



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**GUILHERME CALDAS DE ANDRADE**



ESTUDOS ESTRUTURAIS E DA DINÂMICA DA ENZIMA FKBP12 DE  
MICRO-ORGANISMOS: BUSCA POR NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS

Rio de Janeiro  
2020



Guilherme Caldas de Andrade

ESTUDOS ESTRUTURAIS E DA DINÂMICA DA ENZIMA FKBP12 DE  
MICRO-ORGANISMOS: BUSCA POR NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências

Orientadores:

Cristiane Dinis Ano Bom (IQ/UFRJ)

Fabio Ceneviva Lacerda de Almeida (IBqM/UFRJ)

Rio de Janeiro  
2020

Andrade, Guilherme Caldas de

Estudos Estruturais e da Dinâmica da Enzima FKBP-12 de  
Micro-organismos: Busca por Novos Alvos Terapêuticos /  
Guilherme Caldas de Andrade - Rio de Janeiro: UFRJ/IQ, 2020.

Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio  
de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica, 2020.

Orientadores: Cristiane Dinis Ano Bom  
Fabio Ceneviva Lacerda de Almeida

1. Estrutura de proteínas. 2. FKBP12. 3. Enzimas. 4. PPIase. 5.  
Dinâmica. 6. RMN. I. Ano Bom, Cristiane Dinis. II. Universidade  
Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Química. Programa de Pós-  
Graduação em Bioquímica. III. Título.

Guilherme Caldas de Andrade

ESTUDOS ESTRUTURAIS E DA DINÂMICA DA ENZIMA FKBP12 DE  
MICRO-ORGANISMOS: BUSCA POR NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências - Bioquímica.

Aprovada por:

---

Presidente, Profa. Cristiane Dinis Ano Bom (DBq/IQ/UFRJ)

---

Profa. Luzineide W. Tinoco (IPPN/UFRJ)

---

Profa. Gisele Cardoso de Amorim (UFRJ-Xérem)

---

Prof. Andre Marco Oliveira Gomes (IBqM/UFRJ)

---

Prof. Fábio Cesar Nogueira (DBq/IQ/UFRJ)

---

Prof. Alviclér Magalhães (IQ/UFRJ) (suplente externo)

---

Profa. Mônica Ferreira Moreira Carvalho Cardoso (DBq/(IQ/UFRJ) (suplente interno)

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer grandiosamente:

- Ao universo e seus caminhos tortuosos, por todas as oportunidades maravilhosas e conquistas obtidas com a realização desse trabalho.

- Aos meus pais Elza e José, por todo apoio durante toda a trajetória científica, desde seu início. A torcida fervorosa de ambos me permitiu encontrar forças quando já estava exausto. Amo vocês!

- À minha irmã Daniela por todo companheirismo e momentos de desabafo. Ter alguém tão próximo que compartilha das mesmas alegrias e percalços do mundo científico foi essencial para seguir por essa jornada. Te amo!

- Ao Giuseppe, que surgiu na etapa final de todo esse processo, mas que sempre contribuiu com todo seu carinho e afeto. Gostaria de agradecer, principalmente, por aguentar as minhas rabugices e estresses. Seu apoio é essencial para mim!

- À minha orientadora Cris! Olhar para trás e relembrar cada momento dessa trajetória de quase dez anos é surpreendente. A construção do jovem cientista não se dá apenas pela orientação e auxílio profissional, que já são de extrema dificuldade, mas também pelo zelo, apoio, seriedade e compreensão. Permitir que possamos enxergar a humanidade por trás do profissional é essencial para que não nos abalemos durante este processo tão difícil e severo. Obrigado por cada momento que passamos juntos até aqui. Eles foram essenciais para desenvolvimento do meu pensamento crítico e ético como pesquisador e pessoa. Sei que SEMPRE poderei contar com você! Sou muito grato por toda confiança. Também gostaria de agradecer especialmente pela correção minuciosa dessa tese, mesmo com todas as dificuldades impostas pela vida.

- Ao meu orientador Fábio, que me ajudou muito no crescimento como pesquisador durante o doutorado. Obrigado por todos os conselhos e ajuda! Compartilhar um pouco do seu vasto conhecimento na ciência agregou de maneira indescritível à minha formação!

- À querida professora Danielle, que carinhosamente sempre nos aconselhou e auxiliou no âmbito profissional e pessoal. Grande parte da minha formação se deve a todas as nossas conversas e debates, científicos ou não. Muito obrigado!

- Aos professores Reginaldo e Lucia Paiva por todo apoio! Seus conselhos são sempre preciosos!

- Ao Dr. Francisco Gomes por destinar parte do seu precioso tempo para me auxiliar. Muito obrigado pela colaboração grandiosa no trabalho.

- A todos os meus amigos do LaBEP: Bia, Bianca, Léo, Carol Lixa, Carol Mattos, Luís R e João! Vocês são MUITO importantes para mim! O laboratório se tornou uma casa para todos nós. Obrigado por todo companheirismo, apoio, bagunças e festas! Nada disso teria sido tão compensatório sem vocês! Também não posso esquecer da Ariana, tão amada e querida, que se tornou parte dessa grande família.

- Especialmente ao Luís S., o querido aluno de iniciação científica que co-oriento. Muito obrigado por todo auxílio e apoio. Obrigado também por me escutar e levar em consideração meus conselhos e apontamentos.

- Ao CNRMN e todos os seus componentes, em especial à professora Ana Paula Valente e aos queridos Ramon, Vitor, Mari M., Gabi, Karen, Lucas. Obrigado por todas as conversas e permitirem que eu tivesse uma segunda casa no Fundão!

- A todos os colegas e professores do Departamento de Bioquímica por serem sempre tão receptivos e atenciosos em todos os momentos. Obrigado especialmente ao LaMMP, LaBIM e LIFE por permitirem tantas “invasões” e sempre nos atenderem com tanta gentileza.

- Às minhas amigas lindas do Colégio Pedro II: Bia, Karen e Isah. Tantos anos de amizade (11 anos, talvez rs)! Amo vocês!! Nos piores momentos, vocês são capazes de me levar de volta para aquele lugar mágico em que nossas vidas se entrelaçaram durante 3 anos... E seguiremos assim até o fim. Muito obrigado por todo carinho e doçura!

- Às minhas amigas Mary e Ana Paula. O amor supera qualquer barreira de distância e tempo. Muito já passou, mas vocês continuam morando aqui dentro!

- Aos integrantes da comissão avaliadora, prof<sup>a</sup> Luzineide W. Tinoco, prof<sup>a</sup> Gisele Amorim, prof. André Gomes, prof. Fábio Nogueira, prof. Alviclér Magalhães e prof<sup>a</sup>. Mônica Cardoso, por terem se disponibilizado a ler e avaliar o meu trabalho.

Finalmente, mas não menos importante, gostaria de agradecer àqueles que cruzaram este caminho e deixaram um pouco de si, mesmo que de maneira silenciosa, inspirando-me e influenciando todo esse processo. Onde quer que estejam, verdadeiramente, muito obrigado!

“A minha vida é um vendaval que se soltou,  
É uma onda que se alevantou,  
É um átomo a mais que se animou...  
Não sei por onde vou,  
Não sei para onde vou  
Sei que não vou por aí!”

José Régio - *Cântico Negro*

## RESUMO

ANDRADE, Guilherme Caldas de. **ESTUDOS ESTRUTURAIS E DA DINÂMICA DA ENZIMA FKBP12 DE MICRO-ORGANISMOS: BUSCA POR NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS**. Rio de Janeiro, 2020. Tese (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2020.

As infecções microbianas continuam sendo um desafio para a humanidade, com considerável impacto no sistema de saúde de vários países devido à sua elevada taxa de mortalidade. A crescente resistência e a diminuição do desenvolvimento de novos agentes tornaram a terapia convencional ineficaz. Dessa forma, a pesquisa de medicamentos mais ativos e novos alvos para essas doenças é essencial. A enzima FKBP12 (peptidil-prolil cis-trans isomerase) foi escolhida como alvo para esses estudos. Embora o ortólogo humano já seja usado como alvo para compostos, essa proteína também está presente em vários micro-organismos causadores de doenças, que difere em cerca de 40% em sua sequência primária em comparação à primeira. Dessa maneira, essas enzimas são validadas como alvos biológicos. Foram selecionadas as proteínas FKBP12 de *Trypanosoma brucei* (TbFKBP12) e *Mycobacterium tuberculosis* (MtFKBP12). Elas foram expressas em *E. coli* BL21 (DE3), induzidas com IPTG e purificadas, em etapas, através de cromatografia de afinidade e exclusão molecular. A proteína MtFKBP12 foi isotopicamente marcada com  $^{15}\text{N}$  e  $^{13}\text{C}$  e todos os experimentos necessários para o assinalamento sequencial e de correlação espacial via NOESY foram realizados por RMN. Os NOEs atribuídos, as restrições diédricas previstas e ligações de hidrogênio foram usadas como entrada para o cálculo estrutural usando Aria2.2 / CNS1.2. Diversos ciclos de cálculo foram realizados usando protocolos padrão de *simulated-annealing*. Os 20 confôrmeros de menor energia foram refinados por dinâmica em água. A estrutura da MtFKBP12 é semelhante às outras proteínas desta família, porém com uma região N-terminal divergente que mostra pouca convergência estrutural. A dinâmica da cadeia principal do MtFKBP12 foi investigada medindo os parâmetros de relaxação:  $^{15}\text{N}$   $R_1$ ,  $R_2$  e  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  NOE heteronuclear e indicaram que as principais variações nos parâmetros ocorrem nos resíduos da região N-terminal e nos loops  $\beta 1$ - $\beta 2$  e hélice  $\pi$ - $\beta 5$ . Experimentos de titulação com o peptídeo ligante N-Succinil-AXPF- $\rho$ -nitroanilida (X: leucina ou alanina) foram realizados com as proteínas TbFKBP12 e MtFKBP12. Além disto, experimentos de STD envolvendo a proteína MtFKBP12 e os dois substratos já citados também foram realizados. Os dados indicaram que a interação parece maior com o ligante N-Succinil-ALPF- $\rho$ -nitroanilida. O *Docking* molecular realizado com o servidor HADDOCK 2.2 permitiu observar uma região preferencial de ligação para ambos os substratos na MtFKBP12. Tais dados corroboraram os dados experimentais obtidos através de CSP e STD. Os resultados obtidos com este trabalho identificam os principais resíduos das proteínas envolvidos na ligação com o substrato, o que pode facilitar a identificação de ligantes de baixa afinidade com potencial para subsequentemente se tornarem compostos líderes no desenho de novos medicamentos.

## **ABSTRACT**

ANDRADE, Guilherme Caldas de. **STRUCTURAL AND DYNAMIC STUDIES OF FKBP12 FROM MICRORGANISMS: SEARCHING FOR NEW BIOLOGICAL TARGETS**. Rio de Janeiro, 2020. Tese (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2020

Microbial infections remain a challenge for humankind with considerable impact on health care system of several countries due to its elevated mortality rate. The rising resistance and decrease of development of new agents has turned conventional therapy ineffective. In this way, the research of more effective drugs and targets for these diseases are essential. FKBP12 (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase) enzyme was chosen as a target for such studies. Although human ortholog is already used as a target for compounds, this protein is also present in numerous disease-causing microorganisms, and differ by about 40% in their primary sequence compared to the first one. In this way, such enzymes are validated as biological targets. Initially, FKBP12 proteins from *Trypanosoma brucei* (TbFKBP12) and *Mycobacterium tuberculosis* (MtFKBP12) were selected. They were expressed in *E. coli* BL21(DE3), induced with IPTG and purified with steps of affinity and size-exclusion chromatography. The MtFKBP12 protein was isotopically labelled with  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  and had all experiments required for NMR assignment performed, besides NOESY spatial correlation experiments. Lists containing assigned NOEs, predicted dihedral constraints and hydrogen bonds were used as input of the structural calculation using Aria2.2/CNS1.2. Several calculation cycles were performed using standard simulated annealing protocols. Finally, the 20 best conformers were refined by dynamics in water. It was possible to observe that MtFKBP12 structure is similar with the other proteins of this family with a divergent N-terminal portion that shows little structural convergence. The backbone dynamics of MtFKBP12 were investigated measuring the relaxation parameters:  $^{15}\text{N}$   $R_1$  and  $R_2$  relaxation experiments and  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  heteronuclear NOE and indicated that the main variations in the parameters occur in the residues of the N-terminal region and in the  $\beta_1$ - $\beta_2$  loops and helix  $\pi$ - $\beta_5$ . Titration experiments with N-succinyl-AXPF- $\rho$ -nitroanilide (X: leucine or alanine) were performed with TbFKBP12 and MtFKBP12 proteins, in addition to STD experiments involving the MtFKBP12 protein and the two substrates already mentioned. Data indicated that the interaction appears to be stronger with the N-Succinyl-ALPF- $\rho$ -nitroanilide ligand. The molecular *docking* performed with the HADDOCK 2.2 server allowed us to observe a preferred region of substrate binding in the protein. Such data corroborated the experimental data obtained previously. The results obtained with this work identify the main residues of proteins involved in binding with the substrate, which may facilitate the identification of low affinity ligands that can subsequently become leading compounds in the design of new drugs

.

## Lista de Figuras

Figura 1: Mortes por 100 000 habitantes causadas por doenças infecciosas.....	8
Figura 2: Ligantes imunossupressores de FKBP.....	12
Figura 3: Complexos FKBP12 com seus imunossupressores resolvidos por cristalografia por difração de raio-x.....	12
Figura 4: Isomerização <i>cis-trans</i> em ligações peptídicas .....	13
Figura 5: Atuação dos Imunossupressores em Linfócitos T .....	16
Figura 6: <i>Loop 80's</i> na FKBP12 de humanos .....	17
Figura 7: Esquema da FKBP12 funcionando como reguladora da liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático e endoplasmático .....	19
Figura 8: Esquema representativo dos genes que codificam proteínas da família FKBP em humanos.....	21
Figura 9: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> em micrografia eletrônica de varredura.....	23
Figura 10: Casos de tuberculose em 2018 .....	24
Figura 11: Etapas do processo de infecção por <i>M. tuberculosis</i> .....	26
Figura 12: Espectros de resistência de <i>M. tuberculosis</i> .....	28
Figura 13: Incidência de cepas MDR/RR-TB em casos de tuberculose em 2018.....	29
Figura 14: Microscopia óptica do <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i> .....	30
Figura 15: Distribuição de casos de <i>Trypanosoma brucei</i> em 2018.....	32
Figura 16: Mosca Tsé-Tsé .....	33
Figura 17: Ciclo de vida de <i>T. brucei gambiense</i> .....	35
Figura 18: Estratégias de clonagem utilizadas para MtFKBP12 e TbFKBP12.....	40
Figura 19: Substratos sALPF $\rho$ NA e sAAPF $\rho$ NA .....	49
Figura 20: Esquema representativo do método STD por RMN. ....	52
Figura 21: Alinhamento da sequência primária da proteína FKBP12 de diferentes organismos .....	54
Figura 22: SDS-PAGE 15% normalizado dos testes de expressão da proteína His <sub>6</sub> -MtFKBP12 a 37°C .....	55
Figura 23: SDS-PAGE 15% da lise celular realizada com a melhor condição do teste de expressão da proteína His <sub>6</sub> -MtFKBP12.....	56
Figura 24: SDS-PAGE 12% normalizado da expressão da proteína GST-TbFKBP12 a 17°C.....	57
Figura 25: SDS-PAGE 15 % e cromatograma da purificação da construção His <sub>6</sub> -MtFKBP12 .....	58
Figura 26: SDS-PAGE 15% da clivagem da construção His <sub>6</sub> -MtFKBP12.....	59
Figura 27: SDS-PAGE 15 % da segunda cromatografia de afinidade a níquel .....	59
Figura 28: SDS-PAGE 15 % e cromatograma da purificação da construção GST-TbFKBP12 .....	60
Figura 29: SDS-PAGE 15% da clivagem da construção GST-TbFKBP12 .....	61
Figura 30: SDS-PAGE 15 % da cromatografia de exclusão molecular da proteína MtFKBP12 .....	62
Figura 31: SDS-PAGE 15 % da gel filtração da proteína TbFKBP12.....	63
Figura 32: Espectro unidimensional <sup>1</sup> H da proteína MtFKBP12 .....	64
Figura 33: Espectro <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N HSQC da proteína MtFKBP12 .....	65
Figura 34: Fatias dos Espectros Tridimensionais HN(CO)CACB e HNCACB.....	66
Figura 35: Espectro bidimensional <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N HSQC assinalado da proteína MtFKBP12 .....	68
Figura 36: Padrão de estrutura secundária para a MtFKBP12 obtido através do programa TALOS-N.....	69
Figura 37: Esquema da estrutura secundária da MtFKBP12.....	70
Figura 38: As 20 estruturas de menor energia da MtFKBP12 .....	71
Figura 39: Estrutura de menor energia da proteína MtFKBP12.....	74

Figura 40: Parâmetros de relaxação $^{15}\text{N}$ da cadeia principal.....	76
Figura 41: Análise da Dinâmica utilizando $R_1$ , $R_2$ e Noe Heteronuclear. ....	77
Figura 42: Parâmetros de relaxação $^{15}\text{N}$ da cadeia principal.....	78
Figura 43: Resíduos com valor significativo acima da média de $R_2/R_1$ .....	79
Figura 44: Espectro $^{15}\text{N}$ HSQC da proteína TbFKBP12 não assinalado.....	80
Figura 45: Espectro $^{15}\text{N}$ HSQC da proteína TbFKBP12 assinalado .....	81
Figura 46: Estrutura da FBKP12 de <i>T. brucei</i> determinada por RMN.....	82
Figura 47: Espectros $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC da proteína MtFKBP12 titulada com o substrato sALPF $\rho$ NA.....	84
Figura 48: Valores de CSP da MtFKBP12 na presença de sALPF $\rho$ NA .....	85
Figura 49: Resíduos com CSP estatisticamente significativos após adição de sALPF $\rho$ NA ...	86
Figura 50: Ajuste dos valores de CSP em função da razão molar substrato:proteína.....	86
Figura 51: Espectros $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC da proteína MtFKBP12 titulada com sAAPF $\rho$ NA .....	88
Figura 52: Valores de CSP da MtFKBP12 na presença de sAAPF $\rho$ NA.....	89
Figura 53: Resíduos com CSP estatisticamente significativos após adição de sAAPF $\rho$ NA...90	
Figura 54: Ajuste dos valores de CSP em função da razão molar substrato:proteína.....	91
Figura 55: Resíduos que apresentaram CSP significativo em ambos os substratos, sALPF $\rho$ NA e sAAPF $\rho$ NA.....	91
Figura 56: Espectros $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC da proteína TbFKBP12 após adição de sALPF $\rho$ NA .....	92
Figura 57: Valores de CSP da TbFKBP12 na presença de sALPF $\rho$ NA .....	93
Figura 58: Resíduos com CSP estatisticamente significativos após adição de sALPF $\rho$ NA ...94	
Figura 59: Espectros $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC da proteína TbFKBP12 após adição de sAAPF $\rho$ NA.....95	
Figura 60: Valores de CSP de sAAPF $\rho$ NA na razão molar 4:1 .....	95
Figura 61: Resíduos com CSP estatisticamente significativos após adição de sAAPF $\rho$ NA...96	
Figura 62: Resíduos que apresentaram CSP significativo em ambos os substratos, sALPF $\rho$ NA e sAAPF $\rho$ NA.....	97
Figura 63: Substratos utilizados nos ensaios de transferência de saturação.....	98
Figura 64: Espectro de STD do peptídeo sALPF $\rho$ NA ligado a proteína MtFKBP12 com saturação em 186,577 Hz .....	99
Figura 65: Fator de amplificação de STD do peptídeo sALPF $\rho$ NA ligado a proteína MtFKBP12 (186,577 Hz) .....	100
Figura 66: Fatores de amplificação de STD do peptídeo sALPF $\rho$ NA ligado a proteína MtFKBP12 .....	101
Figura 67: Átomos de hidrogênio da sALPF $\rho$ NA que receberam transferência de saturação102	
Figura 68: Espectro de STD do peptídeo sAAPF $\rho$ NA ligado a proteína MtFKBP12 com saturação em 325,937 Hz .....	103
Figura 69: Fator de amplificação de STD do peptídeo sAAPF $\rho$ NA ligado a proteína MtFKBP12 (325,937 Hz) .....	104
Figura 70: Fatores de amplificação de STD do peptídeo sAAPF $\rho$ NA ligado a proteína MtFKBP12 .....	105
Figura 71: Átomos de hidrogênio da sAAPF $\rho$ NA que receberam transferência de saturação .....	105
Figura 72: <i>Docking</i> molecular dirigido realizado para a interação da MtFKBP12 com os substratos sALPF $\rho$ NA e sAAPF $\rho$ NA.....	107
Figura 73: Resíduos que se encontram em regiões não permitidas no Plot de Ramachandran. .....	111
Figura 74: Estrutura em solução do domínio FKBD da proteína FKBP38 humana (PDB 2MF9).....	112
Figura 75: Interação de sALPF $\rho$ com PvFKBD35 observada em estrutura resolvida por Cristalografia de Raio-X (PDB 4ITZ).....	114

Figura 76: Substratos sALPF $\rho$ NA e sAAPF $\rho$ NA. ....	115
Figura 77: Estruturas MtFKBP12 e TbFKBP12. ....	116

### **Lista de Tabelas**

Tabela 1: FKBP12 de micro-organismos relacionados a doenças negligenciadas.....	39
Tabela 2: Lista de restrições e análise estatística para a estrutura em solução de MtFKBP12	72

## Lista de Abreviaturas e Siglas

1D - Unidimensional  
2D - Bidimensional  
3D - Tridimensional  
ARIA - *Ambiguous Restraints for Interactive Assignment*  
BSA – Albumina de soro bovino  
CaM – Calmodulina  
CaN - Calcineurina  
CpN - Ciclofilina  
CsA - Ciclosporina A  
CSP - Perturbação de deslocamento químico  
DMSO - Dimetilsulfóxido  
DTN - doenças tropicais negligenciadas  
DO - Densidade ótica  
ER – Retículo endoplasmático  
FID - Decaimento livre de indução  
FKBD - Domínio ligador de FK506  
FKBP - Proteína ligadora de FK506  
FRB - Domínio de ligação à FKBP-rapamicina  
HSQC - *Heteronuclear Single Quantum Coherence*  
IL-2 - Interleucina tipo 2  
ILTB – Infecção latente por tuberculose  
IP3R - Receptor de Inositol 1,4,5 Trifosfato  
IPTG - Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactosídeo  
LB - Luria Bertani (Meio rico de cultura)  
MDR/RR-TB – Tuberculose multirresistente ou resistente a rifampicina  
M9 - Meio Mínimo de cultura  
MIP - Potencializador de infectividade macrofágica  
mTOR - *mammalian target of rapamycin*  
NF-AT - Fator nuclear de células T ativadas  
NOE - Efeito nuclear *Overhauser*  
NOESY - *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*  
NUS - *Non Uniforming Sample*  
OMS - Organização Mundial da Saúde  
PDB - Banco de dados de proteínas  
PPIase - Peptidil prolil *cis/trans* isomerase  
RMN - Ressonância Magnética Nuclear  
RMSD - Desvio padrão médio quadrático  
RNAi - RNA interferência  
RyR - Receptor de rianodina  
STD – *Saturation transfer difference*  
TB – Tuberculose  
TGF- $\beta$  - Fator de transformação de crescimento beta  
TGF- $\beta$ R1 - Receptor tipo 1 de fator de transformação de crescimento beta  
TOCSY - *TOTAL Correlation Spectroscopy*  
TORC - Complexo alvo de rapamicina  
TROSY - *Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy*  
TRP (Domínio) - *Transient Receptor Potential*

WHO - Organização mundial de saúde  
XDR-TB – Tuberculose extensivamente resistente

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
1.1 DOENÇAS INFECCIOSAS .....	8
<b>1.1.1 A Resistência aos Fármacos</b> .....	<b>9</b>
1.2 PROTEÍNA LIGADORA DE FK506 (FKBP) .....	11
<b>1.2.1. FKBP12 como Imunofilina</b> .....	<b>14</b>
<b>1.2.2 FKBP12 e a Liberação de Ca<sup>2+</sup></b> .....	<b>17</b>
<b>1.2.3 Outros Parceiros Moleculares de FKBP12</b> .....	<b>19</b>
<b>1.2.4 A Família FKBP: Conservação e Diversidade</b> .....	<b>20</b>
1.3 TUBERCULOSE .....	22
<b>1.3.1 Infecção e Tratamento</b> .....	<b>24</b>
<b>1.3.2 Resistência</b> .....	<b>27</b>
1.4 TRIPANOSSOMÍASE HUMANA AFRICANA.....	30
<b>1.4.1 Infecção e Tratamento</b> .....	<b>33</b>
1.5 ESTUDOS ESTRUTURAIS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR: DESENHO DE INIBIDORES .....	36
<b>2. OBJETIVO GERAL E OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>38</b>
2.1 OBJETIVO GERAL:.....	38
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	38
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
3.1 Clonagem, Expressão e Purificação das FKBP12 .....	39
<b>3.1.1 Construção de Genes Sintéticos</b> .....	<b>39</b>
<b>3.1.2 Expressão Das Enzimas FKBP12</b> .....	<b>40</b>
<b>3.1.3 Lise Celular</b> .....	<b>41</b>
<b>3.1.4 Purificação das Enzimas FKBP12</b> .....	<b>42</b>
<b>3.1.5 Análise do Estado Oligomérico das Enzimas MTFKBP12 e TBFKBP12</b> .....	<b>43</b>
<b>3.1.6 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)</b> .....	<b>43</b>
<b>3.1.7 Dosagem de Proteínas Totais</b> .....	<b>44</b>
3.2 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR .....	44
<b>3.2.1 Determinação Estrutural</b> .....	<b>44</b>
3.2.1.1 Atribuições de NOE e Cálculo Estrutural.....	45
<b>3.2.2 Dinâmica</b> .....	<b>46</b>
3.2.2.1 Análise dos Dados de Relaxação $R_1$ , $R_2$ E $\{^1\text{H}\}$ - $^{15}\text{N}$ NOE.....	47
3.2.2.2 Estimativa do tempo de correlação rotacional ( $\tau_c$ ) .....	48
<b>3.2.3 Estudos de Interação</b> .....	<b>49</b>

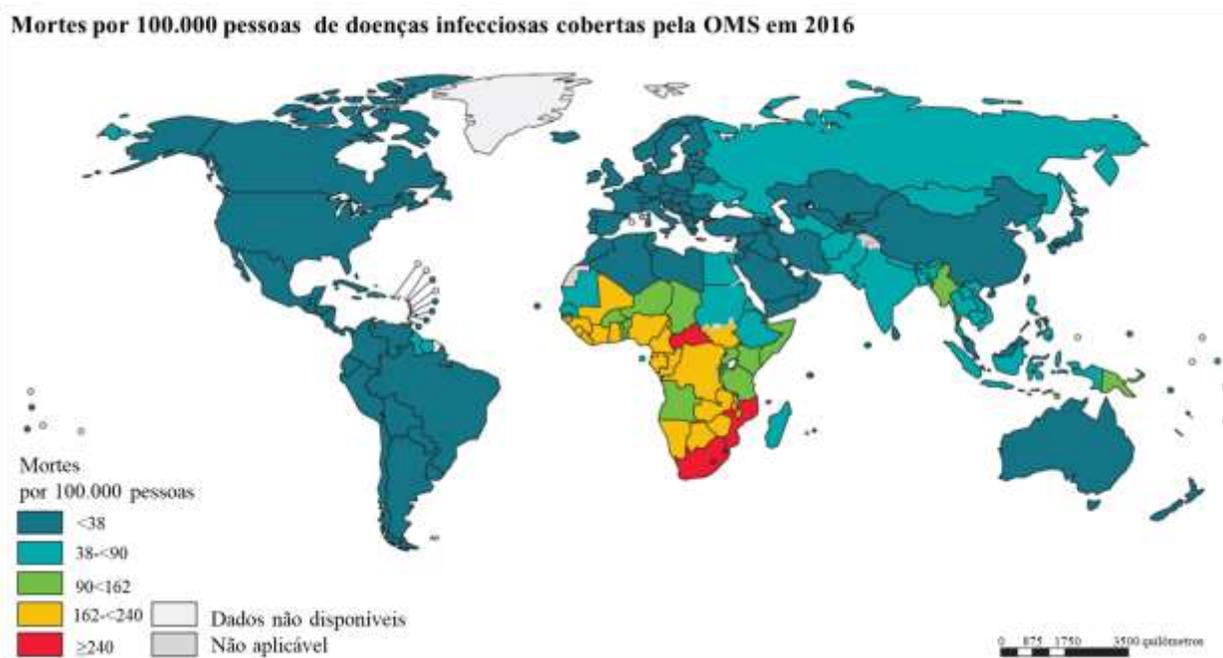
3.2.3.1 Titulação e Mapeamento do Deslocamento Químico.....	50
3.2.3.2 Transferência de saturação (STD) .....	51
3.3.2.3 <i>Docking</i> Molecular Dirigido.....	53
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>54</b>
4.1 SELEÇÃO DOS GENES FKBP12 .....	54
4.2 EXPRESSÃO E LISE DA CONSTRUÇÃO HIS <sub>6</sub> -MtFKBP12.....	54
4.3 EXPRESSÃO E LISE DA CONSTRUÇÃO GST-TbFKBP12 .....	56
4.4 PURIFICAÇÃO E CLIVAGEM DAS PROTEÍNAS MtFKBP12 E TbFKBP12 .....	57
<b>4.4.1 - Purificação da enzima His<sub>6</sub>-MtFKBP12.....</b>	<b>57</b>
<b>4.4.2 - Purificação da enzima GST-TbFKBP12.....</b>	<b>59</b>
4.5 AVALIAÇÃO DO ESTADO OLIGOMÉRICO.....	61
4.6 Ressonância Magnética Nuclear.....	63
<b>4.6.1 – Determinação Estrutural da MtFKBP12 .....</b>	<b>63</b>
<b>4.6.2 – DINÂMICA DA MtFKBP12 .....</b>	<b>75</b>
<b>4.6.3 – TbFKBP12.....</b>	<b>80</b>
<b>4.6.4 – Interação com os Substratos.....</b>	<b>82</b>
4.6.4.1 - Perturbação do Deslocamento Químico.....	82
4.6.4.2 Transferência de Saturação.....	97
<b>4.6.5 – <i>Docking</i> Molecular Dirigido .....</b>	<b>106</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>109</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>118</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>120</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 DOENÇAS INFECCIOSAS

As doenças infecciosas são um dos principais e mais urgentes problemas de saúde no mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica como doenças infecciosas todas aquelas que são causadas por micro-organismos patogênicos, como bactérias, vírus, parasitas ou fungos. Elas podem se espalhar, direta ou indiretamente, de uma pessoa para outra, e também incluem doenças zoonóticas (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2020 a).

Os indicadores de progresso das doenças infecciosas, que consideram HIV, tuberculose, malária, hepatite e doenças tropicais negligenciadas (DTN) em suas estatísticas, estimam que essas doenças causaram 4,3 milhões de mortes em 2016, aproximadamente 16% de todas as mortes no mundo e, mais de 40% das mortes no continente africano (Figura 1). Um considerável progresso realizado nos últimos cem anos na luta contra tais doenças, em particular infecções bacterianas, pode ser atribuído principalmente a três fatores: (1) a melhoria das condições de vida, em particular saneamento; (2) desenvolvimento de vacinas e (3) desenvolvimento de drogas antibacterianas eficientes (KACZOR et al., 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2019a).



**Figura 1: Mortes por 100 000 habitantes causadas por doenças infecciosas**

Mapa apresentando a distribuição geográfica de mortes por doenças infecciosas no mundo. Pode-se observar uma prevalência na região da África e do sudeste da Ásia, principalmente, em países em desenvolvimento. Modificado de World Health Organization (WHO) (2019a).

### 1.1.1 A Resistência aos Fármacos

O avanço na aplicação de antibióticos contra as doenças bacterianas foi considerada a ideia mais promissora do último século. A primeira plataforma bem-sucedida de desenvolvimento de antibióticos foi elaborada por Waksman na década de 1940, o que lhe rendeu o Prêmio Nobel. A plataforma era baseada na atividade antibacteriana de estreptomicetos derivados do solo e detecção de zonas de inibição em uma placa de crescimento. A “era de ouro” dos antibióticos compreendeu as décadas de 1930 e 1960, quando diversos novos medicamentos surgiram. As novas terapias emergentes resultaram no combate eficiente de fungos, bactérias e infecções por protozoários, por exemplo. Os antibióticos, então, tornaram-se indispensáveis como aditivos alimentares, uso veterinário, bem como produtos fitofarmacêuticos (ASLAM et al., 2018; KACZOR et al., 2017).

Infelizmente, essa era terminou porque os pesquisadores não conseguiram manter o ritmo da descoberta de antibióticos, além do uso indiscriminado dos mesmos e, dessa forma, a eficácia dos medicamentos antibacterianos drasticamente declinou ao longo das últimas décadas (ASLAM et al., 2018).

A resistência antimicrobiana ocorre quando os micro-organismos (como bactérias, fungos, vírus e parasitas) mudam quando expostos à drogas antimicrobianas (como antibióticos, antifúngicos, antivirais, antimaláricos e anti-helmínticos). Micro-organismos que desenvolvem resistência antimicrobiana podem ser reportados como bactérias multirresistentes (MDR) ou "superbactérias" (ASLAM et al., 2018; WHO, 2018). A maioria dos mecanismos de resistência a antibióticos bacterianos são adquiridos por alteração de genes alvo (pressão seletiva) ou aquisição de genes de resistência através de plasmídeos (transferência horizontal). Esses genes codificados podem levar à produção de enzimas líticas, alteração da permeabilidade da membrana, ação de efluxo e inibição da ação dos antibióticos (GASHAW et al., 2018; RETA; BITEW KIFILIE; MENGIST, 2019).

A resistência aos antibióticos é um fenômeno antigo e o “resistoma” é um problema dinâmico e crescente. Como muitos antibióticos pertencem à mesma classe de medicamentos, a resistência a um agente antibiótico específico pode levar a resistência a toda uma classe relacionada. A resistência que se desenvolve em um organismo pode se espalhar rápida e imprevisivelmente, e pode afetar o tratamento com antibióticos de uma ampla gama de infecções e doenças. Bactérias resistentes a medicamentos podem circular em populações de seres humanos

e animais, através de alimentos, água e meio ambiente, e a transmissão é influenciada pelo comércio, viagens, migração humana e animal, aumento e mal-uso de antibióticos em clínicas e produção animal, saneamento precário e sistema de esgoto deficiente, sendo um problema maior em países em desenvolvimento (ASLAM et al., 2018; GASHAW et al., 2018; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2015).

A ocorrência de resistência aos antibióticos prescritos induzem, conseqüentemente, o ressurgimento de muitas doenças infecciosas (ASLAM et al., 2018; KACZOR et al., 2017). Estudos apontam que a escolha do agente e a duração da antibiótico-terapia são inadequadas em 30% a 50% dos casos. Estima-se que cerca de 80% dos antibióticos são vendidos nos EUA apenas para uso como suplementos de crescimento e para controlar infecções em animais (ASLAM et al., 2018).

A primeira detecção de micro-organismos resistentes a múltiplos agentes antimicrobianos ocorreu no final da década de 50, em bactérias entéricas, como *Salmonella*, *Shigella* e *Escherichia coli*. Inicialmente, tal evento foi considerado um problema de saúde leve, restrito a micróbios entéricos. No entanto, nos anos 70, os primeiros casos de *Neisseria gonorrhoeae* resistentes à ampicilina e *Haemophilus influenzae* resistentes à ampicilina, tetraciclina e ao cloranfenicol foram reportados (ASLAM et al., 2018).

Atualmente, infecções bacterianas e fúngicas representam riscos e problemas sociais e de saúde de difícil resolução, induzindo um perigo considerável tanto para os pacientes em hospitais quanto para a comunidade (KACZOR et al., 2017).

A resistência antimicrobiana é um dreno para a economia global, com perdas econômicas devido à produtividade reduzida causada por doenças (de seres humanos e animais) e a custos mais altos de tratamento. Para combatê-la, é necessário investimento a longo prazo, como apoio financeiro e técnico aos países em desenvolvimento e na busca e produção de novos medicamentos, ferramentas de diagnóstico, vacinas e outras intervenções, e no fortalecimento dos sistemas de saúde para garantir o acesso e uso mais adequados aos agentes antimicrobianos (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2015).

Portanto, um dos principais desafios da química medicinal contemporânea é o desenvolvimento de novos medicamentos antibacterianos eficazes, não-tóxicos, baratos e de fácil acesso interagindo com novos alvos moleculares, diferentes dos alvos clássicos dos antibióticos atuais (KACZOR et al., 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2015).

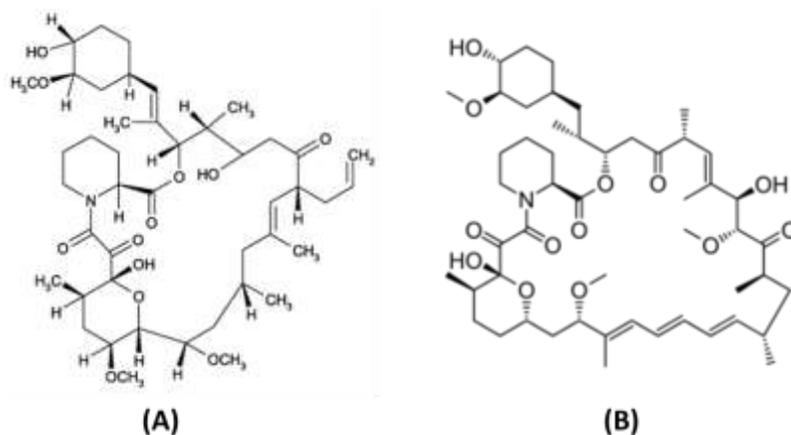
O desenvolvimento de novos agentes antibacterianos pode ser alcançado usando três métodos fundamentais: (i) Modificação através da otimização de um medicamento previamente existente; (ii) Criação de novas moléculas a partir de substâncias sintéticas ou naturais conhecidas e (iii) Identificação de novos sítios-alvo para a síntese de novas moléculas.

A crescente disponibilidade de bancos de dados de bioatividade, adicionalmente com o uso de abordagens computacionais, oferece a chance de prever proteínas alvo, trabalhando com base em duas abordagens principais: o rastreamento de medicamentos baseado em sua estrutura e a triagem de medicamentos baseados em ligantes (KACZOR et al., 2017).

Desta forma, a busca por novos medicamentos é essencial para diversas doenças, dentre elas, as doenças negligenciadas e infecciosas, principalmente em países em desenvolvimento. A busca por compostos mais eficientes focando em novos alvos específicos para estas doenças podem trazer grande impacto social e econômico tanto para o Brasil como para o mundo.

## 1.2 PROTEÍNA LIGADORA DE FK506 (FKBP)

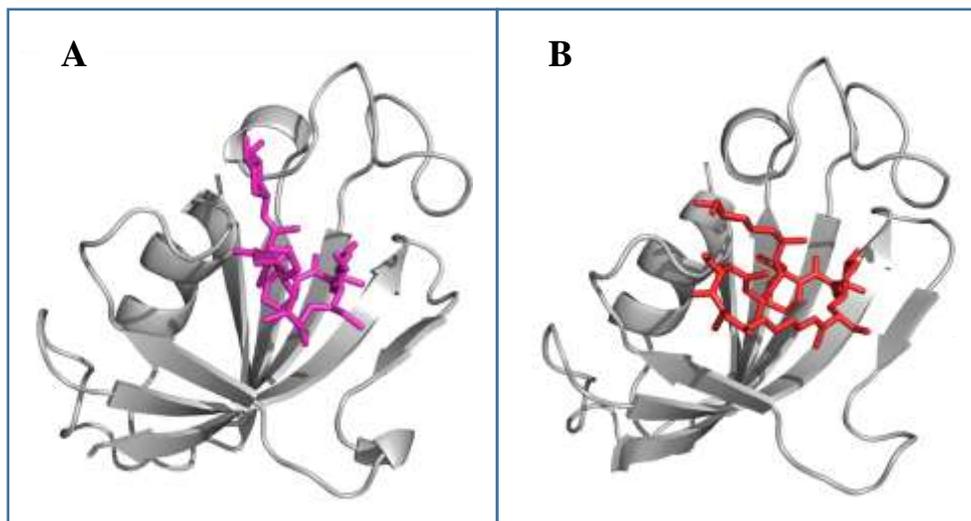
As proteínas ligadoras de FK506 (FKBPs) são uma grande família de proteínas que possuem domínios peptidil prolil cis/trans isomerase (PPIase (EC 5.2.1.8)). Tais proteínas fazem parte de um grupo proteico, em conjunto com as ciclofilinas, conhecido como imunofilinas. O membro fundador da família FKBP é a proteína FKBP12, uma proteína citosólica de 108 aminoácidos (12 kDa) amplamente caracterizada que contém a sequência mínima para uma PPIase e um único domínio de ligação a FK506 (FKBD), sendo expressa abundantemente em todos os tecidos. Além do FK506, a proteína FKBP12 também se liga à rapamicina (Figura 2) e medeia a ação imunossupressora de ambos medicamentos. Outros membros da família foram subsequentemente identificados em leveduras, plantas e mamíferos, com base em sua semelhança de sequência com FKBP12. Uma investigação no genoma humano revela pelo menos 15 polipeptídeos que contêm domínios PPIase semelhantes ao FKBP12 (KANG et al., 2008; TONG; JIANG, 2015).



**Figura 2: Ligantes imunossupressores de FKBP**

(A) O FK506 (tacrolimus) é comumente utilizado como um imunossupressor para evitar a rejeição de transplantes de órgãos. Disponível em: < <https://www.invivogen.com/fk506> >. Acesso em 15 jan. 2020. (B) A rapamicina (Sirolimus) é um inibidor alostérico potente e específico de mTOR com um IC<sub>50</sub> de 0,1 nM nas células HEK293, atuando como ativador de autofagia e imunossupressor. Disponível em: < <https://www.medchemexpress.com/Rapamycin.html> >. Acesso em: 15 jan. 2020.

A estrutura do domínio FKBP12 é caracterizada por uma folha-β anfipática de cinco fitas com uma torção a direita que envolve a α-hélice e forma uma bolsa hidrofóbica na qual seus inibidores se ligam (Figura 3) (KANG et al., 2008).

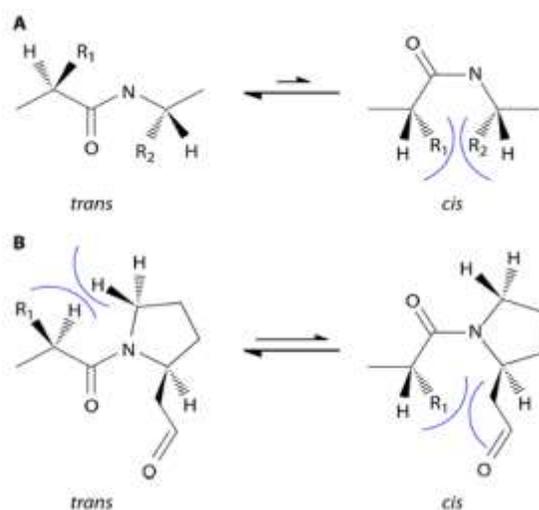


**Figura 3: Complexos FKBP12 com seus imunossupressores resolvidos por cristalografia por difração de raio-x**

O complexo binário formado por FK506-FKB (PDB: 1FKL) e Rapamicina-FKBP (PDB: 2DG3) estão representados em (A) e (B), respectivamente. O primeiro complexo interage com calcineurina (CaN) e impede a ativação e linfócitos T, enquanto o segundo complexo inibe especificamente a via mTOR. Na figura, o FK506 encontra-se destacado em rosa e a rapamicina em vermelho, enquanto a estrutura proteica FKBP-12 encontra-se em cinza.

A FKBP12 humana interage com o FK506 com um  $K_d$  de 0,4 nM e com a rapamicina com um  $K_d$  de 0,2 nM. Tais ligações aumentam a estabilidade da FKBP (os complexos resultantes permanecem mais resistentes à clivagem proteolítica) e criam uma superfície de ligação apropriada para a ligação à calcineurina (CaN) e mTOR, respectivamente.

A função enzimática desempenhada pela FKBP12 é a catálise da interconversão entre as conformações cis/trans da ligação peptídil-prolil (Figura 4). A maioria das ligações peptídicas é encontrada na conformação trans em proteínas enoveladas, enquanto 6% de todas as ligações peptídicas X-Pro apresentam conformação cis (em que X é qualquer aminoácido). Estudos *in vitro* mostraram que a isomerização energeticamente impedida de ligações X-Pro pode limitar o processo de enovelamento proteico. Assim, a PPIase de FKBP12 está envolvida justamente neste processo lento e é conservada em todos os organismos, de bactérias *Archaea* aos primatas. A interconversão cis/trans da ligação peptídica X-Pro ocorre através da ligação do substrato peptídico na bolsa de ligação hidrofóbica da PPIase e a isomerização é facilitada pela mudança conformacional fora do plano da ligação amídica, que é estabilizada através de uma ligação de hidrogênio ao aminoácido localizado na fenda de ligação hidrofóbica, resultando na estabilização do estado de transição durante o processo (KANG et al., 2008; TONG; JIANG, 2015).



#### Figura 4: Isomerização cis-trans em ligações peptídicas

(A) Em quase todas as ligações peptídicas, a conformação trans é favorecida energeticamente porque o impedimento estérico entre as cadeias laterais (R1 e R2) dos dois aminoácidos consecutivos é o mais baixo nesta conformação. (B) Nas ligações peptídil-prolil, em que o grupo amino faz parte da cadeia lateral e, assim, uma ligação peptídica imida é formada, a diferença de energia livre dos dois confôrmeros é comparativamente menor. Consequentemente, cerca de 5 a 6% das ligações peptídil-prolil estão em conformação cis (UNAL; STEINERT, 2014).

Os membros da família FKBP podem conter um ou vários domínios PPIase, que nem sempre exibem atividade PPIase ou se ligam a FK506, mas são essenciais para sua função. É sugerido que o domínio se liga aos locais X-prolina nas proteínas alvo e altera sua conformação através de uma atividade semelhante à PPIase, atuando, portanto, como um interruptor molecular. As PPIase podem interagir com uma gama diversificada de alvos intra e extracelulares, mas tais interações moleculares são fracas. Dessa forma, a quantidade de PPIase necessária para a realização da catálise é geralmente alta (KANG et al., 2008; TONG; JIANG, 2015).

A ampla capacidade de interagir com diferentes alvos faz com que as FKBPs estejam envolvidas em diversas funções celulares, incluindo enovelamento de proteínas, chaperonas, sinalização celular, apoptose e transcrição (TONG; JIANG, 2015). Existem muitos exemplos de FKBPs funcionando como chaperonas, como a FKBP52 de mamíferos, a FKBP73 de bactérias de trigo e FKBP de *Archaea*. Também foi demonstrado que FKBP38 de humanos e FKBP35 de *Plasmodium falciparum* (PfkFBP35) exibem atividade chaperona. A atividade de chaperona das FKBPs não é inibida pelo FK506 ou pela rapamicina, sugerindo que essa atividade ocorra independente da atividade da PPIase (KANG et al., 2008).

Algumas FKBPs também contêm regiões de ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$ , como o domínio de ligação à  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina (CaM) e o motivo da mão-EF, podendo funcionar no retículo endoplasmático (RE) ou na membrana celular, quando possuem motivos de retenção e direcionamento (TONG; JIANG, 2015).

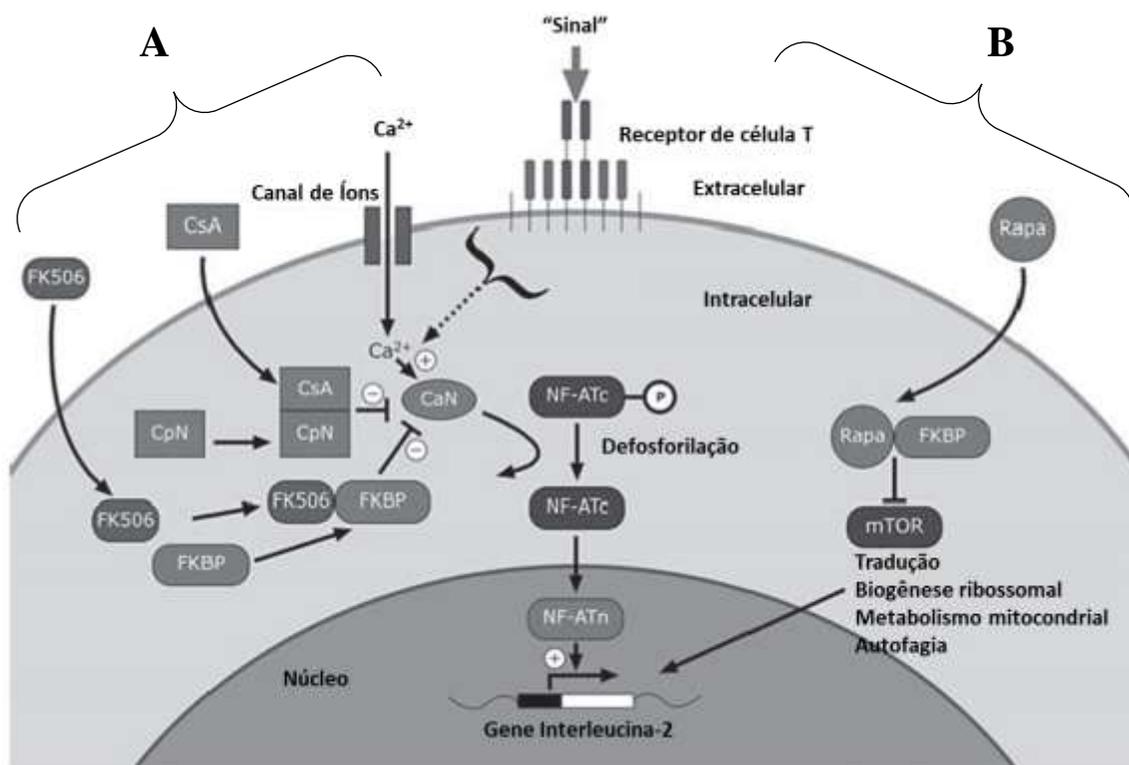
### **1.2.1. FKBP12 como Imunofilina**

Os mecanismos de ação da FKBP12 após ligação inibitória não covalente aos compostos FK506 e Rapamicina já são amplamente conhecidos. No entanto, a inibição enzimática da FKBP12 após tal ligação não contribui exclusivamente para a sua atividade imunossupressora. Em vez disso, a ligação com FKBP12 permite que os complexos interajam posteriormente com os alvos mecanísticos de sua ação na imunossupressão. O complexo FK506-FKBP12 interage especificamente com a calcineurina (CaN) (Figura 5A), uma serina-treonina-fosfatase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ , enquanto o complexo rapamicina-FKBP12 atua na via mTOR, que recebe esse nome devido a interação com rapamicina (*mammalian Target Of Rapamycin*) (Figura 5B) (AGHDASI et al., 2001; KANG et al., 2008; TONG; JIANG, 2015).

Nos linfócitos T, a calcineurina é um componente chave na sinalização mediada pelo receptor de células T necessária para a ativação das mesmas. Ela é ativada pela calmodulina em resposta ao aumento da concentração de cálcio após a ativação do receptor de células T por estimulação do antígeno. A calcineurina ativada defosforila o fator nuclear das células T ativadas (NFAT) que residem no citoplasma, permitindo que ele se transloque para o núcleo, onde coopera com outros fatores de transcrição nuclear para iniciar o programa de transcrição para ativação das células T (Figura 5A).

O tacrolimus (FK506), macrólido de 23 anéis, é um forte imunossupressor e mostra sua atividade inibindo a transcrição de mRNA de Interleucina-2 (IL-2) através da formação de complexo pentamérico com receptor intracelular (FKBP12),  $Ca^{2+}$ , calmodulina e calcineurina. (TAMURA et al., 1994). Quando o complexo binário FK506-FKBP12 é formado, este se liga à calcineurina e bloqueia o acesso do NFAT ao seu local catalítico, impedindo a defosforilação do NFAT e, conseqüentemente, a ativação das células T (TONG; JIANG, 2015).

Outra via importante alterada pela formação de complexos binários com a proteína FKBP12 é a via mTOR. Citocinas, como a IL-2, produzida por células T ativadas, se ligam aos receptores da superfície celular para ativar a via do receptor de fosfato de inositol trifosfato (PI3K) PI3K/ AKT e o efetor a jusante, mTOR. O mTOR ativado fosforila a proteína quinase 6 ribossomal (S6K) e a proteína 1 de ligação ao fator de iniciação eucariótica 4E (4EBP1), dois fatores envolvidos no início da tradução, que resultam no aumento na síntese proteica e promovem o crescimento e a proliferação celular. O complexo rapamicina-FKBP12 se liga especificamente ao mTOR e interfere com sua função quinase, bloqueando a síntese de proteínas e a proliferação de linfócitos T estimulados por citocinas (Figura 5B) (TONG; JIANG, 2015; VILELLA-BACH et al., 1999).



**Figura 5: Atuação dos Imunossupressores em Linfócitos T**

(A) A ativação do receptor de células T resulta em um aumento na concentração intracelular de cálcio livre, seguida pela ativação de calmodulina (CaM) e enzimas dependentes de CaM. A fosfatase dependente de CaM calcineurina (CaN) é um alvo direto dos complexos CsA/CpN e FK506/FKBP. CaN está envolvida na ativação de células T através da defosforilação de fosfoproteínas, como NFAT. (B) O mecanismo de ação simplificado da rapamicina também é mostrado. A ligação de fatores de crescimento, como IL-2, a receptores de células T, induz a atividade de PTK e ativa MAP-quinasas. O complexo FKBP12/rapamicina (Rapa) se liga diretamente ao domínio de ligação de FKBP12/rapamicina (FRB) do mTOR. Essa interação resulta na inibição de atividades de vários processos de sinalização a jusante, conforme ilustrado. Modificado de Kang et al. (2008).

A estrutura cristalográfica do complexo ternário de FKBP12 humano, rapamicina e o domínio de ligação a FKBP12-rapamicina (FRB) do FRAP humano a uma resolução de 2,7 angstroms (Å) revelou as duas proteínas unidas como resultado da capacidade da rapamicina de ocupar dois diferentes bolsos hidrofóbicos simultaneamente. A estrutura mostra extensas interações entre rapamicina e ambas as proteínas, mas poucas interações entre as proteínas.

O *loop 80's* do FKBP12 parece ser uma região em que a estrutura do FKBP12 que difere entre os complexos binário e ternário, com a principal mudança em torno de Ile90, onde os desvios da cadeia lateral e da cadeia principal são aparentes (Figura 6) (CHOI et al., 2007).



**Figura 6: Loop 80's na FKBP12 de humanos**

O *loop 80's*, destacado em rosa, entre a hélice 3<sub>10</sub> e a fita β5 (A81-T96), representa uma região importante de interação entre a proteína FKBP12 e seus parceiros moleculares (PDB 2DG3).

Atualmente, na clínica, o FK506 é um medicamento imunossupressor de primeira linha na prevenção da rejeição de aloenxertos e tratamento de autoimunidade grave. Por atingir especificamente a calcineurina (CaN), o FK506 é frequentemente chamado de inibidor da calcineurina. O principal efeito colateral associado ao FK506 é a nefrotoxicidade, causada pelo bloqueio da função da CaN. A rapamicina, que atua por mecanismo distinto, é desprovida de nefrotoxicidade e, portanto, oferece uma alternativa em imunoterapia. Embora a aplicação clínica do FK506 seja limitada à imunossupressão, a rapamicina e seus análogos são atualmente usados no tratamento de vários cânceres, devido ao seu efeito no bloqueio da proliferação celular (TONG; JIANG, 2015). Além disso, esses ligantes mostram eficácia variável em modelos animais para a doença de Parkinson, demência, e lesão medular, onde as imunofilinas canônicas funcionam como chaperonas e são associados ao enovelamento proteico e modulação do estresse oxidativo (KANG et al., 2008).

### **1.2.2 FKBP12 e a Liberação de Ca<sup>2+</sup>**

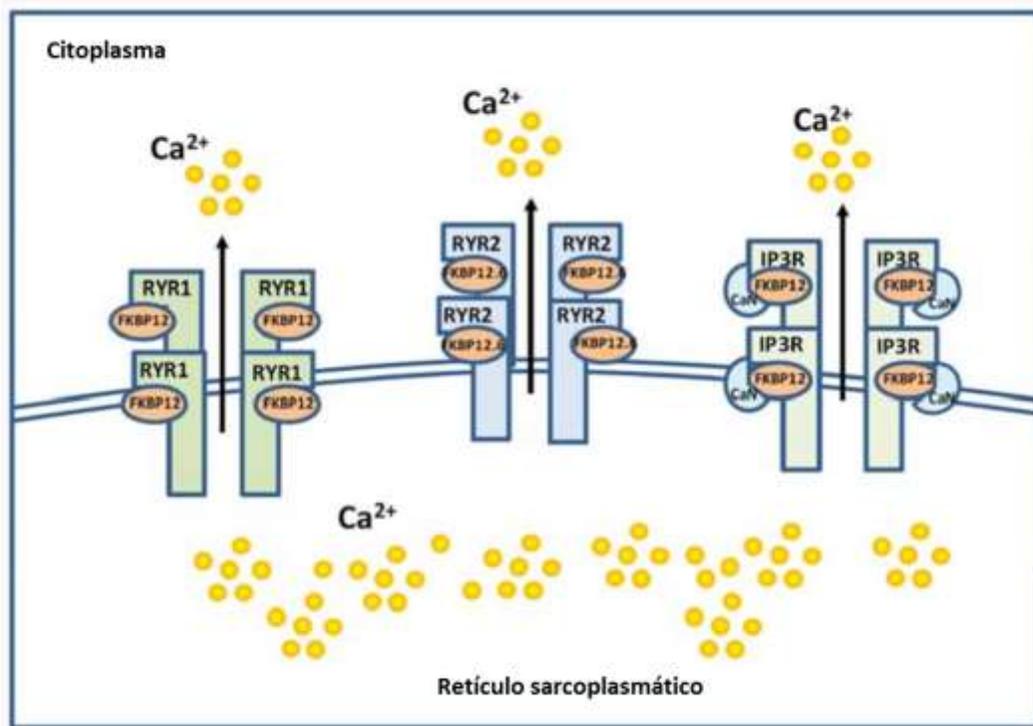
Outra função fisiológica desta pequena proteína citosólica é a regulação da liberação de íons Ca<sup>2+</sup>, quando se associa a receptores de membrana. Nas células musculares, observou-se que

o FKBP12 interage com os principais canais de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos receptores de rianodina do retículo sarcoplasmático (RyRs). Esses receptores de canal mediam a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático no citoplasma durante a contração muscular (TONG; JIANG, 2015).

O receptor RyRs existe como um tetrâmero que se liga a quatro moléculas de FKBP12, uma para cada subunidade (Figura 7). A ligação é sensível ao FK506 ou rapamicina, que desloca o FKBP12 do receptor. Acredita-se que o papel de FKBP12 com os receptores RyR seja distinto de sua função de chaperona, uma vez que tais receptores são corretamente montados e apresentados no retículo sarcoplasmático na sua ausência. A remoção de FKBP12 dos receptores por FK506 ou rapamicina resulta em um canal 'vazado', que leva à depleção do armazenamento de  $\text{Ca}^{2+}$  e, conseqüentemente, à redução da contratilidade muscular. O vazamento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  pode contribuir para a patogênese da disfunção endotelial e hipertensão, por exemplo. Essas observações levaram a sugestão de que o FKBP12 estabiliza a conformação do canal e aumenta o seu limiar de abertura. No entanto, não está claro como a ligação ao FKBP12 afeta a estabilidade dos receptores, pois um estudo inicial sugeriu que a atividade PPIase de FKBP12 não é necessária para tal. (KANG et al., 2008; TONG; JIANG, 2015).

Também foi demonstrado que o FKBP12 interage estreitamente com o receptor de fosfato de inositol trifosfato (IP3R) que é ativado por fosforilação pela proteína quinase A e inativado por desfosforilação por CaN. A ligação de FKBP12 a IP3R permite que ele interaja com CaN e possivelmente module o *status* de fosforilação do receptor (KANG et al., 2008).

A FKBP12.6, a isoforma mais próxima do FKBP12, também desempenha um papel na regulação dos canais de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  RyRs de maneira semelhante à do FKBP12 (TONG; JIANG, 2015).



**Figura 7: Esquema da FKBP12 funcionando como reguladora da liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático e endoplasmático**

FKBP12 e FKBP12.6 associam-se fisicamente aos canais de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  no retículo sarcoplasmático e no retículo endoplasmático. Cada molécula de FKBP12 ou FKBP12.6 se liga a um receptor dentro de um tetrâmero. O FKBP12 se liga seletivamente ao RyR1 e IP3R, enquanto a FKBP12.6 se associa preferencialmente ao RyR2. O CaN é ancorado ao IP3R através do FKBP12 e modula a fosforilação do IP3R. Modificado de Tong e Jiang (2015).

### 1.2.3 Outros Parceiros Moleculares de FKBP12

A FKBP12 também atua como um ligante natural para diferentes outros parceiros, como por exemplo, o motivo rico em glicina e serina (motivo GS) do receptor tipo I do fator de crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), que regula uma ampla gama de processos biológicos. A ligação de FKBP12 não inibe diretamente o receptor, mas bloqueia sua fosforilação pelo TGF- $\beta$ R2, prendendo o receptor em um estado inativo. Os ligantes FK506 e rapamicina inibem essa interação, sugerindo que o domínio central da PPIase do FKBP12 é importante para a interação, e os imunossupressores e o TGF- $\beta$  compartilham um local de ligação comum com a FKBP12 (KANG et al., 2008; TONG; JIANG, 2015). Estudos prévios reportam que células FKBP12<sup>-/-</sup> manifestam parada do ciclo celular na fase G1, sendo consequência direta da perda desta proteína, uma vez que o efeito é resgatado com adição de FKBP12. Dessa forma, esta proteína tem sido alvo da terapia de cânceres e doenças neurodegenerativas, uma vez que quase todos os cânceres de pâncreas e de

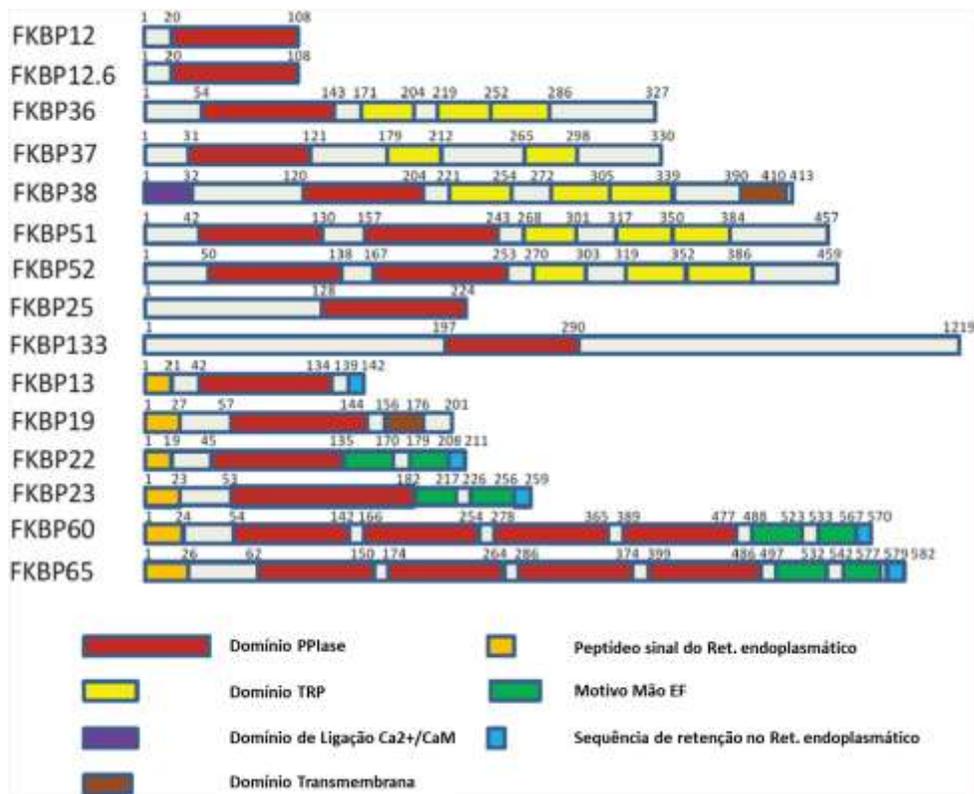
cólon e, um terço dos cânceres de ovário contêm mutações que desativam as vias de sinalização do TGF- $\beta$ . Medicamentos que se liguem ao FKBP12 para impedir sua interação com o receptor TGF- $\beta$  e a calcineurina levariam à parada do ciclo celular, mas não seriam imunossupressores da mesma maneira que imunossupressores, como o FK506, exercem suas ações (AGHDASI et al., 2001). A FKBP12 interage com a activina, um membro da superfamília de TGF e também tem um efeito inibitório na autofosforilação do receptor do fator de crescimento epidérmico (KANG et al., 2008).

Liu et al. (2017) demonstraram a interação entre FKBP12 e a oncoproteína MDM2, que tem sua degradação induzida. Este processo começa com a interrupção da interação MDM2/MDM4 e indução de sua auto-ubiquitinação. O gene MDM2 humano é um oncogene que é amplificado ou superexpresso em muitos tipos de câncer humano. Tal proteína inibe o supressor de tumor p53, o que leva à proliferação e crescimento celular aberrante. A auto-ubiquitinação de MDM2 é estimulada por FKBP25 no núcleo e também por FKBP12 no citosol (LIU et al., 2017).

Esses exemplos demonstram que a atividade da PPIase e a bolsa hidrofóbica de ligação a medicamentos do FKBP12 parecem ser importantes para a interação entre o FKBP12 e os receptores. Juntos, esses dados sugerem que o FKBP12 está envolvido em diversas interações proteicas e regula as atividades de seus parceiros celulares (KANG et al., 2008).

#### **1.2.4 A Família FKBP: Conservação e Diversidade**

Os seres humanos possuem diversas proteínas com domínios FKBP, além da proteína arquetípica FKBP12. Elas podem ser citosólicas, transmembranares ou transmembranares do retículo endoplasmático, quando possuem sequência de endereçamento e/ou motivo de retenção. As proteínas pertencentes a família FKBP variam bastante em tamanho, pois além de possuírem ao menos um domínio FKBD, também possuem diferentes domínios com as mais diversas funções (Figura 8) (TONG; JIANG, 2015).



**Figura 8: Esquema representativo dos genes que codificam proteínas da família FKBP em humanos**  
 Cada domínio presente nas proteínas da família FKBP em humanos é representado pelo esquema de cores descrito na imagem. Modificado de Tong e Jiang (2015).

Além da diversidade de exemplares presente em humanos, esta proteína é conservada em todos os organismos dos diferentes reinos da vida, como bactéria *Archaea*, leveduras, plantas e primatas (KANG et al., 2008; TONG; JIANG, 2015). Assim como nos seres humanos, esta proteína também tem funções reguladoras diversas nestes outros organismos, sendo essencial para a sobrevivência de alguns deles.

Estudos com dois dos tripanosomatídeos mais importantes mostram a relevância das PPIases em sua virulência. Em *Trypanosoma cruzi*, a proteína TcMIP, que pertence a uma classe de FKBP de membrana bacteriana conhecida como potenciadores de infecciosidade de macrófagos, tem um papel importante na invasão parasitária do hospedeiro. O papel do TcMIP no processo de invasão é claro, pois a inibição da entrada do parasita também ocorre quando o TcMIP é bloqueado por anticorpos específicos, e o TcMIP exógeno aumenta significativamente a invasão de maneira dose-dependente em concentrações nanomolares (MORO et al., 1995).

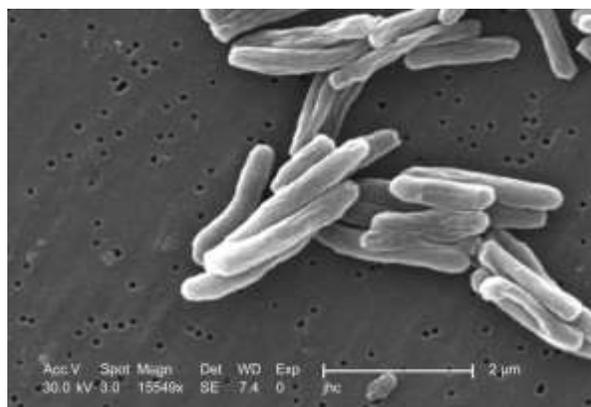
A FKBP12 de *Trypanosoma brucei* também mostrou ser essencial para a sobrevivência do parasita, afetando a citocinese, a arquitetura do citoesqueleto e a motilidade em suas diferentes formas. Verificou-se que a TbFKBP12 é uma proteína associada ao citoesqueleto com localização específica na área da bolsa flagelar da forma da corrente sanguínea e que sua depleção afetou a citocinese e a arquitetura do citoesqueleto. Na forma procíclica no inseto, o *knockdown* mediado por RNA de interferência afetou a motilidade do parasita, com uma rápida queda na velocidade curvilínea devido a uma perda de coordenação na produção de ondas propulsivas e reversas do flagelo. Isso se traduz na rápida interrupção do movimento produtivo e faz com que as células sedimentem no balão de cultura após 60 h da indução de RNAi (BRASSEUR et al., 2013).

Como o efeito da inibição observado nas FKBP12 em outros micro-organismos, verificou-se que os imunossuppressores FK506 (tracolimus) e Rapamicina inibiram o crescimento de *Mycobacteria* spp. e *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP). Além disto, uma cepa avirulenta de *Mycobacterium tuberculosis* teve seu crescimento suprimido pelo uso desses macrólidos em cultura *in vitro* (GREENSTEIN et al., 2008, 2014).

Dessa maneira, o estudo das proteínas FKBP12 de micro-organismos infecciosos, bem como sua interação com novos compostos bioativos que possam levar ao seu bloqueio/inibição, mostra-se promissor no combate deste importante problema social, econômico e de saúde.

### 1.3 TUBERCULOSE

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa transmitida pelo ar causada principalmente pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, que foi descoberta em 1882 por Robert Koch (Figura 9). *M. tuberculosis* e sete espécies de micobactérias intimamente relacionadas (*M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. canetti* e *M. mungi*) compreendem o que é conhecido como complexo *M. tuberculosis*. Verificou-se que a maioria dessas espécies, mas não todas, causa doenças em seres humanos (CDC, 2013; PAI et al., 2016).



**Figura 9: *Mycobacterium tuberculosis* em micrografia eletrônica de varredura**

Microscopia eletrônica de varredura retratando várias bactérias Gram-positivas *Mycobacterium tuberculosis* sob uma ampliação de 15549x. Disponível em: <<https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=8438>>. Acesso em 10 fev. 2020.

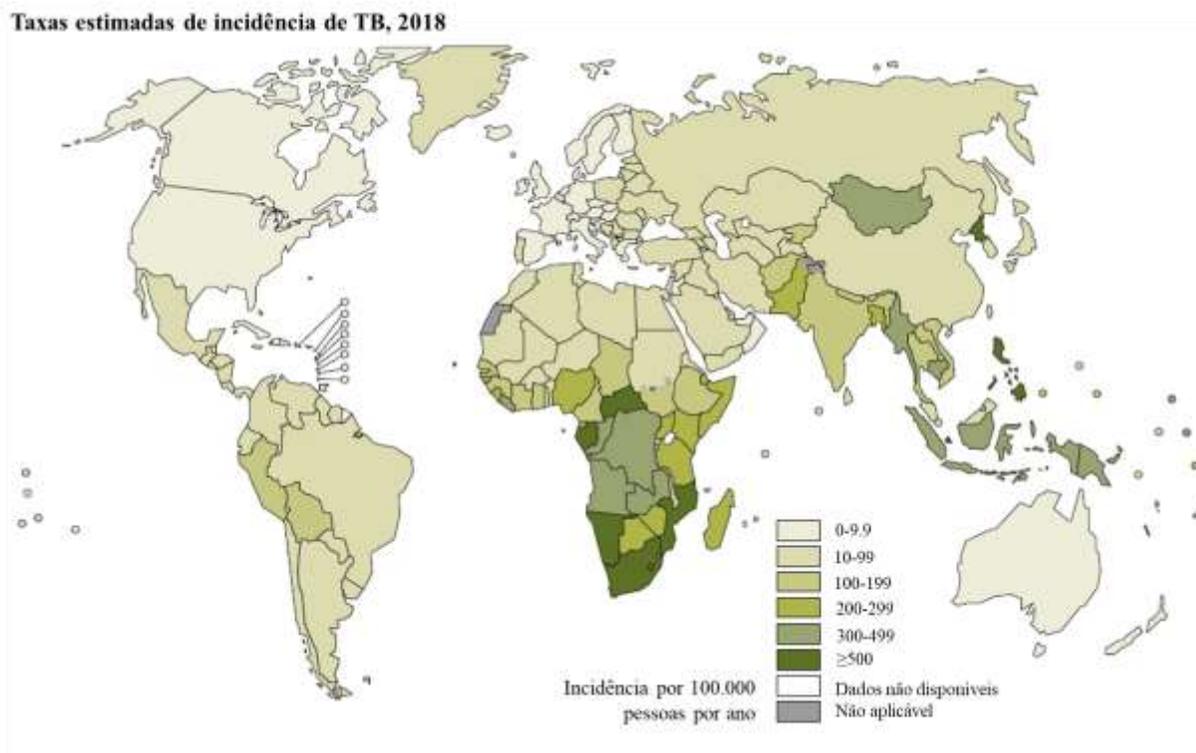
Embora seja primariamente um patógeno pulmonar, o *M. tuberculosis* pode causar doenças em todo o corpo (PAI et al., 2016). A doença extrapulmonar da TB pode ocorrer em diversos locais, incluindo a laringe, os linfonodos, a pleura, o cérebro, os rins, ossos e articulações.

A tuberculose pode se apresentar como uma infecção assintomática não transmissível, também chamada de infecção latente por tuberculose (ILTb), ou uma doença com risco de vida, conhecida por tuberculose ativa. Pacientes com tuberculose ativa apresentam sintomas gerais, como febre, fadiga, falta de apetite e perda de peso, e aqueles com doença pulmonar podem ter tosse persistente e hemoptise (tosse com sangue) em doenças avançadas. No entanto, alguns pacientes com doença ativa positiva também podem ser assintomáticos possuindo assim, a TB subclínica (PAI et al., 2016).

A tuberculose é frequentemente fatal na ausência de tratamento: aproximadamente 50% dos indivíduos que desenvolvem a doença ativa sucumbem a ela. Entretanto, apenas 5% a 15% dos indivíduos infectados com *M. tuberculosis* progredirão (de meses a alguns anos) para a doença ativa (PAI et al., 2016).

Em todo o mundo, cerca de 10 milhões de pessoas adoecem com tuberculose a cada ano, sendo uma das 10 principais causas de morte e, a principal causada por um único agente infeccioso, acima do HIV. No Brasil, em 2018, foram diagnosticados 72.788 casos novos de tuberculose com aproximadamente 4.500 mortes anotadas em 2017. Os dois estados com maiores coeficientes de incidência foram Amazonas e Rio de Janeiro, com 72,9 casos/100 mil habitantes e 66,3 casos/100 mil habitantes, respectivamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL, 2019). Globalmente, estima-se que 1,7 bilhão de pessoas estão infectadas com *M. tuberculosis* e correm, portanto, risco

de desenvolver a doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2019b). A maioria dos casos de TB, em 2018, estão reportados na Figura 10.



**Figura 10: Casos de tuberculose em 2018**

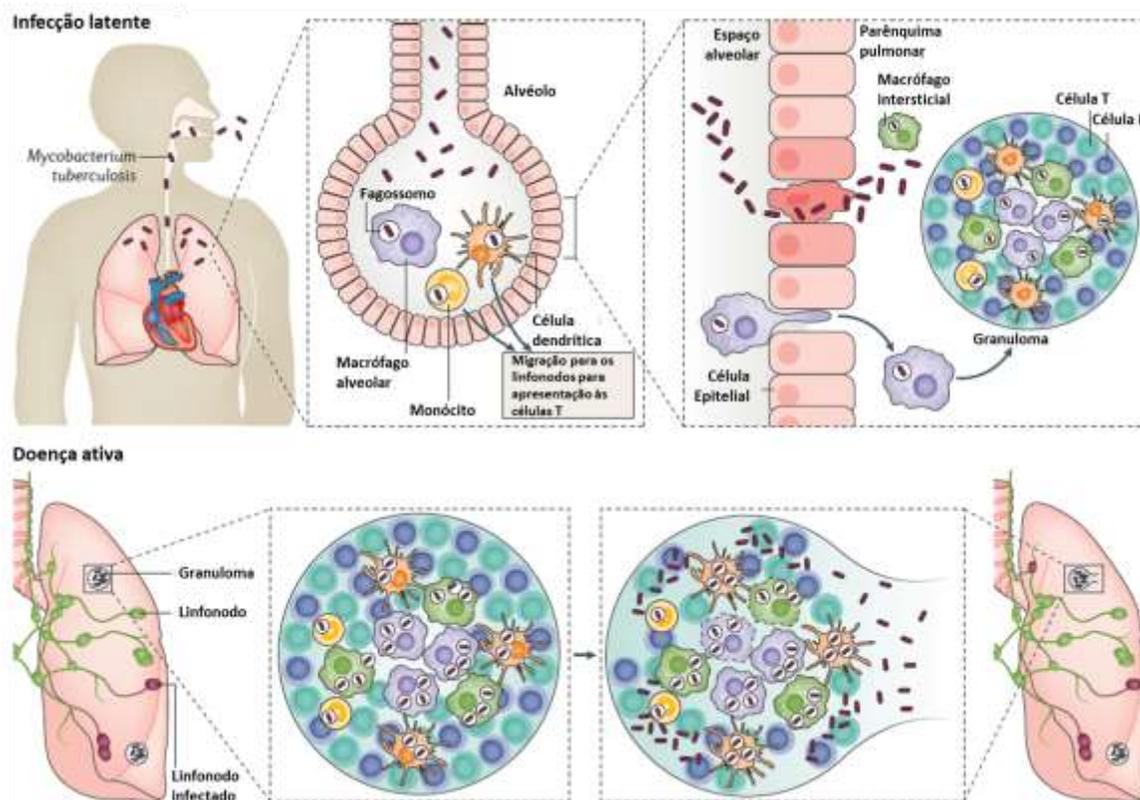
Geograficamente, a maioria dos casos de TB, em 2018, ocorreu nas regiões do Sudeste Asiático (44%), África (24%) e Pacífico Ocidental (18%), com participações menores no Mediterrâneo Oriental (8%), nas Américas (3%) e Europa (3%). Oito países representaram dois terços do total global: Índia (27%), China (9%), Indonésia (8%), Filipinas (6%), Paquistão (6%), Nigéria (4%), Bangladesh (4%) e África do Sul (3%). Modificado de World Health Organization (WHO) (2019b).

### 1.3.1 Infecção e Tratamento

O *M. tuberculosis* é transmitido em partículas transportadas pelo ar, chamadas núcleos de gotículas, de 1 a 5 microns de diâmetro, que podem permanecer suspensas no ar por várias horas. Os núcleos infecciosos de gotículas são gerados quando as pessoas que sofrem de tuberculose pulmonar ou laríngea tosse, espirram, gritam ou cantam. A via de entrada do *M. tuberculosis* é pela via respiratória: após a inalação, a bactéria é translocada para o sistema respiratório inferior, onde encontra os macrófagos alveolares, tipo de célula dominante que o *M. tuberculosis* infecta, além de neutrófilos, monócitos e células dendríticas (CDC, 2013; ERNST, 2012; PAI et al., 2016).

Após infectar os macrófagos alveolares nas vias aéreas, o *M. tuberculosis* ganha acesso ao interstício pulmonar, onde o processo de infecção evolui. No entanto, não se sabe como o *M. tuberculosis* acessa o parênquima. Independentemente da rota, este acesso leva ao recrutamento de um número crescente de células para o local da infecção, gerando uma resposta multicelular do hospedeiro chamada granuloma (PAI et al., 2016).

Neste momento, a maioria dos seres humanos se torna assintomática e não libera bactérias, sendo considerada uma infecção latente pela TB. Vale ressaltar que, embora o tamanho da população bacteriana permaneça estável, uma subpopulação de bactérias continua a se replicar durante esse estágio, podendo acumular mutações durante a latência (ERNST, 2012; PAI et al., 2016). A progressão da doença ILTB para TB ativa pode ocorrer a qualquer momento, variando de semanas a décadas, por razões que não são completamente claras (PAI et al., 2016). A Figura 11 apresenta as etapas de infecção.



**Figura 11: Etapas do processo de infecção por *M. tuberculosis***

A infecção começa quando o *Mycobacterium tuberculosis* entra nos pulmões por inalação, atinge o espaço alveolar e encontra os macrófagos alveolares residentes. Se essa primeira linha de defesa falhar na eliminação da bactéria, o *M. tuberculosis* invade o tecido intersticial pulmonar, seja pelas bactérias que infectam diretamente o epitélio alveolar ou pelos macrófagos alveolares infectados que migram para o parênquima pulmonar. Posteriormente, células dendríticas ou monócitos inflamatórios transportam *M. tuberculosis* para os linfonodos pulmonares para ativação da célula T. Esse evento leva ao recrutamento de células imunes, incluindo células T e células B, para o parênquima pulmonar para formar um granuloma. As bactérias replicam dentro do granuloma crescente. Se a carga bacteriana se tornar muito grande, o granuloma deixará de conter a infecção e as bactérias se disseminarão eventualmente para outros órgãos, incluindo o cérebro. Nesta fase, a bactéria pode entrar na corrente sanguínea ou se reinserir no trato respiratório - o hospedeiro infectado agora é infeccioso, sintomático e possui uma doença ativa da tuberculose. Modificado de Pai et al. (2016).

O principal tratamento para a TB ativa é um período mínimo de 6 meses de terapia com rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol durante os primeiros 2 meses (fase intensiva), seguido pela isoniazida e rifampicina por 4 meses (fase de continuação). A eficácia e o progresso do tratamento são geralmente monitorados com repetidos exames de escarro, culturas e raios X do tórax (PAI et al., 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2019b).

Embora o regime padrão de 6 meses tenha uma alta taxa de sucesso (aproximadamente 86%), ele também tem várias limitações. Em parte devido à longa duração do tratamento, uma certa proporção de pacientes desenvolve toxicidade. Os eventos adversos comuns são aumentos leves no

nível de enzimas hepáticas, erupção cutânea, intolerância gastrointestinal, neuropatia e artralgia e podem ser tratados de forma sintomática sem a descontinuidade dos medicamentos agressores. Eventos adversos graves são hepatite grave, trombocitopenia imune, agranulocitose, hemólise, insuficiência renal, neurite óptica e ototoxicidade. Além disso, a terapia prolongada compromete a adesão do paciente. Como resultado, são necessárias medidas de suporte para garantir a adesão ideal ao tratamento, pois a sua falta de conclusão contribui para a falha do tratamento, recaída e o surgimento de resistência aos medicamentos (PAI et al., 2016).

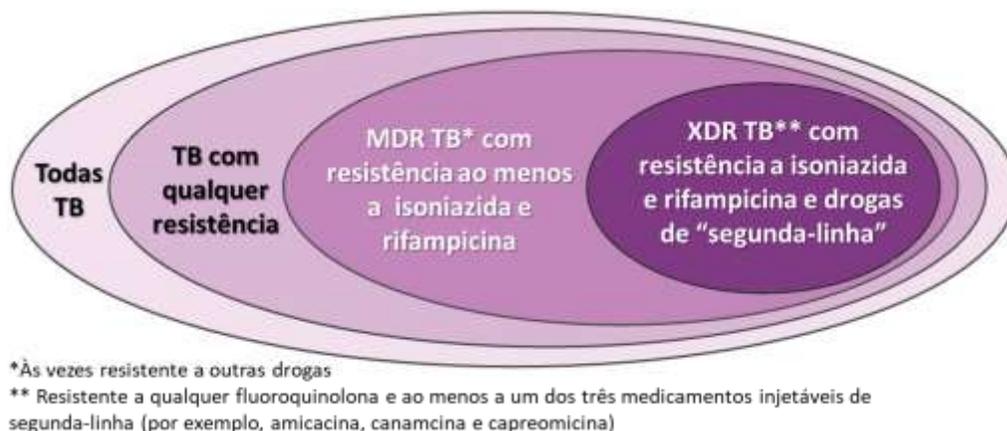
### **1.3.2 Resistência**

A TB resistente a medicamentos é causada por micro-organismos de *M. tuberculosis* que são resistentes aos fármacos normalmente usados para tratar a doença. Ela é transmitida da mesma maneira que a tuberculose suscetível aos medicamentos convencionais, não sendo mais infecciosa. No entanto, o atraso no reconhecimento da resistência ao medicamento ou períodos prolongados de infecciosidade podem facilitar o aumento da transmissão e o desenvolvimento adicional da resistência aos medicamentos (CDC, 2013).

O *M. tuberculosis* desenvolve resistência a medicamentos através de mutações genéticas (não há relatos de resistência desenvolvidos pela aquisição de novo DNA). Os dois principais mecanismos de resistência aos medicamentos são a modificação do alvo (por exemplo, uma RNA polimerase bacteriana mutante que escapa à ação da rifampicina) ou uma enzima defeituosa que converteria um pró-medicamento em um medicamento ativo (por exemplo, um mutante catalase bacteriana que não ativa a isoniazida) (PAI et al., 2016).

Os espectros de resistência da bactéria podem ser variados, apresentando resistência a um ou mais agentes do tratamento. A TB multirresistente (MDR-TB) é causada por organismos resistentes aos medicamentos anti-TB mais eficazes, isoniazida e rifampicina. Esses fármacos são considerados medicamentos de primeira linha e são usados para tratar a maioria das pessoas com a doença. A TB extensivamente resistente a medicamentos (XDR-TB) é um tipo relativamente raro de TB resistente. A XDR-TB é resistente à isoniazida e à rifampicina, além de qualquer fluoroquinolona e pelo menos um dos três medicamentos injetáveis de segunda linha (amicacina, canamicina ou capreomicina). Como o XDR-TB é resistente a medicamentos de primeira e segunda linha, os pacientes ficam com opções de tratamento mais tóxicas, mais caras e muito menos

eficazes, tais como linezolida e claritromicina (Figura 12) (CDC, 2013; PAI et al., 2016; WHO, 2014).

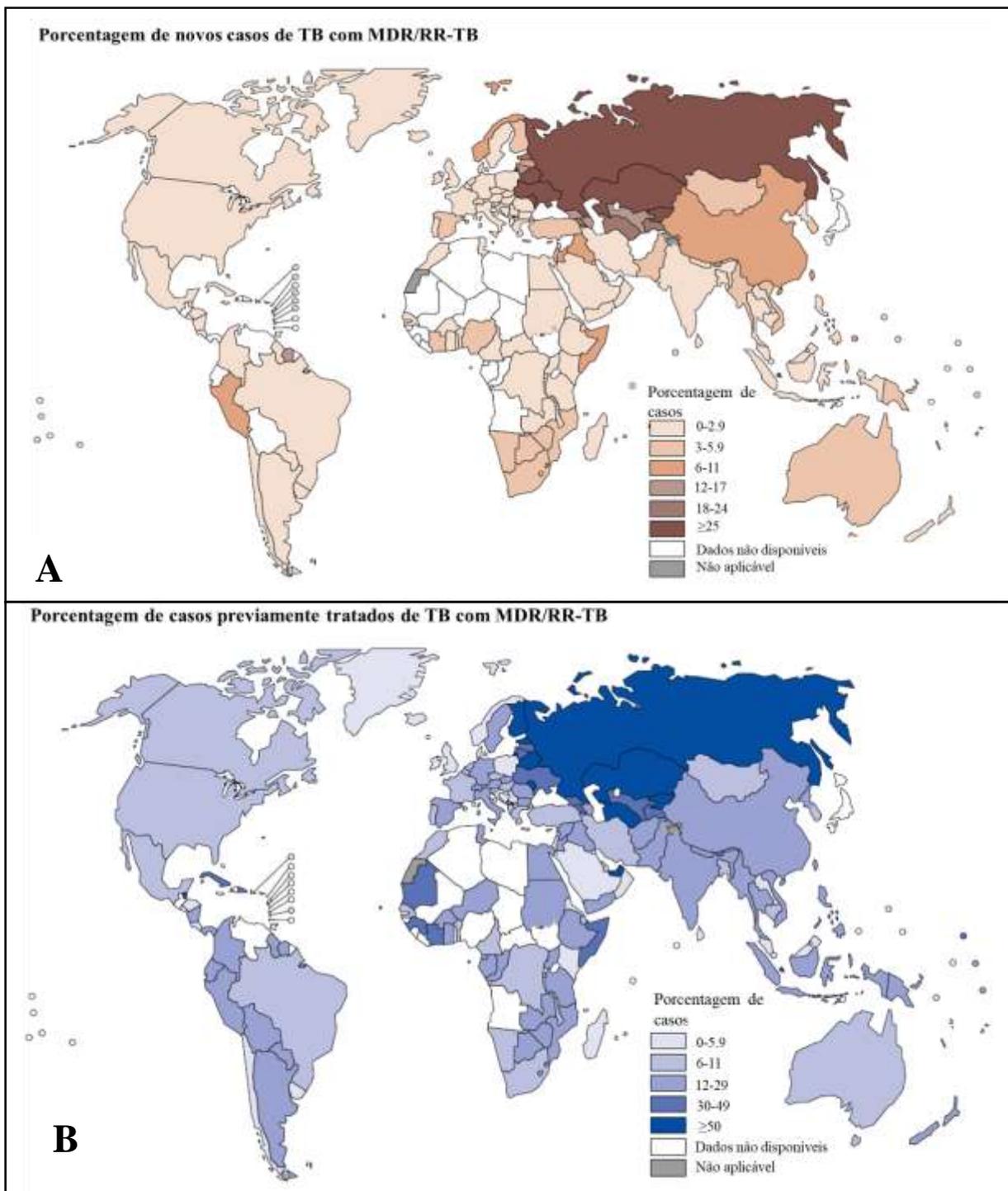


**Figura 12: Espectros de resistência de *M. tuberculosis***

A resistência de *M. tuberculosis* pode apresentar diversos espectros. As cepas podem apresentar resistência a qualquer antibiótico, a apenas um ou a grande parte deles. A tuberculose multirresistente (MDR-TB) é classificada assim por apresentar resistência aos antibióticos de primeira-linha ao combate a essa doença: isoniazida e rifampicina. Já a tuberculose extensivamente resistente (XDR-TB) além de apresentar resistência aos mesmos, também apresenta resistência aos antibióticos de segunda-linha (amicacina, canamicina e capreomicina). Modificado de CDC (2013).

Além disso, a TB resistente a medicamentos pode se desenvolver de duas maneiras diferentes, denominadas resistência primária e secundária. A resistência primária ocorre em pessoas que são inicialmente infectadas com organismos resistentes. A resistência secundária, ou resistência adquirida, se desenvolve durante o tratamento da TB, geralmente, porque o paciente foi tratado com um regime inadequado, não seguiu o regime prescrito adequadamente ou por outras condições, como má absorção de medicamentos ou interações medicamentosas (CDC, 2013).

Segundo dados da OMS, em 2018, estima-se que 3,4% dos casos novos e 18% dos casos tratados anteriormente possuam tuberculose multirresistente ou resistente à rifampicina (MDR/RR-TB) (Figura 13). Globalmente, em 2018, havia um número estimado de 484.000 casos incidentes de MDR/RR-TB com cerca de 214.000 mortes. Entretanto, dos 40 países com uma carga alta de TB ou MDR-TB, ou ambos, apenas 28 deles têm dados de vários anos para avaliar tendências em resistência a drogas. A distribuição geográfica de todos os casos de MDR/RR-TB é de 27% na Índia, 14% na China e 9% na Federação da Rússia (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2019b).



**Figura 13: Incidência de cepas MDR/RR-TB em casos de tuberculose em 2018**

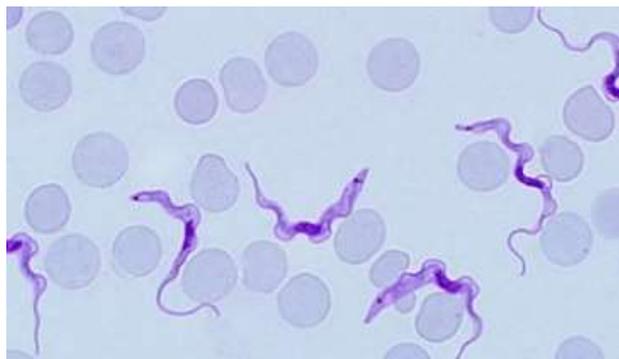
Mapas apresentando a porcentagem de casos de cepas multirresistentes (MDR-TB) ou resistentes à rifampicina (MDR/RR-TB) em casos de tuberculose no mundo. Em (A), estão representados os casos em indivíduos que nunca haviam contraído tuberculose. Em (B), estão representados os casos em indivíduos com tuberculose que já haviam sido previamente tratados. Em ambos os casos, pode-se observar predominância dos casos nos países que formavam a antiga União Soviética (acima de 25% em casos novos e acima de 50% em casos tratados anteriormente. Modificado de World Health Organization (Who) (2019b).

Entre os pacientes com MDR/RR-TB notificados em 2018, 59% foram testados quanto à resistência a fluoroquinolonas e injetáveis de segunda linha, um aumento considerável dos 49% testados em 2017. Um total de 13.068 casos de XDR-TB foi relatada por 81 países, com 88% dos casos sendo da Região Europeia da OMS e da Região do Sudeste da Ásia.

Dessa forma, com o exposto acima, torna-se urgente a busca por novas abordagens terapêuticas no que compete ao combate à tuberculose.

#### 1.4 TRIPANOSSOMÍASE HUMANA AFRICANA

As tripanossomíases humanas, doenças causadas pelo protozoário do gênero *Trypanosoma sp.*, podem ocorrer de duas formas principais: a Americana, também conhecida como Doença de Chagas, que tem como principal causador o *Trypanosoma cruzi*, e a Africana, também conhecida como Doença do Sono e que tem como agentes principais duas espécies: *T. brucei gambiense* e *T. brucei rhodesiense* (Figura 14).



**Figura 14: Microscopia óptica do *Trypanosoma brucei rhodesiense***

Pode-se observar o tripanossoma causador da doença do sono em esfregaço de sangue colorido pelo método de Giemsa Disponível em: < <https://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/index.html> >. Acesso em 15 fev. 2020.

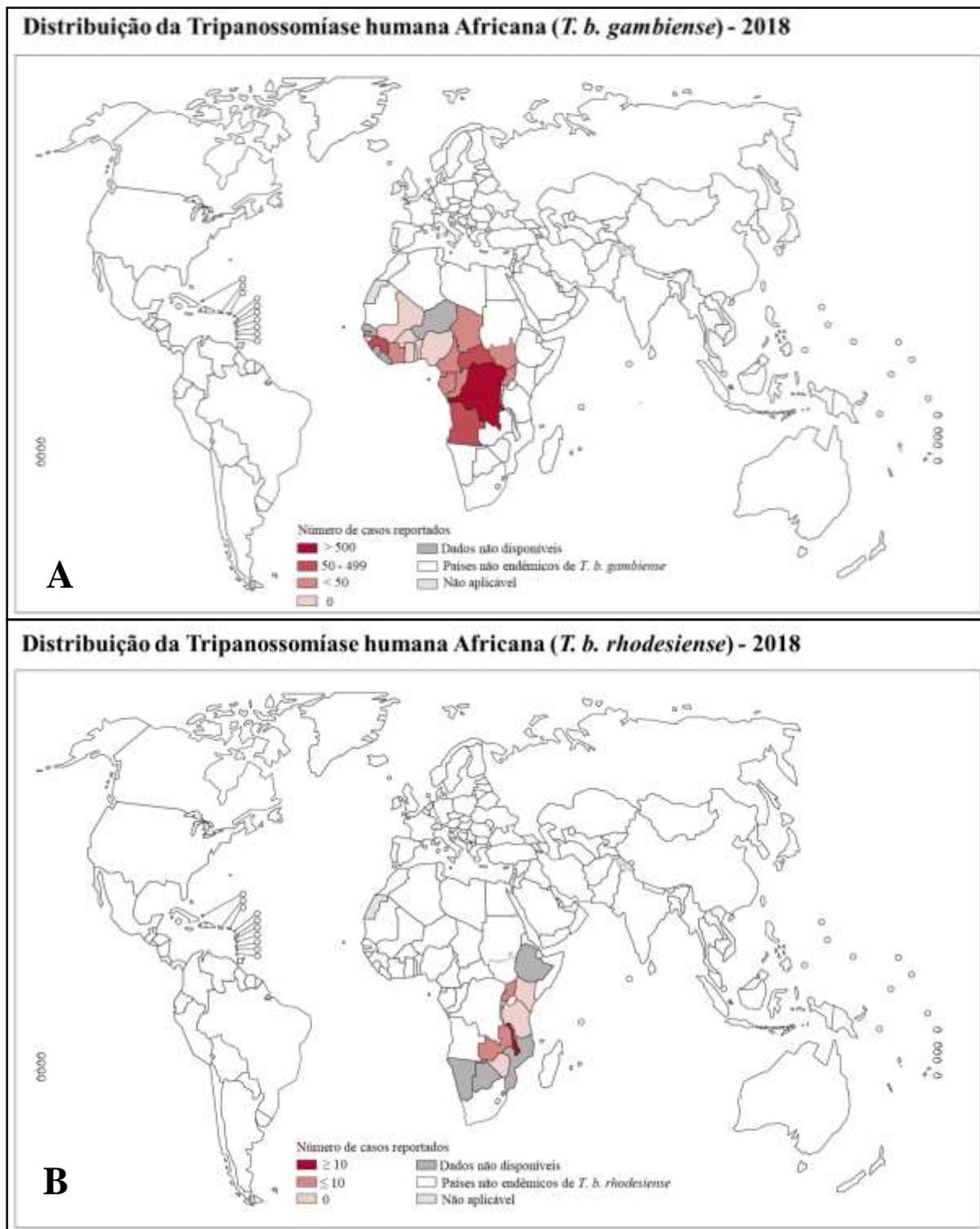
As tripanossomíases humanas fazem parte de um grupo de doenças denominado “Doenças Tropicais Negligenciadas”. O emprego do termo “doenças negligenciadas” foi originalmente proposto na década de 1970. Esta tipologia tem sido, desde então, utilizada para se referir a um conjunto de doenças causadas por agentes infecciosos e parasitários que são endêmicas em populações de baixa renda vivendo, principalmente, em países em desenvolvimento na África, Ásia e nas Américas. O adjetivo “negligenciada” originalmente proposto tomou como base o fato de que por um lado elas não despertam o interesse das grandes empresas farmacêuticas multinacionais, que não veem nessas doenças compradores potenciais de novos medicamentos, e por outro, o

estudo dessas doenças que vêm sendo pouco financiado pelas agências de fomento (DE SOUZA, 2010).

Atualmente, fazem parte desse grupo as doenças Úlcera de Buruli, doença de Chagas, dengue e chikungunya, dracunculíase (doença de verme-da-índia), equinococose, trematodíase transmitida por alimentos, tripanossomíase humana africana (doença do sono), leishmaniose, hanseníase, filariose linfática, micetoma, cromoblastomicose e outras micoses profundas, oncocercose (cegueira do rio), raiva, sarna e outros ectoparasitas, esquistossomose, helmintíases transmitidas pelo solo, envenenamento por picada de cobra, cisticercose/teníase, tracoma e boubá (treponematoses endêmicas) (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2019a).

A tripanossomíase africana, transmitida pela picada da mosca tsé-tsé, coloca 70 milhões de pessoas em risco em toda a África Subsaariana e geralmente é fatal se não tratada ou tratada inadequadamente (KENNEDY, 2019). Como o próprio nome diz, a Tripanossomíase humana africana é endêmica do continente africano e a distribuição dos seus dois agentes principais ocorre geograficamente distinta: enquanto o *T. brucei gambiense* é exclusiva da África Ocidental, acometendo 24 países dessa região, o *T. brucei rhodesiense* é encontrado apenas em 13 países da África Oriental e Austral (WHO, 2020 b). O *T. b. gambiense* é responsável por mais de 98% dos casos relatados de doença do sono em 2018, enquanto o *T. b. rhodesiense* representa apenas cerca de 2%.

A distribuição de casos da doença em 2018, último infográfico disponibilizado pela OMS, pode ser vista na Figura 15.



**Figura 15: Distribuição de casos de *Trypanosoma brucei* em 2018**

Mapas apresentando a distribuição geográfica dos casos da tripanossomíase africana no mundo. Em (A), os casos reportados para *T. brucei gambiense*, exclusivos dos países da África Ocidental. Em (B), os casos reportados para *T. brucei rhodesiense*, exclusivos dos países da África Oriental e Austral. Disponível em: < <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx> >. Acesso em: 01 abril 2020.

Cabe ressaltar que entre 1999 e 2018, o número relatado de novos casos da forma crônica da tripanossomíase humana africana (*T. b. gambiense*) caiu 97% (de 27.862 para 953 casos). Durante o mesmo período, o número de casos relatados da forma aguda de tripanossomíase africana humana (*T. b. rhodesiense*) caiu 96% (de 619 para 24 casos) (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2020 b). Mesmo com a queda no número de casos específicos para esta doença é importante ressaltar que há grande importância nos estudos de novos alvos para tripanossomíases, visto que em outras doenças não foi observada queda nos casos relatados, como por exemplo para a doença de Chagas, causada pelo *Trypanossoma cruzi*, que é responsável por cerca de 12 mil mortes por ano na América Latina (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

#### 1.4.1 Infecção e Tratamento

A doença é transmitida principalmente pela picada da mosca tsé-tsé (Figura 16) infectada, mas existem outras maneiras pelas quais as pessoas são infectadas: (1) infecção de mãe para filho, na qual o parasita pode atravessar a placenta e infectar o feto; (2) transmissão mecânica através de outros insetos sugadores de sangue (no entanto, é difícil avaliar seu impacto epidemiológico); (3) infecções acidentais em laboratórios e (4) transmissão através do contato sexual.



**Figura 16: Mosca Tsé-Tsé**

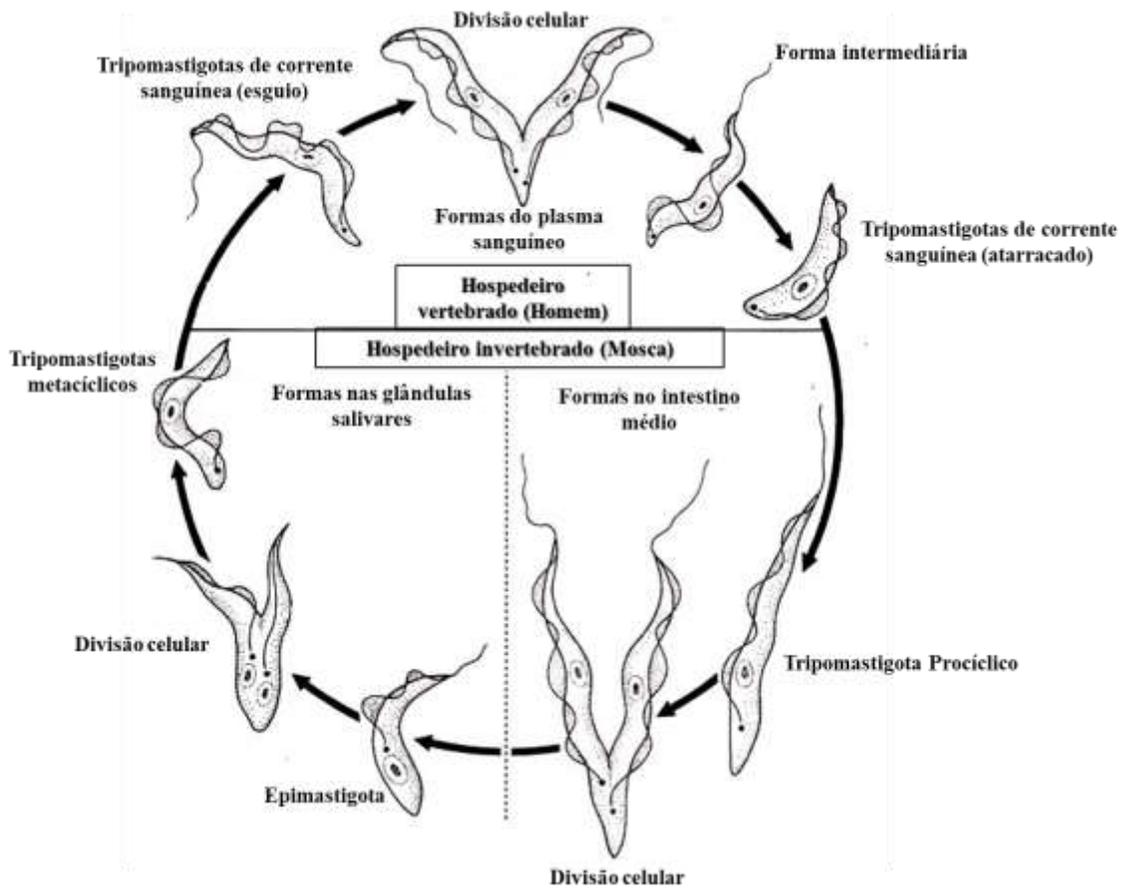
A mosca Tsé-tsé (*Glossina* sp.) é o principal vetor de ambas as formas parasitárias causadoras da Doença do Sono. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/epi.html>>. Acesso em: 10 fev. 2020.

No estágio inicial, os tripanossomas se multiplicam em tecidos subcutâneos, sangue e linfa. Isso também é chamado de estágio hemo-linfático, que envolve crises de febre, dores de cabeça, dores nas articulações e coceira.

No segundo estágio (estágio avançado), os parasitas atravessam a barreira hematoencefálica para infectar o sistema nervoso central. Isso é conhecido como estágio

neurológico ou meningo-encefálico. Em geral, é quando surgem sinais e sintomas mais óbvios da doença: mudanças de comportamento, confusão, distúrbios sensoriais e falta de coordenação. A perturbação do ciclo do sono, que dá nome à doença, é uma característica importante. Sem tratamento, a doença do sono é considerada fatal (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2020 c).

O ciclo de desenvolvimento do parasita em suas diversas formas pode ser observado na Figura 17. Durante uma refeição de sangue no hospedeiro mamífero, uma mosca tsé-tsé infectada injeta tripomastigotas metacíclicos no tecido da pele. Os parasitas entram no sistema linfático e passam para a corrente sanguínea. No interior do hospedeiro, eles se transformam em tripomastigotas da corrente sanguínea, são transportados para outros locais do corpo, atingem outros fluidos corporais (por exemplo, linfa, fluido espinhal) e continuam a replicação por fissão binária. Todo o ciclo de vida dos tripanossomas africanos é representado por estágios extracelulares. A mosca tsé-tsé é infectada com tripomastigotas da corrente sanguínea ao fazer uma refeição de sangue em um hospedeiro mamífero infectado. No intestino médio da mosca, os parasitas se transformam em tripomastigotas procíclicos, multiplicam-se por fissão binária, deixam o intestino médio e se transformam em epimastigotas. Os epimastigotas alcançam as glândulas salivares da mosca e continuam a multiplicação por fissão binária (CDC, 2020).



**Figura 17: Ciclo de vida de *T. brucei gambiense***

Durante um repasto no sangue do hospedeiro mamífero, uma mosca tsé-tsé injeta tripomastigotas metacíclicos no hospedeiro vertebrado. Os parasitas entram no sistema linfático e passam para a corrente sanguínea. No interior do hospedeiro, eles se transformam em tripomastigotas da corrente sanguínea e atingem outros fluidos corporais, como o sistema linfático e fluido espinhal, e continuam a replicação por fissão binária. A mosca tsé-tsé se infecta pelos tripomastigotas de corrente sanguínea ao se alimentar do sangue de um hospedeiro mamífero infectado. No intestino médio da mosca, os parasitas se transformam em tripomastigotas procíclicos, multiplicam-se por fissão binária e se transformam em epimastigotas quando atingem as glândulas salivares. Disponível em: < <http://www.biologydiscussion.com/parasitology/parasitic-protozoa/life-cycle-of-trypanosoma-gambiense-with-diagram/62069>> . Acesso em: 15 mar 2020.

Embora a terapia medicamentosa para a tripanossomíase africana em estágio inicial seja eficaz e com baixa toxicidade, utilizando apenas suramina intravenosa para *T. b. rhodesiense* e suramina intramuscular ou pentamidina para *T. b. gambiense*, os medicamentos utilizados para doença em estágio avançado são muito tóxicos. Neste caso, o melarsoprol é o medicamento de primeira linha para *T. b. rhodesiense* e, embora eficaz, possui administração muito dolorosa, além de causar encefalopatia reativa pós-tratamento em cerca de 10% dos casos. Ainda assim, estudos

recentes demonstram taxa de mortalidade de aproximadamente 6% dos casos tratados com este medicamento. O melarsoprol também é eficaz contra o *T. b. gambiense*, mas foi substituído pela terapia combinada de nifurtimox e eflornitina, que não se mostrou eficaz para a outra variante parasitária (KENNEDY, 2019).

De acordo com os dados apresentados acima para as doenças abordadas, a busca por novas abordagens terapêuticas mostra-se imprescindível. Um medicamento eficaz que exigisse menor duração de tratamento, principalmente no caso da tuberculose, e/ou isento de efeitos colaterais, principalmente no caso do estágio avançado da tripanossomíase africana, seria, portanto, de grande valor terapêutico. Para tal, a busca por novos alvos, tal qual a FKBP12, e o desenho de novos fármacos apresenta-se como um caminho promissor.

## 1.5 ESTUDOS ESTRUTURAIS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR: DESENHO DE INIBIDORES

A estrutura tridimensional e dinâmica de macromoléculas, tais quais as proteínas, é essencial para o entendimento da sua função biológica. A espectroscopia de ressonância magnética nuclear em solução ou estado sólido permite uma descrição completa da estrutura das mesmas a nível atômico. Tais estudos podem ser realizados em diferentes solventes, condições de pH e temperatura e permite investigar interações entre macromoléculas, além de fornecer informações sobre movimentos globais ou locais resultantes das mudanças conformacionais (CLORE; GRONENBORN, 1998).

As proteínas são macromoléculas dinâmicas e seus movimentos são normalmente inerentemente ligados à sua função, seja no processo catálise e/ou interação com parceiros moleculares, por exemplo (PALMER, 1997). Dessa forma, a capacidade de interconversão entre diferentes conformações é crítica para a execução de suas funções biológicas (PALMER III, 2001).

Essas modificações estruturais, bem como a maior ou menor flexibilidade de certas regiões proteicas, possuem barreiras energéticas bastante variáveis. Assim, a interconversão entre diferentes estados pode levar poucos pico-segundos (vibração de ligação, movimentação de loops, tombamento molecular) ou alguns segundos (rearranjos dramáticos como desenovelamento). (MITTERMAIER; KAY, 2009; PALMER, 2004).

A RMN, além de permitir a caracterização estrutural e da dinâmica de proteínas, é também uma ferramenta poderosa para os estudos de interação entre biomoléculas, sendo eficiente em selecionar ligantes de média a baixa afinidade ( $\mu\text{M}$ ) desde que o sistema de interconversão entre os estados livre e ligado esteja experimentando um regime de troca rápida. Com isto, a RMN é muito utilizada pela indústria farmacêutica na seleção de compostos líderes baseados na atividade e estrutura, sendo útil no desenho racional de novas drogas. Alguns parâmetros e experimentos têm sido amplamente utilizados e analisados em estudos de interação, servindo como guias para monitorar as diferenças encontradas nos resíduos quando na presença e ausência do receptor, como o deslocamento químico,  $T_1$ ,  $T_2$  e NOEs.

O mapeamento dos sítios de interação em proteínas pode ser realizado através de perturbação de deslocamento químico pelo ligante, por exemplo (WILLIAMSON, 2013). Assim, é possível entender os mecanismos de ligação de proteínas com substratos, parceiros moleculares ou até mesmo inibidores. A partir desse mapeamento é possível selecionar fragmentos ligantes a proteína alvo com baixa afinidade, por exemplo. Após a triagem de fragmentos, as moléculas que se ligam em regiões contíguas das proteínas, podem ser combinadas para a obtenção de compostos líderes de alta afinidade (nM) (SHUKER et al., 1996).

A determinação da dinâmica das proteínas na presença e ausência dos ligantes selecionados pode gerar dados que permitam um olhar diferenciado nas interações, facilitando a otimização dos ligantes e o desenvolvimento de compostos líderes, bem como na compreensão do equilíbrio conformacional da proteína que leva a ligação (GIORDANO et al., 2005, 2010; VALENTE; MIYAMOTO; L. ALMEIDA, 2006).

Dessa forma, o estudo estrutural das proteínas FKBP12 de *Mycobacterium tuberculosis* (MtFKBP12) e *Trypanosoma brucei* (TbFKBP12), bem como o entendimento de sua ligação aos seus substratos e/ou parceiros moleculares por RMN permitirão pavimentar o caminho para o desenho de inibidores específicos e, conseqüentemente, lançar mão de novas abordagens terapêuticas para as doenças causadas por estes micro-organismos.

## 2. OBJETIVO GERAL E OBJETIVOS ESPECÍFICOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL:

- Estudar a estrutura e a dinâmica das proteínas FKBP12 de *M. tuberculosis* e *T. brucei* por RMN para sua utilização como novos alvos terapêuticos buscando desenhar novos compostos inibidores.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Obtenção do plasmídeo da FKBP12 *M. tuberculosis*;
- Expressão e purificação das FKBP12 de *M. tuberculosis* e *T. brucei*;
- Assinalar a proteína FKBP12 *M. tuberculosis*
- Determinar a estrutura e dinâmica da FKBP12 *M. tuberculosis*;
- Identificar a ligação entre os substratos suc-ALPFpNA e suc-AAPFpNA e as FKBP12 de *M. tuberculosis* e *T. brucei* através de perturbação do deslocamento químico;
- Mapear os átomos dos substratos suc-ALPFpNA e suc-AAPFpNA envolvidos na ligação com a FKBP12 de *M. tuberculosis* através de STD por RMN;
- *Docking* molecular da FKBP12 de *M. tuberculosis* na presença dos substratos suc-ALPFpNA e suc-AAPFpNA.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS FKBP12

##### 3.1.1 Construção de Genes Sintéticos

A estratégia escolhida para a expressão das PPIases FKBP12 dos diferentes micro-organismos foi a partir da construção dos seus genes sintéticos. As fitas senso e anti-senso foram desenhadas de acordo com a sequência primária do polipeptídeo de interesse, que foi expresso heterologicamente em *E. coli*. Para isso, levou-se em conta o uso dos códons mais utilizados pelo organismo onde o polipeptídeo será expresso, evitando-se os códons raros (MAKRIDES; MARKIDES, 1996; WADA et al., 1990).

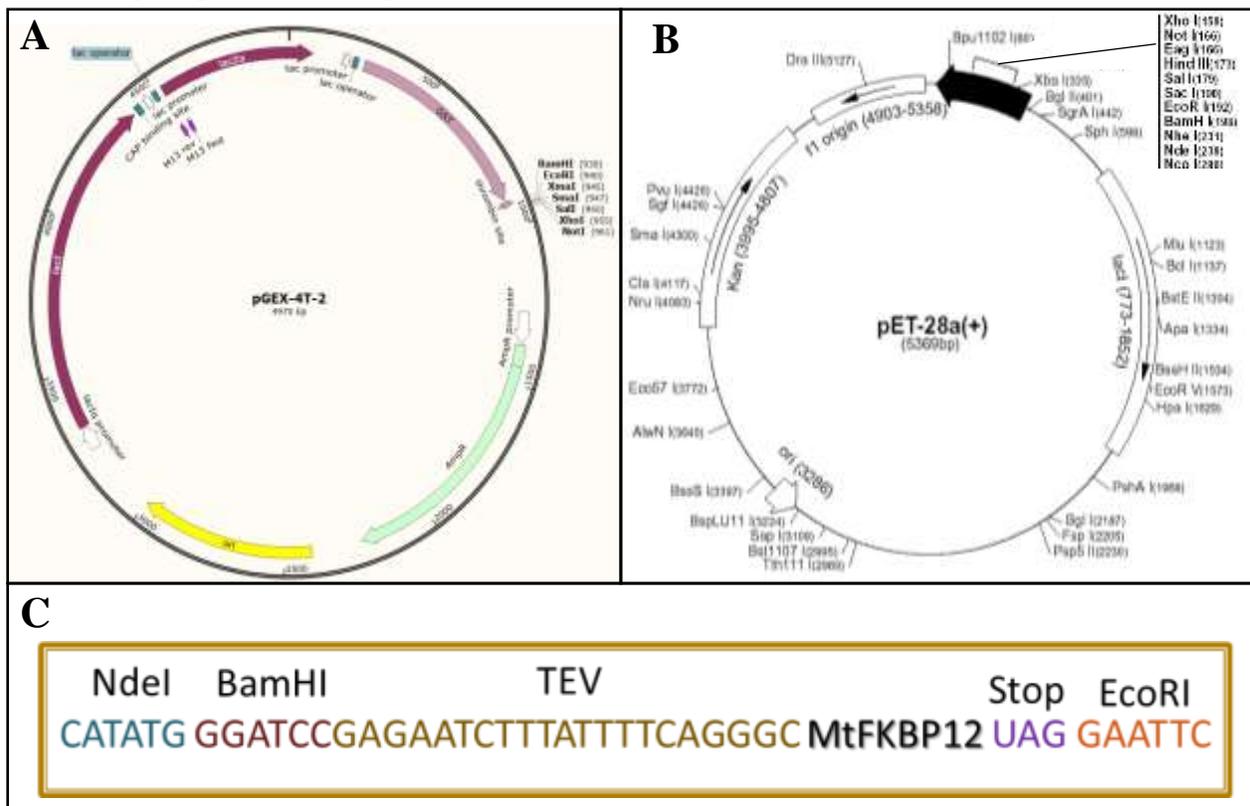
As seqüências selecionadas das enzimas de cada micro-organismo estão listadas na Tabela 1. A enzima FKBP12 presente nos seres humanos foi utilizada como “isca”.

Tabela 1: FKBP12 de micro-organismos relacionados a doenças negligenciadas

FKBP12	Sequência primária
<i>Homo sapiens</i>	GVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSSRDRNKPFKFM LGKQEVIRGWEE GVAQMSV GQRAKLTISP DYAYGATGHPGII PPHATLVFDVELL KLE
<i>M. tuberculosis</i>	MALERPEIDFPEGQPPEYLDITDITEGDGPEAVKGSNVSMHYVGVSWSTGEEFDASWNRGS TLDFTLGTGRVIKGWDMGIAGMKVGGRRKLVIPPHLAYGDRSPSPA IKPGETLIFVVDLVG VG
<i>T. brucei</i>	MSRNDVMMDKII EGDGKTI PRQGSIVTLDYVGYLPDGRKFDSTIERGKPFVFRVGCGEVI KGWDEGIVQMSK GERSRLTMP PSLAFGSTGFPGIIP PNTVIVFEVTL LDVV

O clone contendo o gene da enzima FKBP12 de *Trypanosoma brucei* (TbFKBP12) foi cedido pelo professor José Ricardo Pires do Instituto de Bioquímica Médica (IBqM) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). A TbFKBP12 foi clonada no vetor pGEX-4T-2 (Figura 18A), gerando um construto clivável fusionado a proteína Glutathione S-Transferase (GST). O clone contendo o gene da enzima FKBP12 *Mycobacterium tuberculosis* (MtFKBP12) foi obtido utilizando as enzimas de restrição 5'NdeI-EcoRI 3' para clonagem em vetor pet28a pela empresa GenScript, que gerou um construto clivável fusionado a uma cauda de polihistidina (Figura 18B).

Afim de possibilitar diferentes estratégias de clivagem, foi adicionado a este último construto o sítio de reconhecimento para a cisteíno-protease do *Tobacco Etch Virus* (TEV) na região N-terminal do gene, além do sítio de restrição para a enzima BamHI, que também permitiria subclonagens posteriores (Figura 18C).



**Figura 18: Estratégias de clonagem utilizadas para MtfFKBP12 e TbFKBP12**

(A) Vetor pGEX-4T-2 utilizado para clonagem do gene codificante da proteína TbFKBP12: o vetor permite fusionar a proteína a uma cauda de solubilidade (GST) clivável por trombina, além de conferir resistência a ampicilina. (B) Vetor pET-28a utilizado para clonagem do gene codificante da proteína MtfFKBP12: o vetor permite fusionar a proteína a uma cauda de 6 histidinas clivável por trombina, além de conferir resistência a canamicina. Entretanto, para facilitar o processo de clivagem, adicionamos o sítio de clivagem por TEV durante a clonagem (C).

### 3.1.2 Expressão Das Enzimas FKBP12

Uma vez obtidos os plasmídeos contendo os genes que codificam as proteínas de interesse, estes foram transformados em cepas de *E. coli* BL21(DE3) para que, através dos ensaios de expressão, fosse escolhido o sistema que demonstre a melhor expressão das proteínas heterólogas. Após a transformação, foram feitas culturas em meio Luria-Bertani-ágar (LB-ágar) contendo canamicina (100 µg/mL) (MtfFKBP12) e ampicilina (200 µg/mL) (TbFKBP12) para a obtenção das colônias transformadas. Para os ensaios de expressão, realizados apenas para a proteína

MtFKBP12, as colônias obtidas foram inoculadas em 25 mL de LB contendo o respectivo antibiótico na mesma concentração citada anteriormente, submetidas a agitação em incubadora rotatória a 37°C, e induzidas com 0,5 ou 1 mM de IPTG quando atingiram o meio da curva de crescimento logarítmico ( $DO_{600} \cong 0,8$ ). Estas permaneceram na incubadora a 37°C, sob agitação, onde foram retirados pontos de crescimento, pelo tempo necessário, para a máxima expressão da proteína. Todo o monitoramento do teste de expressão foi realizado por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Para os experimentos de Ressonância Magnética Nuclear, ambas as proteínas foram marcadas uniformemente com  $^{15}\text{N}$  ou duplamente marcada com  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ , sendo obtidas por expressão em células *Escherichia coli* BL21(DE3) em meio mínimo M9 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  17 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 g/L, NaCl 0,5 g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Tiamina 1 g/L) contendo 1,0 g/L de  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  e 1,0 g/L de  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  e 3,0 g/L e  $^{13}\text{C}_6$ - glicose, como únicas fontes de nitrogênio e carbono, respectivamente. Para o crescimento em meio mínimo M9 isotopicamente marcado, as colônias obtidas a partir da transformação de cada vetor (MtFKBP12 ou TbFKBP12) foram inoculadas em 25 mL de meio mínimo M9 contendo o respectivo antibiótico na mesma concentração citada anteriormente e submetidas a agitação em incubadora a 37°C por 16h. Após este período, o pré-inóculo foi adicionado a 1 L de cultura de meio mínimo M9 isotopicamente marcado e induzidos com 0,5 mM (MtFKBP12) e 0,4 mM (TbFKBP12) de IPTG quando atingiram o meio da curva de crescimento logarítmico ( $DO_{600} \cong 0,8$ ). Para expressão da proteína MtFKBP12, o crescimento permaneceu na incubadora a 37°C, sob agitação, por 4h após indução, enquanto para a proteína TbFKBP12, o crescimento permaneceu na incubadora a 17°C, sob agitação, por 16h após indução.

### 3.1.3 Lise Celular

Para o passo subsequente de purificação, as cepas de expressão foram lisadas utilizando *potter* e sonificador de ponta.

O volume total da cultura de expressão MtFKBP12 foi dividido em quatro partes, que foram centrifugadas a 7600 g por 20 minutos a 4°C. Cada parte foi ressuspensa em 12,5 mL de tampão 50 mM fosfato de sódio pH 7,0, 0,5 M NaCl, 1 mM PMSF, 5 mM EDTA. O mesmo procedimento foi utilizado para cultura de expressão de TbFKBP12, porém com adição de 10 mM  $\beta$ -mercapto-etanol ao tampão de ressuspensão. A lise celular foi, então, realizada através de sonicação (20

ciclos de 1 minuto ON e 1 minuto OFF a 225 W) em banho de gelo. O lisado celular foi centrifugado a 7600 g por 20 minutos a 4°C. A análise das proteínas solúveis, presentes no sobrenadante, e insolúveis, presentes no *pellet*, foi obtida por SDS-PAGE com amostras normalizadas contendo 10 µg de proteína total.

### 3.1.4 Purificação das Enzimas FKBP12

#### - MtFKBP12

A purificação desse construto foi feita utilizando coluna de afinidade à níquel (Ni-NTA), que promove a quelação dos átomos de Ni<sup>+2</sup> da resina, pelos 6 resíduos de histidina expressos na porção N-terminal das enzimas comandados pelo vetor de expressão.

Utilizou-se o sistema semi-automatizado de cromatografia líquida Äkta-prime (GE) com coluna cromatográfica com 5 mL de resina His-Trap HP (GE) acoplada a um leitor de UV (280 nm) e equilibrada com tampão A (50 mM de fosfato de sódio pH 7,0, 500 mM de NaCl, 10 mM imidazol). O sobrenadante obtido após a expressão da proteína de interesse e lise celular foi aplicado na resina e submetido a uma lavagem de 40 mL com tampão A. A proteína de interesse foi eluída com gradiente linear crescente de imidazol em 180 mL, ao realizar-se a mistura do tampão A com o tampão B (50 mM de fosfato de sódio pH 7,0, 500 mM de NaCl e 500 mM imidazol). Após a purificação, a cauda de histidina foi removida por meio de clivagem por TEV (1:10 razão molar) por 16 h a 4°C e a proteína dialisada contra o tampão A para retirada do imidazol. Por fim, a MtFKBP12 foi novamente separada pela mesma coluna de afinidade, onde as histidinas e a protease TEV foram retidas e a proteína de interesse eluída com alto grau de pureza. As purificações e clivagem foram monitoradas e analisadas utilizando SDS-PAGE 15%.

#### -TbFKBP12

A purificação desse construto foi feita utilizando coluna de afinidade à glutatona (GSTrap), que se liga a proteína GST expressa na porção N-terminal da enzima comandada pelo vetor de expressão. Utilizou-se o sistema automatizado de cromatografia líquida Äkta-prime (GE) com coluna cromatográfica com 1 mL de resina GSTrap HP (GE) acoplada a um leitor de UV (280 nm) que foi equilibrada com tampão A (50 mM Tris-Cl, pH 7,0, 10 mM β-mercapto-etanol). O sobrenadante obtido após a expressão da proteína de interesse e lise celular foi aplicado na resina, submetido a uma lavagem de 20 mL com tampão A e a proteína TbFKBP12 foi eluída com tampão B (50 mM Tris-Cl,

pH 7,0 10 mM  $\beta$ -mercapto-etanol 10 mM de glutatona reduzida). Após a purificação, a cauda de solubilidade foi removida através de clivagem por trombina (1:10 razão molar) ao adicionar a protease à amostra obtida por 16 h a 4°C.

### 3.1.5 Análise do Estado Oligomérico das Enzimas MTFKBP12 e TBFKBP12

Utilizou-se a cromatografia de gel filtração para análise do estado oligomérico das enzimas TbfFKBP12 e MtfFKBP12. Utilizou-se a coluna cromatográfica HiLoad 26/600 Superdex 75 prep grade (120 mL, 26/600mm) acoplada ao sistema Äkta-prime (GE) equilibrada com tampão 50 mM fosfato de sódio, pH 7,0 e 150 mM de NaCl para MtfFKBP12 e tampão 20 mM fosfato de sódio, pH 7,0, 150 mM de NaCl e 10 mM  $\beta$ -mercapto-etanol para TbfFKBP12. A eluição de cada proteína foi realizada com 120 mL dos respectivos tampões de equilíbrio. Pôde-se calcular a massa molecular estimada da proteína de interesse a partir do volume de eluição da mesma e da curva de calibração feita previamente. Utilizou-se o  $K_{av}$  e o  $\log$  da massa molecular para gerar a regressão linear que permite estimar a massa molecular das enzimas (Equação 1):

$$K_{av} = \frac{\text{Volume de eluição} - \text{volume morto}}{\text{Volume total da coluna} - \text{volume morto}}$$

### 3.1.6 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Diversas análises qualitativas e quantitativas foram realizadas utilizando eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% ou 15% (p/v) a 25 mA em temperatura ambiente, conforme descrito por (LAEMMLI, 1970), durante o processo de obtenção das amostras de MtfFKBP12 e TbfFKBP12. A eletroforese foi realizada em sistema mini-protean da Bio-Rad utilizando tampão de corrida: 50 mM Tris-HCl, pH 8,3; Glicina 150 mM e 0,1% (p/v) SDS.

Os géis foram corados com solução de *Coomassie brilliant blue* 0,1% em metanol/ácido acético/água (45/10/45, v/v/v) e descorados utilizando solução de etanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v). Alternativamente, o gel foi corado com solução de *Coomassie coloidal (Blue silver)* (CANDIANO et al., 2004). Utilizou-se o padrão de peso molecular *Pierce Unstained Protein MW Marker* (Thermo Scientific).

### 3.1.7 Dosagem de Proteínas Totais

A concentração de proteínas totais foi determinada através do método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando a albumina de soro bovino (BSA) como padrão e reagente de Bradford (BioRad). Para dosagem foi feita uma curva padrão com a proteína BSA utilizando concentrações de 0,025 mg/mL a 1 mg/mL. Na placa de ELISA com 96 poços, foram adicionados 10 µL de amostra e 190 µL do reagente de Bradford - BIO-RAD. Após 20 minutos de reação, a leitura foi feita em um espectrofotômetro de microplacas Victor TM X5 (Perkin Elmer) a 595 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata e a determinação da concentração de proteína na amostra foi baseada nos valores obtidos na curva padrão de BSA utilizando o coeficiente angular da reta.

Alternativamente, o reagente Pierce™ 660 nm *Protein Assay* foi utilizado para determinação de proteínas totais, utilizando 150 µL do reagente e 10 µL de amostra, nas mesmas condições descritas anteriormente, e curva padrão de 0,025 mg/mL a 2 mg/mL.

## 3.2 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

### 3.2.1 Determinação Estrutural

Os estudos estruturais foram realizados na plataforma multiusuária de RMN localizada no Centro de Ciências da Saúde: o Centro Nacional de Ressonância Magnética nuclear Jiri Jonas (CNRMN).

A proteína TbFKBP12 já possuía estrutura determinada por RMN e, dessa maneira, os experimentos descritos a seguir competem apenas a MtFKBP12.

Todos os experimentos específicos para assinalamento dos átomos da cadeia principal ( $^1\text{HN}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}\alpha$ ,  $^1\text{H}\beta$ ,  $^{13}\text{C}\alpha$  e  $^{13}\text{C}\beta$ ) e cadeias laterais dos resíduos ( $^{13}\text{CHn}$ ) que compõem a proteína MtFKBP12 foram realizados a 298 K (25°C) com a proteína MtFKBP12 em tampão 50 mM fosfato de sódio contendo 150 mM NaCl pH 7,0. Tais experimentos foram realizados pelo método de amostragem não uniforme (*non uniforming sample* - NUS), no qual uma fração de dados dos experimentos de RMN com duas ou mais dimensões, que seria medida num método convencional, não é adquirida. Dessa forma, o tempo de realização de experimentos e aquisição de dados tornam-se essencialmente menores.

Como o NUS ignora alguns subconjuntos das medições 1D em um espectro 2D/3D, a dimensão indireta contém "lacunas" em relação a uma medição convencional. Como resultado, a transformada de Fourier, amplamente utilizada na RMN, não é mais apropriada e, assim, outros métodos de reconstrução devem ser utilizados (DELAGLIO et al., 2017).

Uma amostra de MtFKBP12 [1,2 mM] duplamente marcada com  $^{15}\text{N}$  e  $^{13}\text{C}$  em 90%  $\text{H}_2\text{O}/10\%$   $\text{D}_2\text{O}$  foi utilizada para os experimentos  $^{15}\text{N}$ -HSQC (16 acumulações, 1024 pontos em  $F_2$  e 256 pontos em  $F_1$ ), 2D  $^{13}\text{C}$ -HSQC (2 acumulações, 1024 pontos em  $F_2$  e 256 pontos em  $F_1$ ), 3D  $^{15}\text{N}$  HSQC NOESY *NUS* (8 acumulações, 1024 pontos em  $F_3$ , 100 pontos em  $F_2$  e 352 pontos em  $F_1$ ), 3D CBCA(CO)NNH *NUS* (8 acumulações, 1024 pontos em  $F_3$ , 64 pontos em  $F_2$  e 140 pontos em  $F_1$ ), HNCACB *NUS* (16 acumulações, 1024 pontos em  $F_3$ , 64 pontos em  $F_2$  e 140 pontos em  $F_1$ ), CCONH *NUS* (16 acumulações, 1024 pontos em  $F_3$ , 80 pontos em  $F_2$  e 130 pontos em  $F_1$ ), HBHA(CO)NNH *NUS* (16 acumulações, 1024 pontos em  $F_3$ , 80 pontos em  $F_2$  e 160 pontos em  $F_1$ ), HNCOC *NUS* (8 acumulações, 1024 pontos em  $F_3$ , 80 pontos em  $F_2$  e 160 pontos em  $F_1$ ), HNCACO *NUS* (16 acumulações, 1024 pontos em  $F_3$ , 64 pontos em  $F_2$  e 140 pontos em  $F_1$ ), HNCA *NUS* (8 acumulações, 1024 pontos em  $F_3$ , 80 pontos em  $F_2$  e 240 pontos em  $F_1$ ), HCAN *NUS* (24 acumulações, 1024 pontos em  $F_3$ , 80 pontos em  $F_2$  e 120 pontos em  $F_1$ ) e HCCH-TOCSY *NUS* (8 acumulações, 1024 pontos em  $F_3$ , 140 pontos em  $F_2$  e 140 pontos em  $F_1$ ). Os espectros acima foram adquiridos em espectrômetro Bruker 600 MHz.

No espectrômetro Bruker 900 MHz foram adquiridos ainda os espectros  $^{13}\text{C}$  HSQC NOESY *NUS* (8 acumulações, 1024 pontos em  $F_3$ , 80 pontos em  $F_2$  e 300 pontos em  $F_1$ ) e  $^{13}\text{C}$  HSQC NOESY (aromático) *NUS* (8 acumulações, 1024 pontos em  $F_3$ , 60 pontos em  $F_2$  e 160 pontos em  $F_1$ ).

Todos os dados foram processados usando o software NMRpipe (DELAGLIO et al., 1995) ou TopSpin3.1 (Bruker) e os assinalamentos das ressonâncias foram feitos utilizando o CCPNMR Analysis (VRANKEN et al., 2005).

### 3.2.1.1 Atribuições de NOE e Cálculo Estrutural

As restrições de distância interatômicas utilizadas nos cálculos das estruturas tridimensionais da MtFKBP12 foram derivadas dos espectros 3D  $^{13}\text{C}$  NOESY HSQC e 3D  $^{15}\text{N}$  NOESY HSQC. A atribuição dos sinais dos espectros NOESY e o cálculo da estrutura foi feito interativamente usando o programa ARIA versão 2.2 (LINGE; O'DONOGHUE; NILGES, 2001;

RIEPING et al., 2007) combinado com o CNS versão 1.2 (BRÜNGER et al., 1998). Inicialmente atribuiu-se manualmente NOEs característicos de estrutura secundária envolvendo os hidrogênios amídico-amídico, amídico-H $\alpha$  ou H $\alpha$ -H $\alpha$ , enquanto, os demais NOEs foram atribuídos automaticamente pelo programa supracitado.

Os ângulos de restrição de diedro *phi* e *psi* da cadeia principal da proteína foram preditos baseado na análise dos deslocamentos químicos do  $^1\text{HN}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}\alpha$ ,  $^{13}\text{C}'$ ,  $^{13}\text{C}\alpha$  e  $^{13}\text{C}\beta$  usando o programa TALOS-N (SHEN; BAX, 2013).

As estruturas foram calculadas usando o CNS 1.2 com protocolo de “*simulated annealing*”. Diversos ciclos de cálculo utilizando o programa ARIA foram realizados utilizando o protocolo padrão e analisando as restrições rejeitadas, assinalamentos de cadeia lateral, violações de diedro e NOEs depois de cada ciclo. Finalmente, 400 confôrmeros foram calculados usando ARIA/CNS e as 20 estruturas geradas de menor energia total foram refinadas por dinâmica em água.

Todas as visualizações, representações, comparações por superposições e criações de modelos de estruturas foram feitos utilizando-se o programa MOLMOL (KORADI; BILLETER; WÜTHRICH, 1996) e Pymol (DELANO, 2002).

### 3.2.2 Dinâmica

A dinâmica dos movimentos proteicos é crítica para execução das funções biológicas (PALMER, 1997; PALMER III, 2001). A RMN utiliza, dentre outras medidas, os parâmetros de relaxação  $T_1$ ,  $T_2$  e os efeitos nucleares *Overhauser* entre o  $^{15}\text{N}$  e o núcleo de hidrogênio diretamente ligado a ele para a caracterização dos tempos de escala dos movimentos internos da cadeia polipeptídica (ISHIMA; TORCHIA, 2000). Os parâmetros de relaxação  $T_1$ ,  $T_2$  e o {1H}- $^{15}\text{N}$  NOE refletem movimentos que são mais rápidos do que o tempo de correlação rotacional ( $\tau_c$ ), que é o tempo necessário para que a proteína dê uma volta completa sobre o seu próprio eixo em solução (PALMER III, 2001).

Para a determinação dos tempos de relaxação e NOEs heteronucleares utilizou-se uma amostra de MtFKBP12 [0,4 mM] marcada com  $^{15}\text{N}$ . Os tempos de relaxação  $T_1$  e  $T_2$  de  $^{15}\text{N}$  foram extraídos de duas séries de dez espectros de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  com tempos de relaxação de 0,1, 0,2, 0,4, 0,5, 0,6, 0,8, 1 s para  $T_1$  e 0,017, 0,034, 0,085, 0,102 e 0,170 s para  $T_2$ .

O NOE heteronuclear foi obtido comparando dois espectros de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ , um deles, com alteração da população de equilíbrio dos hidrogênios amídicos.

### 3.2.2.1 Análise dos Dados de Relaxação $R_1$ , $R_2$ E $\{^1\text{H}\}$ - $^{15}\text{N}$ NOE

As taxas de relaxação obtidas no experimento acima foram analisadas a partir das intensidades dos sinais presentes nos espectros de correlação [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]. Os picos sobrepostos relativos aos resíduos M3, Q16, G29, A34, K36, F55, G72, K76, K86, V87, R90, Y101, D103 e G126 foram retirados da análise posterior. O programa CCPNmr (VRANKEN et al., 2005) foi utilizado para calcular os valores de  $R_1$  e  $R_2$  através do ajuste das intensidades medidas em função tempos de relaxação (T), empregando uma função de decaimento monoexponencial de dois parâmetros, descrita na Equação 2 (STONE et al., 1992):

$$I(T) = I_0 \exp(-R_{1,2}T)$$

Onde  $I(T)$  refere-se à intensidade após um intervalo de tempo (T) e  $I_0$  é a intensidade no tempo zero.

A determinação dos valores dos  $\{^1\text{H}\}$ - $^{15}\text{N}$  NOE se baseou na razão entre as intensidades dos picos presentes no espectro coletado com saturação dos hidrogênios ( $I_{\text{sat}}$ ) e o coletado sem saturação ( $I_{\text{ref}}$ ), conforme a Equação 3:

$$\text{NOE} = I_{\text{sat}} / I_{\text{ref}}$$

Os erros experimentais foram calculados a partir do desvio-padrão do ruído em relação às intensidades de ressonância obtidas nos tempos de relaxação correspondentes ao meio dos experimentos de  $R_1$  e de  $R_2$ , conforme a Equação 4 abaixo:

$$\text{Erro} = \left( \frac{1}{\text{Tempo de saturação (s)}} \right) \times \left( \frac{\text{Desvio padrão do ruído}}{\text{Intensidade da proteína}} \right)$$

Em que *Tempo de Relaxação* (*s*) é o tempo de relaxação referente ao meio do experimento escolhido, o *Desvio padrão do ruído* é o desvio-padrão calculado para o ruído no tempo de relaxação escolhido e a *Intensidade da proteína* é a intensidade dos picos referentes aos resíduos de MtFKBP12 no espectro do mesmo tempo de relaxação.

No caso do  $\{^1\text{H}\}\text{-}^{15}\text{N}$  NOE, o desvio-padrão das intensidades do ruído observadas nos espectros saturado e de referência foram utilizadas. Picos positivos e negativos foram selecionados para o cálculo do desvio-padrão. Picos do ruído próximos dos sinais referentes à proteína de interesse ou próximos ao sinal da água não foram utilizados (Equação 5) (FARROW et al., 1994):

$$\text{Erro} = \frac{\text{Desvio padrão NOE na referência}}{\text{Intensidade referência}} - \left( \left( \frac{\text{Intensidade NOE}}{(\text{Intensidade Referência})^2} \right) \times \text{Desvio padrão ruído na referência} \right)$$

Em que *Desvio padrão NOE na referência* é o desvio-padrão calculado para o ruído no espectro saturado, *Intensidade referência* é a intensidade dos picos referentes aos resíduos de MtFKBP12 no espectro saturado, *Desvio padrão ruído na referência* é o desvio-padrão calculado para o ruído no espectro referência e *Intensidade Referência* é a intensidade dos picos referentes aos resíduos de MtFKBP12 no espectro referência.

### 3.2.2.2 Estimativa do tempo de correlação rotacional ( $\tau_c$ )

Os valores de  $\tau_c$  (ns) foram calculados para MtFKBP12 utilizando os valores médios de  $T_1$  e  $T_2$  (s), considerando apenas os resíduos envolvidos em estrutura secundária. A Equação 6 foi utilizada:

$$\tau_c \approx \frac{1}{4\pi\nu N} * \sqrt{6 * \left(\frac{T_1}{T_2}\right) - 7}$$

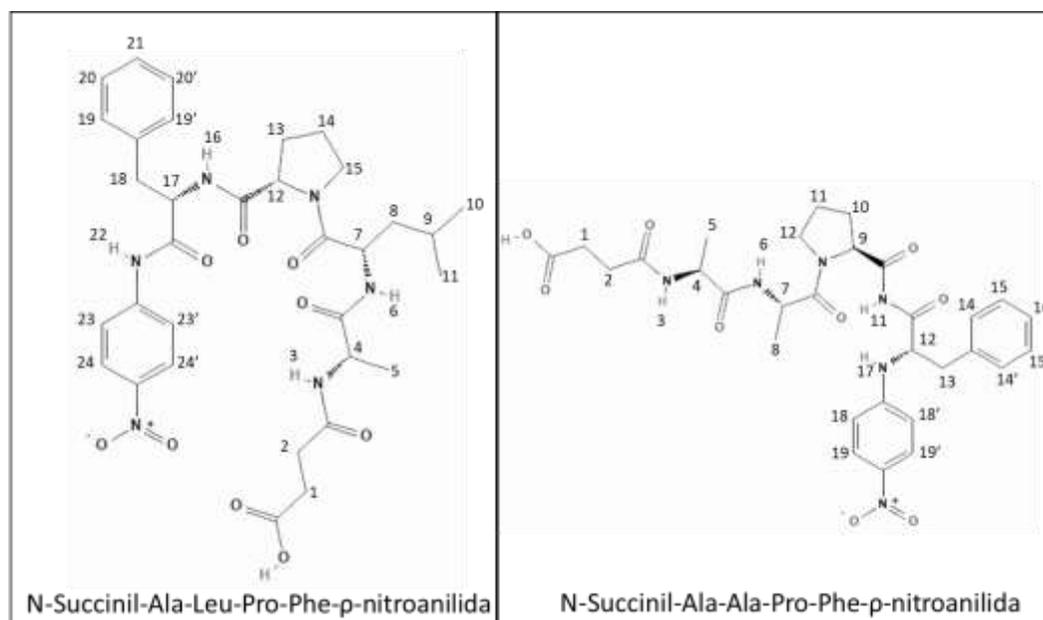
Em que  $\nu N$  é a frequência de ressonância do núcleo de  $^{15}\text{N}$  (em Hz) e  $T_1$  e  $T_2$  são os valores médios das taxas de relaxação do núcleo de  $^{15}\text{N}$  para os resíduos de MtFKBP12 envolvidos em estrutura secundária (KAY; TORCHIA; BAX, 1989).

Uma análise quantitativa para a mobilidade global e interna foi feita utilizando formalismo teórico de Lipari-Szabo (LIPARI; SZABO, 1982), como implementado no programa Tensor2

(DOSSET et al., 2000), no qual o parâmetro de ordem generalizado,  $S_2$ , e taxa de troca química na escala de  $\mu\text{s}$ - $\text{ms}$ ,  $R_{\text{ex}}$  ( $\text{s}^{-1}$ ), foram calculados usando modelo de difusão anisotrópico com simetria axial (LIPARI; SZABO, 1982, DOSSET et al., 2000).

### 3.2.3 Estudos de Interação

Os ensaios de interação entre as proteínas MtFKBP12 e TbFKBP12 e dois dos principais substratos de PPIase descritos na literatura, N-Succinil-Ala-Leu-Pro-Phe- $\rho$ -nitroanilida e N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe- $\rho$ -nitroanilida (Figura 19), foram realizados através de RMN.



**Figura 19: Substratos sALPFpNA e sAAPFpNA**

Os substratos N-Succinil-Ala-Leu-Pro-Phe- $\rho$ -nitroanilida e N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe- $\rho$ -nitroanilida são comumente utilizados para dosagem de atividade enzimática de peptidil-prolil cis-trans isomerases (PPIase). Os hidrogênios foram numerados para facilitar o entendimento dos resultados.

Os ensaios de atividade enzimática de tais isomerases envolve duas reações acopladas realizadas à baixa temperatura ( $4^{\circ}\text{C}$ ). As enzimas PPIase catalisam a conversão de cis-AXPF-pNA em trans-AXPFpNA (X: Leucina ou Alanina). A  $\alpha$ -quimotripsina é, então, incluída no ensaio e reconhece apenas a forma trans do substrato, clivando a p-nitroanilina (p-NA). A p-NA mostra absorvância a 390 nm e fornece a leitura do ensaio. O aumento da absorvância sugere que a isomerização cis-trans é mediada pela atividade da PPIase (RAJAN et al., 2014).

Devido as dificuldades de realização de tais ensaios, a abordagem escolhida foi de monitorar os sítios de interação e principais resíduos envolvidos na catálise enzimática por meio de ensaios de titulação e perturbação de deslocamento químico, bem como identificar os principais átomos dos substratos que participam dessa ligação por meio de ensaios de transferência de saturação.

### 3.2.3.1 Titulação e Mapeamento do Deslocamento Químico

Os ensaios de titulação foram realizados a partir da análise de espectros bidimensionais de  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC realizados em diferentes razões molares de proteína:substrato até a saturação da proteína.

Para isso, as proteínas MtFKBP12 e TbFKBP12 foram produzidas em meio contendo  $^{15}\text{N}$  e foram utilizadas em seus ensaios na concentração final de 100  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Para a MtFKBP12, o tampão utilizado foi 50 mM fosfato de sódio, pH 7,0 com 150 mM NaCl e 10% de  $\text{D}_2\text{O}$ , e para TbFKBP12 foi o tampão 20 mM fosfato de sódio, pH 7,0 com 150 mM NaCl, 100 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol e 10% de  $\text{D}_2\text{O}$ . Uma solução estoque contendo 7,5 mM de N-Succinil-Ala-Leu-Pro-Phe-*p*-nitroanilida e N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilida foi produzida em DMSO 75%. Cada substrato foi adicionado para que atingisse as seguintes razões molares: 0,25, 0,5, 1, 2, 3 e 5 para MtFKBP12. No caso de TbFKBP12, devido sua baixa estabilidade frente ao DMSO 75%, somente o excesso de 4 vezes de substrato em relação a proteína foi investigado, com o objetivo de atingir seu estado saturado. Os ensaios foram realizados no espectrômetro Bruker DRX 600 MHz a 298 K.

Devido a modificação dos deslocamentos químicos causadas pelo solvente orgânico DMSO 75%, foram realizados controles de cada razão molar, adicionando-se o mesmo volume da solução de estoque na ausência do substrato. O valor da perturbação de deslocamento químico (CSP) causado apenas pelo solvente foi, então, descontado no valor total observado no ensaio contendo o substrato.

Os CSPs foram calculados para cada resíduo com o auxílio do programa CCPNmr utilizando a Equação 6 descrita a seguir (VRANKEN et al., 2005)). Um desvio-padrão também foi calculado levando em consideração todos os valores de CSP calculados.

Equação 7

$$\text{CSP} = \sqrt{\left( (\Delta HN)^2 + \frac{(\Delta^{15}N)^2}{10} \right)}$$

Onde  $\Delta HN$  é a variação do deslocamento químico na dimensão do HN e  $\Delta^{15}N$  é a variação do deslocamento químico na dimensão do  $^{15}N$ . A média e o desvio-padrão dos resíduos foram calculados para cada situação.

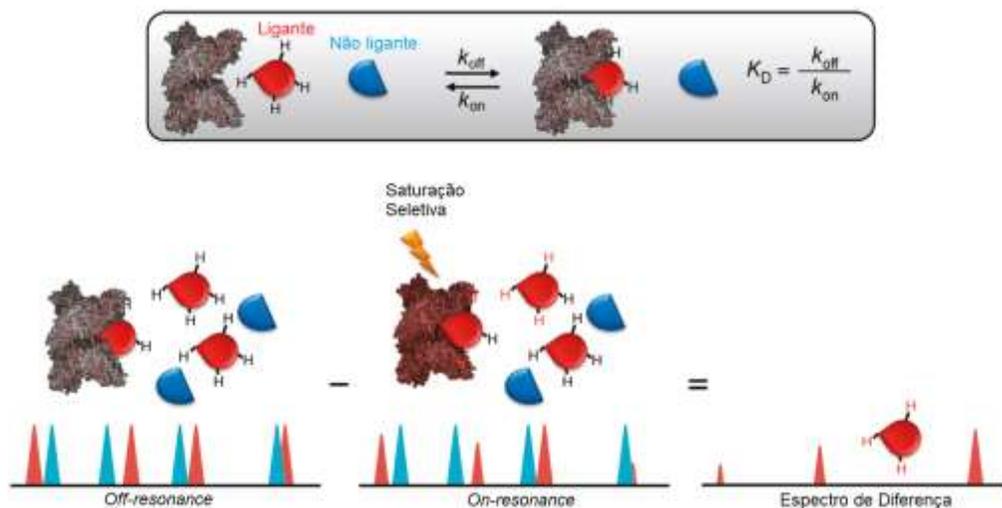
O cálculo do  $K_d$  para os resíduos com mais de dois valores de desvio-padrão acima da média foi feito a partir do ajuste dos valores de CSP de cada razão molar à equação de ligação específica em um único sítio do programa GraphPad Prism 6 (Equação 8):

$$Y = \frac{B_{max} * X}{K_d + X}$$

O valor final de  $K_d$  foi obtido a partir da média entre os  $K_d$  dos resíduos que melhor se ajustaram as equações ( $R^2 > 0,9$ ).

### 3.2.3.2 Transferência de saturação (STD)

Basicamente, o experimento STD envolve subtrair um espectro no qual a proteína está seletivamente saturada (espectro *on-resonance* obtido por irradiação em uma região do espectro que contém apenas ressonâncias do receptor/proteína) com intensidades de sinal  $I_{SAT}$ , de um espectro sem saturação proteica (espectro *off-resonance*), com intensidades de sinal  $I_0$ . No espectro de diferença ( $I_{STD} = I_0 - I_{SAT}$ ), haverá apenas os sinais do(s) ligante(s) que receberam transferência de saturação da proteína (via rotação difusão, através do efeito nuclear *Overhauser*) (Figura 20) (VIEGAS et al., 2011).



**Figura 20: Esquema representativo do método STD por RMN.**

A proteína de interesse é incubada com compostos ligantes (vermelho) e não-ligantes (azul). Em *off-resonance*, coleta-se um espectro  $^1\text{H}$ -RMN dos compostos em alta concentração em relação a proteína de interesse e os sinais referentes aos picos de hidrogênios de ambos os compostos são observados (picos vermelhos e azuis). Em *on-resonance*, é feita saturação seletiva da proteína de interesse com emissão de um pulso de radio-frequência numa região que não contenha sinais dos compostos e, contenha apenas, sinais referentes aos hidrogênios da proteína. Isso resulta na modificação dos sinais do espectro referentes apenas aos compostos ligantes (picos vermelhos). No espectro de diferença, pode-se observar que a subtração entre os espectros *off-* e *on-resonance* gera um espectro contendo apenas os sinais dos compostos ligantes. Modificado de Viegas et al. (2011).

Os ensaios de transferência de saturação foram realizados apenas com a proteína MtFKBP12 na concentração final de 20  $\mu\text{M}$  frente a 2 mM dos substratos N-Succinil-Ala-Leu-Pro-Phe- $\rho$ -nitroanilida e N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe- $\rho$ -nitroanilida.

A proteína MtFKBP12 em tampão 50 mM fosfato de sódio pH 7,0 com 150 mM NaCl foi liofilizada e ressuspendida em  $\text{D}_2\text{O}$ . Foi utilizado  $\text{DMSO-d}_6$  para solubilização dos substratos e realização deste ensaio, com concentração final de 5%. Os experimentos foram realizados no espectrômetro Bruker 500 MHz.

Espectros unidimensionais  $^1\text{H}$ -NMR de cada substrato, da proteína livre e da proteína na presença de cada substrato foram realizados separadamente, afim de identificar regiões no espectro que poderiam ser utilizadas para excitação da proteína sem a excitação direta do substrato. As frequências de excitação escolhidas foram 186,577, 3404,599, -222,101 e 3883,878 Hz para o substrato N-Succinil-Ala-Leu-Pro-Phe- $\rho$ -nitroanilida e 325,937, 3404,599, -191,1758 e 3882,0791 Hz para o substrato N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe- $\rho$ -nitroanilida, espectros *on-resonance* ( $I_{\text{sat}}$ ). Em ambos os casos, um espectro *off-resonance* foi obtido a partir da saturação na frequência -6000 Hz

(I<sub>0</sub>). O espectro de diferença (I<sub>STD</sub>) foi obtido a partir da subtração entre o espectro *off-resonance* e os espectros *on-resonance*.

Os experimentos também foram realizados com variação de tempo de saturação: 0,5, 1, 2, 3 e 4 segundos. Tal variação permitiu identificar o valor de amplificação de STD, que foi calculado a partir da Equação 9 (VIEGAS et al., 2011):

$$ASTD = \left( \frac{I_{STD}}{I_0} \right) * \left( \frac{L}{P} \right)$$

Em que, **A<sub>STD</sub>** é o valor de amplificação de STD, **I<sub>STD</sub>** é a intensidade do pico no espectro de diferença, **L** é a concentração de ligante utilizado e **P** é a concentração de proteína utilizada.

Os substratos N-Succinil-Ala-Leu-Pro-Phe- $\rho$ -nitroanilida e N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe- $\rho$ -nitroanilida foram assinalados a partir do experimento bidimensional TOCSY para a identificação de cada átomo que recebera transferência de saturação via excitação da proteína MtFKBP12.

### 3.3.2.3 *Docking* Molecular Dirigido

A interface “Easy interface” do servidor HADDOCK (versão 2.2) (VAN ZUNDERT et al., 2016) foi utilizada para construir o modelo estrutural do complexo da MtFKBP12 com os substratos N-Succinil-Ala-Leu-Pro-Phe- $\rho$ -nitroanilida e N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe- $\rho$ -nitroanilida.

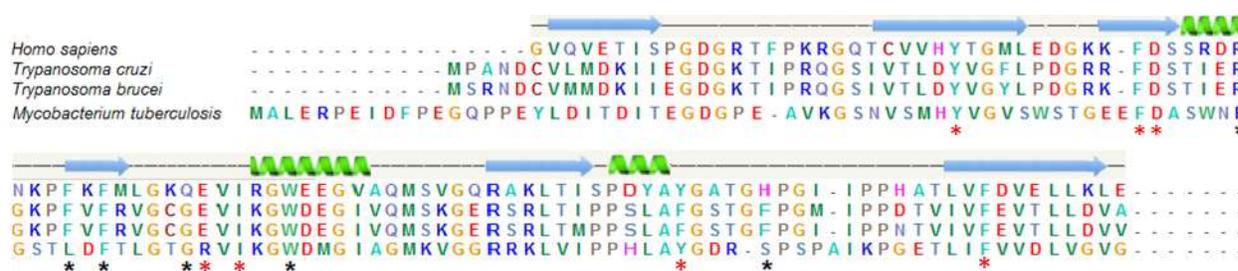
A etapa de *docking* molecular foi realizada a partir da estrutura calculada neste trabalho para a proteína MtFKBP12. Os modelos estruturais dos substratos foram construídos em sua forma estendida utilizando o software CNS\_Solve 1.2 sem as modificações N-Succinil e  $\rho$ -nitroanilida. O estado de ionização das cadeias laterais foi calculado pelo servidor PROPKA em pH 7.0.

O *docking* molecular foi guiado pelas informações obtidas com os dados experimentais de perturbação de deslocamento químico e diferença de transferência de saturação na presença de cada substrato, identificando os resíduos ativos no *docking*. Os resíduos passivos foram automaticamente determinados pelo algoritmo.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 SELEÇÃO DOS GENES FKBP12

A sequência primária da FKBP12 de *Homo sapiens* foi utilizada como molde na busca por proteínas ortólogas em diferentes organismos, como *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* e *Mycobacterium tuberculosis*. Essas sequências foram alinhadas e tiveram os aminoácidos do sítio ativo (DECENZO et al., 1996) destacados. A estrutura secundária da FKBP12 de *Homo sapiens* foi representada acima de sua sequência de acordo com a estrutura depositada no PDB (2PNN) (Figura 21).

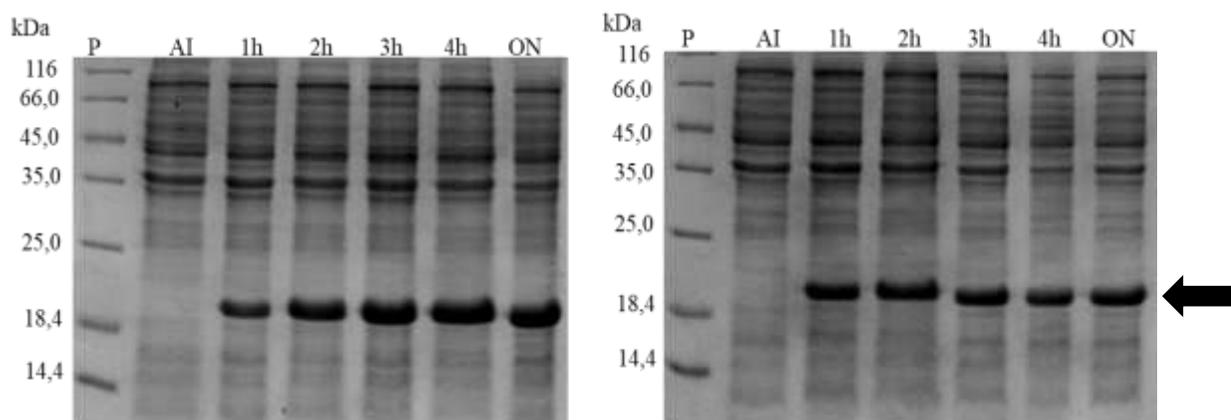


**Figura 21: Alinhamento da sequência primária da proteína FKBP12 de diferentes organismos**

Os resíduos envolvidos na interação com o composto FK506 estão destacados com asterisco, enquanto aqueles previstos em participar da isomerização catalítica encontram-se destacados com asterisco vermelho. Os elementos de estrutura secundária da FKBP12 de *Homo sapiens* encontram-se acima desta sequência.

### 4.2 EXPRESSÃO E LISE DA CONSTRUÇÃO HIS<sub>6</sub>-MTFKBP12

Para identificar as melhores condições de expressão da construção His<sub>6</sub>-MtFKBP12 foram realizados ensaios de expressão variando dois parâmetros: concentração de IPTG (0,5 e 1 mM) e temperatura (18 e 37°C). Tais ensaios utilizando a cepa BL21(DE3) demonstraram enriquecimento de uma banda proteica ao longo do tempo entre as massas moleculares de 18,4 e 25 kDa, o que caracteriza indução da expressão da proteína alvo em todas as condições. Os ensaios realizados a 37°C com indução em DO<sub>600</sub> 1,0 com 0,5 e 1 mM de IPTG apresentaram os melhores resultados de expressão da construção de interesse (Figura 22).



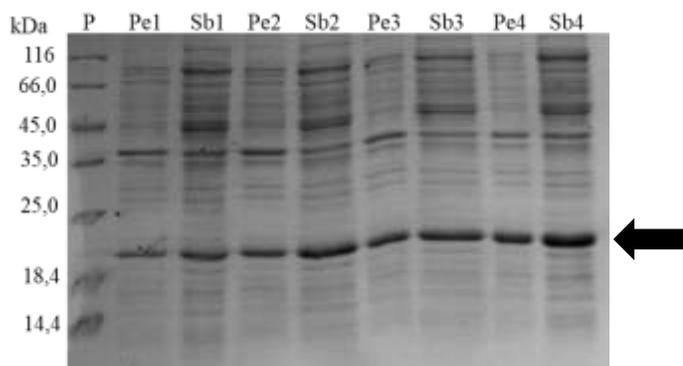
**Figura 22: SDS-PAGE 15% normalizado dos testes de expressão da proteína His<sub>6</sub>-MtFKBP12 a 37°C**

O teste de expressão da proteína His<sub>6</sub>-MtFKBP12 foi realizado em cepa de *E. coli* BL21(DE3) a 37°C com indução em DO<sub>600nm</sub> de 1,0. Em (A) o teste de expressão foi realizado com 0,5 mM de IPTG e em (B) com 1,0 mM de IPTG. *P*: Padrão de peso molecular; alíquotas retiradas: *AI*: antes da indução de expressão, *1h*: 1h após indução, *2h*: 2h após indução, *3h*: 3h após indução, *4h*: 4h após indução, *ON*: 16h após indução. As amostras estão normalizadas com 10 µg de massa total em cada poço. A seta evidencia a expressão da proteína de interesse ao longo do tempo.

É importante ressaltar que as amostras em cada gel estão normalizadas para a quantidade total de proteína de 10 µg, permitindo análise quantitativa dos mesmos. A partir da análise das bandas correspondentes a construção His<sub>6</sub>-MtFKBP12 em ambos os géis de poliacrilamida, pode-se notar uma banda proteica ligeiramente maior quando há indução com 0,5 mM IPTG.

Dessa maneira, a melhor condição de expressão experimentada foi com a cepa de *E. coli* BL21(DE3) em crescimento a 37°C e adição de 0,5 mM de IPTG em DO<sub>600</sub> 1,0.

Com o intuito de identificar a condição com melhor expressão solúvel da construção His<sub>6</sub>Mt-FKBP12, as células de cada alíquota da melhor condição de crescimento do ensaio anterior foram lisadas e tiveram suas porções solúvel e insolúvel separadas por centrifugação. Estas amostras foram aplicadas em SDS-Page 15% (Figura 23).



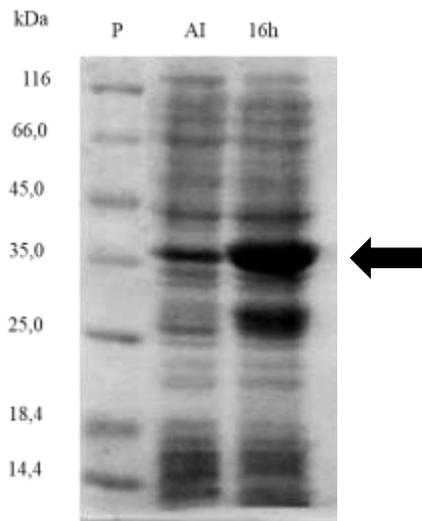
**Figura 23: SDS-PAGE 15% da lise celular realizada com a melhor condição do teste de expressão da proteína His<sub>6</sub>-MtFKBP12**

*P*: Padrão de peso molecular; *Pe1* e *Sb1*: *Pellet* e Sobrenadante da alíquota retirada 1h após a indução; *Pe2* e *Sb2*: *Pellet* e Sobrenadante da alíquota retirada 2h após a indução; *Pe3* e *Sb3*: *Pellet* e sobrenadante da alíquota retirada 3h após a indução, *Pe4* e *Sb4*: *Pellet* e Sobrenadante da alíquota retirada 4h após a indução. A seta indica a proteína de interesse. As amostras estão normalizadas com 10 µg de massa total em cada poço.

Pode-se observar a presença de bandas proteicas consideráveis na porção solúvel do crescimento, principalmente após 4h de indução. Observando a superexpressão solúvel da construção His<sub>6</sub>-MtFKBP12 foi possível dar seguimento a purificação desta enzima.

#### 4.3 EXPRESSÃO E LISE DA CONSTRUÇÃO GST-TbFKBP12

Segundo Aido Machado (2012), as melhores condições para crescimento da proteína TbFKBP12 fusionada à GST seriam usando a cepa de *E. coli* BL21(DE3) a 17°C com 0,4 mM de IPTG em crescimento por 16h. Dessa maneira este protocolo foi confirmado e pode ser visto no SDS-Page 12% abaixo (Figura 24).



**Figura 24: SDS-PAGE 12% normalizado da expressão da proteína GST-TbFKBP12 a 17°C**

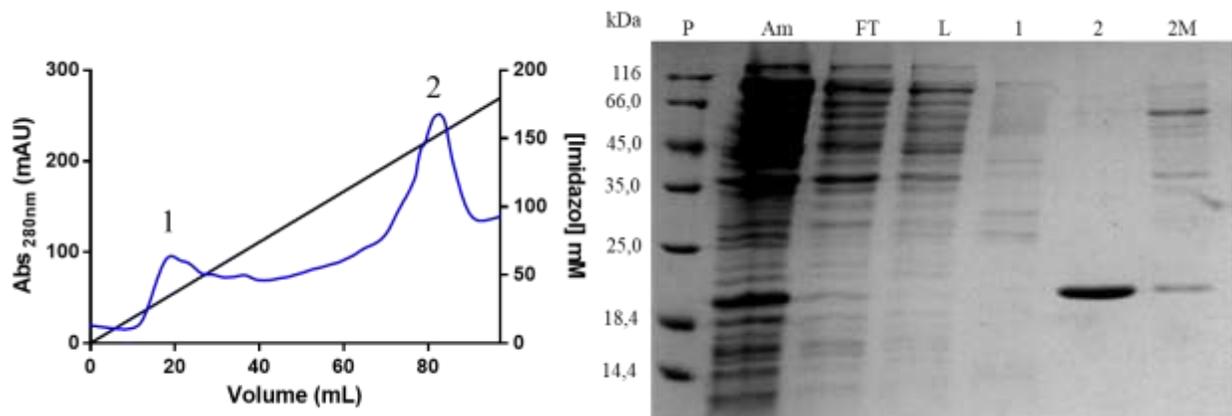
A expressão foi realizada com 0,4 mM de IPTG. *P*: Padrão de peso molecular; 16h: alíquotas retiradas 16h após indução. A seta evidencia a expressão da proteína de interesse ao longo do tempo na massa molecular esperada. As amostras estão normalizadas com 10 µg de massa total em cada poço.

#### 4.4 PURIFICAÇÃO E CLIVAGEM DAS PROTEÍNAS MTFKBP12 E TBFKBP12

Os ensaios de purificação das enzimas His<sub>6</sub>-MtFKBP12 e GST-TbFKBP12 foram feitos utilizando estratégias diferentes.

##### 4.4.1 - Purificação da enzima His<sub>6</sub>-MtFKBP12

A purificação desta construção foi feita utilizando coluna His-Trap (GE) em sistema Äkta-prime. A eluição foi realizada através de um gradiente crescente de imidazol (Figura 25).

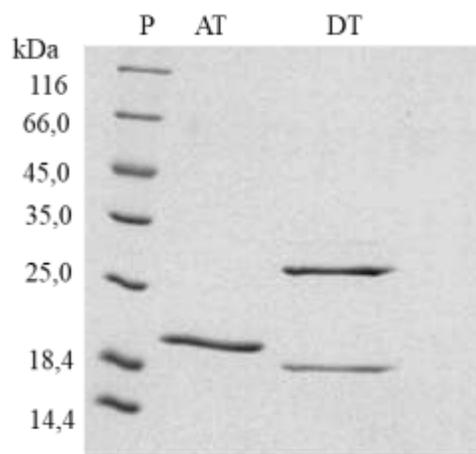


**Figura 25: SDS-PAGE 15 % e cromatograma da purificação da construção His6-MtFKBP12**

A purificação foi feita utilizando coluna His-trap em sistema Äkta-prime em tampão 50 mM fosfato de sódio pH 7,0 com 500 mM de NaCl. O cromatograma mostra os dois picos observados durante a eluição da proteína His<sub>6</sub>-MtFKBP12 (A) e no SDS-PAGE 15% podemos ver as seguintes alíquotas: P: Padrão de peso molecular; Am: amostra aplicada na coluna; FT: *Flow-through*; L: Lavagem; 1 e 2: picos de eluição e 2M: Eluição em 2 M de imidazol.

O primeiro pico do cromatograma corresponde às proteínas contaminantes do hospedeiro utilizado para superexpressão da proteína e a fração que contém o segundo pico corresponde a eluição enriquecida com a proteína de interesse, que começa a ser eluída em aproximadamente 125 mM de imidazol.

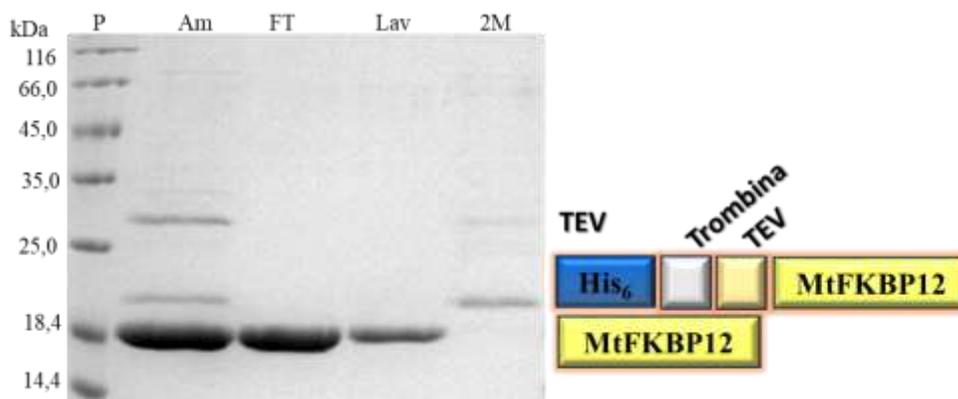
Após obtenção da fração enriquecida contendo a proteína His<sub>6</sub>-MtFKBP12 em alto grau de homogeneidade, a clivagem do *tag* foi realizada. A proteína de interesse foi incubada com a protease TEV (1:10) e, ao mesmo tempo, dialisada para retirada do imidazol. Tal ensaio foi feito por um período de 16 h a 4°C (Figura 26).



**Figura 26: SDS-PAGE 15% da clivagem da construção His<sub>6</sub>-MtFKBP12**

A clivagem da proteína foi feita incubando a amostra: TEV na proporção 10:1. A banda proteica imediatamente abaixo de 35,0 kDa corresponde a protease TEV, a segunda banda de maior massa molecular, em torno de 19 kDa, corresponde a proteína não clivada, antes da adição da protease TEV. Na banda de menor massa molecular encontra-se a proteína MtFKBP12 clivada. P: Padrão de peso molecular; AT: Antes da adição da protease TEV; DT: Depois da adição da protease TEV.

A análise do SDS-PAGE permite observar que a clivagem ocorreu com alta eficiência. Após clivagem e diálise realizadas, a amostra foi novamente submetida a uma cromatografia de afinidade a níquel para separação da proteína de interesse dos demais componentes proteicos (Figura 27).

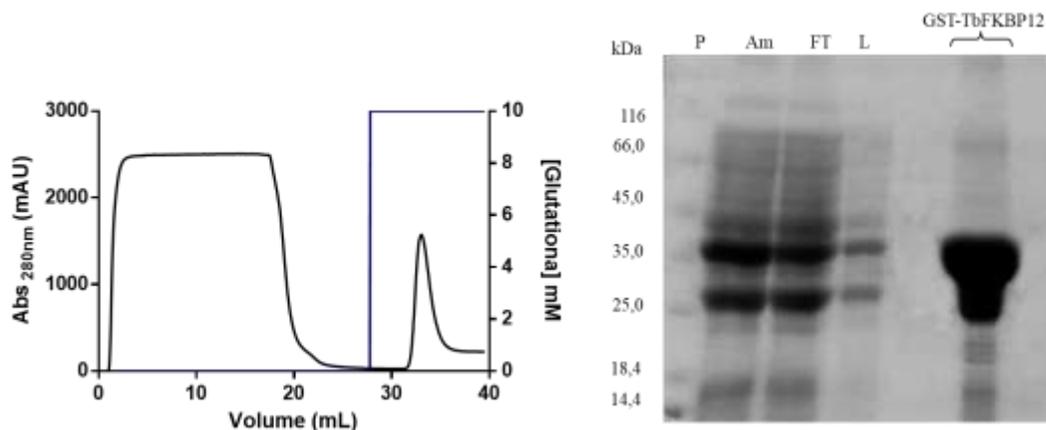


**Figura 27: SDS-PAGE 15 % da segunda cromatografia de afinidade a níquel**

Em “Am” observamos a amostra obtida após diálise e clivagem por TEV, obtendo-se a enzima MtFKBP12 clivada. Após a realização da purificação, a proteína de interesse foi obtida em alto grau de homogeneidade no *flow-through* (FT) e lavagem (Lav). Por fim, a amostra não clivada e a TEV foram eluídas com 2 M de imidazol (2M). P: Padrão de peso molecular.

#### 4.4.2 - Purificação da enzima GST-TbFKBP12

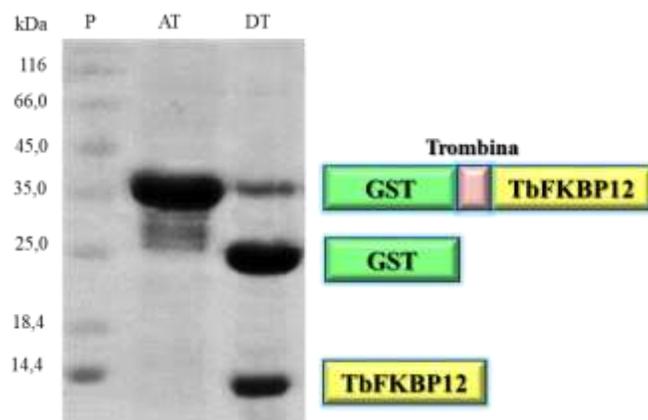
A purificação da construção GST-TbFKBP12 foi feita utilizando coluna GSTrap (GE) em sistema Äkta-prime. A eluição foi realizada com 10 mM de glutatona reduzida (Figura 28).



**Figura 28: SDS-PAGE 15 % e cromatograma da purificação da construção GST-TbFKBP12**

A purificação foi feita utilizando coluna GSTrap em sistema Äkta-prime em tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,0 com 150 mM de NaCl. O cromatograma mostrou um único pico referente a fração enriquecida da amostra de interesse (A). SDS-PAGE da purificação mostrando as frações: P: Padrão de peso molecular; Am: Amostra aplicada na coluna; FT: *Flow-through*; L: Lavagem e GST-TbFKBP12: a eluição da proteína de interesse.

Da mesma forma, após obtenção da fração enriquecida contendo a construção GST-TbFKBP12 em alto grau de homogeneidade, a clivagem do *tag* de GST foi realizada. A proteína de interesse foi incubada com 15 U de trombina por um período de 16 h a 4°C (Figura 29). Os dados mostraram que foi possível separar a TbFKBP12 da GST para os estudos estruturais.



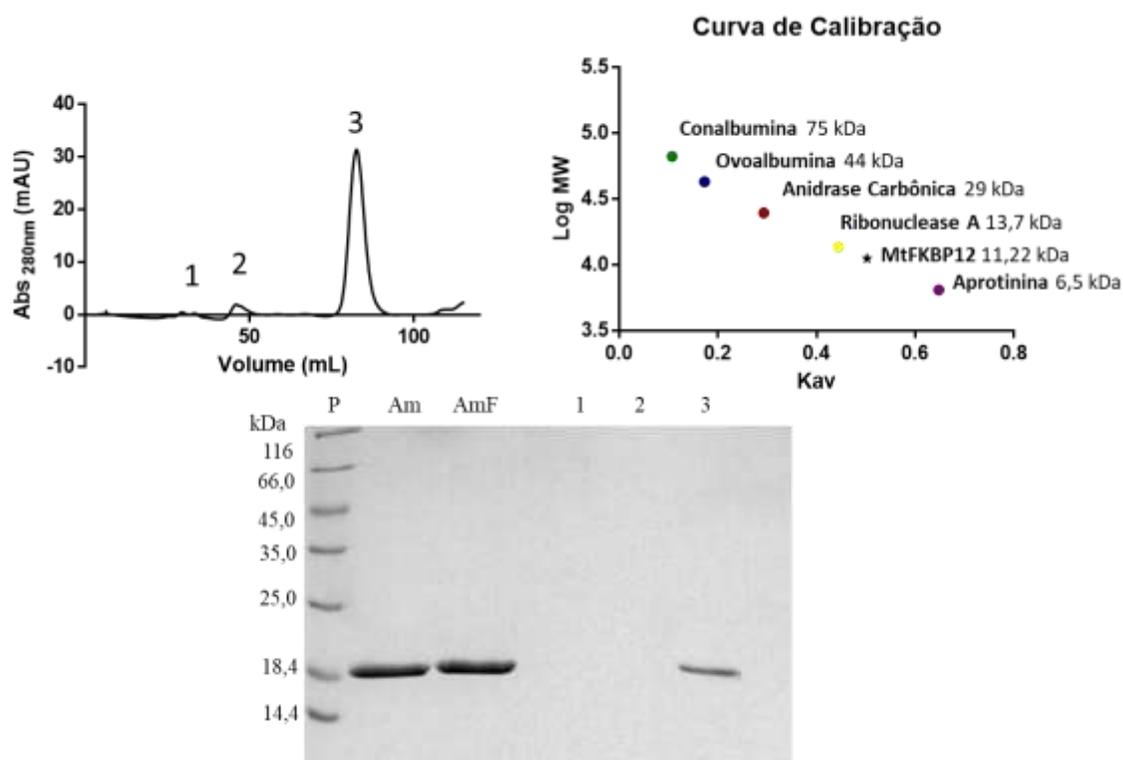
**Figura 29: SDS-PAGE 15% da clivagem da construção GST-TbFKBP12**

A clivagem da proteína foi feita incubando a amostra com trombina por 16 h a 4°C. A banda proteica imediatamente acima de 35,0 kDa corresponde a construção GST-TbFKBP12, a segunda banda de maior massa molecular, em torno de 25 kDa, corresponde a proteína GST clivada. Na banda de menor massa molecular encontra-se a proteína TbFKBP12 clivada. P: Padrão de peso molecular; AT: Antes da adição da trombina; DT: Depois da adição da trombina.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DO ESTADO OLIGOMÉRICO

Após obtenção da amostra purificada e clivada, a avaliação do estado oligomérico foi realizada com a ambas as proteínas com a coluna HiLoad 26/600 Superdex 75 prep grade.

Os resultados do cromatograma e SDS-Page 15% da cromatografia de exclusão molecular com a proteína MtFKBP12 mostraram que ela é eluída com massa molecular aproximada de 11,22 kDa, aproximadamente o valor da proteína no seu estado monomérico (12 kDa) (Figura 30).

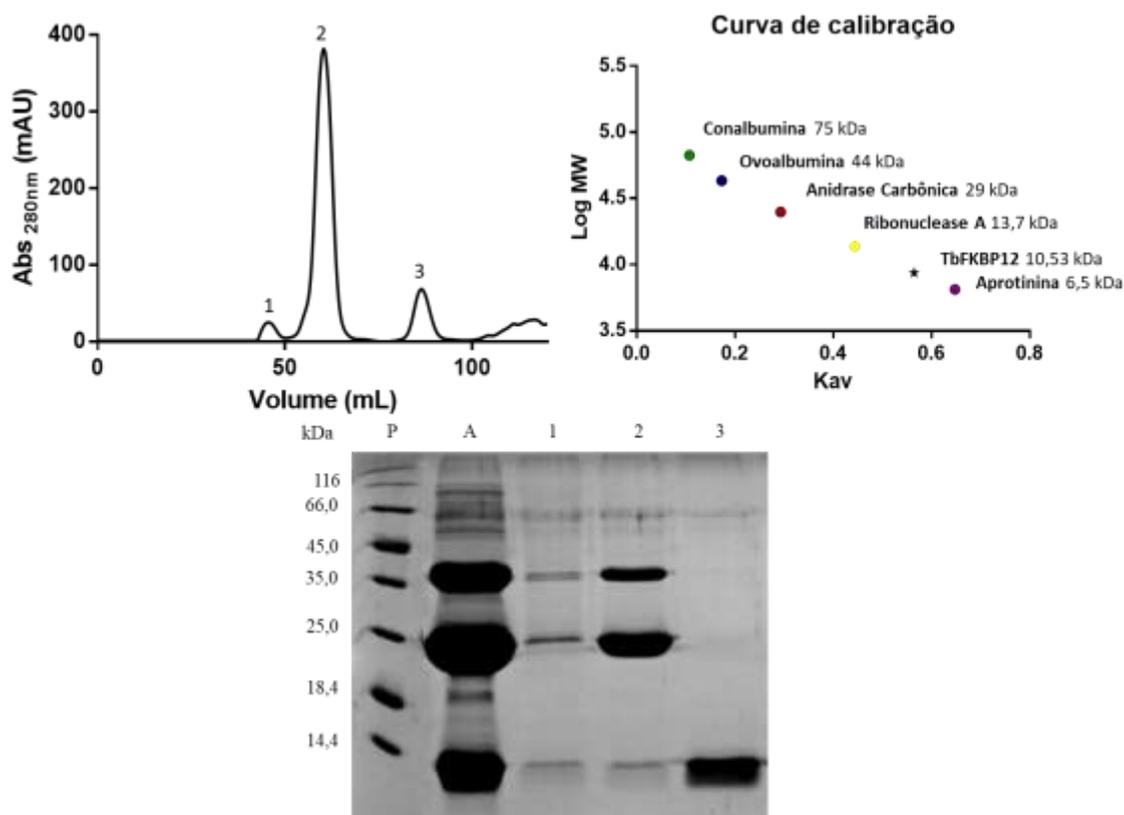


**Figura 30: SDS-PAGE 15 % da cromatografia de exclusão molecular da proteína MtFKBP12**

A análise do cromatograma, segundo a curva de calibração, permite observar um pico majoritário com volume de eluição de uma proteína com raio hidrodinâmico compatível com a massa molecular de 11,22 kDa, condizente com o estado monomérico da proteína. O SDS-Page 12% ao lado demonstra que este pico corresponde a proteína de interesse. P: Padrão de peso molecular; Am: Amostra obtida após clivagem; AmF: Amostra filtrada aplicada na gel-filtração; 1,2 e 3: picos observados no cromatograma.

Esses procedimentos foram realizados para a proteína MtFKBP12 não marcada e marcada isotopicamente. Os rendimentos foram de 24 mg/L de cultura, chegando a 1,2 mM em 600  $\mu$ L, para as amostras não marcada e duplamente marcada com  $^{15}\text{N}$  e  $^{13}\text{C}$  e 20 mg/L de cultura, chegando a 1 mM em 600  $\mu$ L, para a amostra marcada com  $^{15}\text{N}$ .

O cromatograma e SDS-Page 15% da cromatografia de exclusão molecular com a proteína TbFKBP12 mostraram que ela é eluída com massa molecular aproximada de 10,53 kDa, também condizente com a massa molecular do monômero (12 kDa) (Figura 31).



**Figura 31: SDS-PAGE 15 % da gel filtração da proteína TbFKBP12**

A análise do cromatograma, segundo a curva de calibração, permite observar que o terceiro pico corresponde a TbFKBP12 com volume de eluição de uma proteína com raio hidrodinâmico compatível com a massa molecular de 10,53 kDa condizente com o monômero. P: Padrão de peso molecular; Am: Amostra aplicada na gel-filtração; 1, 2 e 3: picos observados no cromatograma.

Para a etapa de concentração da proteína TbFKBP12 foi adicionado  $\beta$ -mercaptoetanol para atingir a concentração de 100 mM, além da adição de 500 mM de NaCl, que foi retirado após tal procedimento. Os rendimentos foram 4 mg/L de cultura, chegando a 0,2 mM em 600  $\mu$ L, para as amostras não marcada e marcada isotopicamente com  $^{15}\text{N}$ .

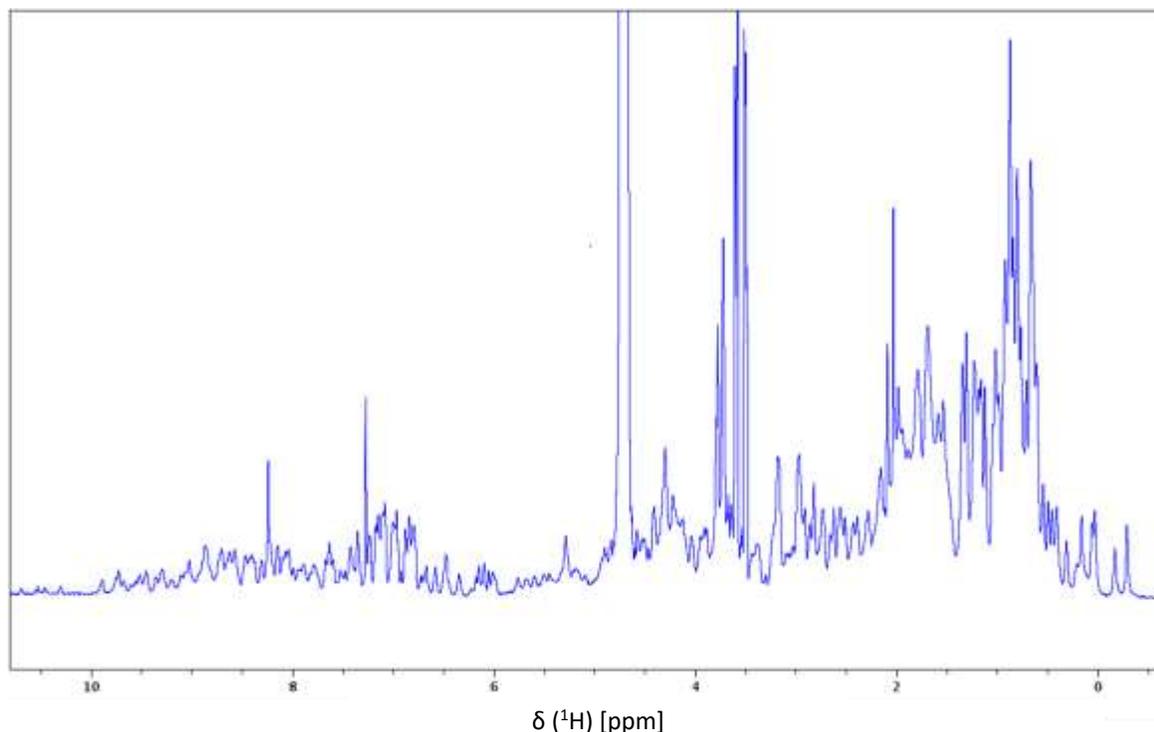
## 4.6 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

### 4.6.1 – Determinação Estrutural da MtFKBP12

A partir da marcação isotópica com  $^{15}\text{N}$  ou  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$  da proteína MtFKBP12 durante a expressão bacteriana e realização dos procedimentos de purificação descritos acima, os espectros

de ressonância magnética nuclear foram obtidos com amostra proteica de concentração 1,2 mM em tampão 50 mM fosfato de sódio, pH 7,0 com 150 mM de NaCl.

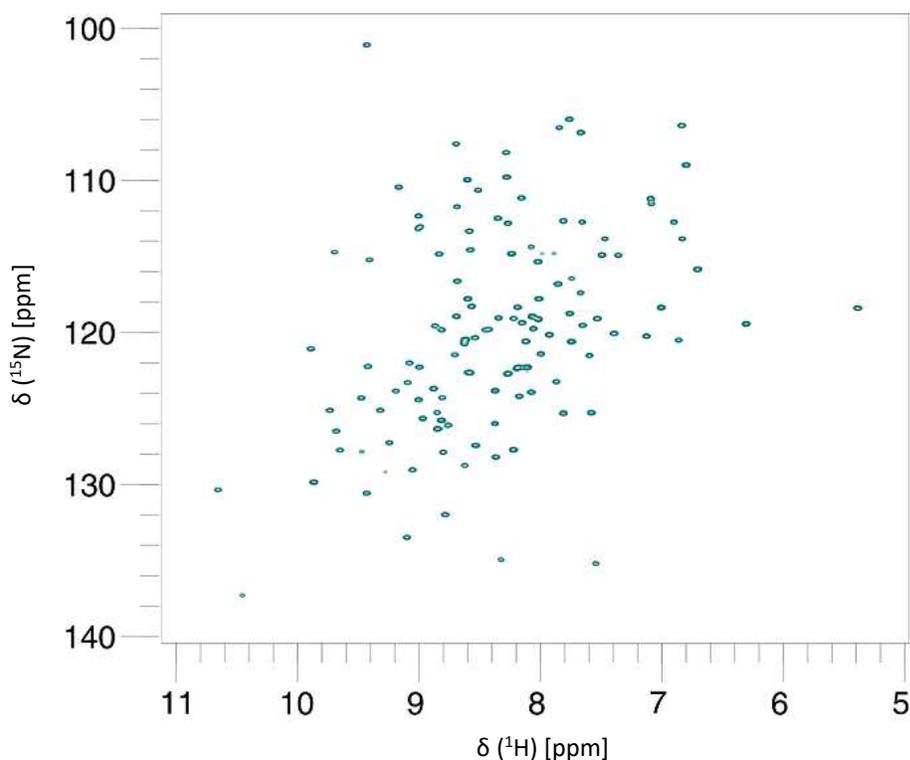
Na Figura 32 vemos o espectro  $^1\text{H}$ -RMN da proteína MtFKBP12 com uma boa dispersão de deslocamentos químicos e com linhas bem finas, o que indicam uma boa estruturação em solução e estado monomérico, respectivamente. Cada sinal nesse espectro corresponde a ressonância de um hidrogênio presente na proteína com determinada frequência. O fator que rege a diferença de frequência entre os átomos de hidrogênio é denominado blindagem e pode ser compreendido levando-se em conta a vizinhança (elétrons) na qual se encontra o núcleo que está sendo objeto de análise. Assim, pode-se identificar diversas regiões no espectro, ressaltando as regiões específicas para hidrogênios amídicos e de cadeia lateral de aromáticos (6,5 – 10,5 ppm) com grande dispersão de deslocamento químico, bem como sinais acima de 10 ppm, geralmente referentes ao H $\epsilon$ N $\epsilon$  da cadeia lateral de triptofanos e sinais abaixo de 0 ppm, referentes a metilas próximas a cadeia lateral de resíduos aromáticos. Tais resultados são fortes indicativos de enovelamento proteico correto.



**Figura 32: Espectro unidimensional  $^1\text{H}$  da proteína MtFKBP12**

O espectro apresenta grande dispersão de deslocamentos químicos e picos finos, podendo-se ressaltar as regiões específicas para hidrogênios amídicos e de cadeia lateral de aromáticos, bem como sinais acima de 10 ppm e abaixo de 0 ppm. Tais sinais são indicativo de que a proteína está enovelada e monomérica.

A Figura 33 mostra o espectro bidimensional de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC. Este espectro fornece os deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  ligados diretamente a  $^{15}\text{N}$  de uma proteína, ou seja, os hidrogênios amídicos, com exceção das prolinas, e as cadeias laterais de alguns resíduos como Trp ( $\text{N}\epsilon\text{-H}\epsilon$ ), Asn ( $\text{N}\delta\text{-H}\delta 2$ ), Gln ( $\text{N}\epsilon\text{-H}\epsilon 2$ ) e por vezes Arg ( $\text{N}\eta\text{-H}\eta$ ) e Lys ( $\text{N}\zeta\text{-H}\zeta$ ). A grande dispersão de deslocamento químico de tal espectro também indica estruturação da proteína em solução. As linhas finas dos sinais observados sugerem que a MtFKBP12 é monomérica, o que torna sua determinação estrutural por RMN factível. Dos 126 resíduos presentes nesta proteína, seriam esperados 116 picos de correlação  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  referentes aos hidrogênios amídicos da cadeia principal (excetuando-se as 10 prolinas), além dos hidrogênios amídicos presentes em cadeias laterais. Levando em conta tais observações, foram observados 126 picos em tal espectro.



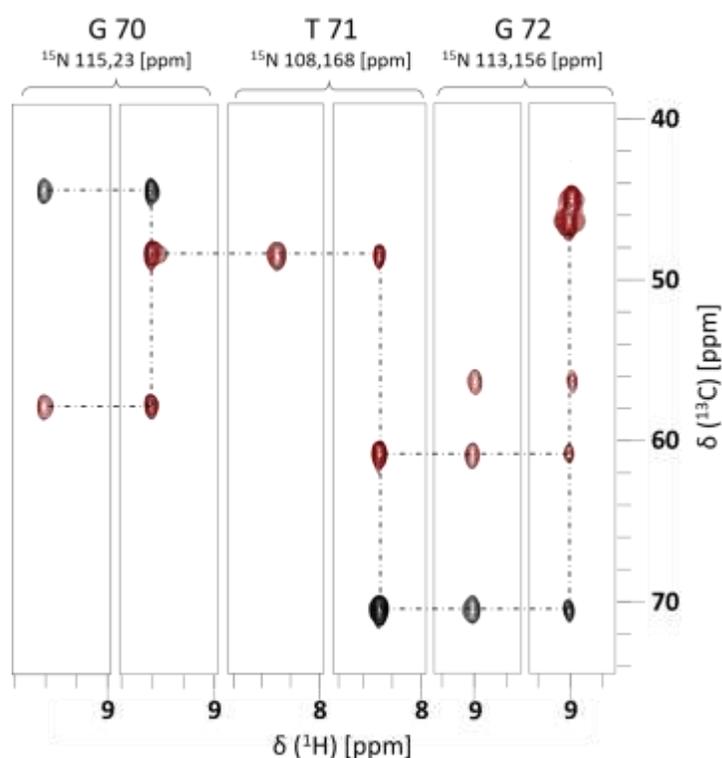
**Figura 33: Espectro  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC da proteína MtFKBP12**

Cada pico no espectro se refere aos hidrogênios amídicos (HN) de cada aminoácido da proteína, apresentando um pico para cada resíduo de aminoácido (exceto prolinas) e picos extras de cadeias laterais de asparagina, glutamina, triptofano e arginina. Este espectro possui 126 picos da proteína MtFKBP12 dos 116 esperados.

Para assinalamento da proteína optou-se fazer uso combinado dos espectros CBCA(CO)NH, que fornecem correlações inter-residuais entre as ressonâncias de  $^1\text{H}$  e  $^{15}\text{N}$  de um resíduo (i) e as correlações dos  $^{13}\text{C}\alpha$  e  $^{13}\text{C}\beta$  do resíduo anterior (i-1), e HNCACB e HNCA, que

forneem correlaões intra-residuais e sequenciais entre as ressonâncias de  $^1\text{HN}$ ,  $^{15}\text{N}$  (resíduo  $i$ ) e  $^{13}\text{C}\alpha$  e  $^{13}\text{C}\beta$  (resíduo  $i$  e  $i-1$ ). Já os espectros HNCO e HN(CA)CO forneem correlaões inter-residuais entre as ressonâncias de  $^1\text{H}$  e  $^{15}\text{N}$  de um resíduo ( $i$ ) e as correlaões  $^{13}\text{CO}$  do resíduo anterior ( $i-1$ ) e correlaões intra-residuais e sequenciais entre as ressonâncias de  $^1\text{HN}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{CO}$  (resíduo  $i$  e  $i-1$ ), respectivamente.

Primeiramente foi feito o assinalamento sequencial dos resídus a partir dos deslocamentos dos  $\text{C}\beta$  e  $\text{C}\alpha$  característicos dos resídus. Esses espectros tridimensionais foram decompostos num espectro bidimensional  $^{15}\text{N}$  HSQC (projeção) e fatias representando a terceira dimensão. A partir dos deslocamentos característicos dos  $\text{C}\beta$  e  $\text{C}\alpha$  de alguns resídus (Serina/Treonina, Glicina e Alanina) pudemos descobrir quais eram esses aminoácidos e, então, procurar na sequência primária onde estes se encaixavam (Figura 34).



MALERPEIDFPEGQPPEYLDITDITEGDGPEAVKGSNVSMHYVGVSWSTGEEFDASWNRGSTLDFTL  
**GTGR**VIKGWDMGIAGMKVGGRRKLVIPPHLAYGDRSPSPAIKPGETLIFVVDLVGVG

**Figura 34: Fatias dos Espectros Tridimensionais HN(CO)CACB e HNCACB**

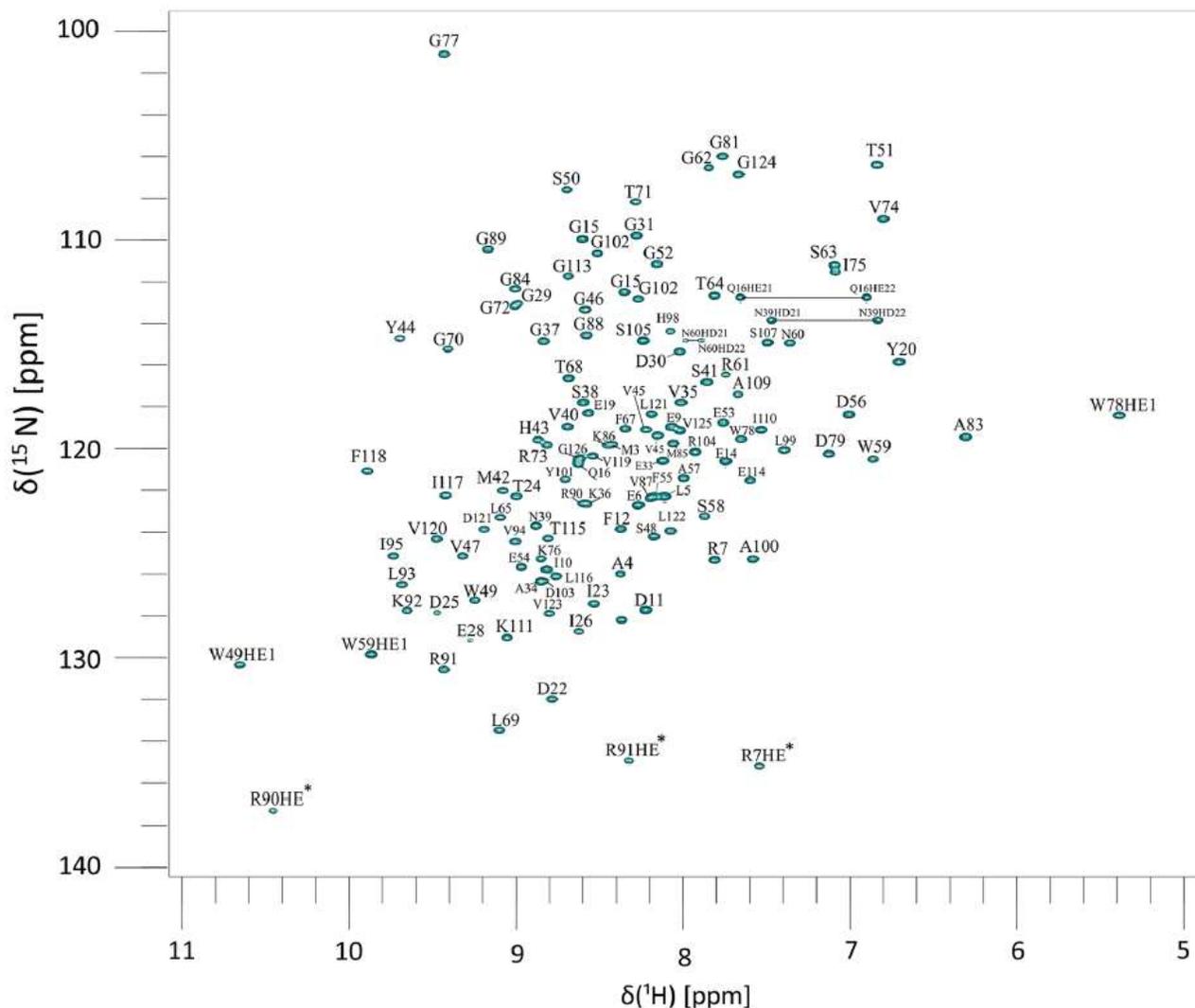
As tiras dos conjuntos de dados HN(CO)CACB (esquerda) e HNCACB (direita) nas frequências  $^{15}\text{N}$  para as ressonâncias amídicas são ilustradas para a sequência de G70 a G71. As ressonâncias  $\text{C}\alpha$  são escalonadas para produzir picos cruzados positivos (vermelhos), enquanto os picos cruzados  $\text{C}\beta$  são negativos (preto). Abaixo, observa-se a sequência primária de MtFKBP12, na qual a única região que representa a sequência GTG encontra-se destacada em vermelho.

Também foram utilizados o par de espectros 3D HBHA(CO)NH e HCCH-TOCSY para completar o assinalamento sequencial (HN, N, C $\alpha$ , C $\beta$ , H $\alpha$ , H $\beta$ ) da proteína. Para atribuição das ressonâncias das cadeias laterais (HC $\gamma$ , HC $\delta$ , etc.) dos resíduos utilizou-se os espectros 3D HCCH-TOCSY, CC(CO)NH e  $^{15}\text{N}$  NOESY HSQC. Para auxiliar no assinalamento das ressonâncias das cadeias laterais dos resíduos aromáticos utilizou-se em conjunto o espectro 3D  $^{13}\text{C}$ -HSQC-NOESY.

Tais assinalamentos permitiram completar a atribuição de todas as ressonâncias nos espectros  $^{15}\text{N}$  HSQC (Figura 35) e  $^{13}\text{C}$  HSQC, podendo-se então partir para a determinação da estrutura da proteína (ANDRADE et al., 2019).

Com base nos experimentos citados acima, 114 dos 115 picos esperados foram atribuídos, exceto A2. Todas as cadeias laterais NH<sub>2</sub> dos grupos de asparaginas, glutaminas e apenas N $\epsilon$  / H $\epsilon$  das argininas 7, 90 e 91 foram assinaladas. Atribuímos 97,9% das ressonâncias dos núcleos da cadeia principal ( $^{13}\text{C}\alpha$ ,  $^{13}\text{CO}$ , H $\alpha$ , amida HN e  $^{15}\text{N}$ ), exceto G1,  $^{13}\text{CO}$  de P17 e P96, H $\alpha$  de G31 e G126. Cerca de 90% das porções  $^{13}\text{CH}_n$  da cadeia lateral foram atribuídas. Considerando todos os átomos da cadeia lateral, atribuímos 70,9% de  $^{13}\text{C}$ , 80,2% de  $^1\text{H}$  e 27,3% de  $^{15}\text{N}$ . Todos os C $\beta$  e H $\beta$  foram atribuídos, exceto para S50. Atribuímos as cadeias laterais completas de quase todos os resíduos aromáticos, exceto W78 (parcialmente atribuído) e F55. Curiosamente, a frequência correspondente à cadeia lateral H $\epsilon$ 1/N $\epsilon$ 1 do triptofano 78 apresenta uma posição bastante incomum. No entanto, o alinhamento da sequência primária com a proteína ortóloga humana mostrou correspondência de deslocamento com triptofano 59 na FKBP12 de humanos (MUSTAFI et al., 2013). As cadeias laterais de H43 e H98 não foram atribuídas.

Todos os deslocamentos químicos foram depositados no Biomagnetic Resonance Bank (<http://www.bmrb.wisc.edu>) com o número de acesso 27690.

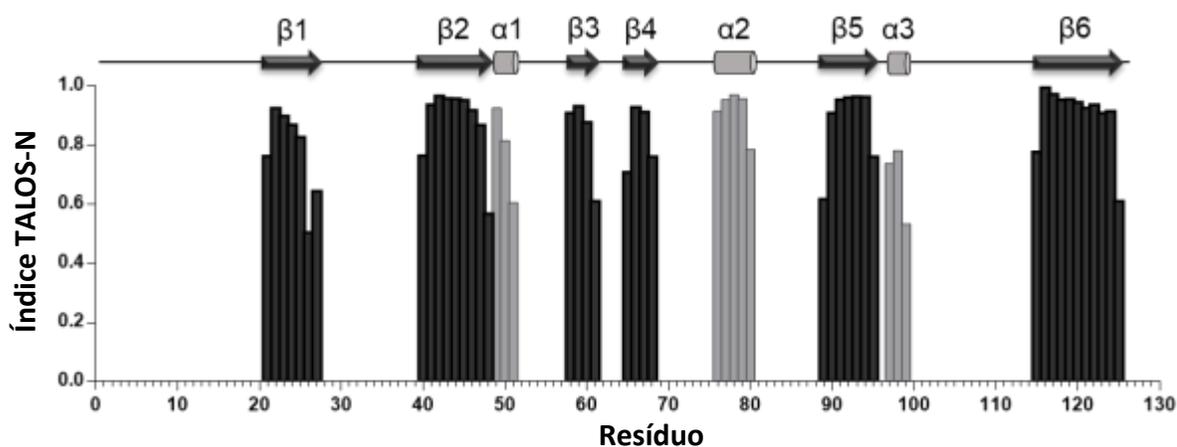


**Figura 35: Espectro bidimensional  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC assinalado da proteína MtFKBP12**

Cada pico no espectro se refere aos hidrogênios amídicos (HN) de cada aminoácido presente na proteína, apresentando um pico para cada resíduo de aminoácido (exceto prolínas) e picos extras de cadeias laterais de asparagina, glutamina, triptofano e arginina.

Uma vez com todas as ressonâncias atribuídas, a determinação estrutural da proteína MtFKBP12 tornou-se possível. Para isso, fez-se necessária a atribuição das ressonâncias dos picos dos espectros  $^{15}\text{N}$ -HSQC NOESY e  $^{13}\text{C}$ -HSQC NOESY, que fornecem as correlações espaciais entre prótons. Cada pico deste espectro indica uma correlação espacial de até 5 Å de distância entre prótons.

Analisou-se a estrutura secundária da proteína de interesse a partir o programa TALOS-N (SHEN; BAX, 2013), que faz a previsão empírica de ângulos de torção  $\phi$  e  $\psi$  da cadeia principal da proteína usando a combinação de cinco tipos de atribuições de deslocamento químico (HN, H $\alpha$ , C', C $\alpha$ , C $\beta$ , N) para uma determinada sequência proteica. O resultado mostrou uma grande semelhança no padrão de estrutura secundária quando comparado com as estruturas FKBP12 previamente descritas (Figura 36) (ANDRADE et al., 2019).

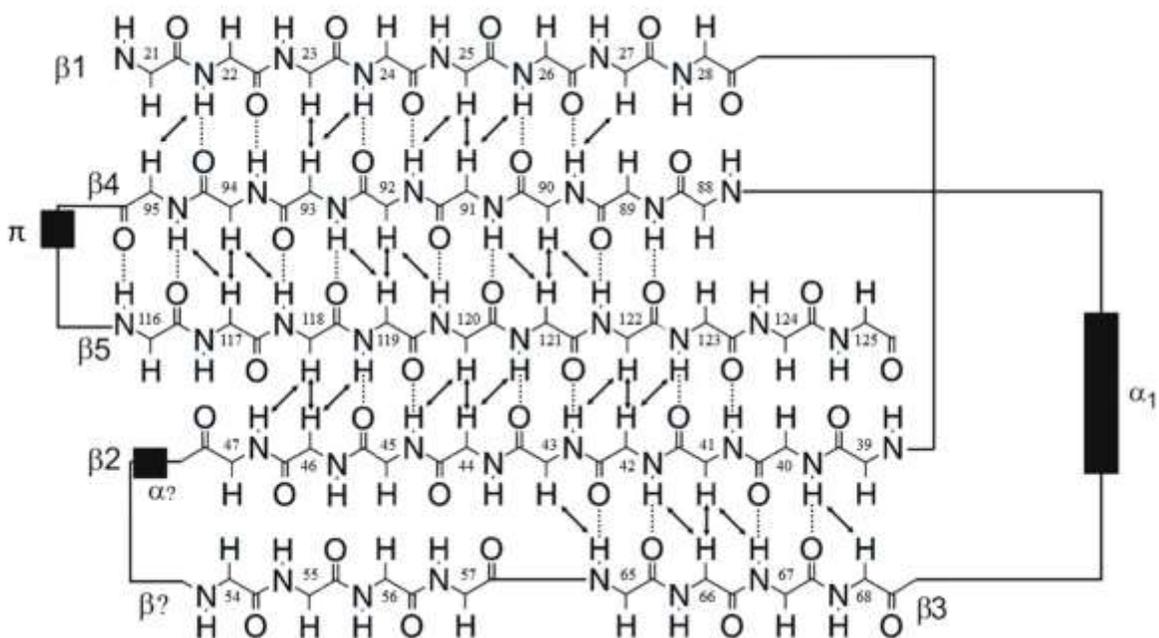


**Figura 36: Padrão de estrutura secundária para a MtFKBP12 obtido através do programa TALOS-N**

As barras escuras correspondem a fitas  $\beta$  previstas pelo servidor de acordo com os dados fornecidos, enquanto as barras claras correspondem as hélices. A hélice “ $\alpha 1$ ” e fita “ $\beta 3$ ” não foram observadas na estrutura de menor energia após o último cálculo realizado.

Inicialmente, para o primeiro cálculo, algumas distâncias de NOEs características de estruturas secundárias envolvendo prótons amídico-amídico, amídico-H $\alpha$  ou H $\alpha$ -H $\alpha$  foram assinaladas a partir das informações obtidas com os deslocamentos químicos assinalados anteriormente.

Posteriormente, as pontes de hidrogênio foram inseridas como restrições de entrada para o cálculo após inferências baseadas nos padrões de NOEs característicos de estrutura secundária, ou seja, o conjunto de NOEs característicos como formadores de folhas  $\beta$  e  $\alpha$ -hélice. A Figura 37 resume, esquematicamente, esses assinalamentos iniciais e a topologia secundária resultante da MtFKBP12.

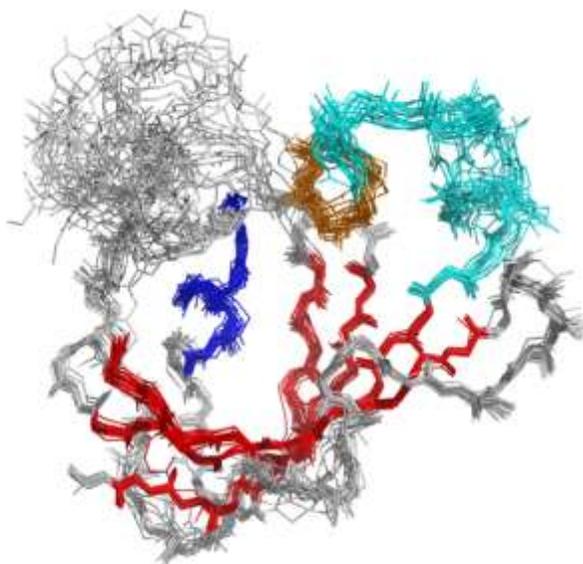


**Figura 37: Esquema da estrutura secundária da MtFKBP12**

Este esquema foi construído a partir da observação dos NOEs e dos resultados obtidos pelo programa TALOS-N. As setas indicam NOEs encontrados e as linhas pontilhadas indicam pontes de hidrogênio. Os NOEs referentes a hélice “α1” e fita “β3”, aqui referidos como “α?” e fita “β?”, não foram confirmados/mostraram-se ambíguos. Assim, as ligações de hidrogênio referentes a essas estruturas secundárias não foram adicionadas. Modificado de Aido Machado (2012).

Assim, os dados de entrada para o cálculo foram: (i) lista contendo as restrições de NOEs obtidos nos espectros NOESY parcialmente assinalados, (ii) lista de deslocamentos químicos, (iii) pontes de hidrogênio e (iv) ângulos de diedros derivados do TALOS-N. A maior parte das restrições de NOE foi assinalada utilizando-se o programa ARIA (LINGE; O’DONOGHUE; NILGES, 2001; RIEPING et al., 2007).

Após diversos ciclos de cálculos realizados, analisando as restrições e violações a cada ciclo, o resultado do último cálculo pode ser observado abaixo, com o conjunto de 20 estruturas de menor energia (Figura 38). As restrições estruturais e coordenadas atômicas das 20 melhores estruturas de MtFKBP12 foram depositadas no Protein Data Bank sob o código de acesso 6WBU.



**Figura 38: As 20 estruturas de menor energia da MtFKBP12**

As 20 estruturas de menor energia refinadas em água. As estruturas secundárias e elementos importantes da estrutura proteica foram destacados em vermelho (folha  $\beta$ ), azul escuro ( $\alpha$ -hélice), cinza (loops), laranja (hélice  $\pi$ ) e ciano (loop 100's).

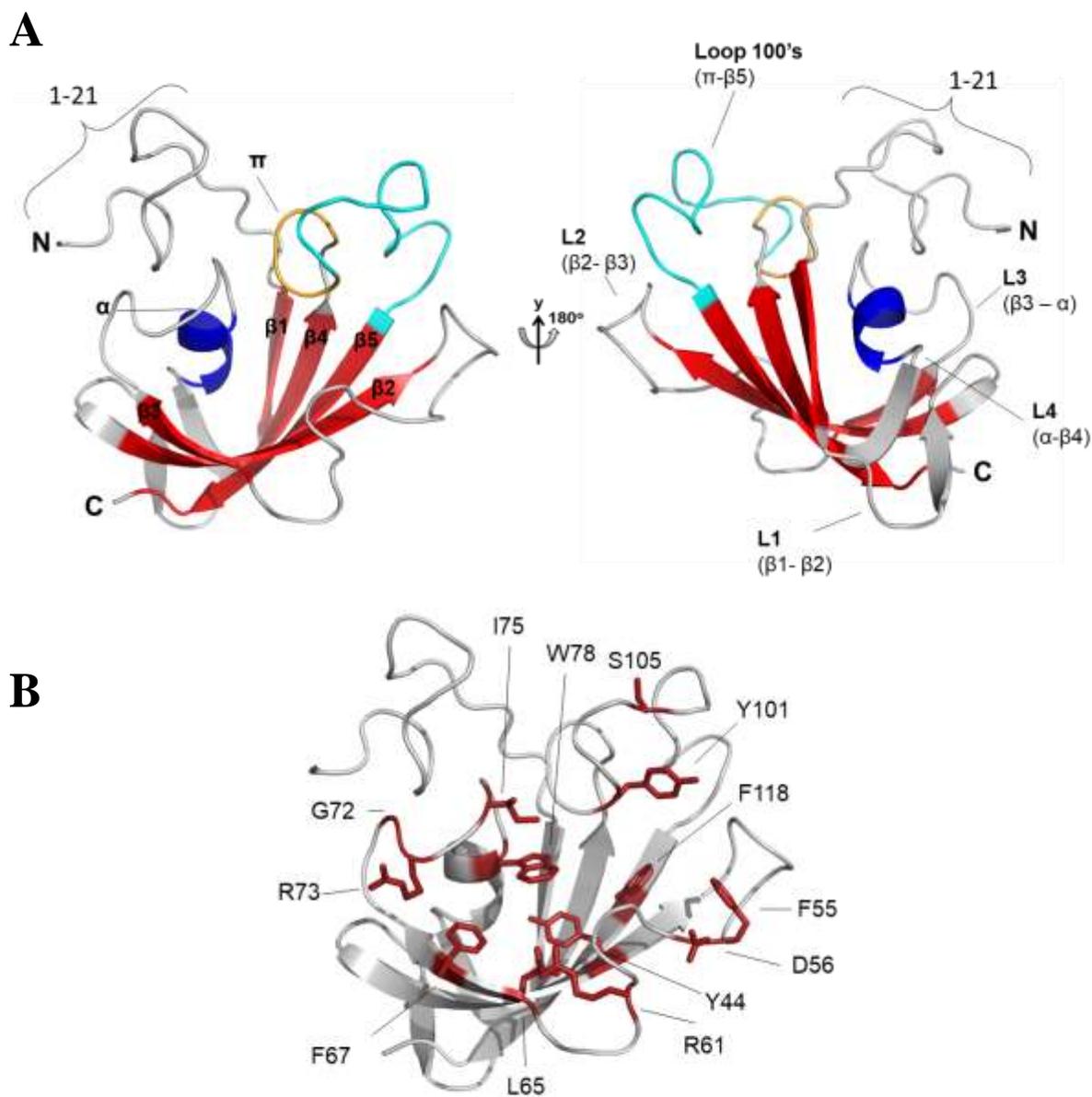
Esse conjunto de estruturas possui um valor de desvio médio quadrático (rmsd) de *backbone* de 0,331 Å para a região de estrutura secundária (fitas e hélices), enquanto o rmsd de *backbone* total é de 0,77 Å, excluindo-se os 21 primeiros resíduos que se encontram no N-terminal que é bastante flexível. A estrutura de alta resolução da MtFKBP12 em solução foi determinada, a partir de cálculo estrutural contendo 3325 restrições de distância interatômicas (1011 de longa distância:  $|i - j| > 5$ ), 29 restrições de ângulos de diedro e 27 restrições de ligações hidrogênio. Esse conjunto de restrições experimentais resultou em uma estrutura de alta resolução bem definida para a MtFKBP12. Como pode ser observado, mais de 98% dos resíduos encontram-se em regiões permitidas do diagrama de Ramachandran (Tabela 2).

**Tabela 2: Lista de restrições e análise estatística para a estrutura em solução de MtFKBP12**

<b>Número de restrições experimentais</b>	
Número total de restrições NOE	3325
Intra-resíduo	1211
Sequencial	668
Pequena distância ( $2 \leq  i - j  \leq 3$ )	316
Média distância ( $4 \leq  i - j  \leq 5$ )	119
Longa distância ( $ i - j  > 5$ )	1011
Ângulos de diedro (phi/psi)	29
Restrições de ligação de hidrogênio	27
<b>RMSD from average structure (Å)</b>	
Cadeia principal (22-26. 39-47. 65-68. 78-82. 89-94. 117-125)	0.331
Cadeia principal (22-126)	0.77
Átomos pesados (22-26. 39-47. 65-68. 78-82. 89-94. 117-125)	0.794
Átomos pesados (22-126)	1.22
<b>Violações de Restrição</b>	
Violações de NOE ( $> 0.5$ Å)	0.1
Ângulo de diedro ( $> 5$ °)	0
<b>Desvios da Geometria Ideal</b>	
RMS para distâncias de ligação (Å)	$0.006 \pm 0.0002$
RMS para ângulos de ligação (°)	$0.854 \pm 0.02$
<b>Plot Ramachandran para resíduos ordenados (%)</b>	
Regiões Favoráveis	68.9%
Regiões permitidas	24.3%
Regiões generosamente permitidas	4.9%
Regiões não permitidas	1.9%
<b>Energia (kcal mol<sup>-1</sup>)</b>	
$E_{\text{Total}}$	$-3240 \pm 139.44$
$E_{\text{Ligação}}$	$86.0841 \pm 5.4422$
$E_{\text{Ângulo}}$	$385.985 \pm 22.106$
$E_{\text{vdw}}$	$-1160.89 \pm 15.6909$
$E_{\text{Elec}}$	$-4112.95 \pm 15.6909$
$E_{\text{Impar}}$	$940.37 \pm 86.1737$

A MtFKBP12 é composta por cinco fitas  $\beta$ , que constituem uma única folha  $\beta$ , uma pequena  $\alpha$ -hélice e uma pequena hélice  $\pi$ . A fita  $\beta 1$  compreende os resíduos D22 a I26,  $\beta 2$  os resíduos N39

a V47,  $\beta 3$  os resíduos L65 a T68, a  $\alpha$ -hélice os resíduos K78 a I82,  $\beta 4$  os resíduos G89 a V94, hélice  $\pi$  os resíduos P97 a Y101,  $\beta 5$  os resíduos I117 a V125 (Figura 39A). Seu arranjo tridimensional é similar às outras estruturas descritas para as FKBP's, no qual as fitas organizadas formando uma única folha  $\beta$  onde  $\beta 1$  faz contato com  $\beta 4$  em orientação antiparalela, e similarmente  $\beta 4$  é antiparalela a  $\beta 5$ . Esta última faz contatos em orientação antiparalela com  $\beta 2$  que também é antiparalela a  $\beta 3$ . A  $\alpha$ -hélice encontra-se entre as fitas  $\beta 3$  e  $\beta 4$  e é envolvida pela folha  $\beta$ . A hélice  $\pi$  situa-se no extenso *loop* entre as fitas  $\beta 4$  e  $\beta 5$ . Este *loop*, que compreende os resíduos G102 a L116, possui elevada importância na mediação da ligação entre as proteínas FKBP12 e seus parceiros moleculares. Normalmente, ele se inicia no resíduo 81 e se prolonga até o 96, sendo chamado na literatura como *loop 80's* (Figura15). Devido à proteína MtFKBP12 possuir um acréscimo de 20 resíduos de aminoácidos na região N-terminal, este *loop* é aqui referido como *loop 100's*. Este *loop*, assim como os demais *loops* e alças, é mais flexível que as fitas ou hélices.



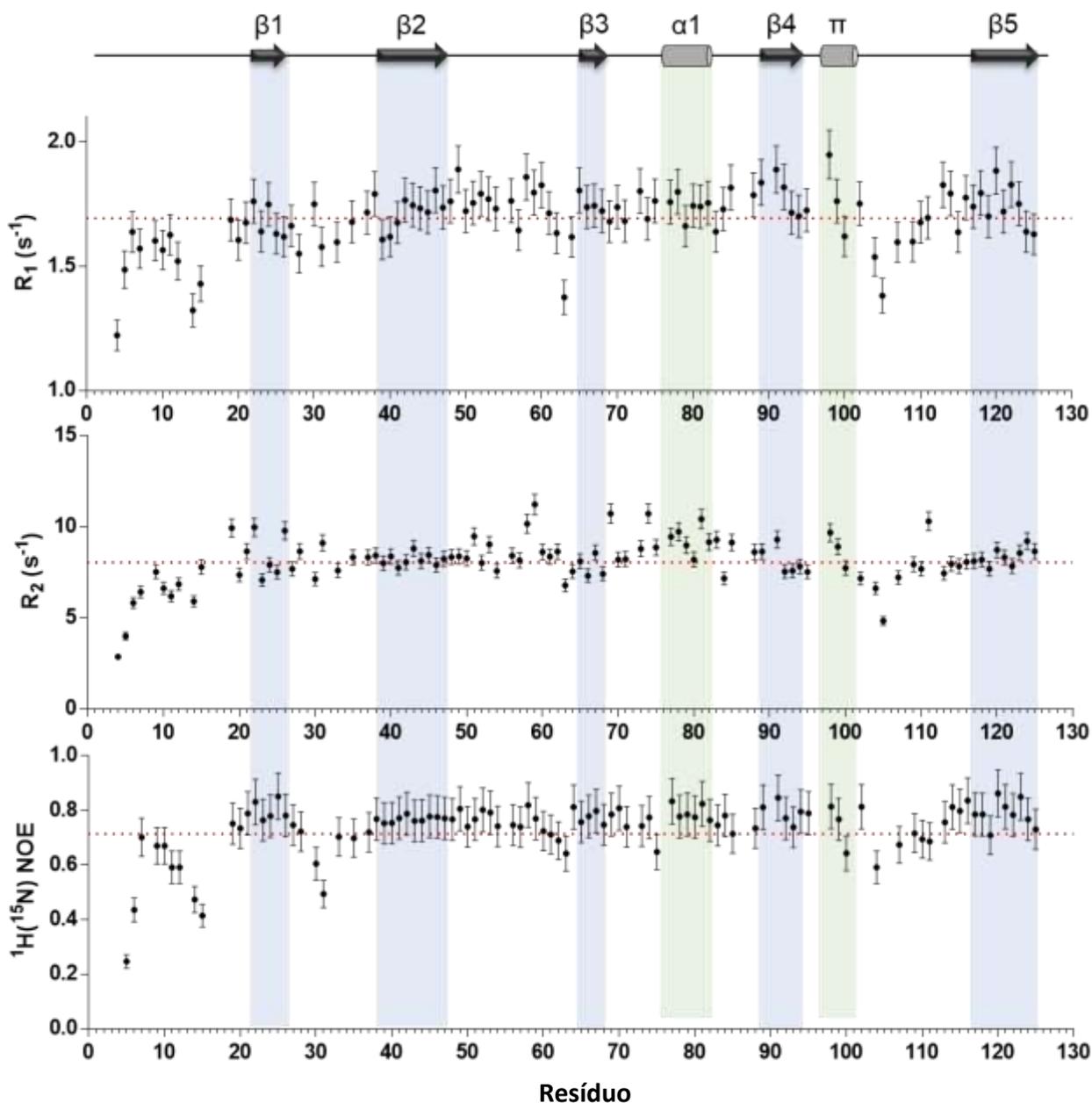
**Figura 39: Estrutura de menor energia da proteína MtFKBP12**

(A) Estrutura de menor energia refinada em água em representação *ribbon*, com elementos de estrutura secundária destacados em vermelho (folha  $\beta$ :  $\beta 1$  (D22-I26),  $\beta 2$  (N39-V47),  $\beta 3$  (L65-T68),  $\beta 4$  (G89-V94),  $\beta 5$  (I117-V125)), azul ( $\alpha$ -hélice: K78-I82), *loops* (cinza), laranja (hélice  $\pi$ : P97 a Y101) e ciano (*loop 100*'s: G102-L116). (B) Estrutura de menor energia refinada em água em representação *ribbon* com resíduos previstos para interação com o composto FK506, por alinhamento de sequência primária, destacados em bordô.

#### 4.6.2 – DINÂMICA DA MtFKBP12

Para investigar a dinâmica interna da proteína MtFKBP12 foram realizados experimentos de relaxação  $^{15}\text{N}$   $R_1$  e  $R_2$  e  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  NOE heteronuclear. Os dados de relaxação mostram pouca variação significativa nos valores de  $^{15}\text{N}$   $R_1$  (Figura 40A), que se encontram, majoritariamente, na faixa entre 1,6 e 1,8  $\text{s}^{-1}$  ( $R_1$  médio = 1,69  $\text{s}^{-1}$ ). Os valores de  $R_1$  abaixo da média (2 desvios-padrões) correspondem aos resíduos M3, A4, E14, presentes na região N-terminal, e S63, presente no loop entre as fitas  $\beta_2$  e  $\beta_3$ . Para a taxa de relaxação  $R_2$  (Figura 40B) a maioria dos resíduos apresenta valores entre 7 e 9  $\text{s}^{-1}$  ( $R_2$  médio = 8,05  $\text{s}^{-1}$ ). Os resíduos que apresentam  $R_2$  abaixo da média (2 desvios-padrões) são M3, A4, L5 (região N-terminal) e S105 (*loop 100's*) e aqueles que apresentam valor  $R_2$  acima da média (2 desvios padrão) são W59 (loop  $\beta_2$ - $\beta_3$ ), L69 e V74 (loop  $\beta_3$  -  $\alpha$ -hélice).

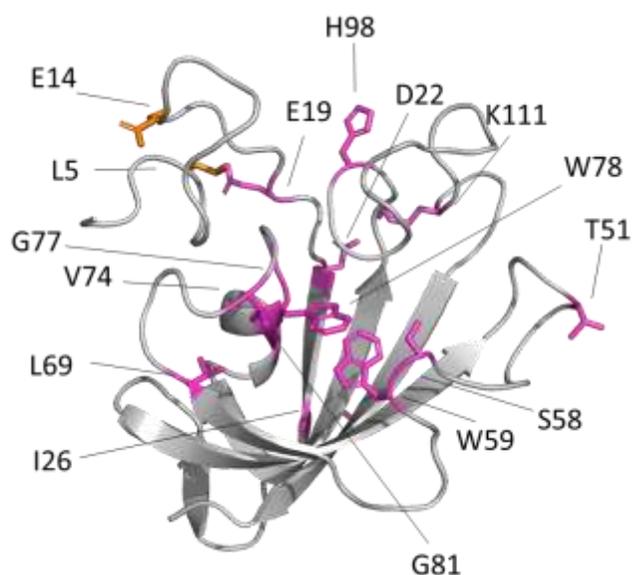
A maioria dos valores de  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  NOE heteronuclear (Figura 40C) encontram-se na faixa entre 0,7 e 0,83  $\text{s}^{-1}$  (NOE médio = 0,714  $\text{s}^{-1}$ ) com variações significativas no N-terminal (resíduos L5, E6, E14 e G15), *loop*  $\beta_1$ - $\beta_2$  (G31) e certa variação no *loop 100's* (hélice  $\pi$  - fita  $\beta_5$ ).



**Figura 40: Parâmetros de relaxação  $^{15}\text{N}$  da cadeia principal**

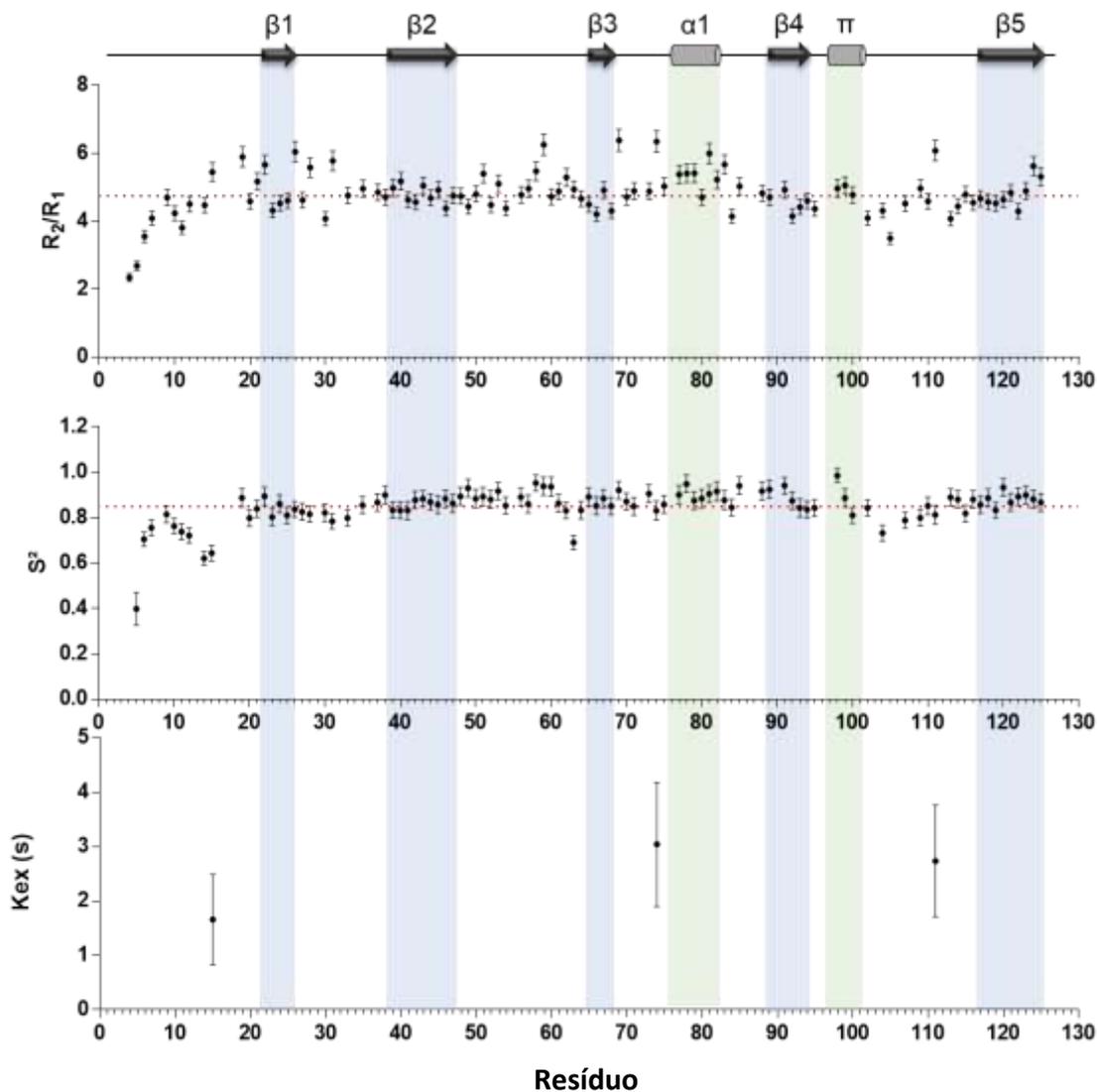
(A)  $R_1$ , (B)  $R_2$ , e (C)  $^1\text{H}(^{15}\text{N})$  NOE Heteronuclear da proteína MtFKBP12 a 0,4 mM em função do número dos resíduos a 25°C. O ensaio foi realizado em tampão 50 mM fosfato de sódio pH 7,0 150 mM NaCl. As barras representam os erros associados a cada medida. A linha tracejada vermelha indica os valores médio de cada parâmetro. Os elementos de estrutura secundária estão indicados na parte superior da figura. As fitas- $\beta$  estão representadas por setas pretas e as hélices  $\alpha$  e  $\pi$  por cilindros cinzas. Observa-se os valores de  $R_1$  médio = 1,69  $\text{s}^{-1}$ ,  $R_2$  médio = 8,05  $\text{s}^{-1}$  e NOE médio = 0,714  $\text{s}^{-1}$ . Sobre  $^{15}\text{N}$   $R_1$ , observa-se certa variação na região N-terminal. Há um ligeiro aumento nos valores de  $^{15}\text{N}$   $R_2$  principalmente nos resíduos situados no loop entre  $\beta_3$  e  $\alpha$ -hélice, indicando certa mobilidade interna nessa região.

A análise em conjunto de tais parâmetros, permite dizer que, de maneira geral, a proteína é bem estruturada, apresentando valores de parâmetros de relaxação próximos a média. As regiões da proteína que são altamente flexíveis, ou seja, apresentam dinâmica rápida (ps-ns), apresentam altos ou baixos valores de  $R_1$  associados a baixos valores de  $R_2$  e  $\{^1\text{H}\}$ - $^{15}\text{N}$  NOE. Isso indica que tais resíduos podem estar em regime de troca rápida térmica e são indicados pelos resíduos L5 e E14 na Figura 40. Em contraste, os resíduos E19, D22, I26, T51, S58, W59, L69, V74, G77, W78, G81, H98 e K111 apresentaram maiores valores de  $R_2$ , indicando processos de troca conformacional (Figura 41).



**Figura 41: Análise da Dinâmica utilizando  $R_1$ ,  $R_2$  e Noe Heteronuclear.**

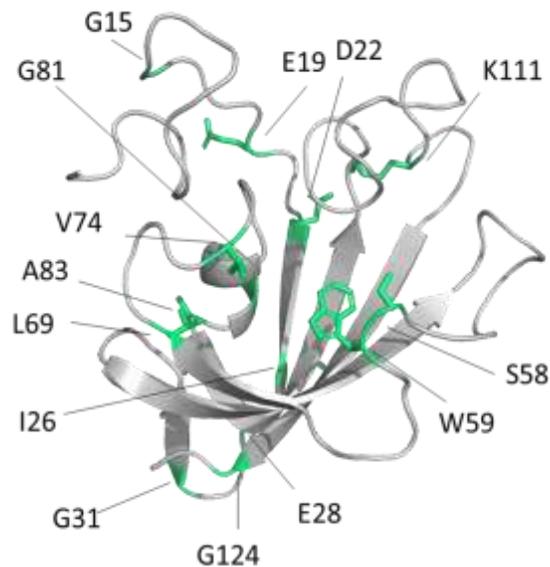
Após a análise combinada das taxas de relaxação, os resíduos altamente flexíveis (ps-ns) foram destacados em amarelo. Estes resíduos L5 e E14 encontram-se presentes exclusivamente na região N-terminal. Os resíduos com altos valores de  $R_2$  (1 ou 2 desvios-padrões acima da média) ( $\mu\text{s}$ -ms) foram destacados em rosa (E19, D22, I26, T51, S58, W59, L69, V74, G77, W78, G81, H98 e K111). Estes resíduos compreendem a região do N-terminal, resíduos preditos de interação com FK506 e o *loop's 100*.



**Figura 42: Parâmetros de relaxação  $^{15}\text{N}$  da cadeia principal**

(A)  $R_2/R_1$ , (B)  $S^2$  e (C)  $K_{\text{ex}}$  da MtFKBP12 em função do número dos resíduos a  $25^\circ\text{C}$ . As barras representam os erros associados a cada medida. A linha tracejada vermelha indica os valores médio de cada parâmetro. Os elementos de estrutura secundária estão indicados na parte superior da figura. As fitas- $\beta$  estão representadas por setas pretas e as hélices  $\alpha$  e  $\pi$  por cilindros cinzas. Os menores valores de  $S^2$  foram observados, principalmente na região N-terminal e no loop 100, indicando menor ordem. Apenas três resíduos foram indicados pelo programa Tensor2 por possuir  $K_{\text{ex}}$  G15, V74 e K111.

A análise da razão  $R_2/R_1$  também é um indicativo de regiões de troca conformacional. Os resíduos G15, E19, D22, I26, E28, G31, S58, W59, L69, V74, G81, A83, K111 e G124 apresentaram razões maiores que a média (Figura 42 e 43). Os resíduos E19, D22, I26, S58, W59, L69, V74, G81 e K111 são apontados em ambas as análises como resíduos envolvidos em troca conformacional.



**Figura 43: Resíduos com valor significativo acima da média de  $R_2/R_1$**

Todos os resíduos com um ou dois desvios-padrões acima da média da razão  $R_2/R_1$  (4,797526) foram destacados em verde. Sugere-se que estes resíduos, que estão de certa forma espalhados pela proteína, mas especificamente nas região N-terminal e no bolsão hidrofóbico, estão em troca conformacional. Movimentos nesta escala de tempo ( $\mu$ s-ms) geralmente descrevem a dinâmica de regiões que estão envolvidas em trabalho biológico

Os dados de relaxação normalmente são interpretados usando o formalismo Modelo Livre de Lipari-Szabo (LIPARI; SZABO, 1982). A dinâmica térmica que ocorre em escala de tempo de ps-ns é analisada pelos parâmetros de ordem ( $S^2$ ) e a dinâmica lenta ( $\mu$ s-ms) pela taxa de troca conformacional ( $R_{ex}$ ) (CLORE et al., 1990). Os valores de  $S^2$  refletem o ângulo do movimento descrito pelo vetor internúcleos, por exemplo as ligações N-H e C-H e variam de 0 a 1, onde 0 reflete completa desordem e 1, completa ordem. Os movimentos mais lentos do que  $\tau_c$  podem ser entendidos como troca conformacional ou equilíbrio entre mais de uma conformação em solução e são entendidos pelo termo de troca cinética ( $R_{ex}$ ) (BLOOM; REEVES; WELLS, 1965; WENNERSTRÖM, 1972).

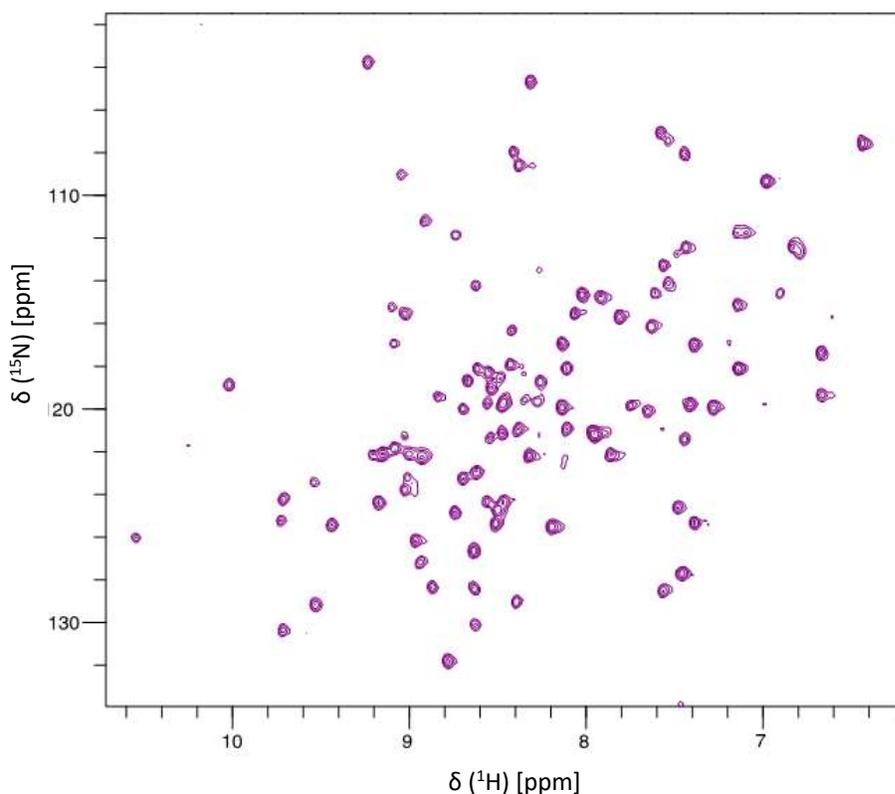
Os resultados do formalismo do modelo-livre de Lipari-Szabo usando o programa Tensor2 são apresentados na Figura 42. O valor de 6,16 nanosegundos para o tempo de correlação isotrópico ( $\tau_c$ ) para a proteína MtFKBP12 está de acordo com o valor esperado para uma proteína

monomérica de 12 kDa. Os parâmetros de dinâmica  $S^2$  e  $K_{ex}$  ( $1/R_{ex}$ ) foram calculados usando o modelo de difusão com simetria axial.

Assim como na análise anterior, os menores valores de  $S^2$  (1 desvio-padrão abaixo da média) foram observados para os resíduos L5, E6, R7, I10, D11, F12, E14, G15 (região N-terminal), S63 (loop  $\beta 2$ - $\beta 3$ ), e R104 (*loop 100's*). Os três resíduos que apresentaram possível  $K_{ex}$  foram G15, V74 e K111.

#### 4.6.3 – TbFKBP12

A proteína FKBP12 de *Trypanosoma brucei* já teve sua estrutura determinada por Aido Machado (2012). Entretanto, uma amostra marcada isotopicamente com  $^{15}\text{N}$  foi produzida para ensaios de ligação e perturbação de deslocamento químico. Dessa maneira, um espectro de  $^{15}\text{N}$ -HSQC foi realizado (Figura 44). O número de picos presente no espectro (107 picos) concorda com o número de aminoácidos na sequência da TbFKBP12.

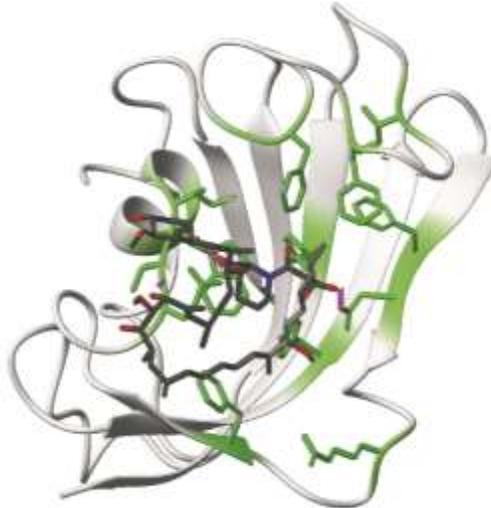


**Figura 44: Espectro  $^{15}\text{N}$  HSQC da proteína TbFKBP12 não assinalado**

Cada pico no espectro se refere aos hidrogênios amídicos (HN) de cada aminoácido da proteína, apresentando um pico para cada resíduo de aminoácido (exceto prolínas) e picos extras de cadeias laterais de asparagina, glutamina, triptofano e arginina.



Tais dados permitem comparar os resultados já obtidos de interação da proteína TbFKPB12 com compostos orgânicos e possíveis novos compostos líderes.



**Figura 46: Estrutura da FBKP12 de *T. brucei* determinada por RMN**

Os resíduos de aminoácidos correspondentes a interação com rapamicina encontram-se destacados (verde) e o composto rapamicina (cinza escuro) encontra-se no sítio ativo desta proteína (AIDO MACHADO, 2012).

#### **4.6.4 – Interação com os Substratos**

##### **4.6.4.1 - Perturbação do Deslocamento Químico**

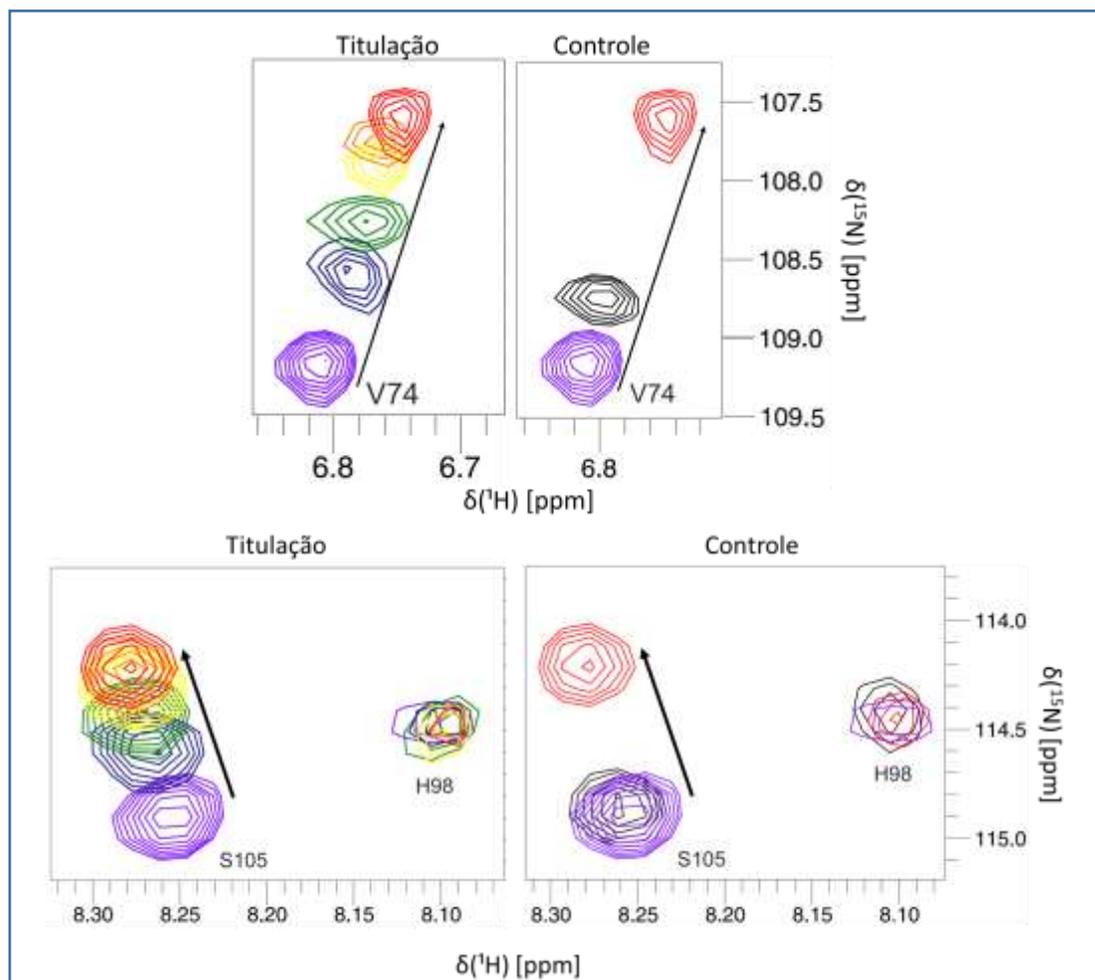
Os resíduos de MtFKBP12 e TbFKBP12 foram mapeados acerca da perturbação do deslocamento químico (CSP) frente a adição dos substratos sALPF $\rho$ NA e sAAPF $\rho$ NA. A medida de CSP é sensível tanto a alterações na estrutura molecular covalente, quanto a interações não-covalentes, como interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. O mapeamento das mudanças nos ambientes químicos dos núcleos fornece informações acerca dos contatos realizados entre a proteína e seus ligantes.

##### **4.6.4.1.1 MtFKBP12**

- N-Succinil-Ala-Leu-Pro-Phe- $\rho$ -nitroanilida

Os estudos de interação da proteína MtFKBP12 na presença do substrato N-Succinil-Ala-Leu-Pro-Phe- $\rho$ -nitroanilida foram realizados e os espectros [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ] HSQC coletados mostram a sobreposição de regiões específicas para a proteína MtFKBP12 na concentração de 100  $\mu\text{M}$  e a titulação do substrato sALPF $\rho$ NA nas concentrações de 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$  e 500  $\mu\text{M}$ . Cada espectro correspondente a uma concentração de substrato foi adquirido e colorido da seguinte forma: roxo – 0  $\mu\text{M}$ , azul – 50  $\mu\text{M}$ , verde – 100  $\mu\text{M}$ , amarelo – 200  $\mu\text{M}$ , laranja – 300  $\mu\text{M}$  e vermelho – 500  $\mu\text{M}$ . Devido a interferência do DMSO 75% utilizado como solvente do substrato no experimento, foi feito um controle para cada volume adicionado. Este valor foi subtraído para obtenção do CSP final e está representado pelo sinal “preto” nas caixas “Controle” (Figura 47).

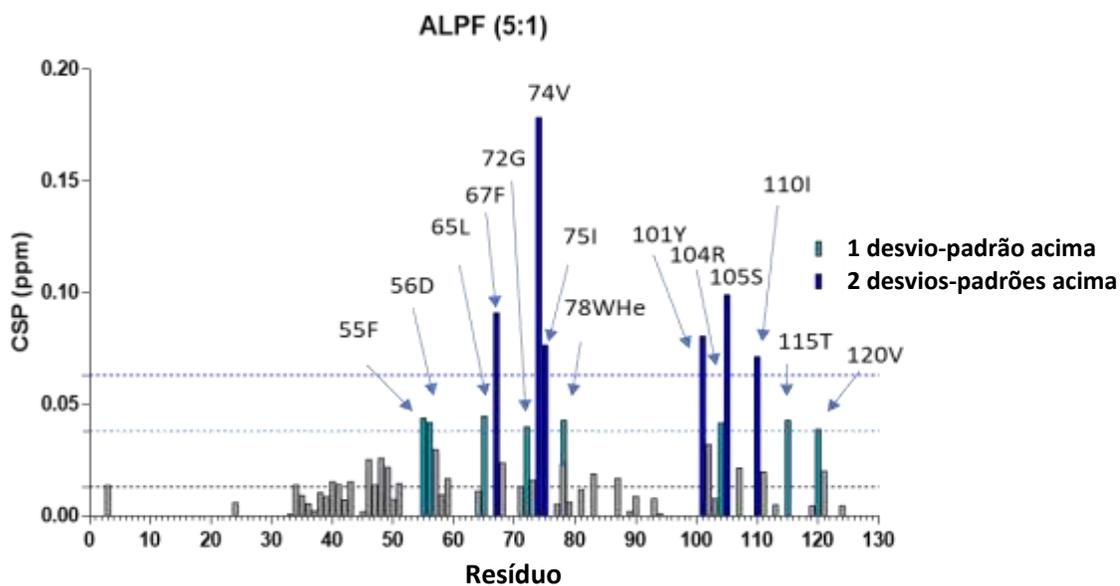
A mudança de deslocamentos químicos de determinados sinais no espectro em função do aumento da concentração de ligante, como observado para os Val74 e Ser105, indica a participação direta ou indireta destes resíduos na interação com o substrato. Ao mesmo tempo, é possível observar os resíduos que não mostram modificação do deslocamento químico, como o resíduo His98.



**Figura 47: Espectros  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC da proteína MtFKBP12 titulada com o substrato sALPFpNA**

É possível identificar os picos referentes aos resíduos destacados modificarem o deslocamento químico de acordo com as concentrações crescentes de substrato. A concentração de proteína MtFKBP12 no ensaio foi  $100\ \mu\text{M}$  e cada cor corresponde a uma concentração específica de ligante: roxo –  $0\ \mu\text{M}$ , azul –  $50\ \mu\text{M}$ , verde –  $100\ \mu\text{M}$ , amarelo –  $200\ \mu\text{M}$ , laranja –  $300\ \mu\text{M}$  e vermelho –  $500\ \mu\text{M}$ . As setas indicam a direção dos picos no espectro em função do aumento da concentração de ligante. Ao lado direito, no quadro “controle”, pode-se observar o controle realizado apenas com DMSO 75% (pico preto) e a comparação com DMSO 75% +  $500\ \mu\text{M}$  sALPFpNA (pico vermelho). O controle foi realizado em cada condição experimental.

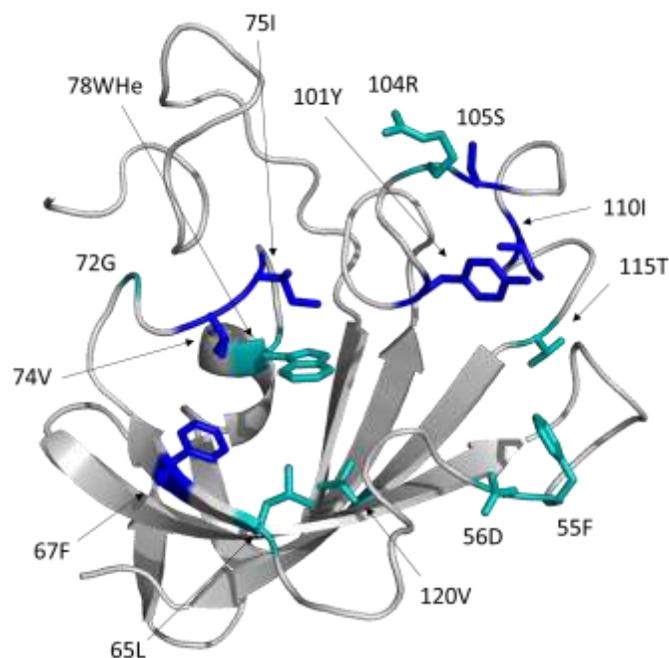
O monitoramento total dos resíduos da proteína livre e ligada pode ser observado através da análise do valor de perturbação do deslocamento químico (CSP). O valor de CSP na última razão molar 5:1 [substrato]/[proteína] pode ser observado na Figura 48. A média foi obtida e o desvio-padrão calculado. Foram destacados os CSP com valores de um desvio-padrão (azul claro) e dois desvios-padrões (azul escuro) acima da média.



**Figura 48: Valores de CSP da MtFKBP12 na presença de sALPF $\rho$ NA**

Este gráfico mostra os valores de CSP na última razão molar 5:1 [substrato]/[proteína]. Os valores de CSP de um desvio-padrão (azul claro) e dois desvios-padrões (azul escuro) acima da média foram destacados. Os resíduos que mostraram valores estatisticamente significativos foram destacados e estão indicados por setas.

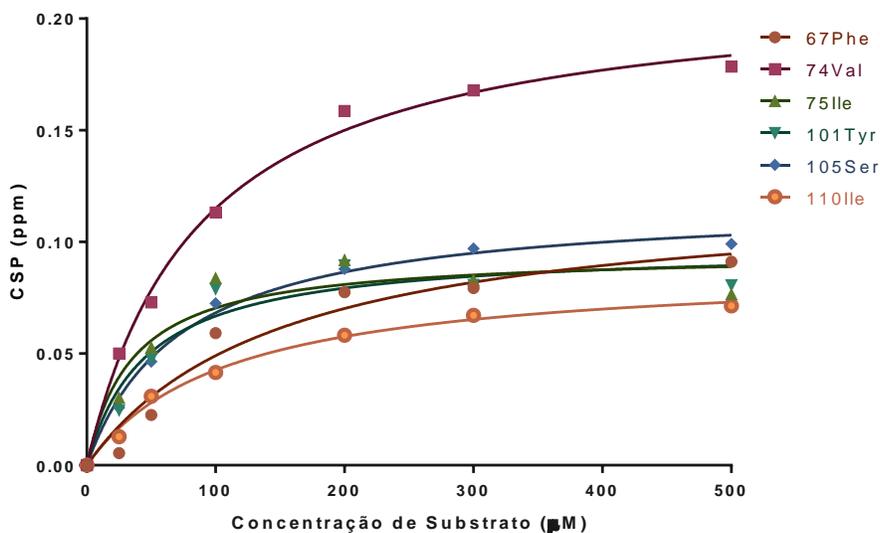
Os resíduos que exibiram valores de perturbação de deslocamento químico (CSPs) estatisticamente significativos foram destacados na estrutura em solução da MtFKBP12 (Figura 49). Os resíduos que exibem valores de CSP superiores a um e dois desvios-padrões da média foram coloridos de azul claro e escuro, respectivamente.



**Figura 49: Resíduos com CSP estatisticamente significativos após adição de sALPF $\rho$ NA**

Os resíduos que exibem valores de CSP superiores a um e dois desvios-padrões da média foram coloridos de azul claro e escuro, respectivamente. É possível observar que as cadeias laterais dos resíduos destacados encontram-se voltadas majoritariamente no bolsão hidrofóbico de ligação da proteína.

Os resíduos com mais de dois desvios-padrões acima da média (F67, V74, I75, Y101, S105 e I110) foram utilizados para o cálculo do  $K_d$  da MtFKBP12-sALPF $\rho$ NA, com valor de  $(20,3 \pm 18,5 \mu\text{M})$ . O ajuste da equação pode ser observado na Figura 50.



**Figura 50: Ajuste dos valores de CSP em função da razão molar substrato:proteína**

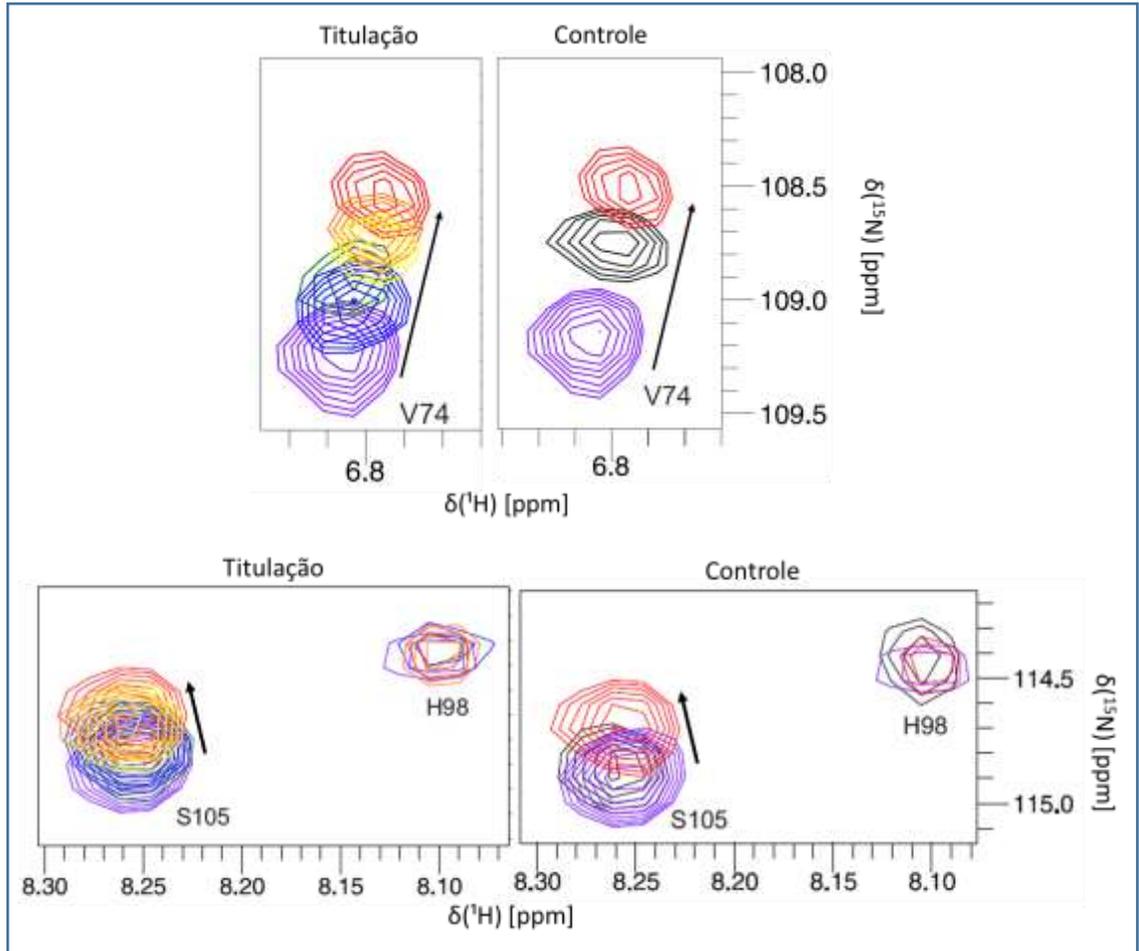
O ajuste de cada resíduo em função da razão molar está representando por uma cor e símbolo a direita. Pode-se notar que a V74 é o resíduo com maior CSP, seguido da S105, F67, Y101, I75 e I110.

Nota-se que os resíduos com maior perturbação de deslocamento químico (CSP) apresentam caráter hidrofóbico ou polar neutro, excetuando D56 e R104.

- N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilida

Os estudos de interação da proteína MtFKBP12 na presença do substrato N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilida foram realizados e os espectros [<sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N] HSQC coletados mostram a sobreposição de regiões específicas para a proteína MtFKBP12 na concentração de 100 μM e a titulação do substrato sAAPF<sub>p</sub>NA nas concentrações de 25 μM, 50 μM, 100 μM, 200 μM, 300 μM e 500 μM. Cada espectro correspondente a uma concentração de substrato foi adquirido e colorido da seguinte forma: roxo – 0 μM, azul – 50 μM, verde – 100 μM, amarelo – 200 μM, laranja – 300 μM e vermelho – 500 μM. Devido a interferência do DMSO 75% utilizado como solvente do substrato no experimento, foi feito um controle para cada volume adicionado. Este valor foi subtraído para obtenção do CSP final e está representado pelo sinal “preto” nas caixas “Controle” (Figura 51).

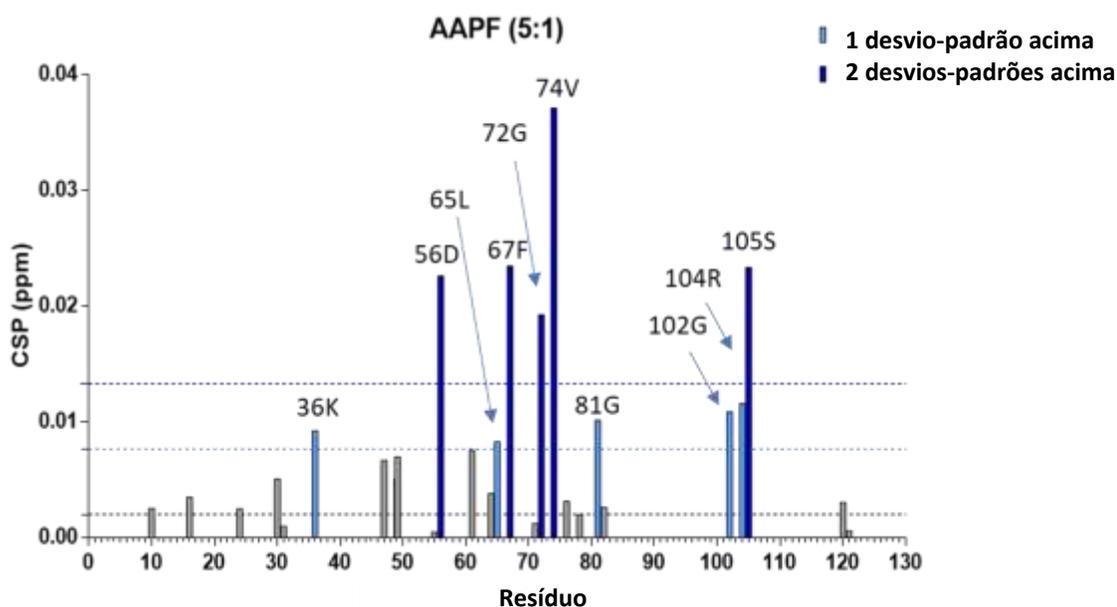
A mudança de deslocamentos químicos de determinados sinais no espectro em função do aumento da concentração de ligante, como observado para os Val74 e Ser105, indica a participação direta ou indireta destes resíduos na interação com o substrato. Ao mesmo tempo, é possível observar os resíduos que não mostram modificação do deslocamento químico, como o resíduo His98.



**Figura 51: Espectros  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC da proteína MtFKBP12 titulada com sAAPFpNA**

É possível identificar os picos referentes aos resíduos destacados modificarem o deslocamento químico de acordo com as concentrações crescentes de substrato. A concentração de proteína MtFKBP12 no ensaio foi  $100\ \mu\text{M}$  e cada cor corresponde a uma concentração específica de ligante: roxo –  $0\ \mu\text{M}$ , azul –  $50\ \mu\text{M}$ , verde –  $100\ \mu\text{M}$ , amarelo –  $200\ \mu\text{M}$ , laranja –  $300\ \mu\text{M}$  e vermelho –  $500\ \mu\text{M}$ . As setas indicam a direção dos picos no espectro em função do aumento da concentração de ligante. Ao lado direito, no quadro “controle”, pode-se observar o controle realizado apenas com DMSO 75% (pico preto) e a comparação com DMSO 75% +  $500\ \mu\text{M}$  sAAPFpNA (pico vermelho). O controle foi realizado em cada condição experimental.

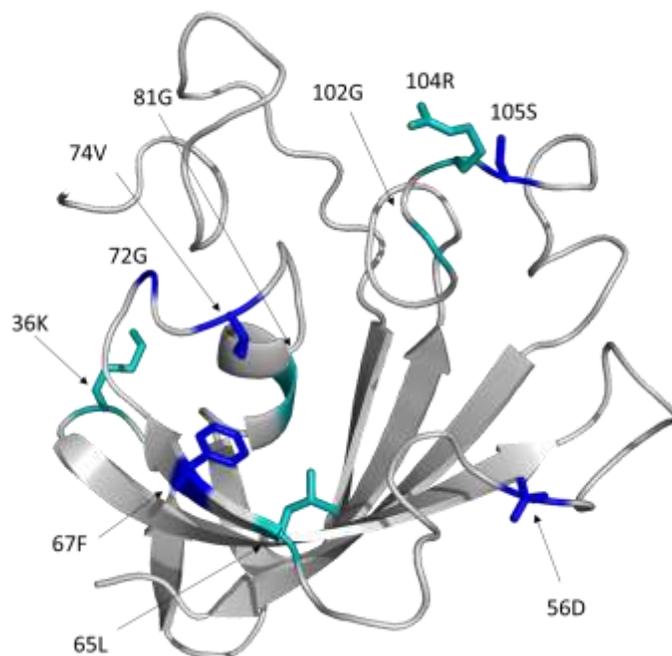
O monitoramento total dos resíduos da proteína livre e ligada pode ser observado através da análise do valor de perturbação do deslocamento químico (CSP). O valor de CSP na última razão molar 5:1 [substrato]/[proteína] pode ser observado na Figura 52. A média foi obtida e o desvio-padrão calculado. Foram destacados os CSP com valores de um desvio-padrão (azul claro) e dois desvios-padrões (azul escuro) acima da média.



**Figura 52: Valores de CSP da MtFKBP12 na presença de sAAPFρNA**

Este gráfico mostra os valores de CSP na última razão molar 5:1 [substrato]/[proteína]. Os valores de CSP de um desvio-padrão (azul claro) e dois desvios-padrões (azul escuro) acima da média foram destacados. Os resíduos que mostraram valores estatisticamente significativos foram destacados e estão indicados por setas.

Os resíduos que exibiram valores de perturbação de deslocamento químico (CSPs) estatisticamente significativos foram destacados na estrutura em solução da MtFKBP12 (Figura 53). Os resíduos que exibem valores de CSP superiores a um e dois desvios-padrões da média foram coloridos de azul claro e escuro, respectivamente.

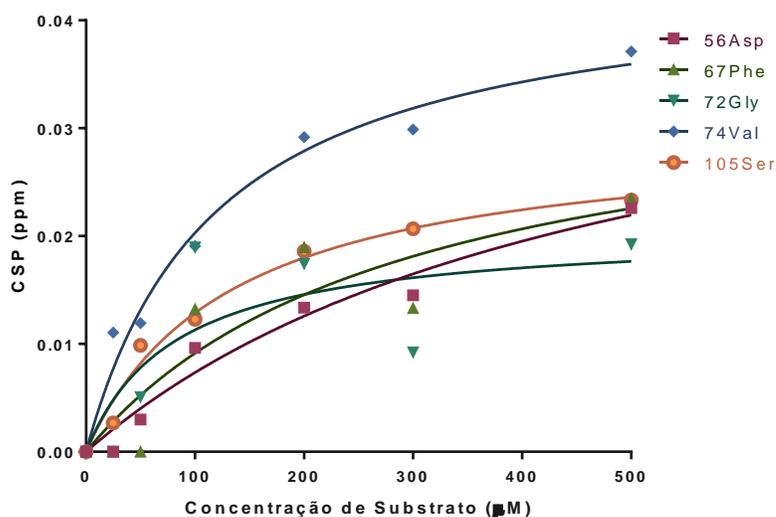


**Figura 53: Resíduos com CSP estatisticamente significativos após adição de sAAPF $\rho$ NA**

Os resíduos que exibem valores de CSP superiores a um e dois desvios-padrões da média foram coloridos de azul claro e escuro, respectivamente. É possível observar que as cadeias laterais dos resíduos destacados encontram-se voltadas majoritariamente no bolsão hidrofóbico de ligação da proteína.

Os resíduos com mais de dois desvios-padrões acima da média foram utilizados para cálculo do  $K_d$  MtFKBP12-sAAPF $\rho$ NA, com valor de  $(101,4 \pm 98,7 \mu\text{M})$ . Nota-se que os resíduos com maior perturbação de deslocamento químico (CSP) apresentam caráter hidrofóbico ou polar neutro, principalmente para aqueles com valores de dois desvios-padrões acima da média, com exceção do D56. Além disso, o resíduo K36 é reportado como mais um resíduo polar, além do R104, participando na ligação ao substrato. É possível que esses resíduos colaborem para o maior  $K_d$  observado nesta condição.

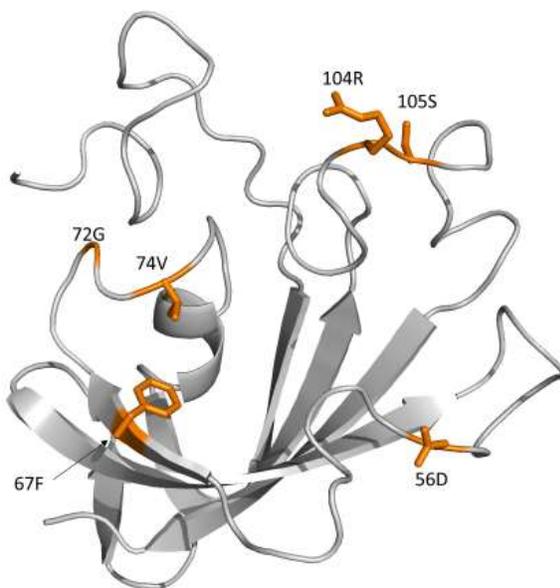
O ajuste da equação pode ser observado na figura 54.



**Figura 54: Ajuste dos valores de CSP em função da razão molar substrato:proteína**

O ajuste de cada resíduo em função da razão molar está representando por uma cor e símbolo a direita. O resíduo V74 apresenta maior CSP, seguido da F67 e S105, D56 e G72.

Pode-se notar que, em ambos os casos a V74, F67 e S105 apresentaram os maiores valores de CSP. Apesar disso, a comparação de valores de CSP e  $K_d$  entre os substratos mostra maior preferência pelo substrato sALPF $\rho$ NA. Os resíduos que apresentaram CSP estatisticamente significativo em ambos os substratos foram destacados em amarelo na figura 55.



**Figura 55: Resíduos que apresentaram CSP significativo em ambos os substratos, sALPF $\rho$ NA e sAAPF $\rho$ NA**

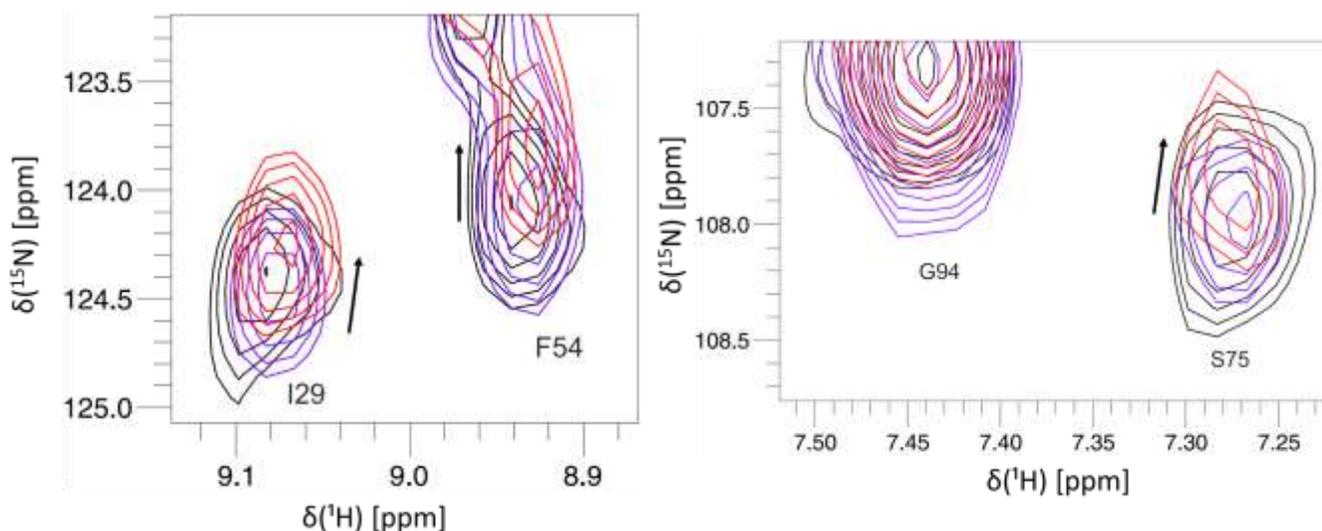
Pode-se inferir que estes resíduos D56, F67, G72, V74, R104 e S105 estariam participando direta ou indiretamente na ligação de ambos os substratos.

#### 4.6.4.1.2 TbFKBP12

- N-Succinil-Ala-Leu-Pro-Phe- $\rho$ -nitroanilida

Os estudos de interação da proteína TbFKBP12 na presença do substrato N-Succinil-Ala-Leu-Pro-Phe- $\rho$ -nitroanilida foram realizados e os espectros [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ] HSQC coletados mostram a sobreposição de regiões específicas para a proteína TbFKBP12 na concentração de 50  $\mu\text{M}$  e a adição do substrato sALPF $\rho$ NA na concentração de 200  $\mu\text{M}$ . Os espectros na ausência e presença do substrato foram adquiridos e coloridos da seguinte forma: roxo – 0  $\mu\text{M}$  e vermelho – 200  $\mu\text{M}$ . Devido a interferência do DMSO 75% utilizado como solvente do substrato no experimento, foi feito um controle para o volume adicionado. Este valor foi subtraído para obtenção do CSP final e está representado pelo pico na cor “preto” (Figura 56).

A mudança de deslocamentos químicos de determinados sinais no espectro na presença do ligante, como observado para os I29 e S75, indica a participação direta ou indireta destes resíduos na interação com o substrato. Ao mesmo tempo, é possível observar os resíduos que não mostram modificação do deslocamento químico, como o resíduo G94.

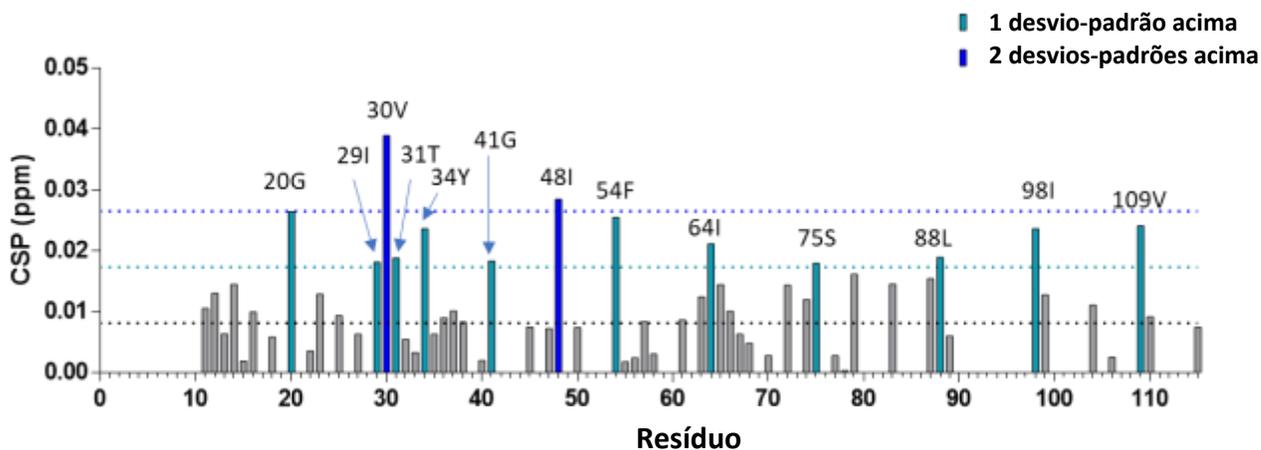


**Figura 56: Espectros  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC da proteína TbFKBP12 após adição de sALPF $\rho$ NA**

É possível identificar os picos referentes aos resíduos destacados modificarem o deslocamento químico com a adição do substrato. A concentração de proteína TbFKBP12 no ensaio foi 50  $\mu\text{M}$  e cada cor corresponde a uma concentração específica de ligante: roxo – 0  $\mu\text{M}$  e vermelho – 200  $\mu\text{M}$ . As setas indicam a direção dos picos no espectro em função do aumento da concentração de ligante. O controle realizado com DMSO 75% está representado pelo pico na cor preta.

O monitoramento total dos resíduos da proteína livre e ligada pode ser observado através da análise do valor de perturbação do deslocamento químico (CSP). O valor de CSP na razão molar 4:1 [substrato]/[proteína] pode ser observado na Figura 57. A média foi obtida e o desvio-padrão

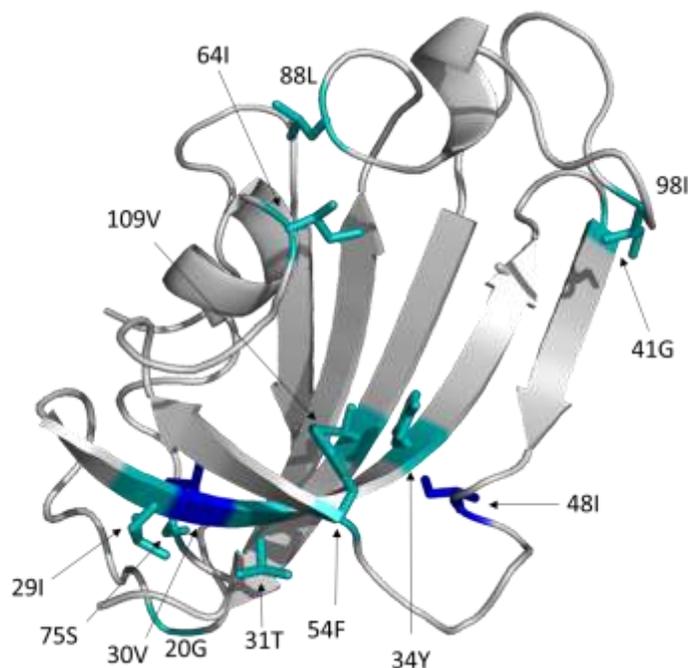
calculado. Foram destacados os CSP com valores de um desvio-padrão (azul claro) e dois desvios-padrões (azul escuro) acima da média.



**Figura 57: Valores de CSP da TbFKBP12 na presença de sALPFρNA**

Este gráfico mostra os valores de CSP na última razão molar 4:1 [substrato]/[proteína]. Os valores de CSP de um desvio-padrão (azul claro) e dois desvios-padrões (azul escuro) acima da média foram destacados. Os resíduos que mostraram valores estatisticamente significativos foram destacados e estão indicados por setas.

Os resíduos que exibiram valores de perturbação de deslocamento químico (CSPs) estatisticamente significativos foram destacados na estrutura em solução da TbFKBP12 (Figura 58). Os resíduos que exibem valores de CSP superiores a um e dois desvios-padrões da média foram coloridos de azul claro e escuro, respectivamente.



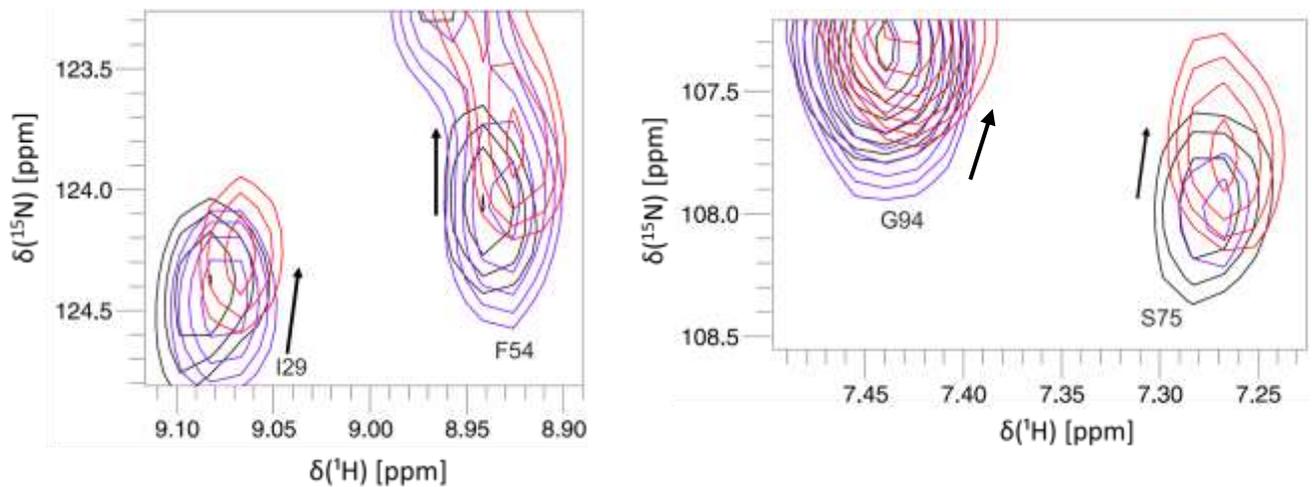
**Figura 58: Resíduos com CSP estatisticamente significativos após adição de sALPF $\rho$ NA**

Os resíduos que exibem valores de CSP superiores a um e dois desvios-padrões da média foram coloridos de azul claro e escuro, respectivamente. É possível observar que as cadeias laterais dos resíduos destacados se encontram voltadas majoritariamente no bolsão hidrofóbico de ligação da proteína.

#### - N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe- $\rho$ -nitroanilida

Os estudos de interação da proteína TbFKBP12 na presença do substrato N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe- $\rho$ -nitroanilida foram realizados e os espectros [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ] HSQC coletados mostram a sobreposição de regiões específicas para a proteína TbFKBP12 na concentração de 50  $\mu\text{M}$  e a adição do substrato sAAPF $\rho$ NA na concentração de 200  $\mu\text{M}$ . Os espectros na ausência e presença do substrato foram adquiridos e coloridos da seguinte forma: roxo – 0  $\mu\text{M}$  e vermelho – 200  $\mu\text{M}$ . Devido a interferência do DMSO 75% utilizado como solvente do substrato no experimento, foi feito um controle para o volume adicionado. Este valor foi subtraído para obtenção do CSP final e está representado pelo pico na cor “preto” (Figura 59).

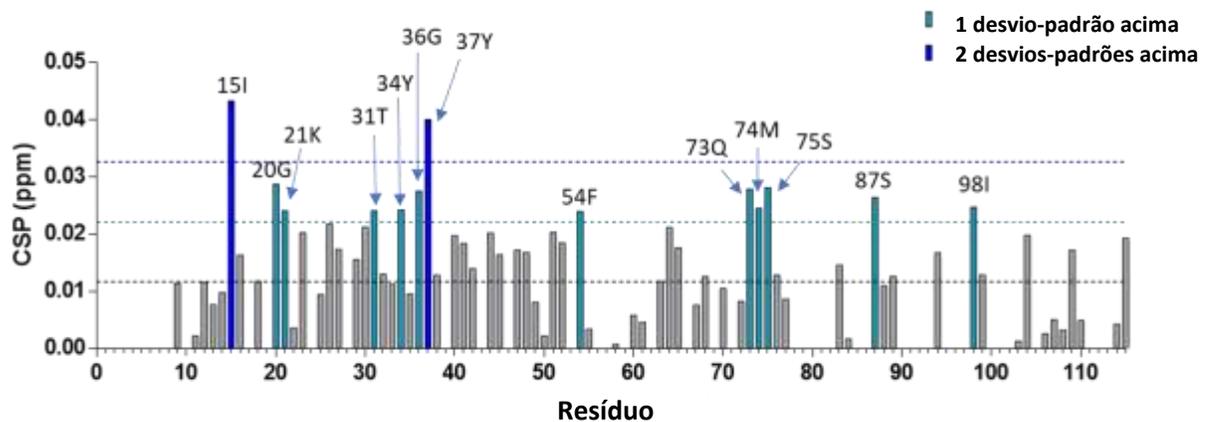
A mudança de deslocamentos químicos de determinados sinais no espectro na presença do ligante, como observado para os I29 e S75, indica a participação direta ou indireta destes resíduos na interação com o substrato.



**Figura 59: Espectros  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC da proteína TbFKBP12 após adição de sAAPF $\rho$ NA**

É possível identificar os picos referentes aos resíduos destacados modificarem o deslocamento químico com a adição do substrato. A concentração de proteína TbFKBP12 no ensaio foi 50  $\mu\text{M}$  e cada cor corresponde a uma concentração específica de ligante: roxo – 0  $\mu\text{M}$  e vermelho – 200  $\mu\text{M}$ . As setas indicam a direção dos picos no espectro em função do aumento da concentração de ligante. O controle realizado com DMSO 75% está representado pelo pico na cor preta.

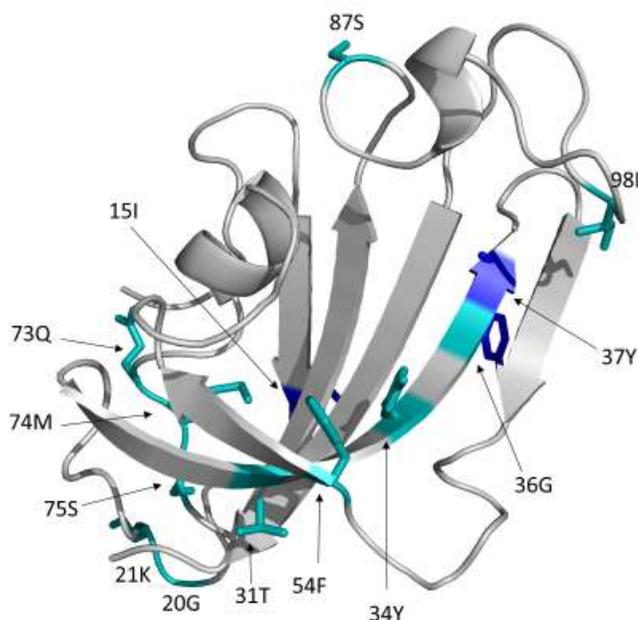
O monitoramento total dos resíduos da proteína livre e ligada pode ser observado através da análise do valor de perturbação do deslocamento químico (CSP). O valor de CSP na razão molar 4:1 [substrato]/[proteína] pode ser observado na Figura 60. A média foi obtida e o desvio-padrão calculado. Foram destacados os CSP com valores de um desvio-padrão (azul claro) e dois desvios-padrões (azul escuro) acima da média.



**Figura 60: Valores de CSP de sAAPF $\rho$ NA na razão molar 4:1**

Este gráfico mostra os valores de CSP na última razão molar 4:1 [substrato]/[proteína]. Os valores de CSP de um desvio-padrão (azul claro) e dois desvios-padrões (azul escuro) acima da média foram destacados. Os resíduos que mostraram valores estatisticamente significativos foram destacados e estão indicados por setas.

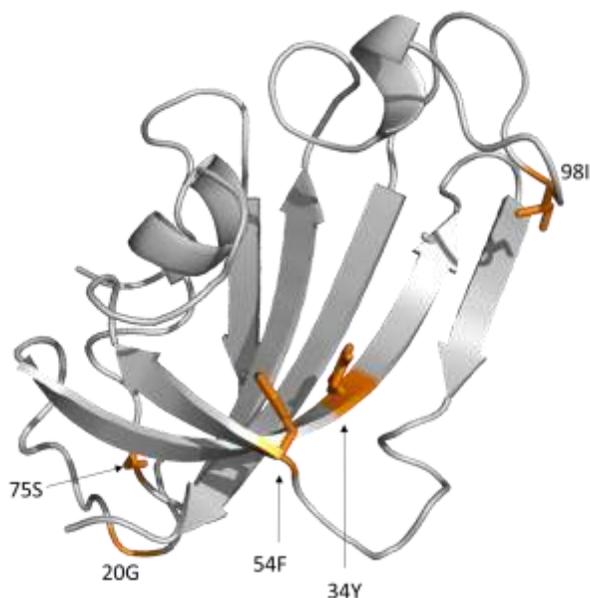
Os resíduos que exibiram valores de perturbação de deslocamento químico (CSPs) estatisticamente significativos foram destacados na estrutura em solução da TbFKBP12 (Figura 61). Os resíduos que exibem valores de CSP superiores a um e dois desvios-padrões da média foram coloridos de azul claro e escuro, respectivamente.



**Figura 61: Resíduos com CSP estatisticamente significativos após adição de sAAPF $\rho$ NA**

Os resíduos que exibem valores de CSP superiores a um e dois desvios-padrões da média foram coloridos de azul claro e escuro, respectivamente. É possível observar que as cadeias laterais dos resíduos destacados encontram-se voltadas majoritariamente no bolsão hidrofóbico de ligação da proteína.

Os resíduos que apresentaram CSP estatisticamente significativo em ambos os substratos foram destacados em amarelo na Figura 62. Nota-se que estes resíduos também apresentam caráter hidrofóbico ou polar neutro. Além disso, é possível identificar que a proteína TbFKBP12 apresenta valores de CSPs semelhantes para ambos os substratos e que também se assemelham aos valores observados para o substrato sAAPF $\rho$ NA no caso da proteína MtFKBP12.



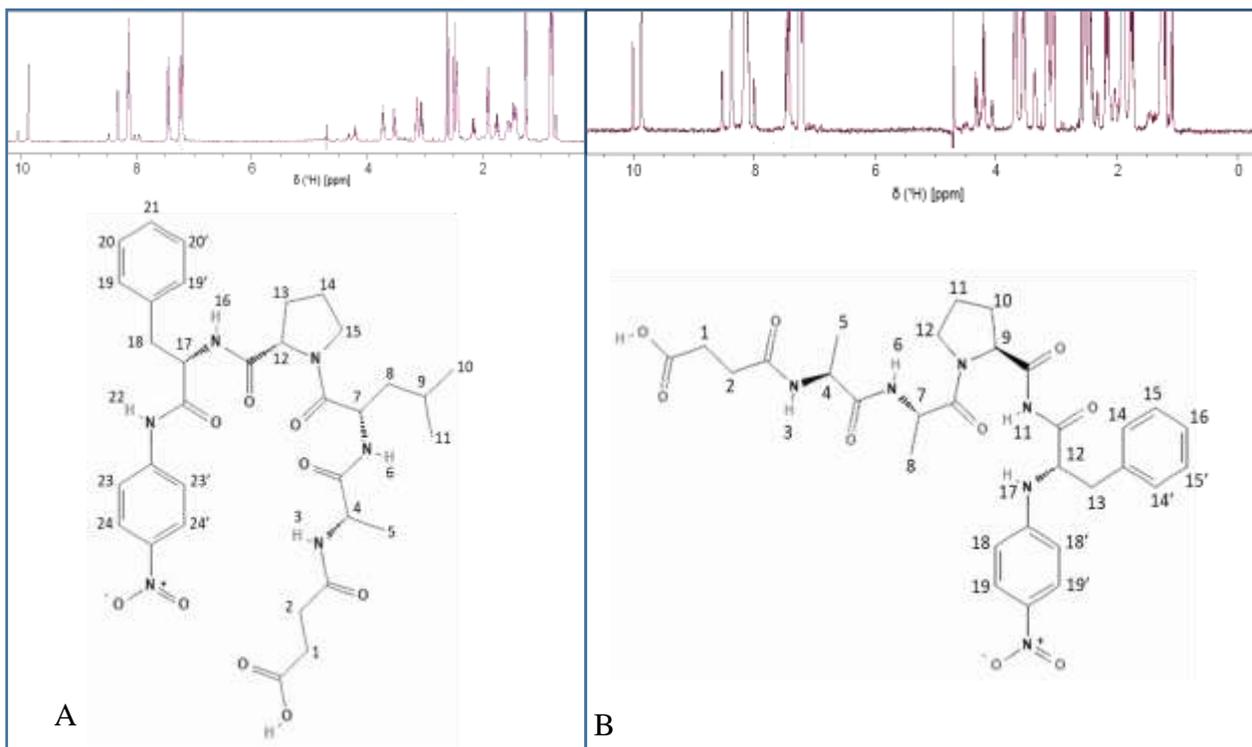
**Figura 62: Resíduos que apresentaram CSP significativo em ambos os substratos, sALPF $\rho$ NA e sAAPF $\rho$ NA**  
 Pode-se inferir que estes resíduos G20, Y34, F54, S75 e I98 estariam participando direta ou indiretamente na ligação de ambos os substratos.

#### 4.6.4.2 Transferência de Saturação

A transferência de saturação permite avaliar, em relação ao substrato, quais átomos teriam maior papel na interação com a proteína de interesse. Aqueles que obtiverem maior transferência de magnetização via saturação da proteína estariam mais intimamente associados a esta e, dessa forma, pode-se identificar de maneira mais meticulosa sua ligação. Tais ensaios foram realizados apenas com a proteína MtFKBP12 na concentração de 20  $\mu$ M.

Os ensaios foram realizados com cinco tempos de saturação (0,5, 1, 2, 3 e 4 segundos), visando observar o aumento da transferência de saturação proteína-ligante, e em regiões do espectro 1D  $^1$ H-NMR contendo apenas sinal referente a proteína, para que não houvesse saturação direta do ligante.

Experimentos bidimensionais de TOCSY foram realizados para permitir a identificação, ou seja, o assinalamento dos sinais no espectro unidimensional que correspondem aos átomos dos substratos N-Succinil-Ala-Leu-Pro-Phe- $\rho$ -nitroanilida e N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe- $\rho$ -nitroanilida. Os átomos dos substratos foram numerados como pode ser observado na figura 63.

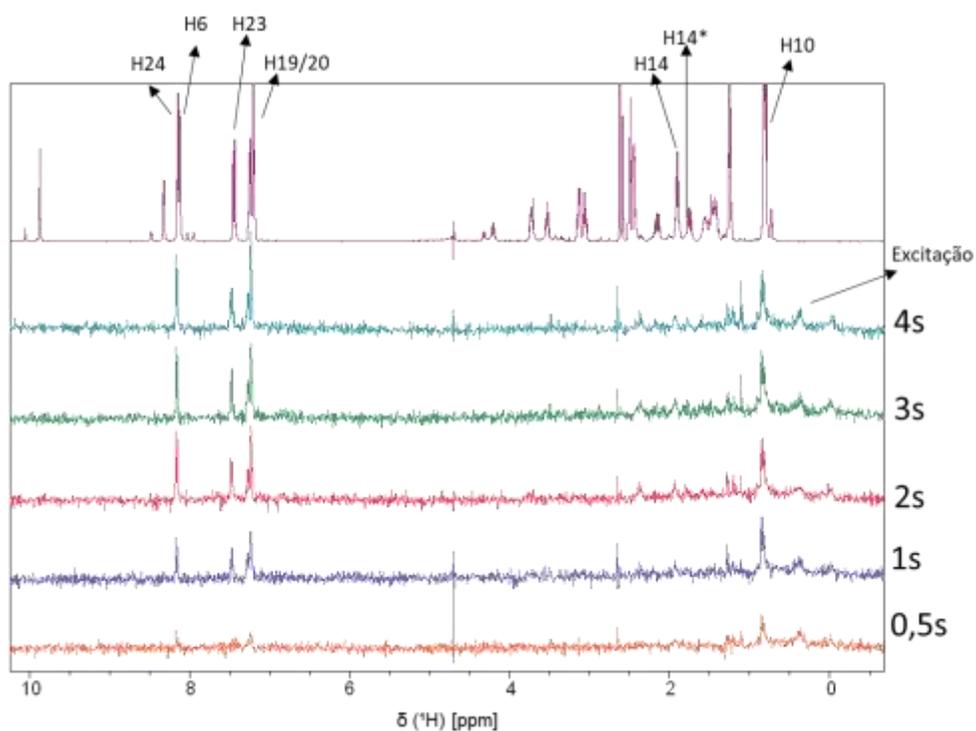


**Figura 63: Substratos utilizados nos ensaios de transferência de saturação**

Em A, a estrutura química de N-Succinil-Ala-Leu-Pro-Phe- $\rho$ -nitroanilida e, em B, a estrutura química de N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe- $\rho$ -nitroanilida. Os átomos de hidrogênio foram numerados para facilitar a compreensão dos resultados. Acima de cada estrutura, pode-se observar o espectro unidimensional  $^1\text{H-NMR}$  que foi utilizado para o assinalamento de cada composto.

- N-Succinil-Ala-Leu-Pro-Phe- $\rho$ -nitroanilida

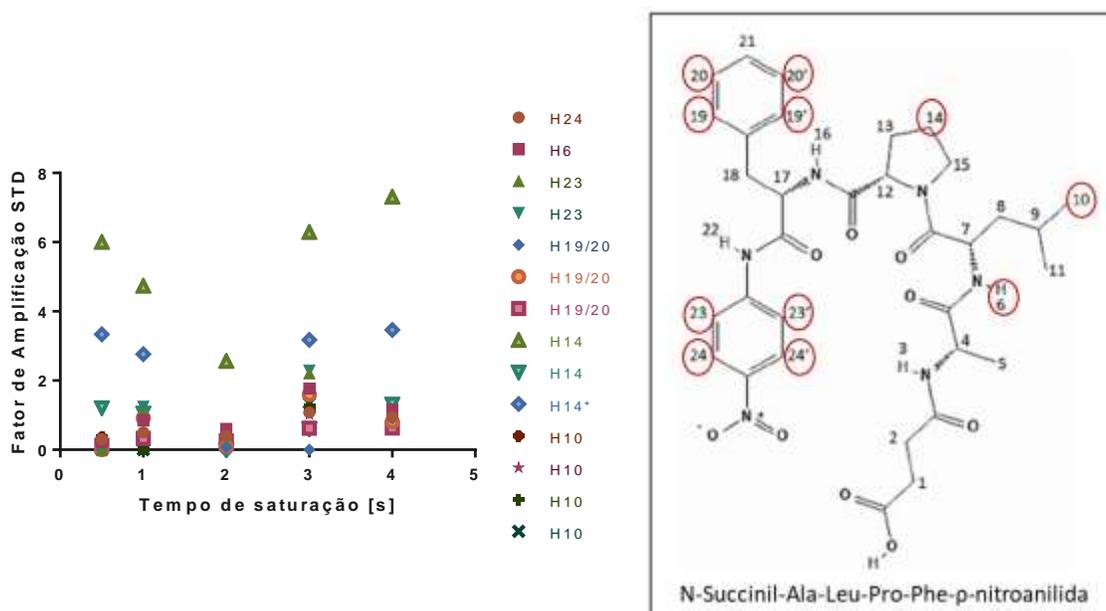
Os ensaios de transferência de saturação deste substrato foram realizados com excitação nas seguintes frequências: 186,577, 3404,599, -222,101 e 3883,878 Hz ( $I_{\text{SAT}}$ ). Os espectros obtidos foram subtraídos do espectro *off-resonance*, excitado em -6000 Hz ( $I_0$ ). Como exemplo, a Figura 64 apresenta o espectro de diferença da frequência de excitação 186,577 Hz.



**Figura 64: Espectro de STD do peptídeo sALPFpNA ligado a proteína MtFKBP12 com saturação em 186,577 Hz**

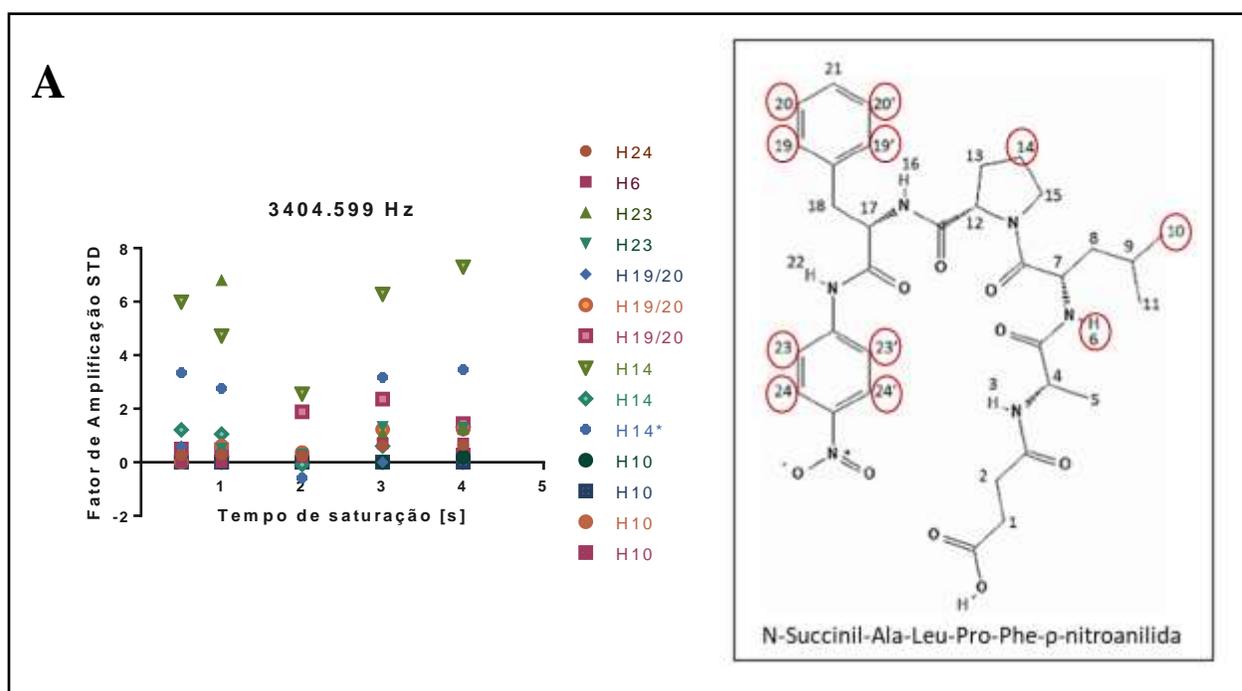
Pode-se identificar os espectros de diferença nos 5 diferentes tempos de saturação, indicados à direita. Os sinais de hidrogênio que sofreram modificação devido a transferência de saturação aparecem em tais espectros e estão indicados por setas na parte superior da figura.

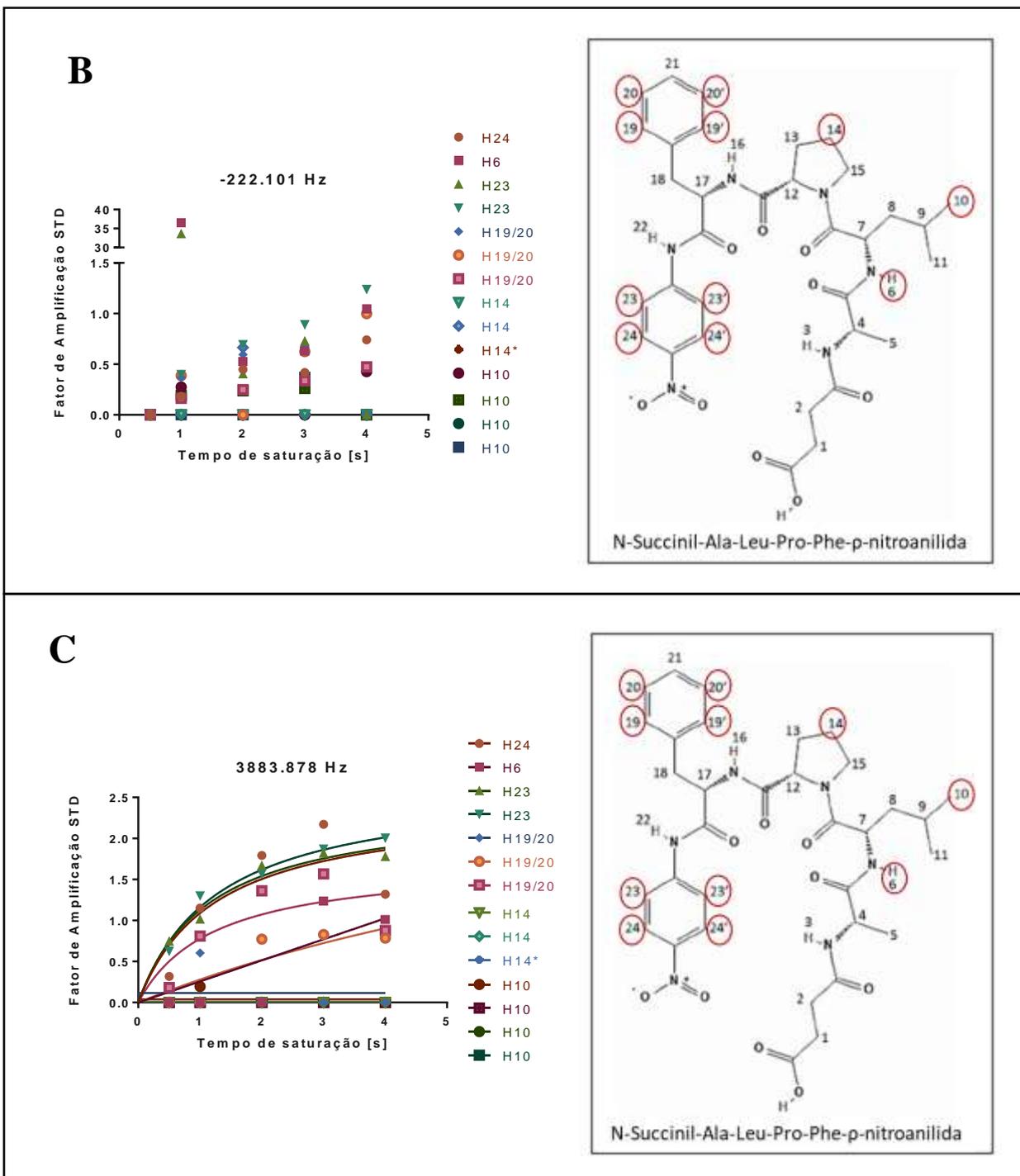
Os valores do fator de amplificação de STD ( $A_{STD}$ ) de cada um dos picos destacados acima podem ser observados na figura 65.



**Figura 65:** Fator de amplificação de STD do peptídeo sALPFpNA ligado a proteína MtFKBP12 (186,577 Hz) Os valores de  $A_{STD}$  foram plotados em função do tempo de saturação de cada experimento. Cada átomo de hidrogênio envolvido na transferência de saturação foi destacado com um círculo vermelho na estrutura química representada à direita.

Para as demais frequências de saturação, serão apresentados apenas o fator de amplificação STD (Figura 66).



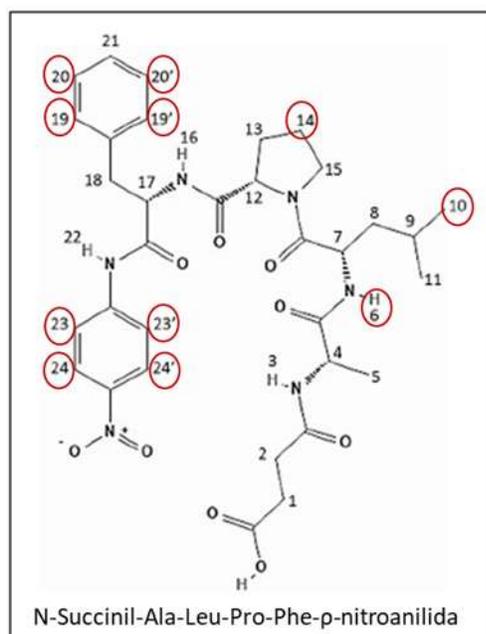


**Figura 66: Fatores de amplificação de STD do peptídeo sALPF $\rho$ NA ligado a proteína MtFKBP12**

Os valores de  $A_{STD}$  foram plotados para cada frequência de excitação ((A)3404,599, (B) -222,101, (C) 3883,878 Hz) em função do tempo de saturação de cada experimento. Cada átomo de hidrogênio envolvido na transferência de saturação foi destacado com um círculo vermelho nas estruturas químicas representadas à direita.

Podemos observar que o Fator de Amplificação STD, que deveria aumentar de acordo com o tempo de saturação, não obedece a tal regime. Isto ocorre, muito provavelmente, pela dinâmica de ligação entre a proteína e esse substrato, que demonstrou ter maior afinidade à MtFKBP12. Os ensaios de STD se ajustam melhor a ligantes com baixa afinidade (VIEGAS et al., 2011).

Entretanto, de maneira qualitativa, pode-se observar que em todas as frequências de saturação houve transferência para os hidrogênios: H6 (amídico) e H10 (H $\delta$ a), pertencentes a Leu2, H14 (H $\gamma$ ), pertencente a Pro3, H19 e H20 (H $\delta$  e H $\epsilon$ ), pertencentes a Phe4, e H23 e H24, componentes da pNA (Figura 67).

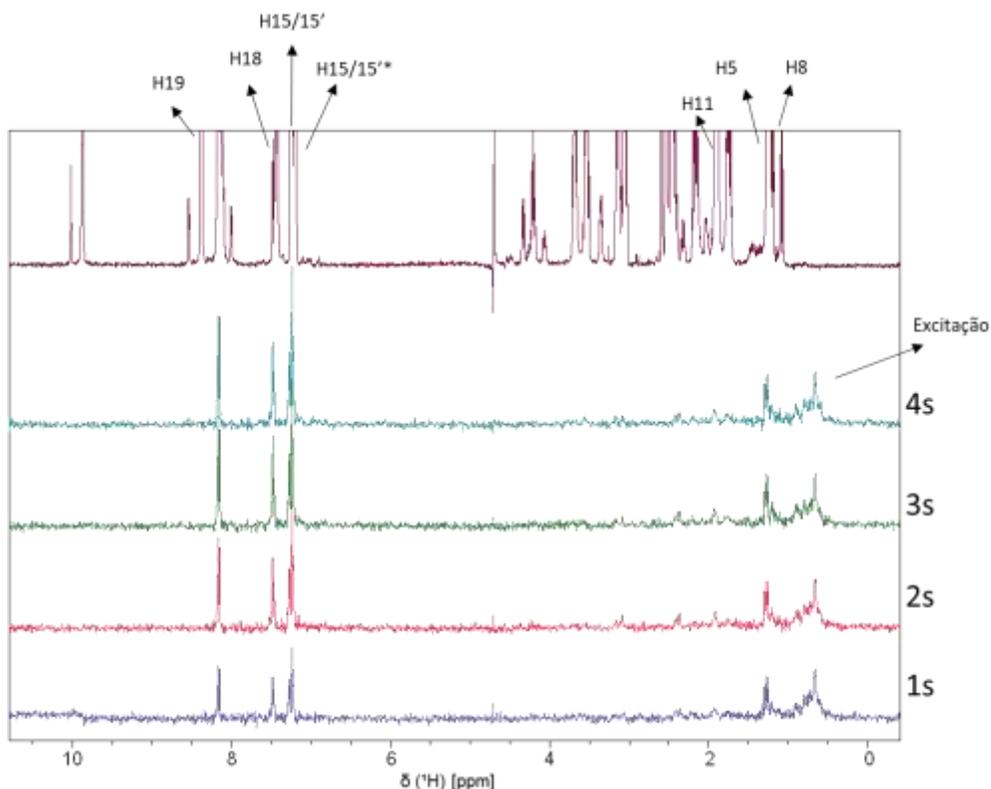


**Figura 67: Átomos de hidrogênio da sALPF $\rho$ NA que receberam transferência de saturação**

A estrutura química do substrato sALPF $\rho$ NA mostra os átomos que sofreram transferência de saturação em todas as frequências utilizadas (círculo vermelho), indicando maior interação com a proteína. Os átomos são: HN e H $\delta$ a da L2, H $\gamma$  da P3, H $\delta$  e H $\epsilon$  da F4 e hidrogênios componentes do anel pNA.

- N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida

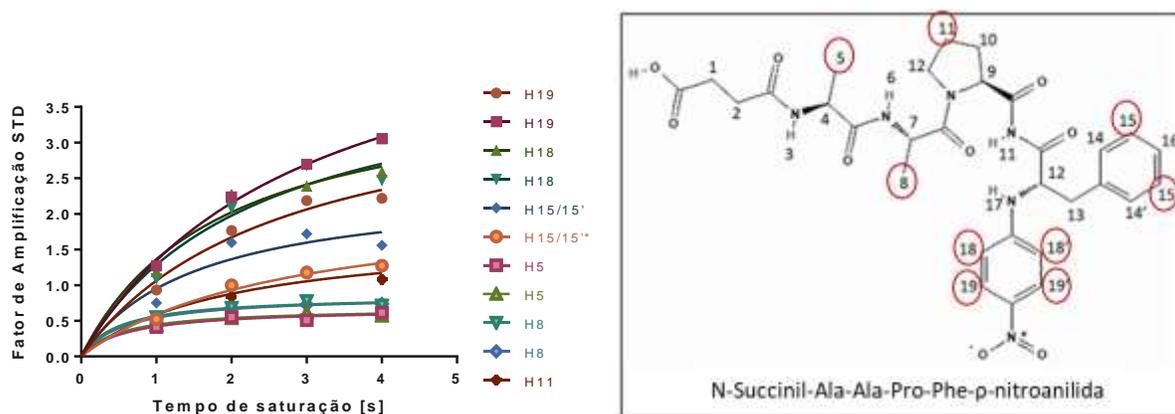
Os ensaios de transferência de saturação deste substrato foram realizados com excitação nas seguintes frequências: 325,937, 3404,599, -191,1758 e 3882,0791 Hz ( $I_{SAT}$ ), e os espectros obtidos também que foram subtraídos do espectro *off-resonance*, excitado em -6000 Hz ( $I_0$ ). Como exemplo, a Figura 67 apresenta o espectro de diferença da frequência de excitação 325,937 Hz.



**Figura 68: Espectro de STD do peptídeo sAAPFpNA ligado a proteína MtFKBP12 com saturação em 325,937 Hz**

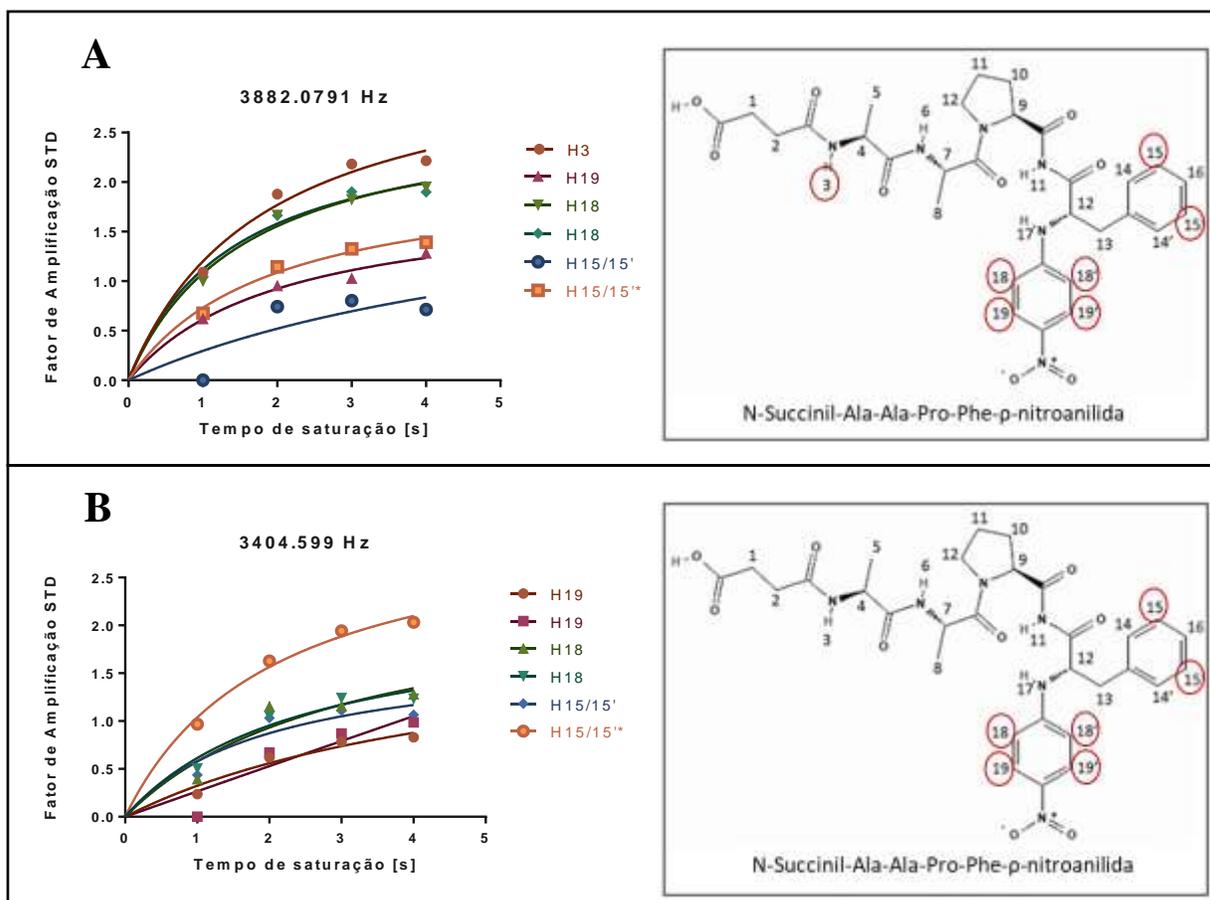
Pode-se identificar os espectros de diferença nos 4 diferentes tempos de saturação, indicados à direita. Os sinais de hidrogênio que sofreram modificação devido a transferência de saturação aparecem em tais espectros e estão indicados por setas na parte superior da figura.

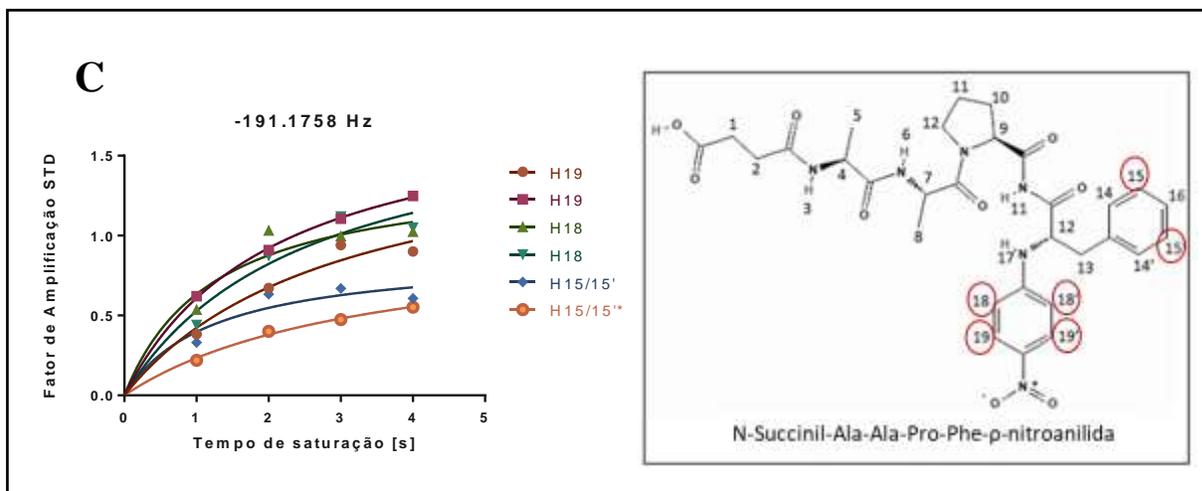
Os valores de  $A_{STD}$  de cada um dos picos destacados acima podem ser observados na Figura 68.



**Figura 69: Fator de amplificação de STD do peptídeo sAAPf $\rho$ NA ligado a proteína M $\rho$ FKBP12 (325,937 Hz)**  
 Os valores de  $A_{STD}$  foram plotados em função do tempo de saturação de cada experimento. Cada átomo de hidrogênio envolvido na transferência de saturação foi destacado com um círculo vermelho na estrutura química representada à direita.

Para as demais frequências de saturação, serão apresentados apenas o fator de amplificação STD (Figura 70).



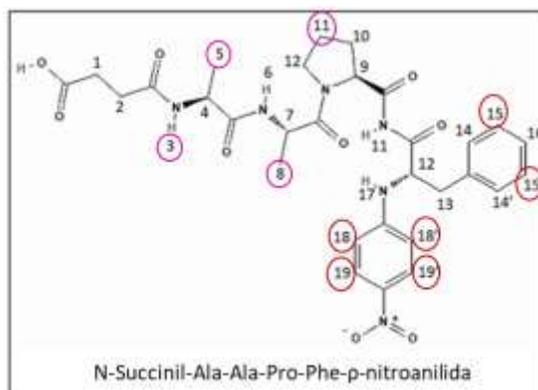


**Figura 70: Fatores de amplificação de STD do peptídeo sAAPFpNA ligado a proteína MtFKBP12**

Os valores de  $A_{STD}$  foram plotados para cada frequência de excitação ((A) 3882,0791, (B) 3404,599, (C) -191,1758 Hz) em função do tempo de saturação de cada experimento. Cada átomo de hidrogênio envolvido na transferência de saturação foi destacado com um círculo vermelho nas estruturas químicas representadas à direita.

Neste caso, pode-se observar que o Fator de Amplificação STD aumenta de acordo com o aumento do tempo de saturação até atingir um platô, diferentemente do observado para o substrato anterior. Isto ocorre, muito provavelmente, pela menor afinidade do ligante com a proteína MtFKBP12.

Apenas os hidrogênios H15 (H $\epsilon$ ) da Phe4 e H18 e H19 do pNA receberam transferência de saturação em todas as frequências utilizadas. Entretanto, o H3 (HN) e H5 (H $\beta$ ) da Ala1, H8 (H $\beta$ ) da Ala2 e H11 (H $\gamma$ ) da Pro3 também foram magnetizados em pelo menos uma das frequências de saturação (Figura 70).



**Figura 71: Átomos de hidrogênio da sAAPFpNA que recebem transferência de saturação**

A estrutura química do substrato sAAPFpNA mostra os átomos que sofreram transferência de saturação em todas as frequências utilizadas (círculo vermelho), indicando maior interação com a proteína. Os átomos são H $\epsilon$  da F4 e hidrogênios componentes do anel pNA. Os átomos que sofreram transferência de saturação em apenas uma frequência estão destacados pelo círculo roxo. Os átomos são: HN e H $\beta$  da A1, H $\beta$  da A2 e H $\gamma$  da P3.

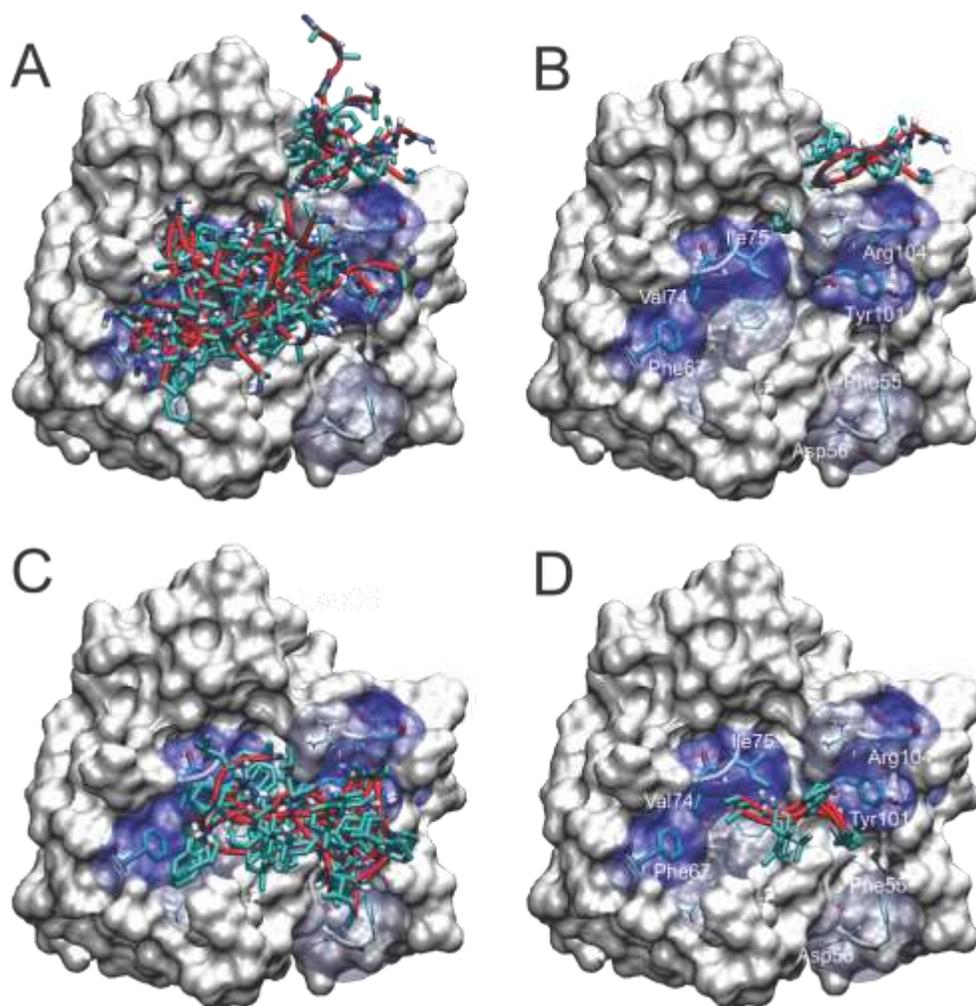
#### 4.6.5 – *Docking* Molecular Dirigido

Uma etapa de *Docking* molecular preliminar foi realizada para avaliarmos a região de interação dos substratos sALPF<sub>p</sub>NA e sAAPF<sub>p</sub>NA na estrutura em solução da proteína MtFKBP12. Para isto, o servidor HADDOCK 2.2 foi utilizado e os parâmetros de entrada para o modelo foram os resultados obtidos de determinação estrutural da MtFKBP12, perturbação do deslocamento químico e transferência de saturação.

Devemos considerar que os substratos peptídicos não possuem estrutura determinada para esta interação e que a estrutura de um peptídeo com 4 resíduos de aminoácidos, contendo um resíduo de Prolina central provavelmente não apresenta uma única conformação preferencial.

Assim utilizamos o CNS\_Solve para produzir e minimizar um conjunto de estruturas para os substratos (sem as modificações N e C-terminal) e escolhemos a estrutura de menor energia para analisar uma etapa preliminar de *docking*.

A figura 73 representa os clusters de menor energia para a MtFKBP12 na presença de sALPF<sub>p</sub>NA e sAAPF<sub>p</sub>NA.



**Figura 72: Docking molecular dirigido realizado para a interação da MtFKBP12 com os substratos sALPFpNA e sAAPFpNA.**

A superfície da proteína mtFKBP12 está representada em branco. Os resíduos mapeados nos experimentos de CSP estão representados na forma de bastões coloridos de acordo com o átomo. Os resíduos que apresentaram CSP de até 2SD acima da média foram marcados em azul escuro e até 1SD foram marcados em azul claro, ambos representados por bastões finos. Os peptídeos foram representados em *cartoon* vermelho com as cadeias laterais representadas por bastões coloridos de acordo com o tipo de átomo. Em (A), podemos visualizar os 10 clusters de menor energia gerados pelo servidor HADDOCK para a MtFKBP12 na presença do peptídeo AAPF (MtFKBP12-AAPF) mostrando sua distribuição sobre toda a superfície de interação mapeada por RMN. Em (B) a representação do cluster de menor energia produzido no *Docking* MtFKBP12-AAPF indicando uma preferência pela região próxima ao loop 100. Em (C), podemos visualizar os 5 clusters de menor energia gerados pelo servidor HADDOCK para a MtFKBP12 na presença do peptídeo ALPF (MtFKBP12-ALPF) mostrando sua distribuição sobre toda a superfície de interação mapeada por RMN. Em (D) a representação do cluster de menor energia produzido no *Docking* MtFKBP12-ALPF indicando uma preferência de localização intermediária entre a região do bolsão hidrofóbico e do loop 100, especificamente entre os resíduos que mostraram o maior valor de CSP, a V74 e a S105, respectivamente.

O Haddock produz 200 estruturas refinadas em água no final do processo de *docking*. Estas estruturas são então clusterizadas e os melhores clusters são apresentados como resultado final do *docking*.

Os resultados indicaram que o peptídeo experimental, de uma forma geral, as regiões do bolsão hidrofóbico e loop 100, corroborando com o monitoramento feito através de RMN. No entanto, algumas diferenças específicas foram observadas na presença de cada peptídeo.

A interação MtFKBP12-AAPF indica que o peptídeo interage com o bolsão hidrofóbico e pode também interagir só com a região do loop 100. Isto pode ser observado ao analisar o cluster de menor energia que mostra o peptídeo mais direcionado para a região do loop 100.

Na interação MtFKBP12-ALPF observamos uma tendência equilibrada do peptídeo experimentar tanto o bolsão hidrofóbico quanto o loop 100, mesmo com a análise do cluster de menor energia. Ao analisarmos o CSP podemos ver que a interação deste é mesmo mais equilibrada ao longo de toda a região de interação já conhecida das FKBP's, o que foi corroborado pelos dados de *docking*.

Assim, apesar de não poder identificar, exclusivamente a partir desses experimentos, a(s) interação(ões) exata(s) entre as duas moléculas, é possível observar uma região preferencial de ligação entre ambas. Esta região encontra-se, principalmente, no bolsão hidrofóbico, representada pela V74 e no *loop 100's*, representada pela S105 (Figura 73).

## 5. DISCUSSÃO

A Organização Mundial da Saúde reporta a urgência e necessidade de melhores estratégias de combate às doenças infecciosas. Em seu último relatório disponível, as doenças infecciosas representaram aproximadamente 16% de todas as mortes no mundo em 2016 (4,3 milhões de mortes) (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2019a).

Apesar da existência de medicamentos previamente descritos contra a maioria das doenças infecciosas, a resistência a antibióticos é um processo persistente e crescente. Isto leva a diminuição de produtividade e elevação dos custos de tratamento, afetando amplamente a economia global. Dessa forma, o investimento no desenvolvimento de novos medicamentos antimicrobianos torna-se urgente (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2015).

Diversos bancos de dados proteicos têm sido utilizados para tal abordagem. Ao lançar mão de ferramentas de bioinformática, por exemplo, é possível prever proteínas alvo com alta “drogabilidade”, que são proteínas que apresentam como principais características a evidência de expressão, baixa antigenicidade, essencialidade, estrutura disponível e possibilidade de realização de ensaios laboratoriais (KACZOR et al., 2017). A proposição de novos alvos proteicos é frequentemente utilizada, na qual os alvos moleculares em parasitas são ajustados a partir de alvos homólogos humanos que tenham sido previamente estudados para a descoberta de fármacos. No melhor dos casos, os fármacos que são seletivos para estes alvos humanos já passaram por estudos clínicos em humanos, sugerindo fortemente que o alvo homólogo no parasita, é provavelmente, passível de intervenção farmacológica, isto é, compostos que podem ser concebidos para inibir o alvo e que são seguros e biodisponível oralmente (DIAZ-GONZALEZ et al., 2011).

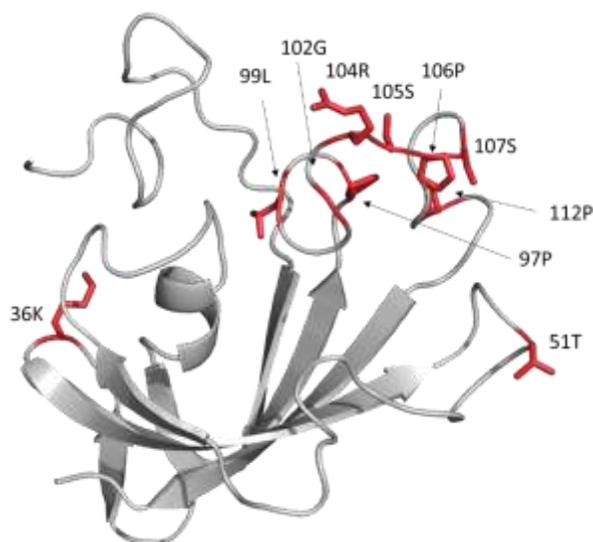
Neste viés, as proteínas ligadoras do composto FK506 (FKBP), proteína conservada nos diferentes reinos da vida, mostrou-se extremamente promissora. Em micro-organismos, a proteína FKBP12 demonstra possuir papel importante e essencial, apesar de ainda não serem totalmente esclarecidos. A proteína *TbFKBP12*, por exemplo, é essencial para o parasita *T. brucei* visto que o silenciamento do seu gene por RNAi acarreta em fenótipos letais para o parasita afetando a motilidade nas formas procíclicas e interferindo na citocinese nas formas sanguíneas (BRASSEUR et al., 2013). Um efeito inibitório semelhante ocorre com o complexo de espécies causador da tuberculose: verificou-se que os imunossupressores FK506 (tracolimus) e Rapamicina inibiram o

crescimento de *Mycobacteria* spp., *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP) e *Mycobacterium tuberculosis* (GREENSTEIN et al., 2008, 2014).

Dessa forma, com o objetivo de propor a utilização desta proteína como alvo para desenvolvimento de fármacos, investigamos estruturalmente as proteínas MtFKBP12 e TbFKBP12, originadas de *Mycobacterium tuberculosis* e *Trypanosoma brucei*, respectivamente, por espectroscopia de RMN, analisando suas características estruturais, dinâmicas e de ligação a parceiros moleculares. Para tal, fez-se necessário a subclonagem, expressão e purificação das mesmas.

Os estudos estruturais por RMN foram iniciados após o rendimento de 24 mg/L de cultura para a proteína MtFKBP12 marcada isotopicamente com  $^{15}\text{N}$  e  $^{13}\text{C}$  e 4 mg/L de cultura para a proteína TbFKBP12 marcada isotopicamente com  $^{15}\text{N}$ . A estrutura em solução da proteína MtFKBP12 reportada nesta Tese possui um enovelamento global similar ao de várias FKBP's de outros organismos: a MtFKBP12 é composta por cinco fitas  $\beta$ , que constituem uma única folha  $\beta$ , uma pequena  $\alpha$ -hélice e uma pequena hélice  $\pi$  (Figura 39).

A análise do diagrama de Ramachandran aponta que 1,9% dos resíduos se encontram em regiões não permitidas. Um exame mais detalhado das 20 estruturas de menor energia feito pelo servidor PSVS (com base em dados do *Molprobit* da Richardson Lab) aponta que tais resíduos que apresentam as maiores violações encontram-se predominantemente em regiões de *loop* (Figura 73).

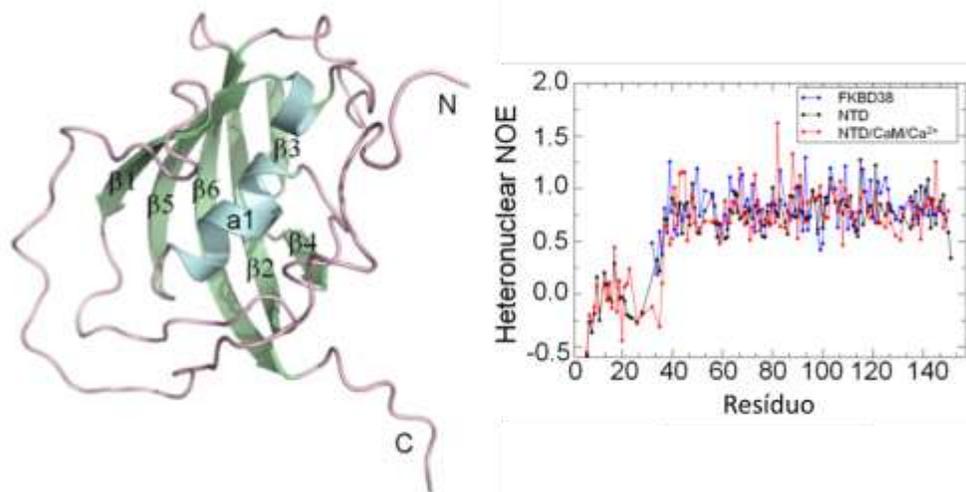


**Figura 73: Resíduos que se encontram em regiões não permitidas no Plot de Ramachandran.**

Os resíduos K36, T51, P97, L99, G102, R104, S105, P106, S107 e P112 (vermelho) apresentaram maior distribuição em regiões não permitidas.

O resíduo K36 encontra-se num pequeno loop que conecta duas fitas- $\beta$ , situação na qual os ângulos de diedro podem ocupar posições desfavoráveis (PAL; CHAKRABARTI, 2002). Os resíduos que aparecem com maior desvios presentes na hélice  $\pi$  e loop 100 encontram-se em regiões ricas em prolinas e próximas a glicinas, que também podem desviar das combinações de ângulos de diedro convencionais (HO; BRASSEUR, 2005; RICHARDSON; KEEDY; RICHARDSON, 2013).

Em relação a dinâmica analisada por RMN, de uma maneira geral, a MtFKBP12 mostrou-se bem estruturada. A região mais flexível da proteína MtFKBP12 é a região N-terminal intrinsecamente desordenada, que apresentou baixos valores de  $R_1$ ,  $R_2$  e NOE heteronuclear. Tal flexibilidade dificulta a convergência dessa região no alinhamento do *ensemble* (Figura 38). Tal qual a proteína MtFKBP12, a proteína FKBP38 de humanos (Figura 17) também apresenta uma região N-terminal anterior ao domínio FKBD. Esta região também é altamente flexível e apresentou baixa convergência na estrutura resolvida por RMN (Figura 74) (KANG et al., 2013).



**Figura 74: Estrutura em solução do domínio FKBD da proteína FKBP38 humana (PDB 2MF9).**

No painel à esquerda, a estrutura em solução da porção N-terminal da proteína FKBP38 humana (NTD) encontra-se à esquerda com as fitas  $\beta$  em verde, hélices em ciano e loops em rosa. No painel à direita, os valores de NOE heteronuclear somente do FKBD, do FKBD mais porção N-terminal (NTD) e do FKBD mais porção N-terminal (NTD) na presença do domínio calmodulina saturado de cálcio (CaM/Ca<sup>2+</sup>). Modificado de Kang et al. (2013).

Na proteína FKBP38 humana, a atividade isomerase do núcleo de FKBP38 é inibida por interações transitórias envolvendo a extensão flexível do N-terminal que precede o domínio catalítico. Neste trabalho, concluiu-se que o domínio CaM/Ca<sup>2+</sup> se liga a extensão N-terminal e, assim, libera os contatos auto inibidores entre a extensão N-terminal e domínio catalítico, potencializando a atividade isomerase de FKBP38.

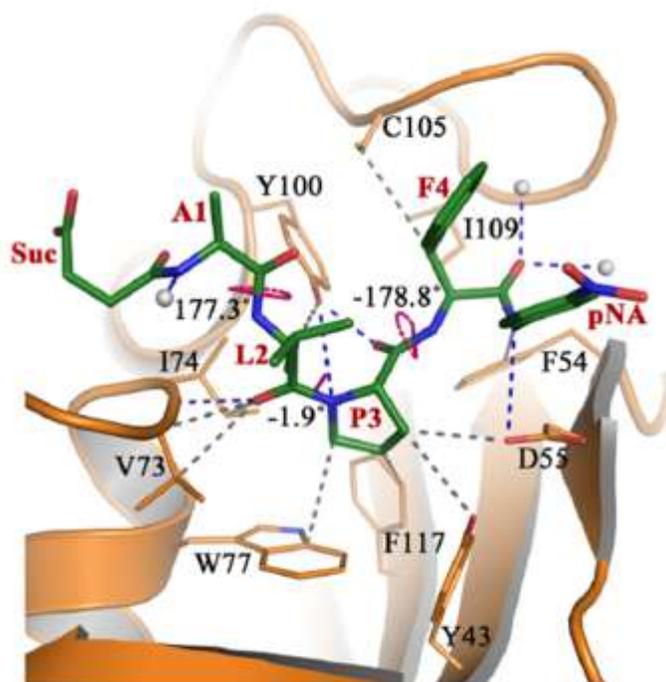
Em outras proteínas FKBP, o *loop 80's/100's* também foi assinalado como a região dinâmica importante para ligação de parceiros moleculares (CHOI et al., 2007; IVERY; WEILER, 1997; LEMASTER; HERNANDEZ, 2015; MUSTAFI et al., 2013). No caso da FKBP12 humana, o trabalho de Mustafi et al. (2013) apresentou picos duplicados que não haviam sido reportados anteriormente, além de alargamento de linha em certas regiões. O primeiro fenômeno representa um estado conformacional minoritário (12% da população) e as maiores diferenças de deslocamento químico e, indiretamente, estruturais, observadas encontram-se no *loop* citado. O alargamento de linha também presente neste *loop* representa troca de estados em escala de tempo intermediário. A His87 parece ser essencial para esta dinâmica, uma vez que quando mutada por uma valina bloqueia a proteína FKBP12 no estado majoritário, extinguindo os picos duplicados mais fracos, como também o alargamento de linha nos mesmos. É importante salientar que tal mutação não inibe a atividade isomerase da proteína FKBP12.

Na MtFKBP12, a His87 corresponde a Ser105 de acordo com o alinhamento da sequência primária. Este resíduo, apesar de não apresentar indícios de dinâmica diferenciada a partir da análise dos parâmetros de relaxação  $^{15}\text{N}$  (Figura 40-43), possui indícios de ter importante papel na ligação dos substratos sALPF $\rho$ NA e sAAPF $\rho$ NA (Figura 55), pois apresenta CSP com valor de 2 desvios-padrões acima da média em ambos os casos.

Como relatado anteriormente, devido à dificuldade de realização de atividade isomerase da MtFKBP12, as técnicas de perturbação de deslocamento químico e transferência de saturação foram utilizadas para entender a ligação dos substratos sALPF $\rho$ NA e sAAPF $\rho$ NA. Tais abordagens são bastante empregadas na literatura (SHUKER et al., 1996; VIEGAS et al., 2011; WILLIAMSON, 2013).

O FKBD da proteína FKBP35 de *Plasmodium vivax* (PvFKBP35), um dos parasitas causadores da Malária, por exemplo, apresentou os maiores CSPs nos resíduos D55, H67, V73 e I74, após adição do substrato sALPF $\rho$ NA, sendo observado posteriormente por cristalografia de difração de Raio-X que a H67 não participa diretamente da ligação (ALAG et al., 2013). Estes resíduos correspondem aos resíduos D56, V74 e I75 na proteína MtFKBP12, que também apresentaram CSP com 1 ou 2 desvios-padrões acima da média nos experimentos de titulação realizados com o mesmo substrato.

No cristal resolvido por Alag et al. (2013) da proteína PvFKBP35 ligada ao substrato sALPF $\rho$ NA, as interações de ligação ocorrem entre os resíduos do substrato L2 e V73, I74 e Y100 da proteína (V74, I75 e Y101 em MtFKBP12), P3 e Y43, D55, W77, Y100 e F117 (Y44, D56, W78, Y101 e F118 em MtFKBP12), F4 e C105 e I109 (S105 e I110 em MtFKBP12) e a porção pNA e F54 e D55 (F55 e D56, em MtFKBP12) (Figura 75). Excetuando os resíduos Y44 e F118, todos os demais resíduos da proteína MtFKBP12 apresentaram CSP significativamente acima da média.



**Figura 75: Interação de sALPFp com PvFKBD35 observada em estrutura resolvida por Cristalografia de Raio-X (PDB 4ITZ)**

As interações por ligação de hidrogênio (traços azuis) e outras interações (traços cinza) feitas por sALPFpNA (bastões verdes) com PvFKBD35, revelando a ligação da região prolina (P3) ao bolsão do sítio ativo. Os três ângulos correspondentes às ligações peptídicas também são marcados e mostrados por traços cor de rosa (ALAG et al., 2013).

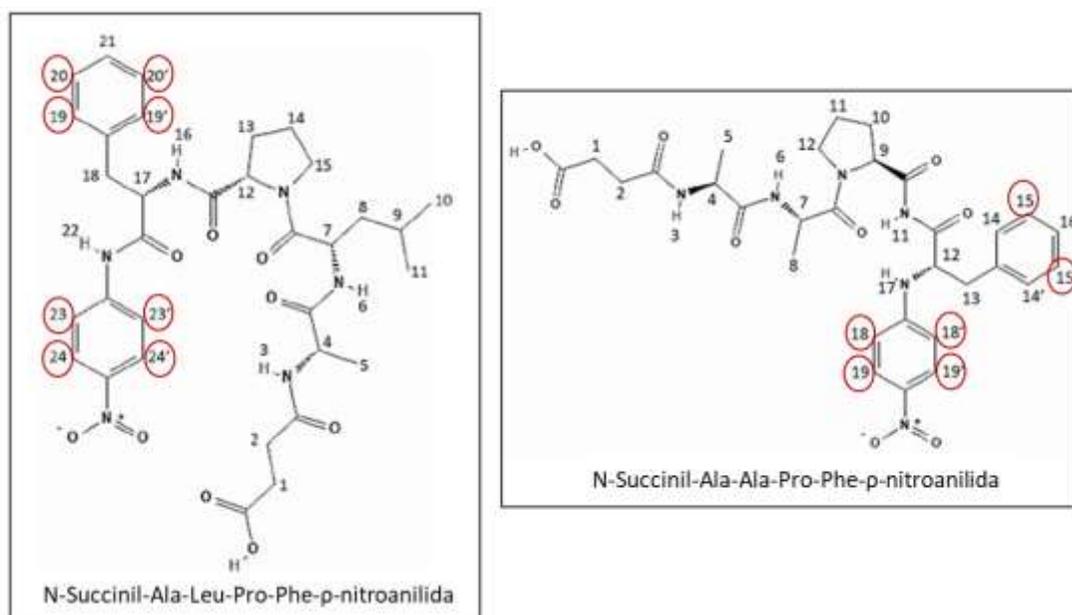
A maior afinidade da proteína MtFKBP12 com o substrato sALPFpNA em relação ao substrato sAAPFpNA vai ao encontro dos resultados de eficiência catalítica da proteína FKBP12 humana com tais substratos (HARRISON; STEIN, 1990; PARK et al., 1992). Estudos previamente reportados demonstram que o valor de  $K_{cat}/K_m$  é expressivamente maior quando o resíduo da posição 2 do substrato é uma Leucina quando comparado aos resíduos de Alanina, Glicina, Valina, Histidina, Lisina e Ácido glutâmico. Porém, tal valor é comparável quando a Fenilalanina ocupa essa posição. Pode-se inferir, dessa maneira, que um resíduo hidrofóbico e, de certa forma, volumoso aumenta a eficiência de conversão cis-trans da ligação peptidil-prolil.

Apesar da maior afinidade a sALPFpNA possibilitar uma melhor análise da constante de dissociação por perturbação de deslocamento químico da proteína MtFKBP12, isso dificultou a visualização da interação proteína-substrato pela abordagem da diferença de saturação (STD). Essa que é uma abordagem poderosa para elucidar as interações fracas proteína-ligante (NEPRAVISHTA et al., 2019; VIEGAS et al., 2011), não se mostrou uma abordagem totalmente eficiente para tal condição. Os Fatores de Amplificação STD que deveriam descrever

uma curva hiperbólica em função do aumento do tempo de saturação, não se apresentaram dessa forma (Figuras 65 e 66).

O oposto ocorreu com substrato sAAPFpNA, que apresentou menor afinidade e, conseqüentemente, maior constante de dissociação em relação ao sALPFpNA. Neste caso, a curva dos Fatores de Amplificação STD em função do tempo de saturação mostrou-se hiperbólica para a maioria dos átomos que sofreram transferência de saturação (Figuras 69 e 70).

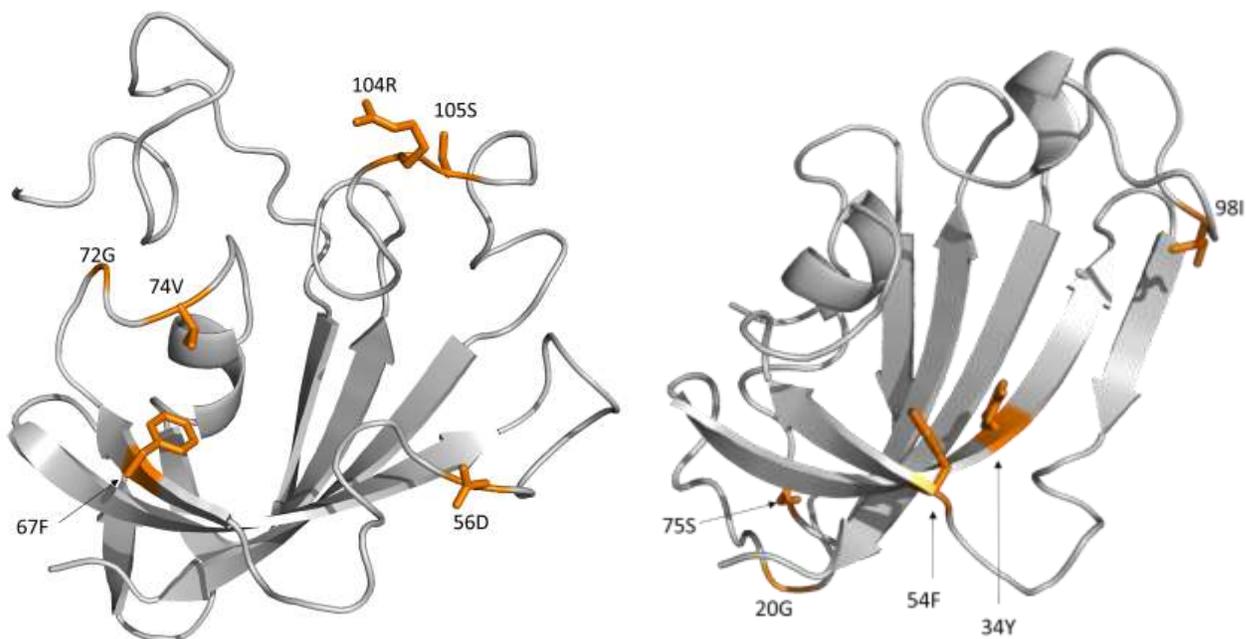
É importante notar que em ambos os substratos, a Fenilalanina 4 e a porção pNA mostraram-se constantemente recebendo transferência de saturação, independente da frequência utilizada para saturação. Isso ocorre, muito provavelmente, devido a eficiência quântica do anel aromático presente em ambas as espécies (Figura 76) (MCMILLAN et al., 2013).



**Figura 76: Substratos sALPFpNA e sAAPFpNA.**

Os átomos destacados nas estruturas químicas receberam transferência de saturação nos experimentos realizados. Os átomos referentes à cadeia lateral da fenilalanina e a porção pNA apresentaram tal fenômeno em ambos os casos.

Ao comparar as estruturas TbFKBP12 e MtFKBP12 quanto aos experimentos de perturbação de deslocamento químico, pode-se identificar que os maiores CSPs ocorreram em resíduos hidrofóbicos ou polares neutros (Figura 77). Apesar dessa congruência, os valores de CSP de TbFKBP12 para os dois substratos se assemelham ao CSP referente ao substrato sAAPFpNA em MtFKBP12. Isso seria explicado, talvez, pela ausência de atividade isomerase na proteína de TbFKBP12 (BRASSEUR et al., 2013).



**Figura 77: Estruturas MtFKBP12 e TbFKBP12.**

Encontram-se destacados em amarelos os resíduos que apresentaram CSP estatisticamente significativo para ambos os substratos.

Em relação a MtFKBP12, ao compararmos os ensaios de perturbação de deslocamento químico entre os substratos, vemos que para sALPFpNA os resíduos com dois desvios-padrões acima da média que não são comuns entre ambos os substratos são a I75, Y101 e I110 (cadeias laterais maiores e mais hidrofóbicas), enquanto que para sAAPFpNA são os resíduos D56 e G72, que possuem cadeias laterais menores e com caráter mais polar/menos hidrofóbico.

Os dados de *Docking* molecular dirigido utilizando a proteína MtFKBP12 corroboraram com os dados obtidos através da investigação da interação proteína-substrato e a investigação dos parâmetros de relaxação  $^{15}\text{N}$  (Figura 72). Apesar da existência de duas regiões possíveis de ligação do substrato observadas no modelo criado, é possível criar a hipótese, com base em dados da literatura (CHOI et al., 2007), que uma movimentação do *loop 100's* traga-o para mais próximo do bolsão hidrofóbico durante a ligação do substrato e, assim, ele funcionaria como uma dobradiça que envolve o substrato durante a catálise (Figura 72). Dessa forma, a interação ocorreria com as duas regiões simultaneamente. Os resíduos R104, S105 e I110, presentes no *loop 100's*, apresentam valor de CSP de ao menos 1 desvio-padrão acima da média quando titulado com sALPFpNA, representando interação com o mesmo ou mudanças derivadas dessa interação. Além disso, o resíduo K111 está apontada nos dados de  $R_2$ ,  $R_2/R_1$  e  $K_{ex}$  como um possível resíduo que

experimental troca conformacional na escala de tempo de  $\mu$ s-ms, podendo sugerir tal movimentação do *loop*.

O entendimento da interação de proteínas FKBP's com seus substratos e inibidores clássicos (FK506 e rapamicina) são maneiras promissoras para desenvolvimento de inibidores específicos para tais proteínas essenciais em micro-organismos causadores de doenças infecciosas. Alag et al. (2010 e 2013) e Harikishore et al. (2013) demonstraram em seus estudos a viabilidade de tal abordagem. Resolver a estrutura do domínio FKBP de uma proteína de 35 kDa (FKBP35) conservada em *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum* e entender a interação de sua estrutura com diferentes ligantes permitiram desenhar racionalmente uma pequena molécula que inibiu o crescimento *in vitro* dos agentes causadores da Malária.

Dessa forma, o trabalho descrito apresenta o início de uma possível trajetória para o desenvolvimento promissor de novas abordagens terapêuticas para as doenças infecciosas aqui estudadas.

## 6. CONCLUSÃO

- Após obtenção do plasmídeo e estudo da cinética de expressão da proteína, variando parâmetros como temperatura e concentração de indutor, foi possível obter a melhor condição de super expressão da construção His<sub>6</sub>-MtFKBP12: 37°C com 0,5 mM de IPTG em DO<sub>600</sub> 1,0. A proteína GST-TbFKBP12 foi igualmente super expressa a 18°C com 0,4 mM de IPTG em DO<sub>600</sub> 1,0;
- A construção His<sub>6</sub>-MtFKBP12 foi obtida em alto grau de homogeneidade após cromatografia de afinidade a níquel, clivada por TEV, e purificada usando uma segunda etapa de cromatografia de afinidade a níquel. A proteína GST-TbFKBP12 foi purificada usando cromatografia de afinidade a GST e clivada com alta eficiência utilizando a protease trombina;
- O estado monomérico das proteínas MtFKBP12 e TbFKBP12 foram alcançados a partir de cromatografia de gel-exclusão.
- Ambas as proteínas foram marcadas isotopicamente em meio mínimo M9 com <sup>15</sup>N ou <sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C.
- Foi possível assinalar e determinar a estrutura e a dinâmica da FKBP12 *M. tuberculosis* em alta resolução através de experimentos específicos de RMN;
- Os principais resíduos de interação entre os substratos sALPF<sub>p</sub>NA e sAAPF<sub>p</sub>NA e as FKBP12 de *M. tuberculosis* e *T. brucei* foram mapeados em suas estruturas em solução através de perturbação do deslocamento químico;
- Foram calculadas as constantes de dissociação de ambos os substratos para a proteína MtFKBP12, identificando maior afinidade ao substrato sALPF<sub>p</sub>NA;
- Os principais átomos dos substratos sALPF<sub>p</sub>NA e sAAPF<sub>p</sub>NA envolvidos na ligação com a FKBP12 de *M. tuberculosis* foram identificados através de experimentos de transferência de saturação (STD) por RMN;

- O *Docking* molecular da FKBP12 de *M. tuberculosis* na presença dos substratos sALPF $\rho$ NA e sAAPF $\rho$ NA foi realizado e corroborou com os dados obtidos anteriormente.

## 7. REFERÊNCIAS

AGHDASI, B. et al. FKBP12, the 12-kDa FK506-binding protein, is a physiologic regulator of the cell cycle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 5, p. 2425–2430, 2001.

AIDO-MACHADO, R.; SALMON, D.; PIRES, J. R. 1H, 15N and 13C assignments of a putative peptidyl prolyl cis-trans isomerase FKBP12 from *Trypanosoma brucei*. **Biomolecular NMR Assignments**, v. 8, n. 1, p. 133–135, 2014.

AIDO MACHADO, R. Estudos estruturais da proteína FKBP12 de *Trypanosoma brucei*. 2012.

ALAG, R. et al. Structural Insights into Substrate Binding by Pv FKBP35 , a Peptidylprolyl cis-trans Isomerase from the Human Malarial Parasite *Plasmodium vivax*. v. 12, n. 4, p. 627–634, 2013.

ANDRADE, G. C. et al. Backbone and side chain 1 H, 15 N and 13 C assignments of a putative peptidyl prolyl cis–trans isomerase FKBP12 from *Mycobacterium tuberculosis*. **Biomolecular NMR Assignments**, v. 0, n. 0, p. 0, 2019.

ASLAM, B. et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 1645–1658, 2018.

BLOOM, M.; REEVES, L. W.; WELLS, E. J. Spin echoes and chemical exchange. **The Journal of Chemical Physics**, v. 42, n. 5, p. 1615–1624, 2 mar. 1965.

BRADFORD, 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, 7 maio 1976.

BRASSEUR, A. et al. *Trypanosoma brucei* FKBP12 differentially controls motility and cytokinesis in procyclic and bloodstream forms. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 2, p. 168–181, 2013.

BRÜNGER, A. T. et al. Crystallography & NMR System: A New Software Suite for Macromolecular Structure Determination. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 54, p. 905–921, 1998.

CANDIANO, G. et al. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 9, p. 1327–1333, 2004.

CDC. Core Curriculum on Tuberculosis: What the Clinician Should Know. 2013.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Parasites – African Trypanosomiasis (also known as Sleeping Sickness)**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/biology.html>>. Acesso em 18 fev. 2020.

CHOI, J. et al. Structure of the FKBP12-Rapamycin Complex Interacting with the Binding Domain of Human FRAP. **Structure**, v. 273, n. 5272, p. 239–242, 2007.

CLORE, G. M. et al. Deviations from the Simple Two-Parameter Model-Free Approach to the Interpretation of Nitrogen-15 Nuclear Magnetic Relaxation of Proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, n. 12, p. 4989–4991, 1990.

CLORE, G. M.; GRONENBORN, A. M. **Determining the structures of large proteins and protein complexes by NMR**Trends in BiotechnologyElsevier Ltd, , 1 jan. 1998.

DE SOUZA, W. Doenças Negligenciadas. **Ciência e Tecnologia para o Desenvolvimento Nacional: Estudos Estratégicos**, 2010.

DECENZO, M. T. et al. FK506-binding protein mutational analysis: defining the active-site residue contributions to catalysis and the stability of ligand complexes. **Protein engineering**, v. 9, n. 2, p. 173–80, 1996.

DELAGLIO, F. et al. NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 6, n. 3, p. 277–293, 1995.

DELAGLIO, F. et al. Non-uniform sampling for all: More NMR spectral quality, less measurement time. **American Pharmaceutical Review**, v. 20, n. 4, 1 maio 2017.

DELANO, W. Pymol: An open-source molecular graphics tool. **CCP4 Newsletter On Protein Crystallography**, v. 700, 2002.

DIAZ-GONZALEZ, R. et al. The susceptibility of trypanosomatid pathogens to PI3/mTOR kinase inhibitors affords a new opportunity for drug repurposing. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8, p. 1–11, 2011.

DOSSET, P. et al. Efficient analysis of macromolecular rotational diffusion from heteronuclear relaxation data. **J. Biomol. NMR**, v. 16, n. 1, p. 23–28, 2000.

ERNST, J. D. The immunological life cycle of tuberculosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 8, p. 581–591, 2012.

FARROW, N. A. et al. Backbone Dynamics of a Free and a Phosphopeptide-Complexed Src Homology 2 Domain Studied by <sup>15</sup>N NMR Relaxation. **Biochemistry**, v. 33, n. 19, p. 5984–6003, 1 maio 1994.

GASHAW, M. et al. Emergence of high drug resistant bacterial isolates from patients with health care associated infections at Jimma University medical center: A cross sectional study. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2018.

GIORDANO, R. J. et al. Structural basis for the interaction of a vascular endothelial growth factor mimic peptide motif and its corresponding receptors. **Chemistry and Biology**, v. 12, n. 10, p. 1075–1083, 2005.

GIORDANO, R. J. et al. From combinatorial peptide selection to drug prototype (I): Targeting the vascular endothelial growth factor receptor pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 11, p. 5112–5117, 2010.

GREENSTEIN, R. J. et al. On the action of cyclosporine A, rapamycin and tacrolimus on *M. avium* including subspecies paratuberculosis. **PLoS ONE**, v. 3, n. 6, p. 1–6, 2008.

GREENSTEIN, R. J. et al. Unanticipated *Mycobacterium tuberculosis* complex culture inhibition by immune modulators, immune suppressants, a growth enhancer, and vitamins A and D: Clinical implications. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p. 37–43, 2014.

HARRISON, R. K.; STEIN, R. L. Substrate Specificities of the Peptidyl Prolyl Cis-Trans Isomerase Activities of Cyclophilin and FK-506 Binding Protein: Evidence for the Existence of a Family of Distinct Enzymes. **Biochemistry**, v. 29, n. 16, p. 3813–3816, 1990.

HO, B. K.; BRASSEUR, R. The Ramachandran plots of glycine and pre-proline. **BMC Structural Biology**, v. 5, p. 1–11, 2005.

ISHIMA, R.; TORCHIA, D. A. **Protein dynamics from NMR** *Nature Structural Biology*, set. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10966641>>. Acesso em: 6 mar. 2020

IVERY, M. T. G.; WEILER, L. Modeling the interaction between FK506 and FKBP12: A mechanism for formation of the calcineurin inhibitory complex. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 2, p. 217–232, 1997.

KACZOR, A. A. et al. Novel Antibacterial Compounds and their Drug Targets - Successes and Challenges. **Current Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 18, p. 3141–3159, 10 ago. 2017.

KANG, C. et al. Functional role of the flexible N-terminal extension of FKBP38 in catalysis. **Scientific Reports**, v. 3, n. 1, p. 2985, 22 dez. 2013.

KANG, C. B. et al. FKBP family proteins: Immunophilins with versatile biological functions. **NeuroSignals**, v. 16, n. 4, p. 318–325, 2008.

KAY, L. E.; TORCHIA, D. A.; BAX, A. Backbone Dynamics of Proteins As Studied by <sup>15</sup>N Inverse Detected Heteronuclear NMR Spectroscopy: Application to Staphylococcal Nuclease. **Biochemistry**, v. 28, n. 23, p. 8972–8979, 1989.

KENNEDY, P. G. E. Update on human African trypanosomiasis (sleeping sickness). **Journal of Neurology**, v. 266, n. 9, p. 2334–2337, 2019.

KORADI, R.; BILLETER, M.; WÜTHRICH, K. MOLMOL: a program for display and analysis

- of molecular structures. **J. Mol. Graphics**, v. 14, n. 96, p. 51–55, 1996.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.
- LEMASTER, D. M.; HERNANDEZ, G. Conformational Dynamics in FKBP Domains: Relevance to Molecular Signaling and Drug Design. **Current molecular pharmacology**, v. 9, n. 1, p. 5–26, 2015.
- LINGE, J. P.; O'DONOGHUE, S. I.; NILGES, M. Automated Assignment of Ambiguous Nuclear Overhauser Effects with ARIA. **Methods in Enzymology**, v. 339, p. 71–90, 2001.
- LIPARI, G.; SZABO, A. Model-Free Approach to the Interpretation of Nuclear Magnetic Resonance Relaxation in Macromolecules. 1. Theory and Range of Validity. **Journal of the American Chemical Society**, v. 104, n. 17, p. 4546–4559, 1982.
- LIU, T. et al. FKBP12 enhances sensitivity to chemotherapy-induced cancer cell apoptosis by inhibiting MDM2. **Oncogene**, v. 36, n. 12, p. 1678–1686, 2017.
- MAKRIDES, S. C.; MARKIDES, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 3, p. 512–538, 1996.
- MCMILLAN, A. W. et al. Fluorescence of tryptophan in designed hairpin and Trp-cage miniproteins: Measurements of fluorescence yields and calculations by quantum mechanical molecular dynamics simulations. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 6, p. 1790–1809, 2013.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL. Brasil Livre da Tuberculose: evolução dos cenários epidemiológicos e operacionais da doença. **Boletim Epidemiológico**, v. 50, n. 9, p. 1–18, 2019.
- MITTERMAIER, A. K.; KAY, L. E. Observing biological dynamics at atomic resolution using NMR. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 34, n. 12, p. 601–611, 2009.
- MORO, A. et al. Secretion by Trypanosoma cruzi of a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase involved in cell infection. **The EMBO journal**, v. 14, n. 11, p. 2483–90, 1995.
- MUSTAFI, S. M. et al. Analysing the visible conformational substates of the FK506-binding protein FKBP12. **Biochemical Journal**, v. 453, n. 3, p. 371–380, 2013.
- NEPRAVISHTA, R. et al. Deriving Ligand Orientation in Weak Protein–Ligand Complexes by DEEP-STD NMR Spectroscopy in the Absence of Protein Chemical-Shift Assignment. **ChemBioChem**, v. 20, n. 3, p. 340–344, 2019.
- PAI, M. et al. Tuberculosis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, 2016.
- PAL, D.; CHAKRABARTI, P. On residues in the disallowed region of the Ramachandran map.

**Biopolymers**, v. 63, n. 3, p. 195–206, 2002.

PALMER, A. G. Probing molecular motion by NMR. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 7, n. 5, p. 732–737, 1 out. 1997.

PALMER, A. G. NMR characterization of the dynamics of biomacromolecules. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 8, p. 3623–3640, ago. 2004.

PALMER III, A. G. NMR Probes of Molecular Dynamics: Overview and Comparison with Other Techniques. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 30, n. 1, p. 129–155, 28 jun. 2001.

PARK, S. T. et al. PPIase catalysis by human FK506-binding protein proceeds through a conformational twist mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 5, p. 3316–3324, 1992.

RAJAN, S. et al. Crystal structure of Plasmodium vivax FK506-binding protein 25 reveals conformational changes responsible for its noncanonical activity. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 82, n. 7, p. 1235–1244, jul. 2014.

RETA, A.; BITEW KIFILIE, A.; MENGIST, A. Bacterial Infections and Their Antibiotic Resistance Pattern in Ethiopia: A Systematic Review. **Advances in Preventive Medicine**, v. 2019, n. Cdc, p. 1–10, 2019.

RICHARDSON, J. S.; KEEDY, D. A.; RICHARDSON, D. C. “THE PLOT” THICKENS: MORE DATA, MORE DIMENSIONS, MORE USES Jane S. Richardson, Daniel A. Keedy, and David C. Richardson. 2013.

RIEPING, W. et al. Structural bioinformatics ARIA2: Automated NOE assignment and data integration in NMR structure calculation. v. 23, n. 3, p. 381–382, 2007.

SHEN, Y.; BAX, A. Protein backbone and sidechain torsion angles predicted from NMR chemical shifts using artificial neural networks. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 56, n. 3, p. 227–241, jul. 2013.

SHUKER, S. B. et al. Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. **Science**, v. 274, n. 5292, p. 1531–1534, 1996.

STONE, M. J. et al. Backbone Dynamics of the Bacillus subtilis Glucose Permease IIA Domain Determined from <sup>15</sup>N NMR Relaxation Measurements. **Biochemistry**, v. 31, n. 18, p. 4394–4406, 1992.

TAMURA, K. et al. **Interaction of tacrolimus (FK506) and its metabolites with FKBP and calcineurin** **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1994.

TONG, M.; JIANG, Y. FK506-Binding Proteins and Their Diverse Functions. **Current Molecular**

**Pharmacology**, v. 9, n. 1, p. 48–65, 2015.

UNAL, C. M.; STEINERT, M. Microbial Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomerases (PPIases): Virulence Factors and Potential Alternative Drug Targets. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 3, p. 544–571, 2014.

VALENTE, A.; MIYAMOTO, C.; L. ALMEIDA, F. Implications of Protein Conformational Diversity for Binding and Development of New Biological Active Compounds. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 30, p. 3697–3703, 2006.

VAN ZUNDERT, G. C. P. et al. The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, n. 4, p. 720–725, 22 fev. 2016.

VIEGAS, A. et al. Saturation-transfer difference (STD) NMR: A simple and fast method for ligand screening and characterization of protein binding. **Journal of Chemical Education**, v. 88, n. 7, p. 990–994, 2011.

VILELLA-BACH, M. et al. The FKBP12-rapamycin-binding domain is required for FKBP12-rapamycin-associated protein kinase activity and G1 progression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 7, p. 4266–4272, 1999.

VRANKEN, W. F. et al. The CCPN data model for NMR spectroscopy: Development of a software pipeline. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 59, n. 4, p. 687–696, 2005.

WADA, K. et al. Codon usage tabulated from the GenBank genetic sequence data. **Nucleic Acids Res.**, v. 18(Suppl.), p. 2367–2411, 1990.

WENNERSTRÖM, H. Nuclear magnetic relaxation induced by chemical exchange. **Molecular Physics**, v. 24, n. 1, p. 69–80, 1972.

WHO. **Companion handbook: to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis**. [s.l.: s.n.].

WILLIAMSON, M. P. Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 73, p. 1–16, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Fourth WHO Report on neglected Tropical Diseases: Integrating neglected tropical diseases into global health and development**. [s.l.: s.n.]. v. 4

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. **Microbe Magazine**, v. 10, n. 9, p. 354–355, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World health statistics 2019: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals**. Geneva: [s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global tuberculosis report 2019**. Geneva: [s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Antimicrobial Resistance**, 15 fev. 2018. Disponível em: < <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> > . Acesso em: 18 jan. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). a **Infectious Disease**, 2020. Disponível em: < [www.who.int/topics/infectious\\_diseases/en/](http://www.who.int/topics/infectious_diseases/en/) >. Acesso em: 16 jan. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). b **Human African Trypanosomiasis: Situation And Trends**, 17 fev. 2020. Disponível em: < [https://www.who.int/gho/neglected\\_diseases/human\\_african\\_trypanosomiasis/en/](https://www.who.int/gho/neglected_diseases/human_african_trypanosomiasis/en/) >. Acesso em: 20 fev. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). c **Trypanosomiasis, human African (sleeping sickness)**, 17 fev. 2020. Disponível em: < [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-\(sleeping-sickness\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness)) >. Acesso em: 20 fev. 2020.