

## SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS DE INTERAÇÃO DE UM ANÁLOGO DA ANTITOXINA CcdA EMPREGANDO FLUORESCÊNCIA NO ESTADO ESTACIONÁRIO

Camila Aparecida Cotrim, Saulo Santesso Garrido, Eliane Trovatti e Reinaldo Marchetto\*

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, CP 355, 14800-900 Araraquara - SP, Brasil

Recebido em 15/5/09; aceito em 23/11/09; publicado na web em 25/3/10

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND INTERACTION STUDIES OF AN ANALOG OF CcdA ANTITOXIN BY STEADY STATE FLUORESCENCE. Toxin-antitoxin (TA) systems contribute to plasmid stability by a mechanism called post-segregational killing. The *ccd* was the first TA system to be discovered with CcdB being the toxin and CcdA the antitoxin. CcdA, an 8.3 kDa protein, interacts with CcdB (11.7 kDa), preventing the cytotoxic activity of CcdB on the DNA gyrase. As an approach to understanding this interaction, CcdA41, a polypeptide derived from CcdA, was synthesized by solid-phase methodology and its interaction with CcdB was analyzed by steady state fluorescence. CcdA41 formed a stable complex with CcdBET2, a peptide based on CcdB, the more recently described bacterial topoisomerase inhibitor.

Keywords: bacterial toxin; peptides; fluorescence.

### INTRODUÇÃO

A viabilidade de células bacterianas que abrigam plasmídeos com baixo número de cópias é potencialmente comprometida pela presença de produtos codificados por genes plasmidiais, que são tóxicos para a célula. Células que carregam tais plasmídeos sobrevivem porque estes codificam, além da toxina, um segundo produto que age como um antídoto.<sup>1</sup> Esses produtos são codificados por dois genes organizados em um mesmo operon, e constituem os denominados sistemas toxina-antitoxinas (sistemas TA).<sup>2</sup>

A expressão dos genes TA é autorregulada em nível transcricional; a antitoxina age como um repressor e a toxina geralmente como um correpressor, contribuindo assim com a estabilidade do plasmídeo, por um mecanismo denominado morte pós-segregacional. A antitoxina é uma proteína instável degradada por uma protease ATP-dependente, enquanto a toxina é uma proteína estável que inibe um processo celular essencial. Essa diferença de estabilidade e a meia vida *in vivo* das duas proteínas é a chave para a funcionalidade dos sistemas TA.<sup>3</sup>

Após a divisão celular, cada célula filha vai herdar alguns dos complexos toxina-antitoxinas do citoplasma. Quando uma célula filha não herda uma cópia do plasmídeo, a síntese da antitoxina não é mais possível.<sup>4</sup> A degradação da antitoxina, subsequentemente, levará à liberação da toxina, que poderá então inibir um determinado processo celular, levando a célula à morte.

*Ccd* (*control of cell death*) foi o primeiro sistema TA identificado e está localizado no plasmídeo F, com a toxina sendo denominada CcdB e a antitoxina CcdA.<sup>5</sup> CcdB é conhecido por atuar em diferentes fases do ciclo catalítico da DNA girase, uma topoisomerase essencial para as células bacterianas.<sup>6</sup> As estruturas cristalinas do CcdB, bem como de um complexo formado entre o CcdB e um relevante fragmento da cadeia A da DNA girase de *Escherichia coli* (GyrA14<sub>EC</sub>) já foram descritas.<sup>7</sup> Nesta última, uma importante interação é observada entre o resíduo Trp99 do CcdB e Arg462 da girase. Esses estudos estruturais, associados à identificação de mutações que induzem a perda de atividade citotóxica do CcdB levaram à conclusão de que esses resíduos desempenham papel crucial no processo de formação do complexo enzima-CcdB.<sup>8</sup> A antitoxina CcdA, quando presente, previne a formação deste complexo,

interagindo com o CcdB, através da formação de um complexo estável CcdA-CcdB, antagonizando assim o efeito tóxico do CcdB.<sup>9</sup>

Acredita-se que a região do CcdA que interage com o CcdB reside nos resíduos de aminoácidos carboxiterminais, uma vez que estudos *in vivo* mostraram que uma forma truncada, mutante desta proteína, com os primeiros 31 aminoácidos suprimidos (CcdA41), também neutralizou a atividade do CcdB, sugerindo que o CcdA41 também forma um complexo com o CcdB.<sup>10</sup> Por outro lado, estudos de hidrólise mostraram que um dos *loop* do CcdB, com uma estrutura variável formada pelos resíduos Arg40-Leu50, quando na presença de CcdA, permanecem protegidos da ação da protease LysC, o que evidencia que este segmento deve funcionar como um provável sítio de reconhecimento para o CcdA.<sup>11</sup>

A proposta da existência de dois tipos de complexos CcdA-CcdB, dependentes da razão CcdA:CcdB,<sup>12</sup> aliada à recente cristalização de um complexo formado pelo CcdB de *Vibrio fischeri* com um fragmento C-terminal de 36 resíduos de aminoácidos da antitoxina do plasmídeo F (CcdA<sub>F37-72</sub>),<sup>13</sup> têm proporcionado a base estrutural deste complexo, porém evidências quanto aos resíduos de aminoácidos realmente importantes para a interação molecular do CcdA com a toxina, e vice-versa, são escassas.

Neste sentido, CcdA41 (fragmento C-terminal de 41 resíduos de aminoácidos do CcdA) foi quimicamente sintetizado empregando-se a metodologia da fase sólida, e a interação com CcdBET2 e CcdBET3 (análogos peptídicos do CcdB)<sup>14</sup> avaliada por espectroscopia de fluorescência no estado estacionário. Evidências quanto à importância das regiões C-terminal de CcdA e o *loop* formado pelos resíduos Arg40-Leu50 de CcdB, na formação do complexo CcdA-CcdB, são sugeridas. CcdA41 formou um complexo estável com o análogo CcdBET2, com uma constante de associação de  $1,5 \pm 0,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , obtida através da técnica de supressão na fluorescência molecular.<sup>15</sup>

### PARTE EXPERIMENTAL

#### Material e reagentes

Foram usados N- $\alpha$ -Fluorenilmetiloxycarbonil-aminoácidos (Fmoc-aminoácidos), Fmoc-Trp-Wang resina, Fmoc-Ile-Wang resina, Di-isopropilcarbodi-imida (DIC) e 1-hidroxi-benzotriazol (HOBt)

\*e-mail: marchetto@iq.unesp.br

(Novabiochem-Läufelfingen, Switzerland); Di-isopropiletilamina (DIEA) e ácido trifluoracético (TFA) (Fluka Chemical Corp); DCM (diclorometano) e DMF (dimetilformamida) para análise (Nuclear), sendo o DMF tratado, borbulhando-se nitrogênio para remoção de contaminantes voláteis e estocado em peneira molecular ativada (4 Å) por um mínimo de 30 dias antes do uso; NMP (N-metilpirrolidona) e acetonitrila (ACN) (Carlo Erba ou Mallinkrodt).

### Medidas espectroscópicas

Medidas de absorvância e fluorescência foram feitas em um espectrofotômetro UV-visível Shimadzu 1601PC e um espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse, respectivamente, ambos equipados com compartimentos de amostra termostatizados, usando uma célula de quartzo de 1,5 mL e 1,0 cm de caminho óptico, contendo uma barra magnética para homogeneização. A largura das fendas de excitação e emissão de fluorescência foi de 5 nm, para todas as medidas.

### Métodos

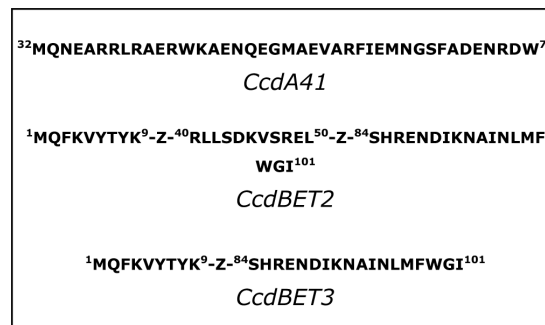
#### Síntese e purificação

As seqüências peptídicas, descritas na Figura 1, foram sintetizadas manualmente pela metodologia da fase sólida,<sup>16</sup> de acordo com o protocolo padrão que emprega o grupamento base-lábil Fmoc como protetor dos  $\alpha$ -amino grupos e derivados *t*-butílicos (*t*-Bu) para a proteção da maioria das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos trifuncionais<sup>17</sup> usando Fmoc-Trp-Wang resina (0,60 mmol/g) e Fmoc-Ile-Wang resina (0,30 mmol/g) e DIC/HOBt como agentes de condensação. Os grupos funcionais das cadeias laterais dos Fmoc-aminoácidos foram protegidos pelos seguintes grupos: *t*Bu (*t*-butila) para Asp, Glu, Ser, Tyr e Thr; Trt (trítala) para Asn, Gln e His, Boc (*t*-butiloxicarbonila) para Lys e Trp e Pmc (2,2,5,7,8-pentametil-cromano-6-sulfonila) para Arg.

Na etapa de acoplamento de cada aminoácido, foi empregado um excesso molar de 3 equivalentes para o Fmoc-aminoácido e 3 equivalentes para os reagentes de condensação em DCM:DMF (1:1 v/v), por 2 h. A eficiência das etapas de acoplamento foi monitorada pelo teste de Kaiser<sup>18</sup> e, quando positivo, o processo era repetido com 50% da quantidade inicial dos reagentes. Quando necessário, era realizado um processo de acetilação usando anidrido acético e DIEA (10 equivalentes cada) em DMF, por 30 min. A clivagem final do peptídeo da resina e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais foi efetuada com uma solução de clivagem (10 mL/g peptidil-resina) contendo TFA (94,5%), água deionizada (2,5%), etanoditiol (2,5%) e tri-isopropilsilano (0,5%), a 25 °C por 2 h. Os peptídeos *in natura* foram precipitados com éter dietílico gelado e centrifugados (4 vezes), dissolvidos em uma solução aquosa de ácido acético 10% e liofilizados. O rendimento dos peptídeos *in natura* (em peso) situou entre 80 e 90%.

A purificação dos peptídeos foi realizada por cromatografia líquida de média eficiência (CLME), usando uma coluna de fase reversa Júpiter C18 (250 x 25 mm; 15  $\mu$ m; 300 Å) com um gradiente convexo de 30 a 60% (CdbBET2 e CcdA41) e de 20 a 50% (CdbBET3) de solvente B (A: água, 0,04% TFA; B: acetonitrila, 0,04% TFA) em 90 min. O fluxo foi de 3,0 mL/min, com detecção em UV a 220 nm. Análises das frações foram feitas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em um cromatógrafo Varian ProStar, empregando uma coluna de fase reversa Nucleosil C18 (250 x 4,6 mm; 5  $\mu$ m; 300 Å), com um gradiente linear de 20 a 80% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 15 min, fluxo de 1,5 mL/min e detecção a 220 nm.

As análises de aminoácidos resultaram de acordo com o teórico esperado (Hidrólise: HCl 6 M a 110 °C por 72 h; analisador: Shimadzu LC-10A/C-47A). A identidade dos peptídeos foi confirmada por espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESIMS) em um espectrômetro Micromass, modelo ZMD.



**Figura 1.** Estrutura primária dos análogos peptídicos sintetizados quimicamente pela metodologia da fase sólida

#### Estudos de fluorescência

A supressão da fluorescência de CcdA41 pelos análogos CdbBET2 e CdbBET3 foi determinada como uma função da concentração destes análogos, como segue: alíquotas (5-100  $\mu$ L) de uma solução estoque de CdbBET2 (520  $\mu$ M) ou CdbBET3 (580  $\mu$ M) foram adicionadas a uma solução 25  $\mu$ M de CcdA41 (1,0 mL) em tampão padrão (Tris-HCl 10 mM, pH 7.2 / NaCl 20 mM / MgCl<sub>2</sub> 5 mM), à 25 °C. Antes da medida da fluorescência, as amostras foram homogeneizadas e equilibradas no suporte de cubeta com o obturador de excitação fechado. O comprimento de onda de excitação foi de 280 nm, com a emissão medida a 350 nm (ensaios com CdbBET2) ou a 355 nm (ensaios com CdbBET3). Para evitar a contribuição dos dois análogos nas medidas de fluorescência do CcdA41, ensaios paralelos foram executados, nas mesmas condições anteriores, porém na ausência de CcdA41. Os valores de emissão intrínseca de CdbBET2 e CdbBET3 na região de análise foram, então, utilizados na correção da emissão de fluorescência do CcdA41, subtraindo-se a fluorescência obtida dos valores de fluorescência do CcdA41, obtidos após a adição de cada alíquota. A intensidade de fluorescência observada, em todas as condições, foi corrigida para perda de sinal devido ao efeito de diluição e por efeito de filtro óptico causada por uma possível absorção dos análogos peptídicos.<sup>19</sup>

Os dados obtidos foram representados em um gráfico de Stern-Volmer, onde a variação da fluorescência relativa do CcdA41 ( $F_0/F$ ) foi avaliada em função da concentração de cada um dos análogos CdbBET2 e CdbBET3. As constantes de associação entre estes análogos e o CcdA41 foram determinadas a partir do coeficiente angular da curva descrita pela Equação 1, em duas diferentes temperaturas (25 e 45 °C).

$$F_0/F = 1 + K_{sv} [Q] \quad (1)$$

onde  $F_0$  e  $F$  representam a intensidade de fluorescência do CcdA41, na ausência e presença de um dos análogos peptídicos, respectivamente,  $[Q]$  a concentração dos peptídeos CdbBET2 ou CdbBET3 e  $K_{sv}$  a constante de supressão.<sup>20</sup>

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Design e síntese

Baseado na estrutura cristalina do CcdB,<sup>7</sup> dois análogos lineares desta toxina foram projetados e sintetizados, pela metodologia da fase sólida.<sup>14</sup> No design destes dois análogos, foram considerados a  $\alpha$ -helice C-terminal de 13 resíduos de aminoácidos, o *loop* formado pelos resíduos Arg40-Leu50 (da folha que se projeta para fora da molécula como uma asa), a folha  $\beta$  N-terminal (Met1-Leu9) e os

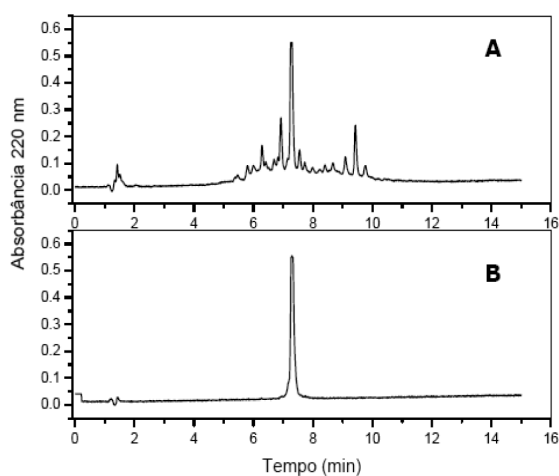
resíduos Gly100 e Ile101 que parecem desempenhar papel importante na formação do complexo CcdB-GyrA.<sup>7,14</sup>

Deste modo, CcdBET2 e CcdBET3 foram sintetizados e purificados como descrito na parte experimental. Após o processo de purificação, 14,8 mg (16,5% de rendimento) e 18,0 mg (19,0% de rendimento) de CcdBET2 e CcdBET3 foram obtidos, respectivamente. HPLC: 25 °C, 8,58 e 8,51 min para CcdBET2 e CcdBET3, respectivamente. Espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESIMS):  $m/z$  (M + 4H)<sup>+</sup> = 1219 (CcdBET2) e 1154 (CcdBET3);  $M_T$  = 4871,8 e 3459,2 g/mol, respectivamente.

Uma sequência truncada do CcdA contendo 41 resíduos de aminoácidos tem sido descrita como uma sequência simplificada que mantém a mesma atividade antídoto do CcdA.<sup>10</sup> A predição da estrutura secundária do CcdA sugere a existência de 2 ou 3  $\alpha$ -hélices no domínio C-terminal do CcdA, justamente na região de 41 resíduos que constituem a molécula de CcdA41.<sup>11</sup> Além disso, a proteção deste domínio pelo CcdB, frente à degradação promovida por proteases, leva a acreditar que a interação do CcdA com o CcdB ocorra nesta região. Desta forma, decidiu-se por sintetizar quimicamente esta sequência, com o intuito de se avaliar o grau de interação com os diferentes análogos de CcdB.

Deste modo, empregando-se a mesma estratégia Fmoc/tBu, utilizada para os análogos de CcdB (Parte Experimental), sintetizou-se a sequência CcdA41 na escala de 0,25 mmols, partindo-se de 416 mg de Fmoc-Trp-Wang-resina (0,60 mmol/g). Foram obtidos ao final, cerca de 2 g de peptidil-resina, sendo que 985 mg foram utilizadas no processo de clivagem (Parte Experimental) obtendo-se 398 mg de peptídeo *in natura*. Parte desta massa (76 mg) foi purificada por CLME, obtendo-se ao final 14 mg de CcdA41 (18% de rendimento) com um grau de pureza de 97%. O conteúdo peptídico situou-se na faixa de 85% e a proporção relativa de aminoácidos apresentou-se dentro do esperado.

A Figura 2 mostra o perfil cromatográfico do análogo CcdA41 purificado por CLME, onde é exibido um pico único com  $t_r$  = 7,73 min. A massa molecular teórica de 4941,52 g/mol foi confirmada por espectrometria de massas, empregando ionização por *electrospray* (ESIMS):  $m/z$  = 1648 (M + 3H)<sup>+</sup>; 1236 (M + 4H)<sup>+</sup>; 989 (M + 5H)<sup>+</sup>.



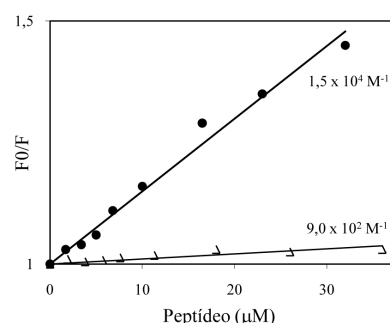
**Figura 2.** Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o análogo peptídico CcdA41, antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa Nucleosil C<sub>18</sub> (25 x 0,46 cm; 5  $\mu$ m; 300 Å), com um gradiente linear de 20 a 80% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 15 min, fluxo de 1,5 mL/min e detecção a 220 nm

### Estudos de fluorescência

Estudos qualitativos do efeito do CcdBET2 na fluorescência intrínseca do CcdA41 já apontavam para uma possível interação entre as

espécies. CcdA41 tem um máximo de emissão a 355 nm, caracterizando alta exposição dos resíduos de triptofano ao solvente. A adição de CcdBET2 resultou em um pequeno deslocamento para o azul na emissão da fluorescência (emissão a 350 nm), indicando que ao menos um resíduo de triptofano da molécula de CcdA41 está inserido no interior do complexo (dados não mostrados). O mesmo efeito não foi observado com a adição de CcdBET3. Estes resultados prontamente nos incitaram a determinar os parâmetros de interação para o sistema CcdA41-CcdBET2, além de avaliar a importância da *loop* Arg40-Leu50, nesta interação.

Os parâmetros de interação foram estudados através da análise da supressão da fluorescência intrínseca do CcdA41 resultante da possível interação com cada um dos peptídeos CcdBET2 e CcdBET3.<sup>15</sup> A variação da intensidade de fluorescência relativa do CcdA41, no comprimento de onda de emissão de 350 nm ( $\lambda_{ex}$  = 280 nm) em função da concentração de CcdBET2 ou de 355 nm em função da concentração de CcdBET3, está representada na Figura 3.



**Figura 3.** Interação do CcdA41 com CcdBET2 (●) e CcdBET3 (Δ) a 25 °C. CcdBET2 ou CcdBET3 (5 a 100  $\mu$ M) foram adicionados a uma solução 25  $\mu$ M de CcdA41 e a fluorescência medida com excitação a 280 nm e emissão a 350 nm (CcdBET2) ou 355 nm (CcdBET3), após cada adição. A inclinação da curva de Stern-Volmer representa a constante de associação para uma supressão estática. Para uma supressão do tipo dinâmica, a inclinação representa a constante de supressão de Stern-Volmer

Dados de supressão geralmente são apresentados como uma variação de  $F_0/F$  em função da concentração de um agente supressor, no caso um dos peptídeos CcdBET2 ou CcdBET3, de acordo com a Equação 1. Uma linearidade, como observada na Figura 3, para ambos os peptídeos, é um indicativo da existência de uma única classe de fluoróforos, em CcdA41, todos igualmente acessíveis aos supressores.

Por outro lado, uma linearidade na representação gráfica de Stern-Volmer pode resultar tanto de uma supressão dinâmica ou colisional como de uma supressão estática (formação de complexo). Ambas podem ser diferenciadas através de uma avaliação comparativa em diferentes temperaturas. Uma diminuição na constante de supressão, com a elevação da temperatura, é esperada no caso de supressão estática. Em contraste, um efeito inverso é observado para uma supressão dinâmica.<sup>20</sup> Para ambas, a dependência de  $F_0/F$  em relação a  $[Q]$  (Equação 1) é idêntica, exceto que a constante de supressão ( $K_{sv}$ ), para uma supressão estática, corresponde à constante de associação ( $K_a$ ) do complexo formado.<sup>20</sup>

O valor da constante de associação ( $K_a = 1,5 \pm 0,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) para o complexo CcdBET2-CcdA41, a 25 °C, foi obtido a partir da inclinação da curva de Stern-Volmer para a identificada supressão estática (Figura 4A), de acordo com a equação descrita na parte experimental.<sup>20</sup> O valor obtido de  $K_a$  é resultado de uma média de pelo menos cinco medidas, incluindo o desvio padrão.

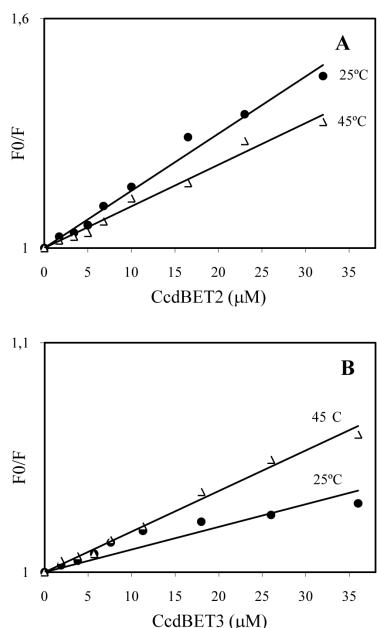
Como CcdBET2, uma diminuição na intensidade da fluorescência de CcdA41, em função da concentração de CcdBET3, também foi observada (Figura 3). Porém, diferentemente de CcdBET2, os estudos da dependência da temperatura identificaram que, neste caso, a supressão

observada foi dinâmica (Figura 4B), resultante de encontros colisionais entre as espécies e não devido à formação de um complexo. Portanto, a inclinação da curva de Stern-Volmer não resulta na constante de associação e sim na constante de supressão de Stern-Volmer ( $K_{sv} = 9,0 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ ). Este resultado intensifica a hipótese de que a interação do CcdA com o CcdB ocorre na região constituída pelos aminoácidos Arg40-Leu50, uma vez que a ausência desta região em CcdBET3 resultou em completa perda de interação entre os análogos peptídicos.

Para confirmar estes resultados, consideraram-se os dois processos como supressões dinâmicas, ambos a  $25^\circ\text{C}$ . Neste caso  $K_{sv} = K_q \tau_0$ , onde  $K_{sv}$  representa a constante de Stern-Volmer,  $K_q$  a taxa de colisão e  $\tau_0$  o tempo de vida da biomolécula sem o supressor, respectivamente. Considerando que o tempo de vida estimado para um biopolímero, como o CcdA41, é da ordem de  $10^{-8} \text{ s}$ ,<sup>21</sup> e  $K_{sv}$  o coeficiente angular das retas representadas na Figura 3, os valores de  $K_q$  podem ser calculados para ambos, CcdBET2 e CcdBET3.

Para CcdBET2, o valor de  $K_q$  ( $1,5 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) é bem superior ao valor máximo da taxa de colisão obtido por diferentes supressores com um determinado biopolímero ( $2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ),<sup>22</sup> mostrando que a supressão, neste caso, foi iniciada não por colisões dinâmicas, mas sim pela formação de um complexo. Por outro lado,  $K_q = 9,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  para CcdBET3, próximo aos valores obtidos para diferentes biopolímeros, evidencia uma supressão colisional.

A elevação da temperatura resulta em uma diminuição da estabilidade dos complexos e, portanto, valores mais baixos na constante de supressão estática, o que explica a diminuição na inclinação da curva de Stern-Volmer observada para CcdBET2 (Figura 4A). O valor da constante de associação obtida a  $45^\circ\text{C}$  ( $K_a = 1,1 \pm 0,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) corresponde a uma diminuição na faixa de 25%. Valores entre 10 e 40% já haviam sido obtidos para diferentes complexos,<sup>23</sup> incluindo aqueles obtidos com proteínas, tais como a soroalbumina humana ou bovina,<sup>24</sup> justificados basicamente pelas diferenças de estabilidade térmica dos diferentes complexos formados.



**Figura 4.** Efeito da temperatura na interação do CcdA41 com CcdBET2 (A) e CcdBET3 (B). CcdBET2 ou CcdBET3 (5 a 100  $\mu\text{M}$ ) foram adicionados a uma solução 25  $\mu\text{M}$  de CcdA41 e a fluorescência medida com excitação a 280 nm e emissão a 350 nm (CcdBET2) ou 355 nm (CcdBET3), a  $25^\circ\text{C}$  (●) e  $45^\circ\text{C}$  (Δ), após cada adição. Supressão do tipo estática (formação de complexo), o aumento de temperatura resulta em diminuição na inclinação da curva de Stern-Volmer. O inverso é válido para supressão dinâmica (sem formação de complexo)

Por outro lado, a supressão resultante de processos dinâmicos é dependente da difusão. Assim, altas temperaturas resultam em maiores coeficientes de difusão e, conseqüentemente, aumento na constante de supressão bimolecular, como observado para CcdBET3 ( $K_{sv} = 13 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$  - Figura 4B).

Apesar de haver estudos envolvendo a identificação das regiões e/ou resíduos de aminoácidos envolvidos na interação do CcdB com o CcdA, estes se limitam à atividade e à estrutura do complexo,<sup>11-13</sup> porém sem a caracterização molecular e os níveis de interação das espécies, de modo que não há até o momento, a obtenção e divulgação de um valor da constante de associação molecular entre a toxina e o seu antídoto CcdA. Neste sentido, o valor obtido neste trabalho, entre o derivado ativo do CcdA (CcdA41) e um análogo peptídico, igualmente ativo do CcdB (CcdBET2),<sup>14</sup> representa o primeiro e único dado disponível, que resulta na quantificação dos níveis de interação, mesmo que entre espécies derivadas, da toxina bacteriana CcdB e o seu antídoto CcdA.

## CONCLUSÃO

CcdBET2 é o primeiro exemplo de um peptídeo sintético derivado da toxina CcdB, com atividade inibitória em topoisomerasas bacterianas, com interação com a antitoxina, a exemplo do sistema natural CcdB-CcdA. Interessante é que uma molécula como o CcdBET2, dimensional e estruturalmente diferente, apresente grande afinidade pela antitoxina. Com os resultados apresentados, é possível especular sobre a importância do *loop* formado pela sequência Arg40-Leu50 em uma relação estrutura-atividade do análogo CcdBET2. O análogo CcdBET3 que, diferentemente do CcdBET2, não inclui o fragmento Arg40-Leu50 na sua estrutura primária, não apresentou interação com a antitoxina. Provavelmente, peptídeos com este fragmento contêm a informação adequada para induzir a formação de um complexo peptídeo-antitoxina estável.

Os ensaios de fluorescência no estado estacionário foram suficientes para concluir a respeito da importância do fragmento Arg40-Leu50 no processo de interação com CcdB. Além disso permitiu, de maneira inédita, a determinação da constante de associação entre uma toxina e a respectiva antitoxina, valores não descritos na literatura até o momento. Também foi possível evidenciar que o uso de pequenos peptídeos contendo fragmentos de CcdA ou CcdB fornece um caminho alternativo para estudar e melhor entender os contatos chave existentes entre as duas proteínas, o que é especialmente importante para o desenho racional de novos inibidores peptídicos de topoisomerasas bacterianas, cuja ação antitóxica do CcdA seja desprezível.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pela FAPESP na forma de auxílio à pesquisa (03/04492-3) e bolsa de IC (07/08052-9 – C. A. Cotrim) e pelo CNPq na forma de bolsas de doutorado (S. S. Garrido e E. Trovatti) e de pesquisa (R. Marchetto).

## REFERÊNCIAS

- Jensen, R. B.; Gerdes, K.; *Mol. Microbiol.* **1995**, *17*, 205.
- Hayes, F.; *Science* **2003**, *301*, 1496; Gerdes, K.; Christensen, S. K.; Lobner-Olesen, A.; *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 371; Engelberg-Kulka, H.; Amitai, S.; Kolodkin-Gal, I.; Hazan, R.; *PLoS Genetics* **2006**, *2*, 1518.; De Bast, M. S.; Mine, N.; van Melderen, L.; *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 4603.
- Dao-Thi, M.-H.; Messens, J.; Wyns, L.; Backmann, J.; *J. Mol. Biol.* **2000**, *299*, 1373.
- Wilbaux, M.; Mine, N.; Guérout, A. M.; Mazel, D.; van Melderen, L.; *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 2712.



5. Ogura, T.; Hiraga, S.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1983**, *80*, 4784.
6. Bernard, P.; Couturier, M.; *J. Mol. Biol.* **1992**, *226*, 735.
7. Loris, R.; Dao-Thi, M.-H.; Bahassi, E. M.; van Melderren, L.; Poortmans, F.; Liddington, R.; Couturier, M.; Wyns, L.; *J. Mol. Biol.* **1999**, *285*, 1667; Dao-Thi, M.-H.; van Melderren, L.; De Genst, E.; Afif, H.; Buts, L.; Wyns, L.; Loris, R.; *J. Mol. Biol.* **2005**, *348*, 1091.
8. Bahassi, E. M.; Salmon, M. A.; van Melderren, L.; Bernard, P.; Couturier, M.; *Mol. Microbiol.* **1995**, *15*, 1031.
9. Bernard, P.; Kèsdy, K. E.; van Melderren, L.; Wyns, L.; Pato, M. L.; Higgins, P. N.; Couturier, M.; *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 534; Madl, T.; van Melderren, L.; Mine, N.; Respondek, M.; Oberer, M.; Keller, W.; Khatai, L.; Zangger, K.; *J. Mol. Biol.* **2006**, *364*, 170.
10. Bernard, P.; Couturier, M.; *Mol. Gen. Genet.* **1991**, *226*, 297.
11. van Melderren, L.; Dao-Thi, M.-H.; Lecchi, P.; Gottesmani, S.; Couturier, M.; Maurizi, M. R.; *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 27730.
12. Afif, H.; Allali, N.; Couturier, M.; van Melderren, L.; *Mol. Microbiol.* **2001**, *41*, 73; Madl, T.; van Melderren, L.; Mine, N.; Respondek, M.; Oberer, M.; Keller, W.; Khatai, L.; Zangger, K.; *J. Mol. Biol.* **2006**, *364*, 170.
13. De Jonge, N.; Buts, L.; Vangelooven, J.; Mine, N.; van Melderren, L.; Wyns, L.; Loris, R.; *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2007**, *63*, 356.
14. Trovatti, E.; Cotrim, C. A.; Garrido, S. S.; Barros, R. S.; Marchetto, R.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 6161.
15. Scatigno, A. C.; Garrido, S. S.; Marchetto, R.; *J. Peptide Sci.* **2004**, *10*, 566.; Garrido, S. S.; Scatigno, A. C.; Trovatti, E.; Carvalho, D. C.; Marchetto, R.; *J. Peptide Res.* **2005**, *65*, 502.
16. Stewart, J. M.; Young, J. D. Em *Solid Phase Peptide Synthesis*; Merrifield, R. B., ed.; Pierce Chemical Company: New York, 1984; Kent, S. B. H.; *Ann. Rev. Biochem.* **1988**, *5*, 957; Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E.; *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*, CRC Press: Boca Raton, 1997.
17. Fields, G. B.; Noble, R. L.; *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1990**, *35*, 161; Chan, W. C.; White P. D.; *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: a Practical Approach*, Oxford University Press: Oxford, 2000.
18. Kaiser, E.; Colescot, R. L.; Bossinge, C. D.; Cook, P. I.; *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595.
19. Borissevitch, I. E.; *J. Lumin.* **1999**, *81*, 219.
20. Lacowicz, J. R.; *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer: New York, 2006.
21. Cui, F. L.; Wang, J. L.; Cui, Y. R.; Li, J. P.; *Anal. Chim. Acta* **2006**, *571*, 175.
22. Ware, W. R.; *J. Phys. Chem.* **1962**, *66*, 455.
23. Behera, P. K.; Mukherjee, T.; Mishira, A. K.; *J. Lumin.* **1995**, *65*, 131.
24. Cui, F. L.; Fan, J.; Li, W.; Fan, Y. C.; Hu, Z. D.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, *39*, 189.