

# Estrutura Cristalográfica da Enzima YopH de *Yersinia enterocolitica* em Complexo com Derivado de Chalcona: Uma Nova Classe de Inibidores Competitivos Promissora para o Desenvolvimento de Antibacterianos

Gustavo M. A. de Lima<sup>1</sup> (PG)\*, Fernando V. Maluf<sup>1</sup> (PG), Priscila G. A. Martins<sup>2</sup> (PG), Angela C. O. Menegatti<sup>2</sup> (PG), Louise D. Chiaradia-Delatorre<sup>2,3</sup> (PQ), Rosendo A. Yunes<sup>3</sup> (PQ), Ricardo J. Nunes<sup>3</sup> (PQ), Adriano D. Andricopulo<sup>1</sup> (PQ), Hernán Terenzi<sup>2</sup> (PQ), Rafael V. C. Guido<sup>1</sup> (PQ)  
\*gustavo.alvares.lima@gmail.com

<sup>1</sup>Laboratório de Química Medicinal e Computacional (LQMC), Centro de Pesquisa e Inovação em Biodiversidade e Fármacos (CIBFar-CEPID), Instituto de Física de São Carlos (IFSC), Universidade de São Paulo (USP)

<sup>2</sup>Centro de Biologia Molecular Estrutural (CEBIME), Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

<sup>3</sup>Laboratório Estrutura e Atividade (LEAT), Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Palavras Chave: yersinia, inibidor, cristalografia de raios X, chalconas, biologia estrutural

## Introdução

*Yersinia enterocolitica* é uma das três espécies do gênero de bactérias gram-negativas *Yersinia* que são patogênicas para o homem. A infecção causada por *Y. enterocolitica* causa desde distúrbios gastrointestinais até sepsis.<sup>1</sup>

O processo de planejamento de substâncias bioativas baseia-se na investigação dos mecanismos de virulência do patógeno. A proteína tirosina fosfatase YopH (do inglês, *Yersinia outer-membrane protein H*) é uma das proteínas injetadas no citosol das células do hospedeiro por meio do sistema de secreção do tipo III, um dos principais fatores de virulência utilizado pela bactéria. Recentemente, uma coleção de 283 derivados de chalcona e sulfonamida foi avaliada frente a YopH. Os resultados levaram a identificação e determinação da potência inibitória e mecanismo de ação de diversos derivados chalcona como inibidores competitivos da enzima alvo.<sup>2</sup>

Neste trabalho, estudos integrados de biologia molecular estrutural foram empregados na clonagem, expressão, purificação e co-cristalização da YoPH em complexo com o derivado (*E*)-3-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)-1-(3-nitrofenil)prop-2-en-1-ona (**P11**) (Figura 1). A informação estrutural detalhada sobre modo de ligação de inibidores é fundamental para aplicação de métodos de planejamento baseado em estrutura. Portanto, esses dados são úteis para o desenvolvimento de novos compostos bioativos mais potentes e seletivos.

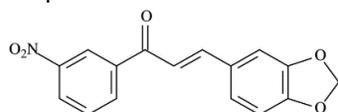


Figura 1. Estrutura molecular do inibidor de YopH **P11** ( $K_i = 4,5 \mu\text{M}$ ).<sup>2</sup>

## Resultados e Discussão

O gene *yopH* foi clonado com sucesso em *E. coli* Rosetta2(DE3) utilizando o vetor pET-Trx.<sup>3</sup> Em seguida, a proteína recombinante foi expressa em larga escala e purificada por métodos de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) que incluíram: cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC) e cromatografia de exclusão molecular (coluna Superdex 200 XK16/100). Após aplicação das etapas cromatográficas obteve-se enzima pura (teor >95%) e monodispersa apropriada para os ensaios de cristalização. Os ensaios de cocristalização foram conduzidos com a YopH a 5 mg/mL na presença de 5 mM de **P11**. Cristais promissores para os estudos de difração de raios-X foram obtidos após 96 horas na condição de cristalização contendo 0,1 M Tris-HCl pH 7,5 e 22% de PEG 8000 na temperatura de 18 °C. Os dados da difração de raios-X foram coletados na linha MX-2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) e processados com o programa XDS. O método de substituição

molecular foi empregado para a determinação das fases iniciais. Em seguida diversos ciclos sucessivos de refinamento foram conduzidos para a determinação do complexo YopH-P11 na resolução de 2,3 Å.

O modo de ligação do inibidor **P11** no sítio catalítico da YopH indica que o substituinte 3-nitrofenil está exposto para o solvente enquanto o substituinte 1,3-benzodioxolil interage com a alça-P (*P-loop*) do sítio ativo (Figura 2). Os átomos de oxigênio desse substituinte estão em posição favorável para receber ligação de hidrogênio das cadeias laterais dos resíduos catalíticos Arg409 e Gln446. Além disso, os elétrons deslocalizados do substituinte 1,3-benzodioxolil são complementares ao dipolo positivo do N-terminal da hélice central presente no sítio catalítico da YopH. Essa interação dipolo-dipolo auxilia a estabilização do complexo.

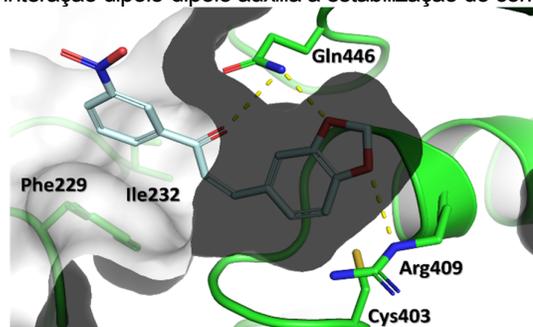


Figura 2. Complexo cristalográfico YopH-P11 (resolução 2,3 Å).

## Conclusões

A integração de métodos de biologia molecular estrutural e química medicinal são essenciais para o planejamento de novos fármacos baseado na estrutura do alvo receptor. Nesse trabalho foi empregado com sucesso métodos em biologia molecular estrutural para a determinação do complexo cristalográfico YopH-P11. A análise detalhada do modo de ligação do inibidor indicou os determinantes estruturais responsáveis pelo processo de reconhecimento molecular e afinidade. Os resultados deste trabalho guiarão o planejamento de novos agentes antimicrobianos como candidatos a novos fármacos para tratamento de infecções causadas por *Y. enterocolitica*.

## Agradecimentos

CAPES, FAPESP

1. Blevess, S. & Cornelis, G. R. How to survive in the host: the *Yersinia* lesson. *Microbes Infect.* **2**, 1451–60 (2000)
2. Martins PG, Menegatti AC, Chiaradia-Delatorre LD, de Oliveira KN, Guido RV, Andricopulo AD, Vernal J, Yunes RA, Nunes RJ, Terenzi H. Synthetic chalcones and sulfonamides as new classes of *Yersinia enterocolitica* YopH tyrosine phosphatase inhibitors. *Eur J Med Chem.*, **64**, 35-41 (2013).
3. Aslanidis, C.; Jong, P.J. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6069–74 (1990).