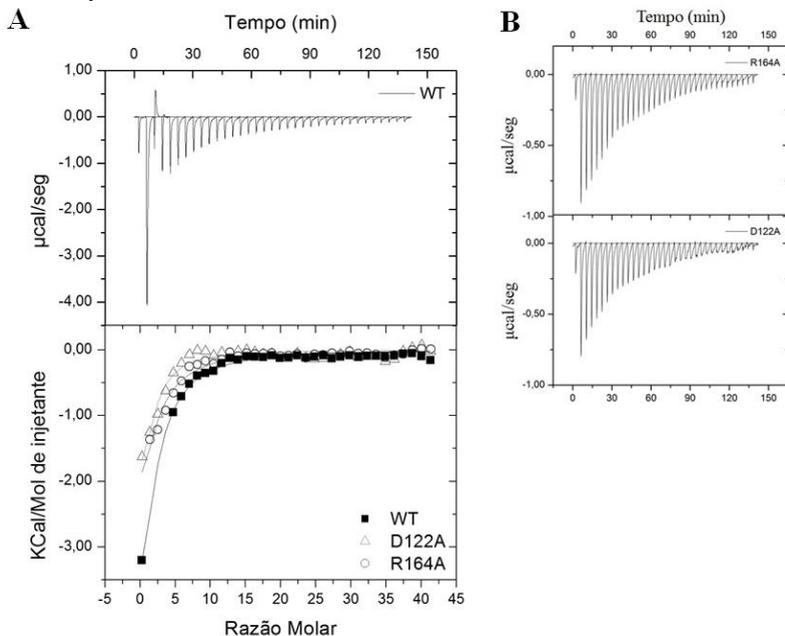
15 μM de proteína foi titulada com 200 μM de $MnCl_2$ a 20 °C. Os dados representam a média \pm DP de dois experimentos independentes.

Para investigar por ITC a ligação de baixa afinidade do terceiro íon metálico ao sítio ativo da PrpC, os dois sítios de alta afinidade foram saturados com dois equivalentes de $MnCl_2$ antes dos ensaios de titulação. Os dados da ligação de baixa afinidade do íon Mn^{2+} à PrpC WT, PrpC_D122A e PrpC_R164A foram analisados usando o modelo matemático de ‘sítios idênticos e independentes’ com o valor de estequiometria (N) fixo em 1, como descrito por Tanoue e colaboradores (2013). A figura 63 mostra os resultados de uma curva representativa da titulação de alta concentração de $MnCl_2$ à PrpC WT e às mutantes. O resultado obtido indica que o íon Mn^{2+} foi capaz de se ligar à PrpC WT, mesmo após a saturação dos sítios de alta afinidade, sendo a reação exotérmica e com uma afinidade de ligação de $1,61 \pm 0,1 \times 10^4 M^{-1}$ (Tabela 21). Ao comparar os parâmetros termodinâmicos entre os ensaios de alta e baixa afinidade da PrpC WT, a ligação do terceiro metal ao sítio ativo foi impulsionada entropicamente (Tabela 21), ao contrário do observado na ligação do primeiro e segundo metal ao sítio ativo, na qual a contribuição entálpica foi maior (Tabela 20).

Como observado para a PrpC WT, o íon Mn^{2+} foi capaz de ligar à PrpC_D122A e PrpC_R164A após a saturação dos sítios de alta afinidade, sendo a reação exotérmica e com uma afinidade de ligação na ordem de $10^4 M^{-1}$. No entanto, os parâmetros termodinâmicos demonstraram que a ligação do terceiro metal à PrpC_D122A foi impulsionada entálpicamente, enquanto a ligação do terceiro metal à PrpC_R164A foi entropicamente direcionada (Tabela 21). Apesar dos resultados de ITC demonstrarem que ambas as mutações não impedem a ligação do terceiro metal à proteína, consistente com os resultados de espectrometria de massa, essas mutações de algum modo afetam a ligação do terceiro metal à proteína, uma vez que os valores de entalpia e entropia das mutantes foram diferentes da proteína WT.

Segundo Rantanen e colaboradores (2007), o resíduo Asn160 (homólogo à Arg164 da PrpC) está correlacionado à presença do terceiro íon metálico no sítio ativo de SaSTP de *S. agalactiae*, mas não está diretamente envolvido na sua coordenação. Por outro lado, foi observado, tanto por cristalografia quanto por ITC, que a substituição do resíduo Asp119 por uma alanina em tPpA de *T. elongatus* (homólogo ao Asp122 da PrpC) causa a perda do terceiro metal no sítio ativo (SU et al., 2011). Segundo Tanoue e colaboradores (2013) as análises de ITC da PP2C α humana demonstraram que a mutação D146A (resíduo homólogo ao Asp122) diminuiu a afinidade de ligação do terceiro íon de magnésio, mas não impediu a ligação do terceiro metal ao sítio ativo. No entanto, foi relatado que o terceiro metal poderia estar localizado em dois subsítios, uma vez que os resultados para a mutação D243A foram similares aos da mutação D146A e a proteína duplo-mutante D146/D243A aboliu completamente a ligação de terceiro metal ao sítio ativo.

Figura 63. Caracterização da ligação de baixa afinidade do íon Mn^{2+} à PrpC e mutantes por ITC.



As titulações foram realizadas a 20 °C com 15 μM de proteína mais 2 equivalentes de $MnCl_2$ na célula e 3 mM de $MnCl_2$ na seringa. Na figura

representativa, (A) o painel superior apresenta os dados brutos de ITC ($\mu\text{cal}/\text{seg}$ pelo tempo (min) e razão molar) da PrpC WT, enquanto o painel inferior mostra os dados integrados (Kcal/mol de injetante pelo tempo (min) e razão molar) da PrpC WT, PrpC_D122A e PrpC_R164A. (B) Ambos os painéis apresentam os dados brutos de ITC da PrpC_R164A (superior) e PrpC_D122A (inferior).

Tabela 21. Parâmetros termodinâmicos da ligação de baixa afinidade do íon Mn^{2+} à PrpC e mutantes

PrpC	K_d, M^{-1}	$\Delta H, \text{Kcal.mol}^{-1}$	$\Delta S, \text{cal.mol}^{-1}.\text{deg}^{-1}$
WT	$1,61 \pm 0,1 \times 10^4$	$-12 \pm 3,6$	$-21,7 \pm 12$
R164A	$1,5 \pm 0,3 \times 10^4$	$-10,1 \pm 1,2$	$-17 \pm 5,2$
D122A	$2,1 \pm 0,9 \times 10^4$	$-6,9 \pm 1,3$	$-3,9 \pm 5$

15 μM de proteína mais 2 equivalentes de MnCl_2 titulados com 3 mM de MnCl_2 a 20 °C. Os dados representam a média \pm DP de dois experimentos independentes.

O sequenciamento do genoma de diversos procariotos, incluindo micro-organismos patogênicos, revelou a existência de proteínas serina/treonina cinases, bem como suas antagonistas, proteínas fosfatases. Além disso, a importância de muitas dessas cinases ao mecanismo de virulência bacteriano já foi determinado, ao contrário das fosfatases, que pouco se sabe sobre o papel das mesmas nesse mecanismo (AGARWAL et al., 2012).

Com base na estrutura primária, a PrpC foi classificada como uma proteína da família PPM, subfamília PP2C. Fosfatases PP2C são definidas por um domínio catalítico conservado com nove a onze seqüências motivos e oito resíduos de aminoácidos altamente conservados, sendo os resíduos envolvidos no ataque nucleofílico e na ligação ao substrato (BORK et al., 1996; ZHANG; SHI, 2004). Apesar do alinhamento de seqüência ter revelado que a PrpC possui pouca identidade de seqüência com outras proteínas PP2C (menos de 30%), resultados similares foram relatados para a MspP de *M. smegmatis* (RANTANEN et al., 2007), a PstP de *M. tuberculosis* (PULLEN et al., 2004) e a PrpZ de *S. enterica* serovar Typhi (LAI; MOUAL, 2005).

A PP2C α humana teve sua estrutura cristalina resolvida em 1996, sendo o primeiro relato para proteínas PP2C. A análise da estrutura terciária de PP2C α revelou um sítio catalítico com um centro metálico binuclear, no qual quatro ácidos aspárticos e um ácido glutâmico, juntamente com seis moléculas de água, coordenam dois íons de manganês (DAS et al., 1996). Posteriormente, a análise da estrutura terciária de PP2C bacterianas identificou uma arquitetura similar ao

domínio catalítico N-terminal de PP2C α , mas em vez de um centro metálico binuclear, essas proteínas apresentaram um terceiro íon metálico no sítio ativo (PULLEN et al., 2004; BELLINZONI et al., 2007; RANTANEN et al., 2007; SCHLICKER et al., 2008). No entanto, a análise da estrutura terciária de proteínas PP2C de plantas revelou que o terceiro metal no sítio ativo não é uma exclusividade de PP2C bacterianas (MELCHER et al., 2009; DUPEUX et al., 2011; SOON et al., 2012).

O centro metálico binuclear composto por quatro resíduos de ácido aspártico está conservado na PrpC, Asp19, Asp36, Asp199 e Asp237, bem como os dois resíduos responsáveis pela coordenação do terceiro metal, Asp122 e Asp199. Além dos dois resíduos de ácido aspártico, um terceiro resíduo de aminoácido é responsável pela coordenação do terceiro metal na PstP de *M. tuberculosis* (Ser160) (PULLEN et al., 2004) e na MspP de *M. smegmatis* (His153) (BELLINZONI et al., 2007). Em PP2C bacterianas, geralmente essa posição é ocupada por um resíduo de Ser, Asn, His ou Arg (PULLEN et al., 2004). Na PrpC esta posição corresponde ao resíduo Arg164, uma vez que a PrpC conserva os dois resíduos de ácido aspártico envolvidos na ligação do terceiro metal e um resíduo de arginina na posição correspondente à Ser160 de PstP de *M. tuberculosis*, é provável que a PrpC possua um terceiro sítio de ligação ao metal.

Este estudo revelou que a eficiência catalítica da PrpC (k_{cat}/K_m $6.128 \pm 779 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) usando pNPP como substrato foi similar à atividade de outras proteínas PP2C, MspP de *M. smegmatis* (k_{cat}/K_m $4.310 \pm 94 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), PP2C α humana (k_{cat}/K_m $1.100 \pm 90 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (WEHENKEL et al., 2007), tPphA de *T. elongatus* (k_{cat}/K_m $1.809 \pm 117 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (SU et al., 2011) e PrpZ de *S. enterica* serovar Typhi (k_{cat}/K_m $1.300 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (LAI; MOUAL, 2005). Em geral, proteínas PP2C, membros da família PPM, apresentam atividade enzimática tanto com íons de Mg^{2+} quanto com íon de Mn^{2+} , em alguns casos, elas ainda apresentam dependência diferente de metal para determinado substrato (TANOUE et al., 2013). Porém, para a PrpC, observou-se atividade enzimática apenas na presença de íons Mn^{2+} , para todos os substratos avaliados, resultados similares foram relatados para a hPTMP, uma fosfatase mitocondrial humana (JOSHI et al., 2007). O K_{metal} da PrpC (k_{cat}/K_{metal} $30.260 \pm 1.349 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) determinado usando pNPP como substrato está de acordo com o relatado para outras PP2C, tPphA de *T. elongatus* (k_{cat}/K_{metal} $2.000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (SU et al., 2011) e MspP de *M. smegmatis* (k_{cat}/K_{metal} $4.995 \pm 239 \text{ M}^{-1}$

s⁻¹) (BELLINZONI et al., 2007), e PP2C α humana (k_{cat}/K_{metal} 4.960 \pm 100 M⁻¹s⁻¹) (JACKSON et al., 2003).

Em células de *E. coli* a concentração regular de íons Mn²⁺ está entre 10 a 100 μ M, mas em determinadas condições, a concentração desse íon pode alcançar a faixa de milimolar (LAI; MOUAL, 2005). Assim, baseando-se na necessidade de altas concentrações de metais para a atividade de fosfatases PP2C e a disponibilidade de íons de Mg²⁺ e Mn²⁺ livres nas células, foi proposto que sob condições fisiológicas essas enzimas estão parcialmente ocupadas por metais e parcialmente ativas. Dessa forma, a variação da concentração de metal poderia ser uma estratégia utilizada pela célula para regular a atividade dessas enzimas, assim como, a sua interação com outros constituintes celulares poderia afetar a sua afinidade pelo metal (WEHENKEL et al., 2007; TANOUE et al., 2013).

Além disso, a atividade ótima da PrpC foi detectada em pH alcalino, pH 9,0, resultados similares foram observados para a PrpC de *B. subtilis* (pH 8,8) e a PrpZ de *S. enterica* serovar Typhi (pH 9,5) (OBUCHOWSKI et al., 2000; LAI; MOUAL, 2005). A análise da atividade de PP2C α humana em diferentes pHs revelou duas ionizações essenciais à catálise, uma deprotonação a pK_a 7, correspondendo à molécula de água que conecta dois átomos de metais, metal 1 e 2, e uma protonação a pK_a 9, correspondendo a His62 que age como um ácido geral durante a catálise (JACKSON et al., 2003; BELLINZONI et al., 2007). Segundo Tanoue e colaboradores (2013), a ligação do terceiro metal a PP2C α também contribui para a dependência do pH na atividade enzimática, visto que PP2C α exibe redução da afinidade pelo metal e da atividade enzimática quando exposta a pH mais ácido. Além disso, a pH 5,5, a MspP de *M. smegmatis* exibiu somente 1,5% da sua atividade enzimática sobre pNPP comparada à atividade a pH 7,5, além de perder a coordenação do terceiro íon metálico no sítio ativo. Assim, indicando que a correta protonação da enzima é essencial para a atividade enzimática e à afinidade dos íons metálicos (WEHENKEL et al., 2007).

Analisando os resultados de atividade enzimática pôde-se observar que ambos os resíduos mutados são importantes à catálise da PrpC, uma vez que a proteína PrpC_D122A não exibiu atividade e a PrpC_R164A apresentou atividade moderada. A substituição do resíduo Asp119 por uma alanina levou à perda da atividade enzimática e do terceiro íon metálico no sítio ativo da tPphA de *T. elongatus*, sem alterar a coordenação do primeiro e segundo íon metálico. Dessa forma, o estudo da relação estrutura-função da mutante D119A demonstrou que

apenas o centro metálico binuclear não é suficiente para a catálise da tPphA (SU et al., 2011). Recentemente, Tanoue e colaboradores (2013) confirmaram que a PP2C α humana requer a ligação de três íons metálicos para a catálise, sendo o terceiro íon metálico coordenado pelos resíduos Asp146, Asp239 e Asp243. Ao contrário da tPphA de *T. elongatus* e da SaSTP de *S. agalactiae* (SCHLICKER et al., 2008), na PstP de *M. tuberculosis* e na MspP de *M. smegmatis* (PULLEN et al., 2004; BELLINZONI et al., 2007), os resíduos, equivalentes à Arg164, do subdomínio FLAP Ser160 e His153, respectivamente, participam diretamente na coordenação do terceiro metal. No entanto, a mutação S160A na PstP de *M. tuberculosis* não afetou significativamente a atividade enzimática. O resíduo do subdomínio FLAP de tPphA de *T. elongatus* correspondente à Ser160 da PstP de *M. tuberculosis* é a His161, apesar desse resíduo não coordenar diretamente o terceiro metal, a substituição do mesmo por um resíduo de alanina provocou a diminuição da atividade enzimática da tPphA, ressaltando a importância da interação do subdomínio FLAP e do centro metálico trinuclear (SU; FORCHHAMMER, 2013).

Embora a ligação do terceiro metal ao sítio catalítico da PrpC desempenhe uma função na catálise, os presentes resultados de MS e ITC indicam que ambas as mutantes ligam ao terceiro íon de Mn²⁺. A análise de interação entre Mn²⁺ e a tPphA de *T. elongatus* por ITC revelou a ligação de três íons por molécula de proteínas, sendo a ligação do M3 de baixa afinidade (SU et al., 2011). Na PP2C α humana a titulação do íon Mg²⁺ por ITC também confirmou a baixa afinidade da ligação do M3, mas em contraste aos dados da tPphA, a mutação D146A diminui a afinidade de ligação do M3 em vez de aboli-la como aconteceu na tPphA D119A. Além disso, o estudo indicou outro resíduo de aminoácido da PP2C α envolvido na ligação do terceiro metal, o Asp243 (TANOUE et al., 2013). Nesse sentido, os vários estudos da relação estrutura-função de proteínas PP2C têm demonstrado diferentes modos de coordenação do terceiro íon metálico ao sítio ativo (SCHLICKER et al., 2008), assim sendo, não se pode descartar a possibilidade da PrpC apresentar um centro metálico trinuclear, uma vez que o Asp122 é importante para a catálise.

As análises de CD UV-distante da PrpC indicam uma mistura de conteúdo de α -hélices e folhas- β , e que a ligação do metal não interfere significativamente no conteúdo de estrutura secundária da PrpC. Os espectros de fluorescência (excitação a 280 nm), na presença e ausência de metal, são dominados pela emissão dos resíduos de Tyr (λ_{\max} 303

nm), contudo, na presença de metal, os espectros apresentam um aumento na intensidade de fluorescência. O aumento da intensidade da fluorescência intrínseca devido à ligação de íons metálicos já foi relatado para outras metaloproteínas, como ACF II e MBP-C, o que indica que a ligação do metal induz sutis alterações conformacionais (NG; WEIS, 1998; SHEN et al., 2011). Segundo Su e colaboradores (2012; 2013), a estrutura cristalina da tPphA D119A de *T. elongatus* mostrou-se em geral muito semelhante à proteína WT, exceto pelo número de íons metálicos no sítio ativo e pela posição de um segmento do subdomínio FLAP próximo ao terceiro íon metálico, que move-se 1,8 Å para o centro. Dessa forma, supõe-se que o metal tenha uma função importante na conformação da proteína, mas sem alterar o seu conteúdo de estrutura secundária.

Como a estrutura cristalina da PP2C α humana na forma apo apresentou um RMSD de apenas 0,4 Å comparada à estrutura na forma holo, foi predito que os íons de metal não são essenciais para estabilizar a estrutura proteica (BORK et al., 1996). No entanto, os resultados de desnaturação térmica revelaram que os íons metálicos afetam a estabilidade térmica da PrpC. A proteína incubada com íons Mn²⁺ apresentou maior integridade funcional e estrutural quando exposta a altas temperaturas, comparada à proteína na forma apo. Além disso, os perfis de desnaturação térmica mostram que a PrpC na forma holo (WT e mutantes) exibe uma resistência maior à desnaturação térmica do que a proteína na forma apo, o que corrobora os resultados de fluorescência intrínseca a 50 °C. Baseando-se nesses resultados, supõe-se que a ligação do metal confere estabilidade estrutural à PrpC. Conclusões similares foram relatadas para HsCen-2, apesar de ambos os íons Ca²⁺ e Mg²⁺ ligarem à proteína, apenas os íons de Ca²⁺ aumentaram a estabilidade térmica de HsCen-2. Dessa forma, o trabalho demonstrou que o cálcio regula a estrutura e função de HsCen-2 aumentando sua estabilidade sem alterar sua estrutura secundária e terciária (CRAIG et al., 2006).

3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os avanços dos sequenciamentos genômicos de procariotos, um grande número de proteínas PPM homólogas às eucariotas vêm sendo identificadas, dessa forma, ressaltando a importância da transdução de sinais via fosforilação em procariotos, principalmente em bactérias patogênicas, uma vez que elas podem utilizar essas proteínas para explorar a sinalização do hospedeiro (SHI, 2009; AGARWAL et al., 2012).

Embora a função celular e os alvos moleculares da PrpC não são conhecidos, em *M. pneumoniae* a PrpC regula o estado de fosforilação de HPr, assim regulando o sistema fosfotransferase (HALBEDEL et al., 2006). Além disso, o fosfoproteoma do *M. pneumoniae* da cepa mutante para *prpC*, identificou cinco proteínas reguladas por PrpC, sendo quatro delas proteínas envolvidas em citaderência (SCHMIDL et al., 2010b). Recentemente, foi relatado o envolvimento de uma das três fosfatases anotadas no genoma do *M. genitalium*, a MG207, na virulência desse patógeno (MARTINEZ et al., 2013).

O presente trabalho apresentou a caracterização bioquímica da PrpC de *M. synoviae*, a única proteína fosfatase anotada no seu genoma. De acordo com os resultados, conclui-se que a PrpC é um membro funcional da família PPM, uma vez que foi capaz de desfosforilar resíduos de Ser/Thr e requer o íon Mn^{2+} para sua atividade enzimática. Inesperadamente, a PrpC foi capaz de desfosforilar resíduos de Tyr. Como até o momento pouco se sabe sobre a fosforilação desse resíduo em *Mycoplasma* (SCHMIDL et al., 2010b), essa descoberta precisa ser melhor investigada. Os resultados de alinhamento de sequências, análise mutacional, MS e ITC fornecem evidências que a PrpC pode apresentar um terceiro sítio metálico essencial à catálise. Além disso, as análises estruturais revelaram que a ligação do íon metálico não é essencial para o enovelamento correto da PrpC, visto que o metal não altera o conteúdo de estrutura secundária da proteína. No entanto, baseando-se nos dados de desnaturação térmica e fluorescência nós concluímos que a ligação do íon Mn^{2+} à PrpC aumenta a sua estabilidade.

3.5 PERSPECTIVAS

A clonagem e a caracterização bioquímica da PrpC de *M. synoviae* é apenas o início de uma série de estudos que ainda podem ser realizados nesse tema.

Para a continuação deste estudo tem-se como perspectivas:

Investigar a dupla especificidade de substrato da PrpC *in vitro* com outros peptídeos fosforilados em resíduo de tirosina, além de substratos proteicos.

Identificar e caracterizar os substratos fisiológicos da PrpC em *M. synoviae*.

Investigar uma possível interação entre a proteína serina/treonina cinase (PknB), gene adjacente ao gene *prpC*, e serina/treonina fosfatase (PrpC) de *M. synoviae* para avaliar se elas formam um par funcional.

Determinar a estrutura cristalina da PrpC por Difração de Raio-X.

Avaliar uma biblioteca de compostos orgânicos buscando identificar candidatos a inibidores da PrpC.

Investigar a implicação biológica da PrpC na fisiologia e patogenicidade de *M. synoviae*.

REFERÊNCIAS

- AEPFELBACHER, M.; TRASAK, C.; RUCKDESCHEL, K. Effector functions of pathogenic *Yersinia* species. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 98, n. 3, p. 521-529, 2007.
- AGARWAL, S. et al. Serine/Threonine Phosphatase (SP-STP), Secreted from *Streptococcus pyogenes*, Is a Pro-apoptotic Protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 12, p. 9147-9167, 2012.
- AL-KAHRAMAN, Y. S. A.; YASINZAI, M.; SINGH, G. Evaluation of some classical hydrazones of ketones and 1,2-diketones as antileishmanial, antibacterial and antifungal agents. **Archives of Pharmacal Research**, v. 35, n. 6, p. 1009-1013, 2012.
- ALONSO, A. et al. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. **Cell**, v. 117, n. 6, p. 699-711, 2004.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. **FEBS Journal**, v. 272, n. 20, p. 5101-5109, 2005.
- ARIÑO, J.; CASAMAYOR, A.; GONZÁLEZ, A. Type 2C protein phosphatases in fungi. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 1, p. 21-33, 2011.
- ARNOLD, K. et al. The SWISS-MODEL workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**, v. 22, n. 2, p. 195-201, 2006.
- AUSUBEL, F. M. et al. **Short protocols in molecular biology**. 2. 1992. 740
- BACH, H. et al. *Mycobacterium tuberculosis* Virulence Is Mediated by PtpA Dephosphorylation of Human Vacuolar Protein Sorting 33B. **Cell Host and Microbe**, v. 3, n. 5, p. 316-322, 2008.
- BAHTA, M.; BURKE, T. R. *Yersinia pestis* and approaches to targeting its outer protein H protein-tyrosine phosphatase (YopH). **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 33, p. 5726-5734, 2012.
- BAHTA, M. et al. Utilization of Nitrophenylphosphates and Oxime-Based Ligation for the Development of Nanomolar Affinity Inhibitors of the

Yersinia pestis Outer Protein H (YopH) Phosphatase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 8, p. 2933-2943, 2011.

BAKAL, R. L.; GATTANI, S. G. Identification and development of 2,5-disubstituted oxadiazole as potential candidate for treatment of XDR and MDR tuberculosis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 0, p. 278-282, 2012.

BARFORD, D.; DAS, A. K.; EGLOFF, M. P. **The structure and mechanism of protein phosphatases: Insights into catalysis and regulation**. 27: 133-164 p. 1998.

BARR, A. J. Protein tyrosine phosphatases as drug targets: Strategies and challenges of inhibitor development. **Future Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 10, p. 1563-1576, 2010.

BEDIA, K.-K. et al. Synthesis and characterization of novel hydrazide-hydrazones and the study of their structure-antituberculosis activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 11, p. 1253-1261, 2006.

BELLINZONI, M. et al. Insights into the Catalytic Mechanism of PPM Ser/Thr Phosphatases from the Atomic Resolution Structures of a Mycobacterial Enzyme. **Structure**, v. 15, n. 7, p. 863-872, 2007.

BERESFORD, N. et al. MptpB, a virulence factor from *Mycobacterium tuberculosis*, exhibits triple-specificity phosphatase activity. **Biochemical Journal**, v. 406, n. 1, p. 13-18, 2007.

BERESFORD, N. J. et al. Inhibition of MptpB phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis* impairs mycobacterial survival in macrophages. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 5, p. 928-936, 2009.

BHATTARAI, B. R. et al. Thiazolidinedione derivatives as PTP1B inhibitors with antihyperglycemic and antiobesity effects. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 21, p. 6161-6165, 2009.

BIALY, L.; WALDMANN, H. Inhibitors of protein tyrosine phosphatases: Next-generation drugs? **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 44, n. 25, p. 3814-3839, 2005.

BLACK, D. S.; BLISKA, J. B. Identification of p130(Cas) as a substrate of *Yersinia* YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions. **EMBO Journal**, v. 16, n. 10, p. 2730-2744, 1997.

BLASKOVICH, M. A. T. Drug discovery and protein tyrosine phosphatases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 17, p. 2095-2176, 2009.

BÖHMER, F. et al. Protein tyrosine phosphatase structure-function relationships in regulation and pathogenesis. **FEBS Journal**, v. 280, n. 2, p. 413-431, 2013.

BORK, P. et al. The protein phosphatase 2C (PP2C) superfamily: Detection of bacterial homologues. **Protein Science**, v. 5, n. 7, p. 1421-1425, 1996.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRANDÃO, T. A. S.; HENGGE, A. C.; JOHNSON, S. J. Insights into the Reaction of Protein-tyrosine Phosphatase 1B: CRYSTAL STRUCTURES FOR TRANSITION STATE ANALOGS OF BOTH CATALYTIC STEPS. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 21, p. 15874-15883, May 21, 2010 2010.

BRANDÃO, T. A. S. et al. Impaired Acid Catalysis by Mutation of a Protein Loop Hinge Residue in a YopH Mutant Revealed by Crystal Structures. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 2, p. 778-786, 2008.

BRAUTIGAN, D. L. Protein Ser/Thr phosphatases – the ugly ducklings of cell signalling. **FEBS Journal**, v. 280, n. 2, p. 324-325, 2013.

BUIM, M. R. et al. *Mycoplasma synoviae* cell invasion: Elucidation of the *Mycoplasma* pathogenesis in chicken. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 34, n. 1, p. 41-47, 2011.

BUIM, M. R. et al. Epidemiological survey on *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* by multiplex PCR in commercial poultry. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 552-556, 2009.

BUKHARI, S. N. A.; JASAMAI, M.; JANTAN, I. Synthesis and biological evaluation of chalcone derivatives (mini review). **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 13, p. 1394-1403, 2012.

BURNSIDE, K.; RAJAGOPAL, L. Aspects of eukaryotic-like signaling in Gram-positive cocci: a focus on virulence. **Future Microbiology**, v. 6, n. 7, p. 747-761, 2011.

CAPUTTO, M. E. et al. Synthesis and biological evaluation of some novel 1-indanone thiazolylhydrazone derivatives as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 0, p. 155-163, 2012.

CARROU, J. L. et al. Persistence of *Mycoplasma synoviae* in hens after two enrofloxacin treatments and detection of mutations in the parC gene. **Veterinary Research**, v. 37, n. 1, p. 145-154, 2006.

CHANDRA, K. et al. Design, synthesis and inhibition activity of novel cyclic peptides against protein tyrosine phosphatase A from *Mycobacterium tuberculosis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 23, p. 8365-8373, 2010.

CHANDRA, K. et al. Design, synthesis and inhibition activity of a novel cyclic enediyne amino acid conjugates against MPTpA. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 10, p. 3274-3279, 2011.

CHAO, J. et al. Protein kinase and phosphatase signaling in *Mycobacterium tuberculosis* physiology and pathogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1804, n. 3, p. 620-627, 2010.

CHEN, L. et al. Identification and characterization of novel inhibitors of mPTPB, an essential virulent phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis*. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 1, n. 7, p. 355-359, 2010.

CHEN, Y. T.; SETO, C. T. Divalent and Trivalent α -Ketocarboxylic Acids as Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatases. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 18, p. 3946-3952, 2002.

CHI, M.-C. et al. Biophysical Characterization of a Recombinant α -Amylase from Thermophilic *Bacillus* sp. strain TS-23. **The Protein Journal**, v. 29, n. 8, p. 572-582, 2010.

- CHIANG, C.-Y. et al. Challenges to the global control of tuberculosis. **Respirology**, v. 18, n. 4, p. 596-604, 2013.
- CHIARADIA, L. D. et al. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of chalcone derivatives as potent inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatases (PtpA and PtpB). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 1, p. 390-402, 2012.
- CHIARADIA, L. D. et al. Synthetic chalcones as efficient inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase PtpA. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 23, p. 6227-6230, 2008.
- CHRISTIAN, M. D. Biowarfare and Bioterrorism. **Critical Care Clinics**, v. 29, n. 3, p. 717-756, 2013.
- CITTI, C.; BLANCHARD, A. Mycoplasmas and their host: Emerging and re-emerging minimal pathogens. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 196-203, 2013.
- CITTI, C.; NOUVEL, L. X.; BARANOWSKI, E. Phase and antigenic variation in mycoplasmas. **Future Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 1073-1085, 2010.
- CIZELJ, I. et al. *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* express a cysteine protease CysP, which can cleave chicken IgG into Fab and Fc. **Microbiology**, v. 157, n. 2, p. 362-372, 2011.
- COHEN, P. The origins of protein phosphorylation. **Nature Cell Biology**, v. 4, n. 5, p. E127-E130, 2002.
- COLE, S. T. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Microbiology**, v. 148, n. 10, p. 2919-2928, 2002.
- COMEAU, A. B. et al. A Focused Library of Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 18, p. 6768-6772, 2010.
- CORI, G. T.; GREEN, A. A. CRYSTALLINE MUSCLE PHOSPHORYLASE: II. PROSTHETIC GROUP. **Journal of Biological Chemistry**, v. 151, p. 31-38, 1943.
- COZZONE, A. et al. Protein phosphorylation on tyrosine in bacteria. **Archives of Microbiology**, v. 181, n. 3, p. 171-181, 2004.

CRAIG, T. et al. Metal-binding properties of human centrin-2 determined by micro-electrospray ionization mass spectrometry and UV spectroscopy. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 17, n. 8, p. 1158-1171, 2006.

CRUZ-KNIGHT, W.; BLAKE-GUMBS, L. Tuberculosis: An overview. **Primary Care - Clinics in Office Practice**, v. 40, n. 3, p. 743-756, 2013.

DAS, A. K. et al. Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. **The EMBO journal**, v. 15, n. 24, p. 6798-6809, 1996.

DEANA, A. D. et al. An investigation of the substrate specificity of protein phosphatase 2C using synthetic peptide substrates; comparison with protein phosphatase 2A. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1051, n. 2, p. 199-202, 1990.

DELANO, W. L. **The PyMOL Molecular Graphics System**. San Carlos, CA: DeLano Scientific, 2002.

DELORME, V. et al. Inhibits *Mycobacterium tuberculosis* Lipolytic Enzymes Belonging to the Hormone-Sensitive Lipase Family and Alters Mycobacterial Growth. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. e46493, 2012.

DOMBRÁDI, V.; KRIEGLSTEIN, J.; KLUMPP, S. Regulating the regulators. Conference on protein phosphorylation and protein phosphatases. **EMBO Reports**, v. 3, n. 2, p. 120-124, 2002.

DRUMMOND, N. et al. *Yersinia enterocolitica*: A brief review of the issues relating to the zoonotic pathogen, public health challenges, and the pork production chain. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 3, p. 179-189, 2012.

DUCATI, R. G. et al. The resumption of consumption : a review on tuberculosis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 697-714, 2006.

DUPEUX, F. et al. Modulation of Abscisic Acid Signaling in Vivo by an Engineered Receptor-Insensitive Protein Phosphatase Type 2C Allele. **Plant Physiology**, v. 156, n. 1, p. 106-116, 2011.

DUSANIC, D. et al. *Mycoplasma synoviae* induces upregulation of apoptotic genes, secretion of nitric oxide and appearance of an apoptotic

phenotype in infected chicken chondrocytes. **Veterinary Research**, v. 43, n. 1, p. 7, 2012.

DUŠANIĆ, D. et al. *Mycoplasma synoviae* invades non-phagocytic chicken cells in vitro. **Veterinary Microbiology**, v. 138, n. 1–2, p. 114-119, 2009.

ECCO, G. **Efeito da S-nitrosilação nas enzimas tirosina fosfatases PtpA e PtpB de *Mycobacterium tuberculosis*** 2010. TCC (Graduação em Ciências Biológicas). Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

ECCO, G. et al. *Mycobacterium tuberculosis* tyrosine phosphatase A (PtpA) activity is modulated by S-nitrosylation. **Chemical Communications**, v. 46, n. 40, p. 7501-7503, 2010.

EDELHOCH, H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. **Biochemistry**, v. 6, n. 7, p. 1948-1954, 1967.

EL-GAZZAR, M. M.; WETZEL, A. N.; RAVIV, Z. The genotyping potential of the *Mycoplasma synoviae* v1hA gene. **Avian Diseases**, v. 56, n. 4, p. 711-719, 2012.

FATHI, A.-R. et al. Nonradioactive technique to measure protein phosphatase 2A-like activity and its inhibition by drugs in cell extracts. **Analytical Biochemistry**, v. 310, n. 2, p. 208-214, 2002.

FISCHER, E. H.; KREBS, E. G. Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. **Journal of Biological Chemistry**, v. 216, p. 121-132, 1955.

FJELD, C. C.; DENU, J. M. Kinetic analysis of human serine/threonine protein phosphatase 2C α . **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 29, p. 20336-20343, 1999.

FONSECA, M. M. et al. A model for the RecA protein of *Mycoplasma synoviae*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. SUPPL. 1, p. 290-295, 2007.

FOURNET, A. et al. Antileishmanial Activity of a Tetralone Isolated from *Ampelocera edentula*, a Bolivian Plant Used as a Treatment for Cutaneous Leishmaniasis. **Planta Medica**, v. 60, n. 01, p. 8-12, 1994.

GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity-a rapid access to atomic charges. **Tetrahedron**, v. 36, n. 22, p. 3219-3228, 1980.

GEOGHEGAN, K. F. et al. Spontaneous α -N-6-Phosphogluconoylation of a "His Tag" in *Escherichia coli*: The Cause of Extra Mass of 258 or 178 Da in Fusion Proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 267, n. 1, p. 169-184, 1999.

GRUNDNER, C.; COX, J. S.; ALBER, T. Protein tyrosine phosphatase PtpA is not required for *Mycobacterium tuberculosis* growth in mice. **FEMS Microbiology Letters**, v. 287, n. 2, p. 181-184, 2008.

GRUNDNER, C. et al. Structural Basis for Selective Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* Protein Tyrosine Phosphatase PtpB. **Structure**, v. 15, n. 4, p. 499-509, 2007.

GUAN, K.; DIXON, J. E. Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. **Science**, v. 249, n. 4968, p. 553-556, 1990.

GUIRADO, E.; SCHLESINGER, L. S.; KAPLAN, G. Macrophages in tuberculosis: Friend or foe. **Seminars in Immunopathology**, v. 35, n. 5, p. 563-583, 2013.

HALBEDEL, S. et al. Regulatory Protein Phosphorylation in *Mycoplasma pneumoniae*: A PP2C-type Phosphatase Serves to Dephosphorylate HPr(Ser-P). **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 36, p. 26253-26259, 2006.

HALLÉ, M.; TREMBLAY, M. L.; MENG, T. C. Protein tyrosine phosphatases: Emerging regulators of apoptosis. **Cell Cycle**, v. 6, n. 22, p. 2773-2781, 2007.

HALLGAS, B. et al. Characterization of lipophilicity and antiproliferative activity of E-2-arylmethylene-1-tetralones and their heteroanalogues. **Journal of Chromatography B**, v. 819, n. 2, p. 283-291, 2005.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v. 5, n. 7, p. 294-300, 2000.

HASEGAWA, H.; HOLM, L. Advances and pitfalls of protein structural alignment. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 19, n. 3, p. 341-348, 2009.

HE, R. et al. Small molecule tools for functional interrogation of protein tyrosine phosphatases. **FEBS Journal**, v. 280, n. 2, p. 731-750, 2013a.

HE, R. et al. Organocatalytic multicomponent reaction for the acquisition of a selective inhibitor of mPTPB, a virulence factor of tuberculosis. **Chemical Communications**, v. 49, n. 20, p. 2064-2066, 2013b.

HE, Y. et al. Discovery and Evaluation of Novel Inhibitors of *Mycobacterium* Protein Tyrosine Phosphatase B from the 6-Hydroxy-benzofuran-5-carboxylic Acid Scaffold. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 3, p. 832-842, 2013c.

HENDRIKS, W. J. A. J. et al. Protein tyrosine phosphatases in health and disease. **FEBS Journal**, v. 280, n. 2, p. 708-730, 2013.

HENEBERG, P. Finding the smoking gun: Protein tyrosine phosphatases as tools and targets of unicellular microorganisms and viruses. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 10, p. 1530-1566, 2012.

HOSSAIN, M. M.; NORAZMI, M.-N. Pattern Recognition Receptors and Cytokines in *Mycobacterium tuberculosis* Infection - The Double-Edged Sword? **BioMed Research International**, v. 2013, p. 18, 2013.

HU, J. et al. Synthesis and biological evaluation of novel thiazolidinone derivatives as potential anti-inflammatory agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 0, p. 292-301, 2013a.

HU, X.; VUJANAC, M.; EREC STEBBINS, C. Computational analysis of tyrosine phosphatase inhibitor selectivity for the virulence factors YopH and SptP. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 23, n. 2, p. 175-187, 2004.

HU, X. et al. Inhibitors of the *Yersinia* protein tyrosine phosphatase through high throughput and virtual screening approaches. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 4, p. 1056-1062, 2013b.

HUANG, X. et al. Asperterpenoid A, a New Sesterterpenoid as an Inhibitor of *Mycobacterium tuberculosis* Protein Tyrosine Phosphatase B from the

Culture of *Aspergillus* sp. 16-5c. **Organic Letters**, v. 15, n. 4, p. 721-723, 2013.

HUANG, Z. et al. Derivatives of Salicylic Acid as Inhibitors of YopH in *Yersinia pestis*. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 76, n. 2, p. 85-99, 2010.

JACKSON, M. D.; FJELD, C. C.; DENU, J. M. Probing the function of conserved residues in the serine/threonine phosphatase PP2C α . **Biochemistry**, v. 42, n. 28, p. 8513-8521, 2003.

JAFFREY, S. R.; SNYDER, S. H. The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. **Science's STKE [electronic resource] : signal transduction knowledge environment**, v. 2001, n. 86, 2001.

JOHNSON, L. N. The regulation of protein phosphorylation. **Biochemical Society Transactions**, v. 37, n. 4, p. 627-641, 2009.

JOHNSON, T. O.; ERMOLIEFF, J.; JIROUSEK, M. R. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for diabetes. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 1, n. 9, p. 696-709, 2002.

JONES, G. et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 3, p. 727-748, 1997.

JOSHI, M. et al. Identification of a novel PP2C-type mitochondrial phosphatase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 356, n. 1, p. 38-44, 2007.

KHAN, I.; IBRAR, A.; ABBAS, N. Oxadiazoles as Privileged Motifs for Promising Anticancer Leads: Recent Advances and Future Prospects. **Archiv der Pharmazie**, p. n/a-n/a, 2013.

KIM, S.-E. et al. Isothiazolidinone (IZD) as a phosphoryl mimetic in inhibitors of the *Yersinia pestis* protein tyrosine phosphatase YopH. **Acta Crystallographica Section D**, v. 67, n. 7, p. 639-645, 2011.

KIM, S. J.; RYU, S. E. Structure and catalytic mechanism of human protein tyrosine phosphatase. **BMB Reports**, v. 45, n. 12, p. 693-699, 2012.

- KOUL, A. et al. Cloning and Characterization of Secretory Tyrosine Phosphatases of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 19, p. 5425-5432, 2000.
- KOUL, A. et al. Interplay between mycobacteria and host signalling pathways. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 189-202, 2004.
- KREBS, E. G.; FISCHER, E. H. The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle. **BBA - General Subjects**, v. 20, n. C, p. 150-157, 1956.
- KRISSINEL, E.; HENRICK, K. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 60, n. 12 I, p. 2256-2268, 2004.
- KÜÇÜKGÜZEL, Ş. G. et al. Synthesis, characterisation and biological activity of novel 4-thiazolidinones, 1,3,4-oxadiazoles and some related compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, n. 3, p. 197-206, 2002.
- KUETE, V.; SANDJO, L. Isobavachalcone: An overview. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v. 18, n. 7, p. 543-547, 2012.
- LACHANCE, H. et al. Charting, Navigating, and Populating Natural Product Chemical Space for Drug Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 13, p. 5989-6001, 2012.
- LAI, S. M.; MOUAL, H. L. PrpZ, a *Salmonella enterica* serovar Typhi serine/threonine protein phosphatase 2C with dual substrate specificity. **Microbiology**, v. 151, n. 4, p. 1159-1167, 2005.
- LAWN, S. D.; ZUMLA, A. I. Tuberculosis. **The Lancet**, v. 378, n. 9785, p. 57-72, 2011.
- LEE, K. et al. Synthesis of tripeptides as potent *Yersinia* protein tyrosine phosphatase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 18, p. 4037-4042, 2005.
- LEE, K. et al. Tripeptide inhibitors of *Yersinia* protein-tyrosine phosphatase. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, n. 15, p. 2577-2581, 2003.

LIANG, F. et al. Aurintricarboxylic Acid Blocks in Vitro and in Vivo Activity of YopH, an Essential Virulent Factor of *Yersinia pestis*, the Agent of Plague. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 43, p. 41734-41741, 2003.

LIU, F. et al. A rapid oxime linker-based library approach to identification of bivalent inhibitors of the *Yersinia pestis* protein-tyrosine phosphatase, YopH. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 9, p. 2813-2816, 2010.

LIU, S. et al. Aryl Vinyl Sulfonates and Sulfones as Active Site-Directed and Mechanism-Based Probes for Protein Tyrosine Phosphatases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 26, p. 8251-8260, 2008.

LOO, J. A. Probing protein-metal ion interactions by electrospray ionization mass spectrometry: Enolase and nucleocapsid protein. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 204, n. 1-3, p. 113-123, 2001.

LUCIANO, R. L. et al. Comparative Study of Serological Tests for *Mycoplasma synoviae* Diagnosis in Commercial Poultry Breeders. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, 2011.

MANGER, M. et al. Discovery of *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase A (MtpA) inhibitors based on natural products and a fragment-based approach. **ChemBioChem**, v. 6, n. 10, p. 1749-1753, 2005.

MARTINEZ, M. A. et al. A serine/threonine phosphatase encoded by MG-207 of *Mycoplasma genitalium* is critical for its virulence. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 1, 2013.

MARTINS, P. G. A. et al. Synthetic chalcones and sulfonamides as new classes of *Yersinia enterocolitica* YopH tyrosine phosphatase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 0, p. 35-41, 2013.

MASCARELLO, A. **Busca racional por moléculas bioativas em modelos de diabetes, leucemia e tuberculose**. 2012. Tese (Doutorado em Química). Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC

MASCARELLO, A. et al. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* tyrosine phosphatase PtpA by synthetic chalcones: Kinetics, molecular

modeling, toxicity and effect on growth. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 11, p. 3783-3789, 2010.

MASCARELLO, A. et al. Discovery of *Mycobacterium tuberculosis* Protein Tyrosine Phosphatase B (PtpB) Inhibitors from Natural Products. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e77081, 2013.

MATIOLLO, C. **Efeito da S-nitrosilação sobre a estrutura de PtpA, e clonagem e caracterização inicial de PtkA e SapM de *Mycobacterium tuberculosis***. 2012. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina,, Florianópolis, SC.

MATIOLLO, C. et al. S-nitrosylation of *Mycobacterium tuberculosis* tyrosine phosphatase A (PtpA) induces its structural instability. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1834, n. 1, p. 191-196, 2013.

MAY, M.; BROWN, D. R. Diversity of expressed vliA Adhesin sequences and intermediate hemagglutination phenotypes in *Mycoplasma synoviae*. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 9, p. 2116-2121, 2011.

MCCAIN, D. F. et al. Suramin Derivatives as Inhibitors and Activators of Protein-tyrosine Phosphatases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 15, p. 14713-14725, 2004.

MELCHER, K. et al. A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. **Nature**, v. 462, n. 7273, p. 602-608, 2009.

MENEGATTI, A. C. O. et al. First partial proteome of the poultry pathogen *Mycoplasma synoviae*. **Veterinary Microbiology**, v. 145, n. 1-2, p. 134-141, 2010.

MIKULA, K. M.; KOŁODZIEJCZYK, R.; GOLDMAN, A. *Yersinia* infection tools – characterization of structure and function of adhesins. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, 2013.

MOINI, M. Metal displacement and stoichiometry of protein-metal complexes under native conditions using capillary electrophoresis/mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, n. 18, p. 2730-2734, 2010.

MONOSTORY, K. et al. A study on CYP1A inhibitory action of E-2-(4'-methoxybenzylidene)-1-benzosuberone and some related chalcones and cyclic chalcone analogues. **Toxicology**, v. 184, n. 2–3, p. 203-210, 2003.

MOORHEAD, G. B. G. et al. Evolution of protein phosphatases in plants and animals. **Biochemical Journal**, v. 417, n. 2, p. 401-409, 2009.

MORE, U. A. et al. Design, synthesis, molecular docking and 3D-QSAR studies of potent inhibitors of enoyl-acyl carrier protein reductase as potential antimycobacterial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 71, n. 0, p. 199-218, 2014.

MUELLER, P.; PIETERS, J. Modulation of macrophage antimicrobial mechanisms by pathogenic mycobacteria. **Immunobiology**, v. 211, n. 6–8, p. 549-556, 2006.

MÜLLER, D. et al. Brunsvicamides A–C: Sponge-Related Cyanobacterial Peptides with *Mycobacterium tuberculosis* Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitory Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 16, p. 4871-4878, 2006.

NAGARAPU, L. et al. Studies on the synthetic and structural aspects of benzosuberones bearing 2, 4-thiazolidenone moiety as potential anti-cancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 71, n. 0, p. 91-97, 2014.

NG, K. K. S.; WEIS, W. I. Coupling of prolyl peptide bond isomerization and Ca^{2+} binding in a C- type mannose-binding protein. **Biochemistry**, v. 37, n. 51, p. 17977-17989, 1998.

NÖREN-MÜLLER, A. et al. Discovery of protein phosphatase inhibitor classes by biology-oriented synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 28, p. 10606-10611, 2006.

OBUCHOWSKI, M. et al. Characterization of PrpC from *Bacillus subtilis*, a Member of the PPM Phosphatase Family. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 19, p. 5634-5638, 2000.

OLIVEIRA, K. N. et al. Sulfonyl-hydrazones of cyclic imides derivatives as potent inhibitors of the *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase B (PtpB). **MedChemComm**, v. 2, n. 6, p. 500-504, 2011.

OTTANÀ, R. et al. Synthesis, biological activity and structure–activity relationships of new benzoic acid-based protein tyrosine phosphatase inhibitors endowed with insulinomimetic effects in mouse C2C12 skeletal muscle cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 71, n. 0, p. 112-127, 2014.

OVEN, I. et al. Diacylated lipopeptide from *Mycoplasma synoviae* mediates TLR15 induced innate immune responses. **Veterinary Research**, v. 44, n. 1, p. 99, 2013.

PACE, C. N. et al. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. **Protein Science**, v. 4, n. 11, p. 2411-2423, 1995.

PATHAK, R. B.; CHOVIATIA, P. T.; PAREKH, H. H. Synthesis, antitubercular and antimicrobial evaluation of 3-(4-chlorophenyl)-4-substituted pyrazole derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 15, p. 5129-5133, 2012.

POWELL, M. J. D. Restart procedures for the conjugate gradient method. **Mathematical Programming**, v. 12, n. 1, p. 241-254, 1977.

PULLEN, K. E. et al. An Alternate Conformation and a Third Metal in PstP/Ppp, the *M. tuberculosis* PP2C-Family Ser/Thr Protein Phosphatase. **Structure**, v. 12, n. 11, p. 1947-1954, 2004.

PURIFICAÇÃO, M. **Identificação de potenciais substratos de PTPA, tirosina-fosfatase de *Mycobacterium tuberculosis***. 2008. 81 Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC,.

RANTANEN, M. K. et al. Structure of *Streptococcus agalactiae* serine/threonine phosphatase. **FEBS Journal**, v. 274, n. 12, p. 3128-3137, 2007.

RAWLS, K. A.; GRUNDNER, C.; ELLMAN, J. A. Design and synthesis of nonpeptidic, small molecule inhibitors for the *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase PtpB. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 8, n. 18, p. 4066-4070, 2010.

RAWLS, K. A. et al. Fragment-based discovery of selective inhibitors of the *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase PtpA.

Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, v. 19, n. 24, p. 6851-6854, 2009.

RAZIN, S. Time-line of significant contributions to mycoplasmaology. **Biologicals**, v. 38, n. 2, p. 191-192, 2010.

RAZIN, S.; HAYFLICK, L. Highlights of mycoplasma research-An historical perspective. **Biologicals**, v. 38, n. 2, p. 183-190, 2010.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 4, p. 1094-1156, 1998.

RHOADS, T. W. et al. Measuring copper and zinc superoxide dismutase from spinal cord tissue using electrospray mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 415, n. 1, p. 52-58, 2011.

RUPPERT, U. et al. The novel protein phosphatase PphA from *Synechocystis* PCC 6803 controls dephosphorylation of the signalling protein PII. **Molecular Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 855-864, 2002.

RUSSELL, D. G.; BARRY, C. E.; FLYNN, J. L. Tuberculosis: What We Don't Know Can, and Does, Hurt Us. **Science**, v. 328, n. 5980, p. 852-856, 2010.

SCHLICKER, C. et al. Structural Analysis of the PP2C Phosphatase tPphA from *Thermosynechococcus elongatus*: A Flexible Flap Subdomain Controls Access to the Catalytic Site. **Journal of Molecular Biology**, v. 376, n. 2, p. 570-581, 2008.

SCHMIDL, S. R. et al. The Stability of Cytadherence Proteins in *Mycoplasma pneumoniae* Requires Activity of the Protein Kinase PrkC. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 1, p. 184-192, 2010a.

SCHMIDL, S. R. et al. The Phosphoproteome of the Minimal Bacterium *Mycoplasma pneumoniae*: Analysis of the Complete Known Ser/Thr Kinome Suggests the Existence of Novel Kinases. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 9, n. 6, p. 1228-1242, 2010b.

SCHNEE, C. et al. A novel rapid dna microarray assay enables identification of 37 *Mycoplasma* species and highlights multiple *Mycoplasma* infections. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, 2012.

SHAKIR, S. M. et al. Regulatory Interactions of a Virulence-Associated Serine/Threonine Phosphatase-Kinase Pair in *Bacillus anthracis*. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 2, p. 400-409, 2010.

SHEN, D. et al. Metal ion binding to anticoagulation factor II from the venom of *Agkistrodon acutus*: Stabilization of the structure and regulation of the binding affinity to activated coagulation factor X. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 16, n. 4, p. 523-537, 2011.

SHI, Y. Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure. **Cell**, v. 139, n. 3, p. 468-484, 2009.

SILVA, A. P.; TABERNERO, L. New strategies in fighting TB: Targeting *Mycobacterium tuberculosis*- secreted phosphatases MptpA & MptpB. **Future Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 8, p. 1325-1337, 2010.

SINGH, R. et al. Disruption of mptpB impairs the ability of *Mycobacterium tuberculosis* to survive in guinea pigs. **Molecular Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 751-762, 2003.

SOBHIA, M. E. et al. Protein tyrosine phosphatase inhibitors: a patent review (2002 – 2011). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 22, n. 2, p. 125-153, 2012.

SOELLNER, M. B. et al. Fragment-Based Substrate Activity Screening Method for the Identification of Potent Inhibitors of the *Mycobacterium tuberculosis* Phosphatase PtpB. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 31, p. 9613-9615, 2007.

SOON, F. F. et al. Molecular mimicry regulates ABA signaling by SnRK2 kinases and PP2C phosphatases. **Science**, v. 335, n. 6064, p. 85-88, 2012.

STEHLE, T. et al. The Apo-structure of the Low Molecular Weight Protein-tyrosine Phosphatase A (MptpA) from *Mycobacterium tuberculosis* Allows for Better Target-specific Drug Development. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 41, p. 34569-34582, 2012.

SU, J.; FORCHHAMMER, K. Determinants for substrate specificity of the bacterial PP2C protein phosphatase tPphA from *Thermosynechococcus elongatus*. **FEBS Journal**, v. 280, n. 2, p. 694-707, 2013.

SU, J.; SCHLICKER, C.; FORCHHAMMER, K. A Third Metal Is Required for Catalytic Activity of the Signal-transducing Protein

Phosphatase M tPphA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 15, p. 13481-13488, 2011.

SUN, J.-P. et al. Crystal Structure of the *Yersinia* Protein-tyrosine Phosphatase YopH Complexed with a Specific Small Molecule Inhibitor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 35, p. 33392-33399, August 29, 2003 2003a.

SUN, J. P. et al. Crystal structure of the *Yersinia* protein-tyrosine phosphatase YopH complexed with a specific small molecule inhibitor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 35, p. 33392-33399, 2003b.

TAN, L. P. et al. High-Throughput Discovery of *Mycobacterium tuberculosis* Protein Tyrosine Phosphatase B (MptpB) Inhibitors Using Click Chemistry. **Organic Letters**, v. 11, n. 22, p. 5102-5105, 2009.

TANOUE, K. et al. Binding of a third metal ion by the human phosphatases PP2Ca and Wip1 is required for phosphatase activity. **Biochemistry**, v. 52, n. 34, p. 5830-5843, 2013.

TAUTZ, L. et al. Inhibition of *Yersinia* Tyrosine Phosphatase by Furanyl Salicylate Compounds. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 10, p. 9400-9408, 2005.

TAUTZ, L.; MUSTELIN, T. Strategies for developing protein tyrosine phosphatase inhibitors. **Methods**, v. 42, n. 3, p. 250-260, 2007.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TIGANIS, T.; BENNETT, A. M. Protein tyrosine phosphatase function: The substrate perspective. **Biochemical Journal**, v. 402, n. 1, p. 1-15, 2007.

TONKS, N. K. Protein tyrosine phosphatases - From housekeeping enzymes to master regulators of signal transduction. **FEBS Journal**, v. 280, n. 2, p. 346-378, 2013.

TU, Z. et al. An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *Escherichia coli* strains. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 113-120, 2005.

- UBERSAX, J. A.; FERRELL JR, J. E. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 7, p. 530-541, 2007.
- UHRIG, R. G.; LABANDERA, A.-M.; MOORHEAD, G. B. *Arabidopsis* PPP family of serine/threonine protein phosphatases: many targets but few engines. **Trends in Plant Science**, v. 18, n. 9, p. 505-513, 2013.
- VASCONCELOS, A. T. R. et al. Swine and Poultry Pathogens: the Complete Genome Sequences of Two Strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a Strain of *Mycoplasma synoviae*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 16, p. 5568-5577, 2005.
- VAZQUEZ, J. et al. Development of Molecular Probes for Second-Site Screening and Design of Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2137-2143, 2007/05/01 2007.
- VIBOUD, G. I.; BLISKA, J. B. ***Yersinia* outer proteins: Role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis.** 59: 69-89 p. 2005.
- VINTONYAK, V. V. et al. Identification of Thiazolidinones Spiro-Fused to Indolin-2-ones as Potent and Selective Inhibitors of the *Mycobacterium tuberculosis* Protein Tyrosine Phosphatase B. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 34, p. 5902-5905, 2010.
- VOVK, A. I. et al. Inhibition of *Yersinia* protein tyrosine phosphatase by phosphonate derivatives of calixarenes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 2, p. 483-487, 2010.
- WALSH, D. A.; PERKINS, J. P.; KREBS, E. G. An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 243, n. 13, p. 3763-3765, 1968.
- WANG, C. C. et al. Systems approach to tuberculosis vaccine development. **Respirology**, v. 18, n. 3, p. 412-420, 2013.
- WEHENKEL, A. et al. Structural and Binding Studies of the Three-metal Center in Two Mycobacterial PPM Ser/Thr Protein Phosphatases. **Journal of Molecular Biology**, v. 374, n. 4, p. 890-898, 2007.

WEIDE, T. et al. 3-Substituted indolizine-1-carbonitrile derivatives as phosphatase inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 1, p. 59-63, 2006.

WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. **Biopolymers**, v. 89, n. 5, p. 392-400, 2008.

WHO. **World Health Organization. Global tuberculosis report 2013**
Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/91355/1/9789241564656_eng.pdf>. Acesso em: 29 dezembro. 2013

WILLIAMSON, E. D.; OYSTON, P. C. F. Protecting against plague: Towards a next-generation vaccine. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 172, n. 1, p. 1-8, 2013.

WONG, D. et al. *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H⁺-ATPase to inhibit phagosome acidification. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 48, p. 19371-19376, 2011.

WONG, D.; CHAO, J. D.; AV-GAY, Y. *Mycobacterium tuberculosis*-secreted phosphatases: from pathogenesis to targets for TB drug development. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 100-109, 2013.

XIAO, Q. et al. Protein N-Terminal Processing: Substrate Specificity of *Escherichia coli* and Human Methionine Aminopeptidases. **Biochemistry**, v. 49, n. 26, p. 5588-5599, 2010.

YASUKAWA, T. et al. S-Nitrosylation-dependent Inactivation of Akt/Protein Kinase B in Insulin Resistance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 9, p. 7511-7518, 2005.

YIN, S. et al. Pseudoceramines A-D, new antibacterial bromotyrosine alkaloids from the marine sponge *Pseudoceratina* sp. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 9, n. 19, p. 6755-6760, 2011.

YOUNG, D.; STARK, J.; KIRSCHNER, D. Systems biology of persistent infection: Tuberculosis as a case study. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 7, p. 520-528, 2008.

ZENG, L. F. et al. A Facile Hydroxyindole Carboxylic Acid Based Focused Library Approach for Potent and Selective Inhibitors of *Mycobacterium* Protein Tyrosine PhosphataseB. **ChemMedChem**, v. 8, n. 6, p. 904-908, 2013.

ZHANG, M. et al. Viewing serine/threonine protein phosphatases through the eyes of drug designers. **FEBS Journal**, v. 280, n. 19, p. 4739-4760, 2013.

ZHANG, W.; SHI, L. Evolution of the PPM-family protein phosphatases in *Streptomyces*: duplication of catalytic domain and lateral recruitment of additional sensory domains. **Microbiology**, v. 150, n. 12, p. 4189-4197, 2004.

ZHANG, Z.-Y. Protein tyrosine phosphatases: prospects for therapeutics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, n. 4, p. 416-423, 2001.

ZHANG, Z. Y. et al. Expression, purification, and physicochemical characterization of a recombinant *Yersinia* protein tyrosine phosphatase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 33, p. 23759-66, 1992.

ZHOU, B. et al. Targeting mycobacterium protein tyrosine phosphatase B for antituberculosis agents. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 10, p. 4573-4578, 2010.

ANEXO A - Artigos relacionados à tese

Martins, G.A.M.; Menegatti, A.C.O.; Chiaradia-Delatorre, L.D.; Oliveira, K. N.; Guido, R.V.C.; Andricopulo, A.D.; Vernal, J.; Yunes, R.A.; Nunes, R.J.; Terenzi, H. Synthetic chalcones and sulfonamides as new classes of *Yersinia enterocolitica* YopH tyrosine phosphatase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 0, p. 35-41, 2013.

doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.04.018

European Journal of Medicinal Chemistry 64 (2013) 35–41



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>



Short communication

Synthetic chalcones and sulfonamides as new classes of *Yersinia enterocolitica* YopH tyrosine phosphatase inhibitors



Priscila Graziela Alves Martins^{a,1}, Angela Camila Orbem Menegatti^{a,1},
Louise Domeneghini Chiaradia-Delatorre^{a,b}, Kely Navakoski de Oliveira^b,
Rafael Victorio Carvalho Guido^c, Adriano Defini Andricopulo^c, Javier Vernal^a,
Rosendo Augusto Yunes^b, Ricardo José Nunes^{b,*,*}, Hernán Terenzi^{a,*}

^aCentro de Biologia Molecular Estrutural (CERIME), Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

^bLaboratório Estrutura e Atividade (LEAT), Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

^cLaboratório de Química Medicinal e Computacional (LQMC), Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador São-carleense 400, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 March 2013

Received in revised form

7 April 2013

Accepted 9 April 2013

Available online 16 April 2013

Keywords:

Enzyme inhibition
Tyrosine phosphatase
YopH
Synthetic compounds

ABSTRACT

YopH plays a relevant role in three pathogenic species of *Yersinia*. Due to its importance in the prevention of the inflammatory response of the host, this enzyme has become a valid target for the identification and development of new inhibitors. In this work, an in-house library of 283 synthetic compounds was assayed against recombinant YopH from *Yersinia enterocolitica*. From these, four chalcone derivatives and one sulfonamide were identified for the first time as competitive inhibitors of YopH with binding affinity in the low micromolar range. Molecular modelling investigations indicated that the new inhibitors showed similar binding modes, establishing polar and hydrophobic contacts with key residues of the YopH binding site.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Matiollo, C.; Ecco, G.; Menegatti, A.C.O.; Razzera, G.; Vernal, J.; Terenzi, H. S-nitrosylation of *Mycobacterium tuberculosis* tyrosine phosphatase A (PtpA) induces its structural instability. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1834, n. 1, p. 191-196, 2013
doi: 10.1016/j.bbapap.2012.10.007.

Biochimica et Biophysica Acta 1834 (2013) 191–196



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

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



S-nitrosylation of *Mycobacterium tuberculosis* tyrosine phosphatase A (PtpA) induces its structural instability

Camila Matiollo ¹, Gabriela Ecco ¹, Angela Camila Orbem Menegatti ¹, Guilherme Razzera ¹, Javier Vernal ¹, Hernán Terenzi ^{*}

Centro de Biologia Molecular Estrutural-INBER, Departamento de Bioquímica, CCB, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 August 2012

Received in revised form 4 October 2012

Accepted 7 October 2012

Available online 24 October 2012

Keywords:

Tyrosine phosphatase A
Mycobacterium tuberculosis
Circular dichroism
S-nitrosylation

ABSTRACT

S-nitrosylation is associated with signal transduction and microbicidal activity of nitric oxide (NO). We have recently described the S-nitrosylation of *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase A, PtpA, an enzyme that plays an important role in mycobacteria survival inside macrophages. This post-translational modification decreases the activity of the enzyme upon modification of a single Cys residue, C53. The aim of the present work was the investigation of the effect of S-nitrosylation in PtpA kinetic parameters, thermal stability and structure. It was observed that the K_M of nitrosylated PtpA was similar to its unmodified form, but the V_{max} was significantly reduced. In contrast, treatment of PtpA C53A with GSNO, did not alter either K_M or V_{max} . These results confirmed that PtpA S-nitrosylation occurs specifically in the non-catalytic C53 and that this modification does not affect substrate affinity. Using circular dichroism (CD) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy techniques it was shown that PtpA S-nitrosylation decreased protein thermal stability and promoted a local effect in the surroundings of the C53 residue, which interfered in both protein stability and function.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

Mascarello, A.; Mori, M.; Chiaradia-Delatorre, L.D.; Menegatti, A.C.O.; Monache, F.D.; Ferrari, D.; Yunes, R.A.; Nunes, R.J.; Terenzi, H.; Botta, B.; Botta, M. Discovery of *Mycobacterium tuberculosis* Protein Tyrosine Phosphatase B (PtpB) Inhibitors from Natural Products. **PLoS ONE**, v. 8, p. 10, p. e77081, 2013.
doi:10.1371/journal.pone.0077081

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

Discovery of *Mycobacterium tuberculosis* Protein Tyrosine Phosphatase B (PtpB) Inhibitors from Natural Products

Alessandra Mascarello^{1*}, Mattia Mori^{2,3*}, Louise Domeneghini Chiaradia-Delatorre^{1,4}, Angela Camila Orbem Menegatti⁴, Franco Delle Monache², Franco Ferrari², Rosendo Augusto Yunes¹, Ricardo José Nunes¹, Hernán Terenzi⁵, Bruno Botta², Maurizio Botta^{3,5}

1 Laboratório Estrutura e Atividade, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil, **2** Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco, Università di Roma La Sapienza, Roma, Italy, **3** Dipartimento Farmaco Chimico Tecnologico, Università degli Studi di Siena, Siena, Italy, **4** Centro de Biologia Molecular Estrutural, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil, **5** Center for Biotechnology, Sbarro Institute for Cancer Research and Molecular Medicine, Temple University, Philadelphia, Pennsylvania, United States of America

Abstract

Protein tyrosine phosphatase B (PtpB) is one of the virulence factors secreted into the host cell by *Mycobacterium tuberculosis*. PtpB attenuates host immune defenses by interfering with signal transduction pathways in macrophages and, therefore, it is considered a promising target for the development of novel anti-tuberculosis drugs. Here we report the discovery of natural compound inhibitors of PtpB among an *in house* library of more than 800 natural substances by means of a multidisciplinary approach, mixing *in silico* screening with enzymatic and kinetics studies and MS assays. Six natural compounds proved to inhibit PtpB at low micromolar concentrations (< 30 μ M) with Kuwanol E being the most potent with $K_i = 1.6 \pm 0.1 \mu$ M. To the best of our knowledge, Kuwanol E is the most potent natural compound PtpB inhibitor reported so far, as well as it is the first non-peptidic PtpB inhibitor discovered from natural sources. Compounds herein identified may inspire the design of novel specific PtpB inhibitors.