

Novo peptídeo antibacteriano inibidor de topoisomerases

Saulo Santesso Garrido^{1*}(PQ), Davi Barbosa Delfino¹(PG), Márcio Falci Pennisi¹(IC)

¹UNESP – Instituto de Química de Araraquara/SP – Dpto. de Bioquímica e Tecnologia Química

*saulosantesso@iq.unesp.br

Palavras Chave: Peptídeos, CcdB, Topoisomerases

Introdução

Peptídeos com atividade antimicrobiana, miméticos da toxina intracelular CcdB, estão sendo utilizados como modelos para o desenho e síntese de novos fármacos com aplicações na área da saúde¹. Eles inibem a ação de topoisomerases bacterianas como DNA girase e Topoisomerase IV (topo IV), enzimas responsáveis por catalisar mudanças topológicas essenciais ao metabolismo celular. DNA girase é a única capaz de introduzir super-hélices negativas no DNA, enquanto que topo IV favorece a atividade de desencadeamento do DNA^{2,3}. Ambas são exclusivas de procariotos.

Baseado na estrutura primária do CcdB natural foi projetado e sintetizado um novo peptídeo, o CcdBdp1 (Figura 1), com o objetivo de testar sua atividade inibitória frente às topoisomerases bacterianas DNA girase e topo IV.

¹MQFKVYTYK⁹-Z-⁶⁴MTTDMACVPV⁷³-Z-⁸⁷ENDIKNAINLMFWG¹⁰¹

Figura 1. Estrutura primária do peptídeo CcdBdp1.

Materiais e Métodos

A metodologia de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) é atualmente a mais utilizada para a síntese de peptídeos que contêm até 60 resíduos de aminoácidos. O crescimento da cadeia polipeptídica do CcdBdp1 ocorreu em um suporte sólido polimérico, o que caracteriza a síntese em fase sólida.

A cromatografia líquida em fase reversa (RP-HPLC) foi empregada para a purificação e caracterização do peptídeo após a sua síntese.

Ensaio de inibição da atividade da DNA girase e topo IV foram realizados incubando-se 1 unidade (U) de cada uma das enzimas com 0,5 µg de plasmídeo pBR322 relaxado ou superenovelado em um volume final de reação de 30 µL, a 37 °C por 60 minutos em tampão de ensaio, contendo CcdBdp1 em diferentes concentrações.

Resultados e Discussão

O análogo CcdBdp1 possui os resíduos de aminoácidos fundamentais para a interação com a DNA girase (W99, G100 e I101), incluindo os resíduos que constituem a α-hélice (S87-F98), um segmento importante para a formação da estrutura do dímero de CcdB (M68–P72) e uma extremidade

35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química

N-terminal com uma β-sheet (M1-K9). Seus três fragmentos foram conectados por um linker flexível (Z), o ácido ε-amino-capróico.

A atividade inibitória do CcdBdp1 foi avaliada a partir de concentrações decrescentes a fim de se determinar a concentração inibitória mínima (CIM) frente à DNA girase e topo IV. A Figura 2 representa o perfil de eletroforese correspondente à inibição da DNA girase frente ao análogo CcdBdp1.

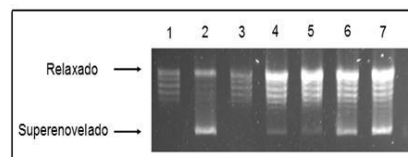


Figura 2. Linha 1, plasmídeo pBR322 relaxado, linha 2, pBR322 relaxado e DNA girase na ausência do CcdBdp1; linhas 3 a 7, pBR322 relaxado, DNA girase e CcdBdp1 nas concentrações de 200, 100, 50, 25 e 12,5 µmol.L⁻¹, respectivamente.

A inibição total da atividade da DNA girase foi observada a 200 µmol.L⁻¹ (linha 3), evidenciando que o análogo peptídico CcdBdp1 é um novo inibidor de topoisomerase bacteriana e sua CIM está no intervalo de 200 a 100 µmol.L⁻¹.

O mesmo tipo de ensaio foi realizado para a enzima topo IV, utilizando neste caso o plasmídeo pBR322 no estado superenovelado, já que a atividade da topo IV corresponde ao relaxamento do DNA. A CIM de CcdBdp1 encontrada para topo IV foi de 1,0 µmol.L⁻¹.

Conclusões

O análogo CcdBdp1, derivado da toxina CcdB, é um novo e potente inibidor da atividade de topoisomerases bacterianas, podendo ser um ponto de partida para o desenvolvimento de novas classes de antibióticos.

Agradecimentos

CAPES, Fundunesp

¹TROVATTI, E.; COTRIM, C. A.; GARRIDO, S. S.; BARROS, R. S.; MARCHETTO, R. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 18, p. 6161-6164, **2008**.

²REECE, R.; MAXWELL, A. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, v. 26, p. 335-375, **1991**.

³KATO, J.; NISHIMURA, Y.; IMAMURA, R.; NIKI, H.; HIRAGA, S.; SUZUKI, H. *Cell*, v. 63, n. 2, p. 393-404, **1990**.