

Peptídeos análogos do CcdB: Síntese Química e estudos de interação com a DNA girase

Camila Aparecida Cotrim* (IC), Saulo Santesso Garrido (PG), Reinaldo Marchetto (PQ)

*camilaap@grad.iq.unesp.br

UNESP - Instituto de Química – Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química – Araraquara SP

Palavras Chave: Síntese em fase sólida, CcdB, DNA girase.

Introdução

A DNA girase é uma enzima essencial para a manutenção do estado topológico do DNA em células bacterianas, o que a torna um alvo potencial para diversos agentes antibacterianos, incluindo a toxina CcdB (1). CcdB é uma proteína de 11,7 kDa que, juntamente com o CcdA, seu antídoto, faz parte de um sistema de morte celular programada em bactérias. A morte celular é prevenida na presença do antídoto, através da formação do complexo estável CcdA-CcdB. A obtenção de análogos peptídicos do CcdB, estruturalmente modificados de forma a evitar a formação deste complexo, poderia resultar em uma nova família de peptídeos antibióticos inibidores de Girase. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi a síntese química de uma série de peptídeos derivados do CcdB, e avaliar a importância dos aminoácidos contidos na região Arg⁴⁰ – Leu⁵⁰, no processo de interação com o CcdA.

Resultados e Discussão

Os fragmentos peptídicos derivados do CcdB (Figura 1) foram sintetizados pela metodologia da fase sólida (SPFS) mediante síntese linear (2), empregando a estratégia que utiliza o grupo Fmoc como protetor dos grupos α-amínicos, bem como grupos lábeis ao ácido trifluoracético como protetores das cadeias laterais dos aminoácidos trifuncionais (3).

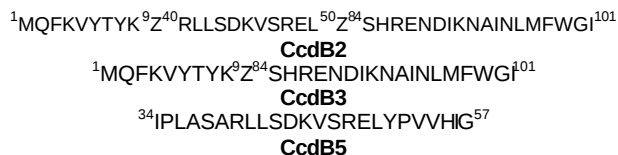


Figura 1. Estrutura primária dos peptídeos sintetizados

Os peptídeos foram analisados e purificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com rendimento final na faixa dos 20%, para todas as sequências. A identidade química foi confirmada pela obtenção das respectivas massas moleculares, 4872, 3459 e 2633 g/mol (CcdB2, CcdB3 e CcdB5) determinadas por espectrometria de massas (ES-MS positivo).

Ensaio de cromatografia de afinidade, empregando colunas de Sepharose® contendo cada uma das

sequências imobilizadas (4), evidenciaram a importância da sequência Arg⁴⁰-Leu⁵⁰, no processo de interação com o CcdA (Figura 2), bem como na atividade biológica do análogo CcdB2.

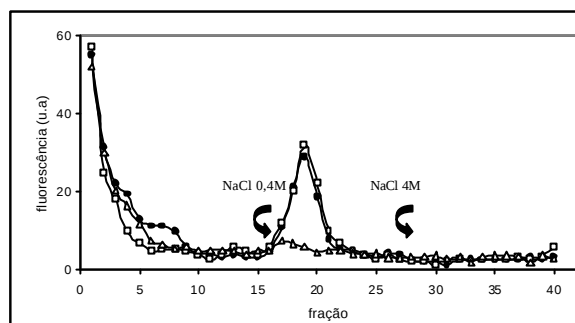


Figura 2. Cromatografia de Afinidade de CcdA41, em colunas contendo CcdB2 (?), CcdB3 (Δ) e CcdB5 (δ) imobilizados.

CcdB2 (MIC = 20 μM) e CcdB3 (MIC = 120 μM), apresentaram inibição do superenovelamento do DNA *in vitro*, porém a atividade do CcdB5 foi nula, o que apóia a teoria de que a região C-terminal (W⁹⁹G¹⁰⁰I¹⁰¹), do CcdB, desempenha papel crucial na formação do complexo enzima-CcdB (5).

Conclusões

A sequência Arg⁴⁰-Leu⁵⁰ é a região de ligação do antídoto CcdA, e consequentemente essencial para o processo de inibição da atividade do CcdB. Porém, a ausência desta sequência, na estrutura primária do CcdB, pode reduzir substancialmente sua atividade inibitória. Por outro lado, a região G terminal (W⁹⁹G¹⁰⁰I¹⁰¹), do CcdB, deve ser a responsável pelo processo de interação entre a enzima e a toxina.

Agradecimentos

À FAPESP e CNPq pelo auxílio financeiro.

¹Couturier, M.; Bahassi, E.M.; Van Melderen, L. **Trends in Microbiology**, v.6, p. 269, 1998.

² Stewart, J. M.; Young, J. D. **Solid Phase Peptide Synthesis**. 2nd ed. Rockford: Pierce Chemical Company, 1984.

³ Fields, G. B.; Noble, R. L. **Int. J. Pept. Prot. Res.** v.35, p.161, 1990.

⁴ Marchetto, R.; Nicolás, E.; Castillo, N.; Bacardit, J.; Navia, M.; Vila, J.; Giralt, E. **J. Pep. Sci.**, v. 7, p. 27, 2001.

⁵ Loris, R.; Dao-Thi, M.; Bahassi, E.M.; Van Melderen, L.; Poortmans, F.; Liddington, R.; Couturier, M.; Wyns, L. **J. Mol. Biol.**, v. 285, p. 1667, 1999.