



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA MEDICINAL E
MODELAGEM MOLECULAR**

JÉSSICA DE OLIVEIRA ARAÚJO

**Planejamento de inibidores da enzima 3-deoxy-D-mano-
octulosonato 8-fosfato Sintase (KDO8PS): um novo alvo para
tratamento de infecção bacteriana**

Belém

2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA MEDICINAL E
MODELAGEM MOLECULAR**

JÉSSICA DE OLIVEIRA ARAÚJO

**Planejamento de inibidores da enzima 3-deoxy-D-mano-
octulosonato 8-fosfato Sintase (KDO8PS): um novo alvo para
tratamento de infecção bacteriana**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Química
Medicinal e Modelagem Molecular como
requisito para a obtenção do grau de Mestre em
Química Medicinal e Modelagem Molecular.
Orientador: Prof. Dr. Anderson Henrique Lima e
Lima.
Coorientador: Prof. Dr. Jerônimo Lameira Silva**

Belém

2019

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)**

A658p Araújo, Jéssica de Oliveira
Planejamento de inibidores da enzima 3-deoxy-D-
manooctulose 8-fosfato Sintase (KDO8PS): um novo
alvo para tratamento de infecção bacteriana / Jéssica de
Oliveira Araújo. — 2019.
90 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Anderson Henrique Lima E Lima
Coorientador(a): Prof. Dr. Jerônimo Lameira Silva
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em
Química Medicinal e Modelagem Molecular, Instituto de
Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém,
2019.

1. KDOPS. 2. LPS. 3. Dinâmica Molecular. 4.
Bifosfatados. I. Título.

CDD 541.2

JÉSSICA DE OLIVEIRA ARAÚJO

**Planejamento de inibidores da enzima 3-deoxy-D-mano-
octulosonato 8-fosfato Sintase (KDO8PS): um novo alvo para
tratamento de infecção bacteriana**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Química
Medicinal e Modelagem Molecular como
requisito para a obtenção do grau de Mestre em
Química Medicinal e Modelagem Molecular.
Orientador: Prof. Dr. Anderson Henrique Lima e
Lima.
Coorientador: Prof. Dr. Jerônimo Lameira Silva

Data da Apresentação: 23 / 07 / 2019

Conceito: Aprovada

Banca Examinadora

Prof. Dr. Anderson Henrique Lima e Lima (Orientador – UFPA)

Prof. Dr. Jerônimo Lameira Silva (Coorientador – UFPA)

Prof. Dr. José Rogério de Araújo Silva (Membro Interno – UFPA)

Prof. Dr. Nelson Alberto Nascimento de Alencar (Membro Externo – UNAMA)

Dedicado aos meus pais Cláudia e Zenilso.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e por todas as vitórias, mesmo com todas as dificuldades, e por me proporcionar tantas coisas boas.

Aos meus pais Zenilso e Cláudia, por tudo que passaram por mim, para que eu pudesse chegar até aqui. Sempre me apoiaram e nunca me deixaram desistir.

Ao meu irmão João Paulo, por todo amor e paciência.

Ao Prof. Dr. Anderson Henrique Lima e Lima pela orientação, ensinamentos, e pela confiança em mim depositada para que executasse esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Jerônimo Lameira Silva pela coorientação, por todo apoio e colaboração junto a este trabalho.

A todos os meus amigos do Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos que sempre me apoiaram.

Aos professores José Rogério e Nelson Alencar por terem aceitado o convite de participar desta banca, e por todas as contribuições junto a este trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro concedido durante esse trabalho.

A Universidade Federal do Pará pela oportunidade de cursar um curso de pós-graduação.

E a todos que direta e indiretamente contribuíram com este trabalho.

Muito obrigada!

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”

(Marie Curie)

RESUMO

As bactérias podem ser distintas em dois grupos através da técnica de Gram, onde pode-se diferenciar bactérias Gram positivas e Gram negativas, as principais diferenças entre esses organismos se dão pela estrutura da parede celular, seus componentes e suas funções. O caso de bactérias Gram-negativas é mais preocupante devido ao surgimento de cepas resistentes a vários antibióticos. O lipopolissacarídeo (LPS) é um componente da membrana externa de bactérias Gram-negativas responsável pelas manifestações tóxicas como inflamações. O 3-deoxy-D-manno-octulosonato (KDO) é um componente do sítio do núcleo interno de LPS essencial para sua formação. A reação para produção de KDO requer dois substratos, o fosfoenolpiruvato (PEP) e D-arabinose 5-fosfato (A5P), catalisada pela 3-Deoxy-D-manno-octulosonato de 8-fosfato sintase (KDO8PS). Essa reação é importante pois desempenha um papel crucial na montagem de LPS. Esta enzima encontra-se em duas formas distintas quanto a dependência da presença ou ausência de íon metálico divalente no sítio ativo. Dentre os vários inibidores da KDO8P sintase, foram selecionados dois com base em suas constantes de inibição (K_i). O mais ativo entre eles tem valor de $0,37 \mu\text{M}$ em KDO8P sintase de *E. coli* independente de metal e de $7,9 \pm 1,6 \mu\text{M}$ para KDO8P sintase independente de metal em *N. meningitidis*. Esses valores de K_i são aproximadamente de 2 a 3 vezes maiores do que os valores de K_m para o PEP que também foram utilizados neste trabalho, além de um terceiro inibidor hipotético que combina as principais características dos inibidores já descritos pela literatura. Nesta pesquisa, foram utilizadas técnicas de modelagem por homologia, *Docking* molecular, Dinâmica Molecular e Energia Livre de Ligação com os métodos MMGBA, MMPBSA, SIE e Decomposição de energia por resíduo para analisar o modo de acoplamento desses ligantes e do substrato PEP. Com os resultados obtidos foram analisadas as principais interações que esses ligantes realizam e o comportamento molecular, tanto dos ligantes como da proteína. Portanto, foram obtidos valores de energias livre de ligação mais favoráveis para os complexos formados com o ligante BPH1 com os três métodos $-96,07 \text{ Kcal/mol}$ com MMGBSA, $-107,09 \text{ Kcal/mol}$ com MMPBSA e $-13,53$ com SIE e observou-se que estes complexos realizam um número maior de interações efetivas. Assim, sugere-se que o ligante BPH1 tem um excelente potencial de inibição da atividade catalítica da enzima KDO8P sintase responsável pela produção de KDO, componente essencial de LPS para formação da membrana externa de bactérias Gram-negativas.

Palavras-chave: KDOPS, LPS, Dinâmica Molecular, Bifosfatados.

ABSTRACT

Bacteria can be distinguished in two groups through the Gram technique, where Gram-positive and Gram-negative bacteria can be differentiated, the main differences between these organisms being the structure of the cell wall, its components and its functions. More evidence has emerged of bacteria resistant to antibiotics, the case of Gram-negative bacteria is more worrisome due to the emergence of strains resistant to various antibiotics. Lipopolysaccharide (LPS) is a component of the outer membrane of Gram-negative bacteria responsible for toxic manifestations such as inflammation. 3-Deoxy-D-manno-octulosonate (KDO) is a site component of the inner core of LPS essential for its formation. The reaction for KDO production requires two substrates, phosphoenolpyruvate (PEP) and D-arabinose 5-phosphate (A5P), catalyzed by 8-phosphate synthase 3-Deoxy-D-mannocobluconate (KDO8PS). This reaction is important because it plays a crucial role in the assembly of LPS. This enzyme is in two distinct forms as the dependence of the presence or absence of divalent metal ion in the active site. There are several inhibitors of KDO8P synthase, two were selected based on their inhibition constants (K_i), with BPH1, the most active among them with a value of $0.37 \mu\text{M}$ in KDO8P metal synthase independent in *E. coli* and BPH2 with value of $7.9 \pm 1.6 \mu\text{M}$ for metal-independent KDO8P synthase in *N. meningitidis*, these K_i values are approximately 2 to 3 times higher than the K_m values for PEP that were also used in this work, in addition to a third hypothetical inhibitor that combines the main characteristics of the inhibitors already described in the literature. Molecular Dynamics, Molecular Dynamics and Free Energy of bonding with the methods MMGBA, MMPBSA, SIE and Energy decomposition by residue to analyze the coupling mode of these ligands and the PEP substrate were used. With the results obtained, we analyzed the main interactions of these ligands and the molecular behavior of both the ligands and the protein. Therefore, more favorable binding-free energy values were obtained for the complexes formed with the BPH1 linker with the three methods $-96.07 \text{ Kcal / mol}$ with MMGBSA, $-107.09 \text{ Kcal / mol}$ with MMPBSA and -13.53 with SIE and observed these complexes perform a greater number of effective interactions. Thus, it is suggested that the BPH1 linker has an excellent potential for inhibiting the catalytic activity of the enzyme KDO8P synthase responsible for the production of KDO, essential component of LPS for the formation of the outer membrane of Gram-negative bacteria.

Keywords: KDOPS, LPS, Molecular Dynamic, Bifosfatados.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática do mecanismo de biossíntese do KDO8P a partir do PEP e A5P.....	13
Figura 2 – Estrutura das bactérias.....	16
Figura 3 – Estrutura das bactérias Gram negativas.....	19
Figura 4 – Estrutura dos LPS.....	20
Figura 5 – KDO8P Sintase independente (azul) e dependente (amarela) de metal..	21
Figura 6 – Esquema com as estruturas dos substratos, intermediário e formação do produto, e as estruturas dos ligantes bifosfatados.....	24
Figura 7 – Estrutura obtida com o resultado da modelagem por homologia para KDO8P sintase de <i>N. meningitidis</i>	39
Figura 8 – Alinhamento entre as sequências utilizadas para a modelagem por homologia com 2QKF (modelo) e 1X6U (<i>template</i>).....	40
Figura 9 – Comparação entre os resultados obtidos com o cálculo de <i>redocking</i> molecular para a) os substratos (em azul) e b) o produto da reação KDO8P (em verde) e as estruturas de referência (em cinza).....	42
Figura 10 – Resultado obtido com o <i>docking</i> molecular para os inibidores, a) BPH1, b) BPH2, c) BPH3 e a proteína KDO8P sintase de <i>N. meningitidis</i>	43
Figura 11 – Gráficos de RMSD para os complexos com os inibidores BPH1, BPH2, BPH3 e PEP.....	45
Figura 12 – Gráficos de RMSF para os complexos com os inibidores BPH1, BPH2, BPH3 e PEP.....	46
Figura 13 – Principais interações de hidrogênio e gráficos da decomposição de energia livre por resíduo para o complexo com BPH1.....	49
Figura 14 – Principais interações de hidrogênio e gráficos da decomposição de energia livre por resíduo para o complexo com BPH2.....	51
Figura 15 – Principais interações de hidrogênio e gráficos da decomposição de energia livre por resíduo para o complexo com BPH3.....	54
Figura 16 – Principais interações de hidrogênio e gráficos da decomposição de energia livre por resíduo para o complexo com PEP.....	56
Figura 17 – Superfícies de Potencial eletrostático molecular (MEP) dos inibidores bifosfatados BPH1, BPH2 e BPH3.....	60
Gráfico 1 – Gráfico de Ramachandran.....	40
Gráfico 2 – Energia em função de cada resíduo determinado pelo servidor Anolea..	41
Gráfico 3 – Distâncias entre as interações obtidas entre o BPH1 e a enzima KDO8P sintase.....	50
Gráfico 4 – Distâncias entre as interações obtidas para o BPH2 e a enzima KDO8P sintase.....	52
Gráfico 5 – Distâncias entre as interações obtidas para o BPH3 e a enzima KDO8P sintase.....	55
Gráfico 6 – Distâncias entre as interações obtidas para o PEP.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de ΔG de ligação para todos os sistemas.....	47
Tabela 2 – Valores de distância média das interações de hidrogênio entre os inibidores e a enzima KDO8P sintase e desvios em Å.....	58

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μM	Micromolar
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
AMBER	Construção Assistida de Modelos com Refinamento de Energia (<i>Assisted Model Building with Energy Refinement</i>)
A5P	Arabinose-5-fosfato
BPH1	Ligante bifosfatado 1
BPH2	Ligante bifosfatado 2
BPH3	Ligante bifosfatados 3
DM	Dinâmica Molecular
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
fs	Fentosegundos
GAFF	Campo de força geral do Amber (<i>General Amber Force Field</i>)
GB	Generalized Born
HF	Hartree-Fock
Δ Gligação	Energia Livre de Ligação
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
K	Kelvin
kcal/mol	Quilocaloria por mol
KDO8PS	3-deoxy-D-manno-octulosonato 8-fosfato sintase
KDO	3-deoxy-D-manno-octulosonato
K_i	Constante de inibição
K_m	Constante de Michaelis
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LPS	Lipopolissacarídeos (constituído de um lipídio e um polissacarídeo ligados por uma ligação covalente)
MEP	Molecular Eletrostatic Potencial
MM	Mecânica Molecular
MMGBSA	Molecular Mechanics of Generalized Born Surface Area
MMPBSA	Molecular Mechanics of Poisson-Boltzmann Surface Area
ns	Nanosegundos
PB	Poisson-Boltzmann
PEP	Fosfoenolpiruvato
Pi	Fosfato inorgânico
PDB	Banco de Dados de Proteínas (<i>Protein Data Bank</i>)
ps	Picosegundos
QM	Mecânica Quântica
RMSD	Desvio quadrático médio (<i>Root Mean Square Deviation</i>)
RMSF	Flutuação quadrática média (<i>Root Mean Squared Fuctuation</i>)
SIE	<i>Solvated interaction energy</i>

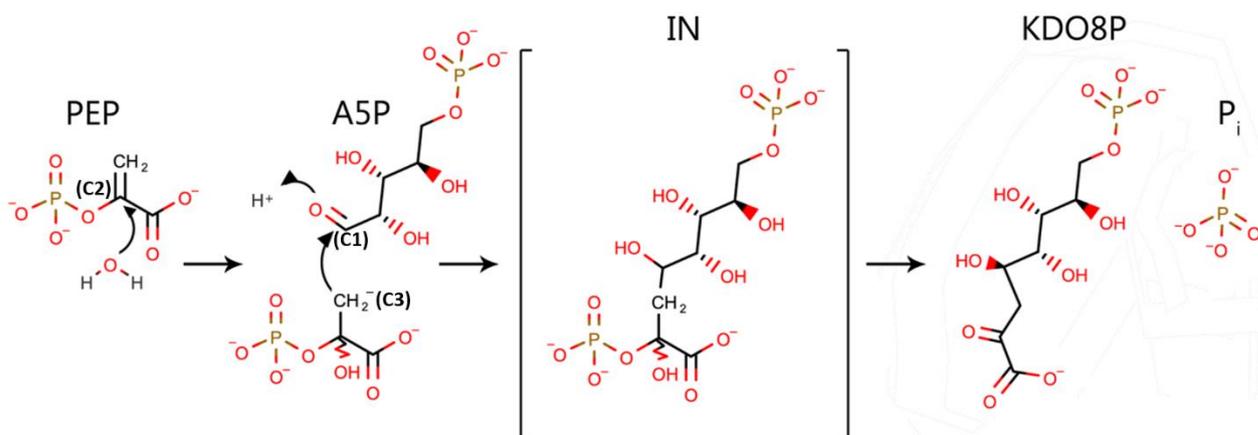
SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1 Bactérias	16
3.2 Resistência bacteriana	17
3.3 Estrutura das bactérias Gram negativas	18
3.4 Lipopolissacarídeo	19
3.5 Enzima 3-Deoxy-D-manno-octulosonato de 8-fosfato sintase	20
3.6 Inibidores.....	22
3.7 Modelagem Molecular.....	24
3.7.1 Modelagem por Homologia	24
3.7.2 <i>Docking</i> Molecular.....	26
3.7.3 Dinâmica Molecular	29
3.7.4 Energia Livre de Ligação – MMGBSA, MMPBSA, SIE e Decomposição de energia livre por resíduo.....	32
3.7.5 Superfície de Potencial Eletrostático Molecular (MEP).....	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Escolha das estruturas.....	35
4.2 Modelagem por Homologia.....	36
4.3 <i>Docking</i> Molecular.....	36
4.4 Dinâmica Molecular e Energia Livre de Ligação.....	36
4.5 Superfície de Potencial Eletrostático Molecular (MEP).....	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 Modelagem por Homologia	39
5.2 <i>Docking</i> Molecular	41
5.3 Dinâmica molecular.....	44
5.4 Energia Livre de Ligação – MMGBSA, MMPBSA e SIE	47
5.5 Decomposição de energia por resíduo.....	48
5.6 Superfície do Potencial Eletrostático Molecular (MEP).....	59
6 CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS	63
APÊNDICES	75

1 INTRODUÇÃO

A 3-deoxy D-manno-octuloso-8-fosfato sintase (KDO8PS) é uma enzima que catalisa a reação entre Fosfoenolpiruvato (PEP) e Arabinose-5-fosfato (A5P). Esta reação é a primeira etapa comprometida da biossíntese de 3-deoxy-D-manno-octuloso (KDO), essa é uma reação enzimática chave que controla o fluxo de carbono na formação biosintética de KDO. A reação envolve um ataque nucleofílico de água em C2 de PEP seguido de um ataque nucleofílico de C3 do PEP no C1, carbono de aldeído, de A5P para formar um açúcar de oito carbonos KDO8P e fosfato inorgânico (Pi) (Figura 1) (AHN et al., 2008; KOHEN et al., 1993; LI et al., 2003b; RAY; BENEDICT, 1980; WANG et al., 2001).

Figura 1 – Representação esquemática do mecanismo de biossíntese do KDO8P a partir do PEP e A5P.



Fonte: adaptado de (LI et al., 2003b).

O KDO é um componente essencial para a formação de lipopolissacarídeos (LPS) e de extrema importância para o núcleo interno. Os LPS se encontram na parede celular de bactérias Gram negativas e são conhecidos como endotoxina promovendo uma resposta antigénica associada a inflamação e septicemia Gram negativas (AHN et al., 2008; RAY; BENEDICT, 1980).

As KDO8P sintases são classificadas em duas classes distintas: pela presença ou ausência de íon metálico divalente para a atividade catalítica (BIRCK; WOODWARD, 2001; DUEWEL; WOODARD, 2000). Quase todos os resíduos do sítio ativo parecem ser conservados em ambas as proteínas, com uma diferença no sítio de ligação do metal. Três resíduos de ligação ao metal se mantêm na enzima

dependente e na independente de metal, no entanto nas KDO8P sintase independente de metal um resíduo Asn é encontrado no lugar de uma Cys de coordenada metálica (ALLISON et al., 2010; DUEWEL et al., 2001; DUEWEL; WOODARD, 2000; LI et al., 2003b; SHULAMI et al., 2003; WANG et al., 2001).

Portanto, a inibição da via de KDO leva a uma alteração grave do crescimento e função, produzindo instabilidade da membrana externa e impedindo a replicação celular. Tais observações, aliadas a presença exclusiva da KDO8P sintase na parede celular de bactérias e ausência em células de mamíferos, associadas ao preocupante aumento na ocorrência de bactérias multirresistentes, sugerem que a enzima KDO8P sintase, da via biosintética de KDO, é um alvo promissor para o planejamento de novos fármacos antimicrobianos que atuam bloqueando a biossíntese de lipopolissacarídeos (ASOJO et al., 2001).

Neste trabalho, foram selecionados dois ligantes bifosfatados (BPH1 e BPH2) inibidores da enzima KDO8P sintase que atuam mimetizando o intermediário da reação enzimática formado pelos substratos (PEP e A5P), além disso foi testado um terceiro inibidor (BPH3) que foi planejado a partir das principais características desses outros dois inibidores e substratos. Esse terceiro inibidor não possui dados experimentais visto que assumimos como um inibidor hipotético, onde foram realizadas simulações computacionais a fim de verificar a afinidade com a enzima quando combinados as características dos dois inibidores já conhecidos (HARRISON; REICHAU; PARKER, 2012).

Para isso, foram utilizados métodos computacionais a fim de realizar o acoplamento correto desses ligantes na cavidade catalítica da enzima KDO8P sintase do organismo independente de metal de *Neisseria meningitidis*, conhecer também o modo de interação desses ligantes e analisar a afinidade dos complexos formados, visto que os inibidores por conter características semelhantes aos substratos, possuem dois grupos fosfatados que derivam deles (HARRISON; REICHAU; PARKER, 2012). Devido os ligantes apresentarem regiões derivadas dos substratos, esses ligantes possuem duas regiões com grupos fosfato, logo possuem cargas negativas. E assim, a partir dos resultados obtidos, contribuir com o desenvolvimento de novos fármacos inibidores da enzima KDO8P sintase.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar as interações entre os inibidores bifosfatados, o substrato Fosfoenolpiruvato e a Enzima KDO8P sintase de *Neisseria meningitidis*.

2.2 Objetivos específicos

- Construir um modelo tridimensional completo da enzima KDO8P sintase independente de metal do organismo de *Neisseria meningitidis* através de modelagem por homologia;
- Analisar o modo de interação dos ligantes bifosfatados e o substrato quando acoplados ao sítio ativo da KDO8P Sintase através de *docking* molecular;
- Descrever o comportamento molecular desses complexos proteína-inibidores e proteína-substrato através de métodos de dinâmica molecular;
- Verificar a espontaneidade energética dos complexos deste estudo por meio de cálculos de energia livre de ligação;
- Identificar as interações intermoleculares específicas entre os inibidores bifosfatados, o substrato e os resíduos de aminoácidos da KDO8P sintase por meio de cálculos de decomposição de energia livre por resíduo;
- Planejar potenciais antibióticos que atuem na via do KDO no processo de biossíntese de LPS.

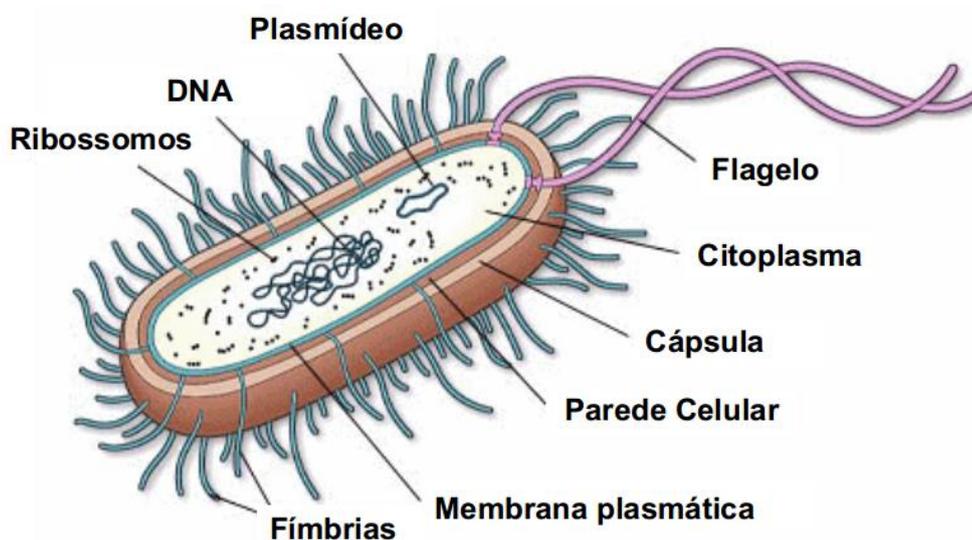
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Bactérias

Bactérias são organismos procariontes e unicelulares de estrutura simples, pertencentes ao reino Monera, de acordo com Robert Harding Whittaker (1920-1980), biólogo norte-americano que propôs em 1969 a classificação dos organismos em cinco diferentes reinos (MURRAY, P.R. et al., 2005). As bactérias possuem organização simples, o tamanho celular pode variar entre 0,2 a 2 μm de diâmetro e 2 a 8 μm de comprimento (KAYSER, 2005; OLIVEIRA, 2017; TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

São constituídas por uma parede celular externa, membrana plasmática, citoplasma, DNA circular disperso no citoplasma sem nenhuma separação, ribossomos para síntese de proteínas e estruturas não essenciais tais como cápsula/glicocálice, flagelo, fímbrias e inclusões (Figura 2). Algumas bactérias podem ter uma membrana externa extra como uma cápsula, que envolve a parede celular, feita de polissacarídeos (MIMS, C.A., et al., 1995; TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

Figura 2 – Estrutura das bactérias.



Fonte: adaptado de TORTORA; FUNKE; CASE, 2012.

As bactérias podem ser distintas em dois grupos, essa divisão se dá por meio da técnica de Gram, que permite à bacteriologia a distinção entre bactérias Gram positivas e Gram negativas. Esses microrganismos podem ser distintos quanto a sua estrutura da parede celular, seus componentes e suas funções. A parede celular de

bactérias Gram negativas é estrutural e quimicamente mais complexa que em Gram positivas (BARBOZA; TORRES, 2005; MURRAY; ROSENTAHL; PFALLER, 2006).

Em bactérias Gram positivas aproximadamente 90% da parede celular corresponde a peptidoglicano, 50% da massa seca da parede celular é representada por proteínas e ácidos teicóicos, que são polímeros que contribuem para a rigidez da parede celular e são formados por cerca de 30 resíduos de glicerol ou ribitol unidos por ligações fosfodiéster e estão também ligados ao peptidoglicano pelo mesmo tipo de ligação (BARBOZA; TORRES, 2005; RYAN; RAY, 2004).

As paredes celulares das bactérias Gram negativas não possuem capacidade de fixar o corante violeta cristal, por isso elas coram em vermelho. Elas são constituídas por peptidoglicano, porém ele constitui uma camada basal delgada, sobre a qual se encontra uma outra camada denominada membrana externa composta por lipoproteínas, fosfolipídios, proteínas e lipopolissacarídeos (KONEMAN et al., 2001; LEVINSON; JAWETZ et al., 1998; OLIVEIRA, 2017).

3.2 Resistência Bacteriana

Tornaram-se cada vez mais frequentes, nas últimas décadas, evidências sobre bactérias resistentes a antibióticos. Ainda que ambas as bactérias Gram positivas e Gram negativas tenham demonstrado padrões de resistência, o caso de bactérias Gram negativas tornou-se mais preocupante devido ao surgimento de cepas resistentes a vários ou mesmo a todos os antibióticos disponíveis, além da falta de novos antibióticos promissores disponíveis (VARDAKAS et al., 2013).

Uma complicação comum entre pacientes imunossuprimidos com câncer que recebem quimioterapia e em pacientes receptores de transplante de células-tronco é a bacteremia, caracterizada pela presença de bactérias na corrente sanguínea. Nas últimas décadas a epidemiologia da bacteremia nesses pacientes mudou com o ressurgimento de bacilos Gram negativos como os principais agentes causadores. O desenvolvimento da resistência entre esses organismos tornou-se um grande problema de saúde pública em todo o mundo e o tratamento de infecções por bactérias Gram negativas multirresistentes é um desafio clínico (C. GUDIOL, et al., 2010).

A *Enterobacteriaceae* é uma família de bactérias Gram negativas muito abundante, o aumento da resistência entre os membros desta família tem culminado no aparecimento cada vez mais frequente de espécies multirresistentes exigindo esforço para prevenção e controle (BORER et al., 2012).

A principal forma de resistência bacteriana é a produção de β -lactamases, que são enzimas que promovem a degradação do anel β -lactâmico, tornando o antimicrobiano inativo e impedindo que ele apresente atividade contra as enzimas responsáveis pela síntese da parede celular bacteriana. Atualmente entre as β -lactamases, o grupo mais preocupante são as β -lactamases de aspecto ampliado e as carbapenemases (SEIBERT et al., 2014).

As carbapenemases possuem disseminação rápida e global, por isso é uma preocupação para os serviços de saúde de todo o mundo. Elas ocorrem mais frequentemente nos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Proteus* e *Morganella* (SEIBERT et al., 2014).

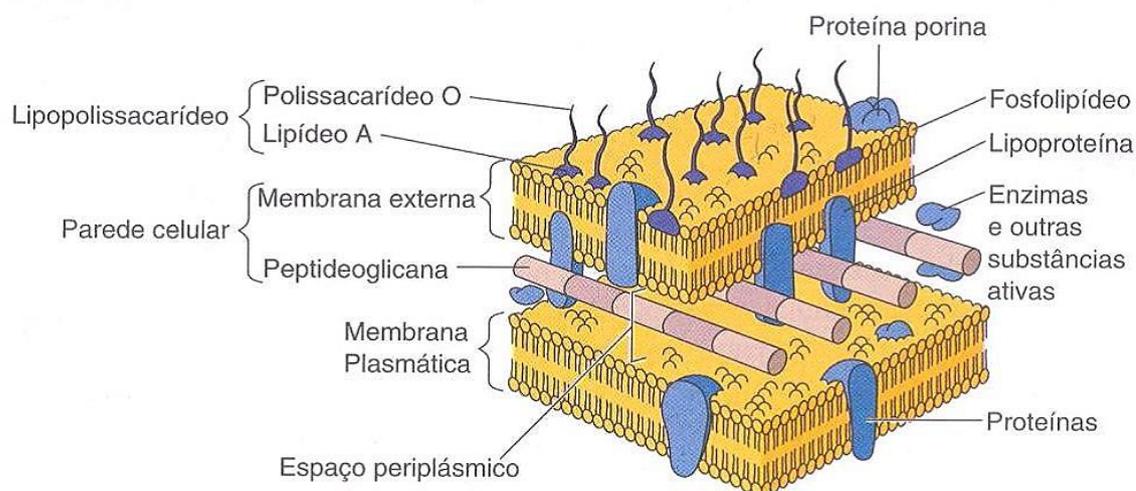
A produção de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) tem se tornado um mecanismo emergente, pois essa enzima confere resistência a todos os agentes β -lactâmicos como as cefalosporinas, penicilinas, monobactâmicos e carbapenêmicos, esta última classe de antimicrobiano é de amplo espectro com uso frequente no tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes. Então para o tratamento de microrganismos produtores de KPC, restam poucas opções terapêuticas (TRAGANTE, et al., 2008; SEIBERT et al., 2014).

3.3 Estrutura das bactérias Gram negativas

Bactérias Gram negativas possuem propriedades químicas, fisiológicas e genéticas peculiares. Formada por poucas camadas de peptidoglicano e por uma membrana externa. O espaço periplasmático, localizado entre a membrana citoplasmática e a membrana externa, é um compartimento que contém alta concentração de enzimas de degradação e proteínas de transporte. O peptidoglicano se encontra ligado a membrana externa da parede através de pequenas lipoproteínas localizadas no espaço periplasmático (VON NUSSBAUM, et al., 2006).

Essa membrana externa possui uma camada dupla. A camada interna é composta por fosfolipídios e proteínas se aproximando da membrana citoplasmática. Possui canais especiais constituído de moléculas proteicas denominadas porinas (proteínas de membrana externa) que permite a difusão passiva de açúcares, aminoácidos e certos íons, enquanto que em sua camada externa é composta por LPS (Figura 3) (MURRAY, et al., 2006).

Figura 3 – Estrutura das bactérias Gram negativas.



Fonte: adaptado de TORTORA; FUNKE; CASE, 2012.

3.4 Lipopolissacarídeo

O lipopolissacarídeo é o principal componente da membrana externa de bactérias Gram negativas, é conhecido também como endotoxina e considerado o principal fator responsável pelas manifestações tóxicas de infecções por bactérias Gram negativas bem como por inflamação sistêmica (ZÄHRINGER, et al., 1999).

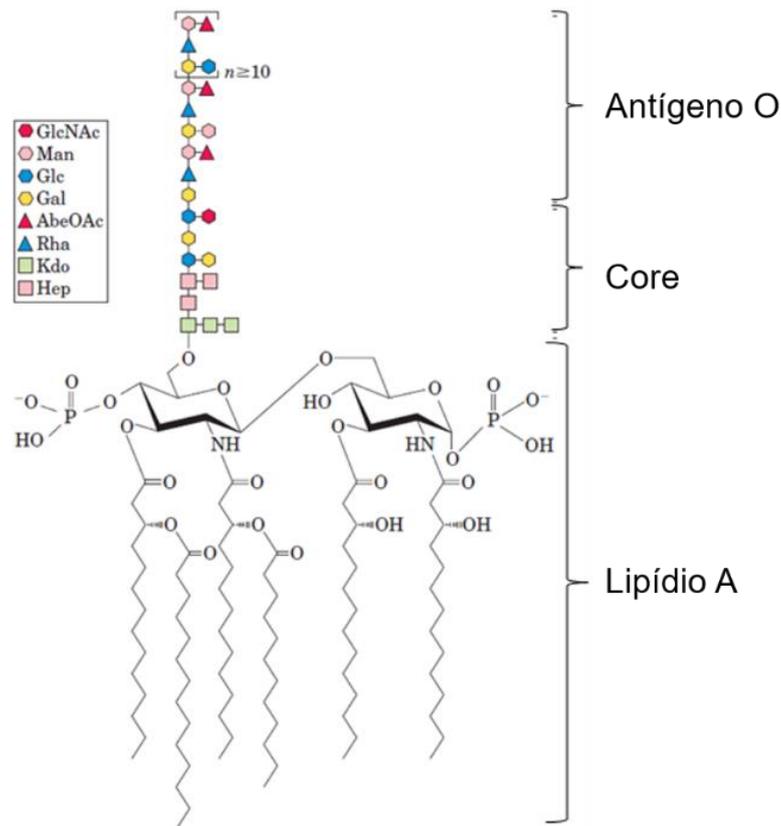
Os LPS contribuem para a integridade estrutural da bactéria e protege a membrana de ataques químicos. Sua estrutura é composta por duas camadas de açúcar e uma camada lipídica, apresentando uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica, respectivamente. A porção lipídica é considerada a responsável pela maior ação antigênica do LPS. O 3-deoxy-D-manno-octulose-8-fosfato (KDO) é um componente do sítio do núcleo interno de LPS essencial para a sua formação (RAETZ; WHITFIELD, 2002).

A reação de condensação entre fosfoenolpiruvato (PEP) e D-arabinose 5-fosfato (A5P) é catalisada pela 3-Deoxy-D-manno-octulose-8-fosfato sintase (KDO8PS) para gerar 3-Deoxy-D-manno-octulose-8-fosfato (KDO8P), precursor fosforilado de KDO, e fosfato inorgânico (Pi), esta reação é o primeiro passo comprometido na biossíntese de KDO (AHN et al., 2008).

Esta reação é importante pois controla o fluxo de carbono na formação biosintética de KDO, que desempenha um papel crucial na montagem de lipopolissacarídeos (LIANG et al., 1998). Além disso, KDO fornece uma ligação entre o lipídeo A, a porção da membrana interna do LPS e o Antígeno O, uma cadeia

polissacarídica que se alonga da membrana externa bacteriana para o ambiente circundante e determina a especificidade antigênica da célula. Enquanto que a composição do Antígeno O varia de acordo com as espécies e cepas existentes. A região do core, núcleo interno, que contem KDO é bastante comum entre as bactérias Gram negativas (Figura 4) (ANDERSON, et al., 1983; INOUYE, 1979).

Figura 4 – Estrutura dos LPS.



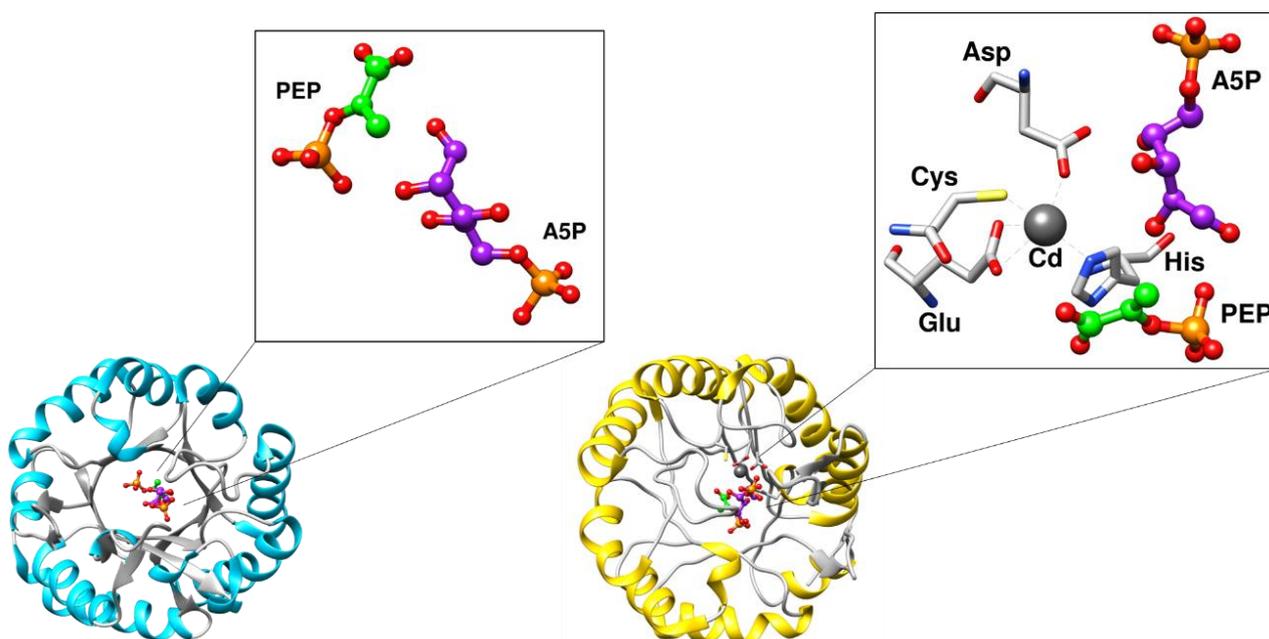
Fonte: adaptado de TORTORA; FUNKE; CASE, 2012.

3.5 Enzima 3-Deoxy-D-manno-octulosonato de 8-fosfato sintase

Como a enzima KDO8P sintase, que fornece função essencial para a homeostase bacteriana, é essencial para formação de KDO, que conseqüentemente é necessário para a viabilidade dos LPS, associado ao fato da KDO8P sintase não está presente em sistemas mamíferos. Torna a inibição da biossíntese de LPS, que interrompe o crescimento celular através da inibição da KDO8P sintase, um alvo atraente para o desenvolvimento de novos antibióticos (ALLISON et al., 2011a; KONA et al., 2009; LI et al., 2003b).

Esta enzima se apresenta em duas formas distintas, quanto a dependência da presença ou ausência de íon metálico divalente no sítio ativo (Figura 5). As KDO8P sintases de *Escherichia coli* e *Neisseria meningitidis* se apresentam independentes da presença de metal, enquanto que as de *Aquifex aeolicus*, *Aquifex pyrophilus*, *Helicobacter pylori* e *Chlamydia psittaci* se apresentam dependentes de metal (BIRCK; WOODARD, 2001; DUEWEL et al., 2001; WANG et al., 2001).

Figura 5 – KDO8P Sintase independente (azul) e dependente de metal (amarela).



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

As estruturas de ambos os tipos de KDO8P sintases, tanto dependentes quanto independentes de metal, cristalizam como homotetrâmeros com subunidades de barril-TIM (β/α)₈ (do inglês, *Triose Fosfato Isomerase*) contendo quatro sítios ativos independentes. Em bioquímica o barril-TIM é uma estrutura de dobra proteica conservada que consiste em oito α -hélices e oito β -folhas paralelas que se alternam ao longo da cadeia peptídica (ASOJO et al., 2001; COCHRANE et al., 2009; DUEWEL et al., 2001; SCHOFIELD et al., 2005; SHUMILIN et al., 2004; WANG et al., 2001).

Os monômeros de KDO8P sintase apresentam estruturas de barril-TIM comum com extensões entre as β - α que se estendem a extremidade do C-terminal e formam o sítio ativo da enzima. O conjunto quaternário é a forma funcional desta enzima, a ligação de PEP é realizada através de interações com resíduos próximos ao centro

do barril, enquanto que três longas alças (L2, L7 e L8) criam o sítio de ligação para A5P e suportam contatos intersubunitários entre o tetrâmero (ALLISON et al., 2013).

Quase todos os resíduos do sítio ativo na maioria das enzimas KDO8P sintase são conservados, com apenas uma pequena diferença no sítio de ligação do metal, três dos quatro resíduos que coordenam o metal são conservados na proteína tanto dependentes quanto independentes de metal (DUEWEL; WOODARD, 2000; WANG et al., 2001). Entretanto, a análise da sequência de KDO8P sintase mostram que o quarto resíduo, uma Cys, de todas as proteínas dependentes de metal, é substituído por uma Asn em proteínas independentes de metal. Alguns trabalhos mostram que é possível converter as KDO8P sintase dependentes de metal em independentes de metal e vice-versa com mutações Cys-Asn e Asn-Cys (COCHRANE et al., 2009; DUEWEL; WOODARD, 2000; KONA et al., 2007; LI et al., 2004; OLIYNYK et al., 2004; SHULAMI et al., 2004).

O papel do metal parece ser estrutural, pois ele organiza e posiciona os resíduos do sítio ativo e o substrato A5P, que pode ser feito de forma equivalente com a cadeia lateral da Asn, indicando que este é o motivo da dependência de metal. Tornando a capacidade de se ligar ao metal totalmente dispensável, é provável que ambas as KDO8P sintase apresentam um mecanismo de reação comum e que o metal, quando presente, apresenta um papel estrutural e não catalítico (AHN et al., 2005; JENSEN et al., 2002).

A estrutura tridimensional da KDO8P sintase depositada no Banco de Dados de Proteínas (PDB) sob o código 2QKF (COCHRANE et al., 2009) do organismo de *Neisseria meningitidis* que é independente de metal, se apresenta cristalografada em tetrâmero com as subunidades que contem seus sítios ativos independentes, as regiões que contém as alças L2, L7 e L8 não conseguem ser cristalografada sem a presença dos substratos A5P e PEP (ALLISON et al., 2011c).

3.6 Inibidores

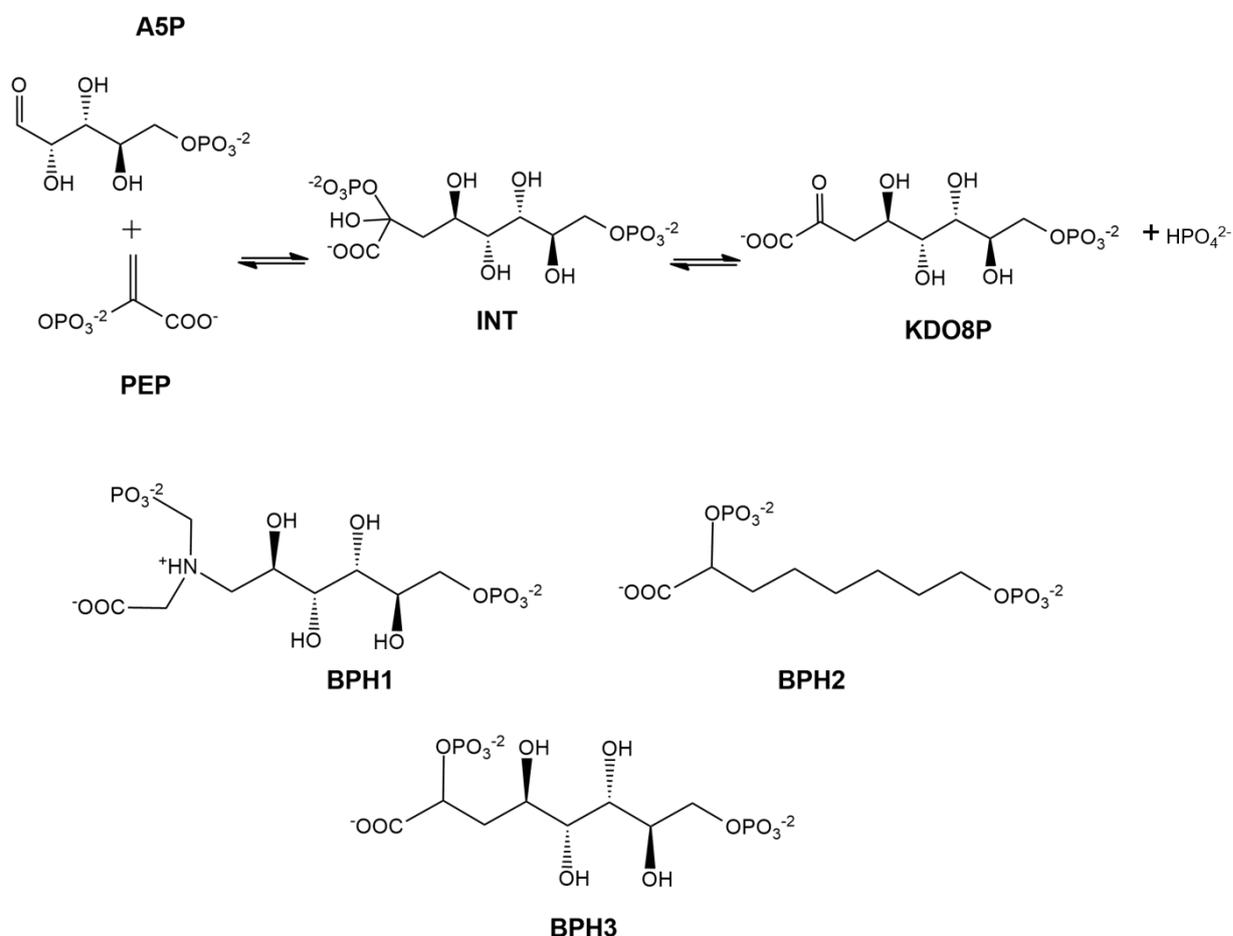
Vários inibidores da KDO8P sintase foram testados e estudados, o mais ativo deles é o ligante bifosfatado 1 (BPH1) desenhado para mimetizar o íon oxocarbênio intermediário com a constante de inibição (K_i) de 0,37 μM em KDO8P sintase independente de metal em *E. coli* (DU et al., 1999). O trabalho experimental de Harrison descreve mimetizadores do intermediário tetraédrico para a inibição da KDO8P sintase em *N. meningitidis*, estes compostos apresentam espaçamento

apropriado e as principais características dos substratos, como as cargas de carboxilato e fosfato derivadas de PEP e o grupo fosfato derivado de A5P (Figura 5) (DU et al., 1997; SHEFFER-DEE-NOOR et al., 1993; XU et al., 2003; BELAKHOV et al., 2004).

A escolha desses inibidores foi feita com base nas constantes de inibição, visto que o ligante BPH1 apresenta melhores valores de constantes de inibição de 0,37 μM para KDO8P sintase de *E. coli*, e o ligante BPH2 apresenta valores de constante de inibição de $7,9 \pm 1,6 \mu\text{M}$ para KDO8P sintase independente de metal em *N. meningitidis*, esses valores de K_i são aproximadamente de 2 a 3 vezes maiores do que os valores de K_m para o PEP em ambas as proteínas, tornando o BPH2 o segundo inibidor mais potente de KDO8P sintase, atrás somente do BPH1 (HARRISON et al., 2012; SILVA et al., 2018).

O terceiro ligante deste trabalho foi escolhido de acordo com as principais características dos dois primeiros inibidores, para este ligante não foi encontrado nenhum valor de constante de inibição experimental pois foi criada como uma molécula hipotética chamada de BPH3, então utilizamos os parâmetros obtidos para os dois inibidores anteriores e fizemos comparações a nível teórico. Esse inibidor conta com o mesmo espaçamento e características do BPH2 e adicionamos ainda os grupos hidroxilas do ligante BPH1 que derivam conseqüentemente do substrato A5P (Figura 6) afim de conhecer a influência desses grupos no modo de interação e afinidade com a enzima KDO8P sintase.

Figura 6 – Esquema com as estruturas dos substratos, intermediário e formação do produto, e as estruturas dos ligantes bifosfatados.



Fonte: Adaptado de (HARRISON; REICHAU; PARKER, 2012).

3.7 Modelagem Molecular

3.7.1 Modelagem por Homologia

A modelagem de proteínas é uma alternativa de se obter informações estruturais se as técnicas experimentais falharem. Muitas proteínas, por exemplo, são muito grandes para análise e não podem ser cristalizadas por difração de raio X. Então o objetivo final da modelagem de proteínas é prever uma estrutura da sua sequência com uma precisão que é comparável aos melhores resultados obtidos experimentalmente, o que permite os usuários utilizarem com segurança os modelos de proteínas gerados *in silico* (KRIEGER; NABUURS; VRIEND, 2005).

Um dos métodos mais bem-sucedidos de predição de estruturas tridimensionais de proteínas é a modelagem por homologia, baseada em alguns

padrões gerais e fundamentada na hipótese de que sequências de aminoácidos similares implicam em estrutura e função similar em diferentes proteínas, mesmo que estas sejam isoladas de diferentes organismos (LEACH, 2001).

Alguns dos padrões gerais da modelagem por homologia observados é que a homologia entre sequências de aminoácidos implica em semelhança estrutural e de função, proteínas homólogas apresentam regiões internas conservadas principalmente constituídas por estruturas secundárias: α -hélices e β -folhas, e as principais diferenças estruturais entre proteínas homólogas ocorrem nas regiões externas, constituídas principalmente por alças (*Loops*)(D'ALFONSO; TRAMONTANO; LAHM, 2001; GINALSKI, 2006; ROST; SANDER, 1996).

Além disso, a modelagem por homologia baseia-se no conceito de evolução molecular, partindo do princípio de que as semelhanças entre as estruturas primárias desta proteína e de proteínas homólogas de estruturas tridimensionais conhecidas resulta em similaridade estrutural entre elas. O método de modelagem por homologia é constituído em quatro passos sucessivos: identificação e seleção de proteínas moldes; alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos; construção das coordenadas do modelo e por último a validação dos resultados (FILHO, 2003; JOHNSON et al., 1994; KRIEGER; NABUURS; VRIEND, 2005).

No primeiro passo é importante ser selecionado pelo menos uma estrutura tridimensional conhecida, que servirá como molde para a construção da proteína-problema. Quando se conhece a família proteica a qual a proteína-problema pertence é suficiente selecionar uma proteína-molde diretamente do Banco de dados de Proteínas (PDB). Já quando não se sabe a família da proteína-problema é necessário procurar de forma sistemática um ou mais moldes adequados em um banco de dados de estruturas primárias derivadas de proteínas armazenadas do PDB (FILHO, 2003; GINALSKI, 2006).

Após isso, definindo o molde, faz-se o alinhamento de sequências, a proteína-problema com a proteína-molde, com o objetivo de alinhar os resíduos de aminoácidos estruturalmente equivalentes levando em conta características estruturais como elementos de estrutura secundária e resíduos catalíticos. As regiões de *gaps* são regiões vazias, que correspondem a estruturas de “alças” (FILHO, 2003).

A geração de coordenadas cartesianas se divide em três partes, com a modelagem das regiões estruturalmente conservadas com a construção da parte

interna da proteína-problema baseado na ideia de que a conformação da cadeia principal da proteína-molde pode ser transferida para ela (FILHO, 2003; KRIEGER; NABUURS; VRIEND, 2005).

A modelagem das regiões de alças é uma etapa essencial para a geração de modelos, as alças geralmente são pequenas e provocam distorções de enovelamento difíceis de avaliar inicialmente, além disso a conformação das regiões de alças é influenciado pelo restante da proteína o que resulta que as regiões de alças devem ter baixa energia interna e não interagir desfavoravelmente com o restante da proteína, então as alças modeladas são selecionadas de acordo com a exposição de grupos hidrofóbicos na superfície e a necessidade de baixas energias conformacionais relativas (FILHO, 2003; FISER; DO; SALI, 2000; LEACH, 2001).

Para a modelagem de cadeias laterais, assim como as alças, são modeladas a partir de dados estéricos e energéticos de estruturas semelhantes obtidas experimentalmente, a modelagem é realizada com auxílio de bancos de dados de rotâmeros permitidos de cadeias laterais derivados de estruturas terciárias do PDB de alta resolução (FILHO, 2003; LEACH, 2001).

A otimização do modelo gerado é necessária após a construção do modelo da proteína-problema, interações desfavoráveis entre átomos não-ligados e as energias de ângulos torcionais e de ligação são otimizadas por mecânica molecular, esta otimização não pode ser extensiva para não desviar o sistema do seu molde original, então a etapa de otimização e validação devem ser realizadas simultaneamente (FILHO, 2003; LEACH, 2001).

Por fim, a validação do modelo deve avaliar a qualidade do empacotamento global da proteína, os possíveis erros estruturais e os parâmetros estereoquímicos. Alguns requisitos que uma proteína modelada deve atender é ter uma estrutura terciária satisfatória, e sua qualidade depende da proteína molde e do alinhamento calculado. O gráfico de Ramachandran é útil pois ele define os resíduos que se encontram em regiões energeticamente mais favoráveis e desfavoráveis e orienta a avaliação da qualidade dos modelos (FILHO, 2003; JOHNSON et al., 1994; PETREY; HONIG, 2005).

3.7.2 Docking Molecular

O cálculo de *docking* (ou ancoramento) molecular (do inglês "*molecular docking*") vem ajudando a compreensão do modo de interação entre macromoléculas,

principalmente proteínas, e moléculas menores que podem atuar como substratos ou inibidores em determinados processos fisiológicos, tornando possível entender mecanismos e processos celulares (VERLI, 2014). Informações sobre as conformações de compostos bioativos, interações entre proteínas e substratos ou inibidores, e a estimativa da força de ligação, são obtidas com os cálculos de *docking* molecular, auxiliando pesquisas de novos compostos de partida, e auxiliam ainda na direção da síntese de compostos derivados (LI et al., 2003).

Uma aplicação de *docking* molecular é projetar inibidores *in silico*, os candidatos podem ser encontrados usando um algoritmo de busca que tenta identificar o modo de ligação ideal de uma molécula pequena (ligante) ao sítio ativo de uma macromolécula alvo (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006b). Assim, o intuito da descoberta de fármacos é utilizar derivados de drogas que se ligam mais fortemente, do que o substrato natural, a uma determinada proteína alvo. Quando isso é feito, a reação bioquímica que a proteína alvo catalisa pode ser alterada ou interrompida. Ainda se a estrutura 3D da proteína alvo é conhecida, o ancoramento molecular vem a ser uma ferramenta útil no processo de descoberta desses derivados. O *docking* molecular permite uma identificação rápida e barata de candidatos promissores a fármacos (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006a).

Os métodos de *docking* molecular normalmente utilizam funções de pontuação baseada em energia, buscando identificar conformações do ligante com energia mais favorável quando ligada ao alvo. Portanto, a tarefa do *docking* molecular é encontrar o modo de ligação do ligante com mais baixa energia (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006a).

Atualmente existem vários programas de *docking* molecular, comerciais e gratuitos, como o GOLD, FlexX, AutoDockTools, Glide, DockThor, Molegro Virtual Docker, entre outros (ARAÚJO, 2017; FRIESNER et al., 2004; KRAMER; RAREY; LENGAUER, 1999; NISSINK et al., 2002; RAREY et al., 1996; THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006a).

Quando levamos em consideração a flexibilidade do ligante aumenta o número de conformações, e o número de possíveis interações a serem considerados. Para lidar com esses problemas, e uma flexibilidade eficiente é necessário algoritmos de busca. O MolDock faz parte do programa de *docking* molecular, *Molegro Virtual Docker* (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006a), e é baseado em um algoritmo de busca

híbrida chamado de evolução diferencial guiada que combina técnica de otimização de evolução diferencial com um algoritmo de previsão de cavidades que permite uma identificação rápida e precisa dos modos de ligação (poses) (ANDRICOPULO; OLIVA, 2008; KITCHEN et al., 2004).

Em meio a todos os programas de *docking*, o *Molegro Virtual Docker* foi utilizado neste trabalho, a função de pontuação do MolDock é estendida com um novo termo levando em consideração a direcionalidade das ligações de hidrogênio. Além disso, é aplicado um procedimento de reclassificação às poses melhores classificadas, com o intuito de aumentar ainda mais a precisão. Essas poses são reclassificadas usando uma função de pontuação mais complexa, além dos termos dessa função, um termo de torção sp^2-sp^2 e um potencial de Lennard Jones são usados, além do que esta função de pontuação apresenta alta acurácia na predição conformacional (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006a).

Essa função de pontuação ($E_{moldock}$) é definida pelos seguintes termos de energia (1):

$$E_{moldock} = E_{inter} + E_{intra} \quad (1)$$

Onde E_{inter} é a energia de interação intermolecular, entre o ligante e a proteína alvo, enquanto que E_{intra} é a energia intramolecular calculada somente para o ligante.

A energia E_{inter} é obtida através da equação (2):

$$E_{inter} = \sum_{i=ligante} \sum_{j=receptor} \left[E_{PLP}(r_{ij}) + 332,0 \frac{q_i q_j}{4r_{ij}^2} \right] \quad (2)$$

Onde temos primeiramente o somatório do número de átomos do ligante e da proteína, respectivamente, o termo E_{PLP} é um potencial linear que utiliza dois parâmetros, um que faz referência a tensões estéricas entre os átomos (van der Waals) e o outro é um forte potencial para determinar ligações de hidrogênio. Os termos $q_i q_j$ são as cargas dos átomos i e j (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006a).

Já o termo E_{intra} é obtido através da equação (3):

$$E_{intra} = \sum_{i=ligante} \sum_{j=receptor} [E_{PLP}(r_{ij})] + \sum_{Lig. Flexíveis} A[l - \cos(m\theta - \theta_0)] + E_{clash} \quad (3)$$

Os dois primeiros somatórios são para todos os pares de átomos do ligante, com exceção dos pares que estão conectados por duas ligações. O segundo termo

refere-se a energia torcional, parametrizado de acordo com os tipos de hibridação dos átomos ligados, onde θ é o ângulo de torção da ligação. O último termo E_{clash} é atribuído um valor 1000 se a distância entre dois átomos for menor que 2,0 Å (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006a).

3.7.3 Dinâmica Molecular

A Dinâmica Molecular (DM) é uma técnica onde se estudam, através de simulações, movimentos em um sistema de partículas. Além disso, a DM é um procedimento que computa o movimento dos átomos em uma molécula, átomos individuais, ou moléculas em sólidos, líquidos e gases, de acordo com as leis de movimento de Newton. Assim a DM resulta na variação do comportamento molecular em função do tempo (VERLI, 2014).

Neste método pode-se calcular propriedades moleculares em sistemas com macromoléculas, o que tem contribuído em diversos estágios do processo que envolve o planejamento de fármacos. A maioria dos estudos computacionais com biomoléculas, utilizam a equação Newtoniana, fundamentada com os princípios da mecânica clássica, consiste na resolução numérica das equações de movimento, que para sistemas atômicos simples sua forma simplificada, também conhecida como segunda lei de Newton, pode ser descrito por (4) (ADCOCK; MCCAMMON, 2006):

$$f_i = m_i a_i = m_i \ddot{r}_i \quad (4)$$

onde f_i é a força atuante na partícula i , m_i é a massa da partícula, a_i é a sua aceleração e \ddot{r}_i é a segunda derivada da posição r da partícula em relação ao tempo.

Para o átomo i com massa m_i e posição indicada pelo vetor tridimensional r_i , a relação entre a velocidade e o momento do átomo p_i é (ADCOCK; MCCAMMON, 2006) (5,6):

$$\frac{dr_i}{dt} = \frac{p_i}{m_i} \quad (5)$$

$$f_i = - \frac{dV}{dr_i} \quad (6)$$

A força f_i exercida sobre o átomo i pelo restante do sistema é determinada pelo gradiente negativo da função energia potencial em relação as coordenadas atômicas.

Partindo desta equação, quando se integra as equações de movimento, pode-se obter as velocidades, que por sua vez, integrando-se resulta a mudança de posição do átomo, com novas posições e velocidades para cada átomo, pode se obter a energia potencial e cinética do sistema. Repetindo sucessivamente esse procedimento resulta no que se denomina “trajetória”, que é um conjunto de posições e velocidades de cada átomo ao longo do tempo.

Essa integral das equações de movimento é feita passo-a-passo no tempo, denominado de passos de integração, e é feito através do uso de algoritmos que por sua vez devem apresentar baixo custo computacional, permitir o uso de grandes intervalos de tempo e conservar a energia do sistema (KARPLUS; MCCAMMON, 2002).

O algoritmo de Verlet é bastante utilizado para esses procedimentos, ele usa expansões de Taylor (7) (VERLET, 1967):

$$r_i(t \pm \Delta t) = r_i(t) \pm v_i(t)\Delta t + \frac{F_i(t)}{m_i} \frac{(\Delta t)^2}{2!} \pm \frac{\dot{F}_i(t)}{m_i} \frac{(\Delta t)^3}{3!} + 0[(\Delta t)^4] \quad (7)$$

Assim, o seu somatório gera o algoritmo para propagação das posições (8),

$$r_i(t + \Delta t) = 2r_i(t) - r_i(t - \Delta t) + \frac{F_i(t)}{m_i} (\Delta t)^2 + 0[(\Delta t)^4] \quad (8)$$

e suas diferenças geram o algoritmo para propagação das velocidades (9),

$$v_i(t) = \frac{r_i(t + \Delta t) - r_i(t - \Delta t)}{2\Delta t} + 0[(\Delta t)^3] \quad (9)$$

Nessas equações Δt representa o passo de tempo, $F_i(t)$ é a força sobre o átomo i no tempo t , e m_i é a massa desse mesmo átomo. Resolvendo o algoritmo de Verlet para cada átomo a cada passo teremos a dinâmica molecular implementada. As derivadas espaciais de cada termo potencial e somadas para se obter a força resultante e a aceleração, sobre cada átomo e a cada novo conjunto de coordenadas. As acelerações são inseridas em um algoritmo, como o de Verlet, para previsão das novas posições e em seguida o processo se repete (KARPLUS; MCCAMMON, 2002).

Após se obter as expressões necessárias para tratar o movimento dos núcleos, deve considerar as condições para realizar a simulação, essas condições devem ser selecionadas pela natureza do sistema em estudo. Além disso, uma importante

condição de trabalho é a disponibilidade de dados experimentais para realizar comparações (LINDAHL, 2008).

Mesmo desprezando os efeitos quânticos, o sucesso da DM em reproduzir resultados satisfatórios, se dá ao uso dos campos de força, que são parâmetros utilizados para moléculas pequenas e podem descrever também o comportamento de macromoléculas como proteínas. Para se obter bons resultados de DM é necessário um bom potencial para descrever o problema, logo é necessário a escolha de um bom campo de força. Os campos de força contêm funções potenciais empíricas, ou seja, nele possui informações precisas e calibradas obtidas experimentalmente e através de cálculos quânticos sobre as moléculas do sistema em estudo, algumas dessas informações do campo de força compreendem equações que descrevem ligações covalentes, ângulos de ligação entre átomos, ângulos de rotação, interações entre átomos não ligados, atrações e repulsões de cargas, entre outros (ADCOCK; MCCAMMON, 2006).

O comprimento de uma simulação pode ser determinado por vários fatores, incluindo o custo de avaliar interações, o número de interações que precisa ser avaliada a cada passo de tempo, período desse passo de tempo e número de graus de liberdade que precisa ser propagada. Para um aumento na eficiência na simulação computacional qualquer um desses fatores podem ser melhorados, inúmeros algoritmos podem ser utilizados para aumentar a estabilidade e aumentar a eficiência das simulações de DM, uma dessas melhorias na eficiência são obtidas através do congelamento dos modos de vibração mais rápidos, restringindo os átomos de hidrogênios a comprimentos fixos utilizando algoritmos como o SHAKE (ADCOCK; MCCAMMON, 2006; RYCKAERT; CICCOTTI; BERENDSEN, 1977; VAN GUNSTEREN; BERENDSEN, 1977).

O uso desse algoritmo permite a utilização de tamanhos de escalas de tempo maiores sem quantidade significativa de degradação na qualidade da trajetória ou na precisão da simulação. O algoritmo SHAKE é uma modificação direta no algoritmo de Verlet para impor restrições nas coordenadas internas, como comprimentos e ângulos de ligação (ADCOCK; MCCAMMON, 2006).

As análises das simulações de DM devem ser realizadas, de preferência, observando as principais mudanças no comportamento desse sistema. As simulações devem alcançar uma estabilidade paralela ao tempo, podendo apresentar alguma

variação no início da simulação, mas que deve atingir um caráter de estabilidade após um tempo de simulação e se manter neste nível de estabilidade até o final da produção de DM.

3.7.4 Energia Livre de Ligação – MMGBSA, MMPBSA, SIE e Decomposição de energia livre por resíduo

Para previsões das afinidades de ligação em um sistema proteína-ligante é fundamental a compreensão de aspectos termodinâmicos de reconhecimento molecular em sistemas biológicos (BROWN; MUCHMORE, 2006; HOU et al., 2003; HOU; GUO; XU, 2002; HOU; YU, 2007; KUHN; KOLLMAN, 2000; LEPSÍK; KRÍZ; HAVLAS, 2004; STOICA; SADIQ; COVENEY, 2008; WANG; KOLLMAN, 2001). Os métodos *Molecular Mechanics Generalized Born Surface Area* (MM-GBSA) e *Molecular Mechanics Poisson-Boltzman Surface Area* (MM-PBSA) tem apresentado sucesso em vários complexos proteínas-ligantes e tem sido amplamente utilizado em cálculos de energia livre, ambos os métodos estão relacionados visto que os dois aplicam o solvente implícito em seus modelos de solvatação. Nestes métodos a energia livre de um complexo (RL) formado por um receptor (R) e um ligante (L) é calculada por (KOLLMAN et al., 2000) (10-12):

$$\Delta G_{\text{ligação}} = \Delta H - T\Delta S \approx \Delta E_{MM} + \Delta G_{sol} - T\Delta S \quad (10)$$

$$\Delta E_{MM} = \Delta E_{\text{internal}} + \Delta E_{\text{electrostatic}} + \Delta E_{vdw} \quad (11)$$

$$\Delta G_{sol} = \Delta G_{PB/GB} + \Delta G_{SA} \quad (12)$$

onde ΔE_{MM} é a alteração da energia MM da fase gasosa e inclui $\Delta E_{\text{internal}}$ com energias de ligação, e ângulo diédrico. ΔG_{sol} é a soma de energia livre de solvatação eletrostática que inclui contribuição polar $\Delta G_{PB/GB}$, $-T\Delta S$ é a mudança de entropia conformacional, geralmente calculada pela análise de modo normal de um conjunto de estruturas retirados da simulação de DM. $\Delta E_{\text{electrostatic}}$ é a eletrostática, ΔE_{vdw} é a energia de Van der Waals. ΔG_{SA} é o componente de solvatação não eletrostática que inclui contribuição não polar. A contribuição polar é calculada usando o modelo GB ou PB, enquanto que a contribuição não polar é estimada pela área de superfície acessível ao solvente (SASA)(HOU et al., 2011).

O método SIE (do inglês, *Solvated interaction energy*) através de uma contribuição de energia de interação E_{inter} , e uma contribuição de energia livre de

dessolvatação ΔG_{dissol} , aproxima a energia livre de ligação em solução aquosa (SULEA; PURISIMA, 2012). Cada uma dessas contribuições é composta ainda por um componente eletrostático e um componente não polar (13),

$$\Delta G_{ligação} \approx E_{inter} + \Delta G_{dissolv} = E_{inter}^{col} + \Delta G_{dissolv}^R + E_{inter}^{vdw} + \Delta G_{dissol}^{np} \quad (13)$$

Então, a componente eletrostático inclui a energia de interação intermolecular de Coulumb E_{inter}^{col} , e a energia de dessolvatação $\Delta G_{dissolv}^R$, devido a mudança de energia do campo de reação após a ligação. A componente não polar inclui a energia de interação intermolecular de Van der Waals E_{inter}^{vdw} , e a energia livre não polar de dessolvatação ΔG_{dissol}^{np} , no que resulta da troca de interações Van der Waals do soluto e o solvente, e no trabalho de manter a cavidade do soluto em água (NAÏM et al., 2007).

A decomposição da energia livre de ligação é utilizada para avaliar, a nível atômico, a contribuição de cada resíduo para a energia livre total da ligação, é calculado utilizando o método MMGBSA com pacote de programas AMBER 16 (CASE et al., 2005; CASE et al., 2016; KOLLMAN et al., 2000). Essa energia de interação entre o ligante e cada resíduo da proteína, utilizando o método MMGBSA, é descrito por (14):

$$\Delta G_{ligante-resíduo} = \Delta E_{elet} + \Delta E_{vdw} + \Delta G_{polar} + \Delta G_{non-polar} \quad (14)$$

onde ΔE_{elet} , é a contribuição eletrostática, e ΔE_{vdw} de Van der Waals em vácuo, ΔG_{polar} é a solvatação polar, e $\Delta G_{non-polar}$ não polar.

3.7.5 Superfície de Potencial Eletrostático Molecular (MEP)

Os mapas de Potencial Eletrostático Molecular (MEP, *Molecular Electrostatic Potential*, em inglês) apresenta as distribuições de cargas em torno de moléculas. Este mapa é muito útil para compreender regiões de ataque nucleofílico e eletrofílico para o estudo de reações no processo de reconhecimento biológico e interações de hidrogênio (LUQUE, F.J.; LOPEZ, J.M.; OROZCO, 2000). Os MEPs são ferramentas que utilizam a densidade eletrônica para prever a capacidade de atrair ou repelir outras moléculas (OKULIK; H JUBERT, 2005).

Uma vantagem da utilização dos mapas MEP é que eles são observáveis computacionalmente, os valores obtidos para os diferentes potenciais eletrostáticos nas superfícies são representados por diferentes cores. O potencial aumenta na ordem de vermelho, laranja, amarelo, verde e azul, onde azul representa a maior energia eletrostática e o vermelho representa a menor energia de potencial eletrostático e cores intermediárias representam potenciais intermediários (CHIDAN KUMAR et al., 2014). Os mapas MEPs tridimensionais utilizam normalmente superfícies de van der Waals, o que facilita a identificação de regiões positivas e negativas de uma determinada molécula (CRAMER, 2004).

O potencial eletrostático molecular negativo corresponde a uma atração de prótons pela densidade eletrônica agregados a molécula como os elementos eletronegativos nitrogênio e oxigênio, enquanto que o potencial eletrostático molecular positivo corresponde a uma repulsão de prótons pelos núcleos atômicos principalmente nos átomos de hidrogênio e carbono. Esses valores de potencial eletrostático são em grande parte responsável pela ligação do substrato para sítios de ligação do receptor, uma vez que o receptor e os ligantes reconhecem um ao outro pela superfície molecular (MORO; BACILIERI; SPALLUTO, 2005).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Escolha das estruturas

Este trabalho se inicia com a escolha da enzima KDO8P sintase da bactéria *Neisseria meningitidis* cujo sua estrutura tridimensional está depositada sob o código 2QKF no banco de dados de proteínas (*Protein Data Bank*, PDB) (COCHRANE et al., 2009). Esta proteína contém a estrutura em tetrâmero, porém foi selecionada somente a cadeia A. A estrutura cristalográfica da proteína 2QKF apresenta o monômero com resíduos de aminoácidos numerados de 1 a 277, e apresenta as regiões das alças ausentes, devido à dificuldade de ser obtida por difração de raios-X sem a presença dos substratos (COCHRANE et al., 2009).

A estrutura do ligante BPH1 foi retirado do banco de dados PDB sob o código 1G7V (ASOJO et al., 2001), que contém o inibidor complexado a enzima KDO8P sintase de *Escherichia coli*. Já o ligante BPH2 foi desenhado tridimensionalmente de acordo com os dados experimentais obtidos a partir do estudo de Harrison (HARRISON; REICHAU; PARKER, 2012). Assim como o ligante anterior, o BPH3 foi desenhado a partir da adição dos grupos hidroxilas, utilizando o programa Avogadro 1.1.0 (HANWELL et al., 2012).

As estruturas desses ligantes foram submetidas a cálculos de otimização de estrutura utilizando o programa Gaussian09 (FRISCH et al., 2009) objetivando encontrar uma estrutura mais estável energeticamente, corrigindo os erros de distâncias, ângulos, e torções entre os átomos da estrutura garantindo a estabilidade do composto utilizado. As otimizações moleculares foram realizadas com o método Hartree-Fock (HF) (LEVINE, 1991) para determinação de funções de onda e energia no estado fundamental de sistemas quânticos de muitos corpos, além disso é base da teoria do orbital molecular que diz que cada movimento do elétron pode ser descrito por uma simples função que não depende explicitamente do movimento instantâneo dos outros elétrons, e é o ponto de partida para os outros métodos *ab initio*. Juntamente com este método foi usado o conjunto de base 6-31G* (LEVINE, 1991; MARTINEZ, 2017; ROOTHAAN, 1951).

A estrutura do substrato PEP foi retirada do banco de dados de proteínas PDB sob o código 1G7U (ASOJO et al., 2001) da enzima de KDO8P sintase de *Escherichia coli*, e foi otimizada utilizando o mesmo método e função de base dos inibidores.

4. 2 Modelagem por homologia

A estrutura da proteína 2QKF (COCHRANE et al., 2009) foi submetida a modelagem por homologia devido sua estrutura tridimensional estar incompleta, as regiões que precisavam ser modeladas são dos resíduos 53-72, 200-218 e 237-257 onde se localizam os *loops* L2, L7 e L8. A sequência obtida no banco de dados PDB foi submetida ao servidor SWISS-MODEL (ARNOLD et al., 2006; WATERHOUSE et al., 2018) a fim de gerar a estrutura completa da proteína do organismo de *Neisseria meningitidis*, a escolha do “molde” foi feita com base nas regiões de *loops*, assim escolhendo-se como proteína-molde a KDO8P sintase de *Escherichia coli* (código 1X6U) que encontra-se complexada com o produto da reação da KDO8P sintase (VAINER et al., 2005a). O SWISS-MODEL (ARNOLD et al., 2006) é um servidor automatizado de modelagem por homologia que utiliza uma estrutura 3D de uma proteína obtida experimentalmente (*template*) para gerar um modelo 3D de uma proteína (alvo).

4. 3 Docking Molecular

Com os ligantes já otimizados, BPH1 retirado do complexo com a proteína de *Escherichia coli*, o BPH2 obtido a partir de literatura, BPH3 desenhado de acordo com as informações teóricas, o PEP retirado também do complexo com a proteína de *Escherichia coli*, e a proteína 2QKF (COCHRANE et al., 2009) modelada de *Neisseria meningitidis*, foram realizados os cálculos de *docking* molecular com o programa Molegro Virtual Docker (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006a), para o acoplamento desses ligantes e do substrato no sítio ativo da enzima KDO8P sintase de *Neisseria meningitidis* a fim de analisar o comportamento desses ligantes quando complexados a enzima e o modo de encaixe, visto que eles são miméticos ao intermediário da reação apresentando regiões que contém os grupos fosfatados derivados dos substratos A5P e PEP. Com os resultados obtidos com o *docking* molecular, foram realizados os cálculos de dinâmica molecular.

4. 4 Dinâmica Molecular e Energia Livre de Ligação

Para investigar o modo de interação dos inibidores e do substrato, realizou-se cálculos de dinâmica molecular utilizando o pacote de programas AMBER 16 (do inglês, *Assisted Model Building with Energy Refinement*) (CASE et al., 2005; CASE et

al., 2016). Os sistemas foram preparados utilizando os programas Antechamber e tLEaP implementados no pacote de programas AMBER 16 (CASE et al., 2005). Primeiramente os ligantes foram submetidos a parametrização pelo Antechamber preparando propriedades de cargas, coordenadas dos ligantes e os parâmetros de ligações, ângulos, diedros, entre outros.

A enzima KDO8P sintase obtida com a modelagem por homologia foi preparada e renumerada, utilizando somente uma cadeia que contém o sítio ativo, onde os estados de protonação dos resíduos de aminoácidos da proteína foi determinado pelo servidor online H++ (ANANDAKRISHNAN; AGUILAR; ONUFRIEV, 2012; GORDON et al., 2005) à pH 7 e analisado com o programa de visualização Chimera (PETTERSEN et al., 2004).

Então, os complexos proteína-ligante foram formados pelo tLEaP como arquivos de entrada para as simulações no AMBER 16, utilizando o campo de força geral do amber GAFF (WANG et al., 2004) (do inglês, *General Amber Force Field*) empregado para os ligantes, enquanto que o AMBER ff14SB (HORNAK et al., 2006) foi empregado para a proteína. Ainda no tLEaP, os complexos foram solvatados em uma caixa d'água de formato cúbico, a distância entre a parede da caixa e dos átomos dos sistemas solvatados foi de 12,0 Å, utilizando condições periódicas de contorno, com moléculas de água do tipo TIP3P (JORGENSEN et al., 1983). Por fim, foram adicionados íons Na⁺ a fim de neutralizar as cargas dos sistemas.

Antes das simulações de dinâmica molecular, todos os sistemas foram submetidos a quatro etapas de minimização para que os sistemas cheguem a um mínimo de energia local e eliminem colisões atômicas, nestas etapas foram utilizados dois métodos, o *steepest-descent* e o método de gradiente conjugado, onde no primeiro é ideal para a remoção de contatos em conformações com energia excessivamente alta, em contrapartida é ineficiente se o objetivo é encontrar um mínimo local de energia potencial, para isso o método de gradiente conjugado é utilizado (ADCOCK; MCCAMMON, 2006).

Na primeira etapa todas as moléculas de água e contra íons foram minimizados por 4000 ciclos com *steepest-descent* e 4000 ciclos com gradiente conjugado totalizando 8000 ciclos para esta etapa, em seguida todos os átomos de hidrogênio da proteína foram minimizados por 3000 ciclos com o método *steepest-descent* seguidos de 2000 de gradiente conjugado, os átomos de hidrogênio das moléculas de

água foram minimizados por mais 4000 ciclos de *steepest-descent* e 4000 de gradiente conjugado, e por fim todo o sistema foi minimizado por 5000 ciclos com *steepest-descent* e 5000 de gradiente conjugado com 10000 ciclos.

Finalizada as etapas de minimização, iniciou-se o aquecimento do sistema durante 200 picosegundos (ps) de dinâmica molecular com o intuito de aumentar de forma gradual a temperatura de 0 a 300 K. Todos os sistemas foram equilibrados para então começar a produção de 100 nanosegundos (ns) de dinâmica molecular com pressão 1 atm e temperatura constantes (300 K). O algoritmo SHAKE (RYCKAERT; CICCOTTI; BERENDSEN, 1977) foi usado para manter os átomos de hidrogênio em suas distâncias de equilíbrio pré-definidas durante as minimizações, permitindo a utilização de passos de integração de 2 fs para a realização de cálculos da dinâmica. Por fim, utilizou-se raio de corte (*cutoff*) de 8,0 Å para diferenciar as interações de longa distância.

Os gráficos de desvio médio quadrático (do inglês, *Root Mean Square Deviations, RMSD*) foram gerados para as trajetórias de 100 ns, de todos os complexos deste estudo após as simulações de dinâmica molecular, além disso foi gerado também o gráfico de flutuações médias quadráticas (do inglês, *Root Mean Square Fluctuations, RMSF*) para se obter as flutuações de cada resíduo da proteína.

Após análise da estabilidade dos complexos através do gráfico de RMSD, foi gerado para o último 1 ns de dinâmica molecular com 1000 frames, a determinação das energias livre de ligação para os sistemas submetidos a cálculos pelos métodos MMGBSA, MMPBSA, SIE e decomposição de energia livre por resíduo. Este tempo de simulação consiste em 1000 frames onde a energia foi computada a cada 2 frames o que representa 500 frames para obtenção da energia livre de ligação.

4. 5 Superfície de Potencial Eletrostático Molecular (MEP)

Para analisar a influência da KDO8P sintase nas superfícies de potencial eletrostático dos inibidores durante as simulações de DM, determinamos a superfície de potencial eletrostático molecular (MEP) para o BPH1, BPH2 e BPH3, em um ambiente proteico. As superfícies foram obtidas a nível M06-2X/6-31G(d) (HOHENSTEIN; CHILL; SHERRILL, 2008; ZHAO; TRUHLAR, 2008) utilizando estruturas de *single point*, essas estruturas foram os últimos pontos da simulação de DM, onde essas superfícies correspondem a um valor de isodensidade de 0,002au.

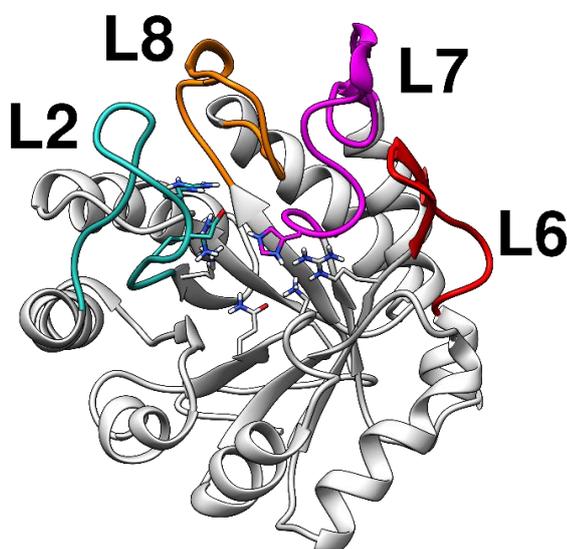
O MEP foi calculado utilizando o programa Gaussian09 (FRISCH, 2009), os mapas tridimensionais foram gerados utilizando o programa Molekel 5.4 (VARETTO).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Modelagem por Homologia

A modelagem por homologia é um método que fornece modelos estruturais nos casos em que não há estruturas experimentais disponíveis. Após submetido a sequência da proteína obtida do PDB sob o código 2QKF (COCHRANE et al., 2009), foi possível obter o modelo gerado pelo servidor SWISS-MODEL (ARNOLD et al., 2006). A proteína utilizada como *template* foi selecionada com o código 1X6U (VAINER et al., 2005b). As regiões que precisavam ser construídas na modelagem abrangeram os resíduos 53-72, 200-218 e 237-257 onde se localizam os *loops* L2, L7 e L8, respectivamente (Figura 7).

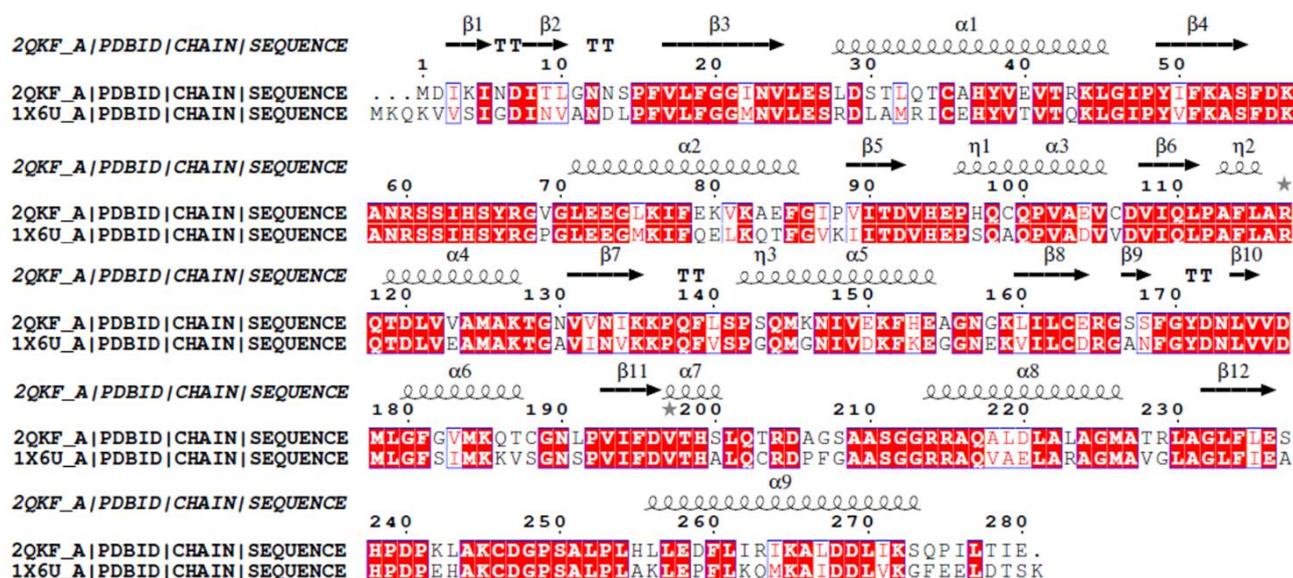
Figura 7 – Estrutura obtida com o resultado da modelagem por homologia para KDO8P sintase de *N. meningitidis*.



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

O melhor modelo resultou na escolha do *template* com a sequência depositada no banco de dados PDB sob o código 1X6U (VAINER et al., 2005b) para construir o modelo 3D. O alinhamento entre essas duas sequências apresentou 71,22% de identidade (Figura 8). O modelo gerado possui diversos resíduos conservados em outras KDO8P sintases.

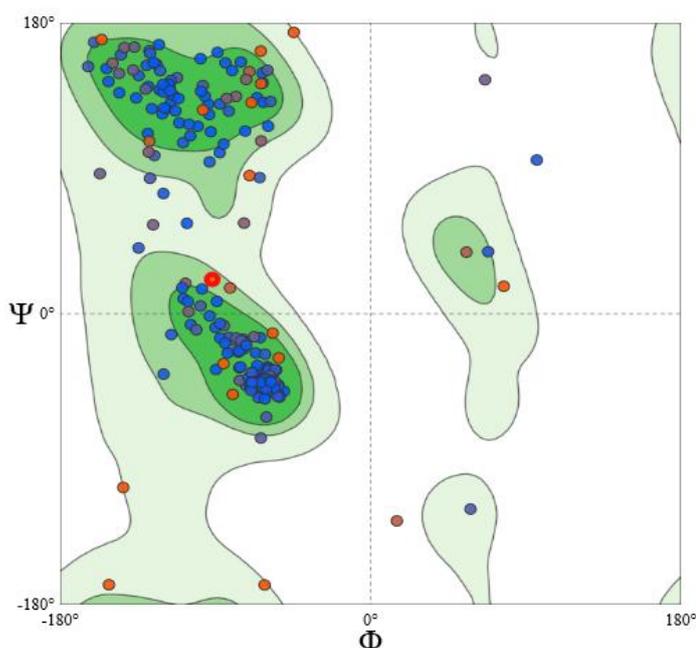
Figura 8 – Alinhamento entre as seqüências utilizadas para a modelagem por homologia com 2QKF (modelo) e 1X6U (*template*).



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

O modelo obtido é caracterizado por uma alta qualidade estereoquímica avaliada utilizando o PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993) e Anolea (MELO et al., 1997). O gráfico de Ramachandran (Gráfico 1) mostrou que 91,82% de resíduos nas regiões mais favoráveis, 2,6% de resíduos nas regiões permitidas, e 4,41% nas regiões não permitidas.

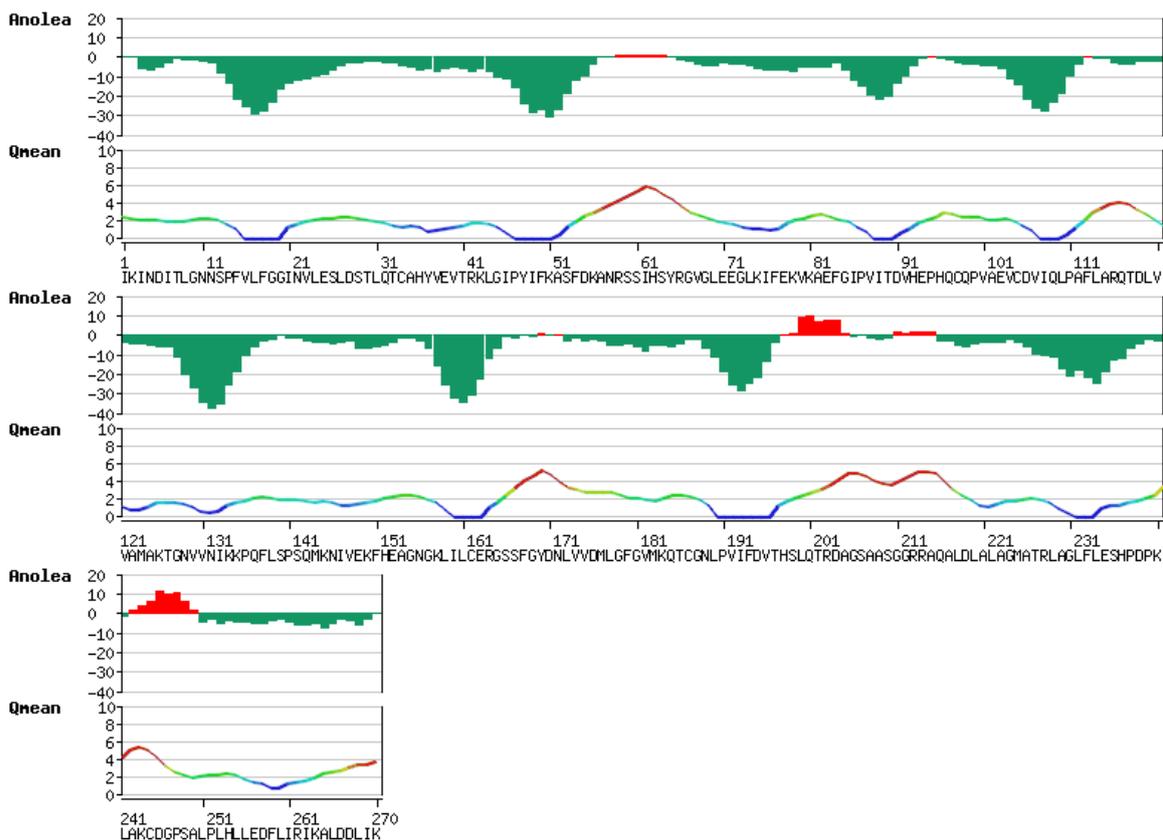
Gráfico 1 – Gráfico de Ramachandran.



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

Desta forma, as energias obtidas considerando cada resíduo de aminoácido encontram-se em grande parte, em regiões favoráveis (Gráfico 2). A maioria das regiões que se encontram com energias menos favoráveis e se apresentam em vermelho no gráfico, são as regiões das alças na proteína, responsáveis pela orientação dos substratos, bem como a saída de produtos.

Gráfico 2 – Energia em função de cada resíduo determinado pelo servidor Anolea.



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

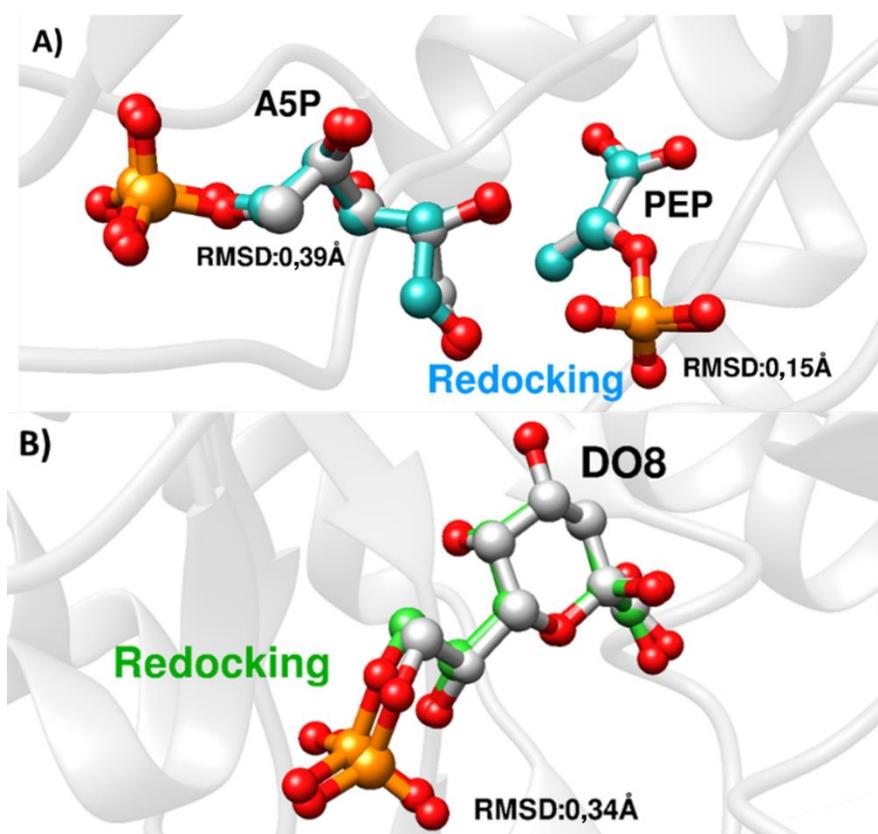
Então, com os resultados obtidos para a proteína modelada encontra-se dentro da margem padrão (KRIEGER; NABUURS; VRIEND, 2005), o modelo obtido com a modelagem por homologia é um bom ponto de partida para o estudo de *docking* e dinâmica molecular para investigar as interações entre os inibidores bifosfatados assim como o substrato PEP quando complexados a KDO8P sintase do organismo independente de metal de *N. meningitidis*.

5.2 Docking Molecular

A fim de avaliar os parâmetros utilizados para os cálculos de *docking* molecular para os ligantes deste estudo, primeiramente foi adotado a técnica de *redocking*

molecular (reacoplamento molecular) que consiste em acoplar o ligante oriundo da estrutura experimental e compará-lo ao resultado obtido por meio do algoritmo de busca utilizado no *docking* (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006a). Neste caso, o A5P e o PEP foram reacoplados ao sítio ativo da proteína KDO8P sintase de *Aquifex Aeolicus* (PDB: 1FWW)(KONA et al., 2009), além deles foi realizado a *redocking* também para o KDO8P (PDB: 1X6U) (VAINER et al., 2005b). Os desvios médios quadráticos (RMSD) obtidos para esses ligantes com os cálculos de *redocking* foram 0,39 Å, 0,15 Å e 0,34 Å respectivamente, comprovando que houve uma pequena variação do resultado obtido em comparação com o ligante de referência (Figura 9).

Figura 9 – Comparação entre os resultados obtidos com o cálculo de *redocking* molecular para a) os substratos (em azul) e b) o produto da reação KDO8P (em verde) e as estruturas de referência (em cinza).

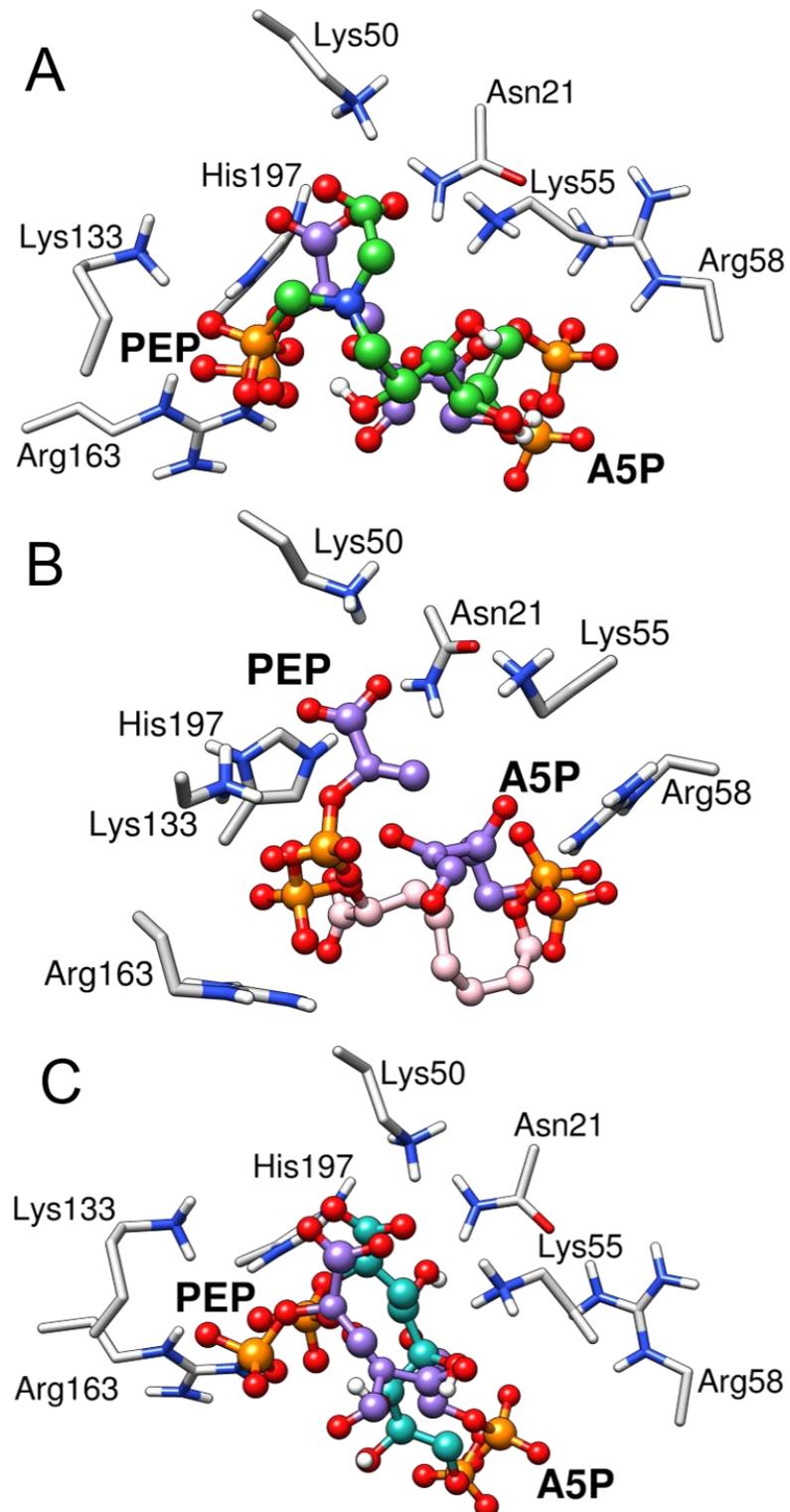


Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

Em seguida, com a proteína modelada obtida a partir da homologia do organismo de *N. meningitidis* foram realizados cálculos de *docking* molecular para os ligantes BPH1, BPH2 e BPH3. Os resultados obtidos para esses ligantes apresentaram excelentes padrões de ancoragem, em que, as regiões que possuem

semelhanças com o PEP conseguiram reproduzir as interações de hidrogênio com os resíduos catalíticos.

Figura 10 – Resultado obtido com o *docking* molecular para os inibidores, A) BPH1, B) BPH2, C) BPH3 e a proteína KDO8P sintase de *N. meningitidis*.



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

Como os inibidores bifosfatados (BPH1, BPH2 e BPH3) apresentam semelhanças estruturais com os substratos A5P e PEP, e com o produto KDO8P, os resultados obtidos para esses ligantes e a proteína foram comparados com os substratos (PDB: 1FWW) (KONA et al., 2009). Assim, verifica-se que a forma como os inibidores foram acoplados se assemelha com a forma em que os substratos estão localizados no sítio ativo da KDO8P sintase homóloga de *Aquifex aeolicus* (Figura 10).

O modo de interação de BPH1, BPH2 e BPH3 ao sítio ativo de KDO8P sintase são os mesmos que a porção fosfato do substrato PEP, o grupo fosfato de BPH1 interage com os resíduos Lys133 e Arg163 enquanto que o grupo carboxilato deste mesmo inibidor interage com os resíduos Lys50, Lys55 e His197 que também interage com o grupo fosfato da porção PEP e é conhecida também por coordenar o íon divalente em KDO8P sintase dependente de metal (ALLISON et al., 2011b). Os inibidores BPH2 e BPH3 interagem de forma semelhante, diferindo apenas na interação com o resíduo Lys50, onde há uma interação mais curta com o grupo carboxilato de BPH3 e com BPH2 essa interação não acontece. Já as interações com os grupos fosfato são essencialmente as mesmas que a da porção PEP.

Com os resultados dos cálculos de *redocking* e *docking* molecular mostram que o protocolo utilizado para esses ligantes conseguiu descrever o modo correto de encaixe em comparação com os substratos obtidos do banco de dados de proteínas. Entretanto, para uma análise mais acurada dessas interações e o comportamento desses complexos são necessárias simulações de DM. A partir disso, com esses resultados, foi possível expandir os estudos para esta classe de compostos bifosfatados, as estruturas resultantes dos cálculos de *docking* molecular foram utilizadas como ponto de partida para o cálculo de DM.

5.3 Dinâmica molecular

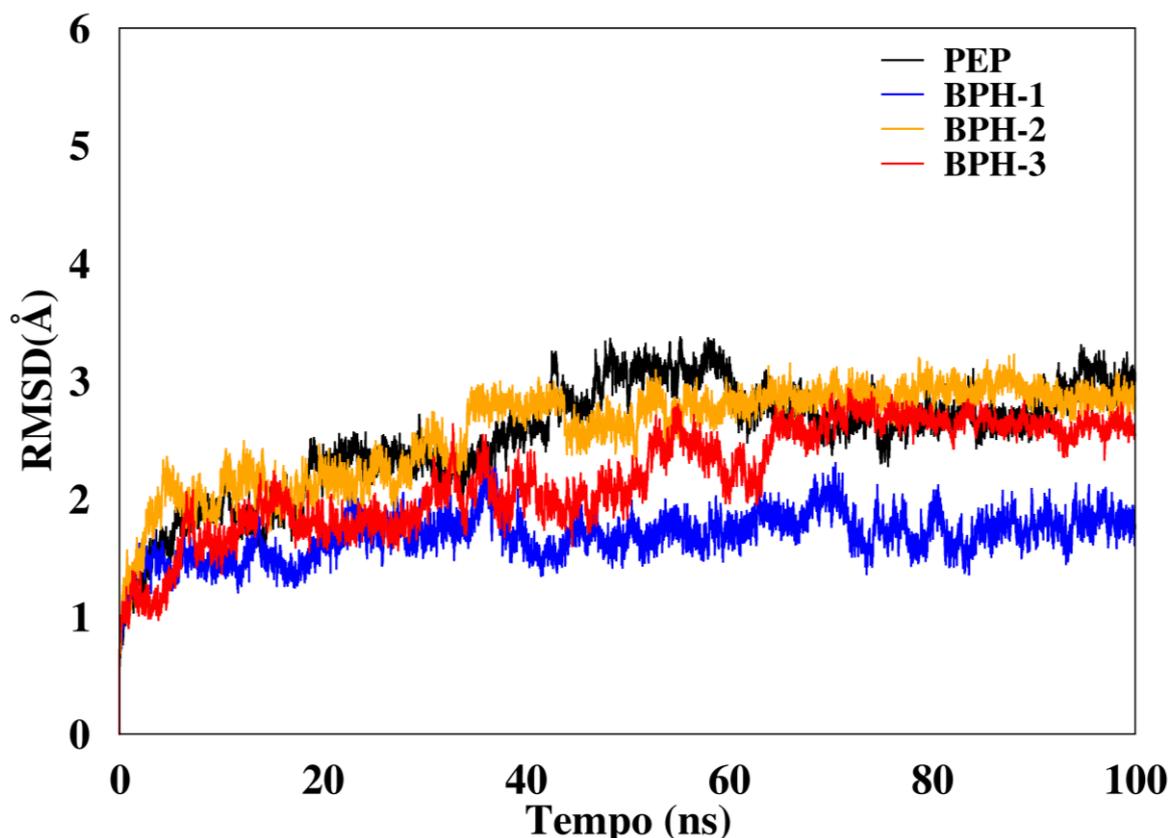
Para todos os sistemas, contendo os inibidores BPH1, BPH2, BPH3 e o substrato PEP, foram realizadas 100ns de dinâmica molecular para análise estrutural e energética desses complexos. O sistema com o substrato PEP foi utilizado para fim de comparação com as interações com o grupo fosfato derivado deste substrato.

As análises dos sistemas formados com os inibidores e substrato e a enzima KDO8P sintase de *Neisseria meningitidis* partem com os gráficos de RMSD ao longo

dos 100ns de DM para os complexos formados entre a enzima KDO8P sintase e os inibidores BPH1, BPH2, BPH3 e o substrato PEP (Figura 11), onde revela um comportamento estável para esses sistemas, com alguns desvios.

O resultado destacou maior estabilidade para o complexo BPH1-KDO8P sintase em azul, em comparação com os outros complexos com BPH2-KDO8P sintase em laranja, BPH3-KDO8P sintase em vermelho e PEP-KDO8P sintase em preto. Os valores de RMSD chegam a aproximadamente 3,5 Å, os maiores desvios são para o sistema com o substrato PEP devido ao número de interações que esse substrato realiza em comparação com os inibidores. Por outro lado, o ligante BPH2 apresenta maior flexibilidade do que os ligante BPH1 e BPH3. Porém, seu comportamento se assemelha com o ligante BPH3, evidenciado na Figura 11.

Figura 11 – Gráficos de RMSD para os complexos com os inibidores BPH1, BPH2, BPH3 e PEP.

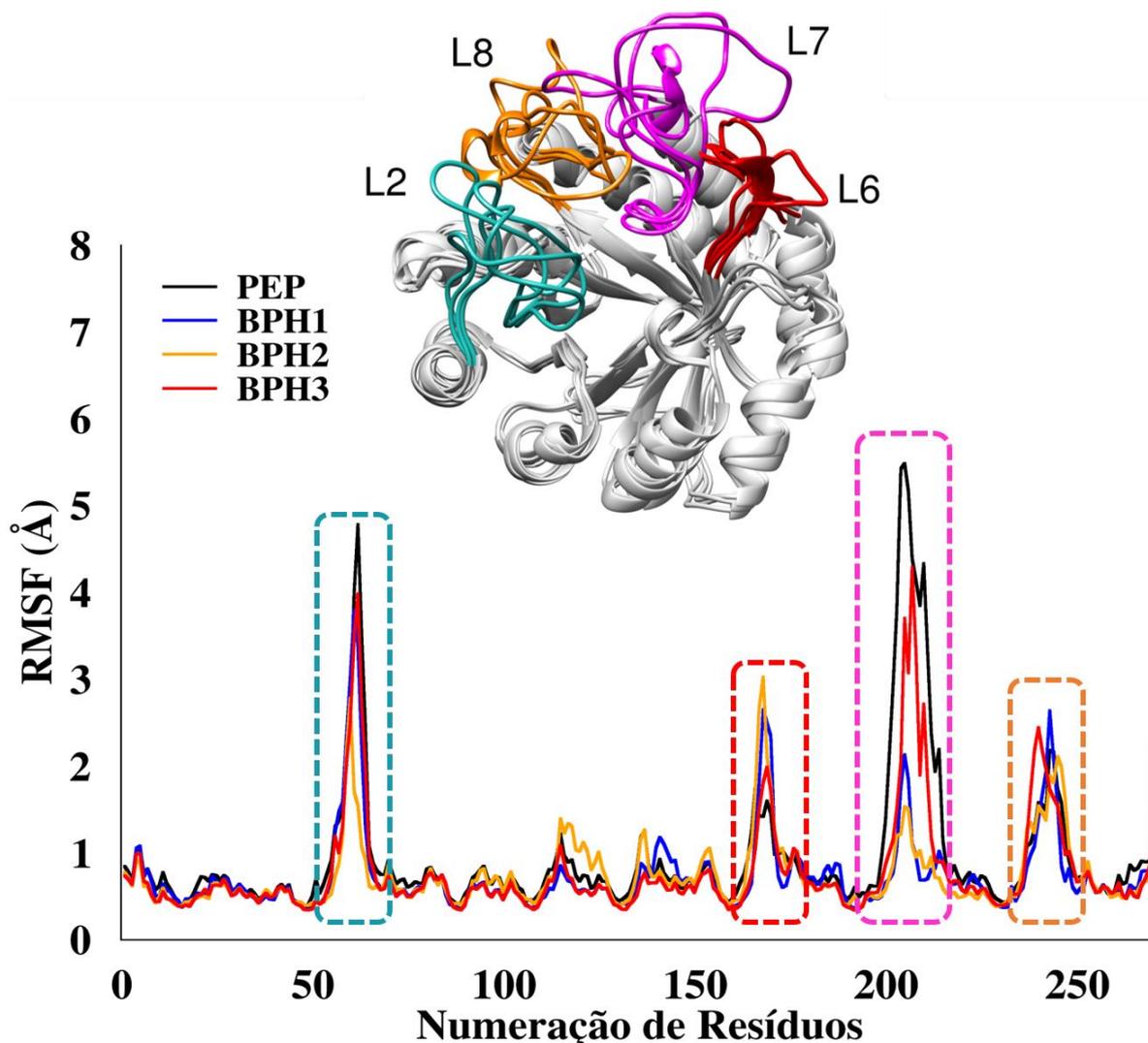


Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

A estrutura da proteína tem influência no gráfico de RMSD, visto que há regiões de alças que se movem durante as simulações de dinâmica molecular, portanto, é

necessário também uma análise para identificar quais regiões são responsáveis por induzir as movimentações estruturais dos complexos que afetam o modo de ligação dos inibidores, para isso, foi realizado análises com o gráfico de RMSF (Figura 12) para os átomos C α da proteína durante os 100ns de DM.

Figura 12 – Gráficos de RMSF para os complexos com os inibidores BPH1, BPH2, BPH3 e PEP.



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

O RMSF evidencia as principais regiões onde apresentam flutuações na proteína, essas flutuações chegam até a 6 Å aproximadamente, algumas dessas regiões devem ser analisadas por serem justamente as regiões de alças como discutido anteriormente, essas alças tem bastante movimentações durante a DM, isso se dá devido ao fato de que a alça L7 funciona como uma “tampa”, que auxilia na entrada dos substratos e na saída do produto, conforme descrito por ALLISON et al.,

2011c. Os resultados mostram que a enzima KDO8P sintase por apresentar estrutura de barril, possui 4 alças que se movimentam bastante durante as simulações de DM para todos os sistemas, essas alças ficam localizados nas regiões destacadas em azul, vermelho, rosa e laranja, que são as regiões com maiores flutuações para todos os complexos.

Essas movimentações para os sistemas indicam que a proteína apresentou diferentes conformações durante os 100ns de DM para os complexos com BPH1, BPH2, BPH3 e PEP. Essas mobilidades, que se apresentam em todos os complexos, estão relacionadas com as interações que esses diferentes ligantes realizam.

5.4 Energia Livre de Ligação – MMGBSA/MMPSA e SIE

A energia livre de ligação é capaz de descrever se a reação, ou as interações entre os ligantes e os receptores são favoráveis (GENHEDEN; RYDE, 2015; KOLLMAN et al., 2000; STOICA; SADIQ; COVENEY, 2008). A partir das análises da DM, foi feita a investigação das energias livres de ligação calculadas pelos métodos MMGBSA, MMPBSA e SIE, realizada também para os últimos 1000 frames. A tabela 2 permite comparar os valores de $\Delta G_{\text{ligação}}$ (Kcal/mol) obtidos para todos os sistemas em ambos os organismos deste estudo.

Tabela 1 – Valores de $\Delta G_{\text{ligação}}$ para todos os sistemas.

	BPH1	BPH2	BPH3	PEP
Experimental	-8,82 ^{a,b}	-7,0 ^{a,c}	(n/d)	-7,66 ^{a,c}
MM/GBSA	-96,07	-71,72	-82,96	-50,34
MM/PBSA	-107,09	-82,64	-110,73	-75,85
SIE	-13,53	-13,49	-14,37	-8,78

^a Resultados convertidos para Kcal/mol baseado nas constantes de inibição obtidas contra KDO8P sintase de ^b *E.coli* e ^c *N. meningitidis*. (n/d) Não determinado.

Os resultados obtidos mostram ter relação com os valores experimentais de constante de inibição para os inibidores. Nota-se que o ligante BPH1 descrito como mais ativo apresenta uma melhor afinidade com a enzima KDO8P sintase.

O BPH2 descrito como menos ativo apresenta valores favoráveis, porém menores do que o BPH1. Em relação ao BPH3, que é um ligante teórico, os valores de energias livre de ligação se aproximam aos valores de BPH1, o que comprova que os grupos hidroxilas fazem contatos importantes e que essas interações contribuem

de forma favorável, o que pode ser evidenciado pelos valores de energia para esse inibidor. Como não foi determinado experimentalmente os valores de constante de inibição para o inibidor BPH3, a comparação entre eles é a nível teórico, e para esse inibidor, os métodos de MM/PBSA e SIE apontam que ele é mais ativo até mesmo que o BPH1, tendo em vista que os valores de energia com esses métodos são mais favoráveis que BPH1 e BPH2.

O substrato natural PEP da enzima KDO8P sintase apresenta também valores favoráveis em todos os métodos utilizados visto que por se o substrato, ele tem uma melhor afinidade com esta enzima. Os valores tanto para BPH1 e BPH2 quando comparados os dados experimentais seguem a mesma tendência demonstrando BPH1 como mais ativo e BPH2 como menos ativo.

5.5 Decomposição de energia por resíduo

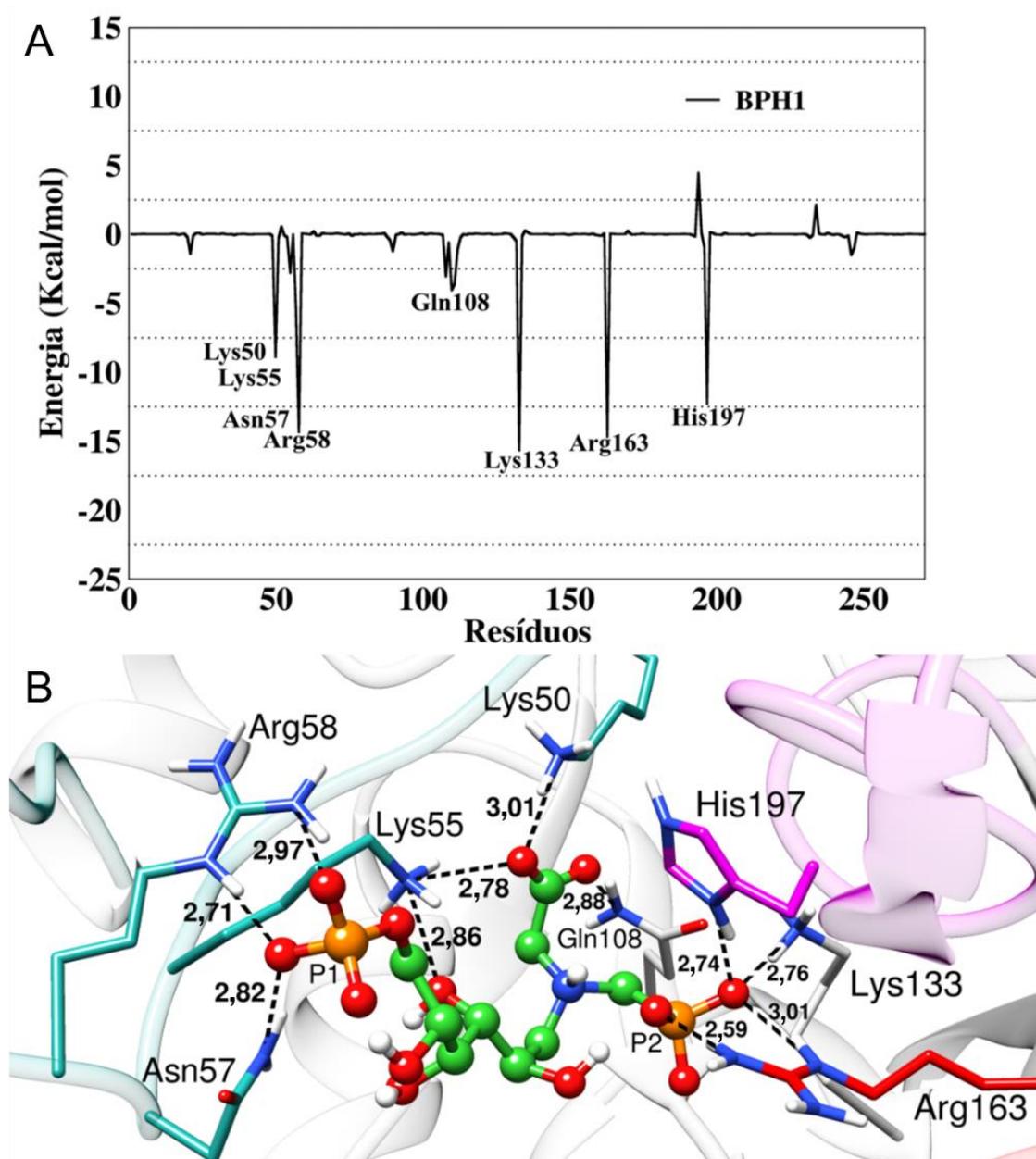
Com isso, analisar somente o comportamento desses complexos, as flutuações das regiões da proteína e as suas afinidades descritas pela energia livre de ligação não é suficiente para entender o modo de ligação desses inibidores e substrato. Então é necessário compreender a nível atômico e energético a contribuição dessas interações para as entender as mudanças conformacionais da proteína. Para isso, foram realizados cálculos de decomposição de energia livre por resíduo para esses sistemas, esses cálculos foram realizados com os últimos 1000 frames, onde apresentam maior estabilidade.

O BPH1 apresenta um grande número de interações com os resíduos que compõem o sítio ativo da enzima KDO8P sintase. As principais interações são com os resíduos Lys50 com energia de -8,90 Kcal/mol, Lys55 com -2,79 Kcal/mol, Asn57 com -5,54 Kcal/mol, Arg58 com -14,34 Kcal/mol, Gln108 com -3,06 Kcal/mol, Lys133 com -15,65 Kcal/mol, Arg163 com -14,66 Kcal/mol e His197 com -12,29 Kcal/mol, que contribuem com valores de energias favoráveis para este sistema. A análise de energia para todos os sistemas se deu através da energia total (Figura 13).

A partir de então a maior parte das interações que esse ligante realiza é com os resíduos que ficam localizados na alça L2 que estão em azul que interagem principalmente com o grupo fosfato (P1) derivado do A5P, algumas dessas interações, como é o caso da Lys55, acontecem também com os grupos hidroxilas que também derivam deste substrato, e uma dessas interações com a alça L2 é a da Lys50 que

interage com o grupo carboxilato que deriva de PEP. O restante das interações desse ligante é com a porção fosfatada que derivada da porção PEP, que fica localizada mais para “dentro” da cavidade catalítica da enzima KDO8P sintase. Essas interações acontecem também com as outras alças, como é o caso de His197 em rosa localizada na alça L7, e a Arg163 em vermelho localizada na alça L6. As interações com Lys133 e a porção fosfatada de PEP, e Gln108 com a região carboxilato, não estão localizadas em alças.

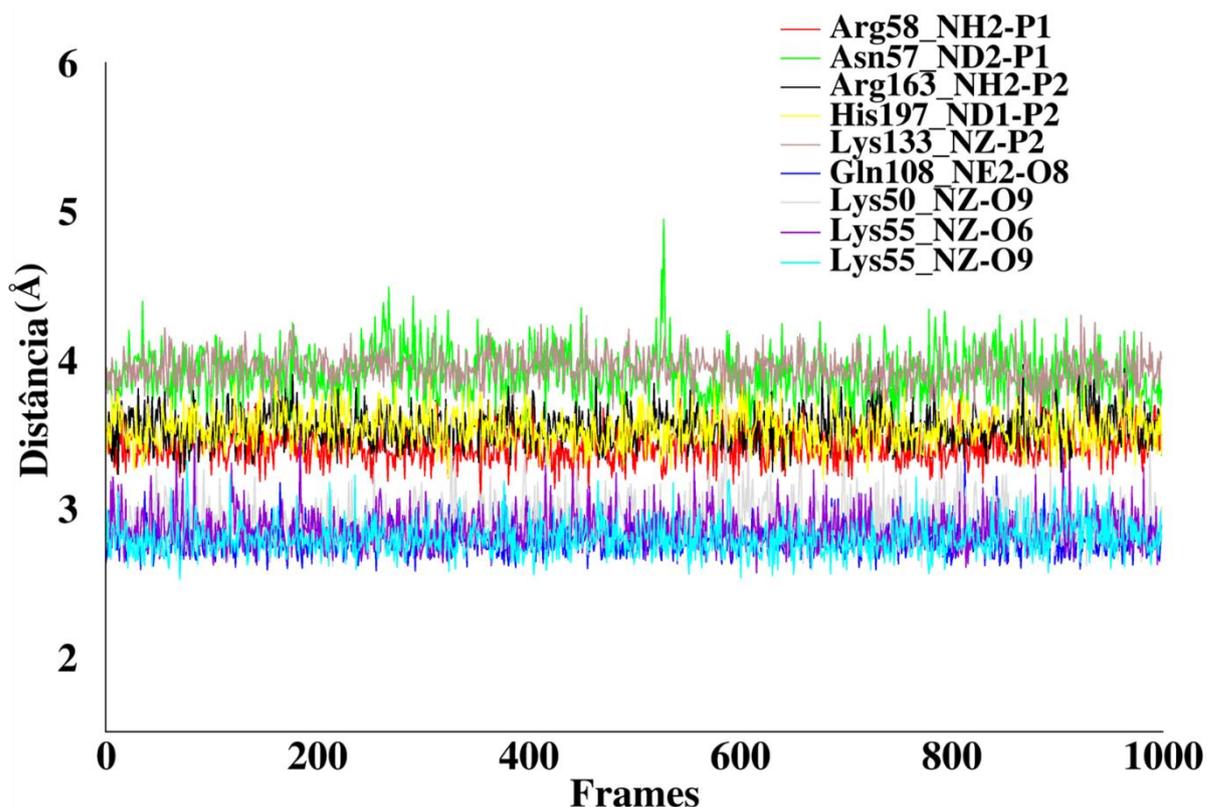
Figura 13 – A) Principais interações de hidrogênio (em Å) e B) gráficos da decomposição de energia livre por resíduo para o complexo com BPH1.



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

O gráfico com as distâncias dessas interações durante os últimos 1000 frames mostra a estabilidade desse sistema (Gráfico 3), para o BPH1, essas interações ficam entre 3 e 4 Å e apresentam alguns desvios, porém não são grandes movimentações, mostrando que essas interações se mantêm estáveis durante a simulação.

Gráfico 3 – Distâncias entre as interações obtidas entre o BPH1 e a enzima KDO8P sintase.



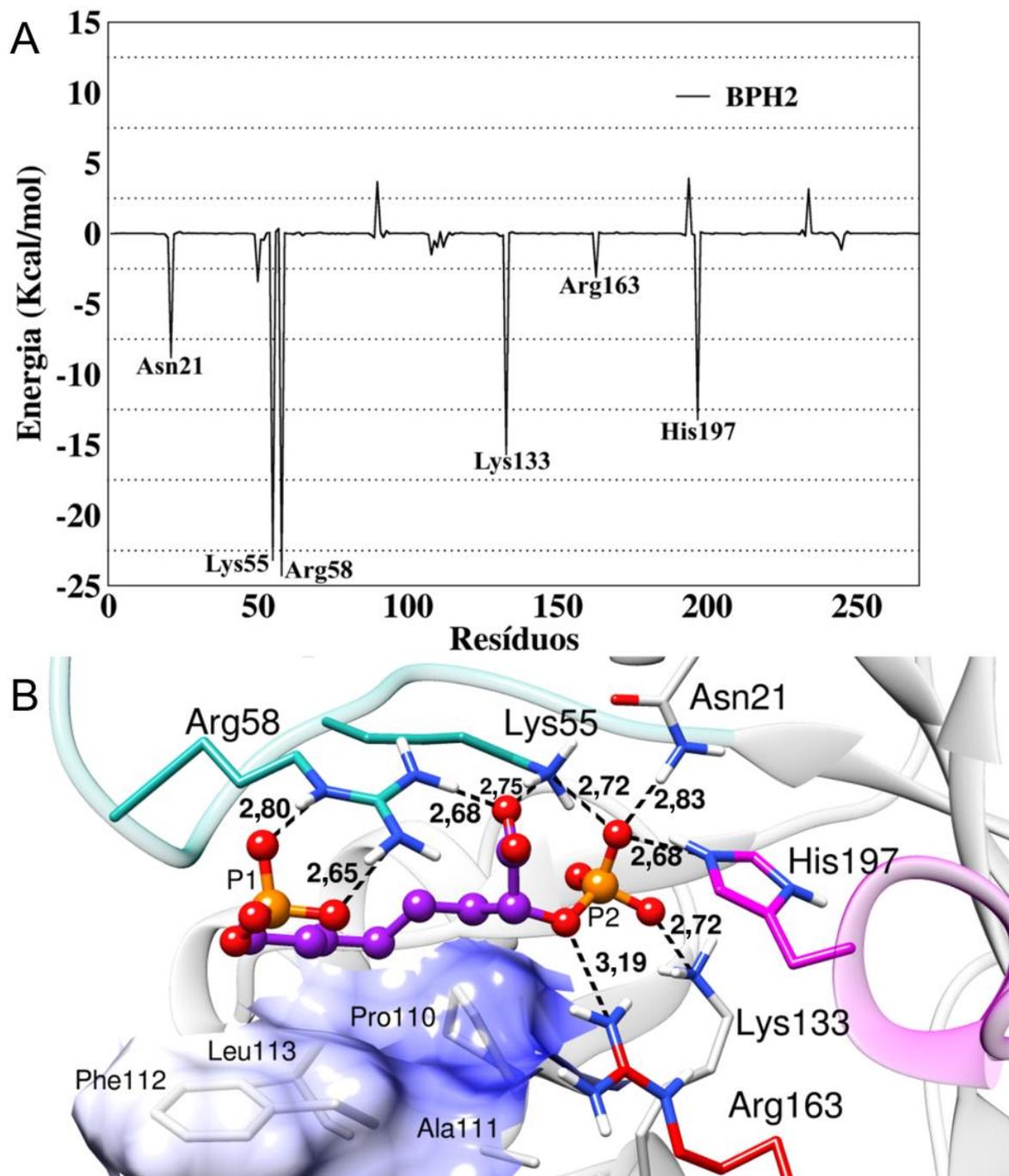
Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

As interações com os grupos fosfatados são estáveis assim como as interações com o grupo carboxilato e os grupos hidroxilas. A interação com Asn57 e a porção fosfatado da porção A5P é a que apresenta maiores desvios, mas que depois se estabiliza até o final do tempo de DM. A Lys55 realiza duas interações de hidrogênio com o átomo O6 do grupo hidroxila, e interage também com o átomo O9 do grupo carboxilato, evidenciando o grande número de interações que esse ligante realiza se mantendo estável até o final da simulação.

O BPH2 por outro lado, apresenta menos interações, porém estas são bastante favoráveis, a análise do gráfico de decomposição por resíduo permite afirmar que as principais interações ocorrem com os resíduos Asn21 com energia de -8,79 Kcal/mol,

Lys55 com -23,18 Kcal/mol, Arg58 com -24,26 Kcal/mol, Lys133 com -15,67 Kcal/mol, Arg163 com -3,08 Kcal/mol, His197 com -13,20 Kcal/mol, e Lys50 com -3,40 Kcal/mol, que contribuem com energias favoráveis para o sistema (Figura 14).

Figura 14 – A) Principais interações de hidrogênio (em Å) e B) gráficos da decomposição de energia livre por resíduo para o complexo com BPH2.

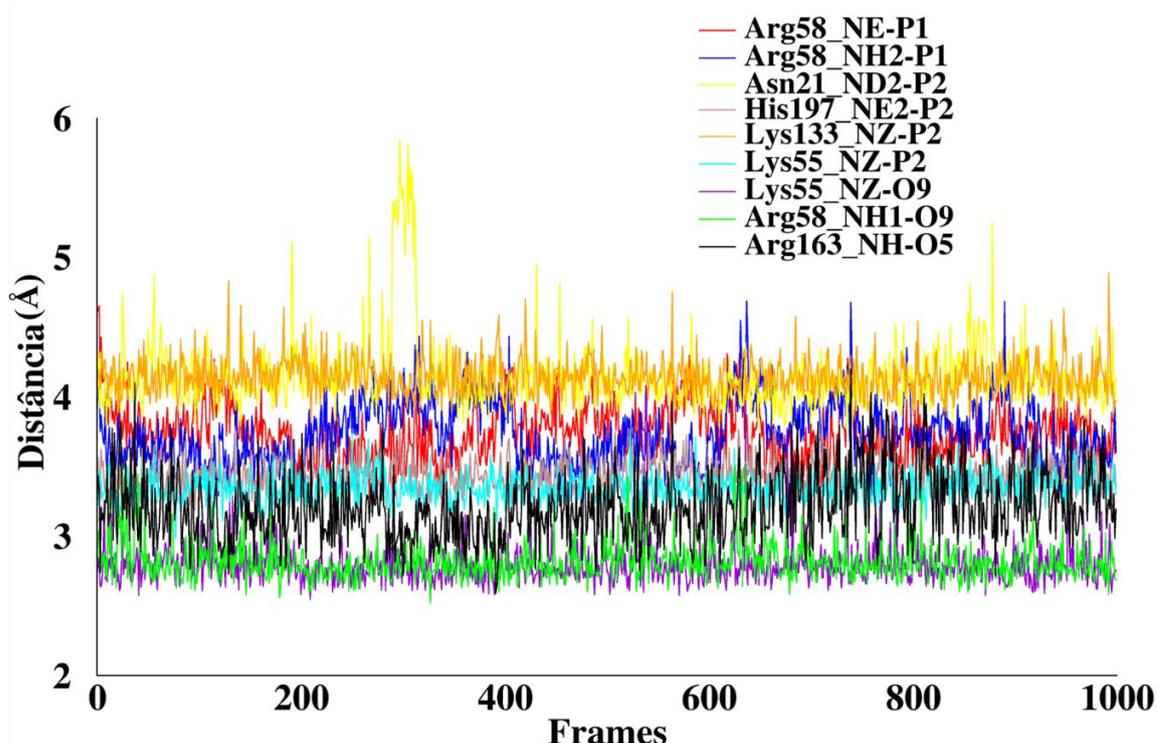


Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

As interações que este ligante realiza são em menores quantidades em relação ao BPH1, porém são interações bastante favoráveis como é o caso da Arg58 com P1 da porção fosfatada derivada do A5P com o átomo O9 da porção carboxilato. O resíduo Lys55 interage de forma favorável com o átomo O9 do grupo carboxilato e com o P2 da porção fosfatada de PEP. Essas interações estão localizadas na alça L2, uma diferença desse sistema é que ele perde a interação com a Lys50, realizando assim menos interações com esse *loop*, as interações com His197 da alça L7 e Arg163 da alça L6 são mantidas, assim como a interação com Lys133. Devido a movimentação desse ligante a interação com Gln108 não acontece, porém ele realiza uma nova interação com Asn21.

Por esse ligante não apresentar os grupos hidroxilas, ele se comporta de forma diferente de BPH1, devido à falta desses grupos, a porção apolar do inibidor BPH2 localizada no bolso de ligação de A5P começa a interagir com os resíduos apolares Pro110, Ala111, Phe112 e Leu113, implicando na perda de interações com a alça L2. Essas interações com esses resíduos apolares fazem com que o BPH2 se afaste mais do sítio ativo. O gráfico de distâncias das interações desse sistema (Gráfico 4) mostra algumas interações com desvios, essas interações ficam entre 3 a 4,5 Å.

Gráfico 4 – Distâncias entre as interações obtidas para o BPH2.



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

Esse sistema apresenta mais desvios do que BPH1 que pode ser explicado pela movimentação desse ligante no sítio ativo devido a interações com os resíduos apolares. Porém, mesmo com essas movimentações, ao final do tempo de simulação essas interações atingem estabilidade, significando a permanência desse inibidor no sítio ativo desta enzima.

As interações desse inibidor BPH2 com os resíduos apolares motivaram a investigação sobre o efeito desses grupos hidroxilas na cadeia de carbonos que liga as duas porções fosfatadas derivadas de A5P e PEP dos inibidores bifosfatados. O BPH3 é justamente a adição desses grupos hidroxilas ao inibidor BPH2.

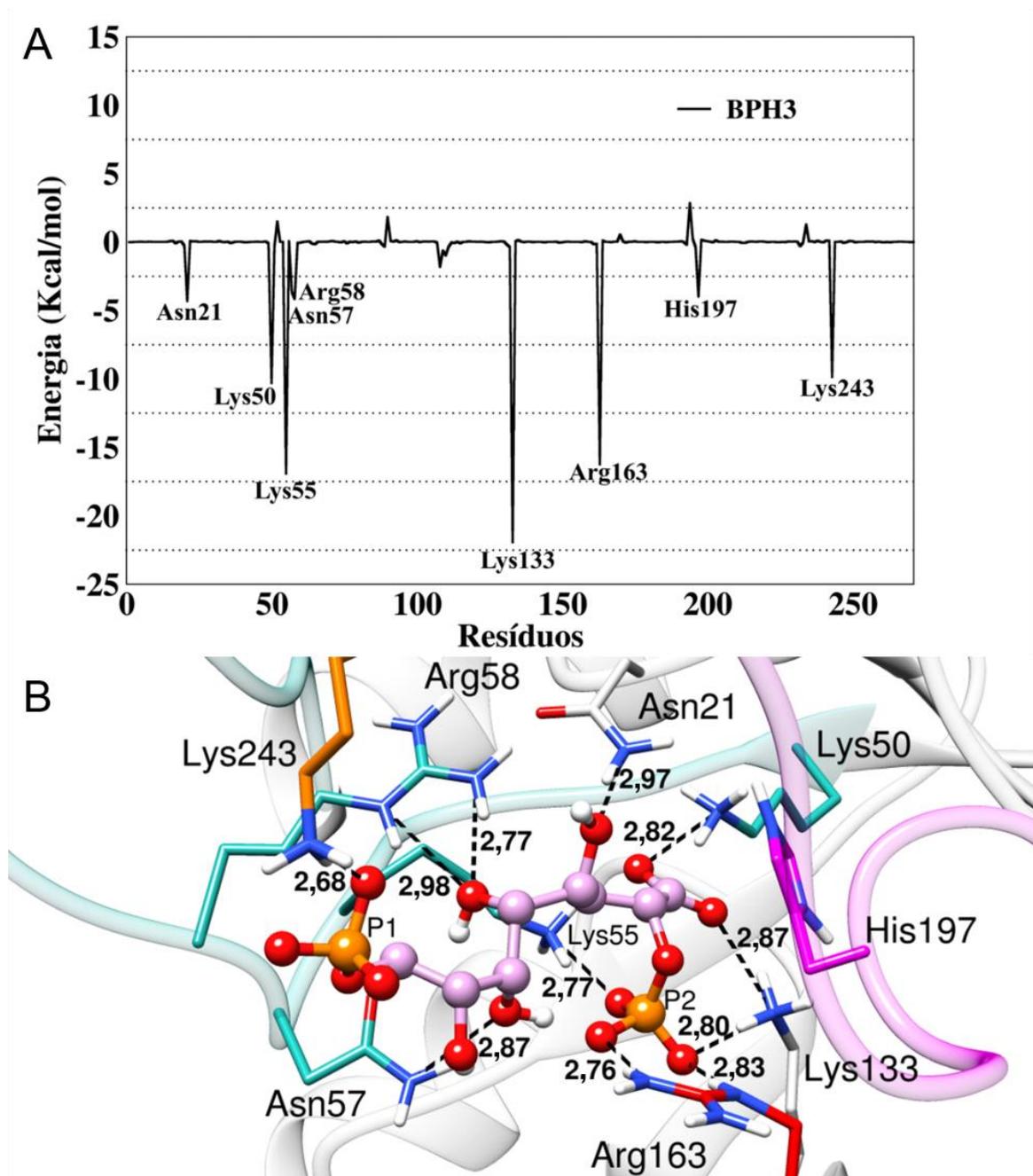
O BPH3 realizou bastante interações quando adicionados esses grupos, essas interações são favoráveis com os resíduos Asn21 com energia de -4,31 Kcal/mol, Lys50 com -10,30 Kcal/mol, Lys55 com -16,91 Kcal/mol, Asn57 com -3,65 Kcal/mol, Arg58 com -4,16 Kcal/mol, Lys133 com -21,93 Kcal/mol, Arg163 com -16,25 Kcal/mol, His197 com -3,97 Kcal/mol e Lys243 com -9,86 Kcal/mol sendo a contribuição de energias favoráveis para esse sistema (Figura 15).

As interações desse inibidor se assemelham as do BPH1, com a adição dos grupos hidroxilas, ele consegue reproduzir todas as interações localizadas na alça L2, como é o caso do resíduo Asn57 que interage com um grupo hidroxila, a Arg58 também interage com outro grupo hidroxila que são resíduos que fazem parte do bolso de ligação do A5P, a interação com a Lys50 é mantida com o grupo carboxilato, e Asn21 passa a interagir com um grupo hidroxila, as interações com Lys133 e Arg163, localizada na alça L6, com a porção de PEP se mantem. Porém, uma interação importante com His197 localizada na alça L7 não acontece. Esse ligante por se afastar mais da alça L7, e realiza uma nova interação com Lys243 da alça L8, e a porção P1 de A5P.

Esse ligante tem uma pequena movimentação no sítio ativo, que faz com que aconteça essa quebra e formação de interações, com os grupos hidroxila as interações com os resíduos apolares não acontece para esse inibidor, mostrando que esses grupos não apenas aumentam o número de interações que esse ligante realiza com os resíduos no sítio catalítico da enzima KDO8P sintase, mas também contribuem para uma estabilização conformacional.

Assim, conseguimos investigar que a adição desses grupos é importante para manter contatos com resíduos principalmente localizados na alça L2, que faz o bolso de ligação para o A5P, como esses grupos hidroxila são derivados também deste substrato, logo a adição desses grupos no inibidor BPH2 aumenta o número de interações estabilizando esse ligante.

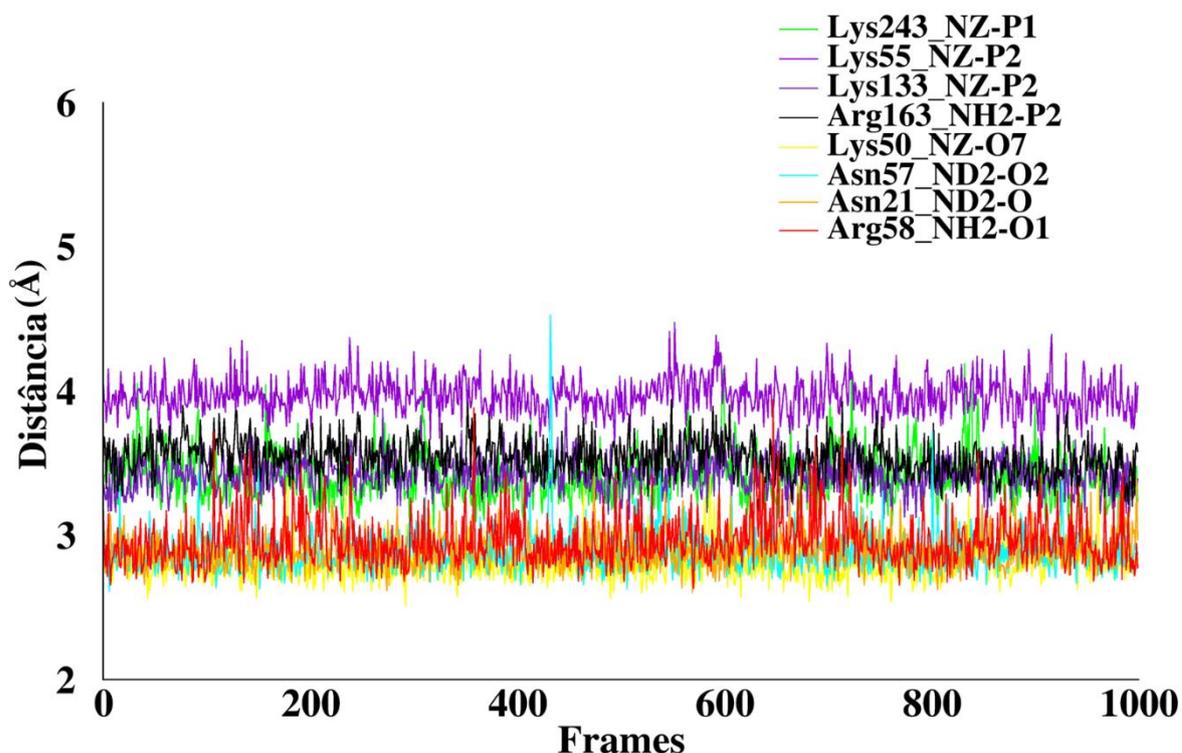
Figura 15 – A) Principais interações de hidrogênio (em Å) e B) gráficos da decomposição de energia livre por resíduo para o complexo com BPH3.



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

A análise do gráfico de distância dessas interações mostra que são estáveis e variam também entre 3 e 4 Å, apesar de apresentarem desvios, essas interações se mantem até o final do tempo de simulação (Gráfico 5).

Gráfico 5 – Distâncias entre as interações obtidas para o BPH3.



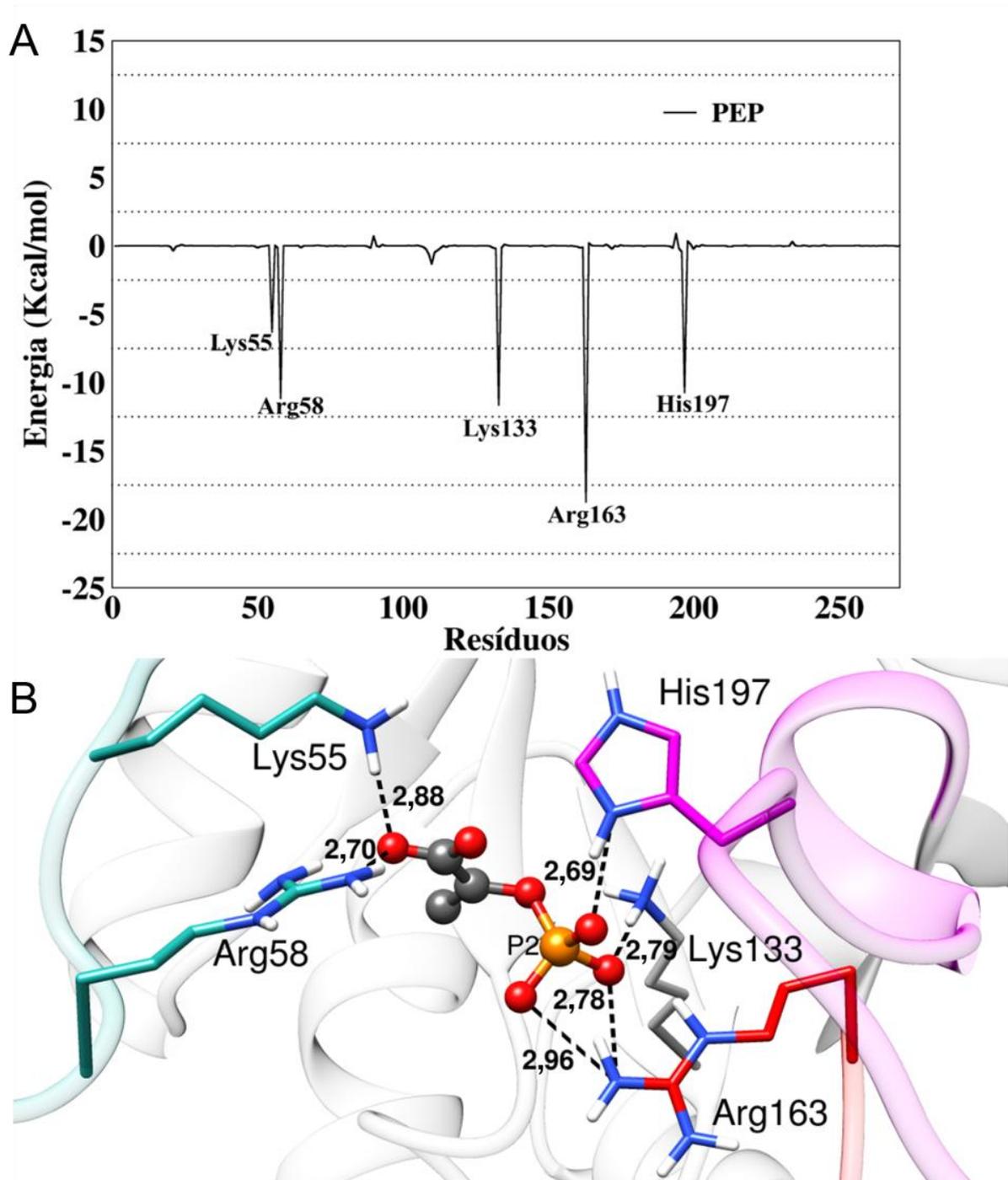
Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

O sistema com PEP para essa enzima mostrou interações favoráveis com os resíduos Lys55 com energia -6,28 Kcal/mol, Arg58 com -11,14 Kcal/mol, Lys133 com -11,63 Kcal/mol, Arg163 com -18,71 Kcal/mol, His197 com -10,71 Kcal/mol (Figura 16). As interações realizadas pelo substrato PEP são importantes comparar com as interações obtidas para os inibidores. O substrato PEP fica localizado na parte mais interna do sítio ativo da enzima KDO8P sintase, com isso é possível observar interações importantes com o P2 da região fosfatada com os resíduos His197 localizada na alça L7, e com o resíduo Arg163 localizada na alça L6, além da interação com o resíduo Lys133.

Além dessas interações é possível observar contatos também com a região do grupo carboxilato, essas interações incluem contatos com os resíduos Lys55 e Arg58

com o átomo O1 deste grupo. Então, com esses resultados, é possível saber o comportamento do substrato PEP no sitio ativo. Compara as interações com o PEP é importante devido ao fato deste substrato apresentar um papel importante na catálise.

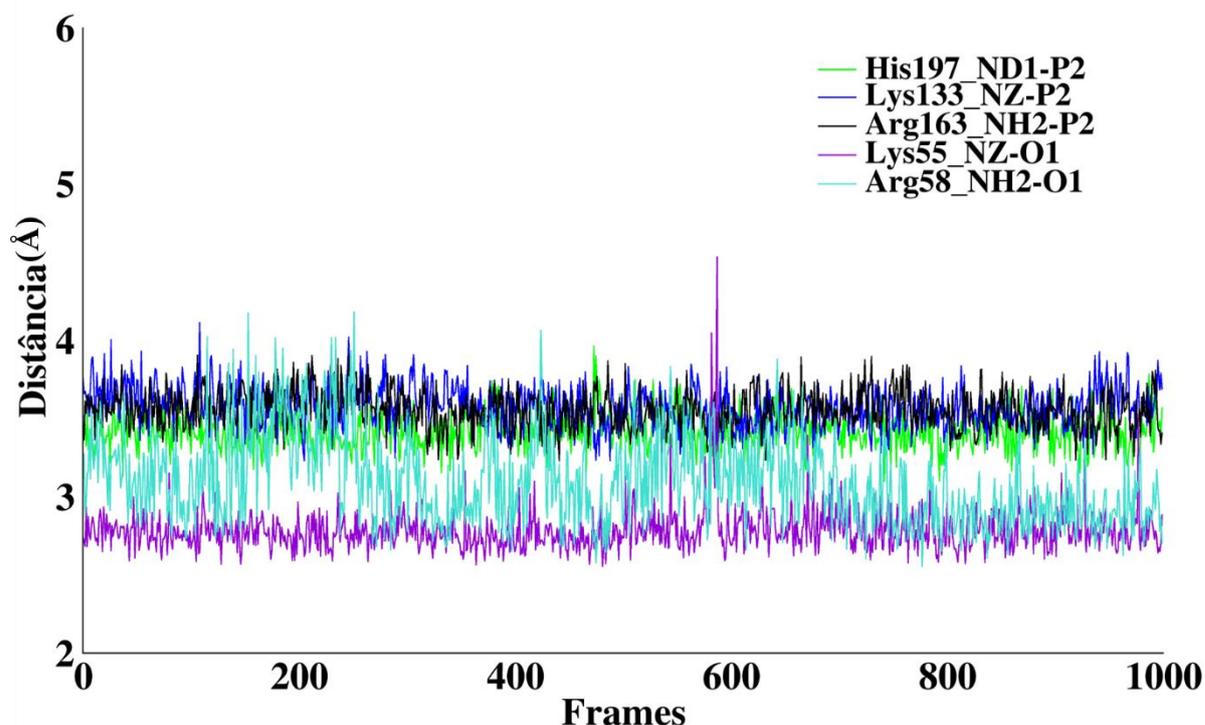
Figura 16 – A) Principais interações de hidrogênio (em Å) e B) gráficos da decomposição de energia livre por resíduo para o complexo com PEP.



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

O comportamento dessas interações foi obtido com o gráfico de distâncias (Gráfico 6) que apresentam um comportamento próximo ao do BPH1, essas interações variam entre 3 e 4 Å para esse sistema também, apresentam poucos desvios, com um perfil bastante estável.

Gráfico 6 – Distâncias entre as interações obtidas para o PEP.



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

Por esse substrato ser uma molécula relativamente pequena, algumas interações apresentam desvios como é o caso da interação com Lys55, mas até o final do tempo de simulação essas interações se estabilizam.

A tabela 1 apresenta os valores das distâncias médias dessas interações. Essas interações foram analisadas para os resíduos da enzima KDO8P sintase descritos anteriormente, e para os átomos P1 e P2 das porções A5P e PEP respectivamente que realizam as principais interações de hidrogênio, assim como os átomos O das interações com os grupos hidroxilas e os átomos O do grupo carboxilato.

É possível notar os valores obtidos para distâncias médias das interações e seus desvios (em Å). Onde as interações analisadas através com os gráficos e com

os valores de distâncias médias dessas interações, comprovam que todos os ligantes de todos os sistemas conseguiram se manter fixados ao sítio ativo da enzima, realizando interações principalmente as obtidas experimentalmente.

Tabela 2: Valores de distância média das interações de hidrogênio entre os inibidores e a enzima KDO8P sintase e desvios em Å.

KDO8P sintase (<i>N. meningitidis</i>)				
	BPH1	BPH2	BPH3	PEP
Asn21	--	ND2-P2 4,1(±0,2)	ND2-O 2,8(±0,1)	--
Lys50	NZ-O6 2,9(±0,1)	--	NZ-O7 2,8(±0,1)	--
Lys55	NZ-O6 2,8(±0,1)	NZ-P2 3,3(±0,1)	NZ-P2 3,9(±0,1)	NZ-O1 2,7(±0,1)
	NZ-O9 2,8(±0,1)	NZ-O9 2,7(±0,1)		
Asn57	ND2-P1 3,9(±0,1)	--	ND2-O2 2,8(±0,1)	--
Arg58	NH2-P1 3,4(±0,1)	NE-P1 3,7(±0,1)	NH2-O1 2,9(±0,1)	NH2-O1 3,0(±0,2)
		NH2-P1 3,7(±0,2)		
		NH1-O9 2,8(±0,1)		
Gln108	NE2-O8 2,7(±0,1)	--	--	--
Lys133	NZ-P2 3,9(±0,1)	NZ-P2 4,1(±0,1)	NZ-P2 3,4(±0,1)	NZ-P2 3,5(±0,1)
Arg163	NH2-P2 3,5(±0,1)	NH-O5 3,2(±0,2)	NH2-P2 3,5(±0,1)	NH2-P2 3,5(±0,1)
His197	ND1-P2 3,5(±0,1)	NE2-P2 3,7(±0,1)	--	ND1-P2 3,4(±0,1)
Lys243	--	--	NZ-P1 3,4(±0,1)	--

O sistema que menos conseguiu realizar interações efetivas foi o BPH2 devido a sua movimentação no sítio ativo, e a falta do grupos hidroxilas, esse ligante perde as interações principalmente localizada na alça L2, o ligante BPH1 conseguiu realizar bastante interações e elas apresentam um comportamento estável como pode ser visto no gráfico de distância dessas interações, o BPH3 também realizou um grande número de interações, algumas delas podem ser vista com o inibidor BPH1 e outras podem ser vistas com o inibidor BPH2, confirmando que a adição dos grupos

hidroxilas garantem um aumento no número de interações também com a alça L2, assim como mantem um estabilidade conformacional para esse ligante. Assim com os resultados para todos os ligantes bifosfatados, essas interações com a enzima KDO8P sintase estão de acordo com os resultados experimentais, que apontam o BPH1 como mais ativo, ficando como segundo mais ativo o BPH3 e por fim o BPH2 é o menos ativo entre esses inibidores.

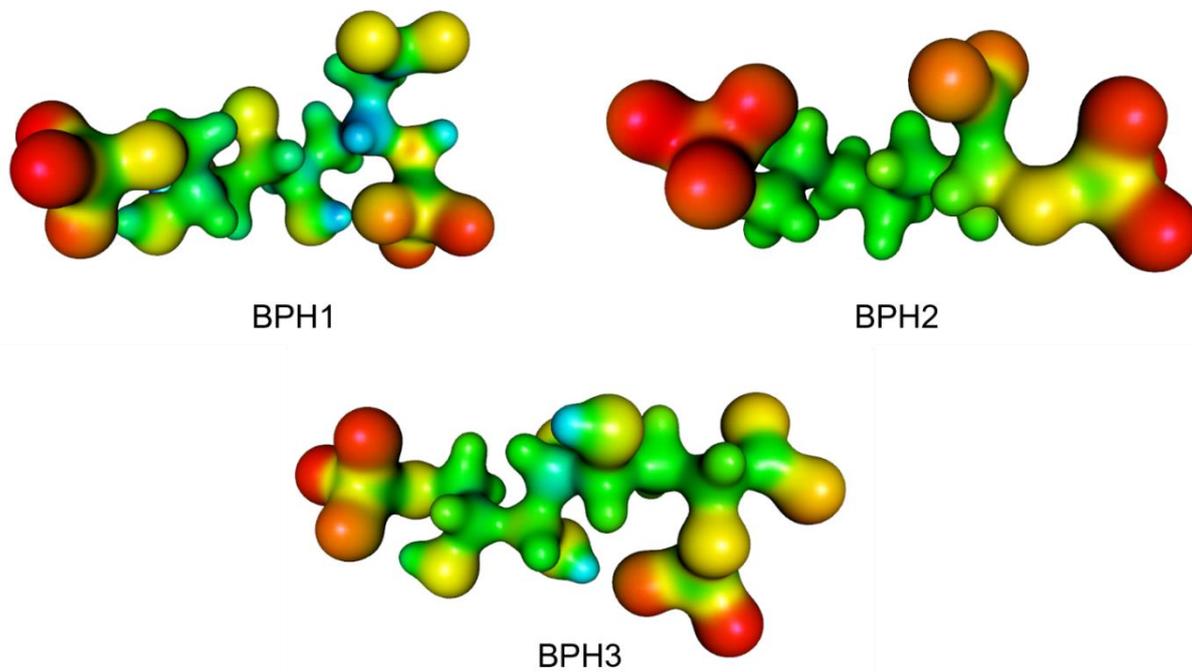
O número interações observadas para o substrato PEP também estão de acordo com os resultados experimentais, o bolso de ligação desse substrato se encontra mais a dentro da cavidade catalítica que mantem contatos importantes com as alças L7 e L8 respectivamente. As principais diferenças entre esses sistemas estão nas interações com a Asn21, Lys50 e Asn57 localizados na alça L2, Gln108, His197 da alça L6, e Lys243 da alça L8, além das quantidades de interações com a Arg58.

5.6 Superfície do Potencial Eletrostático Molecular (MEP)

Além disso avaliamos ainda a influência da KDO8P sintase nas superfícies de potencial eletrostático dos inibidores ao longo da simulação de DM e determinamos as superfícies do potencial eletrostático molecular (MEP) para os inibidores em um ambiente proteico (Figura 17).

As regiões mais nucleofílicas (potencial eletrostático negativo) são mostradas em vermelho, enquanto que as regiões mais eletrofílicas (potencial eletrostático positivo) mostradas em azul. Nossos resultados mostram que as regiões de carga positiva predominantemente nos grupos hidroxilas de BPH1 e BPH3. Por outro lado, as cargas mais negativas estão localizadas no grupo fosfato da porção A5P.

Figura 17 – Superfícies de Potencial eletrostático molecular (MEP) dos inibidores bifosfatados BPH1, BPH2 e BPH3.



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

É possível notar que os inibidores bifosfatados se assemelham aos intermediários do íon oxocarbênio, é proposto que isso pode fornecer uma base para concepção de novos inibidores uma vez que os análogos dos intermediários de reação podem ser utilizados para inibir a KDO8P sintase. Além disso note que o BPH1 e BPH3 possuem uma carga mais positiva em torno do átomo C2 na proteína do que BPH2. Esse potencial positivo em torno de C2 é uma consequência tanto da interação eletrostática entre a enzima com os inibidores quanto da interação eletrostática com os substratos. Assim, como esperado a KDO8P sintase dedica seu poder catalítico a estabilização de seu intermediário catiônico.

6 CONCLUSÕES

O estudo computacional apresentado aqui, indica pontos-chaves para a inibição da enzima KDO8P sintase por inibidores bifosfatados. Estes resultados foram publicados na revista por Araújo e colaboradores (2019), em anexo, e corroboram com dados experimentais previamente publicados e podem favorecer o desenvolvimento e síntese de novos compostos que atuem de forma mais efetiva contra a KDO8P sintase que é essencial para formação de LPS formadores da parede bacteriana.

Os métodos de *docking* molecular e as simulações dinâmicas moleculares forneceram informações importantes sobre o modo de ligação dos inibidores em complexo com a enzima KDO8P sintase no organismo independente de metal de *N. meningitidis*. De acordo com nossos resultados o inibidor BPH1 tem afinidade o que está de acordo com os dados experimentais que o mostra como o mais eficiente inibidor da enzima KDO8P sintase. Além disso, esta pesquisa mostra que essa afinidade está relacionada principalmente com as interações com os resíduos Lys55, Arg58, Lys133 e Arg163, os quais fazem contatos importantes com todos os inibidores.

Uma análise mais acurada feita em relação ao comportamento desses inibidores quanto a presença dos grupos hidroxilas evidencia as diferenças de ligações de hidrogênio entre os sistemas o que ajudou a entender melhor o comportamento desses ligantes. Por exemplo o BPH2 que tem comportamento menos ativo, devido a falta dos grupos hidroxilas que, em virtude disso, realiza menos interações de hidrogênio e interage com resíduos apolares se afastando do centro da cavidade catalítica onde fica localizada a porção PEP.

Depois de conhecidas essas interações, associadas ao fato da KDO8P sintase possuir estrutura de barril com regiões de alças que realizam importantes funções para a catálise, foi possível perceber que essas alças apresentam bastante movimentação durante as simulações, a alça L7 fornece um contato importante com a His197 que faz interação com o inibidor BPH1, BPH2 e PEP o que pode implicar no fechamento desta alça isolando o sítio ativo favorecendo a inibição. Um importante fator que estabiliza a conformação desses ligantes são os contatos com a alça L2

que fornece os contatos da porção A5P, porém essas interações são mais favoráveis com os inibidores que contém os grupos hidroxilas que são derivados de A5P.

Portanto, pode-se concluir que a utilização de métodos computacionais é importante para compreensão dos comportamentos de sistemas biológicos bem como para a investigação a nível atômico das interações por eles realizadas. Estes métodos computacionais associados a dados experimentais são uma ferramenta poderosa que auxiliam no planejamento de moléculas com geometria e propriedades físico-químicas melhoradas, auxiliando no planejamento de fármacos. Desta forma, espera-se que os resultados encontrados neste estudo contribuam para o desenvolvimento de compostos que atuem inibindo a enzima KDO8P sintase.

REFERÊNCIAS

ADCOCK, S. A.; MCCAMMON, J. A. Molecular Dynamics: Survey of Methods for Simulating the Activity of Proteins. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 5, p. 1589–1615, 1 maio 2006.

AHN, M. et al. Mechanistic divergence of two closely related aldol-like enzyme-catalysed reactions†. p. 4046–4049, 2005.

AHN, M. et al. Arabinose 5-phosphate analogues as mechanistic probes for *Neisseria meningitidis* 3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate synthase. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 16, n. 22, p. 9830–6, 2008.

ALLISON, T. M. et al. Specificity and mutational analysis of the metal-dependent 3-deoxy-d-manno-octulosonate 8-phosphate synthase from *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1804, n. 7, p. 1526–1536, 2010.

ALLISON, T. M. et al. Targeting the Role of a Key Conserved Motif for Substrate Selection. **Biochemistry**, v. 50, p. 3686–3695, 2011a.

ALLISON, T. M. et al. An Extended $\beta 7\alpha 7$ Substrate-Binding Loop Is Essential for Efficient Catalysis by 3-Deoxy-d-manno-Octulosonate 8-Phosphate Synthase. **Biochemistry**, v. 50, n. 43, p. 9318–9327, 1 nov. 2011c.

ALLISON, T. M. et al. Examining the role of intersubunit contacts in catalysis by 3-Deoxy-d- Manno-octulosonate 8-Phosphate synthase. **Biochemistry**, v. 52, n. 27, p. 4676–4686, 2013.

ANANDAKRISHNAN, R.; AGUILAR, B.; ONUFRIEV, A. V. H++ 3.0: automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. W1, p. W537–W541, 8 maio 2012.

ANDERSON, L., AND UNGER, F. M. Bacterial Lipopolysaccharides. **ACS Symposium Series 231, American Chemical Society, Washington, DC**, 1983.

ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, R. V. C. G. AND G. **Virtual Screening and Its**

Integration with Modern Drug Design Technologies *Current Medicinal Chemistry*, 2008. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/node/66154/article>>

ARAÚJO, J. D. O. **ESTUDOS DE DOCKING MOLECULAR, DINÂMICA MOLECULAR, E ENERGIA LIVRE PARA DERIVADOS ESTATÍNICOS INIBIDORES DA ENZIMA HMG-CoA REDUTASE (HMGR), COM ATIVIDADE BIOLÓGICA CONTRA A HIPERCOLESTEROLEMIA.** [s.l.: s.n.].

ARNOLD, K. et al. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, v. 22, n. 2, p. 195–201, jan. 2006.

ASOJO, O. et al. Crystal structures of KDOP synthase in its binary complexes with the substrate phosphoenolpyruvate and with a mechanism-based inhibitor. *Biochemistry*, v. 40, n. 21, p. 6326–6334, 2001.

BARBOZA, H. R.; TORRES, B. B. **Microbiologia Básica.** [s.l.: s.n.].

BELAKHOV, V. et al. Synthesis and evaluation of a mechanism-based inhibitor of KDO8P synthase. *Carbohydrate Research*, v. 339, n. 2, p. 385–392, 2004.

BIRCK, M. R.; WOODARD, R. W. Aquifex aeolicus 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid 8-phosphate synthase: A new class of KDO 8-P synthase? *Journal of Molecular Evolution*, v. 52, n. 2, p. 205–214, 2001.

BORER, A. et al. American Journal of Infection Control Risk factors for developing clinical infection with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospital patients initially only colonized with carbapenem-resistant *K pneumoniae*. *American Journal of Infection Control*, v. 40, n. 5, p. 421–425, 2012.

BROWN, S. P.; MUCHMORE, S. W. High-Throughput Calculation of Protein–Ligand Binding Affinities: Modification and Adaptation of the MM-PBSA Protocol to Enterprise Grid Computing. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 46, n. 3, p. 999–1005, 1 maio 2006.

C. GUDIOL, F. TUBAU, L. CALATAYUD, C. GARCIA-VIDAL M. CISNAL, I. SANCHEZ-ORTEGA, R. DUARTE, CARRATALA, M. C. AND J. C. Bacteraemia due

to multidrug-resistant Gram-negative bacilli in cancer patients : risk factors , antibiotic therapy and outcomes. p. 1–7, 2010.

CARLA REGINA TRAGANTE, MARIA ESTHER J. R. CECCON, MÁRIO CÍCERO FALCÃO, MAURÍCIO SEITI, NEUSA SAKITA, R. A. V. Prevalência de sepse por bactérias Gram negativas produtoras de beta-lactamase de espectro estendido em Unidade de Cuidados Intensivos Neonatal. v. 26, n. 1, p. 59–63, 2008.

CASE, D. A. et al. The Amber biomolecular simulation programs. **Journal of computational chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1668–88, dez. 2005.

CHIDAN KUMAR, C. S. et al. Molecular structure, FT-IR, first order hyperpolarizability, NBO analysis, HOMO and LUMO analysis of 2-(4-chlorophenyl)-2-oxoethyl 3-methylbenzoate by HF and density functional methods. **Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 128, p. 327–336, 2014.

COCHRANE, F. C. et al. Reversing Evolution: Re-establishing Obligate Metal Ion Dependence in a Metal-independent KDO8P Synthase. **Journal of Molecular Biology**, v. 390, n. 4, p. 646–661, 2009.

CRAMER, C. J. Essentials of Computational Chemistry, Theories and Models By . Wiley: Chichester, England. 2002. 562 pp. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 43, n. 5, p. 1720, 1 set. 2004.

D'ALFONSO, G.; TRAMONTANO, A.; LAHM, A. Structural Conservation in Single-Domain Proteins: Implications for Homology Modeling. **Journal of Structural Biology**, v. 134, n. 2, p. 246–256, 2001.

DU, S. et al. First nonenzymatic synthesis of Kdo8P through a mechanism similar to that suggested for the enzyme Kdo8P synthase. **Journal of Organic Chemistry**, v. 62, n. 4, p. 794–804, 1997.

DU, S. et al. Towards the development of novel antibiotics: Synthesis and evaluation of a mechanism-based inhibitor of Kdo8P synthase. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 12, p. 2671–2682, 1999.

DUEWEL, H. S. et al. Substrate and metal complexes of 3-deoxy-D-manno-

octulosonate-8-phosphate synthase from *Aquifex aeolicus* at 1.9-Å Resolution: Implications for the condensation mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 11, p. 8393–8402, 2001.

DUEWEL, H. S.; WOODARD, R. W. A metal bridge between two enzyme families: 3-deoxy-D-manno-octulosonate-8-phosphate synthase from *Aquifex aeolicus* requires a divalent metal for activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 30, p. 22824–22831, 2000.

FILHO, O. A. S. R. B. DE A. MODELAGEM DE PROTEÍNAS POR HOMOLOGIA. v. 26, n. 2, p. 253–259, 2003.

FISER, A.; DO, R. K.; SALI, A. Modeling of loops in protein structures. **Protein science : a publication of the Protein Society**, v. 9, n. 9, p. 1753–1773, set. 2000.

FRIESNER, R. A. et al. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 7, p. 1739–1749, 1 mar. 2004.

FRISCH, M. J. et al. **Gaussian 09 Revision A.1. Gaussian Inc.** [s.l: s.n.].

FRISCH, M. J. . ET. A. **Gaussian 09 Gaussian, Inc. Wallingford CT Wallingford CT Gaussian Inc., , 2009.**

GENHEDEN, S.; RYDE, U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 10, n. 5, p. 449–461, 2015.

GINALSKI, K. Comparative modeling for protein structure prediction. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 16, n. 2, p. 172–177, 2006.

GORDON, J. C. et al. H++: a server for estimating pKa's and adding missing hydrogens to macromolecules. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. suppl_2, p. W368–W371, 1 jul. 2005.

HANWELL, M. D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 1, p. 17, 2012.

HARRISON, A. N.; REICHAU, S.; PARKER, E. J. Synthesis and evaluation of tetrahedral intermediate mimic inhibitors of 3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate synthase. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 2, p. 907–911, 2012.

HOHENSTEIN, E. G.; CHILL, S. T.; SHERRILL, C. D. Assessment of the Performance of the M05–2X and M06–2X Exchange-Correlation Functionals for Noncovalent Interactions in Biomolecules. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, n. 12, p. 1996–2000, 9 dez. 2008.

HORNAK, V. et al. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 65, n. 3, p. 712–725, 15 nov. 2006.

HOU, T. et al. Mapping the Binding Site of a Large Set of Quinazoline Type EGF-R Inhibitors Using Molecular Field Analyses and Molecular Docking Studies. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 43, n. 1, p. 273–287, 1 jan. 2003.

HOU, T. et al. Assessing the Performance of the MM / PBSA and MM / GBSA Methods . 1 . The Accuracy of Binding Free Energy Calculations Based on Molecular Dynamics Simulations. p. 69–82, 2011.

HOU, T.; GUO, S.; XU, X. Predictions of Binding of a Diverse Set of Ligands to Gelatinase-A by a Combination of Molecular Dynamics and Continuum Solvent Models. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 106, n. 21, p. 5527–5535, 1 maio 2002.

HOU, T.; YU, R. Molecular Dynamics and Free Energy Studies on the Wild-type and Double Mutant HIV-1 Protease Complexed with Amprenavir and Two Amprenavir-Related Inhibitors: Mechanism for Binding and Drug Resistance. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 6, p. 1177–1188, 1 mar. 2007.

INOUE, M. in *Bacterial Outer Membrane: Biogenesis and Function*. **Wiley, New York**, 1979.

JENSEN, R. A. et al. The Correct Phylogenetic Relationship of KdsA (3-Deoxy- D -manno -octulosonate 8-Phosphate Synthase) with One of Two Independently Evolved

Classes of AroA (3-Deoxy- D - arabino -heptulosonate 7-Phosphate Synthase). p. 416–423, 2002.

JOHNSON, M. S. et al. Knowledge-Based Protein Modeling. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, n. 1, p. 1–68, 1 jan. 1994.

JORGENSEN, W. L. et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **The Journal of Chemical Physics**, v. 79, n. 2, p. 926–935, 15 jul. 1983.

KARPLUS, M.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. **Nature Structural Biology**, v. 9, p. 646, 1 set. 2002.

KAYSER, F. H. Medical Microbiology. n. New York: Thieme, p. 698 p, 2005.

KITCHEN, D. B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 11, p. 935–949, 2004.

KOHEN, A. et al. Stereochemistry of the KDO8P synthase. An efficient synthesis of the 3-fluoro analogues of KDO8P. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 3, n. 8, p. 1577–1582, 1993.

KOLLMAN, P. A. et al. Calculating Structures and Free Energies of Complex Molecules: Combining Molecular Mechanics and Continuum Models. **Accounts of Chemical Research**, v. 33, n. 12, p. 889–897, 1 dez. 2000.

KONA, F. et al. Structural and mechanistic changes along an engineered path from metallo to nonmetallo 3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate synthases. **Biochemistry**, v. 46, n. 15, p. 4532–4544, 2007.

KONA, F. et al. Electronic structure of the metal center in the Cd²⁺, Zn²⁺, and Cu²⁺ substituted forms of KDO8P synthase: Implications for catalysis. **Biochemistry**, v. 48, n. 16, p. 3610–3630, 2009.

KONEMAN, E. ET AL. Diagnostico microbiologico: Texto e atlas colorido. v. 5. ed, n. Rio de Janeiro: Medsi, p. 1465 p, 2001.

KRAMER, B.; RAREY, M.; LENGAUER, T. Evaluation of the FLEX X Incremental

Construction Algorithm for Protein – Ligand Docking. v. 241, n. June, p. 228–241, 1999.

KRIEGER, E.; NABUURS, S. B.; VRIEND, G. Homology Modeling. In: **Structural Bioinformatics**. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2005. p. 509–523.

KUHN, B.; KOLLMAN, P. A. Binding of a Diverse Set of Ligands to Avidin and Streptavidin: An Accurate Quantitative Prediction of Their Relative Affinities by a Combination of Molecular Mechanics and Continuum Solvent Models. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 20, p. 3786–3791, 1 out. 2000.

LASKOWSKI, R. A. et al. {it PROCHECK}: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1993.

LEACH, A. R. **Molecular Modelling: Principles and Applications**. [s.l.: s.n.].

LEPŠÍK, M.; KŘÍŽ, Z.; HAVLAS, Z. Efficiency of a second-generation HIV-1 protease inhibitor studied by molecular dynamics and absolute binding free energy calculations. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 57, n. 2, p. 279–293, 11 jun. 2004.

LEVINE, I. N. **Quantum chemistry, 4th ed.** ., [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 1991.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. *Microbiologia Médica e Imunologia*. v. 4. Ed, n. Porto Alegre: Artes Médicas, p. 415 p., 1998.

LI, C. H. et al. A protein – protein docking algorithm dependent on the type of complexes. v. 16, n. 4, p. 265–269, 2003a.

LI, J. et al. Conversion of Aquifex aeolicus 3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate synthase, a metalloenzyme, into a nonmetalloenzyme. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 24, p. 7448–7449, 2004.

LI, Z. et al. A snapshot of Enzyme Catalysis Using Electrospray Mass Spectrometry. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 125, p. 9938–9939, 2003b.

LIANG, P. H. et al. Catalytic mechanism of Kdo8P synthase: Transient kinetic studies

and evaluation of a putative reaction intermediate. **Biochemistry**, v. 37, n. 46, p. 16390–16399, 1998.

LIMA, A. H. L. E. **MÉTODOS COMPUTACIONAIS APLICADOS AO ESTUDO DE PEPTÍDEOS INIBIDORES E MECANISMOS DE REAÇÕES ENZIMÁTICAS**. [s.l: s.n.].

LINDAHL, E. **Molecular Dynamics Simulations**. In: KUKOL, A. (Ed.). **Molecular Modeling of Proteins SE - 1. Methods Molecular Biology™**. [s.l.] Humana Press. [s.l: s.n.].

LUQUE, F.J.; LOPEZ, J.M.; OROZCO, M. . Perspective on “Electrostatic interactions of a solute with a continuum. A direct utilization of ab initio molecular potentials for the prevision of solvent effects”. **Theor. Chem. Acc.**, v. 103, p. 343–345, 2000.

MARTINEZ, J.-P. The Hartree-Fock method: from self-consistency to correct symmetry. **Annalen der Physik**, v. 529, n. 1–2, p. 1600328, 1 jan. 2017.

MELO, F. et al. **ANOLEA: A WWW Server to Assess Protein Structures**. Proceedings of the 5th International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology. **Anais...AAAI Press**, 1997

MIMS, C.A., PLAYFAIR, J.H., ROITT, I.M., WAKELIN, D., WILLIAMS, R. *Microbiologia médica*. n. São Paulo: Manole, p. p.18-38, 1995.

MORO, S.; BACILIERI, M.; SPALLUTO, C. F. AND G. **Autocorrelation of Molecular Electrostatic Potential Surface Properties Combined with Partial Least Squares Analysis as Alternative Attractive Tool to Generate Ligand-Based 3D-QSARs** **Current Drug Discovery Technologies**, 2005. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/node/90505/article>>

MURRAY, P.R., DREW, W.L., KOBAYASHI, G.S., THOMPSON, J. . *Microbiologia médica*. v. 5.ed, n. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. *Microbiologia Médica*. v. 5 ed, n. Madrid: Elsevier, p. 976 p, 2006.

NAÏM, M. et al. Solvated Interaction Energy (SIE) for Scoring Protein–Ligand Binding

Affinities. 1. Exploring the Parameter Space. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 47, n. 1, p. 122–133, 1 jan. 2007.

NISSINK, J. W. M. et al. A new test set for validating predictions of protein–ligand interaction. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 49, n. 4, p. 457–471, 8 out. 2002.

OKULIK, N.; H JUBERT, A. Theoretical Analysis of the Reactive Sites of Non–steroidal Anti–inflammatory Drugs. **Internet Electronic Journal of Molecular Design Internet Electron. J. Mol. Des**, v. 4, p. 17–30, 1 jan. 2005.

OLIVEIRA, A. R. S. **Aspectos teóricos da interação entre compostos cefalosporínicos e a Proteína 5 de Ligação à Penicilina de Escherichia coli usando Dinâmica Molecular**. [s.l: s.n.].

OLIYNYK, Z. et al. Designing a metal-binding site in the scaffold of Escherichia coli KDO8PS. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 17, n. 4, p. 383–390, 2004.

PETREY, D.; HONIG, B. Protein Structure Prediction : Inroads to Biology. v. 20, p. 811–819, 2005.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera — A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. 2004.

RAETZ, C. R. H.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide Endotoxins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 71, n. 1, p. 635–700, 1 jun. 2002.

RAREY, M. et al. A Fast Flexible Docking Method using an Incremental Construction Algorithm. **Journal of Molecular Biology**, v. 261, n. 3, p. 470–489, 1996.

RAY, P. H.; BENEDICT, C. D. Purification and characterization of a specific 3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate phosphatase from Escherichia coli B. **Journal of Bacteriology**, v. 142, n. 1, p. 60–68, 1980.

ROOTHAAN, C. C. J. New Developments in Molecular Orbital Theory. **Reviews of Modern Physics**, v. 23, n. 2, p. 69–89, 1 abr. 1951.

ROST, B.; SANDER, C. SEQUENCE-STRUCTURE GAP BY STRUCTURE

PREDICTIONS. 1996.

RYAN, K. J.; RAY, C. G. Sherris Medical microbiology: an introduction to infectious disease. v. 4. ed., p. 979 p, 2004.

RYCKAERT, J.-P.; CICCOTTI, G.; BERENDSEN, H. J. C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. **Journal of Computational Physics**, v. 23, n. 3, p. 327–341, mar. 1977.

SCHOFIELD, L. R. et al. Substrate Ambiguity and Crystal Structure of Pyrococcus furiosus 3-Deoxy-d-arabino-heptulosonate-7-phosphate Synthase: An Ancestral 3-Deoxyald-2-ulosonate-phosphate Synthase?,. **Biochemistry**, v. 44, n. 36, p. 11950–11962, 1 set. 2005.

SEIBERT, G. et al. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de Klebsiella pneumoniae carbapenemase em um hospital escola Nosocomial infections by Klebsiella pneumoniae carbapenemase producing enterobacteria in a teaching hospital. v. 12, n. 55, p. 282–286, 2014.

SHEFFER-DEE-NOOR, S.; BELAKHOV, V.; BAASOV, T. Insight into the catalytic mechanism of KDO8P synthase. Synthesis and evaluation of the isosteric phosphonate mimic of the putative cyclic intermediate. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 3, n. 8, p. 1583–1588, 1993.

SHULAMI, S. et al. Cloning, expression, and biochemical characterization of 3-deoxy-D-manno-2-octulosonate-8-phosphate (KDO8P) synthase from the hyperthermophilic bacterium Aquifex pyrophilus. **Extremophiles**, v. 7, n. 6, p. 471–481, 2003.

SHULAMI, S. et al. A reciprocal single mutation affects the metal requirement of 3-deoxy-D-manno-2-octulosonate-8-phosphate (KDO8P) synthases from aquifex pyrophilus and Escherichia coli. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 43, p. 45110–45120, 2004.

SHUMILIN, I. A. et al. Crystal Structure of the Reaction Complex of 3-Deoxy- D - arabino -heptulosonate-7-phosphate Synthase from Thermotoga maritima Refines the Catalytic Mechanism and Indicates a New Mechanism of Allosteric Regulation. p. 455–466, 2004.

SILVA, L. A. et al. Neisseria meningitidis disease-associated clones in Amazonas State, Brazil. **Infectious Diseases**, v. 0, n. 0, p. 1–8, 2018.

STOICA, I.; SADIQ, S. K.; COVENEY, P. V. Rapid and Accurate Prediction of Binding Free Energies for Saquinavir-Bound HIV-1 Proteases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 8, p. 2639–2648, 1 fev. 2008.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock : A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking. p. 3315–3321, 2006a.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 3315–3321, 1 jun. 2006b.

TORTORA, GERARD J., FUNKE, BERDELL R., CASE, C. L. No Title. **Microbiologia**, v. 10.ed., p. 894p., 2012.

UGO VARETTO. **Molekel 5.4; Swiss National Supercomputing Centre: Lugano (Switzerland)**., [s.d.].

VAINER, R. et al. Crystal Structures of Escherichia coli KDO8P Synthase Complexes Reveal the Source of Catalytic Irreversibility. **Journal of Molecular Biology**, v. 351, n. 3, p. 641–652, 2005a.

VAINER, R. et al. Crystal structures of Escherichia coli KDO8P synthase complexes reveal the source of catalytic irreversibility. **Journal of Molecular Biology**, v. 351, n. 3, p. 641–652, 2005b.

VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. Algorithms for macromolecular dynamics and constraint dynamics. **Molecular Physics**, v. 34, n. 5, p. 1311–1327, 1 nov. 1977.

VARDAKAS, K. Z. et al. Predictors of mortality in patients with infections due to multi-drug resistant Gram negative bacteria : The study , the patient , the bug or the drug ? **Journal of Infection**, v. 66, n. 5, p. 401–414, 2013.

VERLET, L. Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. **Physical Review**, v. 159, n. 1, p. 98–103, 5

jul. 1967.

VERLI, H. **Bioinformática da Biologia à flexibilidade molecular**. [s.l: s.n.].

VON NUSSBAUM, F.; BRANDS, M.; HINZEN, B.; WEIGAND, S.; HÄBICH, D. . A. No Title. **Chem**, v. Int. Ed., n. 45, p. 5072, 2006.

WANG, J. et al. Structures of Aquifex aeolicus KDO8P synthase in complex with R5P and PEP, and with a bisubstrate inhibitor: Role of active site water in catalysis. **Biochemistry**, v. 40, n. 51, p. 15676–15683, 2001.

WANG, J. et al. Development and testing of a general amber force field. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 9, p. 1157–1174, 15 jul. 2004.

WANG, W.; KOLLMAN, P. A. Computational study of protein specificity: The molecular basis of HIV-1 protease drug resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 26, p. 14937 LP – 14942, 18 dez. 2001.

WATERHOUSE, A. et al. SWISS-MODEL : homology modelling of protein structures and complexes. v. 46, n. May, p. 296–303, 2018.

XU X., WANG J., GRISON C., PETEK S., COUTROT P., BIRCK M. R., WOODARD R. W., AND G. D. L. Structure-Based Design of Novel Inhibitors of 3-Deoxy- D - manno -octulosonate 8-Phosphate Synthase. **Drug Design and Discovery**, v. 18, n. June 2016, p. 91–99, 2003.

ZÄHRINGER, U.; LINDNER, B.; RIETSCHHEL, E. . Endotoxin in Health and Disease. **In: Endotoxins.**, v. Ed. H. BRA, p. p 93-114, 1999.

ZHAO, Y.; TRUHLAR, D. G. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. **Theoretical Chemistry Accounts**, v. 120, n. 1, p. 215–241, 2008.

APÊNDICES

Article

Computational Investigation of Bisphosphate Inhibitors of 3-Deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate Synthase

Jéssica de Oliveira Araújo, Alberto Monteiro dos Santos, Jerônimo Lameira, Cláudio Nahum Alves and Anderson Henrique Lima * 

Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos, Universidade Federal do Pará, Belém 66075-110, Brasil

* Correspondence: anderson@ufpa.br

Academic Editor: Simone Brogi

Received: 10 May 2019; Accepted: 29 May 2019; Published: 27 June 2019



Abstract: The synthase, 3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate (KDO8P), is a key enzyme for the lipopolysaccharide (LPS) biosynthesis of gram-negative bacteria and a potential target for developing new antimicrobial agents. In this study, computational molecular modeling methods were used to determine the complete structure of the KDO8P synthase from *Neisseria meningitidis* and to investigate the molecular mechanism of its inhibition by three bisphosphate inhibitors: BPH1, BPH2, and BPH3. Our results showed that BPH1 presented a protein–ligand complex with the highest affinity, which is in agreement with experimental data. Furthermore, molecular dynamics (MD) simulations showed that BPH1 is more active due to the many effective interactions, most of which are derived from its phosphoenolpyruvate moiety. Conversely, BPH2 exhibited few hydrogen interactions during the MD simulations with key residues located at the active sites of the KDO8P synthase. In addition, we hydroxylated BPH2 to create the hypothetical molecule named BPH3, to investigate the influence of the hydroxyl groups on the affinity of the bisphosphate inhibitors toward the KDO8P synthase. Overall, we discuss the main interactions between the KDO8P synthase and the bisphosphate inhibitors that are potential starting points for the design of new molecules with significant antibiotic activities.

Keywords: KDO8P synthase; *Neisseria meningitidis*; bisphosphate inhibitors; molecular dynamics

1. Introduction

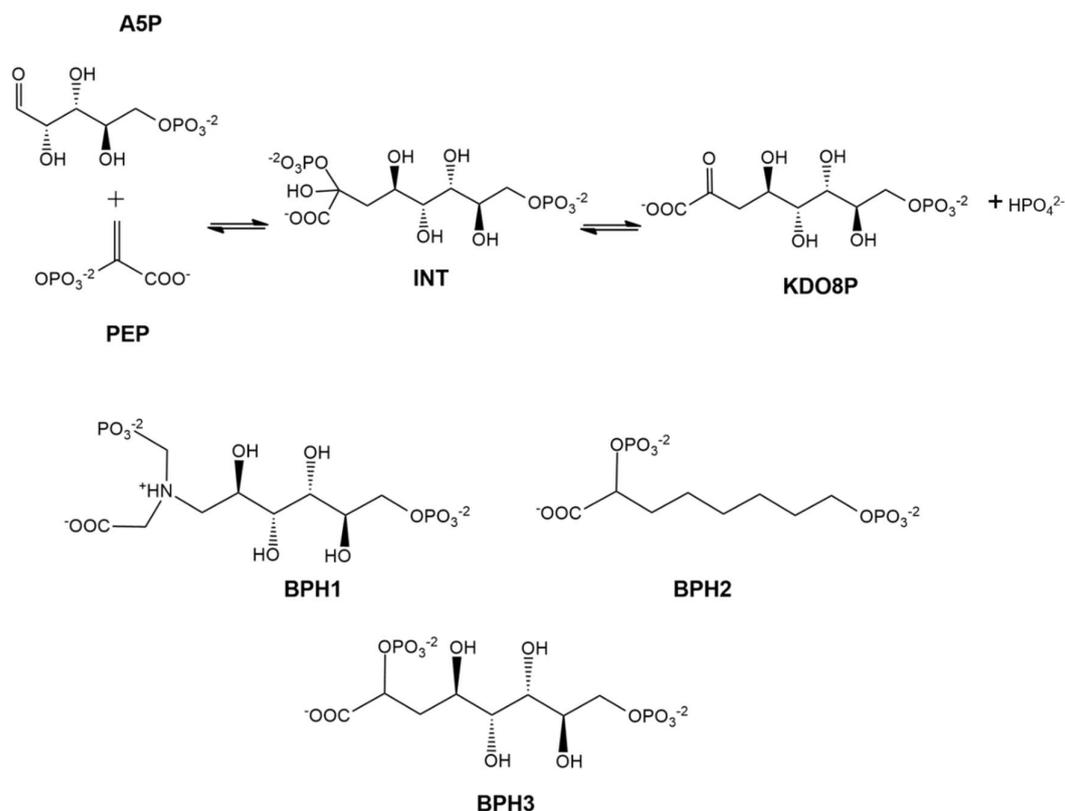
The 3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate (KDO8P) synthase is an important enzyme in the lipopolysaccharide (LPS) biosynthesis of gram-negative bacteria [1]. It catalyzes the aldol-type condensation of D-arabinose 5-phosphate (A5P) and phosphoenolpyruvate (PEP), forming 3-deoxy-D-manno-octulosonate-8-phosphate (KDO8P) and inorganic phosphate (Pi) [2]. The compound, 3-deoxy-D-manno-octulosonate (KDO), is an essential component of the lipopolysaccharide layer found in the cell walls of all gram-negative bacteria [3,4]. The absence of KDO causes the disruption of LPS, leading to severe alteration of the growth and normal functions of gram-negative bacteria [1,5–7]. The KDO pathway is present only in gram-negative bacteria and plant species, and it is considered a potential target for the development of new anti-microbial drugs [8].

The KDO8P synthase belongs to the family of transferases and can be divided into two classes based on the presence or absence of a metal ion in its active site [9,10]. The KDO8P synthases from *Escherichia coli* and *Neisseria meningitidis* are metal independent enzymes [2,11–13], while those from *Aquifex aeolicus*, *Aquifex pyrophilus*, *Helicobacter pylori*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, and *Chlamydia psittaci* require a metal ion to perform their catalytic activities [9,14–17]. Despite the metal dependency, the

active sites of these enzymes are practically identical; they differ only in the substitution of cysteine, the amino acid involved in the metal coordination, with asparagine in the metal-independent enzyme [10].

The catalytic mechanism of the KDO8P synthase leads to the formation of a double-phosphorylated intermediate, after which the products, KDO8P and Pi, are formed [18–21]. Thus, monophosphate and bisphosphate molecules have been studied to construct new potential inhibitors that mimic the tetrahedral intermediate of the reaction. These tetrahedral intermediate derivatives maintain the stereochemistry of the molecule and the charged phosphate groups derived from both PEP and A5P substrates [12,22].

Several molecules have been explored as reaction intermediate mimics. Bisphosphate 1 (BPH1) [12] and bisphosphate 2 (BPH2) [22] are described in the literature as the best inhibitors of KDO8P synthase (Scheme 1).



Scheme 1. At the top, 2D structures that represent the reaction of D-arabinose 5-phosphate (A5P) and phosphoenolpyruvate (PEP) to form 3-deoxy-D-manno-octulosonate-8-phosphate (KDO8P) and inorganic phosphate (Pi). The doubly phosphorylated intermediate (INT) is used as a reference for the design of the analog inhibitors: BPH1, BPH2, and BPH3.

However, little is known about the mode of action of these inhibitors at a molecular level, particularly their interactions with the KDO8P synthase from *Neisseria meningitidis*. In this work, we performed molecular modeling of the inhibitors, BPH1 and BPH2, in complexes with the KDO8P synthase to comprehend the molecular bisphosphate inhibitor interactions. In addition, we hydroxylated BPH2 to create the hypothetical molecule, named BPH3 (Scheme 1) to investigate the influence of the hydroxyl groups on the affinity of the bisphosphate inhibitors toward the KDO8P synthase. Molecular modeling methods can provide valuable information regarding the molecular basis for the bisphosphate-based inhibition of the KDO8P synthase from *Neisseria meningitidis* and to further contribute to the search for new antibacterial agents in gram-negative bacteria.

2. Results and Discussion

2.1. Homology Modeling

The KDO8P synthase crystal structure from *Neisseria meningitidis* is currently available (PDB ID: 2QKF); however, the loops near the catalytic sites are absent. Since the metal-independent KDO8P synthase is generally difficult to analyze using X-ray diffraction techniques, we built, through homology modeling, a complete model of the KDO8P synthase based on the crystal structure of the KDO8P synthase from *Escherichia coli* (PDB ID: 1X6U). The main loops of the modeled KDO8P synthase are shown in Figure 1.

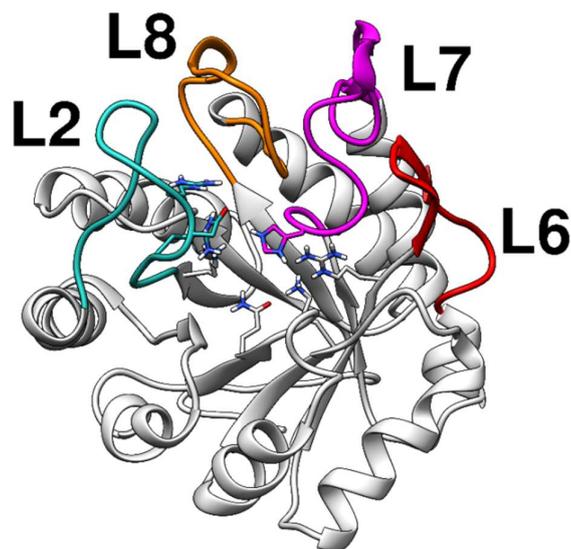


Figure 1. Structure of the modeled KDO8P synthase from *Neisseria meningitidis* evidencing the regions of the loops. The loops, L2, L7, and L8, control access to the active site.

After building the model, the structure was validated through different approaches. The stereochemical quality of the modeled protein determined by the Ramachandran plot analysis showed 91.82% of the residues in a favored region (Figure S1). The Anolea and QMEAN analyses presented great results as well. For more details, see Supporting Information (Figure S2). The overall and local model qualities were evaluated by ProSA-web to identify errors in the three-dimensional structures of the protein model. Thus, a Z-score of -7.6 points implies a good model since the quality is evaluated using solved protein structures as references (Figure S3). Finally, ERRAT was used to analyze the statistics of the non-bonded interactions between different atom types based on the characteristics of the atomic interactions [23]. The overall quality factor was determined as 94.574, which is very satisfactory (Figure S4).

Therefore, the modeled enzyme appeared to be a good starting point to study the interactions through docking and molecular dynamics simulations. Notably, the metal dependence of the KDO8P synthase has been extensively studied; recently, an evolutionary hypothesis showed that the catalytic activity of the metal-dependent KDO8P synthase is more compromised by the truncation of L7 than the metal-independent enzyme is [24]. The metal ion facilitates the correct coordination of A5P in the catalytic site; thus, metal independent enzymes are more reliant on the extended L7 loop for accurate A5P binding.

2.2. Docking Analysis

The enzyme, KDO8P synthase, catalyzes the condensation reaction between PEP and A5P to produce KDO8P. First, we demonstrated that the bound conformations of PEP, A5P, and KDO8P could be reproduced in silico by MVD algorithms [25]. The results of these re-docking simulations are

presented in Supplementary Information (Figure S5) and they show very small deviation from the reference crystal structure (0.15, 0.39, and 0.34 Å for PEP, A5P, and KDO8P, respectively). We used re-docking experiments with known complexes (the substrates: A5P, PEP; and the product: KDO8P), which were of similar conformational complexities with the inhibitors. This is usually performed to evaluate the docking protocol being used, as mentioned by Olson's group [26]. The objective of the procedure is to verify that the docking parameters specified in the input file for the docking method are reasonable and are able to recover the structure and interactions of a known complex.

The inhibitors studied in this work, BPH1, BPH2, and BPH3, share structural and functional similarities with both the A5P and PEP substrates [22,27]. Our results showed that these inhibitors bind similarly, as can be seen in the comparison with the structures of the homologous KDO8P synthase from *Aquifex aeolicus* (PDB ID: 1FXQ, Figure 2 and 1FWW, Figure S6) [28].

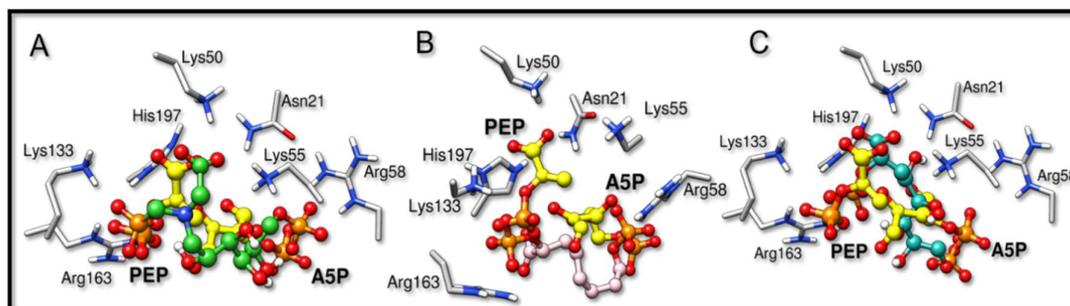


Figure 2. Overlapped structures of the bisphosphate inhibitors with PEP and A5P substrates (PDB ID: 1FXQ). The carbon atoms of the substrates are colored yellow. (A–C) are the superimpositions with BPH1, BPH2, and BPH3, respectively. It is noted that the phosphate groups derived from the substrates overlap the phosphate groups of the inhibitors.

The binding modes of BPH1, BPH2, and BPH3 into the active sites of the KDO8P synthase are essentially the same at the PEP-moiety. The phosphate group of BPH1 interacts with Lys133 and Arg163, while the carboxylate group of BPH1 interacts with Lys50, Lys55, and His197. The residue, His197, which also interacts with the phosphate group of the PEP-moiety, is known to coordinate the divalent ion of the metal-dependent KDO8P synthase [28]. BPH2 and BPH3 interact similarly, differing only in their interactions with Lys50, where there is a shorter interaction with the carboxylate group of BPH3 than with that of BPH2.

2.3. Molecular Dynamics Simulations

We calculated the root mean square deviations (RMSD) of BPH1, BPH2, and BPH3 in the complexes with the KDO8P synthase along the 100 ns of MD simulation (Figure 3). The result highlighted the higher stability of the BPH1-KDO8P synthase complex compared to those of the BPH2 and BPH3 complexes. Moreover, BPH2 and BPH3 exhibited similar behaviors regarding their stabilities over the simulation.

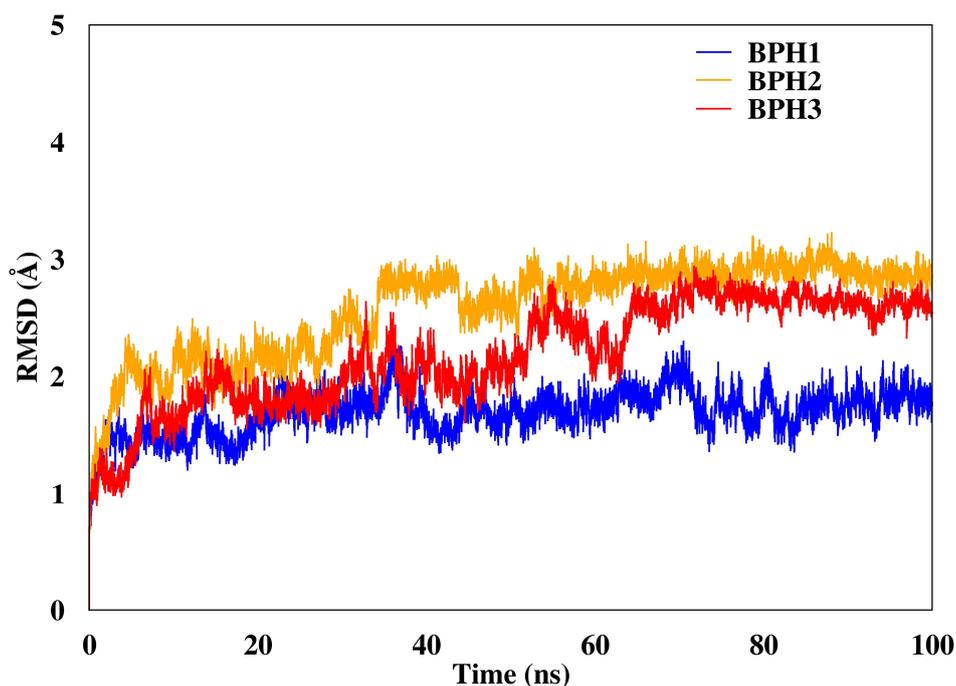


Figure 3. RMSD of the backbone atoms of the complexes after 100 ns of MD simulations. The RMSD represents the enzyme in the presence of the BPH1 (blue), BPH2 (yellow), and BPH3 (red) inhibitors.

Regarding the fluctuations observed for the three complexes, the BPH3-KDO8P synthase complex, particularly residues 200–218 (loop L8), showed slightly higher fluctuations (Figure 4) than others did.

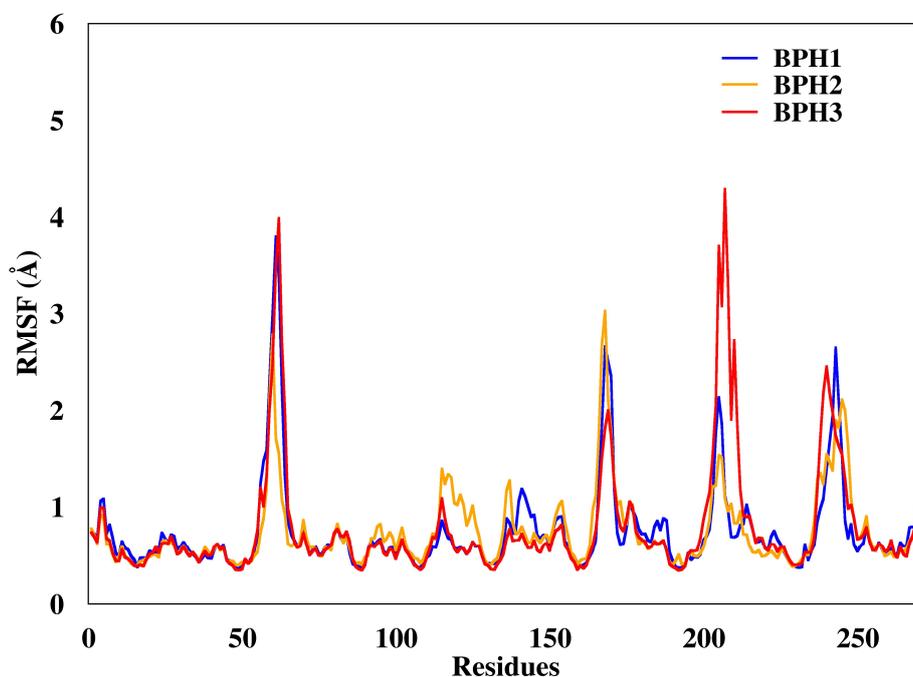


Figure 4. Root mean square deviations (RMSF) of the backbone atoms of the complexes from representative snapshots of MD simulations. Enzyme in the presence of the BPH1, BPH2, and BPH3 inhibitors are colored blue, yellow, and red, respectively.

It appears that the stability of the whole complex may be related to the distances of hydrogen bond interactions obtained from the molecular dynamic simulations. The inter-atomic distance obtained for

the interaction between BPH1 and the residues at the catalytic site was shorter than the corresponding distances from the BPH2 (Table 1). Additional interactions have been observed for the BPH3-KDO8P synthase complex that differs from those of BPH1 and BPH2, but with similar contributions toward the stability.

Table 1. Distances (in Å) for the phosphate groups from MD simulations. (P1) represents the P atom derived from the PEP moiety, while (P2) represents the P atom from the A5P moiety (see Figure S3 for details).

KDO8P Synthase (<i>N. Meningitidis</i>)							
	BPH1 (P1)	BPH2 (P1)	BPH3 (P1)		BPH1 (P2)	BPH2 (P2)	BPH3 (P2)
Arg58 (NH2)	2.8 (\pm 0.1)	2.8 (\pm 0.1)	5.8 (\pm 0.1)	Lys133 (NZ)	2.8 (\pm 0.1)	2.8 (\pm 0.1)	2.7 (\pm 0.1)
Asn57 (ND2)	2.9 (\pm 0.1)	7.6 (\pm 0.1)	6.7 (\pm 0.1)	Arg163 (NE)	2.7 (\pm 0.1)	3.2 (\pm 0.2)	2.8 (\pm 0.1)
				His197 (NE2)	2.7 (\pm 0.1)	2.7 (\pm 0.1)	2.7 (\pm 0.1)

The deviation data shown in Table 1 confirm the stability of the ligands along the simulations. Notably, the BPH3 inhibitor interacts with the hydroxyl groups that connect the two phosphate groups. Thus, the distance between the polar residues, Arg58 and Asn57, increases relative to the P1 atom when compared to those of the inhibitors, BPH1 and BPH2 (see Figure 5).

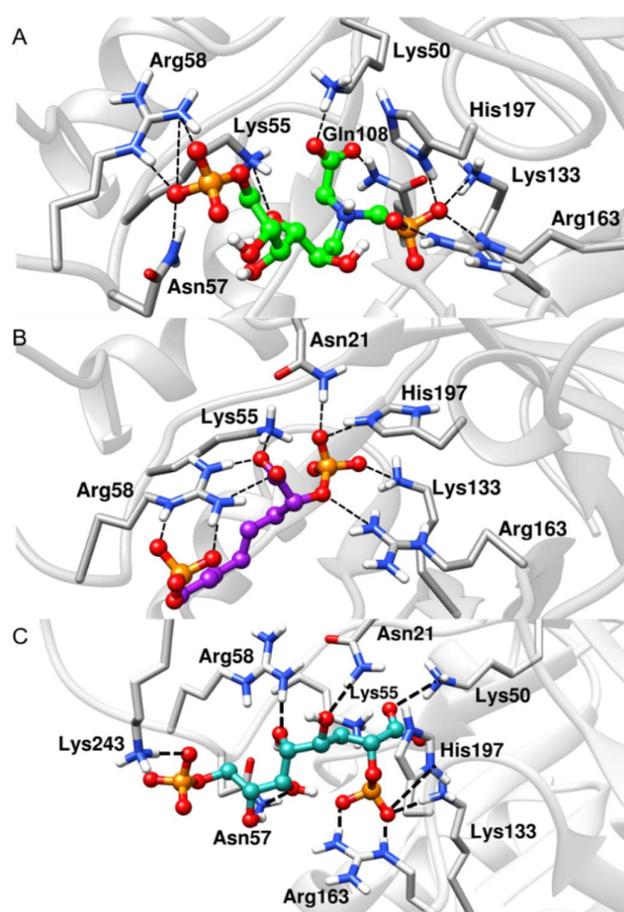


Figure 5. Representative structures along the MD simulations. (A) BPH1-KDO8P synthase, (B) BPH2-KDO8P synthase, and (C) BPH3-KDO8P synthase complexes. We can see important interactions of phosphate groups of the inhibitors with positively charged groups of KDO8P synthase.

The MD simulations results showed that BPH1 and BPH2 differ in their interactions on the A5P moiety. The portion of the BPH2 inhibitor that is located in the pocket of the A5P substrate starts

to interact with the nonpolar residues, Pro110, Phe112, and Leu113, implying that BPH2 loses the interaction with some residues from loop L7, as can be seen in Figure 6.

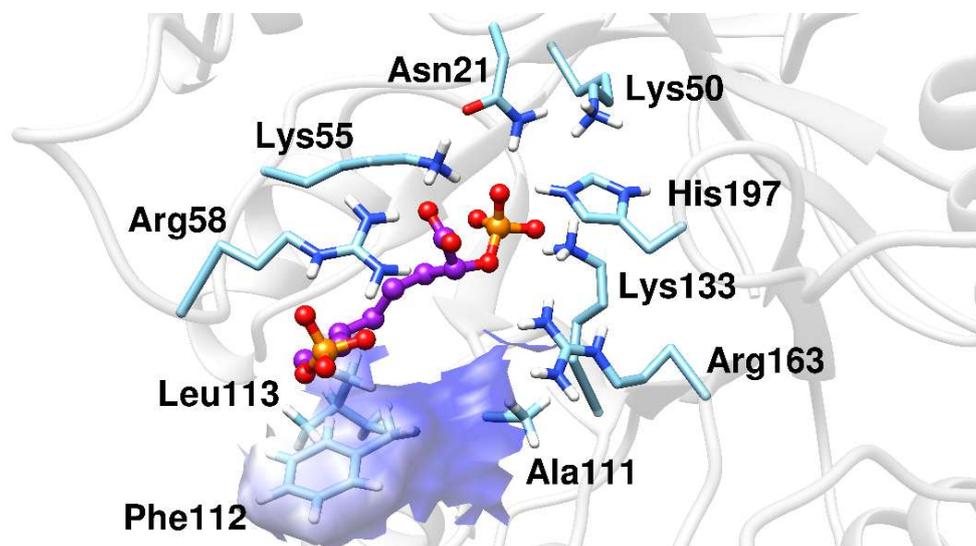


Figure 6. The BPH2 inhibitor having polar contacts at the active site of the KDO8P synthase.

These interactions with nonpolar residues motivated the investigation on the effect of hydroxylating the chain that links both phosphate groups in the bisphosphate inhibitors. Our results showed that hydroxylated bisphosphate inhibitors, such as BPH3, may not only increase the number of interactions at the catalytic sites of the protein, but also contribute to self-conformational stabilization.

2.4. Binding Free-Energy Analysis

BPH1 is the best inhibitor of the series called “phosphate linkers” [29,30]. The binding free-energies (ΔG_{bind}) of BPH1, BPH2, and BPH3 in complexes with the enzyme, KDO8P synthase, have been computed during the last 1000 snapshots of the MD simulations. Table 2 shows the results for the global interaction energy for each complex.

Table 2. Binding free-energy (in kcal.mol⁻¹) values obtained from MM/GBSA, MM/PBSA, and SIE approaches in kcal.mol⁻¹.

	BPH1	BPH2	BPH3
Experimental	-8.82 ^{a,b}	-7.0 ^{a,c}	(n/d)
MM/GBSA	-96.07	-71.72	-82.96
MM/PBSA	-107.09	-82.64	-110.73
SIE	-13.53	-13.49	-14.37

^a Results converted to kcal.mol⁻¹ based on inhibition constants obtained against KDO8P synthase from ^b *E. coli* [31] and ^c *N. meningitidis* [22]. (n/d) Not Determined.

As can be seen in Table 2, BPH1 showed higher affinity towards the KDO8P synthase than BPH2 did in the BPH2-KDO8P synthase complex. This result is corroborated by previously reported experimental results that showed a constant of inhibition of 0.37 μM for BPH1 [31] against 7.9 μM for BPH2 [22]. Moreover, the addition of hydroxyl groups to the BPH2 inhibitor increased the binding-receptor affinity, thereby increasing the proximity of the values to those obtained for the BPH1 inhibitor.

To verify the contribution of each residue to the global interactions with the inhibitors, the last 1000 snapshots obtained from the MD simulations trajectory were analyzed using the per-residue

decomposition (MM-GBSA) approach. The results are illustrated in Figure 7, where negative values correspond to attractions, and the positive values to repulsions.

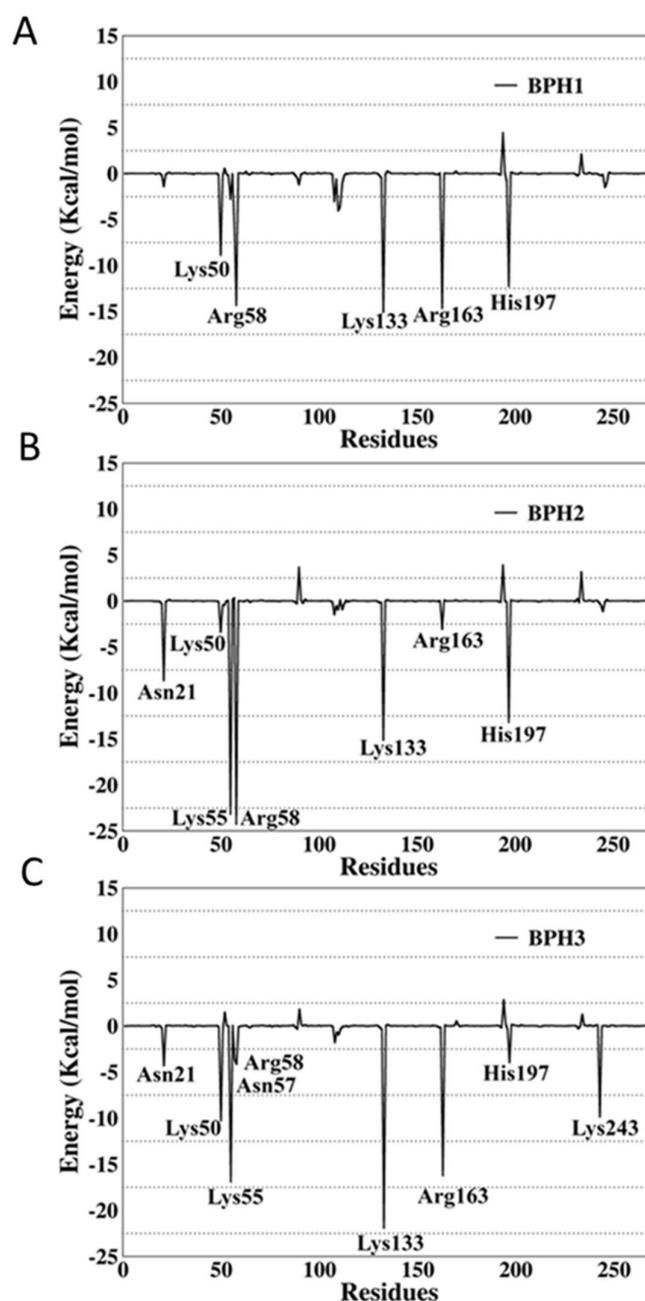


Figure 7. Per-residue decomposition analysis of (A) BPH1, (B) BPH2, and (C) BPH3 in complexes with the KDO8P synthase from *N. meningitidis*.

The per-residue energy decomposition of the BPH1-KDO8P synthase complex indicated multiple interactions in the enzyme active sites. The key residues, Lys50, Arg58, Lys133, Arg163, and His197, contributed greatly with -8.9 , -14.34 , -15.65 , -14.66 , and -12.29 kcal/mol, respectively.

The interactions of BPH2 with Lys55 and Arg58 are more effective than those of BPH1 and BPH3 (Figure 7). The negatively charged phosphate group promotes an optimal interaction with the positively charged groups, particularly arginine and lysine residues at the active site.

Apparently, BPH1 undergoes many interactions, which result in a protein–ligand complex with the highest affinity, as can be seen in Table 2. Furthermore, the absence of polar contacts between the

enzyme and the chain that links the phosphate groups of the inhibitor causes a repulsion observed mainly with the residue Asp90. The inclusion of hydroxyl groups in the hypothetical BPH3 molecule allows interactions with Asn21, Asn57, and Arg58. Besides, Lys243 appears to interact strongly with BPH3 (about $-10 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$), an interaction, which is not observed in BPH1 and BPH2 complexes (See Figures 5 and 7).

Furthermore, we evaluated the influence of the KDO8P synthase on the electrostatic potential surfaces of the inhibitors along the simulation, and determined the molecular electrostatic potential (MEP) surfaces for the inhibitors in a protein environment (Figure 8). The MEP surfaces were obtained from the M06-2X/6-31++G (d,p) level using single-point structures obtained from the MD simulations. These surfaces correspond to an isodensity value of 0.002 au. The most nucleophilic regions (negative electronic potential) are shown in red, while the most electrophilic regions (positive electrostatic potential) are shown in blue. Our results show that the regions of positive charge are predominantly on the hydroxyl groups of BPH1 and BPH3 (Figure 8).

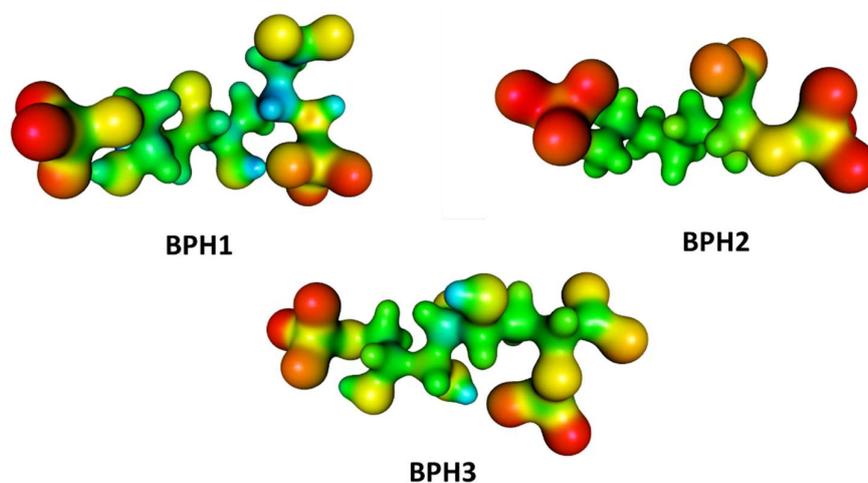


Figure 8. Molecular electrostatic potential (MEP) surfaces of biphosphate inhibitors BPH1, BPH2, and the hypothetical BPH3. Calculations were done at the M06-2X/6-31++G (d,p) level.

Conversely, the most negative charges are on the phosphate group of the A5P moiety. Notably, the biphosphate inhibitors resemble the oxocarbenium ion intermediates formed by the proposed intermediate derivatives that have long been targets of inhibitor design. This may provide a basis for the design of new inhibitors since analogs of the reaction intermediates can be used to inhibit the KDO8P synthase. In addition, note that BPH1 and BPH3 have a more positive charge around C2 in the protein than BPH2 does (see Figure 8). This positive potential around C2 is a consequence of both the electrostatic interaction between the enzyme and inhibitors and the electrostatic interaction with the substrates itself. Thus, as expected, the KDO8P synthase devotes its catalytic power to stabilizing its cationic intermediate.

3. Materials and Methods

3.1. Homology Modeling

The modeling of the systems was performed using the sequence of the enzyme, KDO8P synthase, from *Neisseria meningitidis* obtained from UNIPROT (ACC Q9JZ55) and submitted to the SWISS-MODEL server [32]. The metal-independent KDO8P synthase is generally difficult to discern by X-ray diffraction techniques, and therefore, some Protein Data Bank (PDB) structures do not exhibit important protein loop regions [10]. Thus, we built, by homology modeling, a complete model of the KDO8P synthase based on the crystal structure of the KDO8P synthase from *Escherichia coli* (PDB ID: 1X6U) [33]. Firstly, the most suitable template was explored for homology modeling. PDB ID 1X6U was preferred because it is

71.22% identical and it has the lowest e-value. After modeling the 3D structure, the quality and validation of the model were evaluated by several structure assessment methods including PROCHECK [34], where the overall stereochemical quality of the protein was assessed by the Ramachandran plot analysis [35], Anolea [36], QMEAN [37], z-score by ProSA-web [38], and ERRAT [23].

3.2. Molecular Docking Study

The molecular dockings of BPH1, BPH2, and BPH3 into the active site of the KDO8P synthase from *N. meningitidis* were simulated using a Molegro Virtual Docker (MVD). The MVD is a fast and flexible docking program that estimates the most probable binding conformation of a ligand to a macromolecule [25]. It includes MolDock, which is a heuristic search algorithm that combines differential evolution with a cavity prediction algorithm [25,39]. The docking scoring function of MolDock is an extension of the piecewise linear potential (PLP), including new hydrogen bonding and electrostatic terms. Further, a re-ranking scoring function is introduced to identify the most promising docking solution from the solutions obtained by the docking algorithm.

To develop the docking methodology, we first attempted to demonstrate that bound conformations could be reproduced in silico. For this purpose, A5P and PEP (substrates) and KDO8 (product) from the PDB ID 1FWW and 1X6U, respectively, were re-docked using the template docking feature implemented in the MVD program. The fitness evaluation of each re-docked pose was evaluated by considering the RMSDs values and docking scores. The selected re-docked pose was further evaluated for its interactions and energetic analysis to investigate the efficiency of the docking search algorithm and scoring function by comparing its values with those of the bound conformation.

In all the simulations (re-docking the known bound conformations and docking the bisphosphate inhibitors), a minimum of 10 runs was performed. The MolDock scoring function was set to a grid resolution of 0.30 Å and a maximum iteration of 3000 with a simplex evolution of size 100. Subsequently, the main interactions in the docking results were compared to those of the crystal structures for PEP and A5P (PDB ID: 1FXQ and 1FWW) [9]. The best pose of each inhibitor was selected for subsequent ligand-protein interaction energy analysis. The selection was performed based on smaller RMSD and lower binding energy values.

3.3. MD Simulations

Molecular dynamics simulations were performed to verify the stabilities of the complexes formed from the interaction between KDO8P synthase from *Neisseria meningitidis* and the ligands, BPH1, BPH2, and BPH3. The Amber 16 suite [40] combined with the Amber ff14SB force field was used to perform the MD simulations. Hydrogen atoms were added into the protein structure using the tLeap module, where the protonation states of charged protein residues were obtained from the H++ server (<http://biophysics.cs.vt.edu/H++>) [41]. The charges of the bisphosphate inhibitors were calculated on a Gaussian 09 program [42] using the Hartree–Fock method and 6-31G* basis set [43]. Thereafter, the system was solvated in a truncated octahedron TIP3P water box. The distance between the wall of the box and the closest atom of the solute was 12.0 Å. Counter ions (in this case, Cl⁻) were added to maintain the electroneutrality of the system. All the hydrogen atoms were minimized for 2000 steps of steepest descent, followed by 3000 steps of conjugate gradient. Next, the positions of the water molecules were relaxed using the same protocol. The whole system was energy-minimized for 5000 steps of steepest descent plus 5000 steps of conjugate gradients. Afterward, we started the thermalization of the system from 0 to 298 K running 100 ps molecular dynamics with position restraints at a constant volume. To equilibrate the system before production dynamics, we ran 500 ps molecular dynamics without positional restraints at a constant pressure. We performed 100 ns of MD simulation at a temperature of 298 K. The SHAKE algorithm [44] was used to maintain all the bonds at their equilibrium distances, which allowed the use of an integration time step of 2 fs. Finally, a cut-off of 12 Å was used for non-bonded interactions.

3.4. Free Energy Calculations

The molecular mechanical energy combined with the Poisson–Boltzmann or generalized Born and surface area continuum solvation (MM/PBSA and MM/GBSA) methods are popular approaches to estimating the free energy of the binding of small ligands to biological macromolecules [45,46]. In general, these methods estimate the binding free energy as follows:

$$\Delta G_{bind} = G_{complex} - (G_{receptor} + G_{ligand}), \quad (1)$$

where ΔG_{bind} can be decomposed into the following three terms:

$$\Delta G_{bind} = \Delta E_{MM} + \Delta G_{sol} - T\Delta S \quad (2)$$

The molecular mechanical energy (ΔE_{MM}) represents the summation of the intramolecular energy; the solvation energy (ΔG_{sol}) is composed of the polar ($\Delta G_{PB/GB}$) and non-polar contributions (ΔG_{SA}); finally, the entropic contribution ($T\Delta S$) is associated with the conformational entropy loss when a free-state ligand binds to the corresponding unbound-state receptor.

Similar to MM/PBSA and MM/GBSA, the solvated interaction energy (SIE) [47] treats the protein–ligand system in atomistic detail and solvation effect simplicity. Each interaction and desolvation contribution are further made up of an electrostatic component and a nonpolar component:

$$\Delta G_{bind} \approx E_{inter} + \Delta G_{desolv} = E_{inter}^{col} + \Delta G_{desolv}^R + E_{inter}^{vdW} + \Delta G_{desolv}^{np} \quad (3)$$

Thus, the electrostatic SIE component includes the Coulombic intermolecular interaction energy, E_{inter}^{col} , and the electrostatic desolvation free energy, ΔG_{desolv}^R , due to the change in the reaction field energy upon binding. The nonpolar SIE component includes the van der Waals intermolecular interaction energy, E_{inter}^{vdW} , and the nonpolar desolvation free energy, ΔG_{desolv}^{np} , that results from changes in the solute–solvent van der Waals interactions and changes during maintenance of the solute-size cavity in water.

Thereby, the free energies for the binding of the ligands were calculated from the MD trajectories using Amber16 for PB/GB-SA calculations; SIETRAJ was used to calculate the bind energies from the SIE method. For each complex, the binding free energy was estimated from snapshots taken from the trajectory at 1 ps intervals from the last 1000 snapshots. Additionally, we figured out the residues that most contribute to the calculated overall binding energy using a residue-by-residue decomposition protocol embedded in the GB solvent model based on the MMGBSA approach.

4. Conclusions

In this study, we employed docking, molecular dynamics, and binding free-energy calculations to provide insights into the molecular mechanism of metal-independent KDO8P synthase inhibition. In accordance with our results, BPH1 presented the protein–ligand (ΔG_{bind}) complex with the highest affinity, which is in agreement with experimental data that show it as the most efficient for inhibiting the metal-independent KDO8P synthase. Our results showed that this high affinity is due to the relatively high number of interactions with key residues at the active sites of the enzyme, particularly Lys50, Lys55, Arg58, Lys133, Arg163, and His197. Besides, hydroxylated carbons help the enzyme sustain polar contacts that are essential for maintaining the main interactions primarily with the A5P substrate. Therefore, this study provides a molecular interpretation of the main interactions that occur between the KDO8P synthase and bisphosphate inhibitors, thereby contributing to a better understanding of the inhibition processes involving this biological target and aiding the design of new inhibitors as candidates for antibiotics. We hope that the results reported herein may be useful for designing molecules with more interesting inhibitory activities on the basis of their three-dimensional structures.

Supplementary Materials: The following are available online, Figure S1: Ramachandran Favoured (91.82%), Ramachandran Outliers (2.6%) Rotamers Outliers (4.41%), Figure S2: Non-local Atomic Interaction Energy obtained from Anolea and the protein model quality obtained from Qmean, Figure S3: A) Overall model quality and B) Local model quality obtained from ProSA-web, an interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins <https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>, Figure S4: Overall quality factor evaluated by ERRAT, Figure S5: Re-docking of A) PEP and A5P substrates and B) KDO8P product. At the bottom are the RMSD (in Å) and docking energies (in kcal/mol), Figure S6: Overlapped structures of the bisphosphate inhibitors with PEP and A5P substrates (PDB ID: 1FWW). The carbon atoms of the substrates are colored purple. A, B and C are the superimposition with BPH1, BPH2 and BPH3, respectively.

Author Contributions: J.d.O.A. and A.W.d.S. conducted the molecular dynamics and free energy simulations. J.L. designed the docking experiments, discussed and analyzed the results. C.N.A. contributed to the writing and the revision of the article. A.H.L. designed the research and headed, wrote, and revised the manuscript.

Funding: The article processing charge was funded by Universidade Federal do Pará.

Acknowledgments: The authors acknowledge the National Laboratory for Scientific Computing (LNCC/MCTI, Brazil) for providing HPC resources of the SDumont supercomputer, which have contributed to the research results reported within this paper. Also, we would like to thank PAPQ 2019-PROPESP/UFPA for the financial support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Raetz, C.R.H.; Whitfield, C. Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 635–700. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Ray, P.H. Purification and characterization of 3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate synthetase from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **1980**, *141*, 635–644. [[PubMed](#)]
3. Brennan, P.J.; Nikaido, H. The Envelope of Mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 29–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Raetz, C. Biochemistry of Endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **1990**, *59*, 129–170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Rick, P.D.; Young, D.A. Isolation and characterization of a temperature-sensitive lethal mutant of *Salmonella typhimurium* that is conditionally defective in 3-deoxy-D-manno-octulosonate-8-phosphate synthesis. *J. Bacteriol.* **1982**, *150*, 447–455. [[PubMed](#)]
6. Maldonado, R.F.; Sá-Correia, I.; Valvano, M.A. Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. *FEMS Microbiol. Rev.* **2016**, *40*, 480–493. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Raetz, C.R.H.; Guan, Z.; Ingram, B.O.; Six, D.A.; Song, F.; Wang, X.; Zhao, J. Discovery of new biosynthetic pathways: The lipid A story. *J. Lipid Res.* **2009**, *50*, S103–S108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Cipolla, L.; Polissi, A.; Airoidi, C.; Galliani, P.; Sperandeo, P.; Nicotra, F. The Kdo Biosynthetic Pathway Toward OM Biogenesis as Target in Antibacterial Drug Design and Development. *Curr. Drug Discov. Technol.* **2009**, *6*, 19–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Duewel, H.S.; Radaev, S.; Wang, J.; Woodard, R.W.; Gatti, D.L. Substrate and metal complexes of 3-deoxy-D-manno-octulosonate-8-phosphate synthase from *Aquifex aeolicus* at 1.9-Å Resolution: Implications for the condensation mechanism. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 8393–8402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Cochrane, F.C.; Cookson, T.V.M.; Jameson, G.B.; Parker, E.J. Reversing Evolution: Re-establishing Obligate Metal Ion Dependence in a Metal-independent KDO8P Synthase. *J. Mol. Biol.* **2009**, *390*, 646–661. [[CrossRef](#)]
11. Wagner, T.; Kretsinger, R.H.; Bauerle, R.; Tolbert, W.D. 3-deoxy-D-manno-octulosonate-8-phosphate synthase from *Escherichia coli*. Model of binding of phosphoenolpyruvate and D-arabinose-5-phosphate. *J. Mol. Biol.* **2000**, *301*, 233–238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Asojo, O.; Friedman, J.; Adir, N.; Belakhov, V.; Shoham, Y.; Baasov, T. Crystal structures of KDOP synthase in its binary complexes with the substrate phosphoenolpyruvate and with a mechanism-based inhibitor. *Biochemistry* **2001**, *40*, 6326–6334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Ahn, M.; Cochrane, F.C.; Patchett, M.L.; Parker, E.J. Arabinose 5-phosphate analogues as mechanistic probes for *Neisseria meningitidis* 3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate synthase. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 9830–9836. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Wang, J.; Duewel, H.S.; Woodard, R.W.; Gatti, D.L. Structures of *Aquifex aeolicus* KDO8P synthase in complex with R5P and PEP, and with a bisubstrate inhibitor: Role of active site water in catalysis. *Biochemistry* **2001**, *40*, 15676–15683. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Birck, M.R.; Woodard, R.W. Aquifex aeolicus 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid 8-phosphate synthase: A new class of KDO 8-P synthase? *J. Mol. Evol.* **2001**, *52*, 205–214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Duetzel, H.S.; Woodard, R.W. A metal bridge between two enzyme families: 3-deoxy-D-manno-octulosonate-8-phosphate synthase from Aquifex aeolicus requires a divalent metal for activity. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 22824–22831. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Shulami, S.; Yaniv, O.; Rabkin, E.; Shoham, Y.; Baasov, T. Cloning, expression, and biochemical characterization of 3-deoxy-D-manno-2-octulosonate-8-phosphate (KDO8P) synthase from the hyperthermophilic bacterium Aquifex pyrophilus. *Extremophiles* **2003**, *7*, 471–481. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Dotson, G.D.; Dua, R.K.; Clemens, J.C.; Wooten, E.W.; Woodard, R.W. Overproduction and one-step purification of Escherichia coli 3-Deoxy-D-manno-octulosonic acid 8-phosphate synthase and oxygen transfer studies during catalysis using isotopic-shifted heteronuclear NMR. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 13698–13705. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Dotson, G.D.; Nanjappan, P.; Reily, M.D.; Woodard, R.W. Stereochemistry of 3-Deoxyoctulosonate 8-Phosphate Synthase. *Biochemistry* **1993**, *32*, 12392–12397. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Kohen, A.; Berkovich, R.; Belakhov, V.; Baasov, T. Stereochemistry of the KDO8P synthase. An efficient synthesis of the 3-fluoro analogues of KDO8P. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 1577–1582. [[CrossRef](#)]
21. Kona, F.; Xu, X.; Martin, P.; Kuzmic, P.; Gatti, D.L. Structural and mechanistic changes along an engineered path from metallo to nonmetallo 3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate synthases. *Biochemistry* **2007**, *46*, 4532–4544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Harrison, A.N.; Reichau, S.; Parker, E.J. Synthesis and evaluation of tetrahedral intermediate mimic inhibitors of 3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate synthase. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 907–911. [[CrossRef](#)]
23. Colovos, C.; Yeates, T.O. Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Sci.* **1993**, *2*, 1511–1519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Allison, T.M.; Hutton, R.D.; Jiao, W.; Gloyne, B.J.; Nimmo, E.B.; Jameson, G.B.; Parker, E.J. An Extended $\beta 7\alpha 7$ Substrate-Binding Loop Is Essential for Efficient Catalysis by 3-Deoxy-D-manno-Octulosonate 8-Phosphate Synthase. *Biochemistry* **2011**, *50*, 9318–9327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Thomsen, R.; Christensen, M.H. MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3315–3321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Forli, S.; Huey, R.; Pique, M.E.; Sanner, M.F.;Goodsell, D.S.; Olson, A.J. Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nat. Protoc.* **2016**, *11*, 905. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Du, S.; Tsipori, H.; Baasov, T. Synthesis and evaluation of putative oxocarbenium intermediate mimic in the KDO8P synthase-catalyzed reaction as a tool for the design of potent inhibitors for lipopolysaccharide biosynthesis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 2469–2472. [[CrossRef](#)]
28. Kona, F.; Tao, P.; Martin, P.; Xu, X.; Gatti, D.L. Electronic Structure of the Metal Center in the Cd²⁺, Zn²⁺, and Cu²⁺ Substituted Forms of KDO8P Synthase: Implications for Catalysis. *Biochemistry* **2009**, *48*, 3610–3630. [[CrossRef](#)]
29. Grison, C.; Petek, S.; Finance, C.; Coutrot, P. Synthesis and antibacterial activity of mechanism-based inhibitors of KDO8P synthase and DAH7P synthase. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 529–537. [[CrossRef](#)]
30. Xu, X.; Wang, J.; Grison, C.; Petek, S.; Coutrot, P.; Birck, M.; Woodard, R.; Gatti, D. Structure-Based Design of Novel Inhibitors of 3-Deoxy-D-manno-octulosonate 8-Phosphate Synthase. *Drug Des. Discov.* **2003**, *18*, 91–99. [[CrossRef](#)]
31. Du, S.; Faiger, H.; Belakhov, V.; Baasov, T. Towards the development of novel antibiotics: Synthesis and evaluation of a mechanism-based inhibitor of Kdo8P synthase. *Bioorganic Med. Chem.* **1999**, *7*, 2671–2682. [[CrossRef](#)]
32. Arnold, K.; Bordoli, L.; Kopp, J.; Schwede, T. The SWISS-MODEL workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinforma* **2006**, *22*, 195–201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Vainer, R.; Belakhov, V.; Rabkin, E.; Baasov, T.; Adir, N. Crystal Structures of Escherichia coli KDO8P Synthase Complexes Reveal the Source of Catalytic Irreversibility. *J. Mol. Biol.* **2005**, *351*, 641–652. [[CrossRef](#)]
34. Laskowski, R.A.; MacArthur, M.W.; Moss, D.S.; Thornton, J.M. PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **1993**, *26*, 283–291. [[CrossRef](#)]
35. Morris, A.L.; MacArthur, M.W.; Hutchinson, E.G.; Thornton, J.M. Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins Struct. Funct. Bioinform.* **1992**, *12*, 345–364. [[CrossRef](#)]

36. Melo, F.; Devos, D.; Depiereux, E.; Feytmans, E. ANOLEA: A www Server to Assess Protein Structures. In *Proceedings of the 5th International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*; AAAI Press: Halkidiki, Greece, 1997; pp. 187–190.
37. Benkert, P.; Schwede, T.; Tosatto, S.C.E. QMEANclust: Estimation of protein model quality by combining a composite scoring function with structural density information. *BMC Struct. Biol.* **2009**, *9*, 35. [[CrossRef](#)]
38. Wiederstein, M.; Sippl, M.J. ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, W407–W410. [[CrossRef](#)]
39. De Azevedo, W.F. MolDock applied to structure-based virtual screening. *Curr. Drug Targets* **2010**, *11*, 327–334. [[CrossRef](#)]
40. Case, D.A.; Cheatham, T.E.; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz, K.M.; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R.J. The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1668–1688. [[CrossRef](#)]
41. Anandakrishnan, R.; Aguilar, B.; Onufriev, A. V H++ 3.0: Automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, W537–W541. [[CrossRef](#)]
42. Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani, V.B.; Mennucci, B.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; et al. *Gaussian09*; Revision A.02; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, USA, 2016.
43. Bayly, C.I.; Cieplak, P.; Cornell, W.; Kollman, P.A. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: The RESP model. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 10269–10280. [[CrossRef](#)]
44. Ryckaert, J.-P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H.J.C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: Molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* **1977**, *23*, 327–341. [[CrossRef](#)]
45. Genheden, S.; Ryde, U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opin. Drug Discov.* **2015**, *10*, 449–461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Kollman, P.A.; Massova, I.; Reyes, C.; Kuhn, B.; Huo, S.; Chong, L.; Lee, M.; Lee, T.; Duan, Y.; Wang, W.; et al. Calculating structures and free energies of complex molecules: Combining molecular mechanics and continuum models. *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 889–897. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Naïm, M.; Bhat, S.; Rankin, K.N.; Dennis, S.; Chowdhury, S.F.; Siddiqi, I.; Drabik, P.; Sulea, T.; Bayly, C.I.; Jakalian, A.; et al. Solvated Interaction Energy (SIE) for Scoring Protein–Ligand Binding Affinities. 1. Exploring the Parameter Space. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 122–133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Sample Availability: Not available.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).