

# Biotina proteina ligase de *Mycobacterium tuberculosis* como alvo molecular no desenvolvimento de fármacos baseado na técnica de fragmentos (FBDD)

Jademilson C. Santos<sup>1</sup>(PQ)\*, Marcio V. B. Dias<sup>1</sup>(PQ)

\*email: jademilsonasantos@gmail.com

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Estrutural Aplicada (LBEA), Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas-ICB, Universidade de São Paulo (USP)

Palavras Chave: Biotina proteína ligase, Thermshift, *Mycobacterium tuberculosis*, inibidor, cristalografia, fragmento.

## Abstract

Biotin ligase protein from *Mycobacterium tuberculosis* as a molecular target in Fragment-Based drug discovery (FBDD). In this work, BirA enzyme from *M. tuberculosis* was used as molecular target for development to new drugs.

## Introdução

A resistência a antibióticos pelas bactérias tem levado a busca de alvos farmacológicos que possam ser validados para o desenvolvimento de novos antibióticos. Recentemente, o interesse tem sido voltado para as enzimas que fazem parte das rotas de biossíntese de vitaminas. Algumas vitaminas são cruciais para a manutenção do ciclo vital dos microorganismos<sup>1</sup>. Uma das rotas de biossíntese de vitaminas mais visadas para o desenvolvimento de novos antibióticos é a via de biotina. Na biossíntese de biotina de *M. tuberculosis* a biotina proteína ligase (BirA) representa um alvo atraente para o desenvolvimento de novos fármacos, pois participa globalmente da regulação do metabolismo de lipídios através da biotilação das Acetil-CoA carboxilases (ACCs)<sup>2</sup>. Neste trabalho, a técnica FBDD tem sido empregada no intuito de desenvolver inibidores mais potentes e seletivos para *M. tuberculosis*.

## Resultados e Discussão

O gene que codifica a enzima BirA foi clonado no vetor pET-Trx que contém uma cauda de histidina no N-terminal da enzima fusionada a tiorredoxina e um sítio de clivagem da enzima TEV protease. A proteína recombinante foi expressa e purificada por técnicas cromatográficas. Inicialmente foi realizada uma cromatografia por afinidade a metal imobilizado (IMAC), seguida de uma cromatografia por exclusão molecular utilizando uma coluna superdex 75 16/600. As técnicas cromatográficas de alta eficiência (CLAE) permitiram obter a proteína pura (teor >90%). Ensaio de cristalização foram realizados com a BirA na forma apo em uma concentração de 10 mg/mL. Após 4 dias cristais cresceram em 20% de PEG 2000, 100 mM de Tris-HCl, pH 8,5 e 100 mM N-óxido trietilamina. Os dados de difração de raios-X foram coletados no LNLS a

uma resolução de 2,2 Å e processados no programa XDS. A estrutura da BirA foi resolvida por substituição molecular e ciclos de refinamento foram realizados na determinação final da estrutura tridimensional da enzima.

Os hits foram identificados em uma biblioteca com 400 fragmentos químicos. Todos os fragmentos foram dissolvidos em DMSO em uma concentração final de 200 mM. Esses fragmentos foram adquiridos juntos a empresas comerciais, bem como cedidos pelo grupo do professor Vitor F. Ferreira (UFF). A técnica utilizada para triagem inicial foi o *thermoshift*. Dos 400 compostos disponíveis apenas os fragmentos 1, 2, 3 e 4 (Figura 1) estabilizaram a enzima BirA. Quanto maior a variação positiva do T<sub>m</sub> mais promissor é o fragmento. Nesse caso o fragmento mais promissor para enzima BirA foi o composto 1, estabilizando em +2,0 °C em relação a enzima sem ligante.

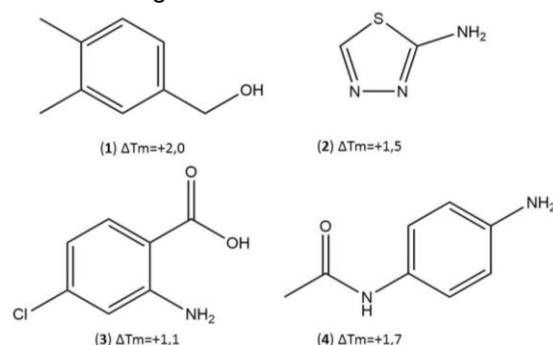


Figura 1. Estrutura química e  $\Delta T_m$  dos fragmentos identificados por thermoshift.

## Conclusões

Nesse trabalho a enzima BirA de *M. tuberculosis* foi clonada, purificada e teve sua estrutura tridimensional resolvida. Por meio da técnica *thermoshift* foram identificados 4 possíveis fragmentos que estão sendo caracterizados através de técnicas de biologia estrutural e biofísica.

## Agradecimentos

Fapesp (2013/26242-0, 2010/15971-3) e Capes.

<sup>1</sup>Dey, S.; Lane, J.M.; Lee, R.E.; Rubin, E.J.; Sacchettini, J.C. *Biochemistry*, **2010**, 49, 6746.

<sup>2</sup>Shi, C.; Tiwari, D.; Wilson, D. J.; Seiler, C. L.; Schnappinger, D.; Aldrich, C. C. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, 4, 1213.