



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

LARISSA GONÇALVES MACIEL

**A ENZIMA 3-HIDRÓXI-QUINURENINA TRANSAMINASE DE *Aedes Aegypti*
COMO ALVO DE 1,2,4- OXADIAZÓIS**

Recife

2020

LARISSA GONÇALVES MACIEL

**A ENZIMA 3-HIDRÓXI-QUINURENINA TRANSAMINASE DE *Aedes Aegypti*
COMO ALVO DE 1,2,4- OXADIAZÓIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos à obtenção do título de Doutora em Química.

Área de concentração: Química Orgânica

Orientadoras: Prof^ª. Thereza Amélia Soares Da Silva

Prof^ª. Janaína Versiani Dos Anjos

Recife

2020

Catálogo na fonte
Bibliotecária Arabelly Ascoli CRB4-2068

M152e Maciel, Larissa Gonçalves
A enzima 3-hidróxi-quinurenina transaminase de *Aedes Aegypti* como alvo de 1,2,4-oxadiazóis / Larissa Gonçalves Maciel. – 2020.
187 f.: il. fig., tab.

Orientadoras: Thereza Amélia Soares da Silva, Janaína Versiani dos Anjos
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Química. Recife, 2020.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Expressão heteróloga de proteínas. 2. Cristalografia de proteínas. 3. Inibição enzimática. I. Silva, Thereza Amélia Soares da (orientadora). II. Anjos, Janaína Versiani dos (orientadora). III. Título.

547

CDD (22. ed.)

UFPE-CCEN 2020-84

LARISSA GONÇALVES MACIEL

A ENZIMA 3-HIDRÓXI-QUINURENINA TRANSAMINASE DE AEDES AEGYPTI COMO ALVO DE 1,2,4 - OXADIAZÓIS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Química.

Aprovada em: 17/04/2020

BANCA EXAMINADORA

____Participação via Videoconferência____
Profa. Thereza Amélia Soares da Silva (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Química Fundamental

____Participação via Videoconferência____
Prof. Christian Robson de Souza Reis
Instituto Aggeu Magalhães
Fundação Oswaldo Cruz

____Participação via Videoconferência____
Profa. Márcia Silva do Nascimento
Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Antibióticos

____Participação via Videoconferência____
Prof. Severino Alves Júnior
Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Química Fundamental

____Participação via Videoconferência____
Prof. Ronaldo Nascimento de Oliveira
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Departamento de Química

Dedico este trabalho às minhas avós Maria (em memória) e Eunice por serem meus exemplos de mulheres fortes e independentes.

Aos meus pais, por me ensinarem que o conhecimento é o bem mais valioso.

AGRADECIMENTOS

Sou grata primeiramente às minhas orientadoras Thereza e Janaína por todo o suporte na minha trajetória na pós-graduação. Desde o mestrado, vocês foram muito solícitas a todos os meus questionamentos e dúvidas e sempre acreditaram em mim (às vezes até mais do que eu mesma!). Vocês são mulheres e cientistas incríveis e sou muito grata por ter convivido com vocês durante todo esse tempo.

Agradeço também às doutoras Maria Helena Neves e Tatiany Romão pela colaboração e todos os ensinamentos. As discussões que tivemos durante esses anos foram muito importantes para a minha formação. Aos amigos do Laboratório de Entomologia, e principalmente Tati Rezende, Suzany, Nathaly, Karine e Elisama pelo companheirismo e discussão nos experimentos realizados no laboratório.

Ao professor Rafael Guido e doutor Andrew Oliveira, sou grata por terem me recebido tão bem em São Carlos e por todo o suporte e ensinamentos durante o ano que estive na USP. Aos amigos do Laboratório de Cristalografia de Proteínas do IFSC-USP, principalmente Ketllyn, Guilherme, Nathalya, Naiara, Fernando Maluf, Fernando Bachega, Antônio, Katarina, Evandro e Amanda, que tornaram a minha experiência em São Carlos muito mais leve e acolhedora.

Aos amigos do Departamento de Química Fundamental, principalmente Michael, Andresa, Fred, Gabriel, Ilária e Sidney, vocês tornaram a minha jornada muito mais divertida.

Aos meus pais Eliane e Éden, minha “boadrasta” Sandra e meus irmãos Diogo e Gabriel, pelo incentivo de sempre buscar os meus sonhos. Ao meu namorado Danilo, por torcer tanto pelo meu sucesso e por me ajudar a manter a minha sanidade mental nesse último ano. Você é um companheiro maravilhoso.

Sou grata a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação profissional e pessoal.

Aos funcionários e técnicos do Departamento de Química Fundamental, Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/PE e Instituto de Física de São Carlos – USP pelo suporte.

Ao CNPq e BioMol - CAPES pelo auxílio financeiro.

“Oh yes, the past can hurt. But the way I see it, you can either run from it, or learn from it.”

(THE LION, 1994)

RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é o vetor de arboviroses como a dengue e a febre Zika, doenças que acometem uma grande quantidade de pessoas principalmente em áreas tropicais. O controle químico é a principal estratégia atual para a diminuição populacional do mosquito, apesar de induzir mecanismos de resistência a longo prazo nos insetos. Em muitos casos, os alvos destes inseticidas são vias bioquímicas importantes para o vetor, que uma vez alteradas, encerram o ciclo de vida dos mosquitos. Uma dessas vias em mosquitos é a via das quinureninas, que culmina com a transformação da 3-hidróxi-quinurenina em ácido xanturênico pela enzima 3-hidróxi-quinurenina transaminase (HKT). Trabalhos prévios do nosso grupo mostraram que compostos contendo o núcleo do 1,2,4-oxadiazol apresentam atividade larvicida com evidências de que estas moléculas são prováveis inibidoras da HKT. Para provar esta hipótese, decidimos investigar o potencial da HKT como alvo molecular de derivados 1,2,4-oxadiazólicos. Para este fim, a HKT de *Aedes aegypti* (AeHKT) foi expressa em *Escherichia coli* e sua estrutura 3D foi determinada por cristalografia de macromoléculas com difração de raios X. A clonagem, expressão heteróloga e purificação da HKT apresentou um rendimento máximo de 150 mg por litro de cultura. A triagem de mais de 1000 condições de cristalização resultou na coleta de 16 conjuntos de dados provenientes de cristais da HKT de duas linhagens de *Aedes aegypti*, RecLab (RL_AeHKT) e *Rockefeller* (R_AeHKT). Problemas com cristais geminados tornaram difíceis o processamento e refinamento do conjunto de dados, mas a determinação da estrutura da RL_AEHKT em resolução máxima de 2,5 Å foi finalizada e está disponível no Banco de Dados de Proteínas. Para avaliar o perfil cinético da HKT e a atividade inibitória dos 1,2,4-oxadiazóis, foi desenvolvida uma metodologia baseada na detecção do complexo ácido xanturênico-Fe³⁺ em 570 nm, tornando o ensaio mais rápido e de baixo custo. Deste modo, HKT expressa em bactéria exibiu uma constante de Michaelis-Menten de 3,3 mM e eficiência catalítica de 149 min⁻¹.mM⁻¹, sendo estes valores similares aos descritos na literatura. A série de onze sais orgânicos derivados de 1,2,4-oxadiazóis foi testada e seus valores de CI₅₀ variaram entre 42 e 294 µM, se comportando como inibidores não-competitivos. A constante de inibição (K_I) do composto canônico desta série foi estimada em 360 µM, valor bem próximo ao K_I descrito para o inibidor cocrystalizado da HKT de *Anopheles gambiae* (300 µM). Desta maneira, foi confirmado que os derivados 1,2,4-oxadiazólicos são inibidores da enzima HKT. Esta primeira série de inibidores da AeHKT servirá de modelo para o desenvolvimento de inibidores mais potentes para a HKT. A elucidação do modo de ligação destes compostos está sendo realizada por simulações computacionais visando a identificação de grupos funcionais importantes para o aumento a atividade inibitória em relação à HKT.

Palavras-chave: Expressão heteróloga de proteínas. Cristalografia de proteínas. Inibição enzimática.

ABSTRACT

The *Aedes aegypti* mosquito is the vector of arboviruses such as dengue and Zika fever, diseases that affect many people mostly in tropical areas. The chemical control is the main current strategy to decrease mosquito population, despite the induction of long-term resistance mechanisms in the insects. In many cases, the targets of these insecticides are important biochemical pathways for the vector, which, once changed, finish the life cycle of the mosquitoes. One of these pathways in mosquitoes is the kynurenine pathway, which culminates in the transformation of 3-hydroxykynurenine to xanthurenic acid by the enzyme 3-hydroxykynurenine transaminase (HKT). Previous works from our group showed that compounds containing the 1,2,4-oxadiazolic nucleus show larvicidal activity with evidences that these molecules are probable HKT inhibitors. To prove this hypothesis, we decided to investigate the HKT potential as molecular target of 1,2,4-oxadiazoles derivatives. Towards this end, the HKT from *Aedes aegypti* was expressed in *Escherichia coli* and its 3D structure was determined by macromolecular crystallography through X-ray diffraction. The HKT cloning, heterologous expression and purification showed a maximum yield of 150 mg *per* liter of culture. The screening of more than 1000 crystallization conditions produced the collection of 16 datasets from HKT crystals of two *Aedes aegypti* lineages, RecLab (RL_AeHKT) and Rockefeller (R_AeHKT). Problems of twinned crystals became difficult the processing and refinement of the datasets, but the determination of RL_AeHKT structure was finished and it is available in Protein Data Bank. To access the HKT kinetic profile and 1,2,4-oxadiazoles inhibitory activity, a methodology was developed based on the detection of the complex xanthurenic acid-Fe³⁺ in 570 nm, making the fast and low-cost assay. Thus, the HKT expressed in bacteria exhibited a Michaelis-Menten constant of 3.3 mM and catalytic efficiency of 149 min⁻¹.mM⁻¹, which are similar values to those described in the literature. The series of eleven organic salts 1,2,4-oxadiazole derivatives was tested and their IC₅₀ values ranged between 42 and 294 μM, behaving as noncompetitive inhibitors. The inhibition constant (K_I) of the canonical compound from this series was estimated in 360 μM, very close value of the K_I described to the cocrystallized inhibitor of HKT from *Anopheles gambiae* (300 μM). Therefore, it was confirmed that the 1,2,4-oxadiazole derivatives are inhibitors of the enzyme HKT. This first series of AeHKT inhibitors will serve as model for the development of more potent HKT inhibitors. The elucidation of the binding mode of these compounds is being carried out by computational simulations aiming the identification of critical functional groups to improve the inhibitory activity towards HKT.

Keywords: Heterologous protein expression. Protein crystallography. Enzymatic inhibition.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo biológico do mosquito <i>Aedes aegypti</i> compreendido pela fase ovo, quatro estágios larvais, a fase pupa e a emergência do mosquito adulto.....	22
Figura 2 - Estrutura dos inseticidas químicos mais usados e suas classes.	23
Figura 3 - Reação de transaminação da enzima HKT com seus substratos amino doador 3-HK e amino acceptor piruvato, gerando os respectivos produtos ácido xanturênico e alanina.....	26
Figura 4 - A enzima HKT de <i>Anopheles gambiae</i> em complexo com o inibidor cocrystalizado 4-OB. Visualização aproximada do sítio ativo da HKT, mostrando os principais resíduos envolvidos no reconhecimento do inibidor.	28
Figura 5 - Estrutura química do 4-OB, o inibidor cocrystalizado com a AgHKT e o esqueleto dos ácidos 1,2,4-oxadiazólicos sintetizados pelo nosso grupo. Somente os átomos de carbono foram enumerados em ambas moléculas.	29
Figura 6 - A: Modelo da placa de cristalização de 24 poços usada nos experimentos de cristalização da HKT com gota suspensa. B: Grid screen feito para a R_HKT. Placas 7 e 8 foram repetidas e incubadas a 4 °C, além da incubação padrão (18 °C). C: Grid screen feito para a RL_HKT. Placas 1, 2, 4, 5 e 6 foram repetidas e incubadas a 4 °C, além da incubação padrão (18 °C). (h) = variação na horizontal, (v) = variação na vertical.	46
Figura 7 - Curva de progresso da reação catalisada pela HKT para padronização do tempo total da nova metodologia.....	51
Figura 8 - Representação esquemática das etapas a serem realizadas nos ensaios enzimáticos da RL_HKT.	52
Figura 9 - Representação esquemática das etapas a serem realizadas nos experimentos de inibição enzimática da RL_HKT.	56
Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose 1% das amostras amplificadas por RT-PCR das linhagens Rockefeller (R) e RecLab (RL). Cada linhagem foi amplificada em duplicata e um controle negativo foi adicionado ao experimento. Marcador: 1kb Plus Ladder (Invitrogen®).....	61
Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% das amostras obtidas a partir da PCR com os oligonucleotídeos iniciadores para LIC. Um controle negativo foi adicionado à cada reação, substituindo o DNA por água ultrapura. Marcador: 1kb Plus Ladder (Cellco Biotec®).	61
Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo duas das seis reações realizadas com as colônias selecionadas para o experimento. Marcador: 1 kb Plus Ladder (Cellco Biotec®).	62

Figura 13 - SDS-PAGE 10% de alíquotas do teste de expressão das construções de R_HKT e RL_HKT nos vetores pET-NUS, pET_M11 e pET-Trx. As bandas relativas à HKT e suas respectivas proteínas de fusão estão destacadas. i = fração insolúvel e s = fração solúvel. Marcador: Protein Ladder Unstained (BioRad®).	64
Figura 14 - Alinhamento da sequência da HKT anotada no UniProtKB (Q95V15) com as sequências das linhagens RecLab (RL_HKT) e Rockefeller (R_HKT).	65
Figura 15 - Cromatograma da primeira cromatografia por afinidade na purificação da R_HKT-Trx, com destaque ao pico relativo à proteína. O fluxo da fase móvel é de 5 mL/min.	67
Figura 16 - Cromatograma da segunda cromatografia por afinidade na purificação da R_HKT. O pico relativo à proteína de interesse está destacado. O fluxo da fase móvel é de 5 mL/min.	68
Figura 17 - SDS-PAGE 10% de alíquotas das etapas de purificação da R_HKT. As bandas relativas à proteína de interesse estão destacadas.	69
Figura 18 - Cromatograma da primeira cromatografia por afinidade na purificação da RL_HKT-Trx. Essa etapa da purificação foi dividida em duas partes por receio de exceder a capacidade da coluna. Os picos relativos à proteína de interesse estão destacados. O fluxo da fase móvel é de 5 mL/min.	70
Figura 19 - Cromatograma da segunda cromatografia por afinidade na purificação da RL_HKT. O fluxo da fase móvel é de 5 mL/min.	70
Figura 20 - SDS-PAGE 10% de alíquotas das etapas de purificação da RL_HKT. As bandas relativas à proteína de interesse estão destacadas.	71
Figura 21 - Exemplo de <i>merohedrical twinning</i> em duas dimensões. A sobreposição de diferentes orientações da célula unitária no cristal pode ser detectada por testes de <i>twinning</i> como realizado pelo programa <i>Xtriage</i> . Estas diferentes orientações estão relacionadas por operadores de simetria chamados de lei do <i>twin</i> e dependem do grupo pontual do cristal.	73
Figura 22 - Cristais da R_HKT e suas respectivas condições de cristalização. As imagens foram obtidas a partir de microscópio com aumento de 7,5X.	74
Figura 23 - Cristais da R_HKT em formação. A imagem foi obtida a partir de microscópio com aumento de 7,5X.	75
Figura 24 - Cristais da RL_HKT e suas respectivas condições de cristalização. As imagens foram obtidas a partir de microscópio com aumento de 7,5X.	78
Figura 25 - Padrão de difração de cristais da R_HKT na ausência (esquerda) e presença (direita) de solução crioprotetora.	80

Figura 26 - Padrão de difração de cristais da R_HKT formados em 50 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ e 2% PEG 400 (A), 300 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ e 2% PEG 400 (B) e 100 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2% PEG 400 e 20 mM NDSB – 221 (C).	81
Figura 27 - Similaridade química entre as moléculas HEPES e NDSB-221.	82
Figura 28 - Padrões de difração de cristais da R_HKT formados em 0,1 M HEPES-NaOH pH 7.5, 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ e 0,5% PEG 400 (A), 0,15 M HEPES-NaOH pH 7.5, 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ e 1% PEG 400 (B), 0,1 M HEPES-NaOH pH 7.5, 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ e 0,5% PEG 400 (C) e 0,2 M HEPES-NaOH pH 7.5, 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ e 1% PEG 400 (D).	84
Figura 29 - Padrões de difração de cristais da R_HKT formados em 0,1 M HEPES-NaOH pH 7.5, 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,5% PEG 400 e 360 µM PLP (A), 0,2 M HEPES-NaOH pH 7.5, 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1% PEG 400 e 360 µM PLP (B) e 0,1 M HEPES-NaOH pH 7.5, 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ e 0,5% PEG 400 (C).	85
Figura 30 - Padrões de difração de cristais da RL_HKT formados em 0,4 M HEPES-NaOH pH 7.5, 1,9 M (NH ₄) ₂ SO ₄ e 2% PEG 400(A), 0,15 M HEPES-NaOH pH 7.5, 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1% PEG 400 e 360 µM PLP (B) e 0,1 M HEPES-NaOH pH 7,5, 10% Etilenoglicol e 10% PEG 8000 (C e D).	86
Figura 31 - Componentes da unidade assimétrica do cristal da RL_HKT. Cadeias A, B, C e D em azul, laranja, verde e roxo, respectivamente. Cada sítio ativo está ocupado por uma molécula do cofator PLP (em vermelho) e as moléculas de água estão representadas por pequenas esferas.	88
Figura 32 - Homodímero cristalográfico e funcional da RL_HKT e o eixo de simetria que relaciona os dois monômeros.	89
Figura 33 - Monômero da RL_HKT, composto de dois domínios de classificação αβ. As cores da representação evidenciam a direção da cadeia que se inicia no N-terminal (azul escuro) e se finaliza na região C-terminal (vermelho).	90
Figura 34 - Identificação das hélices α (H) e fitas β (S) no monômero A da RL_HKT.	91
Figura 35 - Modelo e mapa de densidade eletrônica do PLP no sítio ativo da RL_HKT.	92
Figura 36 - Interações de van der Waals e ligações de hidrogênio entre o PLP e os resíduos do sítio ativo da RL_HKT.	92
Figura 37 - Alinhamento estrutural e sequencial entre as enzimas RL_HKT (azul) e sua homóloga AgHKT (rosa) (painel superior). Os resíduos em rosa no alinhamento sequencial correspondem aos resíduos conservados entre as enzimas (painel inferior).	93

Figura 38 - Distribuição dos resíduos não conservados da AgHKT em relação à RL_HKT (em cinza). Os resíduos Leu-347, Phe-351 e Pro-253 estão dispostos no canal de entrada para o sítio ativo, o que pode influenciar na seletividade de moléculas para entrada no sítio ativo.	94
Figura 39 - Comparação entre as enzimas RL_HKT, AgHKT, AeAGT e huKAT II. Alinhamento estrutural da RL_HKT, AgHKT e AeAGT com visualização aproximada do sítio de ligação do PLP, mostrando os resíduos conservados que interagem com o PLP em um raio de 4 Å a partir do PLP (painel superior). Alinhamento estrutural da RL_HKT e huKAT II para mostrar suas diferenças na superposição da cadeia principal (painel inferior). Desvios médios quadráticos (RMSD) dos alinhamentos estruturais e suas porcentagens de identidade sequencial usando 6MFB como referência.....	95
Figura 40 – Comparação entre as enzimas RL_HKT, AgHKT, AeAGT e huKAT II. Alinhamento sequencial entre a RL_HKT, AgHKT e AeAGT, revelando os resíduos idênticos em vermelho, os resíduos similares em amarelo e os resíduos não conservados estão sem destaque. O alinhamento sequencial está coincidindo com as estruturas secundárias da RL_HKT (6MFB)	96
Figura 41 - Distribuição do B-factor ao longo do homodímero AB da RL_HKT com o PLP (vermelho) explícito no sítio ativo.....	98
Figura 42 - Componentes da unidade assimétrica do cristal da R_HKT. Cadeias A, B, C e D em azul, laranja, verde e roxo, respectivamente. As moléculas de água estão representadas por pequenas esferas.	100
Figura 43 - RL_HKT (azul) em complexo com o PLP (vermelho) e as mutações observadas entre as variantes R_HKT e RL_HKT (amarelo).	101
Figura 44 - Comparação da posição do resíduo Trp ¹⁰⁴ nos quatro sítios ativos, usando a Lys ²⁰⁵ como referência de posição.	102
Figura 45 - Curvas de calibração realizadas para quantificação de ácido xanturênico (AX). A - Concentrações de 0 a 2 mM de AX contendo piruvato sódico a 2 mM e Piridoxal-5-fosfato (PLP) a 40 µM. B – Curva A com a adição das concentrações de ácido xanturênico a 4 e 6 mM.	105
Figura 46 - Concentração de ácido xanturênico (AX) formado por uma alíquota da RL_AeHKT recém purificada (0 meses) em comparação com uma amostra estocada a -20 °C por 4 meses, a 11 mg.mL ⁻¹ e sem glicerol.	105
Figura 47 - Gráfico de linearidade da taxa de reação em relação à concentração da HKT para demonstrar a saturação da enzima pelo substrato nas condições reacionais padronizadas.	106

Figura 48 - Gráfico de taxa de reação da HKT em relação à concentração de 3-HK testada para estimativa das constantes cinéticas. As concentrações de 3-HK testadas foram de 0,5, 1,75, 3, 4, 8,5 e 10 mM.....	106
Figura 49 - Efeito do pH na atividade enzimática da HKT. Os testes foram realizados com tampões Tris-HCl pH 6, 7 e 8, tampão HEPES-NaOH pH 7,5, tampão Borato pH 9 e tampão Carbonato pH 10. Estes tampões foram testados na atividade da RL_AeHKT durante o tempo de incubação, antes da adição da solução de Fe^{3+} em HCl para detecção do complexo AX- Fe^{3+}	108
Figura 50 - Efeito da temperatura na atividade enzimática da HKT. As temperaturas foram avaliadas na incubação da reação completa por 5 minutos a 30, 40, 50, 60 e 70 °C.	109
Figura 51 – Comparação do modo de ligação do inibidor cocrystalizado 4-OB (ácido 4-(2-aminofenil)-4-oxobutírico) (A) e o composto canônico 4a (B), observado a partir dos cálculos de <i>Docking</i> Molecular. O composto 4-OB é mostrado em lilás, enquanto o composto 4a está mostrado em laranja.	111
Figura 52 – Perfil cinético da RL_AeHKT na ausência (0 μM) e presença (50, 100, 200 e 300 μM) do inibidor 4a . O substrato 3-D,L-HK foi testado nas concentrações de 0,5, 2, 4 e 8,5 mM. O aumento da inclinação das retas com o aumento da concentração de inibidor e a ausência da intersecção das retas no eixo Y (variações em K_M e V_{MAX}) caracterizam o mecanismo de inibição como não-competitivo misto.....	112

LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1** - Via das quinureninas em mosquitos. TDO: triptofano dioxigenase; KFM: quinurenina formamidase; KMO: quinurenina monooxigenase; KAT: quinurenina aminotransferase e HKT: 3-hidróxi-quinurenina transaminase com o seu cofator piridoxal-5-fosfato (PLP).25
- Esquema 2** - Preparo das amostras para o teste de expressão da HKT recombinante em *E. coli*.40
- Esquema 3** - Síntese dos sais sódicos derivados de 1,2,4-oxadiazólicos testados como inibidores da HKT. i: $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ e Na_2CO_3 (4 eq.), etanol/ H_2O , T.A.; ii: anidrido glutárico (1.5 eq.), sem solvente; iii: NaOH (1 eq.) e metanol, T.A. .59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Mecanismos de resistência que os insetos podem desenvolver em contato com inseticidas.	24
Tabela 2 - Oligonucleotídeos iniciadores desenhados a partir da sequência do GenBank nº AF435806.1 para amplificação do gene que codifica a proteína HKT de <i>Aedes aegypti</i> . Os códons em negrito indicam os sítios de restrição das enzimas KpnI e XbaI.	35
Tabela 3 - Oligonucleotídeos iniciadores desenhados para a clonagem via LIC nos plasmídeos pET-M11, pET-Trx e pET-NUS. Os códons em negrito foram inseridos na sequência para a hibridização dos insertos com os vetores.	36
Tabela 4 - Descrição do método definido para a primeira cromatografia de afinidade.	42
Tabela 5 - Descrição do método definido para a cromatografia de exclusão molecular na troca de tampão.	42
Tabela 6 - Descrição do método definido para a segunda cromatografia por afinidade.	43
Tabela 7 - Triagem das condições de cristalização testadas para a HKT das linhagens Rockefeller e RecLab.	44
Tabela 8 - Descrição de concentrações e volumes das soluções de uso para preparo das soluções mix 1,2 e 3 no ensaio enzimático da RL_HKT.	50
Tabela 9 - Descrição de concentrações e volumes das soluções de uso para preparo das soluções mixes A e B.	52
Tabela 10 - Descrição do preparo das soluções mix 2 nos experimentos de cinética enzimática.	54
Tabela 11 - Descrição da composição e pH dos tampões testados na avaliação da atividade da HKT.	54
Tabela 12 - Descrição de concentrações e volumes das soluções de uso para preparo das soluções mix 1,2 e 3 no ensaio de inibição da RL_HKT.	55
Tabela 13 - Descrição das diluições a partir da solução estoque de cada composto a 3,33 mM para gerar as soluções de uso.	57
Tabela 14 - Condições testadas para avaliação da cinética de inibição da RL_HKT pelo inibidor 4a. Cada condição é composta por uma concentração do inibidor 4a testado em quatro concentrações do substrato 3-HK (0,5, 1,75, 4 e 8,5 mM).	58
Tabela 15 - Triagem por kits (coarse screens) de condições de cristalização da R_HKT. As condições dos kits em que cristais difratáveis foram observados estão detalhadas com composição, temperatura de cristalização e ligante (quando houver).	72

Tabela 16 - Triagem por kits (coarse screens) de condições de cristalização da RL_HKT. As condições em que cristais difratáveis foram observados estão detalhadas com composição, temperatura de cristalização e ligante (quando houver).	76
Tabela 17 - Cristais que geraram os conjuntos de dados coletados no terceiro experimento de difração de raios X e suas respectivas resoluções.	83
Tabela 18 - Dados obtidos após o processamento e avaliação do Xtriage para os conjuntos de dados da RL_HKT.	87
Tabela 19 - Análise da interface entre os quatro monômeros da unidade assimétrica realizada pelo programa PISA.	89
Tabela 20 - Estatísticas de coleta, processamento e refinamento da estrutura da RL_HKT. ...	97
Tabela 21 - Dados obtidos após o processamento e avaliação do Xtriage para os conjuntos de dados da R_HKT.	99
Tabela 22 - Estatísticas de coleta, processamento e refinamento da estrutura da R_HKT. ..	102
Tabela 23 - Comparação das concentrações e componentes da reação da HKT entre o protocolo de Han e Li (referência) e no novo protocolo.	104
Tabela 24 – Comparação dos parâmetros cinéticos da RL_AeHKT de <i>Aedes aegypti</i> em relação às enzimas HKT expressa em células de inseto e a enzima homóloga HKT de <i>Anopheles gambiae</i>	107
Tabela 25 - Estruturas químicas dos inibidores contendo o núcleo 1,2,4-oxadiazólico e seus respectivos valores de concentração inibitória de 50% da atividade enzimática (CI ₅₀).	110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CI ₅₀	Concentração inibitória em 50% da atividade enzimática
CL ₉₅	Concentração letal para 95% dos indivíduos expostos
F _{calc}	Fatores de estrutura calculados a partir do modelo
F _{obs}	Fatores de estrutura obtidos a partir das intensidades observadas
GFP	Proteína fluorescente verde (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HPLC-ED	Cromatografia líquida de alta performance com detecção eletroquímica
I _{hkl}	Intensidade da reflexão de índices h,k,l
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo
kDa	Quilodaltons
K _I	Constante de inibição
LB	Luria-Bertani
LC-MS/MS	Cromatógrafo líquido acoplado a espectrômetro de massas
LIC	Clonagem independente de ligase (<i>Ligase independent cloning</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDB	Banco de dados de proteínas (<i>Protein Data Bank</i>)
PEG	Polietilenoglicol
PLP	Piridoxal-5-fosfato
R_AeHKT	3-hidróxi-quinurenina transaminase proveniente da linhagem <i>Rockefeller</i> de <i>Aedes aegypti</i>
R _f	Fator de retenção
RL_AeHKT	3-hidróxi-quinurenina transaminase proveniente da linhagem RecLab de <i>Aedes aegypti</i>
RMSD	Desvio médio quadrático (<i>Root-Mean-Square Deviation</i>)
RR ₉₅	Porcentagem da razão entre a CL ₉₅ de indivíduos resistentes em relação à CL ₉₅ de indivíduos susceptíveis
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
T.A.	Temperatura ambiente
TEV Protease	<i>Tobacco Etch Virus</i> Protease
Trx	Tioredoxina A
U.A.	Unidades de absorbância
ZYM	Meio auto-indutor ZYM-5052

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	ARBOVIROSES TRANSMITIDAS PELO <i>Aedes aegypti</i>	21
1.2	O MOSQUITO <i>Aedes aegypti</i>	21
1.3	ESTRATÉGIAS PARA O CONTROLE DA DISSEMINAÇÃO DE ARBOVIROSES	22
1.4	A VIA DAS QUINURENINAS	24
1.5	A ENZIMA 3-HIDRÓXI-QUINURENINA TRANSAMINASE	26
1.6	COMPOSTOS CONTENDO O NÚCLEO 1,2,4-OXADIAZOL COMO PROVÁVEIS INIBIDORES DA AeHKT	29
2	HIPÓTESE	31
3	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	32
3.1	PROCEDIMENTOS GERAIS	32
3.2	EQUIPAMENTOS E PROGRAMAS DE COMPUTADOR UTILIZADOS	32
3.3	SÍNTESE DOS ÁCIDOS 3-(3-ARIL-1,2,4-OXADIAZOL-5-IL)-BUTANÓICOS	33
3.4	SÍNTESE DOS 3-(3-ARIL-1,2,4-OXADIAZOL-5-IL) BUTANOATOS DE SÓDIO	33
3.5	CLONAGEM DA HKT PARA EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM <i>Escherichia coli</i>	33
3.5.1	Colônias de <i>Aedes aegypti</i>	34
3.5.2	Extração do RNA	34
3.5.3	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)	34
3.5.4	Clonagem no pGEM-T easy	35
3.6	SUBCLONAGEM NOS PLASMÍDEOS DE EXPRESSÃO PET-M11, PET-TRX E PET-NUS PARA EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM <i>E. coli</i>	36
3.7	EXPRESSÃO DA HKT RECOMBINANTE EM <i>E. coli</i>	39
3.7.1	Transformação das construções em <i>E. coli</i> Rosetta 2 (DE3) e testes de expressão	39
3.7.2	Purificação da HKT-Trx	41
3.7.3	Lise por sonicação	41
3.7.4	Cromatografia por afinidade	41
3.7.5	Cromatografia de exclusão por massa molecular	42
3.7.6	Clivagem com a TEV Protease	42
3.7.7	Cromatografia de afinidade	43
3.7.8	Cromatografia de exclusão por massa molecular	43
3.8	CRISTALOGRAFIA DA AeHKT	43
3.9	COLETA DE DADOS CRISTALOGRÁFICOS	46
3.10	PROCESSAMENTO E REFINAMENTO DOS DADOS CRISTALOGRÁFICOS ...	47
3.10.1	Estrutura da RL_HKT	47
3.10.2	Estrutura da R_HKT	48

3.11	ENSAIO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA HKT COM DETECÇÃO DIRETA DO ÁCIDO XANTURÊNICO.....	48
3.11.1	Padronização do ensaio enzimático da HKT.....	48
3.11.2	Caracterização cinética da RL_HKT.....	53
3.11.3	Avaliação do perfil de atividade da HKT em diferentes pHs	54
3.11.4	Avaliação do perfil de atividade da HKT em diferentes temperaturas.....	54
3.11.5	Avaliação inibitória dos 1,2,4-oxadiazóis: Determinação de CI ₅₀ e mecanismo de inibição.....	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1	SÍNTESE DOS SAIS SÓDICOS 1,2,4-OXADIAZÓLICOS.....	59
4.2	ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS GÊNICAS E DE AMINOÁCIDOS DA HKT	59
4.3	AMPLIFICAÇÃO POR RT-PCR.....	60
4.4	SUBCLONAGEM EM PET-NUS, PET-M11 E PET TRX PARA EXPRESSÃO EM <i>E. coli</i>	61
4.5	TESTES DE EXPRESSÃO.....	62
4.6	PURIFICAÇÃO DA HKT RECOMBINANTE EXPRESSA EM <i>E. coli</i>	66
4.6.1	Purificação da R_HKT-Trx.....	66
4.6.2	Purificação da RL_HKT-Trx	69
4.7	TRIAGEM DE CONDIÇÕES DE CRISTALIZAÇÃO.....	71
4.7.1	R_HKT	71
4.7.2	RL_HKT.....	76
4.8	COLETA DE DADOS DOS CRISTAIS.....	79
4.8.1	R_HKT.....	79
4.8.2	RL_HKT.....	83
4.9	PROCESSAMENTO E REFINAMENTO DOS DADOS CRISTALOGRAFICOS... ..	87
4.9.1	RL_HKT.....	87
4.9.2	R_HKT	98
4.10	ENSAIO ENZIMÁTICO COM DETECÇÃO DIRETA DO ÁCIDO XANTURÊNICO	103
4.10.1	Caracterização cinética da RL_HKT.....	106
4.10.2	Avaliação do perfil de atividade da HKT em diferentes pHs	108
4.10.3	Avaliação do perfil de atividade da HKT em diferentes temperaturas.....	109
4.10.4	Avaliação inibitória dos 1,2,4-oxadiazóis: Determinação de CI ₅₀ e mecanismo de inibição.....	109
5	CONCLUSÕES	114
6	PERSPECTIVAS	115
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116

APÊNDICE A – CARACTERIZAÇÃO COMPLETA E ESPECTROS DE RMN ^1H E ^{13}C DA SÉRIE DE ONZE SAIS SÓDICOS DERIVADOS DE 1,2,4-OXADIAZÓIS.....	127
APÊNDICE B – ADITIVOS USADOS NA CRISTALIZAÇÃO DA R _{HKT} NO <i>KIT ADDITIVE SCREEN HT</i> E AS CONCENTRAÇÕES DA PROTEÍNA EM QUE FORAM OBSERVADOS CRISTAIS (EM CINZA).....	141
APÊNDICE C – CURVAS DOSE-RESPOSTA DOS ONZE SAIS SÓDICOS DERIVADOS DE 1,2,4-OXADIAZÓIS TESTADOS POR SUA ATIVIDADE INIBITÓRIA FRENTE À ENZIMA HKT DE <i>Aedes aegypti</i> , LINHAGEM RECLAB.....	145
APÊNDICE D – METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO DA CLONAGEM E EXPRESSÃO DA HKT EM CÉLULAS DE INSETO SF9.	151
ANEXO A - DEPÓSITO DA ESTRUTURA CRISTALOGRAFICA DA HKT DE <i>Aedes aegypti</i> (LINHAGEM RECLAB) NO BANCO DE DADOS DE PROTEÍNAS.....	160
ANEXO B - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA CIENTÍFICA <i>BIOORGANIC AND MEDICINAL CHEMISTRY</i>	165
ANEXO C - ARTIGO SUBMETIDO NA REVISTA CIENTÍFICA <i>METHODS</i>	179

1 INTRODUÇÃO

1.1 ARBOVIROSES TRANSMITIDAS PELO *Aedes aegypti*

Arboviroses são doenças causadas por vírus transmitidos por artrópodes e capazes de se multiplicar neste hospedeiro. As fêmeas de mosquitos transmissores de arboviroses são hematófagas, pois precisam de sangue para maturação de seus ovos. Por esta razão, a fêmea infectada transmite os vírus durante o repasto sanguíneo (CLEMENTS, 1992). Várias arboviroses já foram relatadas no Brasil, entre elas as doenças causadas pelos vírus da febre amarela, dengue, febre chikungunya e Zika (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017; LIMA-CAMARA, 2016). Os surtos de febre amarela urbana no Brasil (quando o vírus é transmitido pelo mosquito *Aedes aegypti*) foram erradicados desde 1942 com a distribuição da vacina pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (FERREIRA *et al.*, 2011). Contudo, em 2017 um novo surto da doença na forma silvestre (vírus transmitido pelo mosquito *Haemagogus*) foi relatado nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Bahia e Espírito Santo (SECRETARIA DE VIGILANCIA EM SAÚDE, 2017).

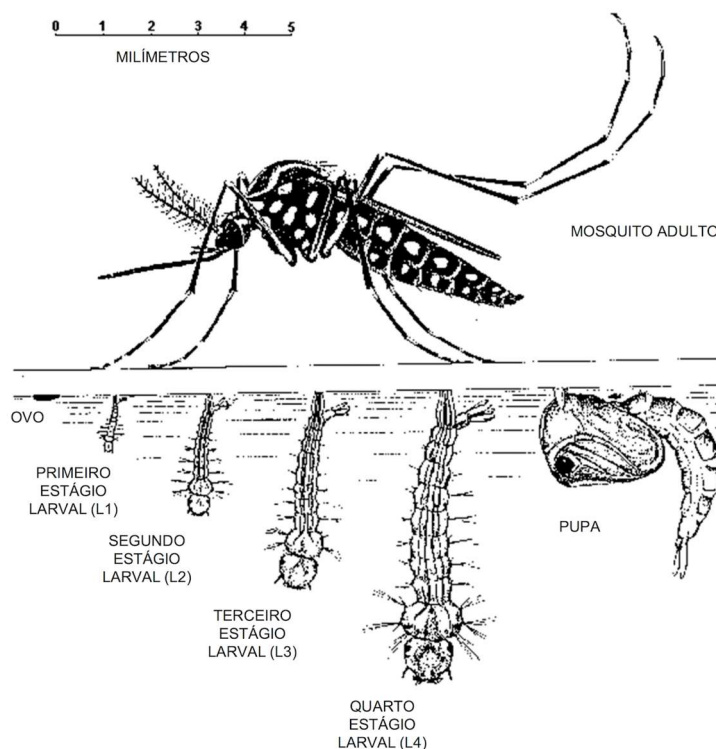
As doenças causadas pelos vírus da dengue (DENV), Zika (ZIKV) e febre chikungunya (CHIKV) estão entre as principais preocupações emergenciais no país e no mundo (CALLENDER, 2019; MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017; SUKHRALIA *et al.*, 2019; WEAVER; REISEN, 2010). Os primeiros relatos do vírus da dengue no Brasil foram divulgados em 1917, mas os vírus ZIKV e CHIKV foram primeiramente detectados no Brasil em 2015 e 2014, respectivamente. Atenção deve ser dada às complicações causadas por estas doenças, como a síndrome congênita do Zika presente em nascituros de grávidas infectadas pelo ZIKV e fortes dores articulares por longos períodos em infectados por CHIKV (MENESES *et al.*, 2017; PLATT; MINER, 2017).

1.2 O MOSQUITO *Aedes aegypti*

O vetor dessas arboviroses é o mosquito *Aedes aegypti*. Ele é de origem africana e vem se espalhando em regiões tropicais e subtropicais desde o século XVI (KUNO, 2010). O mosquito pertence à família *Culicidae* e é facilmente adaptável a ambientes urbanos, proliferando-se em quaisquer locais com água parada e vasta opção para a hematofagia da fêmea. O ciclo de vida do mosquito vai desde o ovo, passando por quatro estágios larvais, pela fase pupa até a fase adulta (Figura 1). Este possui hábitos diurnos, tanto para o repasto

sanguíneo quanto para a postura dos ovos (CLEMENTS, 1992; POWELL; TABACHNICK, 2013).

Figura 1 - Ciclo biológico do mosquito *Aedes aegypti* compreendido pela fase ovo, quatro estágios larvais, a fase pupa e a emergência do mosquito adulto.



Fonte: Adaptado de: https://dengue.cecom.unicamp.br/?page_id=215.

1.3 ESTRATÉGIAS PARA O CONTROLE DA DISSEMINAÇÃO DE ARBOVIROSES

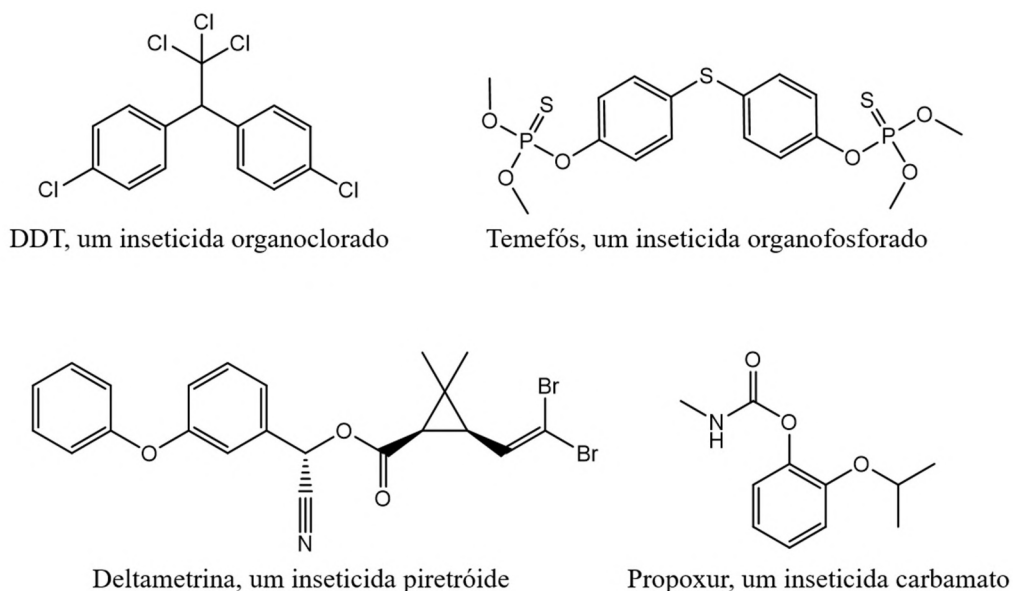
O aumento crescente dos casos de doenças causadas por essas arboviroses impulsiona a diminuição da multiplicação ou a transmissão dos vírus. O desenvolvimento de vacinas é uma das formas de reduzir o número de casos, como é preconizado para a febre amarela. Contudo, este é um método caro, de longo prazo e específico para cada vírus, sendo necessário o desenvolvimento de vacinas para todos os arbovírus e subtipos (dengue subtipos I-IV) (METZ; PIJLMAN, 2011; OYSTON; ROBINSON, 2012).

Outra maneira de conter a transmissão das arboviroses é o controle populacional do mosquito, em que a redução dos casos deverá ser simultânea para todos os vírus em circulação. Por ter sua fase larval delimitada geograficamente no criadouro, a interrupção do ciclo de vida desses indivíduos se torna mais acessível. Portanto, o controle mais efetivo da transmissão e propagação das arboviroses é por meio do uso de inseticidas (ZARA *et al.*, 2016). Os inseticidas mais utilizados no controle de vetores podem ser classificados em inseticidas de origem vegetal,

inseticidas químicos (inorgânicos e orgânicos) e inseticidas biológicos. Estes também podem ser divididos em larvicidas e adulticidas, ou seja, substâncias que matam o inseto na fase ovo/larval e adulta, respectivamente (ZARA *et al.*, 2016).

O controle químico é uma das formas mais utilizadas de controle de vetores em Saúde Pública. O primeiro inseticida sintetizado com efeito prolongado foi o diclorodifeniltricloroetano (DDT), um inseticida organoclorado. Outros inseticidas que atuam no sistema nervoso dos insetos pertencem aos grupos dos organofosforados, carbamatos e piretróides (Figura 2) (BRAGA; VALLE, 2007a).

Figura 2 - Estrutura dos inseticidas químicos mais usados e suas classes.



Fonte: Extraído de BRAGA; VALLE, 2007a.

O uso contínuo de inseticidas tem provocado resistência aos insetos. A resistência já foi detectada para todas as classes de inseticidas usados no Brasil, provocando o aumento de doenças transmitidas por vetores (BRAGA; VALLE, 2007a). Os inseticidas temefós (larvicida) e deltametrina (adulticida) mais usados em todo o território nacional já provocaram a resistência ao mosquito *Aedes aegypti* nas cinco regiões do Brasil. Atenção deve ser dada à região nordeste que apresenta os mais altos níveis de resistência à temefós do Brasil (RR₉₅>100 encontrado em 20% dos casos de resistência) (VALLE *et al.*, 2019).

Existem quatro principais mecanismos de resistência que os mosquitos podem desenvolver: resistência metabólica, por mutação, por penetração e comportamental (Tabela 1) (BRAGA; VALLE, 2007a; LIU, 2015).

Tabela 1 - Mecanismos de resistência que os insetos podem desenvolver em contato com inseticidas.

Mecanismo de resistência	Reação/Efeito
Metabólica	Superexpressão de genes que codificam enzimas de detoxificação (ex. Glutathione-S-transferases)
Mutação	Modificações na sequência do gene que codifica a proteína alvo do inseticida, causando a diminuição da afinidade da molécula pelo alvo
Penetração	Desenvolvimento de barreiras na cutícula do inseto, impedindo a entrada desses inseticidas no corpo do mosquito
Comportamental	Reconhecimento e evasão da população de mosquitos à área exposta ao inseticida

Fonte: A autora (2020).

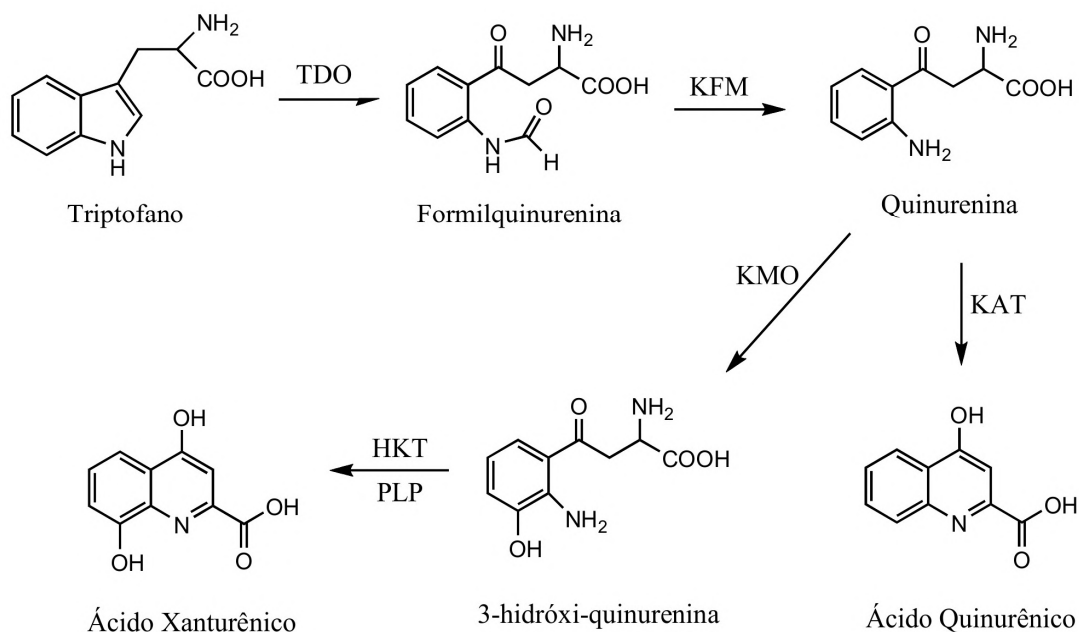
Esses mecanismos de resistência, quando desenvolvidos, são observados após algumas gerações a partir do primeiro indivíduo exposto. Em mosquitos vetores, os mecanismos mais observados são a resistência metabólica e por mutação. A superexpressão ou mutação de genes que codificam as enzimas de detoxificação Glutathione-S-transferases e Esterases já foi detectada em vários estudos de diversas partes do mundo (GOINDIN *et al.*, 2017; HELVECIO *et al.*, 2019; LEONG *et al.*, 2019).

Para uso imediato, é necessário o desenvolvimento de inseticidas com modo de ação distinto dos existentes no mercado, com maior especificidade e menor toxicidade. Isso inclui a descoberta de novos alvos moleculares, como enzimas de detoxificação ou reguladores de crescimento dos insetos. Contudo, isso não exime a necessidade de monitoramento e contorno da resistência que pode ser desenvolvida devido à exposição aos atuais e novos inseticidas ou desenvolvimento de novas estratégias de controle vetorial (BRAGA; VALLE, 2007b).

1.4 A VIA DAS QUINURENINAS

A via das quinureninas é uma das vias metabólicas mais importantes na detoxificação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Esta é a maior via de catabolismo do triptofano nos organismos vivos, em que o triptofano é oxidado a ácido quinolínico, ácido quinurênico ou ainda a ácido xanturênico, dependendo do organismo vivo estudado (Esquema 1) (CHEN, Yiquan; GUILLEMIN, 2009; LI, Jianyong; LI, 1997; MITTAL, 2015). Em humanos, o ácido quinolínico está envolvido na síntese de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NAD⁺, coenzima necessária na respiração celular) (SCHWARCZ, 2004).

Esquema 1 - Via das quinureninas em mosquitos. TDO: triptofano dioxigenase; KFM: quinurenina formamidase; KMO: quinurenina monooxigenase; KAT: quinurenina aminotransferase e HKT: 3-hidróxi-quinurenina transaminase com o seu cofator piridoxal-5-fosfato (PLP).



Fonte: Adaptado de HAN; BEERNTSEN; LI, 2007.

O intermediário da via das quinureninas em estudo neste trabalho é a 3-hidróxi-quinurenina (3-HK). Esta substância, quando presente em quantidades maiores que as normais em humanos, está relacionada a doenças como esquizofrenia, mal de Parkinson e Alzheimer (LEIPNITZ *et al.*, 2007; MADDISON; GIORGINI, 2015; MITTAL, 2015). A 3-HK tem sido associada ao estresse oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio (ou radicais livres) (GILES *et al.*, 2003; VAZQUEZ *et al.*, 2000). Em mosquitos, a 3-HK é produzida a partir da quinurenina e leva à formação irreversível do ácido xanturênico (AX). Este ácido é sintetizado por uma reação irreversível catalisada pela enzima 3-hidróxi-quinurenina transaminase (HKT). O AX é estável e atóxico para insetos, sugerindo que esta é uma reação de detoxificação da 3-HK em mosquitos (HAN; BEERNTSEN; LI, 2007; HAN; FANG; LI, 2002; HAN; LI, 2002).

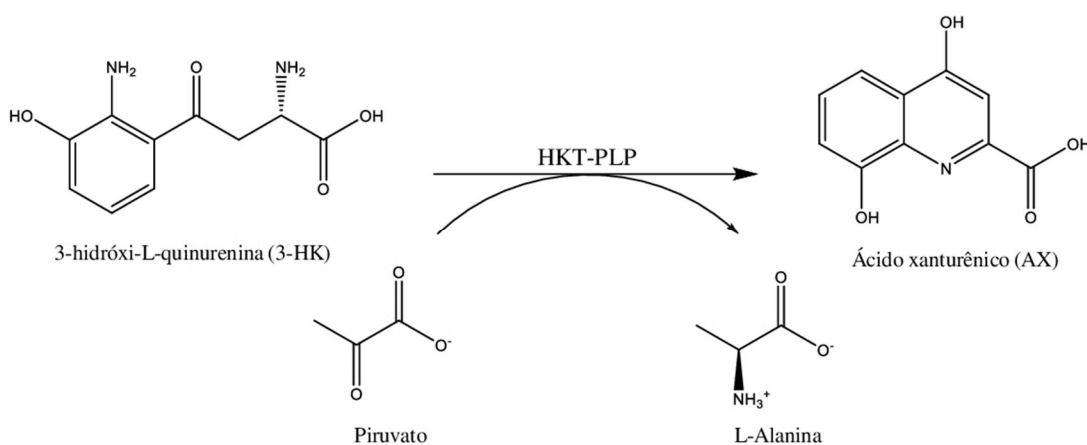
Pesquisadores concluíram em estudos com *Anopheles* spp. que o ácido xanturênico é essencial na reprodução sexual do *Plasmodium falciparum* no vetor (GARCIA *et al.*, 1998). Assim, a inibição desta reação na via das quinureninas poderá gerar o acúmulo de 3-HK e diminuir a formação do ácido xanturênico. Isso seria nocivo ao metabolismo não só do *Aedes aegypti*, mas também a mosquitos do gênero *Anopheles*, vetores da malária (ROSSI *et al.*, 2005). Portanto, a inibição da conversão enzimática da 3-HK em ácido xanturênico na via das

quinureninas é uma atrativa estratégia de controle populacional dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Anopheles ssp.* por meio do acúmulo de 3-HK.

1.5 A ENZIMA 3-HIDRÓXI-QUINURENINA TRANSAMINASE

A enzima HKT é uma aminotransferase dependente de piridoxal-5-fosfato (PLP) e requer dois tipos de substratos para realização da catálise: um amino doador e um amino aceptor. Esta enzima apresenta o substrato amino doador 3-HK como substrato primário, gerando o AX como um de seus produtos (LI, J.; LI, 1998). O segundo produto é o aminoácido correspondente ao substrato amino aceptor (Figura 3).

Figura 3 - Reação de transaminação da enzima HKT com seus substratos amino doador 3-HK e amino aceptor piruvato, gerando os respectivos produtos ácido xanturênico e alanina.



Fonte: A autora (2020).

A enzima HKT de *Aedes aegypti* foi primeiramente reportada na literatura em 1997 por Li J. e Li G. (LI, Jianyong; LI, 1997). Eles identificaram o ácido xanturênico como o composto eletroquimicamente ativo mais abundante em extratos larvais e a partir disso, descobriram uma transaminase que apresenta maior afinidade à 3-HK do que por L-quinurenina (LI, Jianyong; LI, 1997). Em seguida, os autores desenvolveram uma metodologia utilizando HPLC-ED para confirmar a conversão do 3-HK em AX. Para isto, foram preparados extratos larvais proteicos e após a incubação com 3-HK, o substrato amino aceptor piruvato e o cofator PLP, detectou-se a presença do AX.

A investigação do papel desta reação mediada pela HKT para o mosquito veio nos anos seguintes. Em 1999, foi observada a importância da 3-HK na síntese de omocromos (substâncias responsáveis pela coloração de olhos e asas em insetos) (LI, J.; BEERNTSEN; JAMES, 1999). Além disso, a quantificação do AX nos diferentes estágios de vida do mosquito

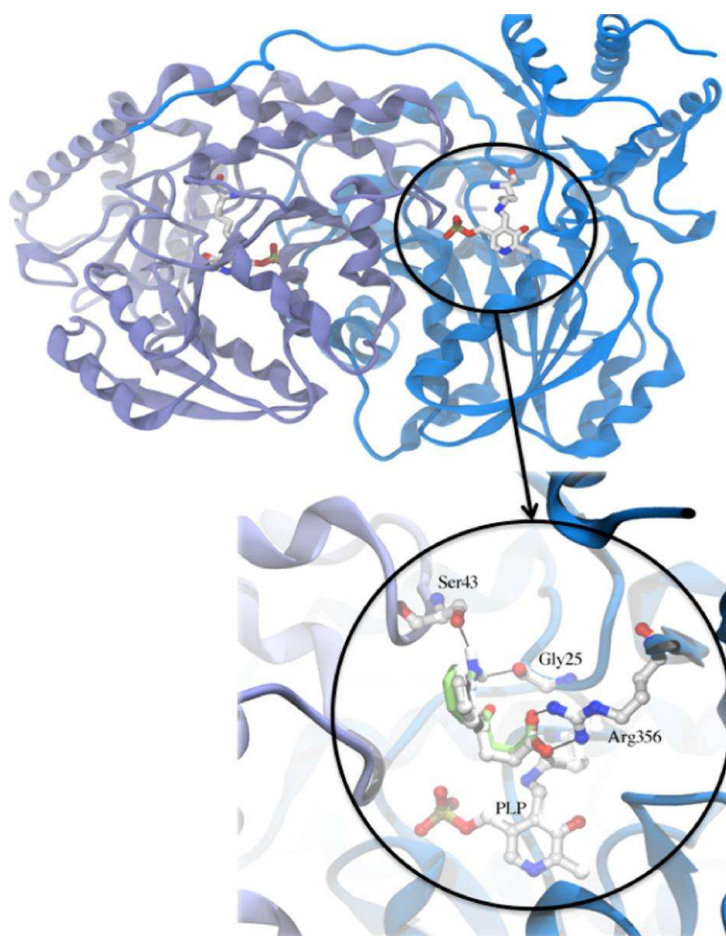
evidenciou a superexpressão da HKT nos estágios de ovo e larva, enquanto nas fases pupa e mosquito adulto este metabólito foi pouco detectado (LI, Jianyong; LI, 1997).

Para caracterizar esta nova enzima, Han e colaboradores extraíram a enzima nativa de larvas do mosquito, determinaram a sequência de aminoácidos e a partir disto, obtiveram o cDNA que codifica a HKT (HAN; FANG; LI, 2002). Esta enzima nativa e outra recombinante expressa em células de inseto Sf9 (mas proveniente do gene obtido a partir da enzima nativa) foram caracterizadas em relação à diferentes substratos amino doadores (3-HK, L-quinurenina, D,L-quinurenina e alanina) e substratos amino aceptores (piruvato, glioxilato, entre outros) (HAN; FANG; LI, 2002; HAN; LI, 2002).

Han e colaboradores observaram que a 3-hidróxi-quinurenina transaminase de *Aedes aegypti* (AeHKT) tem duas funções: realizar a reação de transaminação da 3-HK ao ácido xanturênico e do glioxilato à glicina (HAN; LI, 2002). Por causa desta segunda atividade da AeHKT, esta enzima também foi classificada como uma alanina-glioxilato transaminase (AGT), apesar de já existir uma enzima alanina-glioxilato transaminase de *Aedes aegypti* (AeAGT) reportada. Entretanto, somente a AeHKT consegue metabolizar a 3-HK. Estas duas enzimas apresentam 51% de identidade em suas sequências de aminoácidos. Em humanos, existe uma enzima responsável pela conversão do 3-HK em AX: a quinurenina transaminase II (KAT II). Contudo, esta enzima apresenta pouca similaridade com a HKT por apresentar afinidade por outros substratos amino aceptores e baixa identidade sequencial (HAN; FANG; LI, 2002). A estrutura cristalográfica da KAT II foi determinada e sua sequência de aminoácidos compartilha apenas 21% de identidade com a AeHKT (ROSSI *et al.*, 2008).

Em 2005, Rossi e colaboradores reportaram a expressão heteróloga da HKT de *Anopheles gambiae* (AgHKT) e realizaram a caracterização cinética desta enzima com detecção por HPLC-UV (ROSSI *et al.*, 2005). A AeHKT e a AgHKT são homólogas e possuem 79% de identidade entre suas sequências. As estruturas cristalográficas da holoenzima AgHKT e em complexo com o inibidor ácido 4-(2-aminofenil)-4-oxobutírico (4-OB) estão disponíveis no Banco de Dados de Proteínas (PDB 2CH1 e 2CH2). O 4-OB apresenta constante de inibição (K_i) igual a 300 μ M e os resíduos envolvidos no seu reconhecimento no sítio ativo da AgHKT estão totalmente conservados na AeHKT: Gly²⁵, Ser⁴³ e Arg³⁵⁶ (Figura 4).

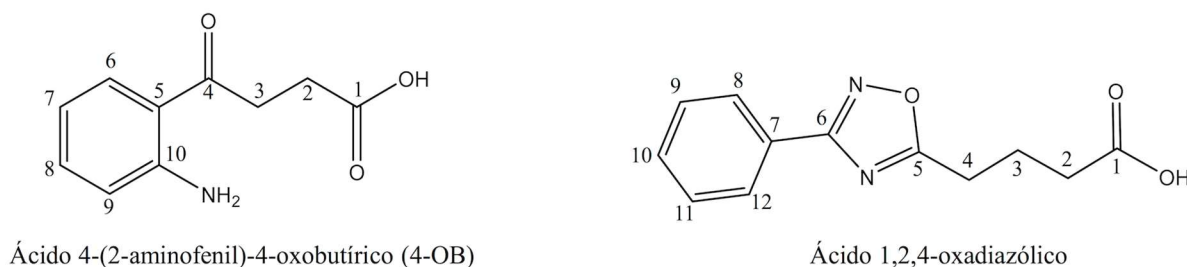
Figura 4 - A enzima HKT de *Anopheles gambiae* em complexo com o inibidor cocrystalizado 4-OB. Visualização aproximada do sítio ativo da HKT, mostrando os principais resíduos envolvidos no reconhecimento do inibidor.



Fonte: Extraído de OLIVEIRA, et al., 2013.

O inibidor 4-OB cocrystalizado com a AgHKT é uma molécula similar ao substrato natural da enzima, exceto pela ausência do grupo hidroxila em C-9 e uma função amina em C-2, não sofrendo transaminação como a 3-HK (ROSSI et al., 2006). Sua estrutura é análoga aos ácidos contendo um núcleo 1,2,4-oxadiazol por sua cadeia ácida, presença e localização dos átomos de nitrogênio e oxigênio na molécula (Figura 5).

Figura 5 - Estrutura química do 4-OB, o inibidor cocristalizado com a AgHKT e o esqueleto dos ácidos 1,2,4-oxadiazólicos sintetizados pelo nosso grupo. Somente os átomos de carbono foram enumerados em ambas moléculas.



Fonte: Adaptado de ROSSI et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2013.

Os 1,2,4-oxadiazóis são conhecidos por sua resistência a hidrólise e por serem bioisósteros de ésteres e amidas, tornando-o um núcleo atrativo para aplicações em química medicinal (BORA *et al.*, 2014). Além disso, o núcleo heterocíclico é passível de realizar várias interações intermoleculares como interações π - π e dipolo-dipolo.

1.6 COMPOSTOS CONTENDO O NÚCLEO 1,2,4-OXADIAZOL COMO PROVÁVEIS INIBIDORES DA AeHKT

Por causa da semelhança estrutural com o inibidor cristalográfico, os derivados de oxadiazol foram testados por nosso grupo de pesquisa como prováveis inibidores da AeHKT. Num primeiro momento, foram realizados estudos de *Docking* Molecular usando várias séries de compostos sintetizados em laboratório. A partir destes resultados, foram realizados ensaios *in vivo* destes compostos em larvas de *Aedes aegypti* (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Diferentes alterações de substituintes no anel aromático e tamanhos da cadeia lateral em C-5 foram testadas e observou-se que os 4-[3-(aril)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-butanoatos de metila apresentaram maior atividade larvicida, que pode ser devido ao aumento do tamanho da cadeia lateral e da mudança de função de ácido para éster, o que confere maior lipofilicidade, facilitando a entrada da molécula no tecido larval. Não foram observadas grandes diferenças na atividade com relação à mudança no anel aromático nos cálculos computacionais, mas ácidos e ésteres contendo substituintes halogenados no anel aromático mostraram os menores valores de CL_{50} (concentração da substância em que provoca a morte de 50% dos indivíduos expostos) (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Contudo, foi necessário o uso de solventes orgânicos a 2% (v/v) para solubilizar os compostos na realização dos testes, pois estes ésteres são moléculas orgânicas insolúveis em água.

Uma segunda otimização foi feita nesse conjunto de prováveis inibidores da AeHKT, em que novos substituintes do anel aromático foram adicionados à série e foi feita uma

derivatização na cadeia ácida com a síntese de sais sódicos (MACIEL, 2016). A síntese desses sais sódicos tornou os 1,2,4-oxadiazóis solúveis em água a concentrações de 0,5 M, dispensando o uso de solventes orgânicos que muitas vezes são tóxicos em ensaios biológicos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005).

A proposta deste trabalho é avaliar o potencial inibitório desses compostos larvicidas frente à enzima AeHKT. A primeira abordagem foi a obtenção da enzima recombinante em *Escherichia coli*. Em seguida, foi determinada a para a análise das possíveis interações alvo-ligante. Por último, foi desenvolvido um método de detecção da atividade enzimática rápido e de baixo custo, essencial para a caracterização cinética da enzima e avaliação da atividade inibitória dos compostos com atividade larvicida.

Para alcançar esses objetivos, foram realizados experimentos de clonagem e expressão da AeHKT em *Escherichia coli*, cristalografia de macromoléculas por meio de difração de raios X e o desenvolvimento de uma metodologia de detecção da reação da AeHKT por espectrofotometria de absorbância. Esta metodologia de avaliação da atividade enzimática da AeHKT é rápida, de baixo custo e que pode ser ampliada para a triagem de várias moléculas simultaneamente. Para fins informativos, a síntese dos sais sódicos derivados de 1,2,4-oxadiazóis será recapitulada na seção de Procedimentos Experimentais e sua caracterização está disposta no Apêndice.

2 HIPÓTESE

O presente trabalho investiga as seguintes hipóteses:

A enzima 3-hidróxi-quinurenina transaminase de *Aedes aegypti* é um alvo molecular para os 1,2,4-oxadiazóis com atividade larvicida?

Caso a hipótese seja verdadeira, é possível sintetizar novas moléculas com maior especificidade e/ou atividade inibitória?

Caso a hipótese seja falsa, seria possível desenvolver moléculas que inibam a enzima de forma específica?

OBJETIVOS

Gerais:

- Obter e caracterizar estruturalmente e cineticamente a enzima recombinante 3-hidróxi-quinurenina transaminase (HKT) de *Aedes aegypti* expressa em *Escherichia coli*;
- Avaliar a atividade inibitória da série de onze sais sódicos derivados de 1,2,4-oxadiazólicos frente à HKT recombinante.

Específicos:

- Produzir a HKT recombinante;
- Caracterizar estruturalmente a enzima HKT para investigação das interações alvo-ligante;
- Desenvolver uma metodologia para detecção da atividade enzimática da HKT recombinante;
- Determinar as constantes cinéticas da HKT recombinante;
- Determinar as CI_{50} da série de onze sais sódicos derivados de ácidos 1,2,4-oxadiazólicos com atividade larvicida;
- Estudar o mecanismo de inibição da série ou do composto canônico (representativo para a série de análogos).

3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.1 PROCEDIMENTOS GERAIS

Os reagentes e solventes utilizados foram obtidos através dos fornecedores Aldrich®, Vetec®, Dinâmica®, Merck®, Invitrogen Life Technologies®, New England Biolabs®, Promega®, Affymetrix®, GE Healthcare Life Sciences®, QIAGEN®, Thermo Scientific®, Cellco Biotec®, Molecular Dimensions®, Hampton Research® e Jena Bioscience®.

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada utilizando-se placas de sílica em suporte de alumínio contendo indicador fluorescente F₂₅₄ da marca Fluka®. Para a revelação das manchas utilizou-se lâmpada ultravioleta.

3.2 EQUIPAMENTOS E PROGRAMAS DE COMPUTADOR UTILIZADOS

Para a determinação dos pontos de fusão, foi utilizado o aparelho Electro-thermal modelo Mel-Temp analógico e os pontos de fusão dos compostos obtidos não são corrigidos. Para a obtenção dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C foi utilizado o instrumento Varian® UNMRS 400 MHz, utilizando como solventes clorofórmio deuterado e água deuterada. Para a obtenção dos percentuais de análise elementar, foi utilizado o analisador elementar (CHNS-O), da marca CE instruments®, modelo EA 1110.

Nas etapas de clonagem, expressão e purificação das proteínas recombinantes foram utilizados o termociclador T3 termocycler da marca BIOMETRA®, termociclador T110 Thermal Cycler da marca BIO-RAD®, banho seco digital da marca ThermoFisher Scientific®, centrífuga 5415D e centrífuga refrigerada 5810R da marca Eppendorf®, centrífugas refrigeradas Sorvall Legend XTR e Sorvall RC 3BP+ da marca ThermoFisher Scientific®, agitadores orbital com controle de temperatura Environ da marca Lab-line® e Ecotron da marca INFORS HT®, agitador orbital refrigerado Multitron Standard da marca INFORS HT®, pHmetro ORION STAR A214 da marca Thermo Scientific®, sonicator Fisherbrand Q700 da marca Fischer Scientific®, cromatógrafo ÄKTA pure da marca GE Healthcare Life Sciences® e fontes de marcas BIO-RAD® e Amersham pharmacia biotech® para a eletroforese. A quantificação do RNA, DNA e proteína obtidos foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop 2000 da marca Thermo Scientific®.

Os experimentos de cristalização foram realizados utilizando placas de cristalização de 24 e 96 poços das marcas Molecular Dimensions®, Hampton Research® e MiTeGen® e incubados em incubadora da marca Molecular Dimensions®. Os dados provenientes dos experimentos de cristalografia foram visualizados, processados ou analisados pelos seguintes

programas de computador: ADXV, XDS, autoPROC, os programas *Aimless*, PISA, *Coot*, *Pointless*, *Matthews* e *Refmac* do pacote CCP4, os programas *Xtriage*, *Phaser*, *AutoBuild*, *Phenix.refine* e *MolProbity* do pacote Phenix, LigPlot+ e PyMOL.

Os experimentos relativos ao ensaio enzimático foram realizados em banho térmico da marca Polystat® e leitor de placas Elx808 com filtro para leitura em comprimento de onda de 570 nm da marca BIOTEK®.

3.3 SÍNTESE DOS ÁCIDOS 3-(3-ARIL-1,2,4-OXADIAZOL-5-IL)-BUTANÓICOS

As arilamidoximas foram sintetizadas de acordo com o método de Tiemann (TIEMANN, 1884). Os demais reagentes foram obtidos comercialmente.

Procedimento geral para síntese dos ácidos 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-butanóicos

Foram adicionados 30 mmol do anidrido glutárico (1,5 equivalentes) e 20 mmol da amidoxima correspondente (1 equivalente) em um balão médio e este foi mantido em banho de óleo a 200 °C. Após aproximadamente uma hora de reação, verificou-se por CCD em fase móvel 7:3 hexano/acetato de etila o consumo total da amidoxima. Em seguida ao término da reação, foram adicionados 10 mL de solução de bicarbonato de sódio saturado e 10 mL de diclorometano ao balão. A extração foi realizada por 16 horas sob agitação magnética. Posteriormente à extração, as fases orgânica e aquosa foram separadas e foi adicionado ácido cítrico anidro à fase aquosa até pH ácido. A solução foi transferida para um funil de separação e foram realizadas 3 extrações com 20 mL de diclorometano para que o produto seja transferido para a fase orgânica. As alíquotas foram reunidas, secas com sulfato de sódio anidro, filtradas e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O sólido foi recristalizado com uma mistura de clorofórmio e hexano.

3.4 SÍNTESE DOS 3-(3-ARIL-1,2,4-OXADIAZOL-5-IL) BUTANOATOS DE SÓDIO

Em um balão pequeno, foram adicionados 0,8 mmol de ácido 4-(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanóico (1 equivalente) e 3,2 mL da solução-mãe de NaOH 1% recém-preparada (1 equivalente) e seu conteúdo foi mantido sob agitação com barra magnética por 1 hora. Após esse tempo, o metanol foi retirado por rotaevaporação e o produto foi seco durante uma hora em bomba de alto vácuo. A recristalização foi realizada em clorofórmio.

3.5 CLONAGEM DA HKT PARA EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM *ESCHERICHIA COLI*

3.5.1 Colônias de *Aedes aegypti*

Duas linhagens de *Aedes aegypti* (RecLab, originária de Recife- PE, e *Rockefeller*) mantidas no insetário do IAM/FIOCRUZ – PE, foram utilizadas para a obtenção do material genético. Os adultos foram mantidos a 26 ± 1 °C, em umidade relativa de 65% a 85% e fotoperíodo de 12:12 h dia/noite. Os mosquitos adultos foram alimentados com solução de sacarose 10% e as fêmeas foram alimentadas artificialmente com sangue de coelhos Nova Zelândia. As larvas foram mantidas em água decolorada e alimentadas com ração para gatos.

Para a realização do experimento, 20 larvas em estágio L4 foram coletadas, lavadas com água destilada e mantidas em gelo para realizar a extração do RNA.

3.5.2 Extração do RNA

O RNA das larvas foi extraído de acordo com o procedimento descrito por Romão e colaboradores (ROMAO *et al.*, 2006). Aliquotas de 500 µL de TRIzol® e 200 µL de clorofórmio foram adicionados aos microtubos contendo cinco larvas maceradas. O RNA foi precipitado em 300 µL de isopropanol gelado, lavado com 200 µL de etanol 75%, ressuspenso em 30 µL de água ultrapura e estocado a -80 °C. A quantificação foi realizada em NanoDrop 2000 em comprimento de onda de 260 nm.

Após a extração do RNA, foi realizado o tratamento do RNA total com a enzima rDNase I, RNase-Free (Affymetrix®) para descartar contaminantes de DNA. Deste modo, 4 µg (8 µL) do RNA total foram tratados com 10 U da rDNase e 1 µL do tampão de reação 10X. Após incubação a temperatura ambiente por 15 minutos, foi adicionado 1 µL da solução de término da reação (EDTA a 50 mM pH 8,0) aos microtubos e incubados a 65 °C em termociclador por 10 minutos. Estas etapas foram realizadas para as duas linhagens de *Aedes aegypti*.

3.5.3 Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

A transcrição reversa foi realizada com o kit *Cloned AMV First-Strand Synthesis* (Invitrogen®). Para cada 5 µL do RNA tratado, foram adicionados em um microtubo 1 µL de 50 mM oligo dT, 2 µL de 10 mM dNTP e água ultrapura para completar o volume de reação para 14 µL. As amostras foram incubadas a 65 °C por 5 minutos, imersas em gelo para causar um choque térmico e imediatamente foram adicionados 40 U de RNase out, 4 µL do tampão de reação 5X e 15 U da enzima AMV Transcriptase Reversa. As reações foram incubadas em banho-maria a 37 °C por uma hora e após o término, mantidas em gelo.

Aliquotas de 5 µL do cDNA recém-sintetizado foram transferidas para novos microtubos e submetidas à PCR com o par de oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 2). Assim, 1 µL de dNTP a 10 mM, 2,5 µL de tampão de reação da Platinum® *Taq* DNA Polimerase *High Fidelity* 10X, 3 U da Platinum® *Taq* DNA Polimerase *High Fidelity*, 1 µL de cada oligonucleotídeo a 10 mM, 1 µL de MgSO₄ 50 mM e 13 µL de água ultrapura foram adicionados ao microtubo contendo o cDNA. Um controle negativo foi preparado substituindo o cDNA por água ultrapura. A amplificação foi realizada no termociclador T3 *thermocycle* (BIOMETRA®) e seguiu com a primeira desnaturação a 94 °C por 3 minutos, 34 ciclos de 94 °C por 50 segundos para desnaturação, 60 °C por 1 minuto para anelamento e 72 °C por 50 segundos para extensão. Após os ciclos, houve a extensão final de 72 °C por 10 minutos.

Tabela 2 - Oligonucleotídeos iniciadores desenhados a partir da sequência do *GenBank* n° AF435806.1 para amplificação do gene que codifica a proteína HKT de *Aedes aegypti*. Os códons em negrito indicam os sítios de restrição das enzimas *KpnI* e *XbaI*.

Oligonucleotídeo	Sequência
HKT Fw <i>KpnI</i>	5'-CAG GGT ACC ATG AAA TTT ACC CCG CCG-3'
HKT Rv <i>XbaI</i>	5'-CAG TCT AGA GCT GAA GTG TTG AAC TCT CG-3'

Fonte: A autora (2020).

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 0,05% corado com brometo de etídeo. A eletroforese foi realizada a 120V, 100W, 100mA em 40 minutos de corrida. As bandas de interesse foram visualizadas em transluminador com luz ultravioleta, cortadas com lâmina estéril e purificadas com o kit *illustra* GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare Life Sciences®) conforme a metodologia descrita no kit.

3.5.4 Clonagem no pGEM-T *easy*

As reações de PCR foram conduzidas pela *Taq HiFi*, enzima capaz de inserir adeninas nas extremidades dos insertos amplificados. Esta extremidade possibilita a ligação do inserto no vetor pGEM-T *easy*, que tem extremidades 3'T livres. Para a reação de ligação foram usados 50 ng do vetor pGEM-T *easy*, 55 ng do produto de PCR, 5 µL do tampão da T4 DNA ligase 2X, 3 U da T4 DNA ligase e água ultrapura. As reações foram incubadas a 4°C por 16 horas.

O construto foi então introduzido na bactéria via transformação por choque térmico em 50 µL de células de *E. coli* quimiocompetentes cepa TOP10 (Invitrogen®) e 25 µL de tampão de transformação (Tris-HCl a 5 mM pH 7,4 e MgCl₂ a 5 mM). As amostras foram homogeneizadas e mantidas em gelo por 30 minutos. Após a incubação, as amostras foram submetidas a um choque térmico de 42 °C por 1 minuto e em seguida, incubadas novamente

em gelo por 5 minutos. Alíquotas de 500 µL de meio de cultura SOC foram adicionadas aos microtubos e as culturas foram mantidas em agitador orbital a 37 °C com agitação de 200 rpm por 60 minutos. Alíquotas de 100 µL das células transformadas foram plaqueadas em meio de cultura LB/Ágar (Luria-Bertani) contendo ampicilina a 100 µg/mL e as placas foram mantidas em estufa a 37 °C por 16 horas. Além da marca de resistência ao antibiótico, o meio LB/Ágar continha uma mistura de IPTG/X-Gal utilizada para selecionar as construções cujo inserto estava inserido no *operon lac* do vetor, causando a repressão do gene que codifica a β-galactosidase. Neste sistema, as colônias de cor branca continham o construto enquanto as azuis não o continham.

Em seguida à observação do crescimento das colônias, inóculos de colônias brancas isoladas foram preparados em 5 mL de meio LB contendo ampicilina a 100 µg/mL e incubados em agitador orbital a 37 °C com agitação de 200 rpm por 16 horas. Posteriormente à incubação, as culturas foram centrifugadas e os sedimentos de células foram submetidos a lise alcalina para liberação dos construtos com o kit *QIAprep Spin Miniprep* (QIAGEN®). As minipreparações plasmidiais foram quantificadas em NanoDrop 2000 e estocadas a -20 °C.

3.6 SUBCLONAGEM NOS PLASMÍDEOS DE EXPRESSÃO PET-M11, PET-TRX E PET-NUS PARA EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM *ESCHERICHIA COLI*

As construções das duas linhagens da HKT em pGEM-T *easy* foram levadas para o “Laboratório de Cristalografia de Proteínas” no IFSC-USP e atuaram como fonte genética da HKT. Um par de oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados para realizar a subclonagem nos vetores pET otimizados e gentilmente cedidos pela Celco Biotec® para uso nas etapas de clonagem e expressão da HKT em *E. coli* (Tabela 3). Esses vetores utilizam o LIC (do inglês, *ligation independent cloning*) como método de clonagem, excluindo o uso de enzimas de restrição e DNA ligase após adição do inserto no plasmídeo.

Tabela 3 - Oligonucleotídeos iniciadores desenhados para a clonagem via LIC nos plasmídeos pET-M11, pET-Trx e pET-NUS. Os códons em negrito foram inseridos na sequência para a hibridização dos insertos com os vetores.

Oligonucleotídeo	Sequência
HKT LIC Fw	5'- CAG GGC GCC ATG AAA TTT ACC CCG CCG -3'
HKT LIC Rv	5'- GAC CCG ACG CGG TTA TAC GTA ATC CGG ATG GGT-3'

Fonte: A autora (2020).

Para realização do experimento, os vetores precisam ser tratados com a enzima *BsaI* para liberação do gene da GFP e depois incubados com T4 DNA Polimerase na presença de

dTTP para remoção dos nucleotídeos a partir da extremidade 3' até alcançar a primeira timina na sequência. Os vetores já foram cedidos após a clivagem com *Bsa*I. Deste modo, seguiu-se para o tratamento com a T4 DNA Polimerase.

Nesta etapa, foram adicionados à microtubos de 1,5 mL as seguintes soluções: 2 µL do tampão NEBuffer 2.1, 0,5 µL de dTTP a 100 mM, 1 µL de DTT a 10 mM, 0,4 µL T4 DNA Polimerase, 600 ng de cada vetor em seu respectivo tubo e água ultrapura até volume final de 20 µL. As amostras foram incubadas em termociclador T100 *Thermal Cycler* (BIO-RAD®) a 22 °C por 30 minutos e posterior incubação a 75 °C por 20 minutos para término da reação. Simultaneamente, foi realizado o tratamento dos insertos para continuidade da clonagem.

Os insertos das duas linhagens de *Aedes aegypti* foram preparados primeiramente na amplificação usando os oligonucleotídeos HKT LIC seguido de incubação com a T4 DNA Polimerase na presença de dATP. Para isso, foram adicionados à microtubos as seguintes soluções: 1 µL de cada construção em pGEM-T *easy*, 10 µL do tampão da *Phusion High Fidelity* DNA polimerase 10X, 1 µL de dNTP a 10 mM, 1 µL de cada oligonucleotídeo a 10 mM, 0,5 µL da *Phusion High Fidelity* DNA Polimerase (Thermo Scientific®) e água ultrapura até completar o volume da reação para 50 µL. Um controle negativo foi preparado substituindo o cDNA por água ultrapura. A amplificação foi realizada em termociclador T100 *Thermal Cycler* (BIO-RAD®) e seguiu com a primeira desnaturação a 98 °C por 3 minutos, 35 ciclos de 98 °C por 30 segundos para desnaturação, 68 °C por 30 segundos para anelamento e 72 °C por 45 segundos para extensão dos oligonucleotídeos. Após os ciclos, houve a extensão final de 72 °C por 10 minutos. A amplificação de cada linhagem foi feita em duplicata e os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8% em TAE 1X para visualização e purificação das bandas amplificadas. As bandas de interesse foram cortadas com lâmina estéril e purificadas com o *Agarose Gel Extraction kit* (Cellco Biotec®). Após o preparo dos vetores e dos insertos, foram realizadas as etapas de hibridizações do inserto ao vetor e finalização da clonagem.

As hibridizações dos 3 vetores com 2 diferentes insertos em duplicata geraram um conjunto de 12 construções plasmidiais. A proporção inserto:vetor utilizada foi de 3:1 e foram diluídos para uso nos volumes de 10 µL de cada inserto para 1 µL de cada plasmídeo. As amostras foram incubadas em termociclador a 22 °C por 5 minutos e em seguida, foi adicionado 1 µL de EDTA a 25 mM em cada microtubo. Em seguida, as reações foram novamente incubadas a 22 °C por 5 minutos.

Após a hibridização, os construtos foram transformados em células de *E. coli* ultracompetentes cepa DH5 α (Invitrogen Life Technologies®) para realizar a etapa final da clonagem e amplificação das construções. Foram adicionados à microtubos as seguintes soluções: 11 μ L de cada construção, 9 μ L de água ultrapura, 80 μ L de tampão de transformação 2 (KCl a 10 mM, MgCl₂ a 5 mM, CaCl₂ a 3 mM e PEG 6000 a 1,5%) e 100 μ L das células quimiocompetentes. Os microtubos foram homogeneizados e mantidos em gelo por 30 minutos. Após a incubação, as amostras foram submetidas a um choque térmico de 42 °C por 45 segundos seguido de incubação em gelo novamente por 5 minutos. Aliquotas de 800 μ L de meio de cultura SOC foram adicionadas aos microtubos e as culturas foram mantidas em agitador orbital Ecotron (INFORS HT®) a 37 °C com agitação de 200 rpm por 60 minutos. Aliquotas de 100 μ L das células transformadas foram plaqueadas em meio de cultura LB/Ágar contendo canamicina a 50 μ g/mL e as placas foram mantidas em estufa a 37 °C por 16 horas. Uma transformação controle de cada vetor foi preparada contendo somente o vetor linearizado.

Após a observação do crescimento de colônias isoladas, foram realizadas PCR de colônia com 6 colônias de cada replicata das construções plasmidiais, totalizando 36 colônias testadas. Uma amplificação com a construção em pGEM-T *easy* foi realizada como controle positivo. Deste modo, foram adicionados aos respectivos tubos 1 μ L de cada colônia ressuspensa em 100 μ L de água ultrapura, 1 μ L de cada oligonucleotídeo HKT LIC a 10 mM, 25 μ L do *Taq Pol MasterMix 2X* (Cellco Biotec®) e 22 μ L de água ultrapura. A amplificação foi realizada em termociclador a 95 °C por 5 minutos, 30 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 68 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto. Após os ciclos, houve a extensão final de 72 °C por 10 minutos. Somente duas das 36 colônias não exibiram amplificação do DNA e foram descartadas.

Após a confirmação, inóculos de colônias brancas isoladas foram preparados em 2 mL de meio de cultura LB contendo canamicina a 50 μ g/mL e incubados em agitador orbital a 37 °C com agitação de 200 rpm por 16 horas. Após a incubação, as culturas foram centrifugadas e os sedimentos de células foram submetidos a lise alcalina para liberação dos construtos com o *kit Fast-n-Easy Plasmid Miniprep* (Cellco Biotec®). As minipreparações foram quantificadas em NanoDrop 2000 em comprimento de onda de 260 nm e estocadas a -20 °C.

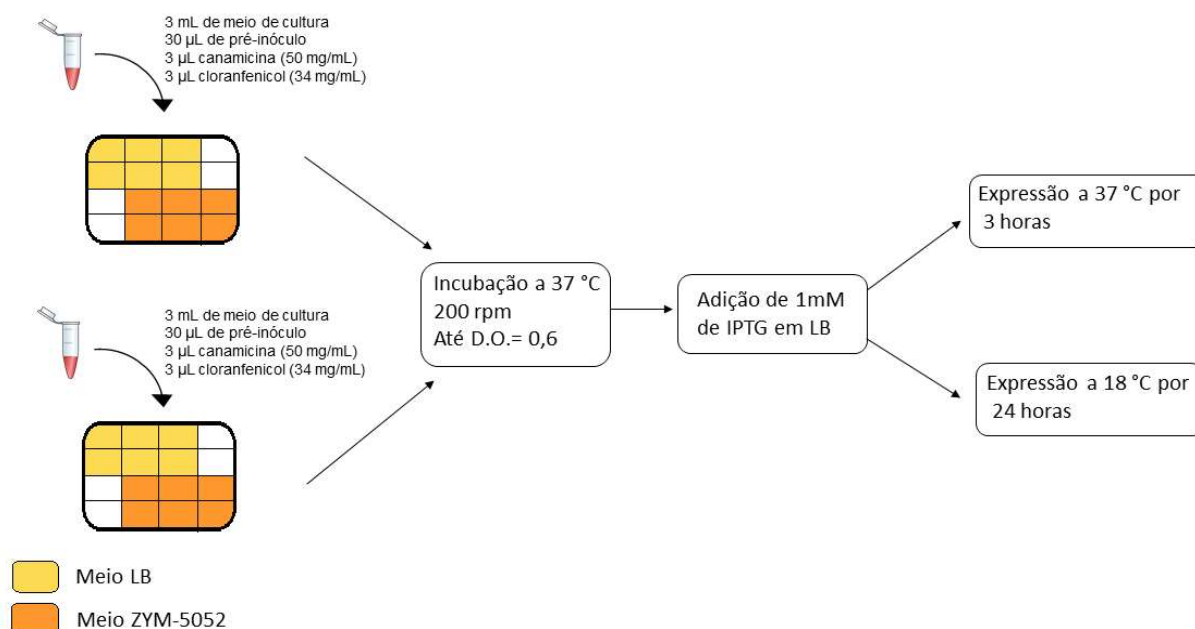
3.7 EXPRESSÃO DA HKT RECOMBINANTE EM *E. COLI*

3.7.1 Transformação das construções em *E. coli* Rosetta 2 (DE3) e testes de expressão

As transformações das construções plasmidiais da HKT foram realizadas por choque térmico, procedimento similar à seção 3.6. Os tubos contendo as células a serem transformadas foram mantidos a -80°C e alíquotas foram descongeladas por incubação em gelo por 10 minutos para a realização do experimento. Em seguida, 1 µL de cada minipreparação plasmidial, 19 µL de água ultrapura e 80 µL de tampão de transformação 2 foram adicionados aos respectivos tubos contendo 100 µL de células ultracompetentes *E. coli* Rosetta 2 (DE3) (Novagen®). As amostras foram incubadas em gelo por 30 minutos e posteriormente mantidas a 42 °C por 45 segundos, seguido de incubação em gelo novamente por 5 minutos. Alíquotas de 800 µL de meio de cultura SOC foram adicionadas aos tubos e estes foram incubados em agitador orbital a 37 °C por 1 hora em agitação de 200 rpm. Após a recuperação, as células foram centrifugadas a 3500 g por 2 minutos, ressuspensas em 200 µL do sobrenadante e espalhadas em placas de Petri contendo meio de cultura LB/Ágar suplementado com cloranfenicol a 34 µg/mL e canamicina a 50 µg/mL por 16 horas. Após a observação do crescimento das colônias, uma colônia isolada de cada placa foi selecionada para preparo de inóculos e teste de expressão. Assim, 5 mL de pré-inóculo em meio de cultura LB contendo cloranfenicol a 34 µg/mL e canamicina a 50 µg/mL foram preparados e incubados a 37 °C por 16 horas em agitação orbital de 200 rpm.

Após o crescimento do pré-inóculo, duas placas com inóculos para o teste de expressão foram preparadas com os meios de cultura LB contendo o indutor de expressão proteica IPTG e o meio auto indutor ZYM-5052 (STUDIER, 2005) (Esquema 2). O volume restante do pré-inóculo foi estocado em criotubos a -80 °C contendo 10% de glicerol.

Esquema 2 - Preparo das amostras para o teste de expressão da HKT recombinante em *E. coli*.



Fonte: A autora (2020).

As culturas foram posteriormente centrifugadas e os sedimentos de células foram submetidos à lise por choque térmico com rápido congelamento e descongelamento e em seguida, submetidas à SDS-PAGE 10% para análise da expressão da AeHKT nas diferentes condições testadas. A eletroforese foi realizada a 400 mA e voltagem livre por 45 minutos em tampão de corrida 1X (Glicina a 0,19 M, Tris-HCl a 30 mM pH 8,3 e SDS a 3,5 mM).

A partir do teste de expressão, as condições com maior proporção de proteína na fração solúvel e construções com maior praticidade na purificação foram selecionadas para realização da expressão em larga escala. Frascos tipo *Erlenmeyer* de 2 L foram preenchidos com 1 L de meio ZYM-5052, 10 mL de pré-inóculo das células com a construção de interesse, 1 mL de cloranfenicol a 34 mg/mL, 1 mL de canamicina a 50 mg/mL e incubados em agitador orbital a 37 °C e rotação de 200 rpm até atingir a densidade óptica (D.O.) próxima a 0,6. Em seguida, a temperatura do agitador foi ajustada para 18 °C e incubados por 24 horas.

Após a expressão, as culturas foram centrifugadas a 4000 g, 4 °C por 20 minutos. Os sedimentos de células foram ressuspensos em tampão para lise (Tris-HCl a 20 mM pH 8, NaCl a 200 mM, 10% Glicerol, Imidazol a 10 mM pH 8 e 1% Tween 20) e estocados em -20 °C para descongelamento quando necessário.

3.7.2 Purificação da HKT-Trx

A primeira linhagem da HKT a ser purificada foi a extraída de larvas *Rockefeller* (linhagem de referência), seguida da linhagem RecLab. As construções escolhidas a partir do teste de expressão foram a RL_HKT-pET_Trx (HKT de RecLab fusionada à Tioredoxina e cauda de 6X-His) e R_HKT-pET_Trx (HKT de *Rockefeller* fusionada à Tioredoxina e cauda de 6X-His). Portanto, etapas de clivagem da Trx e cauda de 6X-His foram adicionadas à purificação.

3.7.3 Lise por sonicação

Os sedimentos de células estocados a -20 °C após a expressão foram descongelados em banho de gelo e transferidos para um béquer de vidro de volume apropriado. Foram adicionados ao béquer DTT a 4 mM, PMSF a 1 mM, 1:1000 (v/v) de Benzonase Nuclease e Lisozima a 1 mg/mL e incubados em banho de gelo por 30 minutos. Após a incubação, a suspensão foi submetida a lise em sonicador *Fisherbrand* Q700 (ThermoFisher Scientific®) por 30 segundos em intervalos de 45 segundos no tempo total de 7 minutos. O lisado obtido foi centrifugado a 20000 g, 4 °C por 40 minutos. Uma amostra dos sedimentos celulares foi preparada para aplicação em SDS-PAGE 10% contendo 100 µL de SDS 10% e 30 µL de tampão de amostra 4X (Tris-HCl a 125 mM pH 6,8, 40% glicerol, 4% SDS, 0,02% azul de bromofenol e β-mercaptoetanol a 1,4 M). O sobrenadante foi filtrado em membrana hidrofílica com poros de 0,45 µm e mantido em gelo para as próximas etapas de purificação. As etapas de purificação cromatográficas foram realizadas no equipamento *ÄKTA pure* (GE Healthcare Life Sciences®), sistema automatizado de alta pressão para purificação de proteínas, peptídeos e ácidos nucleicos.

3.7.4 Cromatografia por afinidade

A primeira cromatografia foi realizada com o objetivo de isolar as proteínas que interagem com o Ni²⁺ imobilizado na resina da coluna. Para isso, foi utilizada a coluna *HisTrap* HP (GE Healthcare Life Sciences®) contendo 5 mL de volume de coluna e os tampões A (Tris-HCl a 50 mM pH 8, NaCl a 500 mM, Imidazol a 20 mM pH 8 e 10% glicerol) e B (Tris-HCl a 50 mM pH 8, NaCl a 500 mM, Imidazol a 500 mM pH 8 e 10% glicerol) para a purificação. O método criado foi adaptado dos protocolos já estabelecidos no laboratório e foi facilmente editado de acordo com o volume de amostra a ser purificada (Tabela 4). As amostras purificadas

foram coletadas em volumes de 10 mL e preparadas para análise em SDS-PAGE 10% contendo 200 µL da amostra, 100 µL de 10% SDS e 60 µL de tampão de amostra 4X.

Tabela 4 - Descrição do método definido para a primeira cromatografia de afinidade.

Etapas	Condições
Equilíbrio da coluna	5 CV
Injeção	Adaptável ao volume de amostra a ser purificada
Lavagem	15 CV
Eluição	
Gradiente (A até B)	5 CV
Constante (somente B)	2 CV
Equilíbrio	2 CV

CV = volumes de coluna. Em todos os passos, o fluxo foi ajustado para 5 mL/min se não exceder a pressão máxima da coluna (0,5 MPa).
Fonte: A autora (2020).

3.7.5 Cromatografia de exclusão por massa molecular

Nessa segunda etapa, foi realizada uma diálise para retirar o imidazol e o glicerol da amostra e seguir para a etapa de clivagem com a TEV Protease. Assim, foi utilizada a coluna *HiTrap Desalting* de 5 mL contendo a resina *Sephadex G-25* para a troca do tampão equilibrada no tampão de diálise (Tris-HCl a 50 mM pH 8 e NaCl a 200 mM). O método estabelecido é mais simples que a afinidade, contendo somente as etapas de equilíbrio, injeção e eluição das proteínas (Tabela 5). As etapas de injeção e eluição foram repetidos até a troca do tampão de toda a amostra.

Tabela 5 - Descrição do método definido para a cromatografia de exclusão molecular na troca de tampão.

Etapas	Condições
Equilíbrio da coluna	3 CV
Injeção	Até 1 mL
Eluição	Até o término da detecção do pico relativo à proteína

CV = volumes de coluna. Em todos os passos, o fluxo foi ajustado para 5 mL/min se não exceder a pressão máxima da coluna (0,5 MPa).
Fonte: A autora (2020).

3.7.6 Clivagem com a TEV Protease

Após a diálise, a proteína foi incubada com a TEV Protease expressa e purificada no laboratório. Essa etapa é necessária para liberação da proteína de fusão e da cauda de 6X-His. Assim, foram adicionados à amostra DTT a 4 mM e 1:5 (v/v) de TEV Protease purificada a 2,5 mg/mL, nessa ordem. Em seguida, a mistura foi incubada a T.A. por 3 horas. Após a incubação, uma alíquota de 20 µL foi preparada e submetida à SDS-PAGE 10% para análise do progresso

da clivagem. Frequentemente a amostra já estava mais de 90% clivada permitindo assim o prosseguimento para a próxima etapa de purificação.

3.7.7 Cromatografia de afinidade

Nesta etapa, a amostra foi submetida à segunda cromatografia de afinidade para retirada da proteína de fusão juntamente com a cauda de 6X-His e a TEV Protease. O método utilizado é bem similar ao da primeira cromatografia de afinidade, exceto pela diminuição do fluxo da fase móvel para melhor performance da purificação (Tabela 6). A coluna e os tampões usados foram os mesmos da seção 3.7.4.

Tabela 6 - Descrição do método definido para a segunda cromatografia por afinidade.

Etapas	Condições
Equilíbrio da coluna	5 CV
Injeção	Volume total da reação de clivagem, fluxo de 2,5 mL/min
Lavagem	15 CV, fluxo de 2,5 mL/min
Eluição	
Gradiente (A até B)	5 CV
Constante (somente B)	2 CV
Equilíbrio	2 CV

CV = volumes de coluna. Quando não mencionado, o fluxo da fase móvel foi definido a 5 mL/min.

Fonte: A autora (2020).

3.7.8 Cromatografia de exclusão por massa molecular

Após a segunda cromatografia por afinidade, foi realizada a última cromatografia de exclusão por massa molecular em resina *Sephadex* para remover o imidazol e o glicerol provenientes do tampão usado na etapa anterior. Desta forma, o método e o tampão utilizados nesta etapa foram os mesmos da seção 3.7.5. As amostras purificadas foram concentradas e quantificadas em NanoDrop 2000 em comprimento de onda de 280 nm.

3.8 CRISTALOGRAFIA DA AeHKT

As soluções de cristalização utilizadas foram produzidas e obtidas comercialmente pelas empresas Hampton Research®, Jena Bioscience®, Molecular Dimensions® e QIAGEN®, empresas especializadas em produção de *kits coarse screens*. Inúmeros cristais foram obtidos nas variadas condições e estes serviram de inspiração inicial para aprimoramento da condição de cristalização e assim obter cristais de melhor poder de difração (Tabela 7).

Tabela 7 - Triagem das condições de cristalização testadas para a HKT das linhagens *Rockefeller* e RecLab.

Proteína	Meios de solução de cristalização	Temperatura de cristalização (°C)	Observação
R_HKT	Classic HT	18	
	SaltRx	18	
	JCSG 1	18	
	JCSG +	18	
	Morpheus	18	
	PEG I	18	
	PEG II	18	
	PEGs suite	18	Apoenzima e cocrystal com PLP
	MPD	18	
	Crystal Screen I e II	18	Apoenzima e cocrystal com PLP
	Crystal Screen cryo	18	
RL_HKT	Additive screen HT	18	
	Index	18	Apoenzima e cocrystal com PLP
	JBScreen Classic 1-4	18 e 4	Apoenzima e cocrystal com PLP
	JBScreen Classic 5-8	18 e 4	Apoenzima e cocrystal com PLP
	JBScreen Classic 9 e 10	4	
	PACT ++	18 e 4	Proteólise com Tripsina 1:100 e 1:1000

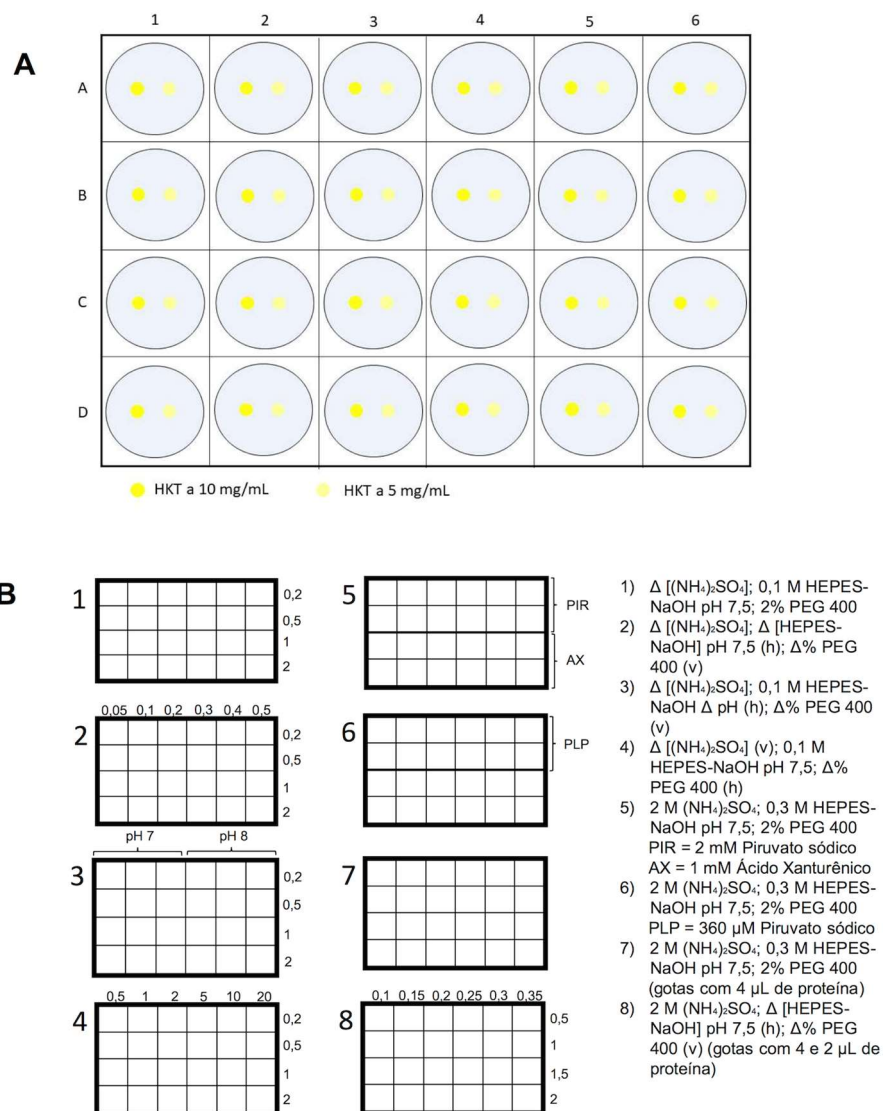
As proteínas foram testadas nas concentrações de 5 mg/mL e 10 mg/mL e cristalizadas em placas com gota sentada de 96 poços.

Fonte: A autora (2020).

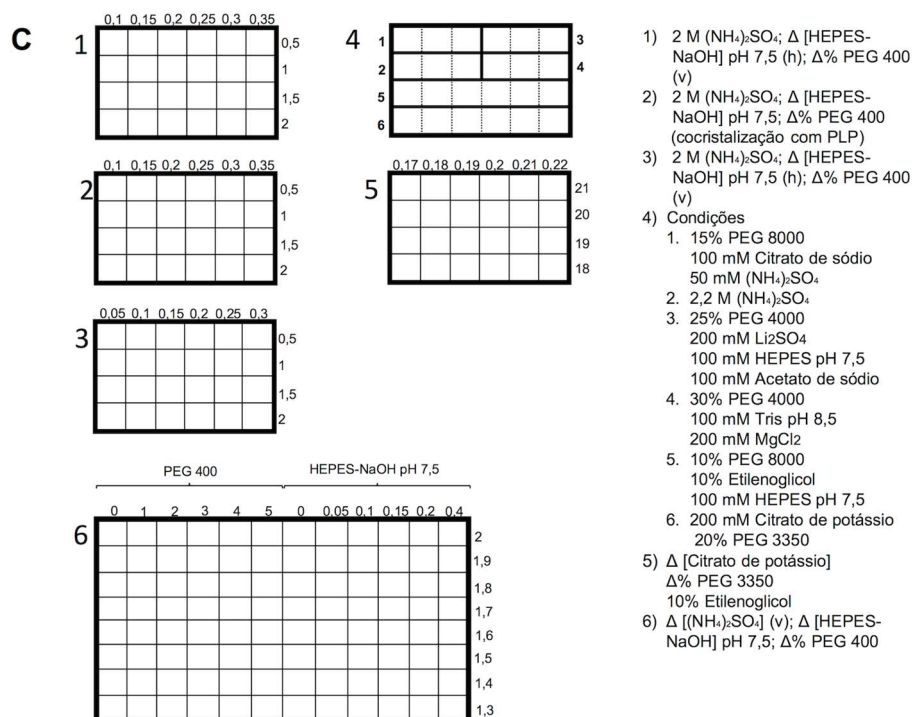
Além da variação das condições de cristalização, foram testadas duas temperaturas de incubação (18°C e 4 °C) para alguns *kits* e ainda a cocrystalização da HKT com o PLP (cofator da enzima) a 360 µM.

A partir da triagem inicial, algumas condições de cristalização foram selecionadas para serem reproduzidas em placas de gota suspensa por *grid screens*, em que a variação fina a partir da condição inicial de cristalização poderia aumentar a chance de obter cristais com maior poder de difração e conjuntos de dados com mais alta resolução. As condições selecionadas foram a D3 do *kit* Crystal Screens I e II, A7 do *kit* JCSG+, D11, F7 e H11 do *kit* JBScreen 1-4 e A6 e D5 do *kit* JBScreen 5-8. Assim, foram feitas várias triagens de concentração e temperatura de cristalização baseadas nessas condições (Figura 6). As placas foram incubadas por até 60 dias após o início do experimento e observadas em microscópio pelo menos uma vez por semana.

Figura 6 - A: Modelo da placa de cristalização de 24 poços usada nos experimentos de cristalização da HKT com gota suspensa. B: *Grid screen* feito para a R_HKT. Placas 7 e 8 foram repetidas e incubadas a 4 °C, além da incubação padrão (18 °C). C: *Grid screen* feito para a RL_HKT. Placas 1, 2, 4, 5 e 6 foram repetidas e incubadas a 4 °C, além da incubação padrão (18 °C). (h) = variação na horizontal, (v) = variação na vertical.



Continuação da Figura 6



Fonte: A autora (2020).

3.9 COLETA DE DADOS CRISTALOGRAFICOS

Os cristais obtidos das duas linhagens de *Aedes aegypti* foram difratados na linha MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), localizado em Campinas, SP. A coleta dos dados de difração de raios X foi feita a baixa temperatura (100 K), com resfriamento por vapor de nitrogênio líquido para evitar a formação de cristais de gelo. Primeiramente, os cristais foram imersos em uma solução crioprotetora, em que se adicionou 20% de etilenoglicol ou glicerol à uma alíquota da solução em que o cristal foi formado. Em seguida, o cristal foi transferido para um suporte de náilon (*loop*) para posicionamento no goniômetro e assim iniciar os testes de difração do cristal. Esse processo foi repetido até que o cristal avaliado apresentasse boas condições (baixa mosaicidade, alta resolução, entre outros) para a coleta de dados de difração de raios X. O detector utilizado na coleta de dados foi o Pilatus 2M e a linha de luz em comprimento de onda de 1,458730 Å. As imagens coletadas foram analisadas visualmente pelo programa ADXV (ADXV, 2013).

3.10 PROCESSAMENTO E REFINAMENTO DOS DADOS CRISTALOGRAFICOS

3.10.1 Estrutura da RL_HKT

Após a coleta de imagens das reflexões de cada cristal, o conjunto de dados foi processado pelo *X-Ray Detector Software* (XDS) (KABSCH, 2010). O arquivo contendo a indexação e integração das reflexões foi posteriormente usado pelo programa *Aimless* do pacote CCP4 para escalonamento e avaliação das estatísticas para o corte de resolução (EVANS, 2011; POTTERTON *et al.*, 2003). A resolução selecionada para cada conjunto é referente à relação da média do sinal/ruído das reflexões $\langle I/\sigma(I) \rangle$ maior ou igual a 2. Nesta etapa, existe a possibilidade de os programas identificarem a presença de *twinning* nos dados processados. Outro programa do pacote CCP4 utilizado foi o *Matthews* para estimar o número de monômeros na célula unitária e a proporção de moléculas de solvente (KANTARDJIEFF; RUPP, 2003). Essa informação é importante para adicionar corretamente o número de macromoléculas e a porcentagem de solvente no célula unitária no programa *Phaser* para estimativa das fases. A análise da qualidade do conjunto de dados foi feita pelo programa *Xtriage* do pacote *Phenix*, em que foram determinadas as leis do *twin* de cada conjunto de dados para o correto refinamento da estrutura cristalográfica (ZWART; GROSSE-KUNSTLEVE; ADAMS, 2005).

O método de substituição molecular foi usado para a determinação das fases. O modelo utilizado foi a estrutura da 3-hidróxiquinurenina transaminase de *Anopheles gambiae* (PDB 2CH1) pelo programa *Phaser* do pacote *Phenix* (ADAMS *et al.*, 2010, 2002; ECHOLS *et al.*, 2012; MCCOY *et al.*, 2007). As duas proteínas apresentam 79% de identidade em suas sequências de aminoácidos (ROSSI *et al.*, 2006). O programa *AutoBuild* foi usado em seguida à etapa de substituição molecular para o melhoramento dos modelos, construção de *loops* e alguns resíduos das regiões N- e C-terminal das cadeias (TERWILLIGER *et al.*, 2007). As etapas subsequentes de refinamento foram realizadas pelos programas *Coot* (EMSLEY *et al.*, 2010) e *Phenix.refine* (AFONINE *et al.*, 2012). A estratégia de refinamento foi baseada inicialmente em refinamento de corpo rígido, *simulated annealing* e ocupâncias. Com o avanço da construção do modelo, essas funções foram substituídas por refinamento de B-fatores em grupo e simetria não-cristalográfica global. As coordenadas x, y e z foram refinadas em todas as etapas e as moléculas de água foram adicionadas de forma automatizada e posteriormente conferidas. A validação do modelo obtido foi feita pelo *MolProbity*, programa acoplado ao pacote *Phenix* que é executado em conjunto com o *Phenix.refine* (CHEN, Vincent B. *et al.*, 2010). Os programas *LigPlot⁺* (LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011), *PISA* (KRISSINEL;

HENRICK, 2007) e o banco de dados CATH (DAWSON *et al.*, 2017) foram usados para a análise da estrutura da RL_HKT e suas interações com o cofator PLP. O programa *Refmac* também foi usado na construção da ligação covalente entre a Lys²⁰⁵ e o PLP no sítio ativo (VAGIN *et al.*, 2004). Os programas *Coot* e PyMOL foram usados para a preparação das imagens das estruturas cristalográficas (SCHRÖDINGER, [s.d.]).

3.10.2 Estrutura da R_HKT

Por causa da dificuldade em processar corretamente conjuntos de dados que apresentem *twinning*, o conjunto de dados da R_HKT ID 5 foi processado pelo pacote autoPROC (VONRHEIN *et al.*, 2011) que realiza a indexação, integração e escalonamento em um único programa e permite o processamento anisotrópico. A substituição molecular foi realizada no programa *Phaser* utilizando a cadeia A da estrutura cristalográfica da RL_HKT como modelo. Em seguida, etapas subsequentes de refinamento utilizando o *Phenix.refine* foram realizadas até alcançar o modelo atual.

3.11 ENSAIO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA HKT COM DETECÇÃO DIRETA DO ÁCIDO XANTURÊNICO

Com o intuito de realizar ensaios enzimáticos para HKT por um método de menor custo e mais rápido do que os descritos na literatura (HPLC-UV e LC-MS/MS), uma metodologia de detecção do complexo AX-Fe³⁺ foi desenvolvida já que o substrato da HKT (3-HK) e o produto da reação (AX) apresentam absorção máxima em comprimentos de onda bem próximos ($\lambda_{\text{máx}}$ = 370 e 369 nm, respectivamente). Já o complexo AX-Fe³⁺ apresenta absorção em comprimento de onda de 570 nm, o que dispensa a separação dos metabólitos para quantificação. A metodologia desenvolvida foi baseada nos trabalhos de Lepkovski e colaboradores (LEPKOVSKY; NIELSEN, 1942; LEPKOVSKY; ROBOZ; HAAGEN-SMIT, 1943) para o método de detecção e adaptada de Han e Li (HAN; LI, 2002) em relação ao ensaio enzimático da HKT.

3.11.1 Padronização do ensaio enzimático da HKT

As seguintes soluções foram preparadas para a padronização e realização do ensaio enzimático:

I. Soluções estoque:

- a. Cloreto de ferro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a 100 mM: 135,2 mg em HCl a 0,1 M q.s.p. 5 mL;
- b. Piridoxal-5-fosfato hidrato (PLP) a 20 mM: 34,3 mg em NaOH a 0,1 M q.s.p. 7 mL.

II. Soluções de uso:

- a. Tampão HEPES (HEPES-NaOH a 200 mM pH 7,5/NaCl a 100 mM):
 - 10 mL de HEPES-NaOH pH 7,5 a 1 M;
 - 1,25 mL de NaCl a 4M;
 - 38,75 mL de Água ultrapura.
- b. 3-D,L-hidróxi-quinurenina (3-HK) a 25 mM: 11,22 mg em Tampão HEPES q.s.p. 2 mL;
- c. Ácido xanturênico (AX) a 20 mM: 16,4 mg em NaOH a 0,1 M q.s.p. 4 mL;
- d. Piridoxal-5-fosfato hidrato (PLP) a 0,5 mM: Diluir 250 μL de PLP a 20 mM em 9,75 mL de Tampão HEPES;
- e. Cloreto de ferro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a 10 mM: Diluir 1 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 100 mM em 9 mL de HCl a 0,1 M;
- f. Enzima recombinante RL_HKT a 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Os ensaios foram realizados em microplacas transparentes de fundo redondo contendo 96 poços e as reações foram padronizadas em volume final de 100 μL . Todas as soluções de estoque e uso foram recém-preparadas, exceto a de 3-HK que foi mantida a -20°C . Cada reação foi estabelecida contendo 2 μg da RL_HKT recém-purificada, 3-HK a 2 mM, Piruvato sódico a 2 mM, PLP a 40 μM e Tampão HEPES para completar o volume final de 100 μL . A temperatura estabelecida para a reação foi de 50°C baseado no trabalho de Han e Li (HAN; LI, 2002). Soluções *mixes* foram preparadas para garantir que a reação iniciasse somente após a adição da enzima ou o substrato. Portanto, a solução *mix* 1 continha a enzima e o PLP, enquanto a solução *mix* 2 continha o 3-HK, Piruvato sódico e o Tampão HEPES. Uma terceira solução *mix* foi preparada para compor as amostras sem enzima (branco) e esta continha apenas PLP e Tampão HEPES. Deste modo, os brancos foram feitos a partir da combinação das soluções *mix* 3 e 2, enquanto as amostras foram feitas a partir da combinação das soluções *mix* 1 e 2 (Tabela 8). O volume final para cada amostra após a adição das respectivas soluções *mixes* deve ser igual

a 100 μL . Para todas as reações acima citadas, brancos foram preparados para subtrair suas absorbâncias das respectivas amostras. Todas as reações foram realizadas em duplicata.

Tabela 8 - Descrição de concentrações e volumes das soluções de uso para preparo das soluções *mix* 1,2 e 3 no ensaio enzimático da RL_HKT.

Solução <i>mix</i> 1:			
Reagente	Concentração Inicial	Volume (μL)	Concentração final*
HKT	0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	20	2 μg
PLP	500 μM	8	40 μM
Total:		28 μL	
Solução <i>mix</i> 2:			
Reagente	Concentração Inicial	Volume (μL)	Concentração final*
3-HK	25 mM	8	2 mM
Piruvato	50 mM	4	2 mM
Tampão HEPES	-	60	-
Total:		72 μL	
Solução <i>mix</i> 3:			
Reagente	Concentração Inicial	Volume (μL)	Concentração final*
Tampão HEPES	-	20	-
PLP	500 μM	8	40 μM
Total:		28 μL	

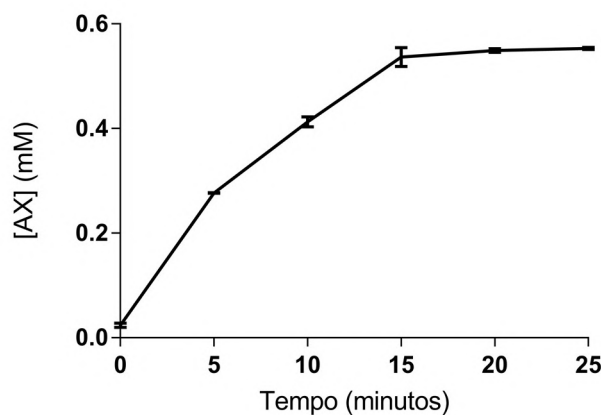
*A concentração final foi calculada para o volume reacional de 100 μL .

Fonte: A autora (2020).

Após a reação, foi adicionado 100 μL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 10 mM em HCl a 0,1 M em cada poço para interromper a catálise da HKT acidificando o meio reacional, gerar o complexo de AX-Fe^{3+} e completar o volume nos poços para 200 μL . Em seguida, foi feita a leitura da placa em 570 nm para aquisição dos dados de absorbância.

Uma curva de progresso foi realizada para determinar o tempo reacional do ensaio enzimático. Para isso, a reação foi acompanhada de 5 em 5 minutos até o tempo final de 25 minutos. O tempo escolhido foi o de 5 minutos por melhor representar a região de velocidade inicial da reação catalisada pela HKT (Figura 7).

Figura 7 - Curva de progresso da reação catalisada pela HKT para padronização do tempo total da nova metodologia.



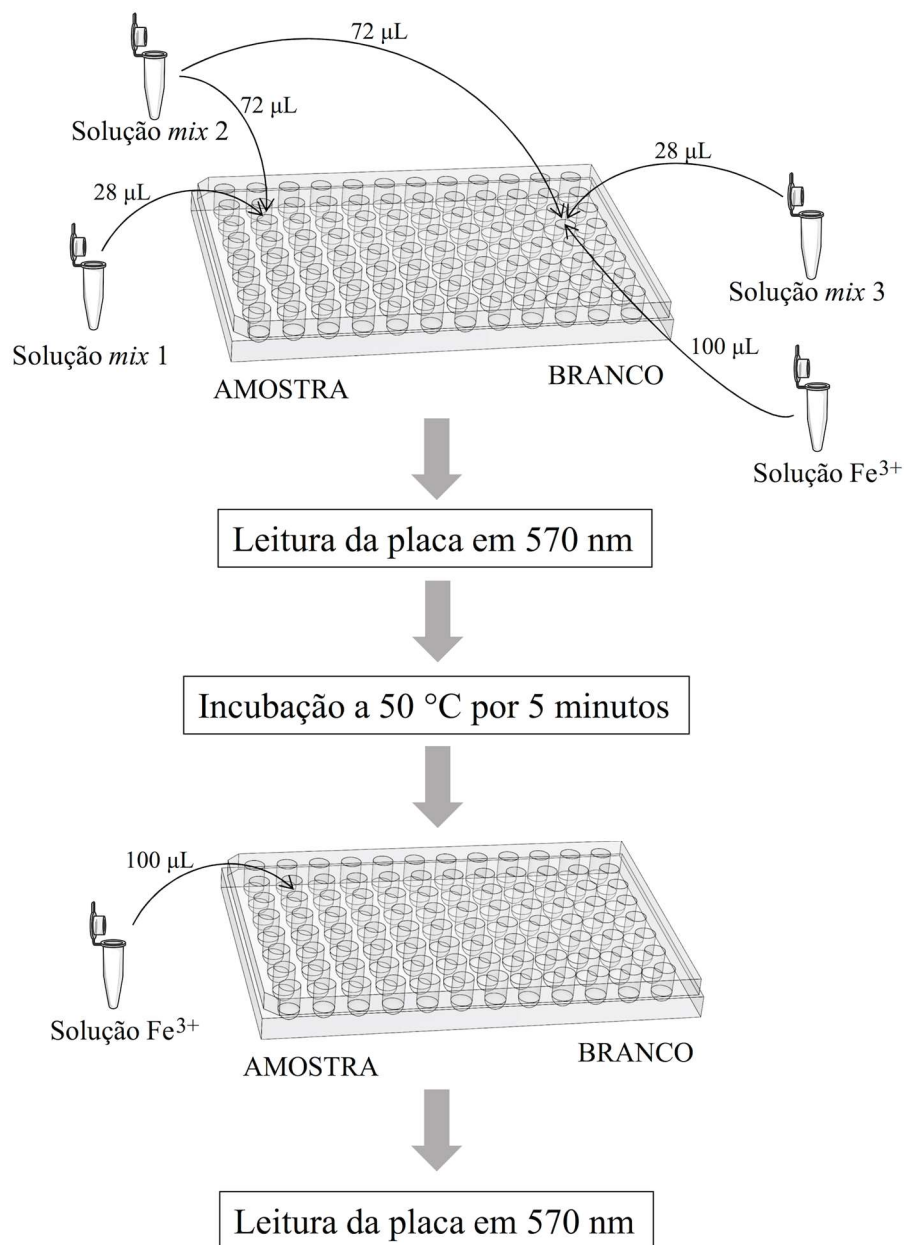
Fonte: A autora (2020).

Portanto, o ensaio enzimático foi padronizado em volume reacional de 100 μL contendo 2 μg da enzima HKT, 40 μM do cofator PLP, 2 mM dos substratos amino-doador 3-HK e amino-acceptor piruvato sódico, e o Tampão HEPES para completar o volume final. A reação deve ser incubada a 50 $^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos e em seguida, adicionar 100 μL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 10 mM em HCl a 0,1 M em cada poço, completando o volume para 200 μL (Figura 8).

Outro procedimento adotado para garantir a quantidade suficiente de reagentes para todas as amostras foi o preparo das soluções *mixes* para “n+1” poços. Por exemplo, na comparação da atividade entre dois clones da RL_HKT a ser realizada em triplicata ($n = 6$ poços), deve-se preparar o volume final de cada solução *mix* equivalente a 7 (n+1) poços.

A quantificação da formação do AX catalisada pela HKT foi quantificada por curva de calibração. Para isso, foram preparadas as soluções *mixes* A (contendo concentrações fixas de PLP e Piruvato sódico) e B (contendo concentrações variáveis de AX) em um volume final de 100 μL (Tabela 9).

Figura 8 - Representação esquemática das etapas a serem realizadas nos ensaios enzimáticos da RL_HKT.



Fonte: A autora (2020).

Tabela 9 - Descrição de concentrações e volumes das soluções de uso para preparo das soluções *mixes* A e B.

Solução *mix* A (para todos os poços):

Reagente	Concentração Inicial	Volume (µL)	Concentração Final
Piruvato sódico	50 mM	4	2mM
PLP	500 µM	8	40 µM
Total:		12 µL	

Continuação da Tabela 9

Solução *mix* B (para cada concentração de AX):

Concentração Final de AX (mM)	Volume de AX (μ L)	Volume de Tampão HEPES (μ L)
0,0	-	88
0,2	1	87
0,4	2	86
0,6	3	85
0,8	4	84
1,0	5	83
1,2	6	82
1,4	7	81
1,6	8	80
1,8	9	79
2,0	10	78
4,0	20	68
6,0	30	58
Total em cada poço:		88 μ L

*A concentração final foi calculada para o volume reacional de 100 μ L.

Fonte: A autora (2020).

Após a adição das soluções *mixes* em seus respectivos poços, foi feita a incubação a 50 °C por 5 minutos e posteriormente, adicionado 100 μ L de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 10 mM em HCl a 0,1 M em cada poço, completando o volume para 200 μ L. Cada concentração de AX foi testada em triplicata e uma regressão linear dos dados de absorbância em relação à concentração de AX foi realizada no GraphPadPrism7.0 para gerar a curva de calibração.

3.11.2 Caracterização cinética da RL_HKT

A enzima RL_HKT expressa em *Escherichia coli* foi caracterizada em termos das constantes cinéticas, pH e temperatura ótimas. Em relação às constantes cinéticas, a taxa de reação da HKT foi calculada a partir da leitura em 0 e 5 minutos de reação e foram testadas seis concentrações de 3-HK (0,5; 1,75; 3; 4; 8,5 e 10 mM) na presença de piruvato sódico a 5 mM. Por isso, somente a preparação da solução *mix* 2 foi alterada para comportar os novos volumes de 3-HK (Tabela 10). As soluções *mixes* 1 e 3 foram preparadas e os procedimentos de incubação e leitura foram realizados como descrito na seção 3.11.1.

Tabela 10 - Descrição do preparo das soluções *mix* 2 nos experimentos de cinética enzimática.

0,5 mM		1,75 mM		3,0 mM	
Reagente	Volume (µL)	Reagente	Volume (µL)	Reagente	Volume (µL)
3-HK	2	3-HK	7	3-HK	12
Piruvato sódico	8	Piruvato sódico	8	Piruvato sódico	8
Tampão HEPES	62	Tampão HEPES	57	Tampão HEPES	52
Total:	72µL	Total:	72µL	Total:	72µL

4,0 mM		8,5 mM		10,0 mM	
Reagente	Volume (µL)	Reagente	Volume (µL)	Reagente	Volume (µL)
3-HK	16	3-HK	34	3-HK	40
Piruvato sódico	8	Piruvato sódico	8	Piruvato sódico	8
Tampão HEPES	48	Tampão HEPES	30	Tampão HEPES	24
Total:	72 µL	Total:	72 µL	Total:	72 µL

Fonte: A autora (2020).

3.11.3 Avaliação do perfil de atividade da HKT em diferentes pHs

A atividade da RL_HKT foi avaliada em diferentes tampões na faixa de pH de 6 a 10, substituindo o Tampão HEPES na solução *mix* 2 descrita na seção 3.11.1 (Tabela 11).

Tabela 11 - Descrição da composição e pH dos tampões testados na avaliação da atividade da HKT.

Composição do Tampão	pH	Volume na solução <i>mix</i> 2 (µL)
Tris-HCl a 200 mM	6	60
NaCl a 100 mM		
Tris-HCl a 200 mM	7	60
NaCl a 100 mM		
Tris-HCl a 200 mM	8	60
NaCl a 100 mM		
Ácido Bórico-NaOH a 200 mM	9	60
NaCl a 100 mM		
Carbonato/Bicarbonato de sódio a 200 mM	10	60
NaCl a 100 mM		

Fonte: A autora (2020).

3.11.4 Avaliação do perfil de atividade da HKT em diferentes temperaturas

A atividade da HKT também foi avaliada em cinco temperaturas de incubação: 30, 40, 50, 60 e 70 °C. Deste modo, os experimentos foram conduzidos pelo mesmo procedimento da seção 3.11.1, alterando somente a temperatura de incubação.

3.11.5 Avaliação inibitória dos 1,2,4-oxadiazóis: Determinação de CI_{50} e mecanismo de inibição

A atividade inibitória dos sais derivados do 1,2,4-oxadiazol sintetizados foi avaliada pela metodologia desenvolvida neste trabalho. O ensaio foi adaptado da padronização descrita na seção 3.11.1. e requer pré-incubação dos compostos com a enzima RL_HKT e o cofator PLP a 50 °C por 30 minutos para então adicionar os outros componentes da reação e avaliar a redução na atividade enzimática. Os inibidores foram testados em cinco concentrações (50,75, 100, 250 e 500 μ M) que ocuparam 30 μ L do volume total de 100 μ L (Tabela 12).

Tabela 12 -Descrição de concentrações e volumes das soluções de uso para preparo das soluções *mix* 1,2 e 3 no ensaio de inibição da RL_HKT.

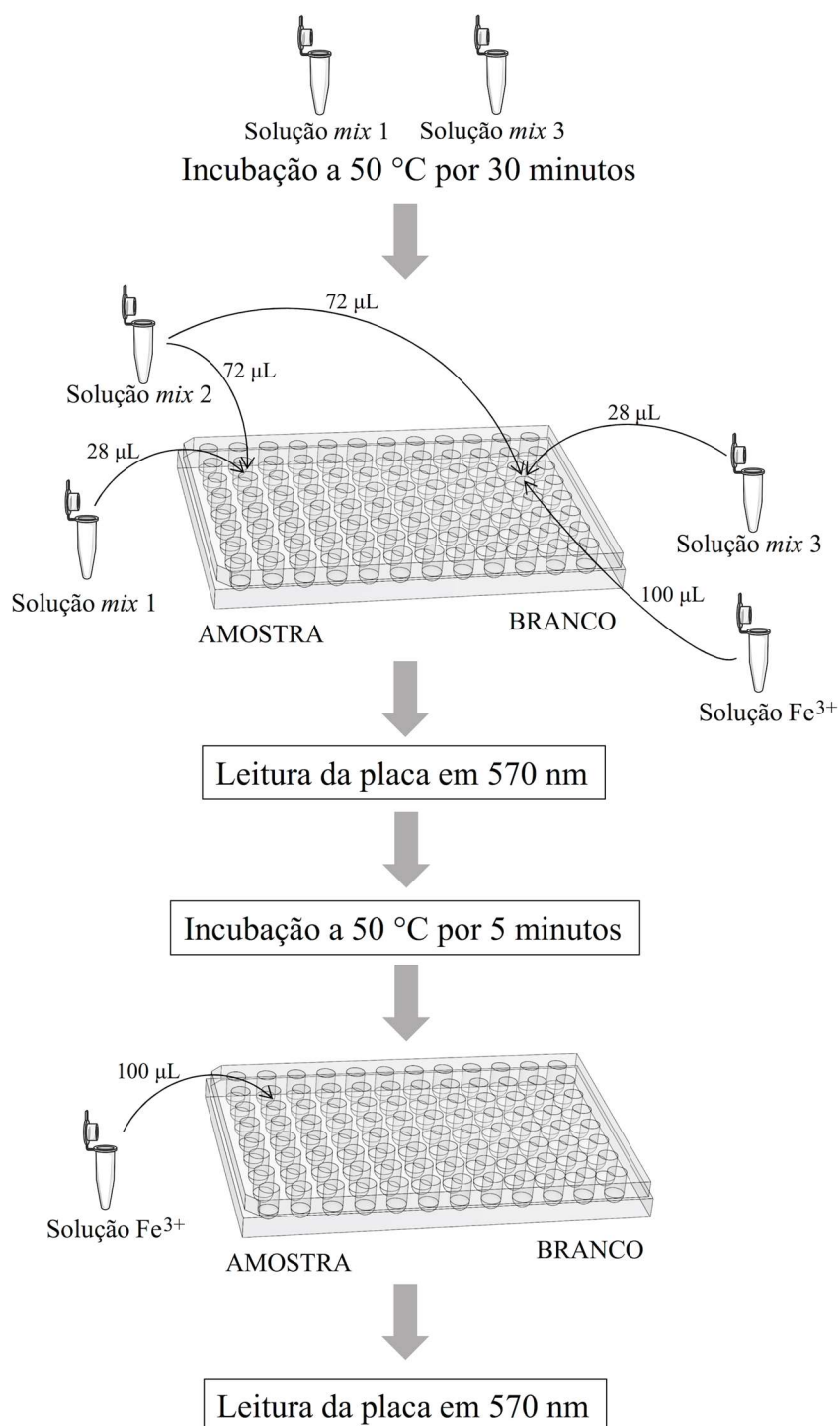
Solução <i>mix</i> 1:			
Reagente	Concentração Inicial	Volume (μ L)	Concentração Final
HKT	0,1 μ g/ μ L	20	2 μ g
PLP	500 μ M	8	40 μ M
Composto	*	30	*
Total:		58 μ L	
Solução <i>mix</i> 2:			
Reagente	Concentração Inicial	Volume (μ L)	Concentração Final
3-HK	25 mM	8	2 mM
Piruvato sódico	50 mM	4	2mM
Tampão HEPES	-	30	-
Total:		42 μ L	
Solução <i>mix</i> 3:			
Reagente	Concentração Inicial	Volume (μ L)	Concentração Final
Tampão HEPES	-	20	-
PLP	500 μ M	8	40 μ M
Composto	*	30	*
Total:		58 μ L	

*A concentração inicial do composto a ser testado deve ser 3,33 vezes maior do que a concentração final desejada (ajustar em 30 de 100 μ L. Essa é a razão entre a concentração inicial e final para ocupar o volume padronizado no ensaio enzimático (30 μ L do composto a ser testado em 100 μ L do total da reação).

Fonte: A autora (2020).

Portanto, os volumes das soluções *mixes* 1 e 3 foram modificados para adicionar o composto a ser testado e o volume da solução *mix* 2 foi diminuído para conter somente 30 μ L do Tampão HEPES. Cada concentração e branco foram testadas em duplicata e um controle negativo (sem inibidor) foi adicionado a cada experimento (Figura 9).

Figura 9 - Representação esquemática das etapas a serem realizadas nos experimentos de inibição enzimática da RL_HKT.



Fonte: A autora (2020).

Para os onze sais de 1,2,4-oxadiazóis testados, soluções super estoque foram preparadas contendo 33,3 µmol de cada composto em volume final de 100 µL de Tampão HEPES (concentração de 333 mM). Em seguida, uma diluição de 100X foi realizada em

Tampão HEPES para obter uma solução estoque de concentração igual a 3,33 mM. Esta solução estoque foi usada para preparar as soluções de uso para cada concentração a ser testada (Tabela 13).

Tabela 13 - Descrição das diluições a partir da solução estoque de cada composto a 3,33 mM para gerar as soluções de uso.

Concentração da solução (μM)	Concentração Final* (μM)	Volume da solução estoque (μL)	Volume de Tampão HEPES (μL)
1665	500	150	150
832,5	250	75	225
333	100	30	270
249,75	75	22,5	277,5
166,5	50	15	285
Total:		300 μL	

*A concentração final foi calculada para o volume reacional de 100 μL. Para os compostos 4b, 4j e 4k, a concentração máxima de 500 μM foi substituída para melhor estimativa dos CI_{50} por 450, 300 e 300 μM, respectivamente.

Fonte: A autora (2020).

Todos os dados de atividade enzimática e inibição da RL_HKT foram analisados usando o programa GraphPad Prism7.0. Os dados cinéticos foram estimados utilizando o modelo de Michaelis-Menten contido no programa e os dados de inibição foram determinados por regressão não-linear.

O mecanismo de inibição da série 11 sais de 1,2,4-oxadiazóis foi realizado para o composto canônico **4a** (sem substituição no anel aromático). Os experimentos foram realizados a partir da coleta de dados cinéticos em quatro concentrações de 3-HK (0,5; 1,75; 4 e 8,5 mM) na ausência (0 μM) e quatro concentrações (50, 100, 200 e 300 μM) do inibidor **4^a** (Tabela 14). As quatro condições foram testadas em triplicata e um gráfico de Lineweaver-Burk contendo o recíproco da taxa (1/taxa) em relação ao recíproco da concentração de 3-HK (1/concentração) foi plotado para observar o mecanismo de inibição.

Tabela 14 - Condições testadas para avaliação da cinética de inibição da RL_HKT pelo inibidor **4a**. Cada condição é composta por uma concentração do inibidor **4a** testado em quatro concentrações do substrato 3-HK (0,5, 1,75, 4 e 8,5 mM).

Condição	Concentração de 4a (μ M)	Concentração de 3-HK (mM)
1	0	0,5
		1,75
		4,0
		8,5
2	50	0,5
		1,75
		4,0
		8,5
3	100	0,5
		1,75
		4,0
		8,5
4	200	0,5
		1,75
		4,0
		8,5
5	300	0,5
		1,75
		4,0
		8,5

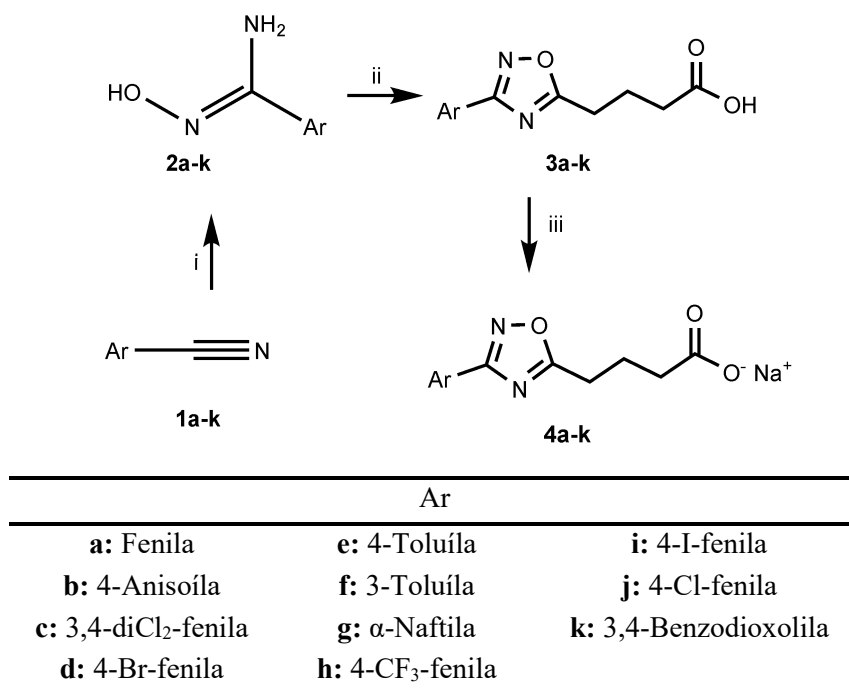
Fonte: A autora (2020).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SÍNTESE DOS SAIS SÓDICOS 1,2,4-OXADIAZÓLICOS

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram o potencial de derivados 1,2,4-oxadiazólicos como inibidores da enzima HKT (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Desta maneira, foi realizada a síntese de larvicidas 1,2,4-oxadiazólicos solúveis em água. Estes compostos foram obtidos por uma síntese de três etapas a partir da síntese de arilamidoximas com seus respectivos substituintes, posteriormente reagidas com anidrido glutárico para formar os ácidos 4-[3-(aril)-1,2,4-oxadiazol-5-il] butanóicos. Após a recristalização, estes compostos foram submetidos à reação com hidróxido de sódio em meio metanólico para formar os sais sódicos derivados de 1,2,4-oxadiazóis (Esquema 3).

Esquema 3 - Síntese dos sais sódicos derivados de 1,2,4-oxadiazóis testados como inibidores da HKT. i: $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ e Na_2CO_3 (4 eq.), etanol/ H_2O , T.A.; ii: anidrido glutárico (1.5 eq.), sem solvente; iii: NaOH (1 eq.) e metanol, T.A.



Fonte: A autora (2020).

Toda a caracterização desta série de compostos está disposta na minha Dissertação de Mestrado (MACIEL, 2016) e alguns dados de caracterização estão contidos no Apêndice.

4.2 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS GÊNICAS E DE AMINOÁCIDOS DA HKT

A sequência do mRNA parcial da HKT de *Aedes aegypti* foi obtida no *GenBank* (número de acesso AF435806.1) e possui 1167 pares de bases. Oligonucleotídeos foram desenhados a partir desta sequência para adicionar sítios de restrição das enzimas *KpnI* e *XbaI* e realização da clonagem com *tags* de hibridização do sistema LIC para expressão em *E. coli*.

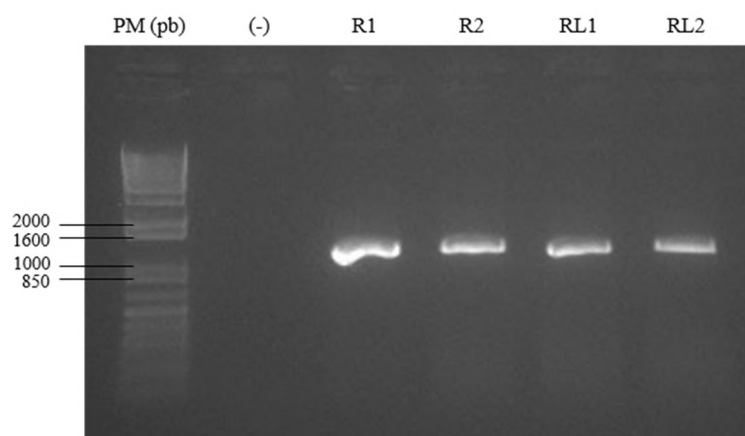
Anotações sobre a HKT estão disponíveis no UniProtKB através do código de acesso Q95V15. Neste banco de dados consta informações sobre a ligação covalente do cofator PLP com a Lys²⁰⁵ via formação de uma base de Schiff (FISCHER *et al.*, 1958). Além disso, constam também informações sobre a sequência de aminoácidos, domínios da HKT e proteínas homólogas que serão discutidos nos próximos tópicos (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2011).

Outra ferramenta utilizada para análise da sequência da HKT foi o *ProtParam* do servidor ExPASy. A partir dessa análise, a massa molecular da R_HKT foi estimada em 43.433,24 Daltons com 388 resíduos e ponto isoelétrico teórico em pH 6,1. Já a RL_HKT possui massa molecular de 43.429,26 Daltons com o mesmo número de resíduos de aminoácidos e ponto isoelétrico da R_HKT. Por isso, decidiu-se usar os tampões em pH 8 para a purificação das proteínas recombinantes. O coeficiente de extinção calculado também foi usado para a determinação das concentrações reais das proteínas. Os valores obtidos foram 61475 M⁻¹.cm⁻¹ ou 1,415 M⁻¹.cm⁻¹ para absorbância de 0,1% (=1g/L). O índice de estabilidade da proteína calculado é igual a 38,89 para a R_HKT e 39,11 para a RL_HKT, considerando-se assim a HKT uma proteína estável (GASTEIGER *et al.*, 2005).

4.3 AMPLIFICAÇÃO POR RT-PCR

As reações de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) foram realizadas a partir do RNA total extraído das larvas para obtenção do cDNA da HKT. Amostras do RNA das duas linhagens foram submetidas à reação de RT-PCR e o fragmento de aproximadamente 1100 pares de bases foi amplificado, indicando a presença de mRNA no RNA total (Figura 10). O tamanho dos fragmentos obtidos foi consistente com o esperado, confirmados via sequenciamento e pode-se observar uma única banda intensa em cada amostra, demonstrando a especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados. Os fragmentos foram excisados do gel de agarose, purificados e clonados em pGEM-T *easy*.

Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose 1% das amostras amplificadas por RT-PCR das linhagens *Rockefeller* (R) e *RecLab* (RL). Cada linhagem foi amplificada em duplicata e um controle negativo foi adicionado ao experimento. Marcador: 1kb Plus Ladder (Invitrogen®).

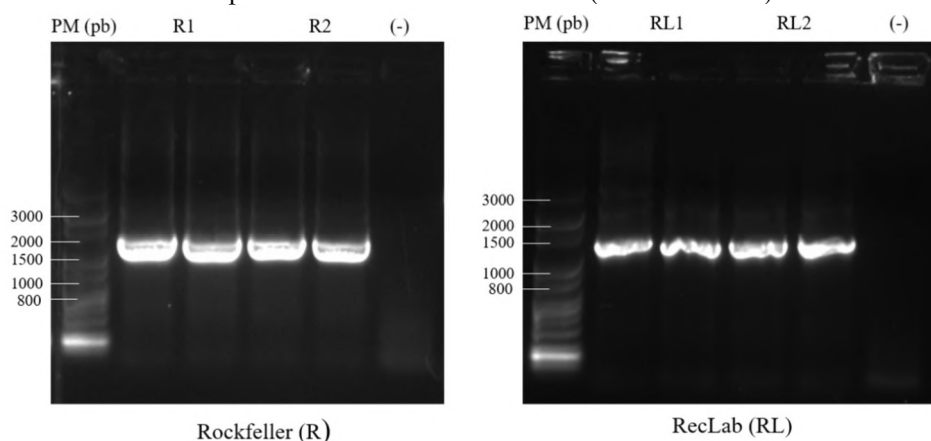


Fonte: A autora (2020).

4.4 SUBCLONAGEM EM PET-NUS, PET-M11 E PET TRX PARA EXPRESSÃO EM *E. COLI*

A subclonagem a partir das construções em pGEM-T *easy* para inserção do gene no vetor pET foi realizada com o intuito de expressar a HKT das duas linhagens em um sistema de expressão de baixo custo e alto rendimento. Assim, a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada com uma minipreparação de cada linhagem, em duplicata e utilizando os oligonucleotídeos iniciadores desenhados para clonagem independente de ligase (LIC) (Figura 11).

Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% das amostras obtidas a partir da PCR com os oligonucleotídeos iniciadores para LIC. Um controle negativo foi adicionado à cada reação, substituindo o DNA por água ultrapura. Marcador: 1kb Plus Ladder (Cellco Biotec®).

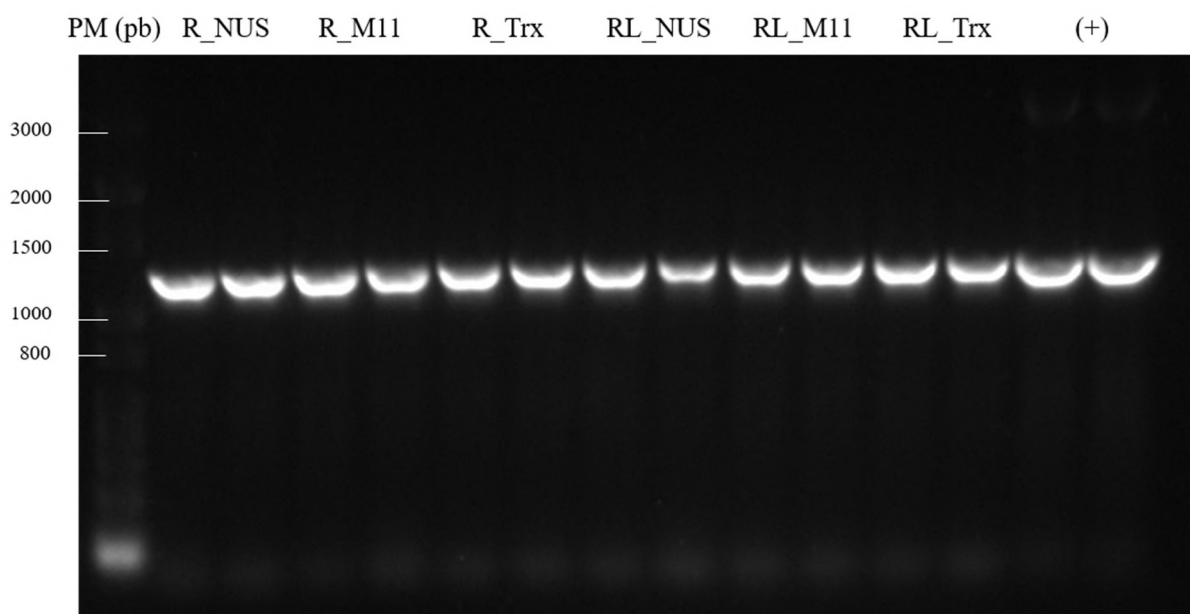


Fonte: A autora (2020).

Após o sucesso da PCR em ambas linhagens, os genes amplificados foram excisados do gel, purificados e incubados com os plasmídeos para a hibridização entre o inserto e o vetor,

conforme descrito na seção 3.6. A combinação de três vetores (pET-M11, pET-Trx e pET-NUS) com os insertos das duas linhagens de *Aedes aegypti* (Rockefeller e RecLab) resultou em seis construções, nomeadas com as siglas das linhagens e das proteínas de fusão dos vetores (*i.e.*: R_NUS é a construção da HKT de Rockefeller no vetor pET-NUS). As amostras hibridizadas foram então transformadas em células DH5 α e o experimento de PCR de colônia foi realizado para confirmação da transformação das colônias escolhidas. Seis colônias de cada construção foram selecionadas, totalizando 36 colônias testadas. Dessas, somente duas colônias não mostraram amplificação e foram descartadas. A construção da RL_HKT em pGEM-T *easy* foi utilizada como controle positivo da reação (Figura 12).

Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo duas das seis reações realizadas com as colônias selecionadas para o experimento. Marcador: 1 kb Plus Ladder (Cellco Biotec®).



Fonte: A autora (2020).

As colônias confirmadas pela PCR foram incubadas em meio de cultura LB para crescimento das células transformadas e posterior obtenção das minipreparações plasmidiais. Em seguida, células Rosetta 2 (DE3) foram transformadas com as minipreparações plasmidiais para expressão da HKT recombinante.

4.5 TESTES DE EXPRESSÃO

Testes de condições de expressão da HKT em *E. coli* foram realizados para otimizar a quantidade de proteína recombinante na fração solúvel e alcançar a condição de expressão com maior praticidade na etapa de purificação. Assim, os seguintes fatores foram variados:

- Temperatura de expressão proteica: 37 °C e 18 °C

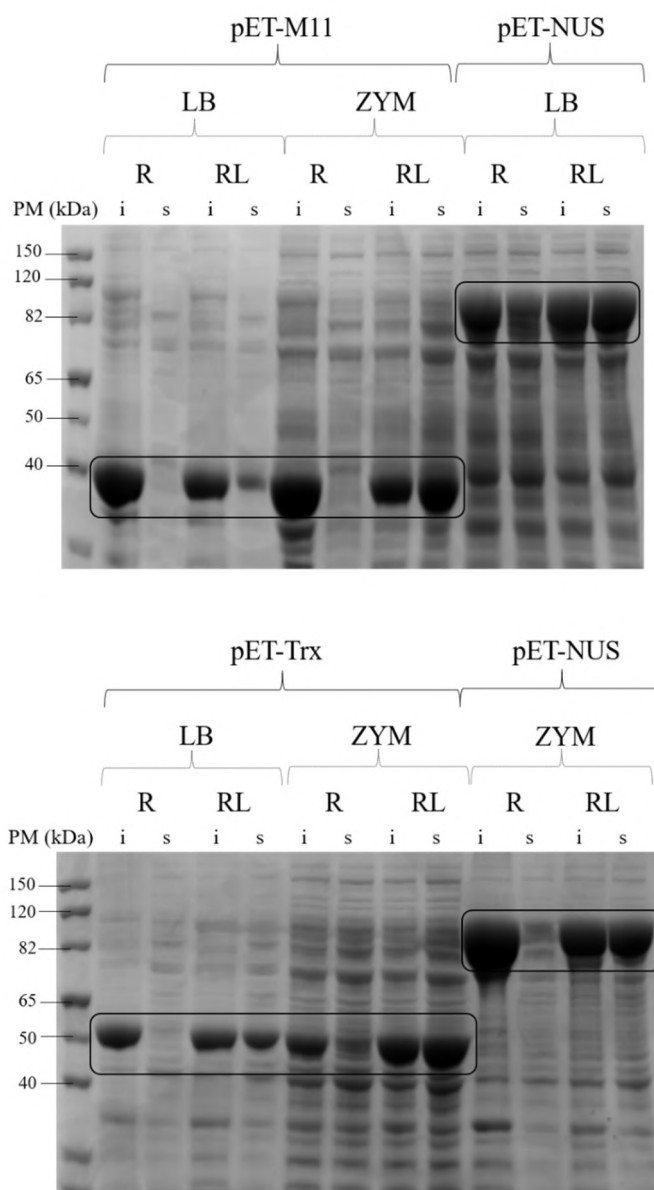
- Meio de cultura: LB com indução por IPTG e ZYM-5052 (meio auto-indutor)
- Construção: R ou RL em NUS, M11 ou Trx
- Tempo de expressão: 3 e 24 horas

Resultados preliminares das expressões a 37 °C mostraram que praticamente não havia proteína em solução (fração solúvel), sugerindo a formação de corpos de inclusão ou agregados proteicos. Deste modo, essas amostras foram descartadas e seguiu-se com os testes a 18 °C.

Os inóculos incubados a 18 °C foram mantidos sob agitação por 24 horas para aumentar a eficiência de expressão proteica. Após este período, alíquotas dos inóculos foram centrifugadas, submetidas à lise e preparadas para análise em SDS-PAGE 10% (Figura 13).

Após análise da quantidade de proteína na fração solúvel dos três vetores, foi observado que a construção em pET-NUS foi a mais bem-sucedida em ambas as linhagens. Contudo, o sítio de ligação da TEV Protease para clivagem da proteína de fusão NusA nesse vetor é menos acessível que o do pET-Trx. Isso pode ser justificado pela diferença de tamanho das proteínas, ocorrendo um efeito estérico para se alcançar o sítio de clivagem (55 kDa da NusA e 12 kDa da Trx). Entretanto, a presença de uma proteína de fusão foi necessária para observar a expressão da R_HKT na fração solúvel, ausente no vetor pET-M11. Assim, optou-se por realizar as expressões em larga escala com as construções das duas linhagens em pET-Trx e otimizar alguns procedimentos, tais como utilização de sonda ultrassônica (sonicação) para aumentar a quantidade da R_HKT na fração solúvel.

Figura 13 - SDS-PAGE 10% de alíquotas do teste de expressão das construções de R_HKT e RL_HKT nos vetores pET-NUS, pET_M11 e pET-Trx. As bandas relativas à HKT e suas respectivas proteínas de fusão estão destacadas. i = fração insolúvel e s = fração solúvel. Marcador: Protein Ladder Unstained (BioRad®).



Fonte: A autora (2020).

Após a observação da notável diferença de solubilidade da HKT entre as duas linhagens, foram realizadas análises das sequências destas duas variantes da HKT para identificar alguma mutação que justificasse a diferença de solubilidade (Figura 14).

Figura 14 - Alinhamento da sequência da HKT anotada no UniProtKB (Q95V15) com as sequências das linhagens RecLab (RL_HKT) e *Rockefeller* (R_HKT).



Fonte: A autora (2020).

Além da mutação já esperada em H360M, foram observadas as mutações V149I e P215S somente na linhagem *Rockefeller*. A primeira mutação é menos prejudicial à proteína, pois ambos resíduos Valina e Isoleucina contêm a cadeia lateral hidrofóbica. Já os resíduos Prolina e Serina são bem diferentes, por a Prolina ser um aminoácido cíclico e causar restrições à mobilidade conformacional do esqueleto protéico. Por outro lado, a Serina contém uma cadeia lateral polar com uma hidroxila na parte terminal, possibilitando a formação de uma ligação de hidrogênio com a água ou resíduos polares intra- ou inter-cadeias. Estas duas mutações mais recentes estão localizadas no domínio catalítico da enzima e as implicações estruturais dessa mutação serão discutidas mais à frente. Contudo, a nível de expressão proteica, essas mutações poderiam justificar a drástica mudança na quantidade e solubilidade da proteína.

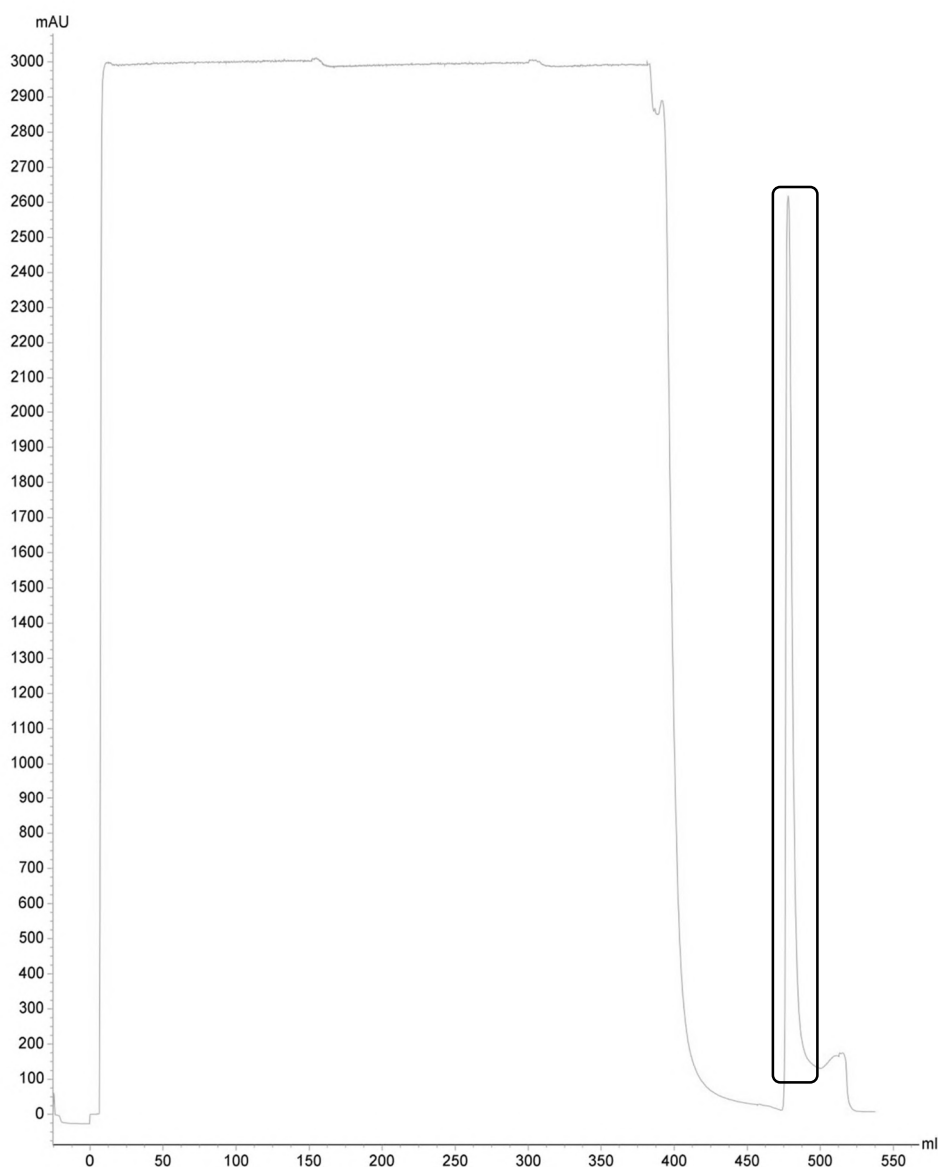
4.6 PURIFICAÇÃO DA HKT RECOMBINANTE EXPRESSA EM *E. COLI*

4.6.1 Purificação da R_HKT-Trx

A metodologia para a purificação da HKT expressa em *E. coli* foi primeiramente adaptada para a linhagem *Rockefeller* e depois testada para a linhagem RecLab. Os protocolos já estabelecidos no laboratório para outras proteínas purificadas foram usados como base e contém as seguintes etapas: lise por sonicação, primeira cromatografia por afinidade, clivagem com a TEV Protease, segunda cromatografia por afinidade e gel filtração.

Após a sonicação das células e recuperação das proteínas na fração solúvel, foi feita uma cromatografia de afinidade para separar as proteínas que tem baixa ou nenhuma afinidade com o Ni^{2+} imobilizado na resina da coluna (idealmente, somente a proteína recombinante em estudo deveria ter afinidade por causa da cauda de 6xHis). Foi observado um pico mais intenso no cromatograma após a injeção e lavagem da amostra, em que o aumento de imidazol no tampão diminui a afinidade da cauda de 6xHis pelo Ni^{2+} , resultando na eluição da proteína da coluna (Figura 15).

Figura 15 - Cromatograma da primeira cromatografia por afinidade na purificação da R_HKT-Trx, com destaque ao pico relativo à proteína. O fluxo da fase móvel é de 5 mL/min.



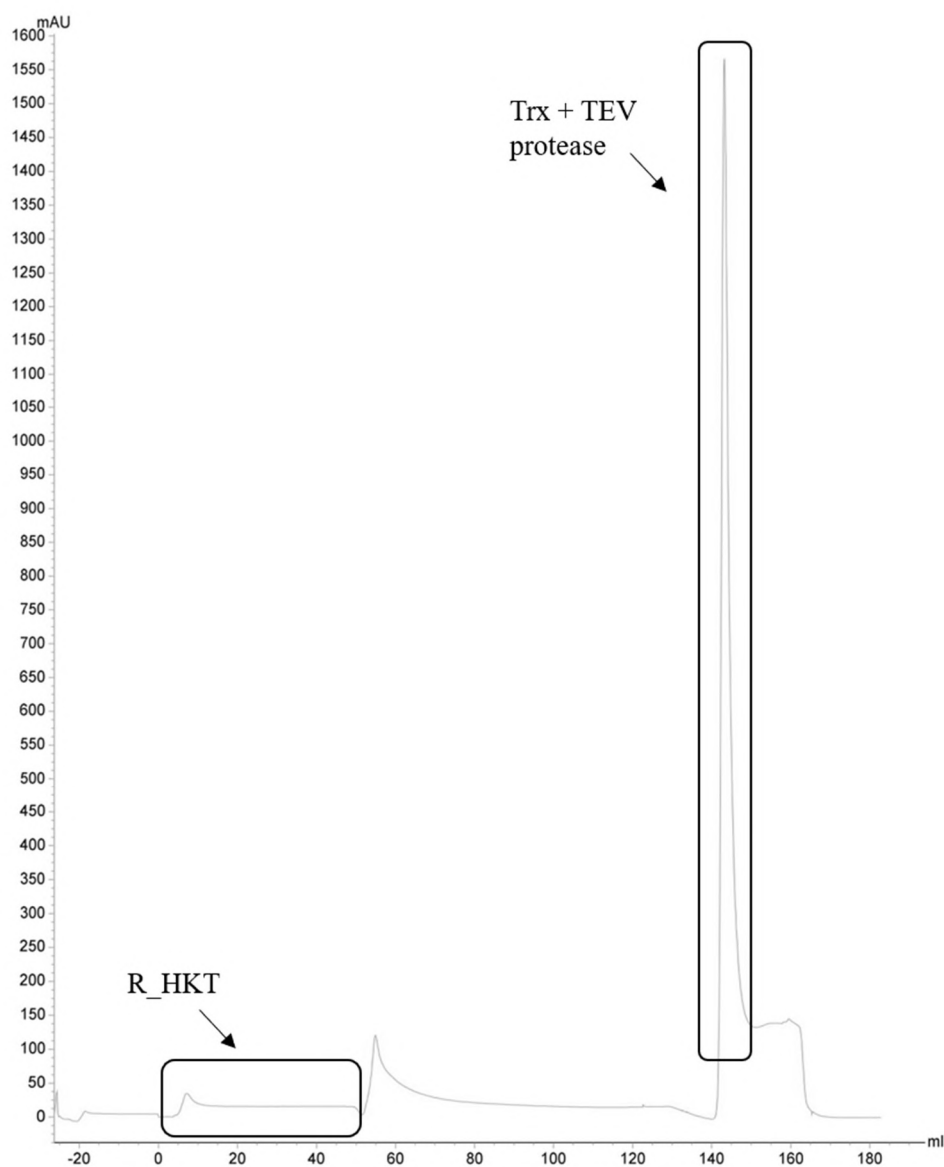
Fonte: A autora (2020).

Em seguida, foi feita uma troca de tampão para retirada do imidazol, glicerol e detergente adicionados nas etapas anteriores pois essas substâncias podem diminuir a atividade da TEV Protease usada para remoção da Trx. O sucesso da clivagem foi analisado por SDS-PAGE 10% e então seguimos para a retirada da Trx livre e a TEV Protease da solução da R_HKT.

Nesta etapa, somente a Trx e a TEV Protease deveriam interagir com a coluna *HisTrap*, pois a cauda de 6xHis foi clivada da R_HKT pela TEV Protease. Um pico largo de absorbância constante foi observado na injeção da amostra e outros picos mais altos na eluição, que são

relativos à TEV Protease e Trx (Figura 16). Aqui, o fluxo na etapa de injeção e lavagem foi diminuído para 2,5 mL/min no intuito de aumentar a resolução entre os picos e consequentemente, melhorar a separação entre as diversas proteínas do meio.

Figura 16 - Cromatograma da segunda cromatografia por afinidade na purificação da R_HKT. O pico relativo à proteína de interesse está destacado. O fluxo da fase móvel é de 5 mL/min.

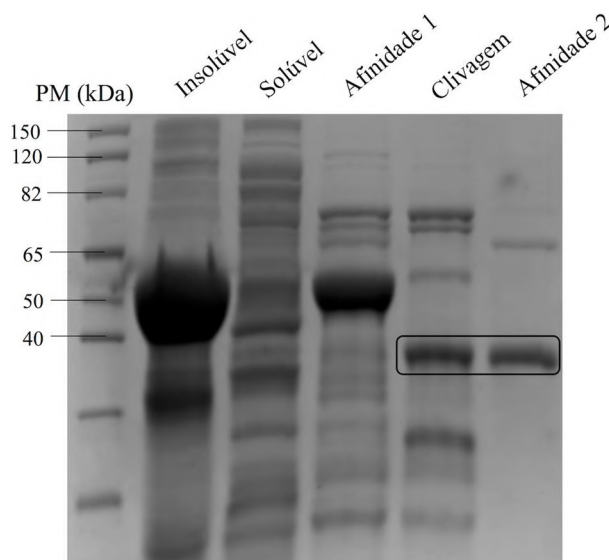


Fonte: A autora (2020).

Portanto, o SDS-PAGE final contendo todas as etapas da purificação mostrou que a proteína apresentou grau de pureza suficiente para realizar os primeiros testes de cristalização (Figura 17). O rendimento final de expressão da R_HKT após a purificação completa foi de 5 mg por litro de cultura. Esse valor é alto considerando outros sistemas de expressão como as células de inseto Sf9, mas existem relatos na literatura de proteínas que possuem rendimento

acima de 100 mg por litro de cultura (LIN, Meng I.; NAGATA; KATAHIRA, 2018; TOCAJ *et al.*, 1995). A RL_HKT será mais um desses exemplos, como será discutido no próximo tópico.

Figura 17 - SDS-PAGE 10% de alíquotas das etapas de purificação da R_HKT. As bandas relativas à proteína de interesse estão destacadas.



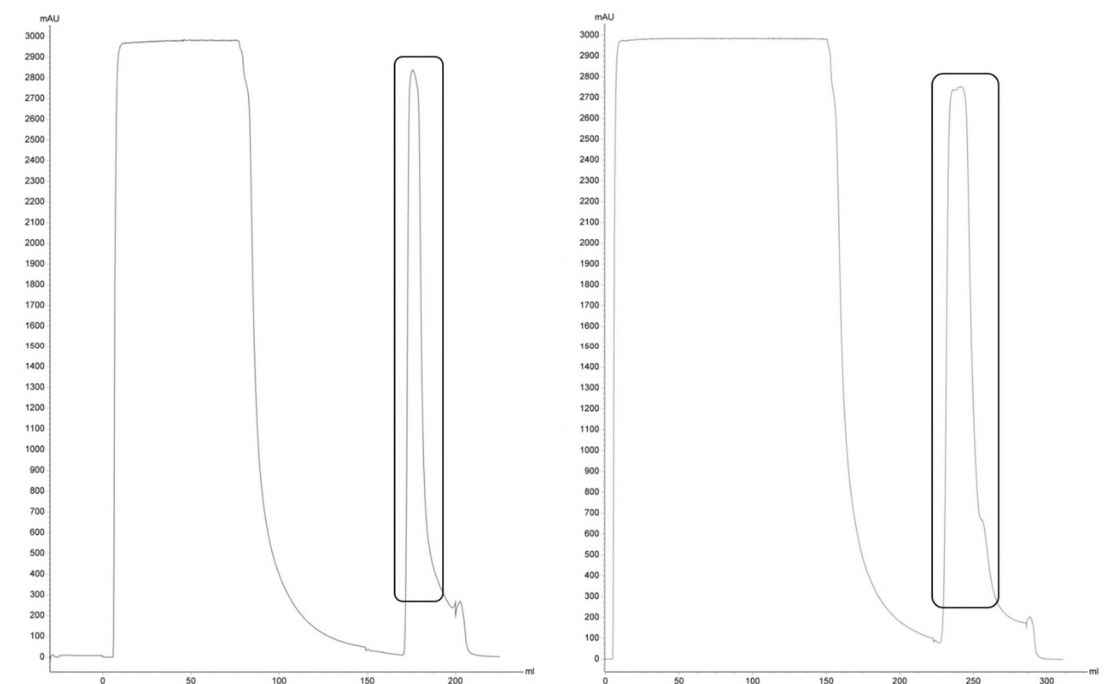
Fonte: A autora (2020).

4.6.2 Purificação da RL_HKT-Trx

Os protocolos de purificação da HKT foram previamente desenvolvidos e são descritos na seção 4.6.1 para a R_HKT. Nenhuma diferença a nível de perfil de purificação foi observada, exceto pelo rendimento da expressão e consequente rendimento de proteína após o término da purificação (Figuras 18 e 19).

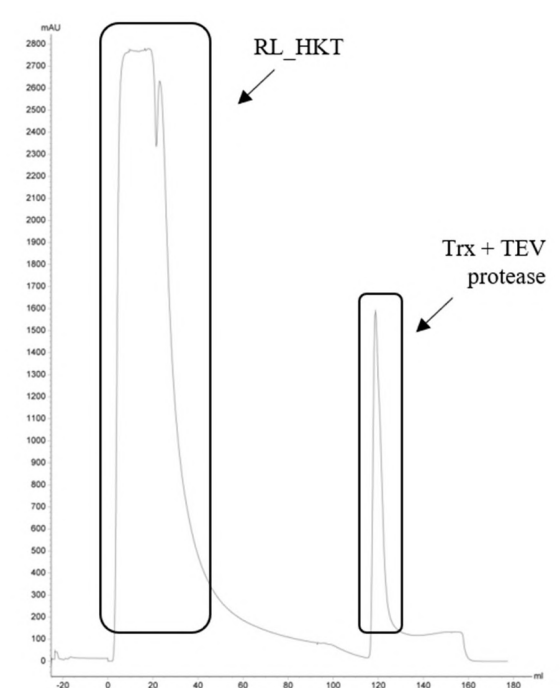
A HKT de ambas linhagens tem a coloração amarela em altas concentrações, o que facilitou a percepção visual no processo de purificação das variantes. Foi possível acompanhar a localização da proteína na coluna em todas as etapas, inclusive nas cromatografias por afinidade (apesar da coluna ter coloração azulada, em altas concentrações a mudança para o amarelo foi totalmente perceptível). Além disso, a quantidade de proteína observada no processo de purificação da RL_HKT nos atentou ainda mais a analisar as sequências e compará-las para entender essa discrepância na expressão.

Figura 18 - Cromatograma da primeira cromatografia por afinidade na purificação da RL_HKT-Trx. Essa etapa da purificação foi dividida em duas partes por receio de exceder a capacidade da coluna. Os picos relativos à proteína de interesse estão destacados. O fluxo da fase móvel é de 5 mL/min.



Fonte: A autora (2020).

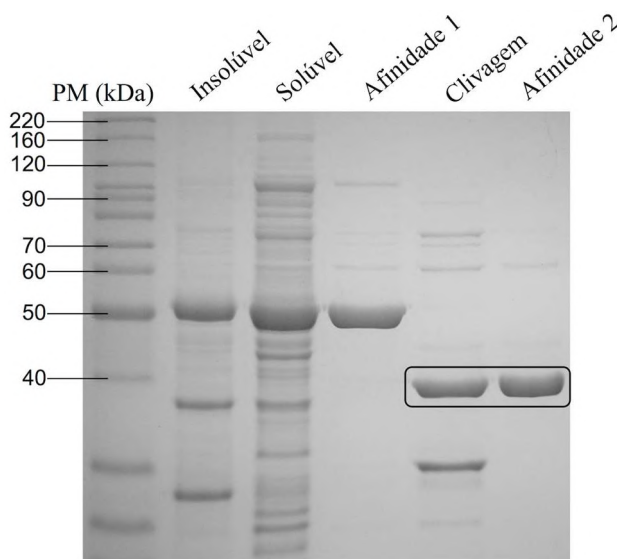
Figura 19 - Cromatograma da segunda cromatografia por afinidade na purificação da RL_HKT. O fluxo da fase móvel é de 5 mL/min.



Fonte: A autora (2020).

O protocolo de purificação também foi eficiente para a variante RL_HKT a nível pureza na análise eletroforética (Figura 20).

Figura 20 - SDS-PAGE 10% de alíquotas das etapas de purificação da RL_HKT. As bandas relativas à proteína de interesse estão destacadas.



Fonte: A autora (2020).

O rendimento final de expressão da RL_HKT foi de 150 mg por litro de cultura, valor 30 vezes maior que a R_HKT. Este rendimento é mais que suficiente para os ensaios propostos e reduz os custos de expressão e purificação, pois menores volumes de cultura bacteriana e tampões nas cromatografias serão necessários para obter a quantidade desejada de proteína.

4.7 TRIAGEM DE CONDIÇÕES DE CRISTALIZAÇÃO

4.7.1 R_HKT

Mais de 15 *kits* e condições com variações sistemáticas (*grid screens*) foram triados na tentativa de cristalizar a R_HKT (Tabela 15). A partir destas triagens, cristais de diversos formatos e tamanhos foram observados em mais de 20 diferentes condições de cristalização (Figura 22). Notou-se durante as primeiras coletas de dados no LNLS que cristais maiores e de vértices bem definidos geravam padrões de difração com resoluções mais altas e menor mosaicidade. Contudo, os programas de processamento de dados detectaram que os cristais que geraram esses conjuntos de dados estavam geminados (*twinned*). Isso significa que existe mais de um tipo ou orientação da célula unitária no monocristal e por isso, os dados poderiam ser processados incorretamente. O *pseudo-merohedral twinning* foi detectado em alguns conjuntos de dados, identificando sobreposição dos padrões de difração de diferentes orientações da célula unitária no cristal (Figura 21) (WLODAWER *et al.*, 2017). Assim, continuou-se a testar outras condições com o objetivo de contornar o *twin* e obter um conjunto de dados com maior resolução (acima de 2,7 Å).

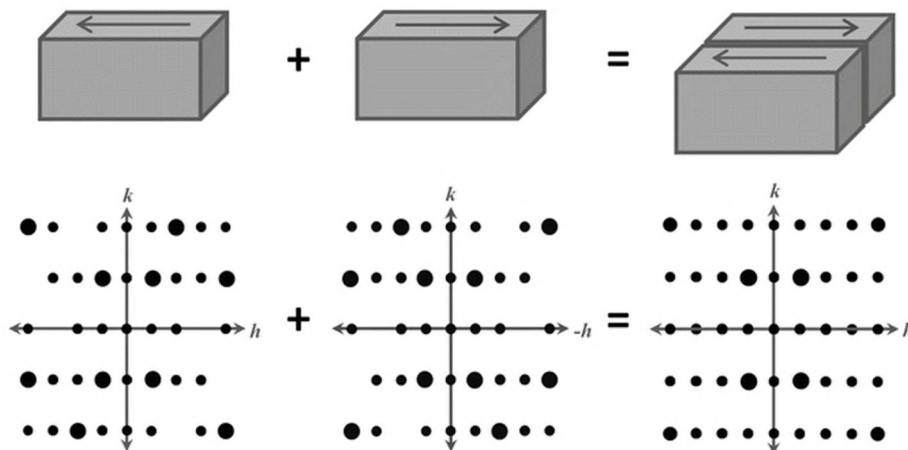
Tabela 15 - Triagem por kits (*coarse screens*) de condições de cristalização da R_HKT. As condições dos kits em que cristais difratáveis foram observados estão detalhadas com composição, temperatura de cristalização e ligante (quando houver).

Kits	Poços com cristal	Concentração de proteína (mg/mL)	Condição de cristalização
Classics	C4	5	0,1 M HEPES pH 7,5 2 M Formato de amônio
SaltRx	D3	5	0,1 M Tris pH 8,5 2,5 M NH ₄ NO ₃
	D12	10	0,1 M Tris pH 8,5 4 M NaNO ₃
JCSG 1	A7	10	0,2 M Citrato tripotássico 20% (m/v) PEG 3350
JCSG +	D10	5 e 10	0,1 M Cacodilato de sódio pH 6,5 0,2 M Acetato de cálcio hidratado 40% (v/v) PEG 300
PEGs II	A12	5 e 10	0,1 M Tris pH 8,5 0,2 M Citrato trissódico 30% (m/v) PEG 400
	H12	5 e 10	10% (m/v) PEG 8000 10% (m/v) PEG 1000
<i>Crystal Screen</i> I e II	D3	5 e 10	0,1 M HEPES-NaOH pH 7,5 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 2% (v/v) PEG 400
<i>Additive Screen HT</i>	(<i>vide</i> Apêndice 2)	5 e 10	(<i>vide</i> Apêndice 2)
Index	H2	10	0,2 M Tartarato de sódio e potássio tetra- hidratado 20% (m/v) PEG 3350
	H3	10	0,2 M Malonato de sódio pH 7 20% (m/v) PEG 3350
	H4	10	0,2 M Citrato de amônio tribásico pH 7 20% (m/v) PEG 3350 360 µM PLP

Em todas as triagens, as proteínas foram cristalizadas em placas com gota sentada de 96 poços. Quando não especificado, o crescimento dos cristais foi observado a 18 °C.

Fonte: A autora (2020).

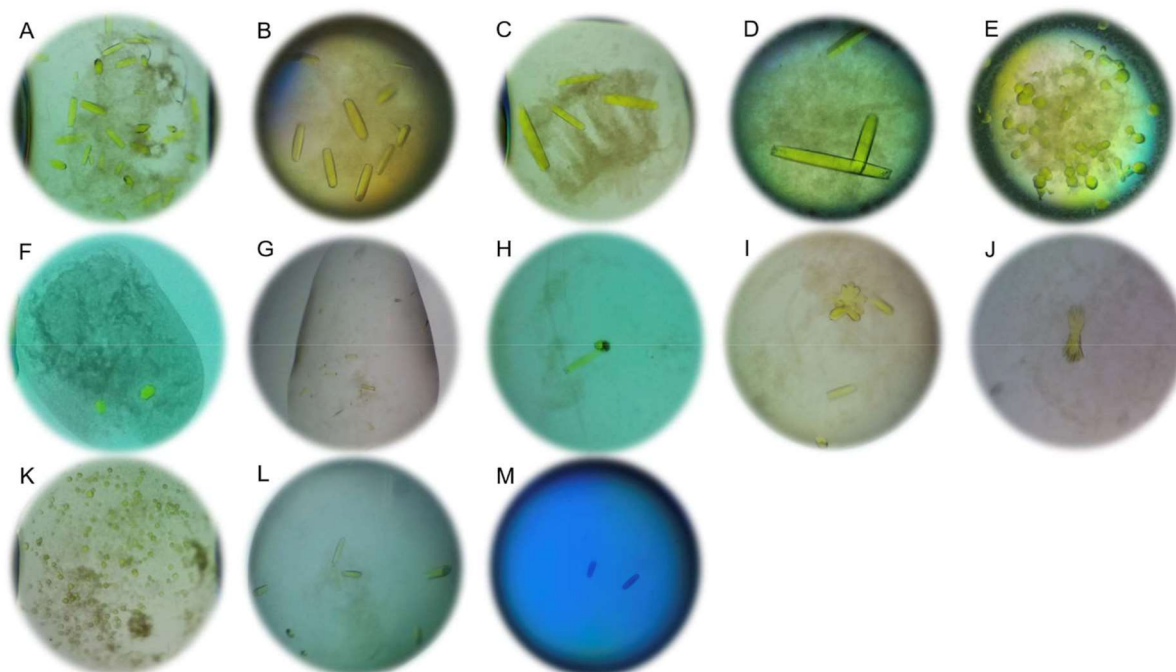
Figura 21 - Exemplo de *merohedrical twinning* em duas dimensões. A sobreposição de diferentes orientações da célula unitária no cristal pode ser detectada por testes de *twinning* como realizado pelo programa *Xtriage*. Estas diferentes orientações estão relacionadas por operadores de simetria chamados de lei do *twin* e dependem do grupo pontual do cristal.



Fonte: Adaptado de WLODAWER et al., 2017.

Os primeiros cristais observados da R_HKT cresceram a partir da triagem por *kits* (*coarse screens*). A partir daí, foram avaliadas as possíveis condições de cristalização a ser otimizadas para obter cristais com maior poder de difração. Cristais muito pequenos como esferulitas (Figura 22K) e bastões (Figura 22G) ou geminados (Figuras 22I e 22J) mesmo após otimizações foram desconsiderados. Já cristais maiores e em maior quantidade (Figura 22A) foram escolhidos como promissores para as otimizações da condição de cristalização.

Figura 22 - Cristais da R_HKT e suas respectivas condições de cristalização. As imagens foram obtidas a partir de microscópio com aumento de 7,5X.



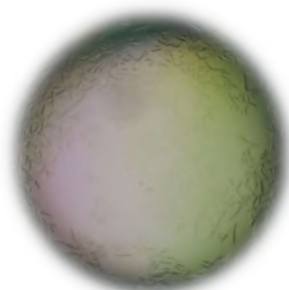
- A: SD; 0,1 M HEPES-NaOH pH 7,5; 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2% (v/v) PEG 400; 18 °C
 B: HD; 0,1 M HEPES-NaOH pH 7,5; 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2% (v/v) PEG 400; 18 °C
 C: SD; 0,3 M HEPES-NaOH pH 7,5; 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2% (v/v) PEG 400; 18 °C
 D: HD; 0,1 M HEPES-NaOH pH 7,5; 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2% (v/v) PEG 400; 4 °C
 E: HD; 0,35 M HEPES-NaOH pH 7,5; 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5% (v/v) PEG 400; 18 °C
 F: SD; 0,1 M HEPES-NaOH pH 7,5; 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2% (v/v) PEG 400; 360 μM PLP; 18 °C
 G: SD; 0,1 M HEPES-NaOH pH 7,5; 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2% (v/v) PEG 400; 0,3% (m/v) cloridrato de 1,5-diaminopentano; 18 °C
 H: SD; 0,2 M Citrato de tripotássio; 20% (m/v) PEG 3350; 18 °C
 I: SD; 0,1 M HEPES-NaOH pH 7,5; 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2% (v/v) PEG 400; 2,5 mM *p*-toluenosulfonato de sódio; 18 °C
 J: SD; 0,1 M HEPES-NaOH pH 7,5; 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2% (v/v) PEG 400; 30 mM NDSB - 195; 18 °C
 K: SD; 0,2 M Tartarato de sódio e potássio tetrahidratado; 20% (m/v) PEG 3350; 18 °C
 L: SD; 0,1 M HEPES-NaOH pH 7,5; 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2% (v/v) PEG 400; 2,5 mM L-Arginina; 18 °C
 M: SD; 0,2 M Citrato de tripotássio; 20% (m/v) PEG 3350; 1:10 azul de metileno
 SD: placas com gota sentada HD: placas com gota suspensa

Fonte: A autora (2020).

Fatores como o tipo de placa de cristalização, temperatura de incubação e concentração dos reagentes que compõem a condição de cristalização foram variados pois estes influenciam diretamente no tempo de crescimento e tamanho do cristal. Na condição inicial, cristais foram observados após 72 horas de incubação a 18 °C em placas com gota sentada. Contudo, quando a mesma condição de cristalização foi reproduzida em placas com gota suspensa, a nucleação foi observada após 2 horas de incubação e cristais formados após 24 horas de incubação a 18 °C (Figura 23). Apesar do rápido crescimento do cristal ser favorável à formação do *twin*, foi observado em placas de gota suspensa o crescimento de cristais maiores (Figura 22B) e com resoluções mais altas no padrão de difração do que a mesma condição em placas de gota sentada (Figura 22A). A temperatura de incubação das placas também favoreceu o crescimento de

cristais maiores (Figura 22D) e com até 24 horas a mais de incubação para observar a formação de cristais.

Figura 23 - Cristais da R_HKT em formação. A imagem foi obtida a partir de microscópio com aumento de 7,5X.



Fonte: A autora (2020).

Por fim, também foram variadas as concentrações dos três componentes da condição: HEPES-NaOH (tampão), sulfato de amônio e PEG 400 (precipitantes), além do pH do tampão. Contudo, não foram observados cristais em pH diferente de 7,5 e em concentrações menores de sulfato de amônio (até 1,8 M). Uma das formas de retardar o crescimento dos cristais é diminuindo a concentração do sulfato de amônio. Contudo, a alta concentração deste sal é um requisito para a formação dos cristais da HKT. Foram observados cristais maiores e em menor quantidade em até 0,3 M de HEPES-NaOH pH 7,5 (Figura 22C). Porém, quando ultrapassada essa concentração e diminuída a concentração de PEG 400, os cristais mudavam do formato de bastões para “vassouras” (Figura 22E), perdendo a qualidade de um monocristal. Vários cristais também foram observados na tentativa de cristalizar a R_HKT com aditivos (Figuras 22G, 22I, 22J e 22L), mas o tamanho e a geminação dos cristais impediram a continuidade dessa estratégia.

Outra condição de cristalização que a princípio seria promissora, é a que contém citrato tripotássico e PEG 3350 (Figura 22H) por ser a mesma condição de cristalização da HKT de *Anopheles gambiae*. Durante as primeiras triagens, o citrato tripotássico não estava disponível no laboratório e então foi feito o teste com o corante Izit de cristal (Hampton Research®), adicionando 1 µL da solução que contém azul de metileno ao poço contendo o cristal com o auxílio de uma lupa para visualização. O método é usado para diferenciar cristais inorgânicos de cristais de macromoléculas. Este último possui canais em que pequenas moléculas podem penetrar e por causa da coloração característica do azul de metileno, o cristal de proteína também mudará de cor após a incubação com o corante. Assim, o cristal mudou de amarelo para azul (Figura 22M), sendo esse um forte indício de que é um cristal da R_HKT. Os ensaios

de cristalização foram realizados nesta condição de cristalização em placas de gota suspensa com variação fina dos componentes da condição original e incubação das placas a 4°C e 18 °C. Todavia, não houve formação de cristal da HKT em nenhuma das condições. Ao final, 1.536 condições de cristalização foram testadas para a variante R_HKT.

4.7.2 RL_HKT

Para a RL_HKT, todos os *kits* JBScreen Classic e PACT++ foram triados além das otimizações por variações sistemáticas (*grid screens*), totalizando mais de 1.250 condições de cristalização (Tabela 16).

Tabela 16 - Triagem por kits (*coarse screens*) de condições de cristalização da RL_HKT. As condições em que cristais difratáveis foram observados estão detalhadas com composição, temperatura de cristalização e ligante (quando houver).

Kits	Poços com cristal	Concentração de proteína	Condição de cristalização
JBScreen Classic 1-4	A12	5 e 10	0,1 M Tris pH 8,5 0,2 M Citrato trissódico 30% (m/v) PEG 400 360 µM PLP
	B11	10	0,1 M HEPES pH 7,5 0,2 M Acetato de sódio 20% (m/v) PEG 3000 Incubação a 4 °C
	C7	10	0,1 M Tris pH 8,5 0,2 M Sulfato de lítio 16% (m/v) PEG 4000 360 µM PLP
	C8	10	0,1 M Tris pH 8,5 0,2 M Acetato de sódio 16% (m/v) PEG 4000 360 µM PLP
	C11	5	0,1 M Tris pH 8,5 0,2 M Sulfato de lítio 20% (m/v) PEG 4000
	C11	10	0,1 M Tris pH 8,5 0,2 M Sulfato de lítio 20% (m/v) PEG 4000 360 µM PLP
	D1	5	0,1 M HEPES-NaOH pH 7,5 0,1 M Sulfato de sódio 22% (m/v) PEG 4000 Incubação a 4 °C
	D11	10	0,1 M Tris pH 8,5 0,2 M Cloreto de magnésio 30% (m/v) PEG 4000 360 µM PLP

Continuação da Tabela 16

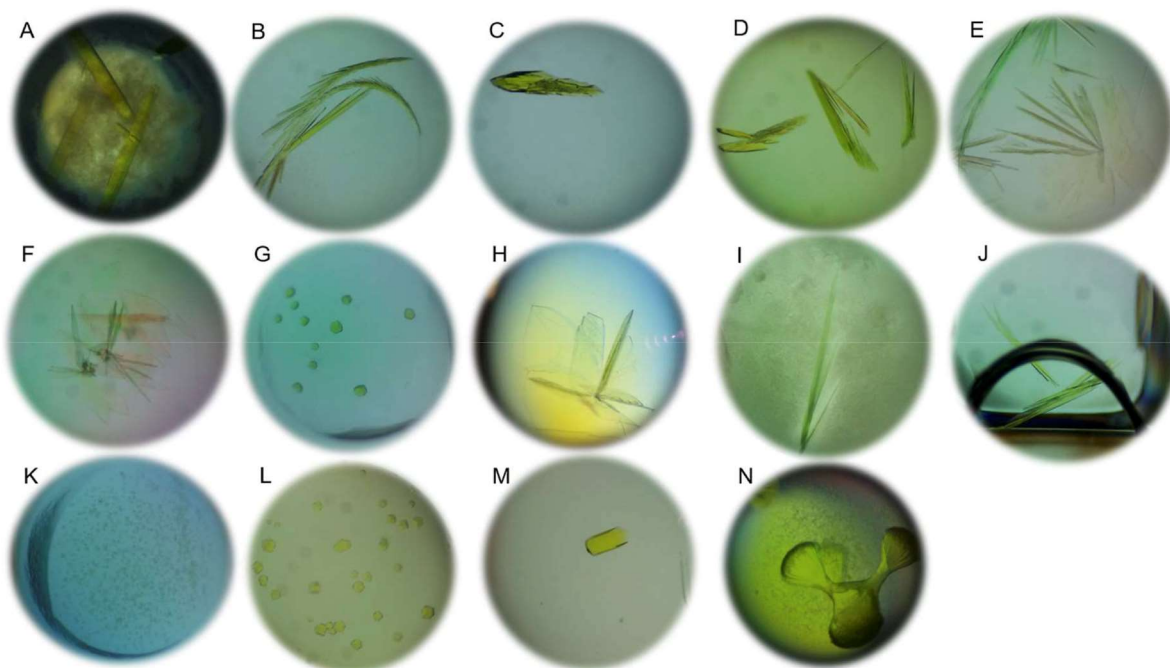
Kits	Poços com cristal	Concentração de proteína (mg/mL)	Condição de cristalização
JBScreen Classic 1-4	E8	10	0,1 M Citrato trissódico pH 5,6 0,2 M Sulfato de amônio 15% (m/v) PEG 4000 360 µM PLP
	F7	10	0,1 M HEPES-NaOH pH 7,5 0,2 M Sulfato de lítio 0,1 M Acetato de sódio 25% (m/v) PEG 4000
	G8	10	16% (m/v) PEG 6000 0,01 M Citrato trissódico 360 µM PLP
	H11	10	0,1 M HEPES-NaOH pH 7,5 10% (m/v) Etilenoglicol 10% (m/v) PEG 8000 Incubação a 4 °C
JBScreen Classic 5-8	A6	10	0,1 M Citrato trissódico 0,05 M Sulfato de amônio 15% (m/v) PEG 8000 360 µM PLP
	B5	10	14% (m/v) PEG 10000 0,1 M Imidazol pH 8
	D3	10	0,1 M MES pH 6,5 2 M Sulfato de amônio 5% (m/v) PEG 400 Incubação a 4 °C
	D3	10	2 M Sulfato de amônio 5% (m/v) PEG 400 0,1 M MES pH 6,5 360 µM PLP
	D5	10	2,2 M Sulfato de amônio
	D5	5	2,2 M Sulfato de amônio Incubação a 4 °C
	E11	10	30% (m/v) 2-Metil-2,4-pentanodiol 0,1 M Acetato de sódio pH 4,6 0,02 M Cloreto de cálcio
PACT ++ (Proteólise <i>in situ</i>)	E3	10	20% (m/v) PEG 3350 0,2 M Iodeto de sódio 0,5 µg/mL Tripsina-EDTA
	E3	10	20% (m/v) PEG 3350 0,2 M Iodeto de sódio 5 µg/mL Tripsina-EDTA Incubação a 4 °C
	E4	10	20% (m/v) PEG 3350 0,2 M Tiocianato de potássio 5 µg/mL Tripsina-EDTA
	E4	10	20% (m/v) PEG 3350 0,2 M Tiocianato de potássio 0,5 µg/mL Tripsina-EDTA Incubação a 4 °C

Em todas as triagens, a proteína foi cristalizada em placas de gota sentada de 96 poços. Quando não especificado, o crescimento dos cristais foi observado a 18 °C.

Fonte: A autora (2020).

Os primeiros cristais obtidos em placas de gota suspensa foram na mesma condição de cristalização dos cristais da R_HKT (0,1 M HEPES-NaOH pH 7,5, 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 2% PEG 400). As mesmas otimizações de temperatura e concentração também foram realizadas na tentativa de contornar os cristais geminados (*twin*). Porém, as triagens com os *kits* da JBScreen geraram mais cristais de diferentes formatos e tamanhos como cubos e agulhas (Figura 24).

Figura 24 - Cristais da RL_HKT e suas respectivas condições de cristalização. As imagens foram obtidas a partir de microscópio com aumento de 7,5X.



- A: HD; 0,1 M HEPES-NaOH pH 7,5; 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5% (v/v) PEG 400; 4 °C
 B: SD; 20% PEG 3350; 0,2 M NaI; 0,5 µg/mL Tripsina-EDTA; 4 °C
 C: SD; 0,1 M MES pH 6,5; 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 5% (v/v) PEG 400; 18 °C
 D: SD; 20% (m/v) PEG 3350; 0,2 M KSCN; 0,5 µg/mL Tripsina-EDTA; 18 °C
 E: SD; 20% (m/v) PEG 3350; 0,2 M NaI; 5 µg/mL Tripsina-EDTA; 4 °C
 F: SD; 20% (m/v) PEG 3350; 0,2 M KSCN; 0,5 µg/mL Tripsina-EDTA; 4 °C
 G: SD; 0,1 M HEPES-NaOH pH 8,5; 0,2 M Sulfato de lítio; 0,1 M Acetato de sódio; 20% (m/v) PEG 4000; 18 °C
 H: HD; 0,1 M HEPES-NaOH pH 7,5; 10% (v/v) Etilenoglicol; 10% (m/v) PEG 8000; 4 °C
 I: SD; 0,1 M HEPES-NaOH pH 7,5; 0,2 M Acetato de sódio; 20% (m/v) PEG 3000; 4 °C
 J: SD; 20% PEG 3350; 0,2 M NaI; 0,5 µg/mL Tripsina-EDTA; 18 °C
 K: SD; 0,1 M Tris-HCl pH 8,5; 0,2 M Sulfato de lítio; 20% (m/v) PEG 4000; 360 µM PLP; 18 °C
 L: SD; 0,1 M BIS-TRIS propano pH 8,5; 0,2 M Citrato de trisódio; 20% (m/v) PEG 3350; 18 °C
 M: SD; 0,1 M MES pH 6,5; 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 5% (v/v) PEG 400; 4 °C
 N: HD; 0,25 M HEPES-NaOH pH 7,5; 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5% (v/v) PEG 400; 18 °C
 SD: placas com gota sentada HD: placas com gota suspensa

Fonte: A autora (2020).

Foi observado que por mais que a RL_HKT cristalizasse na mesma condição que a R_HKT, houve maior formação de precipitados em torno dos cristais para a primeira linhagem (Figura 24A). Além disso, também foram formados os cristais de formato “vassoura”, mas em maiores dimensões e menor quantidade (Figura 24N). Estes cristais foram testados durante os

experimentos de difração de raios X e como esperado, não geraram um padrão de difração de qualidade.

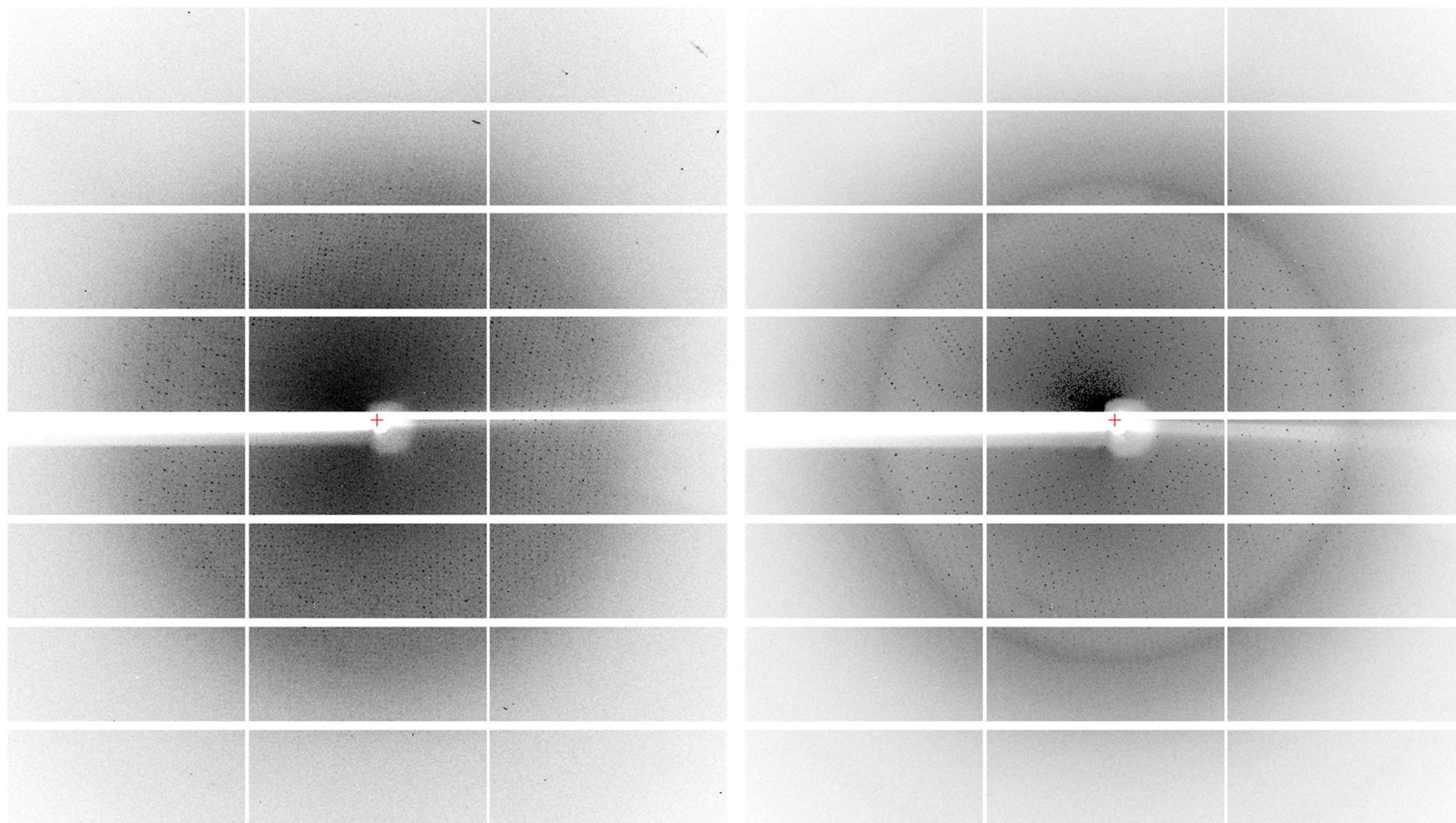
Os cristais da RL_HKT também apresentaram novos formatos como cubos de diferentes tamanhos (Figuras 24G, 24K e 24L), agulhas geminadas em experimentos de proteólise *in situ* (Figuras 24B, 24D e 24J) e na ausência de protease (Figura 24I), placas contendo diferentes concentrações de Tripsina (Figuras 24E e 24F) e também na ausência de Tripsina (Figura 24H). Das 14 condições de cristalização acima citadas, cinco continham tampão HEPES-NaOH. Além disso, a dependência da cristalização em condições tamponadas foi observada pois nos experimentos de proteólise *in situ* a RL_HKT cristalizou em solução contendo apenas sal e precipitante. A condição de cristalização D3 do kit JBScreen Classic 5-8 foi a mais promissora para resolução do problema dos cristais geminados (*twin*), pois foi observado um monocristal de faces bem definidas e gota sem precipitados (Figura 24M). Porém, o cristal que gerou o melhor padrão de difração (alta resolução com baixa mosaicidade) foi o da condição que contém 0,1 M HEPES-NaOH pH 7,5, 10% (m/v) PEG 8000 e 10% (v/v) etilenoglicol (Figura 24H). Essa condição também foi reproduzida em placas de gota suspensa e os cristais obtidos foram difratados e seus conjuntos de dados coletados.

4.8 COLETA DE DADOS DOS CRISTAIS

4.8.1 R_HKT

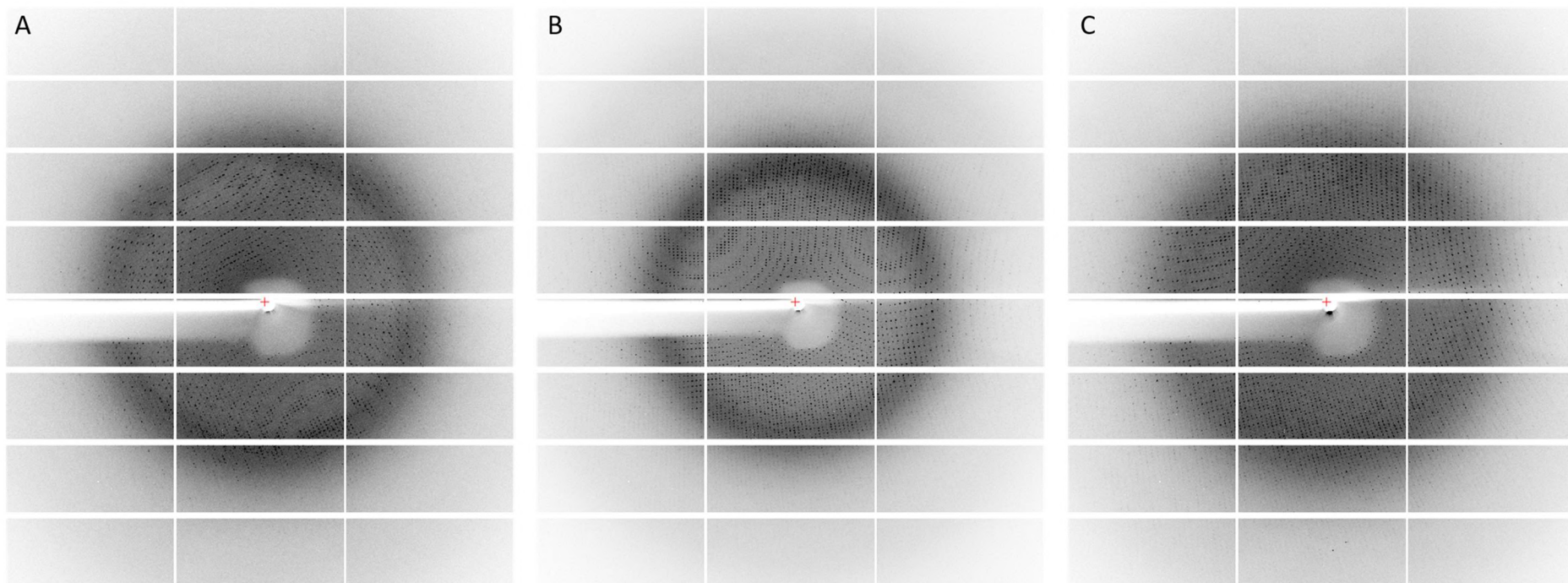
Ao todo, 12 conjuntos de dados foram coletados de cristais da R_HKT (todos provenientes das otimizações feitas a partir da condição D3 do kit Crystal Screen 1 e 2). Os critérios usados para a escolha da coleta dos dados foram a nitidez e separação das reflexões no padrão de difração (alta mosaicidade ou pontos “arrastados” normalmente são característicos de cristais de baixa qualidade) e a presença de reflexões em resoluções maiores que 3 Å. No primeiro momento, dois conjuntos de dados foram coletados: a partir de cristais crescidos em placas de gota suspensa a 18 °C, um deles sem solução crioprotetora e o outro com solução crioprotetora de 20% de etilenoglicol (Figura 25). Em geral, as imagens de difração foram coletadas a cada 0,5°, cobrindo ao menos 180° do cristal. Apesar do padrão de difração apresentar reflexões bem definidas, visualmente só foram identificadas reflexões em até 3 Å de resolução máxima e nenhuma condição de cristalização anteriormente testada apresentou aumento na resolução máxima. Por isso, foram feitas novas otimizações com a variação de concentrações de tampão HEPES-NaOH pH 7,5 e PEG 400 (Figura 26).

Figura 25 - Padrão de difração de cristais da R_HKT na ausência (esquerda) e presença (direita) de solução crioprotetora.



Fonte: A autora (2020).

Figura 26 - Padrão de difração de cristais da R_HKT formados em 50 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 2% PEG 400 (A), 300 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 2% PEG 400 (B) e 100 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2% PEG 400 e 20 mM NDSB – 221 (C).

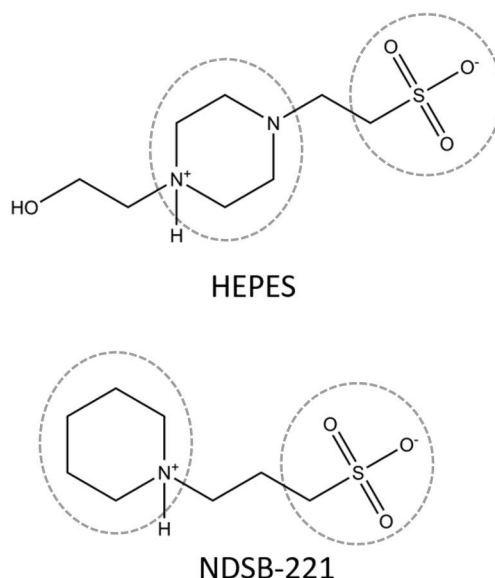


Fonte: A autora (2020).

No segundo experimento, foram coletados mais três conjuntos de dados da R_HKT: dois provenientes da variação da concentração de tampão HEPES-NaOH e o terceiro a partir da triagem com o *kit Additive Screen* contendo NDSB-221 (Figura 27). Estes novos cristais geraram padrões de difração com reflexões mais intensas e presença de reflexões em resoluções mais altas (2,5 Å para os conjuntos sem o aditivo e 2,3 Å no conjunto contendo o aditivo).

O NDSB-211 é uma sulfobetaina não-detergente conhecida por estabilizar proteínas, reduzindo a agregação (VUILLARD; BRAUN-BRETONT; RABILLOUDET, 1995) e auxiliando na cristalização dessas proteínas (VUILLARD *et al.*, 1996). A estrutura química do NDSB-221 é similar ao HEPES, em que ambos têm estrutura zwitteriônica, contêm anéis nitrogenados e um grupamento sulfonato em uma das extremidades (Figura 27).

Figura 27 - Similaridade química entre as moléculas HEPES e NDSB-221.



Fonte: Extraído de GOOD *et al.*, 1980; VUILLARD *et al.*, 1996.

Compostos zwitteriônicos são conhecidos na literatura por funcionarem como estabilizantes na purificação de proteínas (GONENNE; ERNST, 1978; LIN, Weifeng *et al.*, 2013), transportadores em *drug delivery* transdérmico (MAZZENGA; BERNER, 1991) e até medicamentos anti-HIV (PANG; TOM; ZHENG, 2009; WILD *et al.*, 1994) e para diabetes (MOHAN; PINTO, 2007). Uma das formas de determinar o modo de interação do HEPES e NDSB-221 com a HKT é na determinação da estrutura cristalográfica e observação da provável presença dessas moléculas no cristal. Assim, será possível determinar se a interação é superficial à proteína ou está relacionada ao sítio ativo.

No terceiro experimento de difração de raios X, foram coletados sete conjuntos de dados de cristais da R_HKT. As otimizações nessa etapa incluem a incubação a 4 °C, gotas com 4 µL de proteína (para obtenção de cristais maiores) e cocristalização com PLP (incluindo a variação da concentração de tampão HEPES-NaOH e PEG 400) (Tabela 17).

Tabela 17 - Cristais que geraram os conjuntos de dados coletados no terceiro experimento de difração de raios X e suas respectivas resoluções.

Característica dos cristais	Condição de cristalização	Resolução máxima (Å)*
Cocristal com PLP	0,1 M HEPES-NaOH pH 7.5, 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,5% PEG 400 e 360 µM PLP	2,4
	0,2 M HEPES-NaOH pH 7.5, 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1% PEG 400 e 360 µM PLP	2,5
Gotas de 4 µL	0,1 M HEPES-NaOH pH 7.5, 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ e 0,5% PEG 400	2,1
	0,2 M HEPES-NaOH pH 7.5, 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ e 1% PEG 400	2,8
Incubação a 4 °C	0,1 M HEPES-NaOH pH 7.5, 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ e 0,5% PEG 400	2,0
	0,15 M HEPES-NaOH pH 7.5, 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ e 1% PEG 400	1,9
Incubação a 18 °C	0,1 M HEPES-NaOH pH 7.5, 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ e 0,5% PEG 400	2,1

*Identificação visual das reflexões no programa ADXV(ADXV, 2013).

Fonte: A autora (2020).

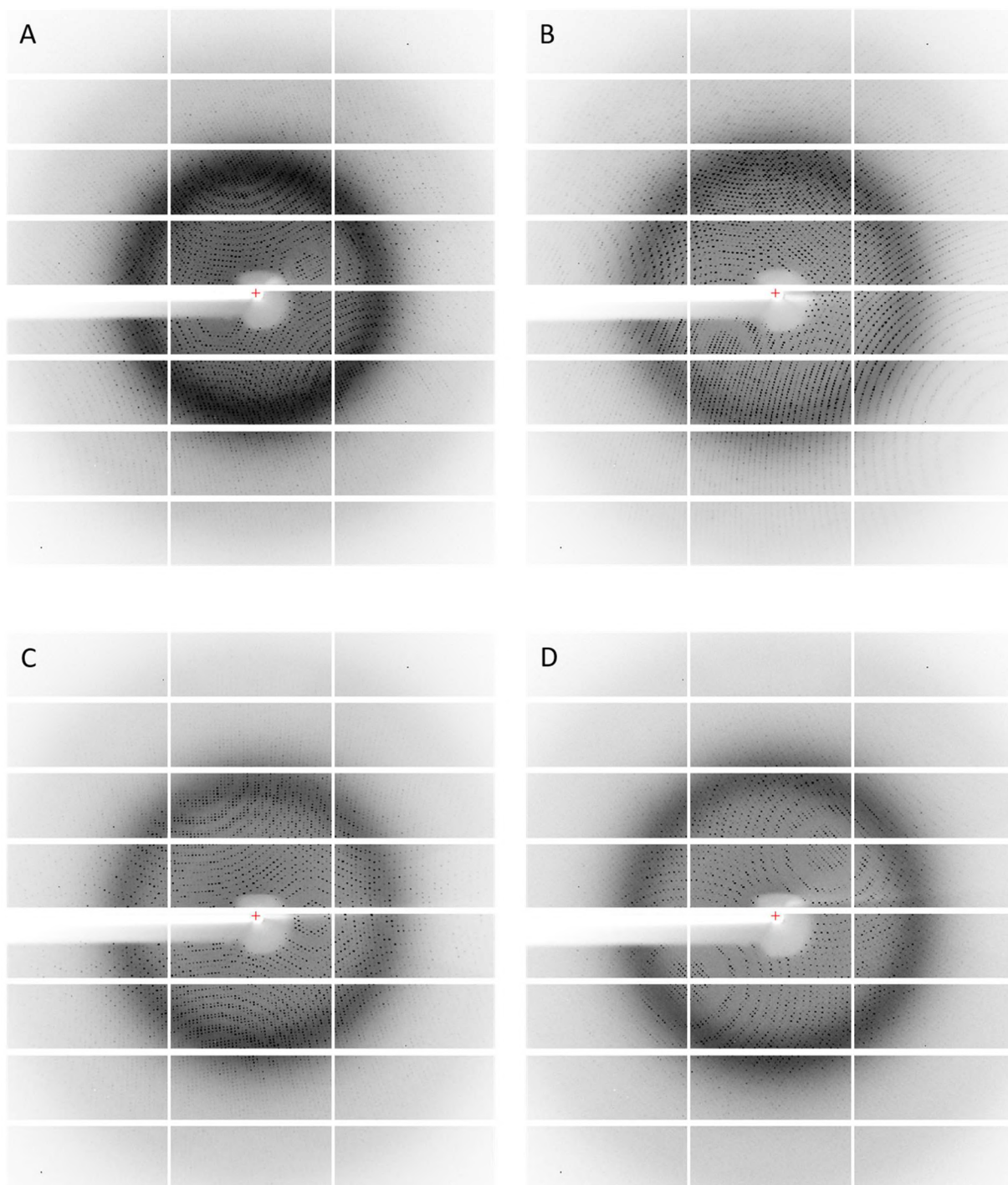
Na cocristalização com o PLP, não houve diferença entre as resoluções com a variação da concentração de PEG 400 e HEPES-NaOH. Já para os cristais maiores, a diminuição das concentrações desses componentes foi crucial para o aumento da resolução do padrão de difração. Em relação à temperatura, a incubação a 4 °C foi o fator mais importante para o aumento da resolução máxima, gerando conjuntos de dados com resoluções menores que 2,0 Å (Figuras 28 e 29). Apesar de todos esses esforços, o problema do cristal geminado (*twin*) não foi contornado.

4.8.2 RL_HKT

Os experimentos de difração de raios X com os cristais da RL_HKT resultou na coleta de quatro conjuntos de dados: dois provenientes de otimizações da condição D3 do *kit Crystal*

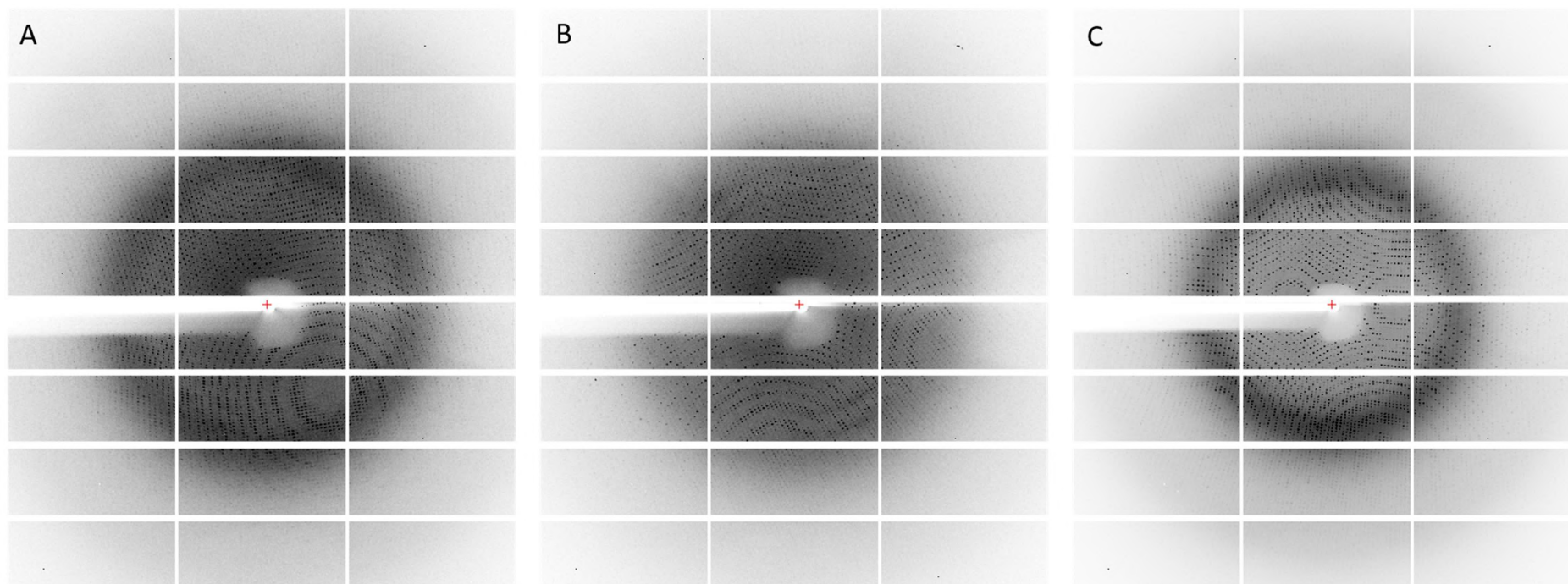
Screen 1 e 2 e dois resultantes da triagem com os *kits* da JBScreen (condição H11 do *kit* JBScreen Classic 1 – 4).

Figura 28 - Padrões de difração de cristais da R_HKT formados em 0,1 M HEPES-NaOH pH 7.5, 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 0,5% PEG 400 (A), 0,15 M HEPES-NaOH pH 7.5, 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 1% PEG 400 (B), 0,1 M HEPES-NaOH pH 7.5, 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 0,5% PEG 400 (C) e 0,2 M HEPES-NaOH pH 7.5, 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 1% PEG 400 (D).



Fonte: A autora (2020).

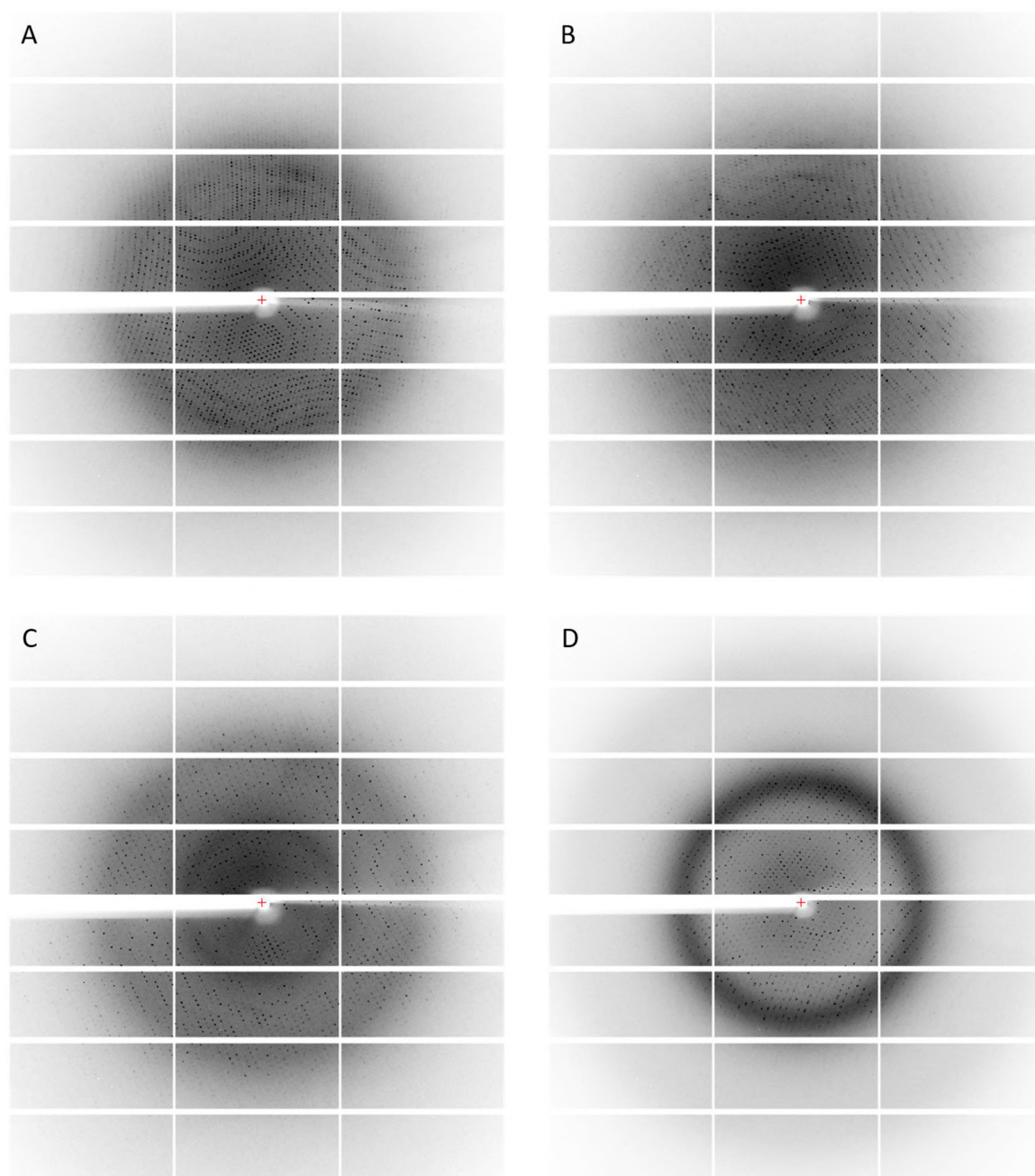
Figura 29 - Padrões de difração de cristais da R_HKT formados em 0,1 M HEPES-NaOH pH 7.5, 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5% PEG 400 e 360 μM PLP (A), 0,2 M HEPES-NaOH pH 7.5, 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1% PEG 400 e 360 μM PLP (B) e 0,1 M HEPES-NaOH pH 7.5, 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 0,5% PEG 400 (C).



Fonte: A autora (2020).

A questão da formação do *twin* mostrou-se independente da variante da HKT, pois também foi observada nos cristais da RL_HKT. Apesar disso, foi possível coletar dois conjuntos de dados a partir da otimização da condição H11 do kit JBScreen Classic 1 – 4 em placa de gota suspensa (Figura 30).

Figura 30 - Padrões de difração de cristais da RL_HKT formados em 0,4 M HEPES-NaOH pH 7,5, 1,9 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 2% PEG 400(A), 0,15 M HEPES-NaOH pH 7,5, 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1% PEG 400 e 360 μM PLP (B) e 0,1 M HEPES-NaOH pH 7,5, 10% Etilenoglicol e 10% PEG 8000 (C e D).



Fonte: A autora (2020).

Não houve aumento nas resoluções dos conjuntos de dados obtidos da nova condição de cristalização, mas diferenças no padrão de difração são visíveis, sendo esta uma evidência da mudança do grupo espacial. Além disso, o objetivo de contornar os dados *twinning* foi alcançado para a RL_HKT. A R_HKT não formou cristais nessa condição de cristalização.

4.9 PROCESSAMENTO E REFINAMENTO DOS DADOS CRISTALOGRÁFICOS

Devido ao êxito em obter conjuntos de dados sem *twinning* para a variante RL_HKT, esta foi a primeira estrutura a ser resolvida com sucesso. Por este motivo, esta proteína será primeiramente discutida nesta seção, seguida da variante R_HKT.

4.9.1 RL_HKT

Após o processamento do conjunto de dados pelos programas XDS e *Aimless*, o arquivo das reflexões foram submetidos à análise da qualidade dos dados e determinação da lei do *twin* pelo programa *Xtriage* (Tabela 18). Também foram avaliados pelo *Xtriage* os dados estatísticos de saída do *Aimless* (como a sugestão do corte de resolução de acordo com o $I/\sigma(I)$) e os valores estatísticos importantes para a caracterização do conjunto de dados como a completeza e a multiplicidade, que serão apresentados mais à frente.

Tabela 18 - Dados obtidos após o processamento e avaliação do *Xtriage* para os conjuntos de dados da RL_HKT.

ID	Condição de cristalização	Resolução máxima (Å)*	Grupo espacial**	Alertas <i>Xtriage</i>	Lei do <i>twin</i>
1	0,1 M HEPES-NaOH pH 7,5 10% Etilenoglicol 10% PEG 8000 ⁽¹⁾	2,44	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	-	-
2	0,1 M HEPES-NaOH pH 7,5 10% Etilenoglicol 10% PEG 8000 ⁽¹⁾	2,25	P 22 ₁ 2	-	-
3	0,15 M HEPES-NaOH pH 7,5 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 1% PEG 400 360 µM PLP	2,04	P 6 ₃ 22	Não há lei de <i>twin</i> para o grupo espacial	-
4	0,4 M HEPES-NaOH pH 7,5 1,9 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 2% PEG 400 ⁽¹⁾	2,80	P 6	Fração do <i>twin</i> 0,20	h, -h-k, -l

(1) Cristais crescidos a 4 °C

* Resolução definida de acordo com o $I/\sigma(I) > 2$

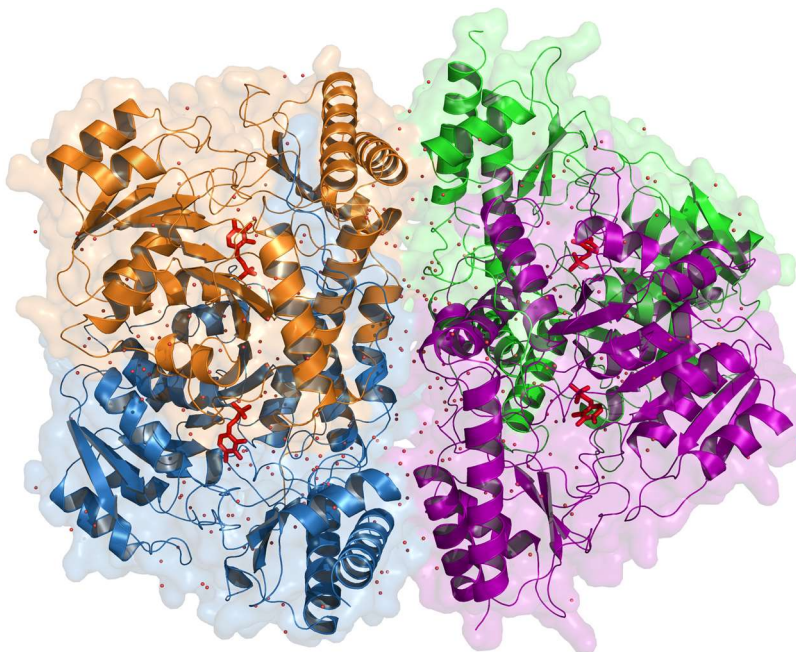
** Definido pelo Pointless.

Fonte: A autora (2020).

A análise do conteúdo da célula unitária a partir do coeficiente de *Matthews* foi realizada pelo programa *Matthews* do pacote CCP4. O programa *Xtriage* encontrou problemas em alguns conjuntos de dados, em que o padrão das reflexões está diferente do esperado para um conjunto sem *twin*. Contudo, não há possibilidade de lei de *twin* para o grupo espacial. Assim, o programa sugere o reprocessamento dos dados para determinar se o problema é relacionado ao processamento ou à qualidade do conjunto de dados.

As resoluções máximas calculadas pelo *Aimless* de acordo com o $I/\sigma(I)$ são mais altas que as identificadas visualmente durante a coleta de dados. Isso mostra a importância da obtenção do conjunto de dados mesmo quando na identificação visual o padrão de difração mostra-se insatisfatório. A definição da resolução máxima do modelo foi feita nessa etapa, durante a geração do único arquivo de reflexões. Todos os conjuntos de dados foram processados e avaliados por estes programas. O conjunto de dados inicialmente selecionado para construção do modelo foi o ID 1 por não ter o problema do cristal geminado (*twin*). A análise do conteúdo da célula unitária definiu com a maior probabilidade a presença de 4 moléculas por unidade assimétrica (UA) e 49,65% de solvente (Figura 31). Os 388 resíduos foram modelados em cada monômero de massa de 43,4 kDa.

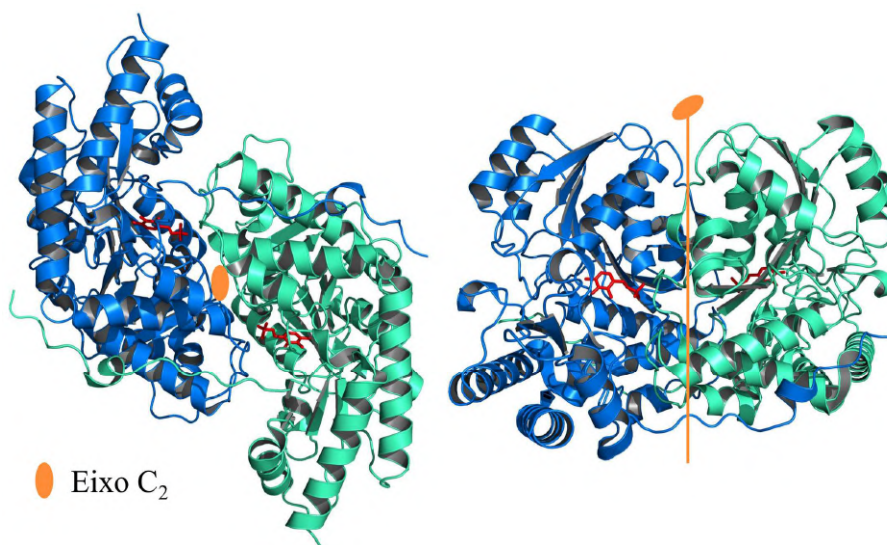
Figura 31 - Componentes da unidade assimétrica do cristal da RL_HKT. Cadeias A, B, C e D em azul, laranja, verde e roxo, respectivamente. Cada sítio ativo está ocupado por uma molécula do cofator PLP (em vermelho) e as moléculas de água estão representadas por pequenas esferas.



Fonte: A autora (2020).

Não há resíduos ausentes internamente às cadeias pois o programa *AutoBuild* foi usado para a construção de um *loop* entre os resíduos Lys³⁰⁵ e Arg³¹³ e resíduos no C-terminal que não foram adicionados nas etapas iniciais da construção do modelo. A RL_HKT foi observada como um homodímero cristalográfico, característico de enzimas PLP-dependentes do tipo I (SCHNEIDER; KÄCK; LINDQVIST, 2000). Os monômeros estão relacionados por um eixo de simetria C_2 , em que a rotação da estrutura em 180° mostrará a mesma imagem da RL_HKT, mas relacionada ao outro monômero (Figura 32).

Figura 32 - Homodímero cristalográfico e funcional da RL_HKT e o eixo de simetria que relaciona os dois monômeros.



Fonte: A autora (2020).

As interações predominantes que estabilizam o homodímero são 13 interações eletrostáticas e 34 ligações de hidrogênio distribuídas por toda a interface entre os monômeros (Tabela 19). A área de interface média entre o PLP e a cadeia correspondente é de $223,43 \text{ \AA}^2$ e $67,75 \text{ \AA}^2$ com o monômero relacionado. Não há ligações dissulfeto entre os monômeros no homodímero. Estas análises foram feitas pelo programa PISA.

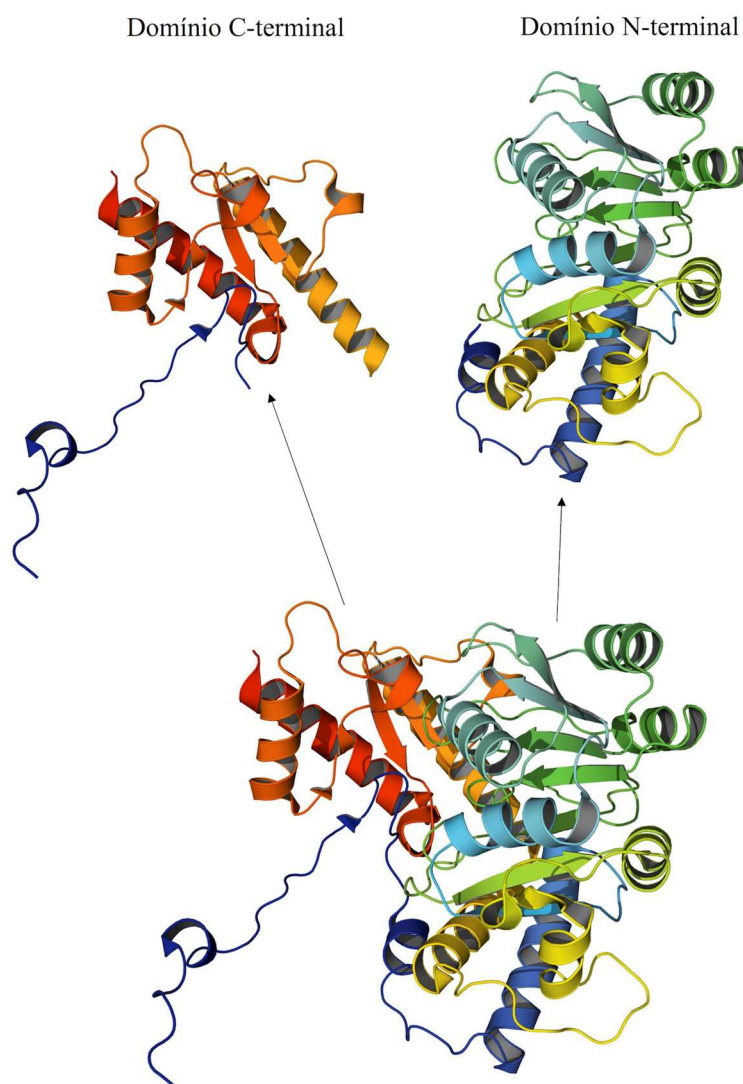
Tabela 19 - Análise da interface entre os quatro monômeros da unidade assimétrica realizada pelo programa PISA.

Cadeia	Cadeia'	Área de interface ($\text{\AA}^2$)	Energia de solvatação (kcal/mol)
D	C	3773,52	-65,65
B	A	3746,92	-71,84
D	B	537,37	-5,30
C	A	527,21	-5,11

Fonte: A autora (2020).

Por causa da alta identidade entre a AgHKT e a AeHKT (79%), o CATH (banco de dados de classificação de proteínas) sugeriu que cada monômero da RL_HKT possui dois domínios muito similares com os da AgHKT: um domínio N-terminal formado pelos resíduos 30-278 e um domínio C-terminal que inclui os resíduos 2-29 e 279-388 (Figura 33). O domínio N-terminal (CATH 3.40.640.10) é um sanduíche de 3 camadas $\alpha\beta\alpha$ formado por 7 hélices α e 7 fitas β .

Figura 33 - Monômero da RL_HKT, composto de dois domínios de classificação $\alpha\beta$. As cores da representação evidenciam a direção da cadeia que se inicia no N-terminal (azul escuro) e se finaliza na região C-terminal (vermelho).

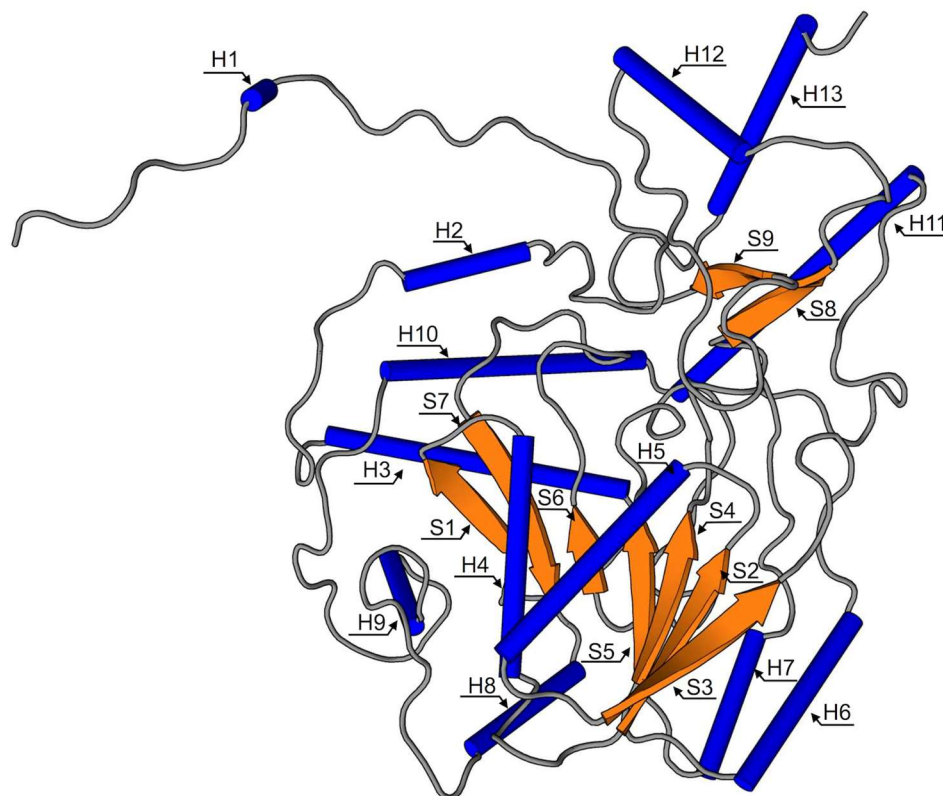


Fonte: A autora (2020).

Estas estruturas secundárias estão intercaladas ao longo da sequência da proteína e conectadas por longos *loops*. A disposição das fitas β na parte hidrofóbica da estrutura forma uma folha β em formato de sela. Essa curvatura é característica de fitas β paralelas, que precisam

dessa rotação para manter as ligações de hidrogênio entre as fitas. As hélices α ficam dispostas ao redor da folha β , em contato com o solvente. O domínio C-terminal (CATH 3.90.1150.10) é composto pelo braço N-terminal que mantém os monômeros do homodímero unidos e os 110 resíduos finais da estrutura, formando um complexo $\alpha\beta$. O braço N-terminal é composto uma volta de hélice α , importante para a disposição dos resíduos que interagem com o monômero relacionado (Ser⁸, Ser⁹, Leu¹⁰ e Arg¹¹). O complexo $\alpha\beta$ possui fitas β antiparalelas e a disposição das estruturas secundárias não é alternada como no outro domínio e predominantemente formado por hélices α . A junção dos dois domínios gera um monômero com pouca simetria, mas com arquitetura bem diversa (Figura 34).

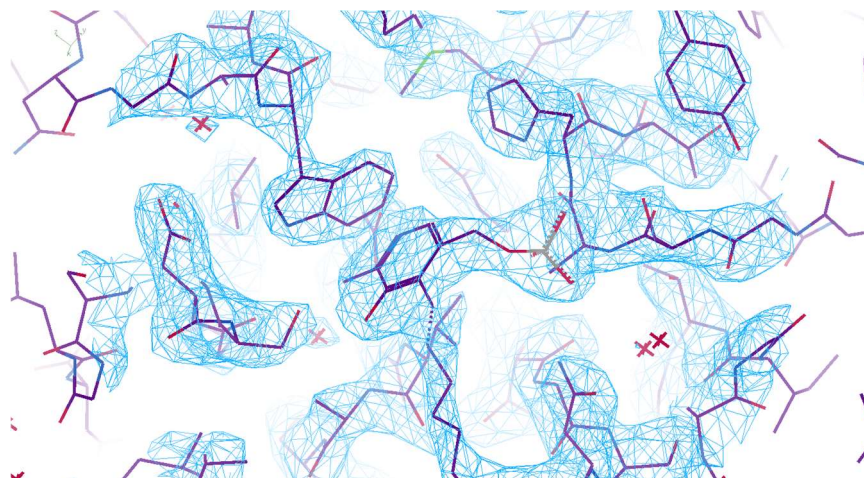
Figura 34 - Identificação das hélices α (H) e fitas β (S) no monômero A da RL_HKT.



Fonte: A autora (2020).

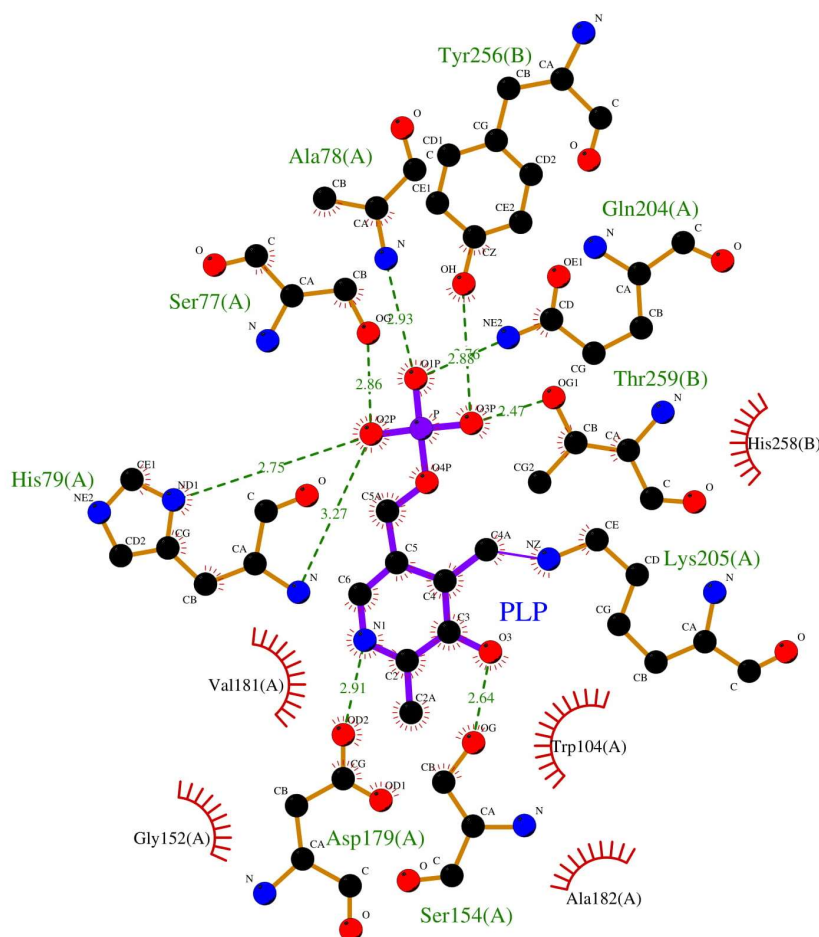
Cada homodímero da RL_HKT é composto por dois sítios ativos formados por resíduos de ambas cadeias. Os sítios dos dois homodímeros estão preenchidos uma molécula do PLP (Figura 35). As interações que mantêm o PLP no sítio ativo são a ligação covalente com a Lys²⁰⁵, ligações de hidrogênio com os resíduos A/Ser⁷⁷, A/Ala⁷⁸, A/His⁷⁹, A/Ser¹⁵⁴, A/Asp¹⁷⁹, A/Gln²⁰⁴, B/Tyr²⁵⁶ e B/Thr²⁵⁹ e interações de van der Waals com os resíduos A/Trp¹⁰⁴, A/Gly¹⁵², A/Val¹⁸¹, A/Ala¹⁸² e B/His²⁵⁸ (Figura 36). A análise dessa interação foi feita pelo programa LigPlot⁺.

Figura 35 - Modelo e mapa de densidade eletrônica do PLP no sítio ativo da RL_HKT.



Fonte: A autora (2020).

Figura 36 - Interações de *van der Waals* e ligações de hidrogênio entre o PLP e os resíduos do sítio ativo da RL_HKT.

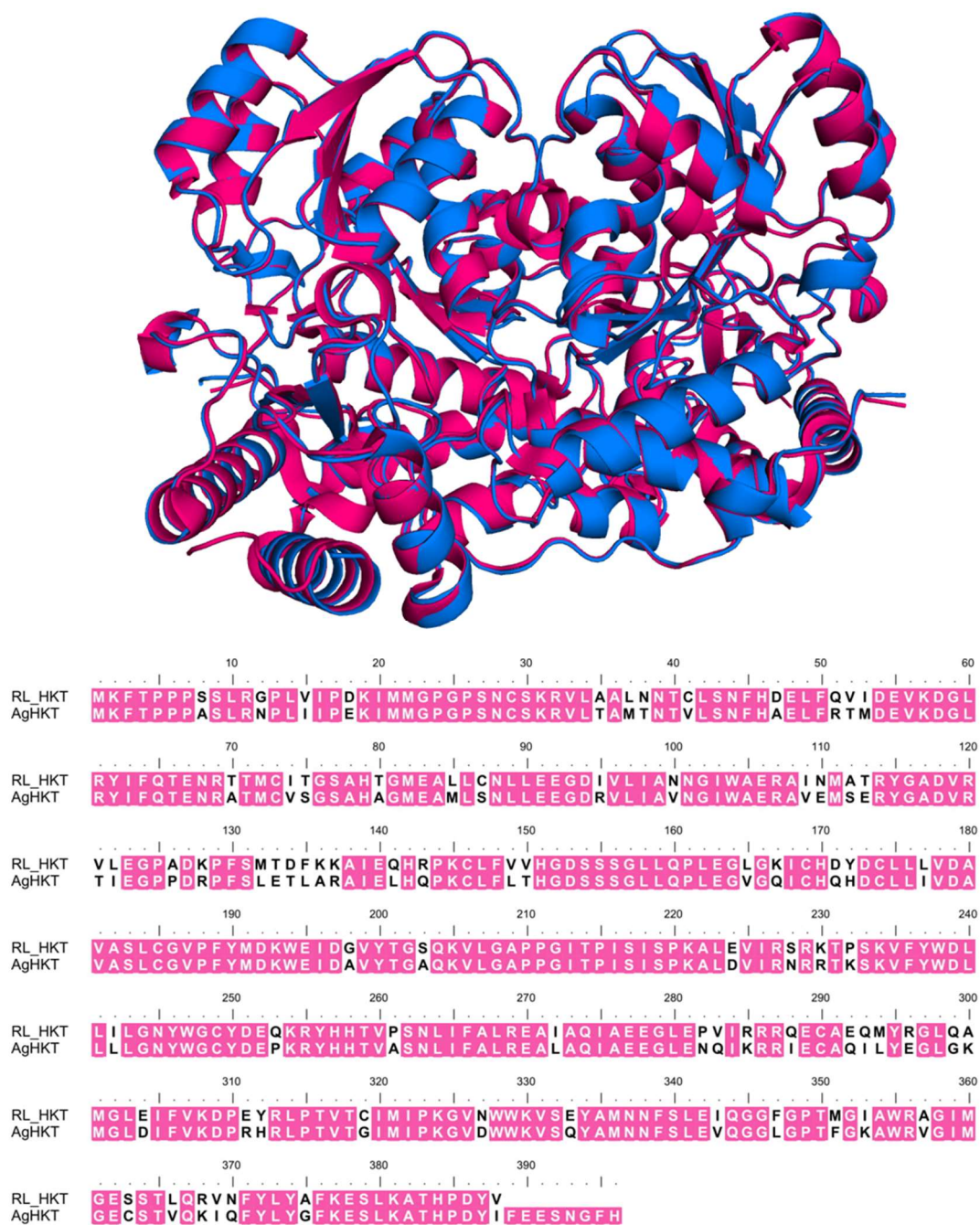


Fonte: A autora (2020).

Foi relatado no trabalho de Oliveira e colaboradores que o sítio ativo das enzimas AgHKT e AeHKT são idênticos em um raio de 7 Å em relação ao 4-OB, o inibidor

cocristalizado da AgHKT (OLIVEIRA *et al.*, 2013). A estrutura tridimensional destas enzimas é bem conservada, com um desvio médio quadrático (RMSD) de 0,4 Å em relação à cadeia principal (Figura 37).

Figura 37 - Alinhamento estrutural e sequencial entre as enzimas RL_HKT (azul) e sua homóloga AgHKT (rosa) (painel superior). Os resíduos em rosa no alinhamento sequencial correspondem aos resíduos conservados entre as enzimas (painel inferior).

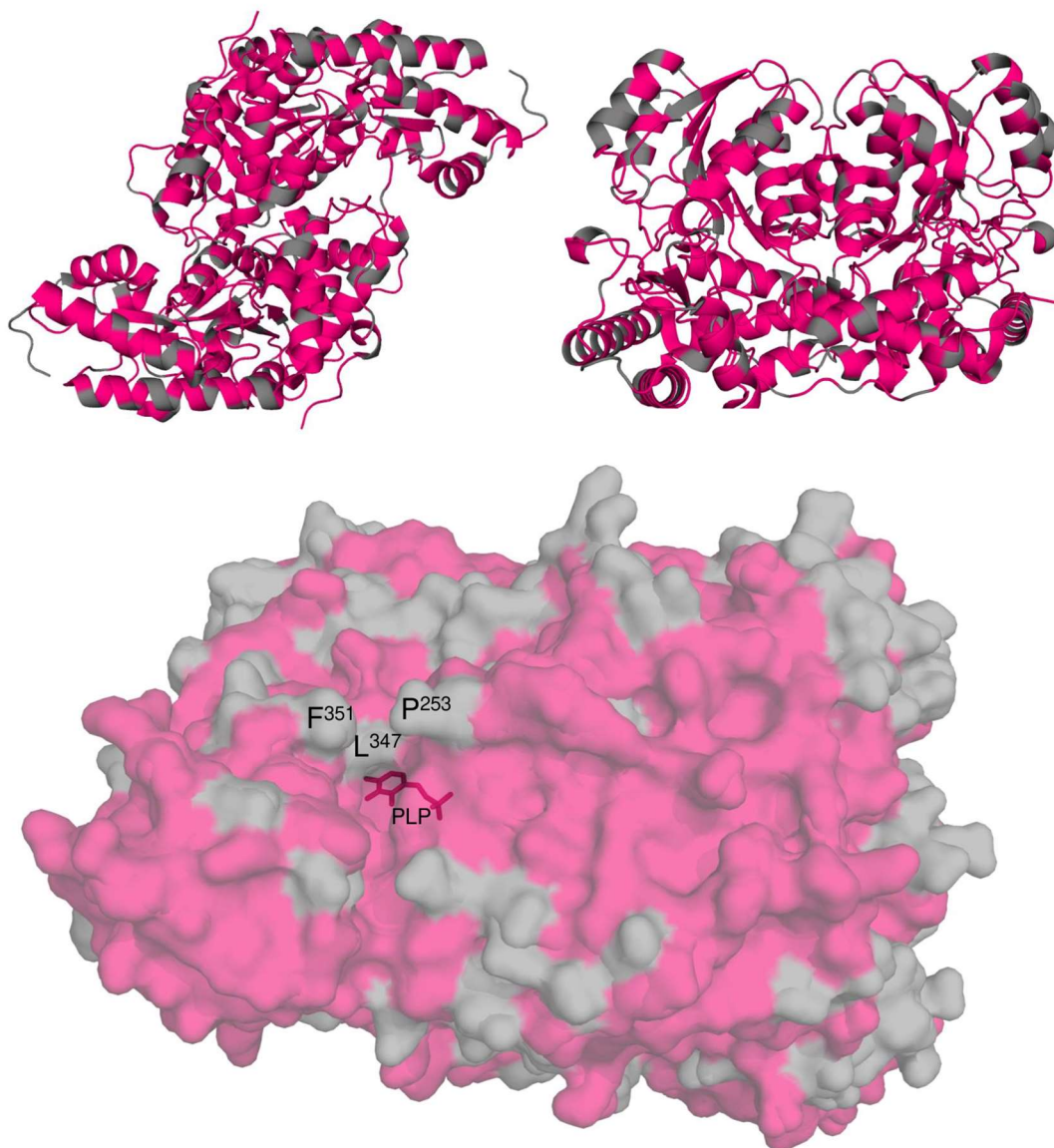


Fonte: A autora (2020); extraído de ROSSI, et al., 2006.

Os resíduos não conservados estão dispostos em toda a estrutura da AgHKT, incluindo hélices α e fitas β . Contudo, os resíduos A/Leu³⁴⁷, A/Phe³⁵¹ e D/Pro²⁵³ estão dispostos no canal

de entrada para o sítio ativo. Estas mutações podem influenciar na seletividade do inibidor (Figura 38).

Figura 38 - Distribuição dos resíduos não conservados da AgHKT em relação à RL_HKT (em cinza). Os resíduos Leu-347, Phe-351 e Pro-253 estão dispostos no canal de entrada para o sítio ativo, o que pode influenciar na seletividade de moléculas para entrada no sítio ativo.

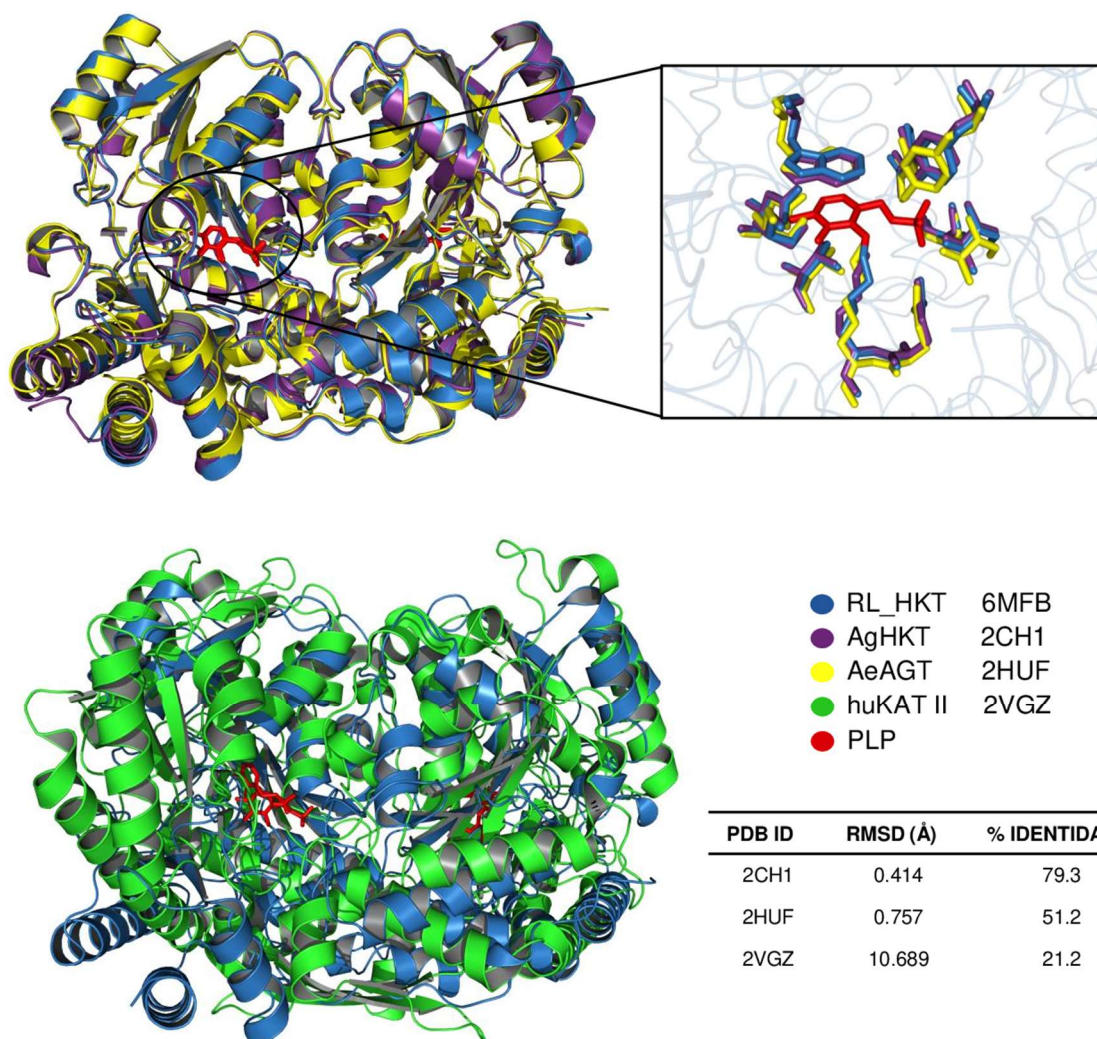


Fonte: Da autora; extraído de ROSSI, et al., 2006.

O alinhamento estrutural entre as enzimas RL_HKT, AgHKT, huKAT II (quinurenina aminotransferase II humana) e AeAGT (Alanina glioxilato aminotransferase de *Aedes aegypti*) também foi realizado, com RMSD de 0,7 Å entre a RL_HKT e AeAGT e 10,7 Å entre a RL_HKT e huKAT II. A baixa identidade sequencial (21%) e o alto RMSD estrutural entre as enzimas RL_HKT e huKAT II favorece a especificidade dos inibidores da RL_HKT, pois estes

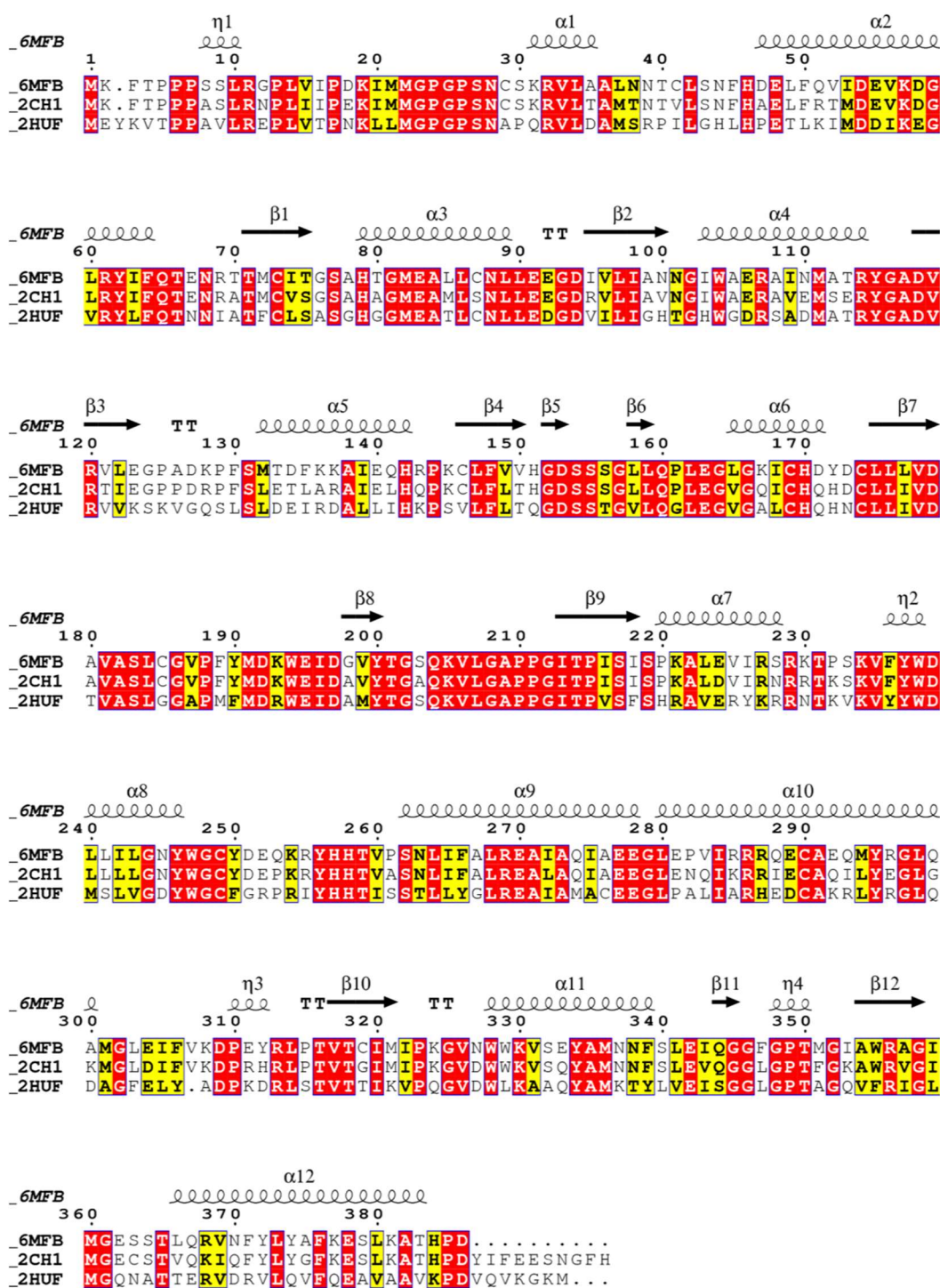
são menos propensos a afetar a atividade da enzima homóloga em humanos (Figura 39 e 40). Os principais resíduos de interação com o PLP no sítio ativo estão totalmente conservados nas enzimas RL_HKT, AgHKT e AeAGT, já que a correta posição do PLP no sítio ativo é essencial para a atividade enzimática.

Figura 39 - Comparação entre as enzimas RL_HKT, AgHKT, AeAGT e huKAT II. Alinhamento estrutural da RL_HKT, AgHKT e AeAGT com visualização aproximada do sítio de ligação do PLP, mostrando os resíduos conservados que interagem com o PLP em um raio de 4 Å a partir do PLP (painel superior). Alinhamento estrutural da RL_HKT e huKAT II para mostrar suas diferenças na superposição da cadeia principal (painel inferior). Desvios médios quadráticos (RMSD) dos alinhamentos estruturais e suas porcentagens de identidade sequenciais usando 6MFB como referência.



Fonte: A autora (2020); extraído de HAN *et al.*, 2006; ROSSI *et al.*, 2008, 2006.

Figura 40 – Comparação entre as enzimas RL_HKT, AgHKT, AeAGT e huKAT II. Alinhamento sequencial entre a RL_HKT, AgHKT e AeAGT, revelando os resíduos idênticos em vermelho, os resíduos similares em amarelo e os resíduos não conservados estão sem destaque. O alinhamento sequencial está coincidindo com as estruturas secundárias da RL_HKT (6MFB).



Fonte: A autora (2020); extraído de HAN *et al.*, 2006; ROSSI *et al.*, 2008, 2006.

O refinamento da estrutura da RL_HKT foi finalizado e sua estrutura cristalográfica está disponível no Banco de Dados de Proteínas (PDB) pelo código 6MFB (Tabela 20).

Tabela 20 - Estatísticas de coleta, processamento e refinamento da estrutura da RL_HKT.

ID 1 RL_HKT	
Dados cristalográficos	
Faixa de resolução (Å)	47,85 – 2,50 (2,57 – 2,50)*
Grupo espacial	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Parâmetros de rede (Å)	a=86,24
	b=115,03
	c=171,04
	$\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
Número total de imagens	360
$\Delta\phi$ (°)	0,5
Número total de reflexões	388427 (30462)*
Número total de reflexões únicas	59594 (4580)*
Multiplicidade	6,5 (6,7)*
Completeza (%)	99,9 (100,0)*
R _{meas} (%)	9,4 (86,6)*
R _{p.i.m.} (%)	3,7 (33,3)*
I/ $\sigma(I)$	16,2 (2,6)*
Refinamento	
Número de resíduos de aminoácido por monômero	A – 383
	B – 385
	C – 383
	D - 384
Moléculas de água	370
R _{work} (%)	18,9
R _{free} (%)	25,6
RMSD – ângulos de ligação (°)	1,4
RMSD – comprimento das ligações (Å)	0,010
Clashscore	5,88
Rotâmeros incomuns (%)	1,23
Ramachandram em região proibida (%)	0,13
Ramachandram em região favorecida (%)	97,71

*Os valores entre parênteses são referentes à camada de resolução mais externa.

Fonte: A autora (2020).

Uma das formas de avaliar a concordância entre o modelo em construção e os dados experimentais é a avaliação dos *R-factors* (neste caso, R_{work} e R_{free}). Eles são calculados a partir dos fatores de estrutura (F) e estes estão diretamente relacionados às intensidades (I) das reflexões obtidas durante o experimento de difração de raios-X (Equação 1).

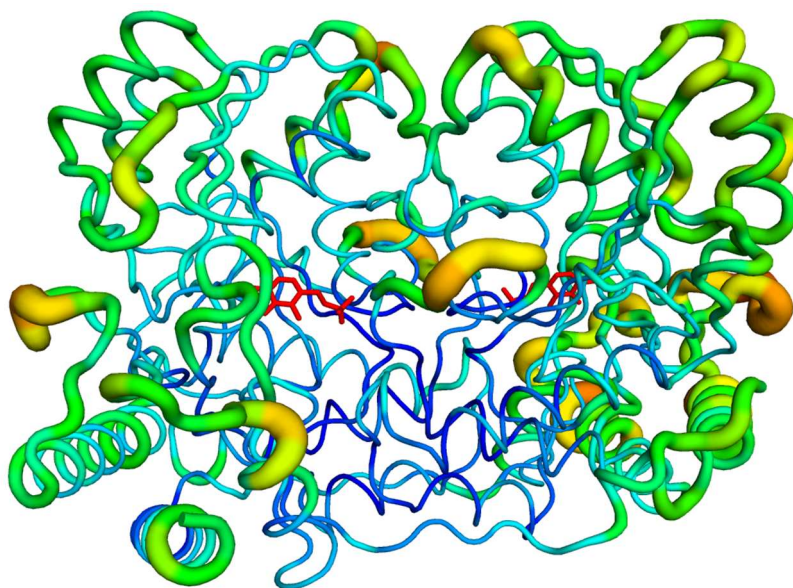
Equação 1 – Equação para o cálculo do *R-factor* e a relação de proporcionalidade entre os fatores de estrutura e as intensidades das reflexões.

$$R_{factor} = \frac{\sum ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{\sum |F_{obs}|} I_{hkl} \propto |F_{hkl}|^2$$

Portanto, quanto menores os valores dos *R-factors*, maior a concordância. Para evitar a superestimativa do modelo, 5% das reflexões são excluídas do refinamento para validação cruzada. Estas reflexões compõem o R_{free} , enquanto o R_{work} contém os dados incluídos no refinamento (THE INTERNATIONAL UNION OF CRYSTALLOGRAPHY, 2017).

A distribuição do *B-factor* (ou fator de temperatura) ao longo das cadeias está condizente com a evolução do refinamento, em que as regiões expostas ao solvente e os *loops* apresentam maior oscilação (Figura 41).

Figura 41 - Distribuição do *B-factor* ao longo do homodímero AB da RL_HKT com o PLP (vermelho) explícito no sítio ativo.



Fonte: A autora (2020).

4.9.2 R_HKT

Devido a todos os conjuntos de dados da R_HKT apresentarem *twinning*, o modelo desta linhagem foi construído e refinado posteriormente à RL_HKT. No primeiro momento, as etapas de processamento foram realizadas pelos programas XDS, Aimless, Pointless e a análise dos dados processados, pelo Xtriage (Tabela 21). O conjunto de dados ID 9 foi escolhido pela provável presença de ligante na estrutura.

Tabela 21 - Dados obtidos após o processamento e avaliação do *Xtriage* para os conjuntos de dados da R_HKT.

ID	Condição de cristalização	Resolução máxima (Å)*	Grupo espacial**	Alertas <i>Xtriage</i>	Lei do <i>twin</i>
5	0,1M HEPES-NaOH pH 7,5 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 2% PEG 400 ⁽¹⁾	2,50	P 6 ₁ 22	Não há lei de <i>twin</i> para o grupo espacial	-
6	0,1M HEPES-NaOH pH 7,5 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 2% PEG 400 ⁽²⁾	2,50	P 6 ₁ 22	Não há lei de <i>twin</i> para o grupo espacial	-
7	0,05M HEPES-NaOH pH 7,5 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 2% PEG 400	2,19	P 6 ₂	Fração do <i>twin</i> 0,27	h, -h-k, -l
8	0,3 M HEPES-NaOH pH 7,5 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 2% PEG 400	2,00	P 6 ₃	Fração do <i>twin</i> 0,26	h, -h-k, -l
9	0,1 M HEPES-NaOH pH 7,5 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 2% PEG 400 0,02 M NDSB – 221	2,13	P 6 ₃	Fração do <i>twin</i> 0,22	h, -h-k, -l
10	0,1 M HEPES-NaOH pH 7,5 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,5% PEG 400 360 µM PLP	2,01	P 6 ₃ 22	Não há lei de <i>twin</i> para o grupo espacial	-
11	0,2 M HEPES-NaOH pH 7,5 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 1% PEG 400 360 µM PLP	2,03	P 6 ₃ 22	Não há lei de <i>twin</i> para o grupo espacial	-
12	0,1 M HEPES-NaOH pH 7,5 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,5% PEG 400 ⁽³⁾	1,83	P 6 ₃ 22	Não há lei de <i>twin</i> para o grupo espacial	-
13	0,2 M HEPES-NaOH pH 7,5 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 1% PEG 400 ⁽³⁾	2,16	P 6 ₃	Lei do <i>twin</i> 0,25	h, -h-k, -l
14	0,1 M HEPES-NaOH pH 7,5 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,5% PEG 400 ⁽⁴⁾	1,94	P 6 ₃	Lei do <i>twin</i> 0,26	h, -h-k, -l
15	0,15 M HEPES-NaOH pH 7,5 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 1% PEG 400 ⁽⁴⁾	1,99	P 6 ₃	Lei do <i>twin</i> 0,29	h, -h-k, -l
16	0,1 M HEPES-NaOH pH 7,5 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,5% PEG 400	1,83	P 6 ₃ 22	Não há lei de <i>twin</i> para o grupo espacial	-

(1) Dados coletados sem solução crioprotetora

(2) Dados coletados sem solução crioprotetora

(3) Gotas de 4 µL da HKT para a cristalização

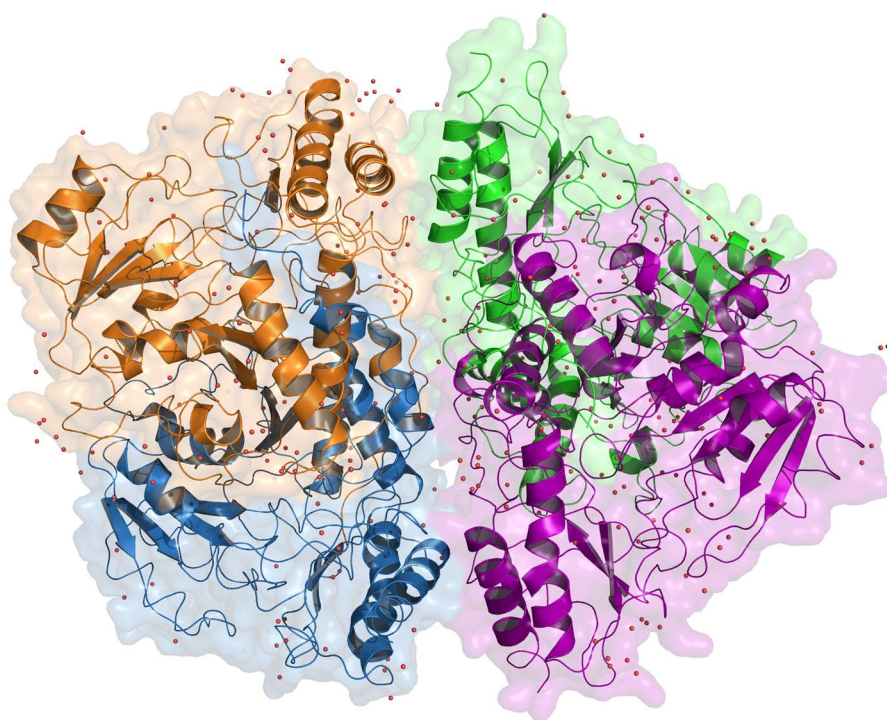
(4) Cristais crescidos a 4 °C

* Resolução definida de acordo com o $I/\sigma(I)$ maior que 2** Definido pelo *Pointless*

Fonte: A autora (2020).

A substituição molecular foi bem-sucedida, encontrando somente uma solução. O modelo usado foi a estrutura cristalográfica da RL_HKT, em que as cadeias A e B (homodímero) foram selecionadas e as coordenadas do PLP e das águas deletadas. Contudo, ao observar ao modelo, notou-se a sobreposição de cadeias e pouquíssima correlação entre o modelo e a densidade eletrônica das cadeias E e F. Deste modo, o conjunto de dados foi reprocessado usando o programa autoPROC, um pacote que realiza todo o processamento de forma automatizada, além de exibir a opção de processamento anisotrópico. Após o reprocessamento, a substituição molecular foi novamente realizada e apresentou uma solução. Agora, a unidade assimétrica contém somente quatro cadeias da proteína e os sítios estão ausentes de qualquer ligante, inclusive o cofator PLP (Figura 42).

Figura 42 - Componentes da unidade assimétrica do cristal da R_HKT. Cadeias A, B, C e D em azul, laranja, verde e roxo, respectivamente. As moléculas de água estão representadas por pequenas esferas.

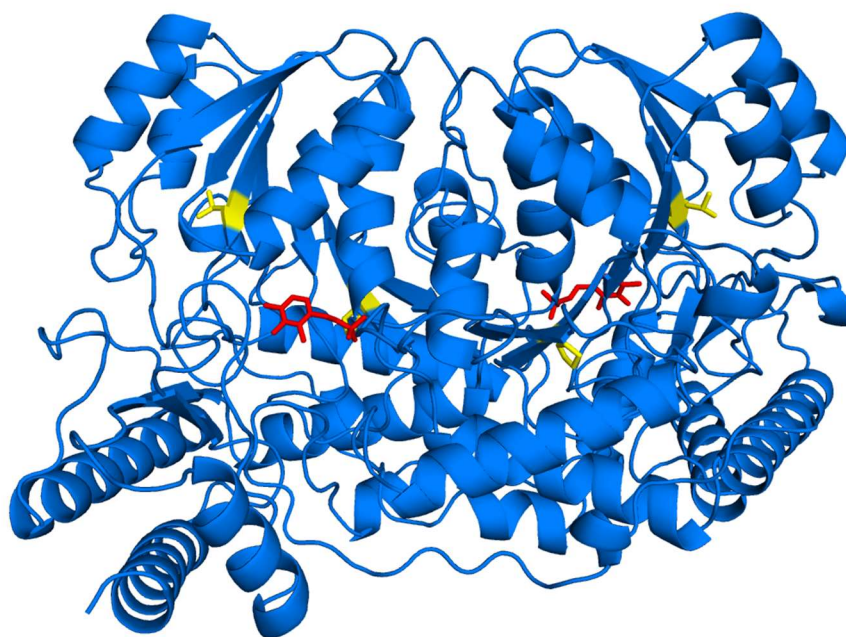


Fonte: A autora (2020).

Este é um exemplo claro de que a presença de um cristal em condição de cristalização contendo ligante não implica na presença do ligante na estrutura final. O sucesso da cocrystalização depende de fatores como a concentração tanto da proteína quanto do ligante, a afinidade do ligante à proteína, escolha da etapa em que o ligante será incubado com a proteína, dentre outros (HASSELL *et al.*, 2006; MÜLLER, 2017).

Apesar disso, alguns pontos podem ser discutidos em comparação com a variante RL_HKT. O primeiro é relativo às mutações V149I e P215S discutidas anteriormente. Elas estão dispostas em duas fitas β distintas e as cadeias laterais estão direcionadas para o lado oposto ao sítio ativo. Portanto, é improvável a existência de diferenças na atividade enzimática das variantes (Figura 43).

Figura 43 - RL_HKT (azul) em complexo com o PLP (vermelho) e as mutações observadas entre as variantes R_HKT e RL_HKT (amarelo).

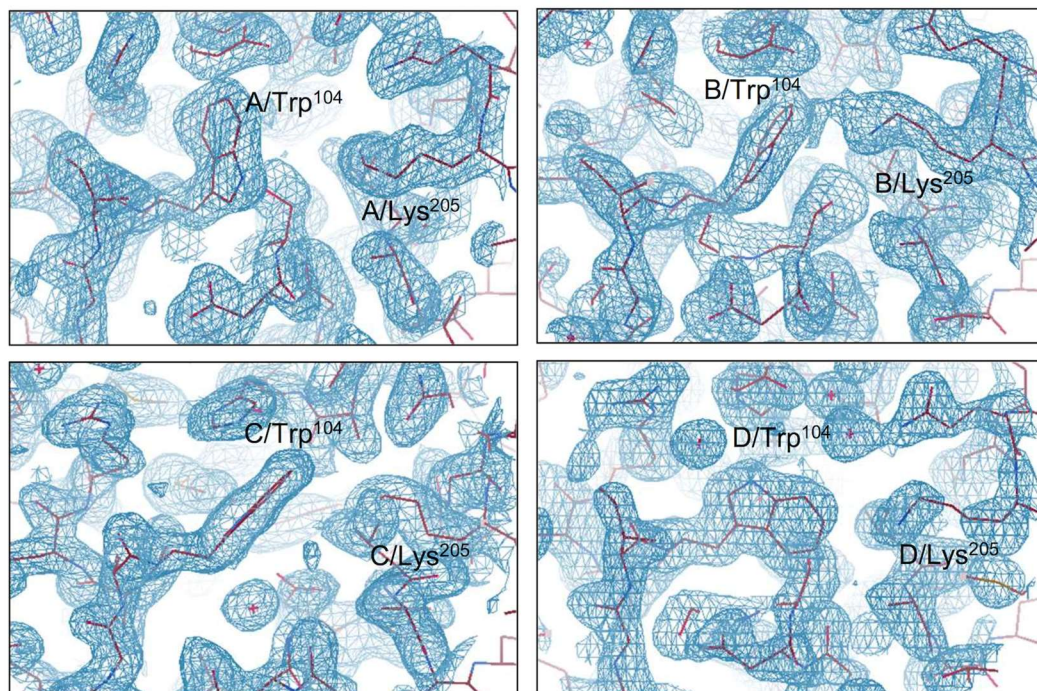


Fonte: A autora (2020).

Também foi observada a movimentação do resíduo Trp¹⁰⁴ nos quatro sítios da estrutura. Isto se deve ao espaço vazio no sítio devido à ausência do cofator PLP e ainda a inexistência na interação π - π observada entre o PLP e o Trp¹⁰⁴ na Figura 35. Portanto, o Trp¹⁰⁴ está livre tanto por efeitos estérico e eletrônico para se movimentar livremente no sítio ativo da enzima (Figura 44).

Ainda que o modelo esteja concordante com a densidade eletrônica da variante R_HKT, observa-se que os valores de *R-factors* não estão diminuindo com o progresso do refinamento. Isso se deve ao fato de que os *R-factors* de estruturas contendo *twinning* não se comportam da mesma forma que os *R-factors* de estruturas sem problemas de *twinning*. Por isso, outros dados estatísticos devem ser observados como a qualidade do modelo avaliada pelos desvios quadráticos médios de ângulo e comprimento de ligações (Tabela 22).

Figura 44 - Comparação da posição do resíduo Trp¹⁰⁴ nos quatro sítios ativos, usando a Lys²⁰⁵ como referência de posição.



Fonte: A autora (2020).

Tabela 22 - Estatísticas de coleta, processamento e refinamento da estrutura da R_HKT.

ID 9 R HKT	
Dados cristalográficos	
Faixa de resolução (Å)	59,7 – 2,0 (2,071 – 2,0)*
Grupo espacial	P 6 ₃
Parâmetros de rede (Å)	a=182,416
	b=182,416
	c=123,604
	$\alpha=\beta=90^\circ$
	$\gamma=120^\circ$
Número total de imagens	360
$\Delta\phi$ (°)	0,5°
Número total de reflexões	311869 (29816)*
Número total de reflexões únicas	156303(15042)*
Multiplicidade	2,0 (2,0)*
Completeza (%)	99,34 (96,01)*
R _{meas} (%)	4,51 (50,45)*
R _{p.i.m.} (%)	3,189 (35,68)*
I/ σ (I)	16,61 (1,93)*

Continuação da Tabela 22

Refinamento	
	A – 386
Número de resíduos de aminoácido por monômero	B – 386
	C – 386
	D - 386
Moléculas de água	280
R _{work} (%)	31,7
R _{free} (%)	35,3
RMSD – ângulos de ligação (°)	8,8
RMSD – comprimento das ligações (Å)	0,5
Clashscore	26,3
Rotâmeros incomuns (%)	0,08
Ramachandram em região proibida (%)	2,09
Ramachandram em região favorecida (%)	84,82

*Os valores entre parênteses são referentes à camada de resolução mais externa.

Fonte: A autora (2020).

A análise de interface do programa PISA e as comparações com as proteínas homólogas para a variante R_HKT foram omitidas devido à alta identidade entre as variantes RL_HKT e R_HKT.

4.10 ENSAIO ENZIMÁTICO COM DETECÇÃO DIRETA DO ÁCIDO XANTURÊNICO

A nova metodologia desenvolvida para realização dos ensaios enzimáticos da HKT foi modificada a partir do protocolo publicado por Han e Li (HAN; LI, 2002) para avaliar a conversão de 3-HK para AX pela enzima HKT. O método é baseado na detecção do ácido xanturênico em complexo com ferro III (Fe^{3+}), complexo este primeiramente reportado por Lepkovski e colaboradores na detecção de AX em ratos deficientes de piridoxina (LEPKOVSKY; NIELSEN, 1942; LEPKOVSKY; ROBOZ; HAAGEN-SMIT, 1943) e mais recentemente utilizado por Lima e colaboradores para quantificar o AX em intestinos do mosquito *Aedes aegypti* (LIMA *et al.*, 2012). Este complexo AX- Fe^{3+} apresenta absorção em comprimento de onda bem distinto do AX ou 3-HK livres, o que dispensa o uso de cromatografia para detecção desses metabólitos, técnica na qual se baseava a metodologia de Han e Li (HAN; LI, 2002). Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços permitindo a leitura simultânea de várias amostras, o que torna esta metodologia mais rápida e barata para caracterização enzimática e/ou de inibição da HKT. A nova metodologia utiliza concentrações

ligeiramente diferentes em relação ao protocolo de Han e Li, e que foram adaptadas para o ensaio em batelada em microplaca (Tabela 23).

Tabela 23 - Comparação das concentrações e componentes da reação da HKT entre o protocolo de Han e Li (referência) e no novo protocolo.

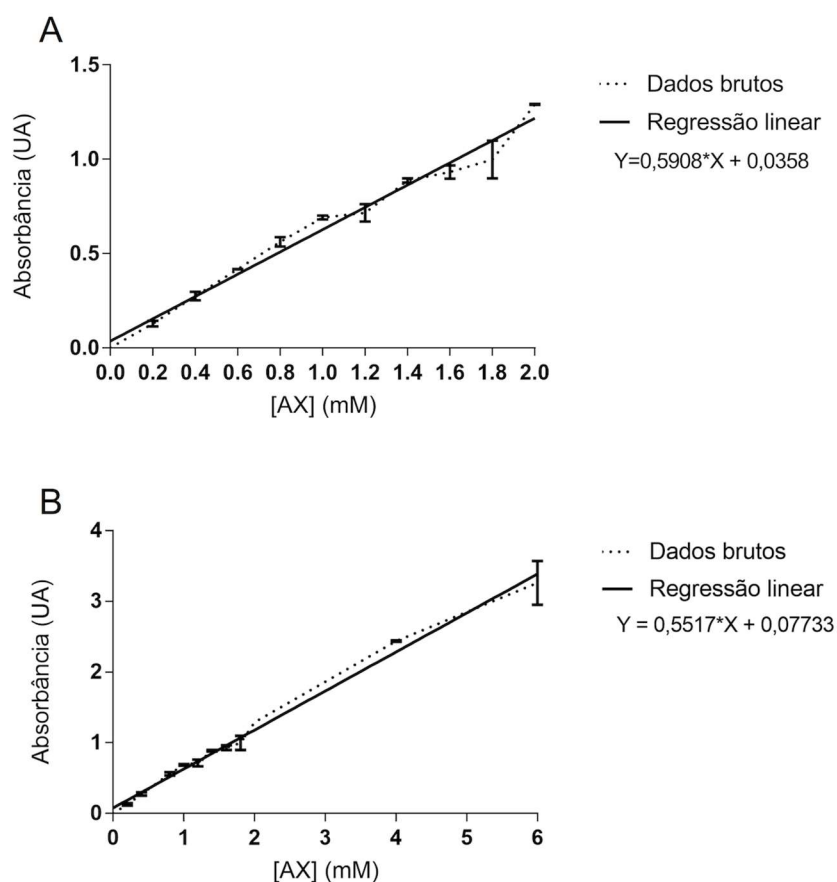
Componente reacional	Protocolo de Han e Li	Novo protocolo
HKT	1 µg	2 µg
3-D,L-HK	10 mM	2 mM
PLP	40 µM	40 µM
Piruvato sódico	5 mM	2 mM
Tampão	Fosfato pH 7	HEPES-NaOH pH 7,5
Volume final:	50 µL	100 µL
Parada da reação	50 µL de Ácido Fórmico a 0,1 M	100 µL de FeCl ₃ .6H ₂ O em HCl a 0,1 M

Fonte: A autora (2020).

A quantificação do complexo AX-Fe³⁺ (e consequentemente, AX) foi feita a partir da curva de calibração contendo concentrações de 0 a 2 mM de AX em intervalos de 0,2 mM. Dois pontos de maior concentração (4 e 6 mM) foram adicionados para quantificar o AX em maiores concentrações, se necessário (Figura 45). A regressão linear dos dados resultou em R² igual a 0,98.

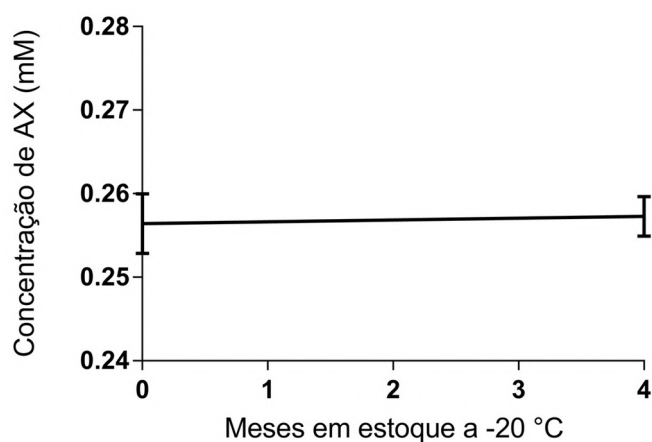
A estabilidade da RL_AeHKT foi avaliada em uma amostra de concentração igual a 11 mg.mL⁻¹ em Tampão HEPES descrito no ensaio enzimático, sem glicerol e estocada a -20 °C por quatro meses. A concentração de AX formada em 5 minutos de reação foi comparada com uma amostra recém-purificada (0 meses) e um gráfico foi plotado em relação ao tempo de estoque. A nível de atividade enzimática, a proteína estocada nas condições acima citadas se mostrou tão estável quanto à proteína recém purificada (Figura 46).

Figura 45 - Curvas de calibração realizadas para quantificação de ácido xanturênico (AX). A - Concentrações de 0 a 2 mM de AX contendo piruvato sódico a 2 mM e Piridoxal-5-fosfato (PLP) a 40 μ M. B – Curva A com a adição das concentrações de ácido xanturênico a 4 e 6 mM.



Fonte: A autora (2020).

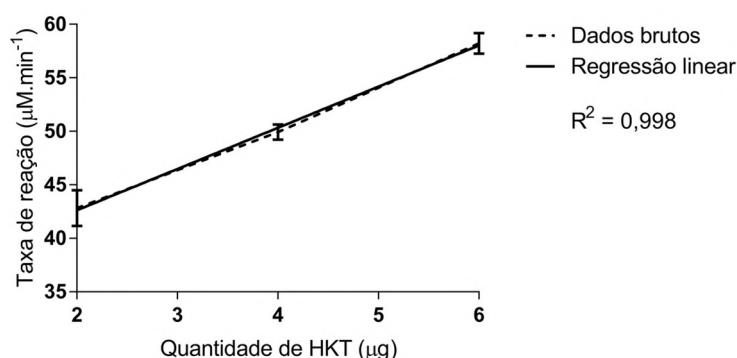
Figura 46 - Concentração de ácido xanturênico (AX) formado por uma alíquota da RL_AeHKT recém purificada (0 meses) em comparação com uma amostra estocada a -20 °C por 4 meses, a 11 mg.mL⁻¹ e sem glicerol.



Fonte: A autora (2020).

A saturação da enzima pelo substrato 3-HK foi confirmada pela linearidade da taxa de reação com o aumento da concentração da enzima (Figura 47). Isto significa que a taxa de reação está aumentando diretamente proporcional ao aumento da concentração da enzima sem alterar a concentração do substrato. Portanto, a quantidade de 3-HK padronizada no ensaio enzimático é suficiente para saturar até três vezes mais a quantidade de enzima adicionada à reação.

Figura 47 - Gráfico de linearidade da taxa de reação em relação à concentração da HKT para demonstrar a saturação da enzima pelo substrato nas condições reacionais padronizadas.

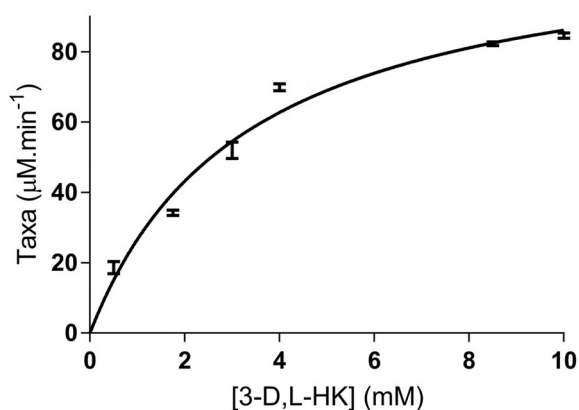


Fonte: A autora (2020).

4.10.1 Caracterização cinética da RL_HKT

Os valores das constantes de Michaelis-Menten (K_M) e da velocidade máxima ($V_{MÁX}$) da HKT nas condições estabelecidas foram obtidas a partir do gráfico de taxa (ou velocidade) em relação à concentração de 3-HK testada (Figura 48).

Figura 48 - Gráfico de taxa de reação da HKT em relação à concentração de 3-HK testada para estimativa das constantes cinéticas. As concentrações de 3-HK testadas foram de 0,5, 1,75, 3, 4, 8,5 e 10 mM.



Fonte: A autora (2020).

Uma regressão no modelo de Michaelis-Menten incluída no pacote do GraphPad Prism7.0 foi realizada e as constantes calculadas automaticamente (Tabela 24). O valor obtido de K_M para a RL_AeHKT (3,3 mM) foi similar ao obtido para a AeHKT expressa em células de inseto Sf9 (3,0 mM) (HAN; LI, 2002), indicando que não há diferenças na especificidade do substrato para estas duas enzimas expressas em organismos distintos. Entretanto, a AgHKT apresentou afinidade ao 3-HK maior do que as duas enzimas recombinantes provenientes do *Aedes aegypti* ($K_M = 2,0$ mM) e esta diferença é ainda mais evidente quando a L-quinurenina é avaliada como substrato amino-doador ($K_M = 1,4$ mM) (CANAVESI *et al.*, 2019). Um dos prováveis motivos para essa diferença no reconhecimento do substrato é a presença do isômero D no substrato comercial 3-D,L-HK, como discutido por Canavesi e colaboradores (CANAVESI *et al.*, 2019). Como esperado, a HKT é específica para o isômero L, não degradando o isômero D, que permanece inalterado após a reação (MACIEL, 2016). Apesar desta dificuldade em relação ao 3-HK, esta nova metodologia requer do uso do 3-HK para geração do AX e consequente detecção colorimétrica do complexo AX-Fe³⁺.

Tabela 24 – Comparação dos parâmetros cinéticos da RL_AeHKT de *Aedes aegypti* em relação às enzimas HKT expressa em células de inseto e a enzima homóloga HKT de *Anopheles gambiae*.

Enzima	Substrato	K_M (mM)	K_{cat} (min ⁻¹)	K_{cat}/K_M (min ⁻¹ .mM ⁻¹)
RL_AeHKT	3-D,L-HK	3,3 ± 0,8	492,3 ± 46	149,2 ± 50
AeHKT(HAN; LI, 2002)	3-D,L-HK	3,0 ± 0,4	1760 ± 80	587 ± 107
AgHKT(ROSSI <i>et al.</i> , 2005)	3-D,L-HK	2,0 ± 0,3	988,5 ± 113	494,3 ± 80
AgHKT(CANAVESI <i>et al.</i> , 2019)	L-quinurenina	1,4 ± 0,2	-	-

As constantes cinéticas da RL_AeHKT foram obtidas usando concentrações de 3-HK iguais a 0,5 1,75, 3,0, 4,0, 8,5 e 10 mM na presença de 5 mM de piruvato sódico. Os parâmetros foram calculados a partir do ajuste dos dados experimentais em regressão de Michaelis-Menten inclusa no pacote GraphPad Prism7.0

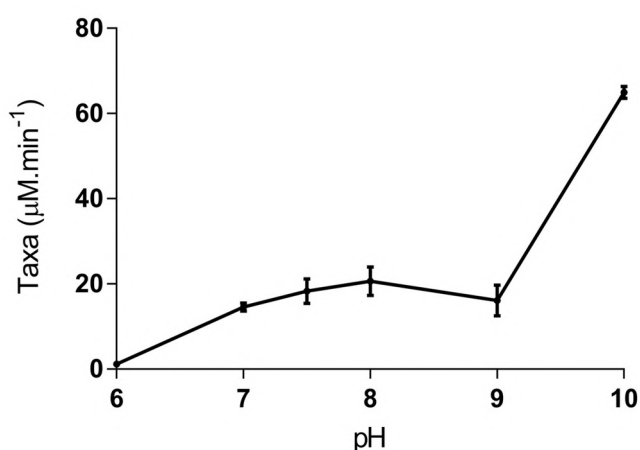
Fonte: A autora (2020).

Em termos de taxa de *turnover*, o K_{CAT} calculado para a RL_AeHKT é quase quatro vezes menor que o da AeHKT e quase duas vezes menor que o observado para a AgHKT. Entretanto, a diminuição no K_{CAT} e consequentemente na eficiência catalítica da RL_AeHKT recombinante expressa em *E. coli* em comparação à expressa em Sf9 é compensada pelo alto rendimento de proteína purificada. O sistema de expressão heteróloga em bactérias apresenta menor custo e maior rapidez em relação a células de inseto e isto é crucial para a realização dos ensaios de inibição e avaliação de novos inibidores para a HKT.

4.10.2 Avaliação do perfil de atividade da HKT em diferentes pHs

O efeito de diferentes pHs na atividade da RL_AeHKT foi avaliado e os valores de taxa obtidos foram plotados (Figura 49).

Figura 49 - Efeito do pH na atividade enzimática da HKT. Os testes foram realizados com tampões Tris-HCl pH 6, 7 e 8, tampão HEPES-NaOH pH 7,5, tampão Borato pH 9 e tampão Carbonato pH 10. Estes tampões foram testados na atividade da RL_AeHKT durante o tempo de incubação, antes da adição da solução de Fe^{3+} em HCl para detecção do complexo AX- Fe^{3+} .



Fonte: A autora (2020).

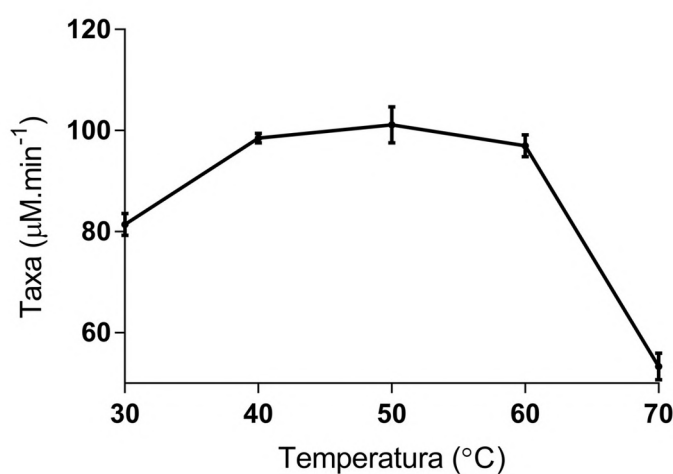
Um gráfico em formato de sino era esperado, descrevendo o comportamento da maioria das enzimas em diferentes pHs. Contudo, um aumento anômalo na taxa de reação em pH 10 foi observado. Isto se deve provavelmente à formação de espécies insolúveis de Fe^{3+} (hidróxido ou carbonato). Vale ressaltar aqui que o pH estava controlado durante o período de incubação, previamente à adição da solução de Fe^{3+} para interromper a reação e gerar o complexo AX- Fe^{3+} . A escolha do diluente do Fe^{3+} foi previamente planejada pois sabe-se que o íon Fe^{3+} forma facilmente espécies insolúveis em pH neutro. Portanto, o ácido clorídrico foi escolhido por acidificar a reação se ocorrida em pH neutro, e isto dificulta a formação destas espécies insolúveis. Contudo, ao testar um tampão em pH 10, a solução final não foi acidificada o suficiente e a turbidez das espécies insolúveis gerou um falso positivo na leitura da amostra. Apesar desse falso positivo, todos os outros tampões testados em pH de 6 a 9 apresentaram a coloração esverdeada e a solução límpida esperada para um ensaio colorimétrico. Sendo assim, o teste da atividade da HKT em pHs muito básicos é uma limitação desta metodologia devido à geração de espécies insolúveis de Fe^{3+} .

Dentre os valores de pH testados, o tampão Tris-HCl pH 8 foi o que realmente apresentou a atividade ótima, resultado um pouco diferente do pH 9, como observado por Han e Li (HAN; LI, 2002). Contudo, o Tampão HEPES pH 7,5 foi o escolhido para realização dos ensaios enzimáticos por apresentar baixa interferência em ensaios biológicos (GOOD *et al.*, 1966) e pela HKT já ter demonstrado afinidade por esse tampão nos experimentos de cristalização.

4.10.3 Avaliação do perfil de atividade da HKT em diferentes temperaturas

A atividade da RL_AeHKT também foi avaliada em diferentes temperaturas de incubação e a taxa de reação foi plotada em relação à temperatura (Figura 50). Como esperado e reportado por Han e Li (HAN; LI, 2002), a HKT apresentou atividade ótima em incubação a 50 °C e por isto, esta foi a temperatura de incubação escolhida para realização dos ensaios enzimáticos e de inibição da HKT.

Figura 50 - Efeito da temperatura na atividade enzimática da HKT. As temperaturas foram avaliadas na incubação da reação completa por 5 minutos a 30, 40, 50, 60 e 70 °C.



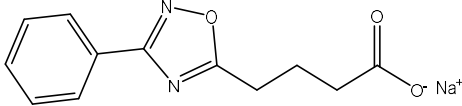
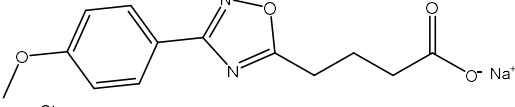
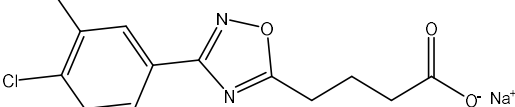
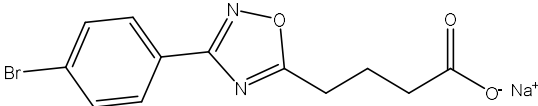
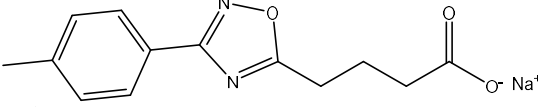
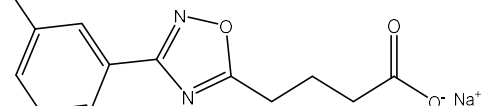
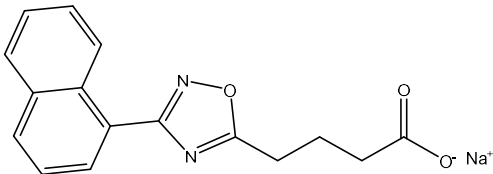
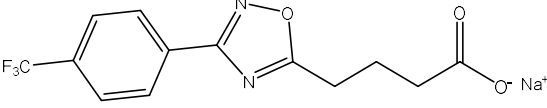
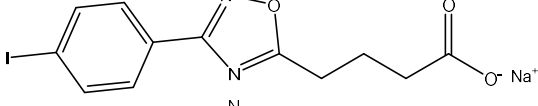
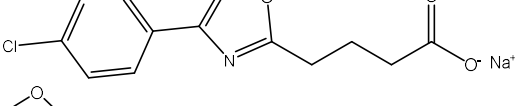
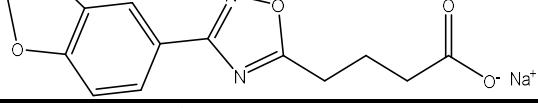
Fonte: A autora (2020).

4.10.4 Avaliação inibitória dos 1,2,4-oxadiazóis: Determinação de CI_{50} e mecanismo de inibição

A série de onze sais sódicos contendo o núcleo 1,2,4-oxadiazólico foi testada como inibidores da RL_AeHKT pela nova metodologia aqui desenvolvida. Cada composto foi testado em duplicada, em cinco concentrações e os dados de porcentagem de atividade em relação ao logaritmo da concentração do inibidor foram plotados para construção da curva dose-resposta

e estimativa da concentração inibitória de 50% da atividade enzimática (CI_{50}) destes compostos (Tabela 25). Em todos os experimentos, um controle negativo (sem inibidor) foi testado simultaneamente para ser considerado o valor máximo da porcentagem de atividade.

Tabela 25 - Estruturas químicas dos inibidores contendo o núcleo 1,2,4-oxadiazólico e seus respectivos valores de concentração inibitória de 50% da atividade enzimática (CI_{50}).

Código	Estrutura molecular do inibidor	CI_{50} (μM) ^a
4a		72 ± 1
4b		101 ± 1
4c		64 ± 1
4d		110 ± 1
4e		88 ± 1
4f		54 ± 1
4g		63 ± 1
4h		70 ± 1
4i		42 ± 1
4j		294 ± 1
4k		87 ± 1

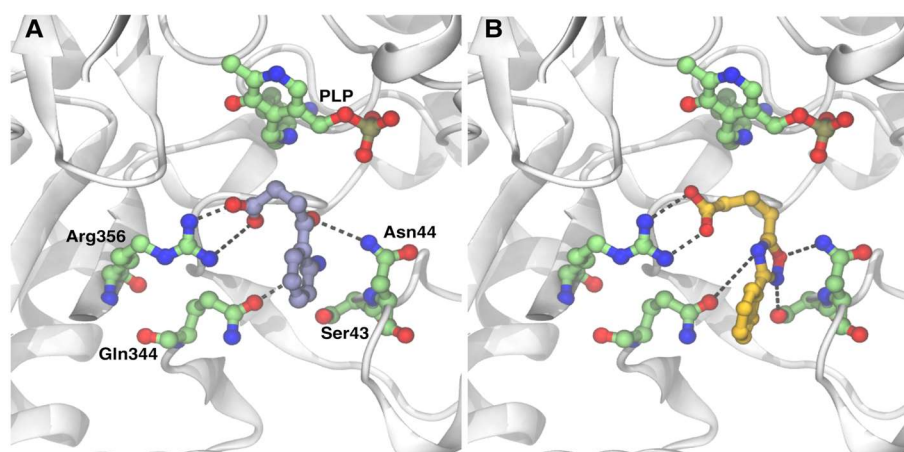
^aOs compostos foram testados nas concentrações de 500, 250, 100, 75 e 50 μM . A concentração de 500 μM foi substituída por 450, 300 e 300 μM , respectivamente, nos compostos 4b, 4j e 4k para melhor estimativa dos valores de CI_{50} . Os valores de CI_{50} estão dispostos como valor médio com o desvio padrão.

Fonte: A autora (2020).

Os valores de CI_{50} obtidos para esta série de compostos variaram entre 42 e 294 μM . Vale ressaltar que esta é a primeira série de inibidores da HKT de *Aedes aegypti* reportada na literatura, tornando estes resultados muito promissores para desenho de novos inibidores da HKT.

Apesar da diversidade química dos substituintes no anel aromático, não foi observada uma tendência clara em relação à estrutura-atividade. Oito dos onze inibidores apresentaram valores de CI_{50} menores que 100 μM e os dois compostos mais potentes apresentaram valores de CI_{50} próximos a 50 μM (**4i**, CI_{50} = 42 μM e **4f**, CI_{50} = 54 μM). O composto **4i** possui um átomo de iodo na posição *para* do anel aromático, indicando que grupos volumosos, macios e eletronegativos favorecem a atividade inibitória. Contudo, os compostos **4d** e **4j** (contendo os substituintes brometo e cloreto, respectivamente) localizados na mesma posição no anel aromático apresentaram apenas inibição moderada. Apesar disso, é possível observar que grupos volumosos na posição *meta* do anel aromático favorecem a atividade inibitória, como é o caso dos compostos **4c**, **4f**, **4g** e **4k** que apresentaram CI_{50} menor que 100 μM . Essa baixa influência da substituição aromática na inibição corrobora com o trabalho anterior publicado pelo nosso grupo de pesquisa, já que esses substituintes estão parcialmente posicionados para fora do sítio ativo, em contato com o solvente (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Esse posicionamento é similar ao observado para o inibidor cocrystalizado da AgHKT (Figura 51).

Figura 51 – Comparação do modo de ligação do inibidor cocrystalizado 4-OB (ácido 4-(2-aminofenil)-4-oxobutírico) (A) e o composto canônico **4a** (B), observado a partir dos cálculos de *Docking Molecular*. O composto 4-OB é mostrado em lilás, enquanto o composto **4a** está mostrado em laranja.

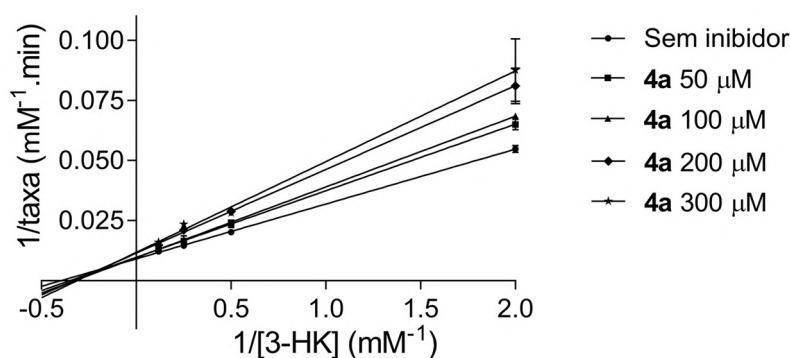


Fonte: A autora (2020); Adaptado de (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Portanto, esses dados estão consistentes com os cálculos de *Docking* Molecular realizado pelo nosso grupo de pesquisa (OLIVEIRA et al., 2013), confirmando que esta série de derivados 1,2,4-oxadiazólicos são inibidores da HKT de *Aedes aegypti*.

A partir da confirmação da atividade inibitória desta série de compostos, foi investigado o mecanismo de inibição a partir dos dados cinéticos na ausência (0 μM) e presença em quatro concentrações (50, 100, 200 e 300 μM) do composto canônico **4a**. Os dados do recíproco da taxa (1/taxa) em relação ao recíproco da concentração de substrato (1/concentração de 3-HK) foram plotados e o perfil do gráfico foi analisado de acordo com os estudos de Lineweaver e Burk (LINEWEAVER; BURK, 1934). Diferentes tipos de inibição podem ser inferidos a partir de mudanças na inclinação da reta (relacionado ao V_{MAX}) ou localização na intersecção no eixo Y (relacionado à razão K_M/V_{MAX}) em relação à cinética sem inibidor do gráfico de Lineweaver-Burk. No caso do composto **4a**, foram observadas alterações nos dois parâmetros, o que indica o tipo de inibição não-competitiva mista, ou seja, o composto **4a** pode se ligar tanto à enzima livre, como no complexo enzima-substrato (Figura 52). Ainda assim, a regressão não-linear dos dados de taxa em relação à concentração do substrato apresentou valor de alfa (α) igual a 3,4, indicando a preferência do inibidor à enzima livre ($\alpha > 1$).

Figura 52 – Perfil cinético da RL_AeHKT na ausência (0 μM) e presença (50, 100, 200 e 300 μM) do inibidor **4a**. O substrato 3-D,L-HK foi testado nas concentrações de 0,5, 2, 4 e 8,5 mM. O aumento da inclinação das retas com o aumento da concentração de inibidor e a ausência da intersecção das retas no eixo Y (variações em K_M e V_{MAX}) caracterizam o mecanismo de inibição como não-competitivo misto.



Fonte: A autora (2020).

Esse tipo de inibição também foi observado em ensaios da enzima alanina-glioxilato transaminase utilizando o piruvato como inibidor (CELLINI *et al.*, 2007). Esta enzima e a RL_AeHKT compartilham 44% de identidade e 67% de similaridade em suas sequências de aminoácidos e ambas são enzimas PLP dependentes. A partir da regressão não-linear dos dados

brutos, foi estimada a constante de inibição (K_I) do composto canônico **4a** e esta é igual a 360 μM , sendo este valor similar ao observado para o composto 4-OB ($K_I = 300 \mu\text{M}$) (ROSSI *et al.*, 2006). Juntamente com os estudos de *Docking* Molecular realizados por Oliveira e colaboradores, este é mais um indício de que esta série de compostos apresenta comportamento similar ao inibidor cocrystalizado com a enzima AgHKT e pode ser usada para guiar o desenho de inibidores mais potentes para HKT.

5 CONCLUSÕES

Visando a investigação da atividade inibitória de 1,2,4-oxadiazóis frente à HKT de *Aedes aegypti*, foi realizada a clonagem, expressão e purificação da enzima recombinante de linhagens de *Aedes aegypti*: *Rockefeller* e *RecLab*. Ambas apresentaram ótimos rendimentos de purificação na ordem de miligramas por litro de cultura.

Experimentos de cristalografia de macromoléculas por meio de difração de raios-X foram executados para elucidar a estrutura tridimensional desta enzima. A estrutura HKT proveniente da linhagem *RecLab* foi determinada com sucesso e está disponível no Banco de Dados de Proteínas como 6MFB. Problemas com cristais geminados (*twinned*) foram encontrados em todos os cristais da HKT de linhagem *Rockefeller*. Apesar disto dificultar o processamento e refinamento dos dados cristalográficos, esforços estão sendo aplicados para resolver a estrutura da HKT dessa linhagem.

Uma vez que métodos cromatográficos para avaliação de ensaios biológicos são de alto custo devido ao uso de colunas cromatográficas e solventes na fase móvel, uma metodologia foi desenvolvida baseada na detecção espectrofotométrica do complexo AX-Fe³⁺ a 570 nm. Além de ser mais rápida por suprimir o tempo de corrida dos métodos cromatográficos, permite a avaliação simultânea de amostras pois utiliza placas de 96 poços. Esta metodologia é abrangente para avaliação de inibidores que contenham diversos grupos funcionais, exceto para grupos altamente conjugados que apresentem absorção em comprimentos de onda na região visível do espectro eletromagnético.

A partir desta metodologia, foi feita a caracterização cinética da HKT proveniente da linhagem *RecLab* e suas constantes de Michaelis-Menten e eficiência catalítica resultaram em valores comparáveis aos descritos na literatura. A série de onze derivados de 1,2,4-oxadiazóis foi testada e apresentou concentrações inibitórias de 50% da atividade enzimática (CI₅₀) entre 42 e 294 µM, atuando como inibidores não competitivos. Esta é a primeira série de inibidores da enzima HKT de *Aedes aegypti* descrita na literatura e servirá como base para o desenho de novos inibidores mais potentes em relação à esta enzima.

6 PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, pretende-se realizar simulações computacionais de dinâmica molecular e cálculos de energia livre para identificar grupos funcionais no inibidor e resíduos na enzima responsáveis pela interação alvo-inibidor.

Em seguida, o planejamento racional e a síntese de inibidores mais potentes em relação à enzima HKT de *Aedes aegypti* serão viabilizados e os ensaios *in vitro* serão realizados utilizando a metodologia aqui desenvolvida.

As etapas computacionais e experimentais de síntese e avaliação *in vitro* serão executadas até que se obtenha um composto líder com alta potência e especificidade para a enzima HKT.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, P. D. *et al.* PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 66, n. 2, p. 213–221, 2010. DOI 10.1107/S0907444909052925. .

ADAMS, P. D. *et al.* PHENIX: Building new software for automated crystallographic structure determination. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 58, n. 11, p. 1948–1954, 2002. DOI 10.1107/S0907444902016657. .

ADXV. Adxv – A Program to Display X-ray Diffraction Images. 2013. Disponível em: <http://www.scripps.edu/~arvai/adxv.html>.

AFONINE, P. V. *et al.* Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 68, n. 4, p. 352–367, 2012. DOI 10.1107/S0907444912001308. .

AGILENT TECHNOLOGIES. QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit. v. 200521, n. 5, p. 1158–60, 1162, 1164–5, 2002. DOI PMID:12449398. Disponível em: <http://www.genomics.agilent.com/files/Manual/200521.pdf>.

BORA, R. *et al.* [1, 2, 4]-Oxadiazoles: Synthesis and Biological Applications. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 4, p. 355–369, abr. 2014. DOI 10.2174/1389557514666140329200745. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-5575&volume=14&issue=4&spage=355>.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 279–293, 2007a. DOI 10.5123/S1679-49742007000400006. Disponível em: scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742007000400006&lng=en&nrm=iso&tlng=en.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 295–302, 2007b. DOI 10.5123/S1679-49742007000400007. Disponível em: http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742007000400007&lng=en&nrm=iso&tlng=en.

49742007000400007&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt.

CALLENDER, D. M. Management and control of yellow fever virus: Brazilian outbreak January-April, 2018. **Global Public Health**, v. 14, n. 3, p. 445–455, 4 mar. 2019. DOI 10.1080/17441692.2018.1512144. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/17441692.2018.1512144>.

CANAVESI, R. *et al.* Study of *Anopheles gambiae* 3-hydroxykynurenine transaminase activity and inhibition by LC-MS/MS method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 173, p. 154–161, 2019. DOI 10.1016/j.jpba.2019.05.025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.05.025>.

CELLINI, B. *et al.* Human wild-type alanine:glyoxylate aminotransferase and its naturally occurring G82E variant: functional properties and physiological implications. **Biochemical Journal**, v. 408, n. 1, p. 39–50, 15 nov. 2007. DOI 10.1042/BJ20070637. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2049084&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

CHEN, V. B. *et al.* MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 66, n. 1, p. 12–21, 2010. DOI 10.1107/S0907444909042073. .

CHEN, Y.; GUILLEMIN, G. J. Kynurenine Pathway Metabolites in Humans: Disease and Healthy States. **International Journal of Tryptophan Research**, v. 2, n. 1, p. 1–19, 8 jan. 2009. DOI 10.4137/IJTR.S2097. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.4137/IJTR.S2097>.

CLEMENTS, A. N. **The biology of mosquitoes. v.1.** [s.l.: s.n.], 1992.

DAWSON, N. L. *et al.* CATH: An expanded resource to predict protein function through structure and sequence. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D289–D295, 2017. DOI 10.1093/nar/gkw1098. .

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. Von. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de saúde pública**, v. 51, n. 0, p. 10–15, 2017. DOI 10.1590/s1518-8787.2017051006889. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-

89102017000100606&lng=en&tlng=en.

ECHOLS, N. *et al.* Graphical tools for macromolecular crystallography in PHENIX. **Journal of Applied Crystallography**, v. 45, n. 3, p. 581–586, 2012. DOI 10.1107/S0021889812017293. .

EMSLEY, P. *et al.* Features and development of Coot. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 66, n. 4, p. 486–501, 2010. DOI 10.1107/S0907444910007493.

EVANS, P. R. An introduction to data reduction: Space-group determination, scaling and intensity statistics. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 67, n. 4, p. 282–292, 2011. DOI 10.1107/S090744491003982X. .

FERREIRA, K. V. *et al.* Histórico da febre amarela no Brasil e a importância da vacinação antiamarílica. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, v. 36, n. 1, p. 40–47, 2011. .

FISCHER, E. H. *et al.* The reaction of sodium borohydride with muscle phosphorylase. v. 80, p. 2906–2907, 1958. .

GARCIA, G. E. *et al.* Xanthurenic Acid Induces Gametogenesis in *Plasmodium*, the Malaria Parasite. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 20, p. 12003–12005, 15 maio 1998. DOI 10.1074/jbc.273.20.12003. Disponível em: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.273.20.12003>.

GASTEIGER, E. *et al.* Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. **The Proteomics Protocols Handbook**. [s.l.: s.n.], 2005. p. 571–607. DOI 10.1385/1592598900.

GOINDIN, D. *et al.* Levels of insecticide resistance to deltamethrin, malathion, and temephos, and associated mechanisms in *Aedes aegypti* mosquitoes from the Guadeloupe and Saint Martin islands (French West Indies). **Infectious Diseases of Poverty**, v. 6, n. 1, p. 1–15, 2017. DOI 10.1186/s40249-017-0254-x. .

GONENNE, A.; ERNST, R. Solubilization of membrane proteins by sulfobetaines, novel zwitterionic surfactants. **Analytical Biochemistry**, v. 87, n. 1, p. 28–38, 1978. DOI 10.1016/0003-2697(78)90565-1. .

GOOD, N. E. *et al.* Hydrogen Ion Buffers for Biological Research. **Analytical Biochemistry**,

v. 104, n. 2, p. 300–310, 1980. DOI 10.1021/bi00866a011. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00866a011>.

GOOD, N. E. *et al.* Hydrogen Ion Buffers for Biological Research. **Biochemistry**, v. 5, n. 2, p. 467–477, fev. 1966. DOI 10.1021/bi00866a011. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00866a011>.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999. Disponível em: <http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>.

HAN, Q. *et al.* Crystal structures of *Aedes aegypti* alanine glyoxylate aminotransferase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 48, p. 37175–37182, 2006. DOI 10.1074/jbc.M607032200. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16990263>.

HAN, Q.; BEERNTSEN, B. T.; LI, J. The tryptophan oxidation pathway in mosquitoes with emphasis on xanthurenic acid biosynthesis. **Journal of Insect Physiology**, v. 53, n. 3, p. 254–263, mar. 2007. DOI 10.1016/j.jinsphys.2006.09.004. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022191006001491>.

HAN, Q.; FANG, J.; LI, J. 3-Hydroxykynurenine Transaminase Identity with Alanine Glyoxylate Transaminase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 18, p. 15781–15787, 3 maio 2002. DOI 10.1074/jbc.M201202200. Disponível em: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M201202200>.

HAN, Q.; LI, J. Comparative characterization of *Aedes* 3-hydroxykynurenine transaminase/alanine glyoxylate transaminase and *Drosophila* serine pyruvate aminotransferase. **FEBS Letters**, v. 527, n. 1–3, p. 199–204, 11 set. 2002. DOI 10.1016/S0014-5793(02)03229-5. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793%2802%2903229-5>.

HASSELL, A. M. *et al.* Crystallization of protein-ligand complexes. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 63, n. 1, p. 72–79, 2006. DOI 10.1107/S0907444906047020. .

HELVECIO, E. *et al.* Polymorphisms in GSTE2 is associated with temephos resistance in *Aedes aegypti*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2019. DOI

10.1016/j.pestbp.2019.10.002. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.10.002>.

INVITROGEN LIFE TECHNOLOGIES. **Growth and Maintenance of Insect Cell Lines**. [s.l.: s.n.], 2002a.

INVITROGEN LIFE TECHNOLOGIES. **InsectSelect Glow System For Detection of Transfected Cells and Stable Expression of Heterologous Proteins in Lepidopteran Insect Cell Lines using pIZT/V5-His**. [s.l.: s.n.], 2002b.

KABSCH, W. XDS. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 66, n. 2, p. 125–132, 2010. DOI 10.1107/S0907444909047337. .

KANTARDJIEFF, K. A.; RUPP, B. Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals. **Protein Science**, v. 12, n. 9, p. 1865–1871, 2003. DOI 10.1110/ps.0350503. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1110/ps.0350503>.

KRISSINEL, E.; HENRICK, K. Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State. **Journal of Molecular Biology**, v. 372, n. 3, p. 774–797, 2007. DOI 10.1016/j.jmb.2007.05.022. .

KUNO, G. Early history of laboratory breeding of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) focusing on the origins and use of selected strains. **Journal of Medical Entomology**, v. 47, n. 6, p. 957–971, 2010. DOI 10.1603/ME10152. .

LASKOWSKI, R. A.; SWINDELLS, M. B. LigPlot + : Multiple Ligand-Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. p. 2778–2786, 2011. DOI 10.1021/ci200227u. .

LEIPNITZ, G. *et al.* In vitro evidence for an antioxidant role of 3-hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid in the brain. **Neurochemistry International**, v. 50, n. 1, p. 83–94, 2007. DOI 10.1016/j.neuint.2006.04.017. .

LEONG, C. S. *et al.* Enzymatic and molecular characterization of insecticide resistance mechanisms in field populations of *Aedes aegypti* from Selangor, Malaysia. **Parasites and Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1–17, 2019. DOI 10.1186/s13071-019-3472-1. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3472-1>.

LEPKOVSKY, S.; NIELSEN, E. A green pigment-producing compound in urine of pyridoxine-

deficient rats. **Journal of Biological Chemistry**, v. 144, p. 135–138, 1942. .

LEPKOVSKY, S.; ROBOZ, E.; HAAGEN-SMIT, A. J. Xanthurenic acid and its role in the tryptophane metabolism of pyridoxine-deficient rats. **Journal of Biological Chemistry**, v. 149, p. 195–201, 1943. .

LI, J.; BEERNTSEN, B. T.; JAMES, A. A. Oxidation of 3-hydroxykynurenine to produce xanthommatin for eye pigmentation: a major branch pathway of tryptophan catabolism during pupal development in the Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti* . **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, n. 4, p. 329–338, abr. 1999. DOI 10.1016/S0965-1748(99)00007-7. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10333572>.

LI, J.; LI, G. Identification of 3-Hydroxykynurenine and Xanthurenic Acid and Quantitation of 3-Hydroxykynurenine Transaminase Activity Using HPLC with Electrochemical Detection. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, 1998. DOI 10.1080/10826079808000531. .

LI, Jianyong; LI, G. Transamination of 3-hydroxykynurenine to produce xanthurenic acid: a major branch pathway of tryptophan metabolism in the mosquito, *Aedes aegypti* , during larval development. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 27, n. 10, p. 859–867, out. 1997. DOI 10.1016/S0965-1748(97)00068-4. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T79-3S6MNBH-6/2/44de50074cdd466df109b04b96dd6a47>.

LIMA-CAMARA, T. N. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. **Revista de saúde pública**, v. 50, p. 1–7, 2016. DOI 10.1590/S1518-8787.2016050006791. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27355468>.

LIMA, V. L. A. *et al.* The Antioxidant Role of Xanthurenic Acid in the *Aedes aegypti* Midgut during Digestion of a Blood Meal. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. e38349, 11 jun. 2012. DOI 10.1371/journal.pone.0038349. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0038349>.

LIN, M. I.; NAGATA, T.; KATAHIRA, M. High yield production of fungal manganese peroxidases by *E. coli* through soluble expression, and examination of the activities. **Protein Expression and Purification**, v. 145, p. 45–52, 2018. DOI 10.1016/j.pep.2017.12.012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.12.012>.

LIN, W. *et al.* A novel zwitterionic copolymer with a short poly(methyl acrylic acid) block for improving both conjugation and separation efficiency of a protein without losing its bioactivity. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n. 19, p. 2482, 2013. DOI 10.1039/c3tb00474k. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3tb00474k>.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 56, n. 3, p. 658–666, mar. 1934. DOI 10.1021/ja01318a036. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja01318a036>.

LIU, N. Insecticide Resistance in Mosquitoes: Impact, Mechanisms, and Research Directions. **Annual review of entomology**, v. 60, n. 1, p. 537–559, 7 jan. 2015. DOI 10.1146/annurev-ento-010814-020828. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-ento-010814-020828>.

MACIEL, L. G. **3-hidróxi-quinurenina transaminase de *Aedes aegypti*: clonagem, expressão, avaliação funcional e síntese de prováveis inibidores seletivos**. 2016. Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

MADDISON, D. C.; GIORGINI, F. The kynurenine pathway and neurodegenerative disease. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 40, p. 134–141, 2015. DOI 10.1016/j.semcdb.2015.03.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.03.002>.

MAYER, S. V.; TESH, R. B.; VASILAKIS, N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. **Acta Tropica**, v. 166, p. 155–163, fev. 2017. DOI 10.1016/j.actatropica.2016.11.020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.11.020>.

MAZZENGA, G. C.; BERNER, B. Transport The transdermal delivery of zwitterionic drugs I: the solubility of zwitterion salts. **Journal of Controlled Release**, v. 16, p. 77–88, 1991. .

MCCOY, A. J. *et al.* Phaser crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, n. 4, p. 658–674, 2007. DOI 10.1107/S0021889807021206. .

METZ, S. W.; PIJLMAN, G. P. Arbovirus vaccines; opportunities for the baculovirus-insect cell expression system. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 107, n. SUPPL., p. S16–S30, 2011. DOI 10.1016/j.jip.2011.05.002. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2011.05.002>.

MITTAL, S. **Targeting the broadly pathogenic Kynurenine pathway**. [s.l.: s.n.], 2015.

MOHAN, S.; PINTO, B. M. Zwitterionic glycosidase inhibitors: salacinol and related analogues. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 12–13, p. 1551–1580, 2007. DOI 10.1016/j.carres.2007.05.014. .

MÜLLER, I. Guidelines for the successful generation of protein-ligand complex crystals. **Acta Crystallographica Section D: Structural Biology**, v. 73, n. 2, p. 79–92, 2017. DOI 10.1107/S2059798316020271. .

OLIVEIRA, V. S. *et al.* The enzyme 3-hydroxykynurenine transaminase as potential target for 1,2,4-oxadiazoles with larvicide activity against the dengue vector *Aedes aegypti*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 22, p. 6996–7003, nov. 2013. DOI 10.1016/j.bmc.2013.09.020. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089613008006>.

OYSTON, P.; ROBINSON, K. The current challenges for vaccine development. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, p. 889–894, 2012. DOI 10.1099/jmm.0.039180-0. .

PANG, W.; TOM, S. C.; ZHENG, Y. T. Current peptide HIV type-1 fusion inhibitors. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 20, n. 1, p. 1–18, 2009. DOI 10.3851/IMP1369. .

POTTERTON, E. *et al.* A graphical user interface to the CCP4 program suite research papers A graphical user interface to the CCP4 program suite. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, p. 1131–1137, 2003. .

POWELL, J. R.; TABACHNICK, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*-a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 11–17, 2013. DOI 10.1590/0074-0276130395. .

ROBERT, X.; GOUET, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. W1, p. 320–324, 2014. DOI 10.1093/nar/gku316. Disponível em: <http://esript.ibcp.fr>.

ROMAO, T. P. *et al.* A second independent resistance mechanism to *Bacillus sphaericus* binary

toxin targets its alpha-glucosidase receptor in *Culex quinquefasciatus*. **FEBS Journal**, v. 273, n. 7, p. 1556–1568, abr. 2006. DOI 10.1111/j.1742-4658.2006.05177.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-4658.2006.05177.x>.

ROSSI, F. *et al.* Crystal structure of human kynurenine aminotransferase II, a drug target for the treatment of schizophrenia. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 6, p. 3559–3566, 2008. DOI 10.1074/jbc.M707925200. .

ROSSI, F. *et al.* Crystal structure of the *Anopheles gambiae* 3-hydroxykynurenine transaminase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 15, p. 5711–5716, 11 abr. 2006. DOI 10.1073/pnas.0510233103. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16585514>.

ROSSI, F. *et al.* Identification and biochemical characterization of the *Anopheles gambiae* 3-hydroxykynurenine transaminase. **FEBS Journal**, v. 272, n. 21, p. 5653–5662, nov. 2005. DOI 10.1111/j.1742-4658.2005.04961.x. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16262702>.

SCHNEIDER, G.; KÄCK, H.; LINDQVIST, Y. The manifold of vitamin B6 dependent enzymes. **Structure**, v. 8, n. 1, p. 1–6, 2000. DOI 10.1016/S0969-2126(00)00085-X. .

SCHRÖDINGER, L. The PyMOL Molecular Graphics System. [s.d.]. .

SCHWARCZ, R. The kynurenine pathway of tryptophan degradation as a drug target. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 4, n. 1, p. 12–17, fev. 2004. DOI 10.1016/j.coph.2003.10.006. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471489203002029>.

SECRETARIA DE VIGILANCIA EM SAÚDE. Monitoramento Dos Casos E Óbitos De Febre Amarela No Brasil - Informe – Nº 43/2017. p. 1–7, 2017. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/02/COES-FEBRE-AMARELA---INFORME-43---Atualiza----o-em-31maio2017.pdf>.

STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. **Protein Expression and Purification**, v. 41, n. 1, p. 207–234, 2005. DOI 10.1016/j.pep.2005.01.016. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046592805000264>.

SUKHRALIA, S. *et al.* From dengue to Zika: the wide spread of mosquito-borne arboviruses.

European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, v. 38, n. 1, p. 3–14, 28 jan. 2019. DOI 10.1007/s10096-018-3375-7. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10096-018-3375-7>.

TERWILLIGER, T. C. *et al.* Iterative model building, structure refinement and density modification with the PHENIX AutoBuild wizard. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 64, n. 1, p. 61–69, 2007. DOI 10.1107/S090744490705024X.

THE INTERNATIONAL UNION OF CRYSTALLOGRAPHY. R-factor: Online dictionary of crystallography. 2017. Disponível em: http://reference.iucr.org/dictionary/R_factor. Acesso em: 24 maio 2018.

THE LION King, Direção de Roger Allers e Rob Minkoff. Estados Unidos: Walt Disney Feature Animation, 1994. 1 fita de vídeo (89 min) VHS, son. color.

THE UNIPROT CONSORTIUM. Ongoing and future developments at the Universal Protein Resource. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. SUPPL. 1, p. 214–219, 2011. DOI 10.1093/nar/gkq1020. .

TIEMANN, F. No Title. **Chem. Ber.**, v. 17, p. 126–129, 1884. .

TOCAJ, A. *et al.* High Level Expression of Protein L, an Immunoglobulin-Binding Protein, in *Escherichia coli*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, n. 1, p. 1–5, 1995. .

VAGIN, A. A. *et al.* REFMAC5 dictionary: Organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 60, n. 12 I, p. 2184–2195, 2004. DOI 10.1107/S0907444904023510. .

VALLE, D. *et al.* Resistance to temephos and deltamethrin in *aedes aegypti* from Brazil between 1985 and 2017. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, n. 3, p. 1–17, 2019. DOI 10.1590/0074-02760180544. .

VONRHEIN, C. *et al.* Data processing and analysis with the autoPROC toolbox. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 67, n. 4, p. 293–302, 2011. DOI 10.1107/S0907444911007773. .

VUILLARD, L. *et al.* Protein crystallography with non-detergent sulfobetaines. **Journal of**

Crystal Growth, v. 168, p. 150–154, 1996. .

VUILLARD, L.; BRAUN-BRETONT, C.; RABILLOUDET, T. Non-detergent sulphobetaines : protein purification a new class of mild solubilization agents for. **Biochemical Journal**, v. 305, p. 337–343, 1995. .

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Research**, v. 85, n. 2, p. 328–345, fev. 2010. DOI 10.1016/j.antiviral.2009.10.008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166354209004951>.

WILD, C. T. *et al.* Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 21, p. 9770–9774, 1994. DOI 10.1073/pnas.91.21.9770. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.91.21.9770>.

WLODAWER, A. *et al.* **Protein Crystallography - Methods and Protocols**. [s.l.: s.n.], 2017. v. 1607. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7000-1>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides**. World Health Organization. [s.l.: s.n.], 2005. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/2005/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf?ua=1.

ZARA, A. L. de S. A. *et al.* Estratégias de controle do Aedes aegypti: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 1–2, 2016. DOI 10.5123/S1679-49742016000200017. Disponível em: http://www.iec.pa.gov.br/template_doi_ess.php?doi=10.5123/S1679-49742016000200391&scielo=S2237-96222016000200391.

ZWART, P. H.; GROSSE-KUNSTLEVE, R. W.; ADAMS, P. D. Xtriage and Fest: automatic assessment of X-ray data and substructure structure factor estimation. 2005. .

APÊNDICE A – CARACTERIZAÇÃO COMPLETA E ESPECTROS DE RMN ^1H E ^{13}C DA SÉRIE DE ONZE SAIS SÓDICOS DERIVADOS DE 1,2,4-OXADIAZÓIS.

4-(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio (4a): sólido branco; rendimento: 89 %; P.F.: 225-226°C; RMN de ^1H (D_2O , 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 1,87 (q; 2H; $J=7,2$ Hz, 7,6 Hz; CH_2); 2,15 (t; 2H; $J=7,2$ Hz; CH_2); 2,75 (t; 2H; $J=7,6$ Hz; CH_2); 7,29-7,40 (m; 3H; $\text{H}_{\text{aromático}}$); 7,61 (dd; 2H; $J=7,6$ Hz, 1,6 Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$). RMN de ^{13}C (D_2O) $\delta(\text{ppm})$: 25,3; 28,2; 39,2; 127,8; 129,6; 131,7; 134,3; 170,0; 183,4; 184,5. I.V. (pastilha de KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1545 (C=O); 1475 (C=N); 1260 (N-O). Análise Elementar Calculada: C, 56.70; H, 4.36; N, 11.02; Na, 9.04; O, 18.88. Análise Elementar Encontrada: C, 55.93; H, 4.18; N, 10,70.

4-(3-(4-metoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio (4b): sólido branco; rendimento: 91%; P.F.: 243-244°C; RMN de ^1H (D_2O , 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 1,88 (q; 2H; $J=7,6$ Hz, 7,6 Hz; CH_2); 2,17 (t; 2H; $J=7,6$ Hz; CH_2); 2,76 (t; 2H; $J=7,6$ Hz; CH_2); 3,65 (s; 3H; CH_3); 6,74 (d; 2H; $J=8,8$ Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$); 7,46 (d; 2H; $J=8,8$ Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$). RMN de ^{13}C (D_2O) $\delta(\text{ppm})$: 25,3; 28,2; 39,2; 57,9; 116,8; 120,4; 131,3; 163,9; 169,6; 183,1; 184,4. I.V. (pastilha de KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1545 (C=O); 1487 (C=N); 1259 (N-O). Análise Elementar Calculada: C, 54.93; H, 4.61; N, 9.86; Na, 8.09; O, 22.52. Análise Elementar Encontrada: C, 53.88; H, 4.66; N, 9.52.

4-(3-(3,4-diclorofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio (4c): sólido branco; rendimento: 90%; P.F.: 244-245°C; RMN de ^1H (D_2O , 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 1,97 (q; 2H; $J=7,2$ Hz, 7,6 Hz; CH_2); 2,21 (t; 2H; $J=7,2$ Hz; CH_2); 2,91 (t; 2H; $J=7,6$ Hz; CH_2); 7,36 (d; 1H; $J=8,8$ Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$); 7,46 (dd; 1H; $J=8,8$ Hz, 2,0 Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$); 7,62 (d; 1H; $J=2,0$ Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$). RMN de ^{13}C (D_2O) $\delta(\text{ppm})$: 25,3; 28,3; 39,1; 127,9; 129,0; 131,1; 133,6; 135,1; 137,7; 168,4; 184,0; 184,5. I.V. (pastilha de KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1550 (C=O); 1478 (C=N); 1258 (N-O). Análise Elementar Calculada: C, 44.61; H, 2.81; Cl, 21.95; N, 8.67; Na, 7.12; O, 14.86. Análise Elementar Encontrada: C, 43.77; H, 2,78; N, 8.40.

4-(3-(4-bromofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio (4d): sólido branco; rendimento: 92%; P.F.: 285-286°C; RMN de ^1H (D_2O , 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 1,93 (q; 2H; $J=7,2$ Hz, 7,6 Hz; CH_2); 2,19 (t; 2H; $J=7,2$ Hz; CH_2); 2,86 (t; 2H; $J=7,6$ Hz; CH_2); 7,36 (d; 2H; $J=8,4$ Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$); 7,42 (d; 2H; $J=8,4$ Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$). RMN de ^{13}C (D_2O) $\delta(\text{ppm})$: 25,3; 28,3; 39,2; 126,8; 128,2; 131,1; 134,6; 169,4; 183,7; 184,5. I.V. (pastilha de KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1543 (C=O); 1478 (C=N); 1263 (N-O). Análise Elementar Calculada: C, 43.27; H, 3.03; Br, 23.99; N, 8.41; Na, 6.90; O, 14.41. Análise Elementar Encontrada: C, 42.53; H, 2,98; N, 8.09.

4-(3-(4-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio (4e): sólido branco; rendimento: 91%; P.F.: 246-247°C; RMN de ^1H (D_2O , 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 1,90 (q; 2H; $J=8,0$ Hz, 7,6 Hz; CH_2); 2,16 (t; 2H; $J=7,6$ Hz; CH_2); 2,22 (s, 1H, CH_3); 2,80 (t; 2H; $J=8,0$ Hz; CH_2); 7,16 (d; 2H; $J=8,0$ Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$); 7,56 (d; 2H; $J=8,0$ Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$). RMN de ^{13}C (D_2O) $\delta(\text{ppm})$: 23,2; 25,3; 28,2; 39,1; 125,0; 129,7; 132,3; 145,3; 170,1; 183,4; 184,6. I.V. (pastilha de KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1541 ($\text{C}=\text{O}$); 1482 ($\text{C}=\text{N}$); 1330 ($\text{N}-\text{O}$). Análise Elementar Calculada: C, 58.21; H, 4.88; N, 10.44; Na, 8.57; O, 17.89. Análise Elementar Encontrada: C, 57.53; H, 4.57; N, 10.06.

4-(3-(3-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio (4f): sólido branco; rendimento: 83%; P.F.: 244-245°C; RMN de ^1H (D_2O , 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 1,91 (q; 2H; $J=7,6$ Hz, 7,2 Hz; CH_2); 2,18 (t; 2H; $J=7,2$ Hz; CH_2); 2,22 (s, 1H, CH_3); 2,82 (t; 2H; $J=7,6$ Hz; CH_2); 7,51 - 7,24 (m; 4H; $\text{H}_{\text{aromático}}$). RMN de ^{13}C (D_2O) $\delta(\text{ppm})$: 23,0; 25,2; 28,2; 38,9; 126,7; 127,9; 130,1; 131,6; 135,0; 141,9; 170,2; 183,4; 184,3. I.V. (pastilha de KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1541 ($\text{C}=\text{O}$); 1482 ($\text{C}=\text{N}$); 1257 ($\text{N}-\text{O}$). Análise Elementar Calculada: C, 58.21; H, 4.88; N, 10.44; Na, 8.57; O, 17.89. Análise Elementar Encontrada: C, 56.58; H, 4.69; N, 9.70.

4-(3-(naftalen-1-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio (4g): sólido branco; rendimento: 79%; P.F.: 195-197°C; RMN de ^1H (D_2O , 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 1,80 (q; 2H; $J=7,2$ Hz, 8,0 Hz; CH_2); 2,11 (t; 2H; $J=7,2$ Hz; CH_2); 2,67 (t; 2H; $J=8,0$ Hz; CH_2); 7,16 - 7,25 (m; 4H; $\text{H}_{\text{aromático}}$); 7,54 (dd; 2H; $J=7,2$ Hz, $J=7,6$ Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$); 8,08 (d; 1H; $J=7,6$ Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$). RMN de ^{13}C (D_2O) $\delta(\text{ppm})$: 25,1; 28,1; 38,9; 124,9; 127,6; 127,6; 129,0; 130,0; 131,1; 131,5; 132,3; 134,4; 135,9; 170,0; 182,3; 184,2. I.V. (pastilha de KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1541 ($\text{C}=\text{O}$); 1477 ($\text{C}=\text{N}$); 1257 ($\text{N}-\text{O}$). Análise Elementar Calculada: C, 63.16; H, 4.31; N, 9.21; Na, 7.56; O, 15.77. Análise Elementar Encontrada: C, 60.94; H, 4.19; N, 8.68.

4-(3-(4-(trifluorometil)fenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio (4h): sólido branco; rendimento: 90%; P.F.: 277-278°C; RMN de ^1H (D_2O , 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 1,95 (q; 2H; $J=7,2$ Hz, 7,6 Hz; CH_2); 2,19 (t; 2H; $J=7,2$ Hz; CH_2); 2,88 (t; 2H; $J=7,6$ Hz; CH_2); 7,60 (d; 2H; $J=8,4$ Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$); 7,79 (d; 2H; $J=8,4$ Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$). RMN de ^{13}C (D_2O) $\delta(\text{ppm})$: 25,3; 28,3; 39,1; 124,9; 127,6; 128,5; 128,6; 130,1; 131,5; 134,7; 135,1; 169,3; 184,0; 184,5. I.V. (pastilha de KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1546 ($\text{C}=\text{O}$); 1482 ($\text{C}=\text{N}$); 1261 ($\text{N}-\text{O}$). Análise Elementar Calculada: C, 48.46; H, 3.13; F, 17.69; N, 8.69; Na, 7.13; O, 14.90. Análise Elementar Encontrada: C, 46.24; H, 3.09; N, 8.34.

4-(3-(4-iodofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio (4i): sólido branco; rendimento: 88%; P.F.: 285-286°C; RMN de ^1H (D_2O , 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 1,96 (q; 2H; $J=7,6$ Hz, 7,6 Hz; CH_2); 2,20 (t; 2H; $J=7,6$ Hz; CH_2); 2,90 (t; 2H; $J=7,6$ Hz; CH_2); 7,40 (d; 2H; $J=7,6$ Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$); 7,68 (d; 2H; $J=7,6$ Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$). RMN de ^{13}C (D_2O) $\delta(\text{ppm})$: 25,3; 28,3; 39,1;

100,6; 127,5; 131,1; 140,8; 169,7; 183,8; 184,5. I.V. (pastilha de KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1541 (C=O); 1472 (C=N); 1257 (N-O). Análise Elementar Calculada: C, 37.92; H, 2.65; I, 33.39; N, 7.37; Na, 6.05; O, 12.63. Análise Elementar Encontrada: C, 37.88; H, 2.85; N, 7.37.

4-(3-(4-clorofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio (4j): sólido branco; rendimento: 89%; P.F.: 277-278°C; RMN de ^1H (D_2O , 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 1,96 (q; 2H; $J=7,6$ Hz, 7,2 Hz; CH_2); 2,19 (t; 2H; $J=7,2$ Hz; CH_2); 2,89 (t; 2H; $J=7,6$ Hz; CH_2); 7,39 (dd; 2H; $J=7,6$ Hz, 2,0 Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$); 7,67 (dd; 2H; $J=7,6$ Hz, 2,0 Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$). RMN de ^{13}C (D_2O) $\delta(\text{ppm})$: 25,3; 28,3; 39,1; 126,7; 131,2; 131,8; 139,8; 169,5; 183,8; 184,6. I.V. (pastilha de KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1546 (C=O); 1477 (C=N); 1257 (N-O). Análise Elementar Calculada: C, 49.93; H, 3.49; Cl, 12.28; N, 9.70; Na, 7.96; O, 16.63. Análise Elementar Encontrada: C, 48.29; H, 3.33; N, 9.23.

4-(3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio (4k): sólido branco; rendimento: 87%; P.F.: 257-259°C; RMN de ^1H (D_2O , 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 1,92 (q; 2H; $J=7,6$ Hz, 7,2 Hz; CH_2); 2,18 (t; 2H; $J=7,6$ Hz; CH_2); 2,83 (t; 2H; $J=7,2$ Hz; CH_2); 5,87 (s, 2H, CH_2); 6,73 (d; 1H; $J=8,4$ Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$); 7,03 (d; 1H; $J=1,6$ Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$); 7,20 (dd; 1H; $J=8,4$ Hz, 1,6 Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$). RMN de ^{13}C (D_2O) $\delta(\text{ppm})$: 25,3; 28,2; 39,1; 104,5; 109,4; 111,3; 121,7; 124,9; 150,2; 152,5; 169,7; 183,3; 184,5. I.V. (pastilha de KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1546 (C=O); 1477 (C=N); 1257 (N-O). Análise Elementar Calculada: C, 52.36; H, 3.72; N, 9.39; Na, 7.71; O, 26.82. Análise Elementar Encontrada: C, 51.26; H, 3.70; N, 9.26.

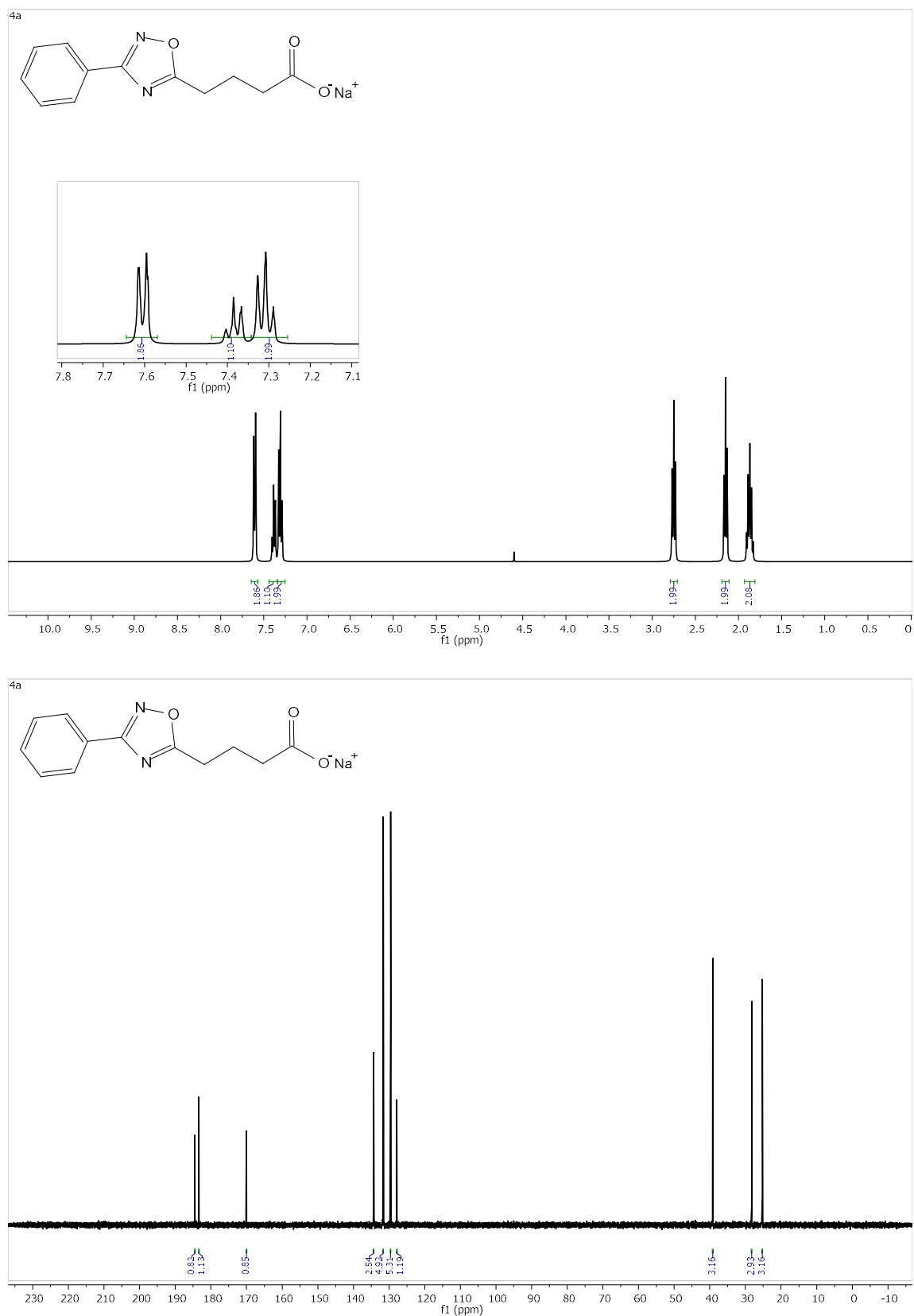


Figura A - Espectros de RMN ^1H e ^{13}C do 4-(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio (4a)

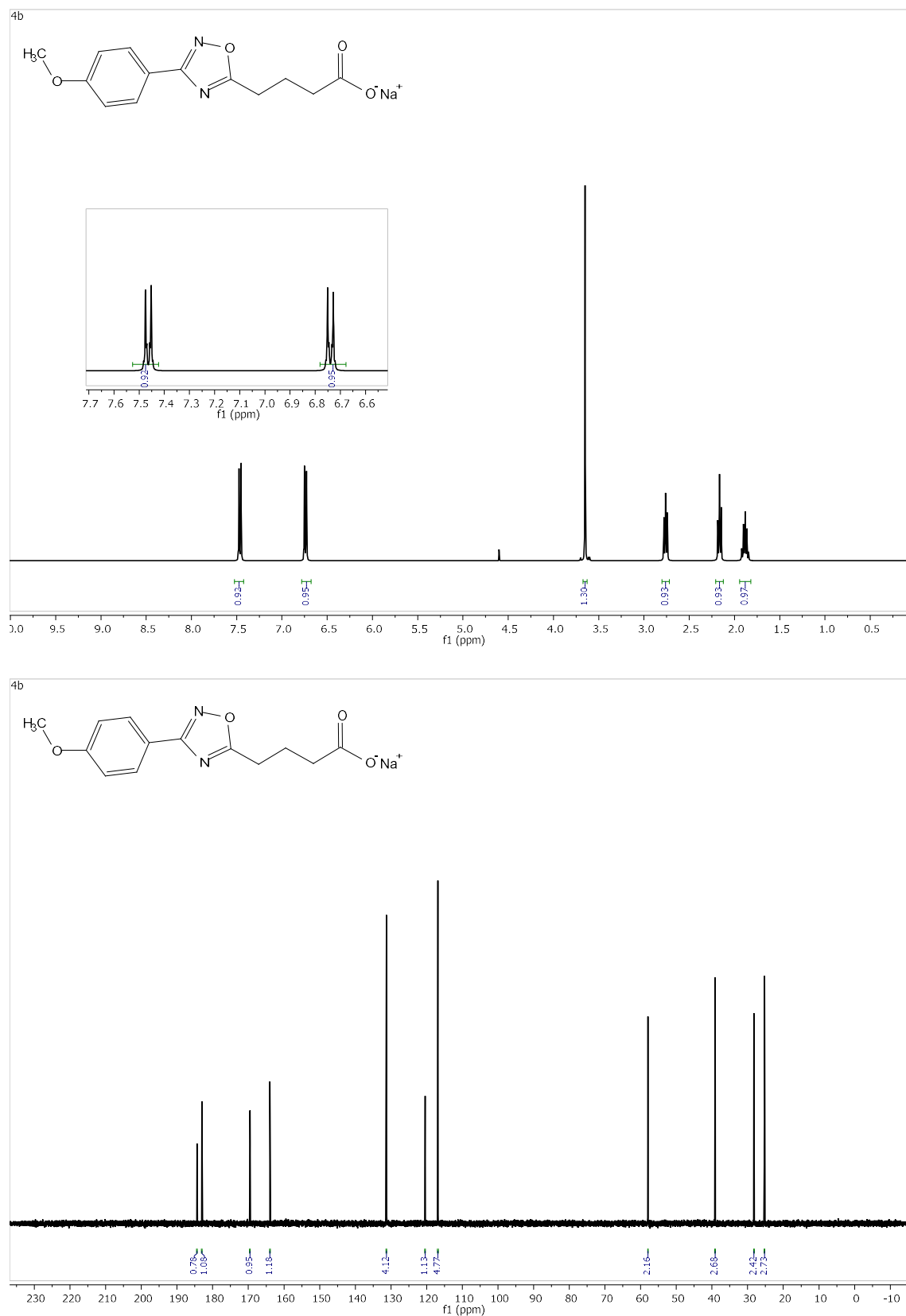


Figura B - Espectros de RMN ^1H e ^{13}C do 4-(3-(4-metoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio (4b)

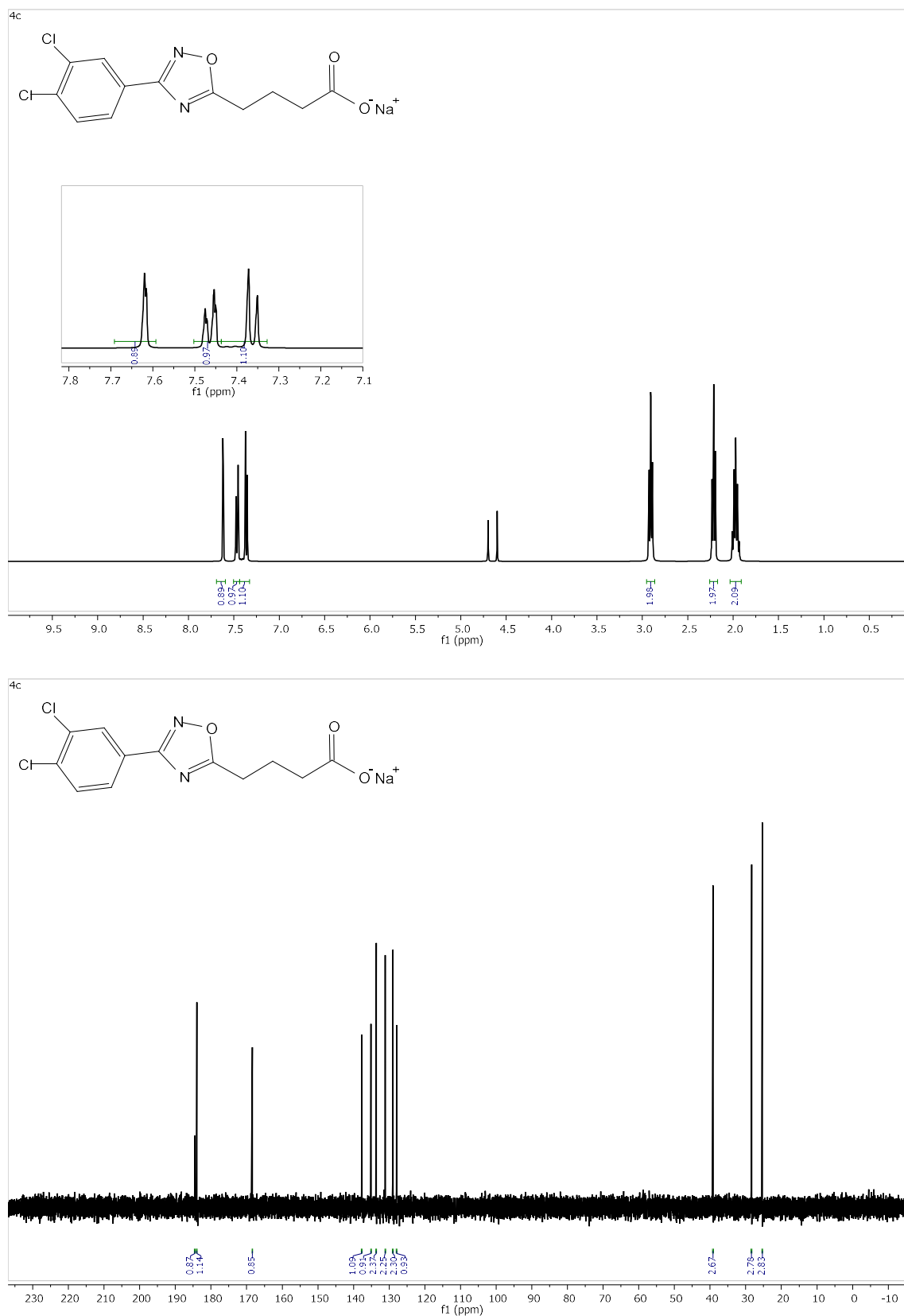


Figura C - Espectros de RMN ^1H e ^{13}C do 4-(3-(3,4-diclorofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio (4c)

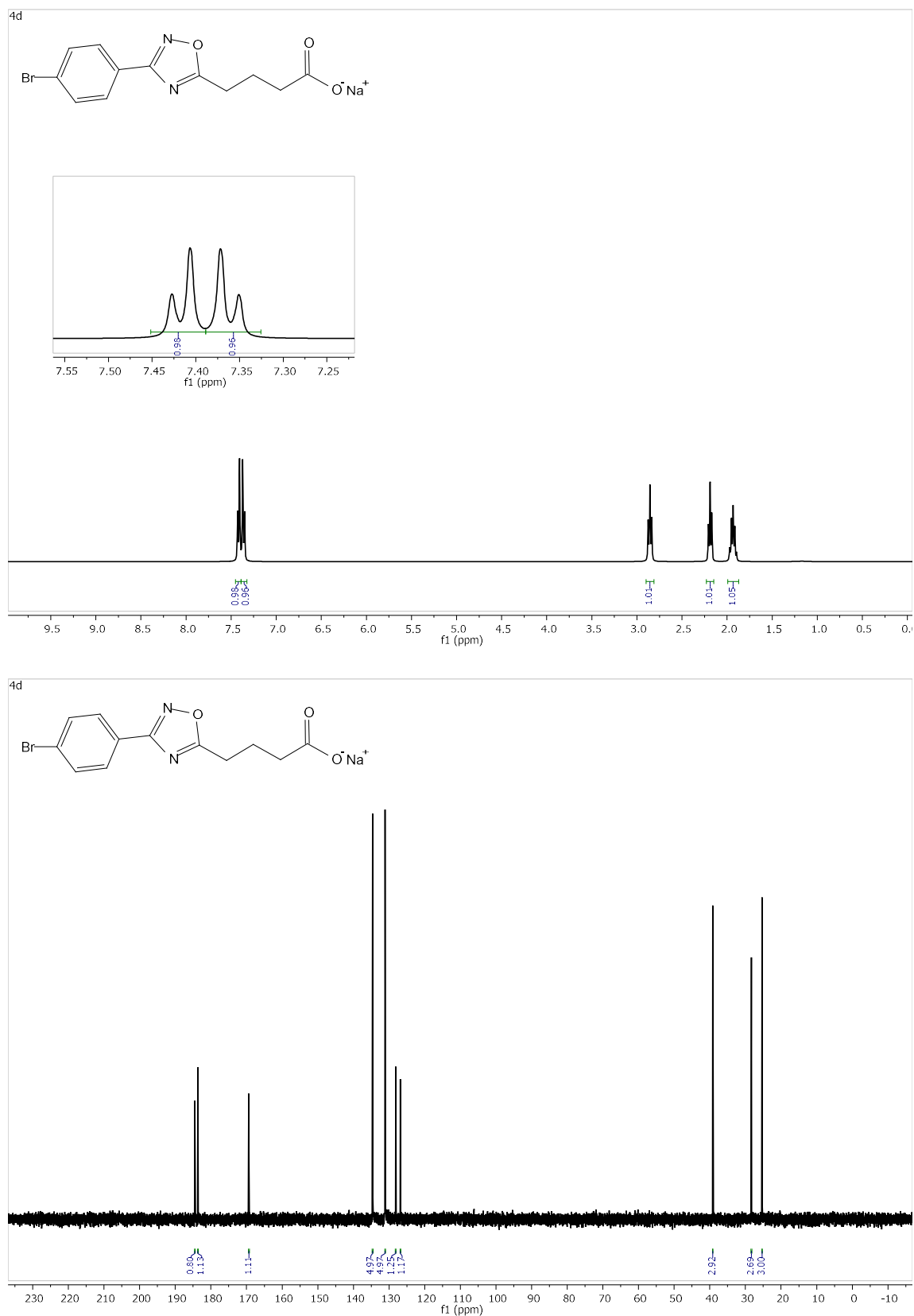


Figura D - Espectros de RMN ^1H e ^{13}C do 4-(3-(4-bromoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio (4d)

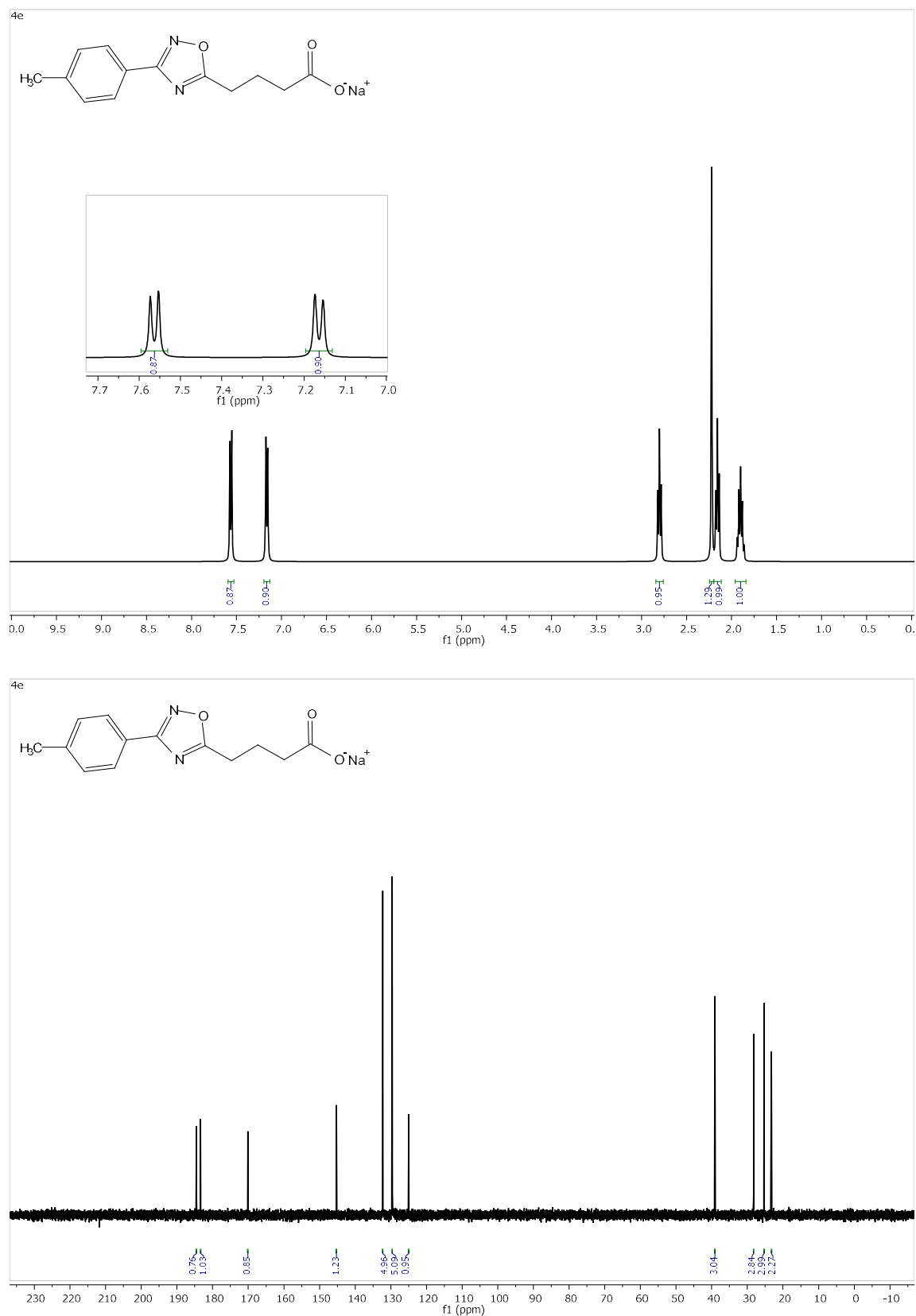


Figura E - Espectros de RMN ^1H e ^{13}C do 4-(3-(4-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio (4e)

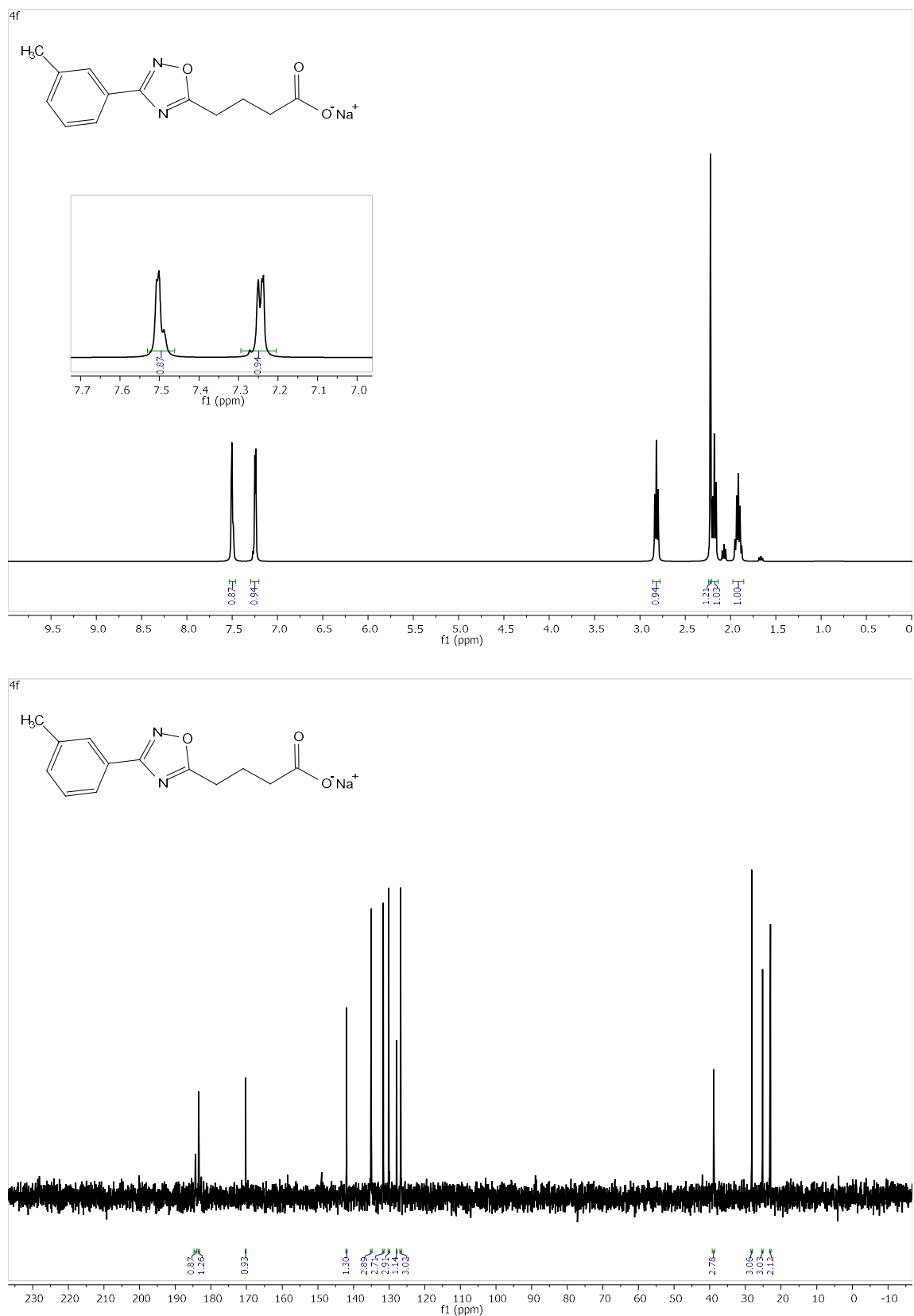
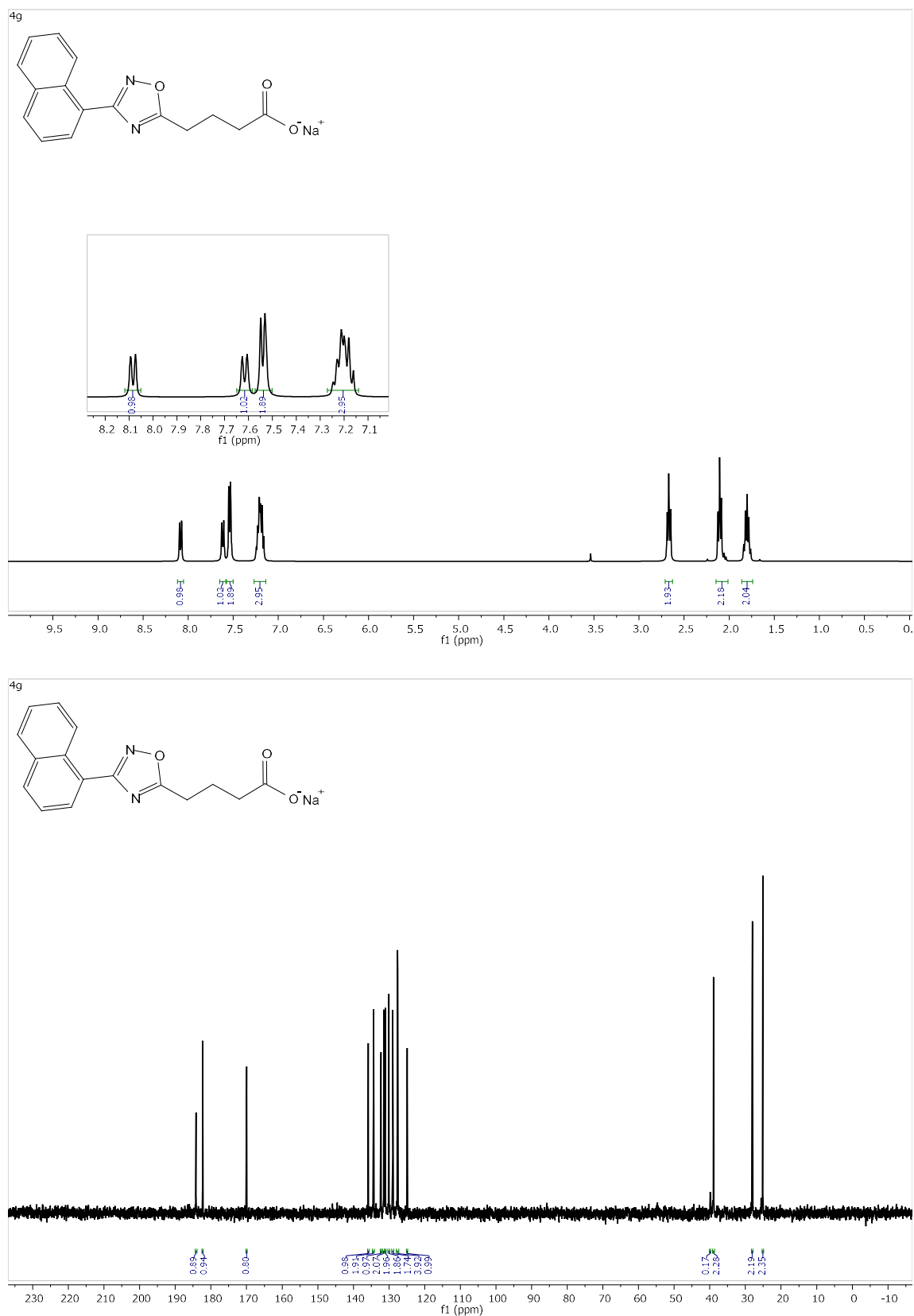


Figura F - Espectros de RMN ^1H e ^{13}C do 4-(3-(3-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio (4f)

Figura G - Espectros de RMN ^1H e ^{13}C do 4-(3-(naftalen-1-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio (4g)

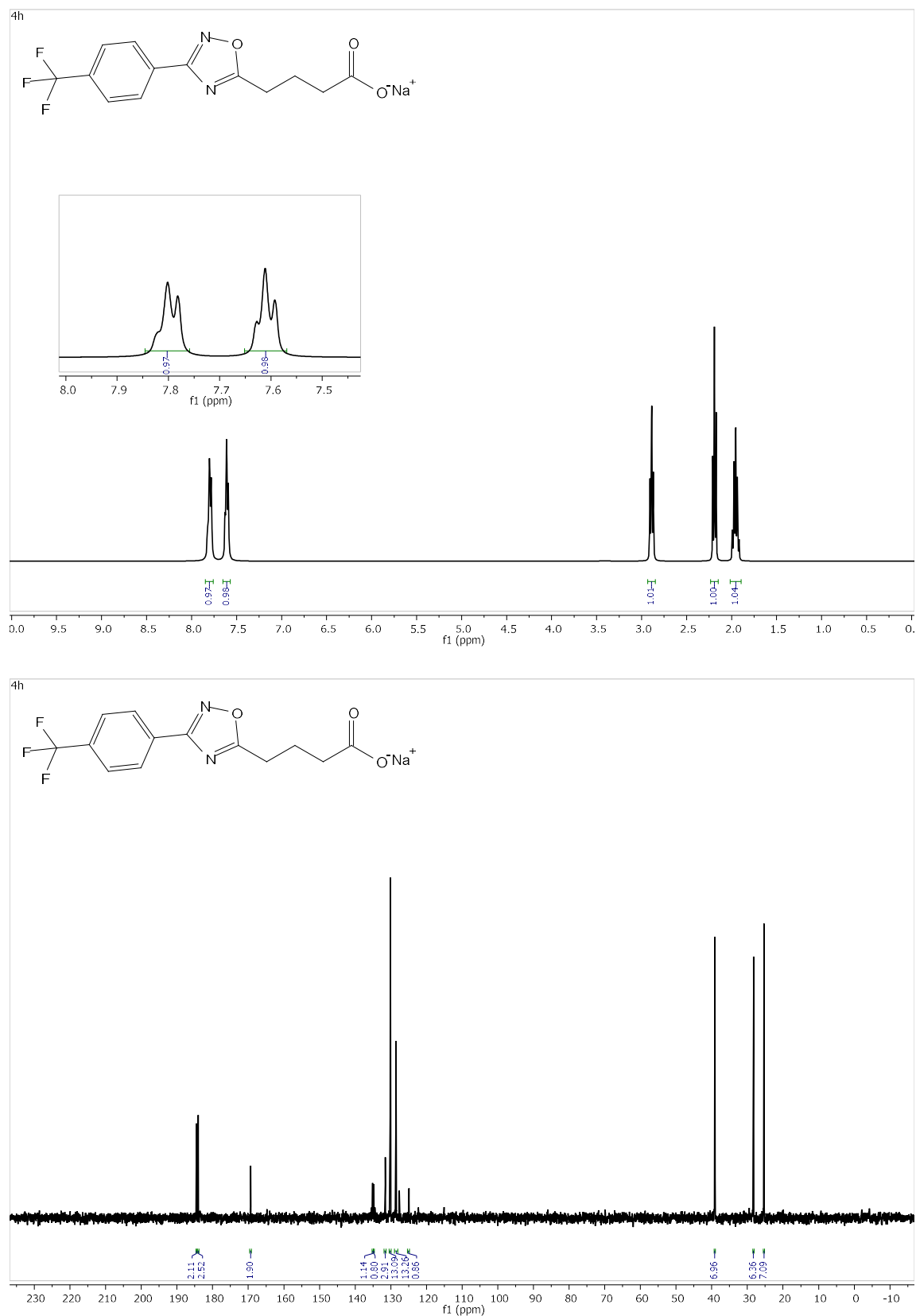


Figura H - Espectros de RMN ¹H e ¹³C do 4-(3-(4-(trifluorometil)fenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio (4h)

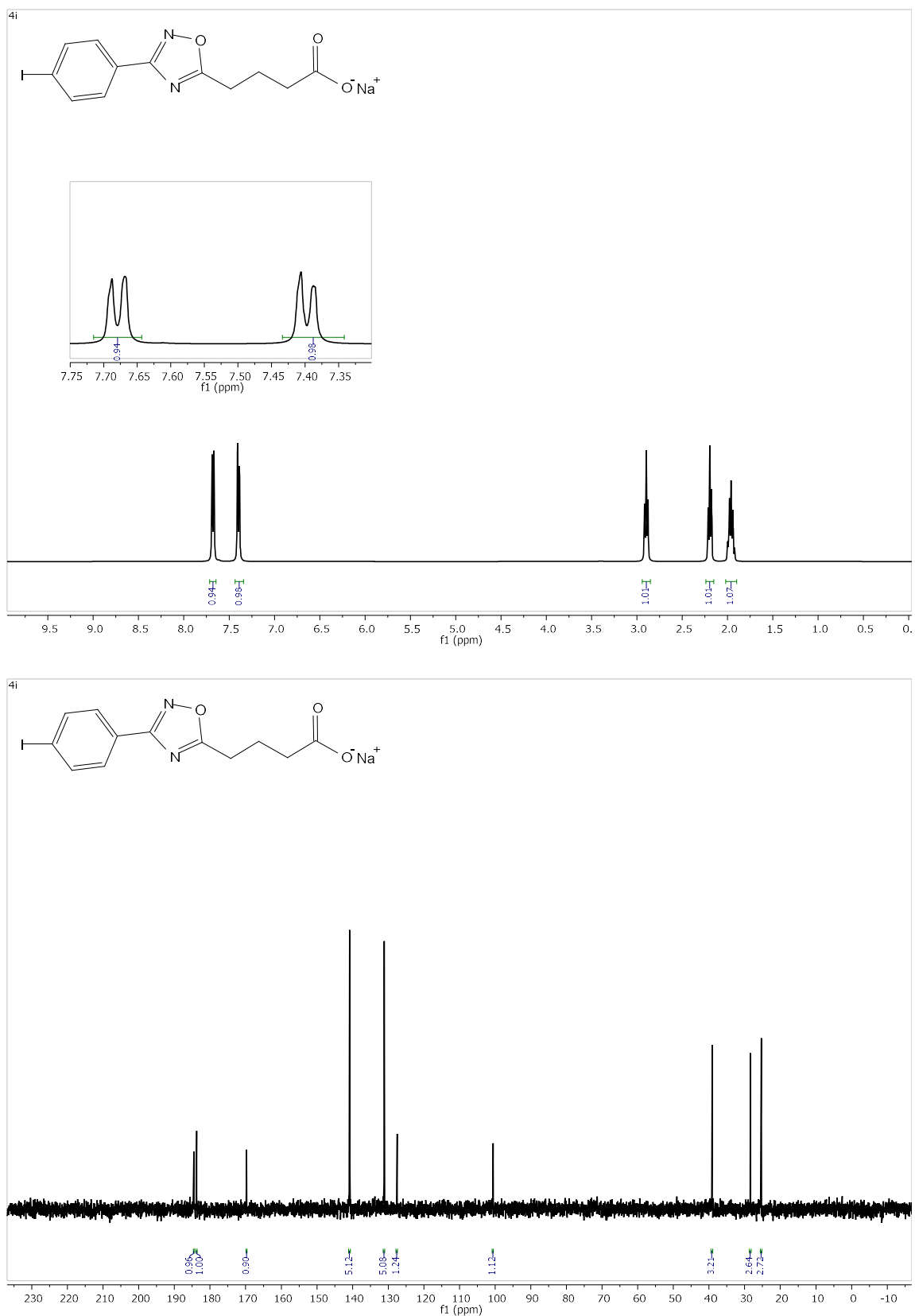


Figura I - Espectros de RMN ¹H e ¹³C do 4-(3-(4-iodofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio (4i)

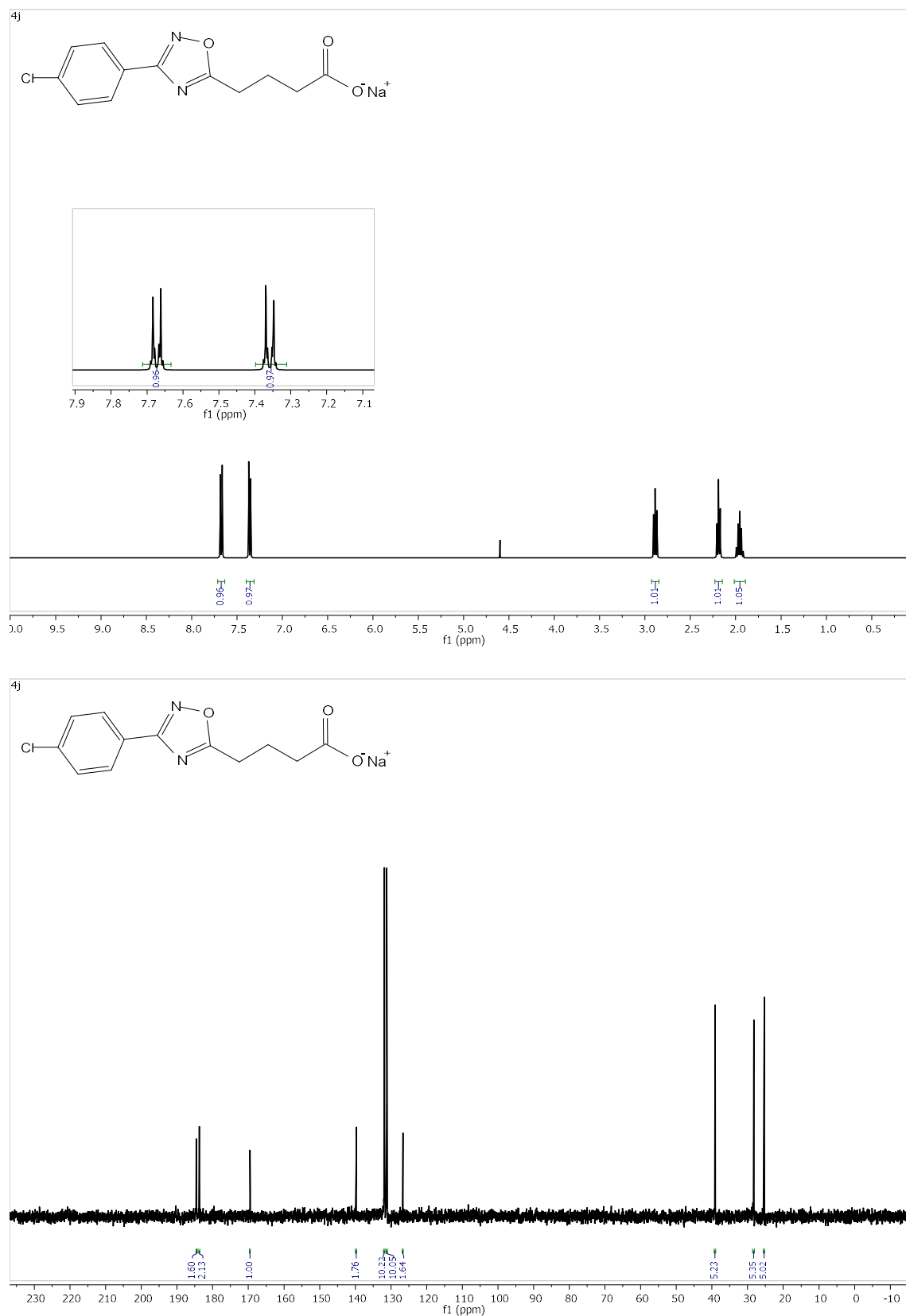


Figura J - Espectros de RMN ¹H e ¹³C do 4-(3-(4-clorofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio (4j)

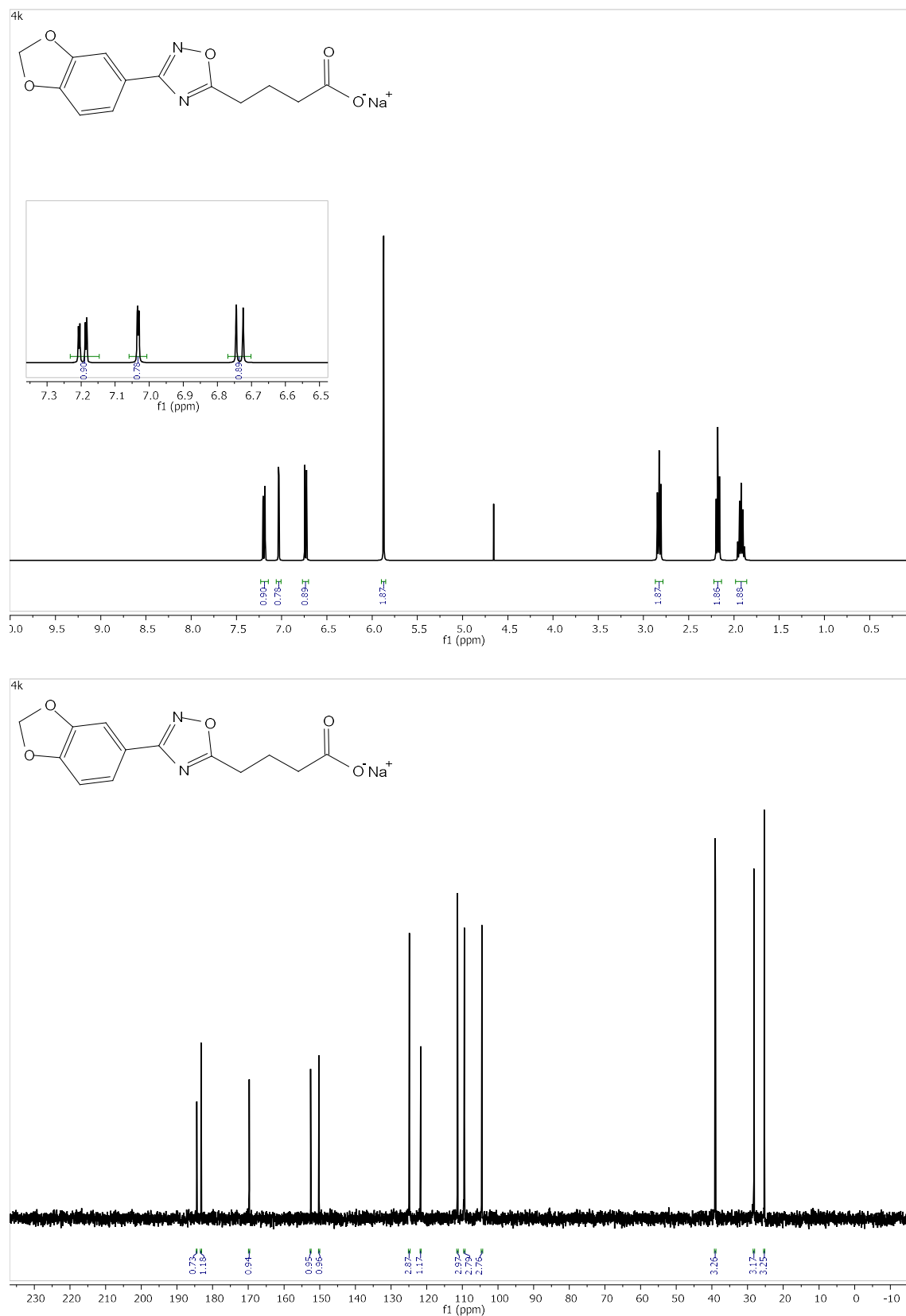


Figura K - Espectros de RMN ¹H e ¹³C do 4-(3-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio (4k)

**APÊNDICE B – ADITIVOS USADOS NA CRISTALIZAÇÃO DA R_{HKT} NO KIT
ADDITIVE SCREEN HT E AS CONCENTRAÇÕES DA PROTEÍNA EM QUE
 FORAM OBSERVADOS CRISTAIS (EM CINZA).**

Aditivo	Concentração R _{HKT}	
	5 mg/mL	10 mg/mL
0,1 M Cloreto de bário di-hidratado		
0,1 M Cloridrato de cádmio		
0,1 M Cloreto de cálcio di-hidratado		
0,1 M Cloreto de cobalto (II) hexahidratado		
0,1 M Cloreto de cobre (II) di-hidratado		
0,1 M Cloreto de magnésio hexahidratado		
0,1 M Cloreto de manganês (II) tetra-hidratado		
0,1 M Cloreto de estrôncio hexahidratado		
0,1 M Cloreto de ítrio (III) hexahidratado		
0,1 M Cloreto de zinco		
0,1 M Cloreto de ferro (III) hexahidratado		
0,1 M Cloreto de níquel (II) hexahidratado		
0,1 M Cloreto de crômio (III) hexahidratado		
0,1 M Acetato hidrato de praseodímio (III)		
1,0 M Sulfato de amônio		
1,0 M Cloreto de potássio		
1,0 M Cloreto de lítio		
2,0 M Cloreto de sódio		
0,5 M Fluoreto de sódio		
1,0 M Iodeto de sódio		
2,0 M Tiocianato de sódio		
1,0 M Tartarato de sódio e potássio tetra-hidratado		
1,0 M Citrato de sódio tribásico di-hidratado		
1,0 M Cloreto de cério		
1,0 M Malonato de sódio pH 7,0		
0,1 M L-Prolina		
0,1 M Fenol		
30% (v/v) Dimetilsulfóxido		
0,1 M Brometo de sódio		
30% (m/v) Ácido 6-aminohexanóico		
30% (m/v) Dicloridrato de 1,5-diaminopentano		
30% (m/v) 1,6-Diaminohexano		
30% (m/v) 1,8-Diaminooctano		
1,0 M Glicina		
0,3 M Triglicina		
0,1 M Taurina		
0,1 M Cloridrato de betaína		
0,1 M Espermidina		
0,1 M Tetracloridrato de espermina		
0,1 M Cloreto de cobalto (III) hexaamina		
0,1 M Sarcosina		
0,1 M Cloridrato de trimetilamina		
1,0 M Cloridrato de guanidina		
0,1 M Uréia		
0,1 M Hidrato de adenina β-nicotinamida dinucleotídeo		

0,1 M Hidrato de adenosina-5'-trifosfatodissódico		
0,1 M Cloridrato de TCEP		
0,01 M GSH (L-Glutationa reduzida), GSSG (L-Glutationa oxidada)		
0,1 M EDTA		
5% (m/v) Polivinilpirrolidona K15		
30% (m/v) Dextran sulfato de sódio		
40% (m/v) Pentaeritritoletoxilato (3/4 EO/OH)		
10% (m/v) Polietilenoglicol 3350		
30% (m/v) D-(+)-Glicose monohidrato		
30% (m/v) Sacarose		
30% (m/v) Xilitol		
30% (m/v) D-Sorbitol		
12% (m/v) Inositol		
30% (m/v) D-(+)-Trehalose di-hidratado		
30% (m/v) D-(+)-Galactose		
30% (m/v) Etilenoglicol		
30% (m/v) Glicerol		
3,0 M NDSB-195		
2,0 M NDSB-201		
2,0 M NDSB-211		
2,0 M NDSB-221		
1,0 M NDSB-256		
0,15 mM CYMAL [®] -7		
20% (m/v) Cloridrato de benzamidina		
5% (m/v) N-óxido de n-dodecil-N,N-dimetilamina		
5% (m/v) N-octil-β-D-glicosídeo		
5% (m/v) N-dodecil-β-D-maltosídeo		
30% (m/v) N-óxido de trimetilamina di-hidratado		
30% (m/v) 1,6-Hexanodiol		
30% (v/v) (+/-)-2-Metil-2,4-pentanodiol		
50% (v/v) Polietilenoglicol 400		
50% (v/v) Jeffamina M-600 pH 7,0		
40% (v/v) 2,5-Hexanodiol		
40% (v/v) (±)-1,3-Butanodiol		
40% (v/v) Polipropilenoglicol P 400		
30% (v/v) 1,4-Dioxano		
30% (v/v) Etanol		
30% (v/v) 2-Propanol		
30% (v/v) Metanol		
10% (v/v) 1,2-Butanodiol		
40% (v/v) <i>tert</i> -Butanol		
40% (v/v) 1,3-Propanodiol		
40% (v/v) Acetonitrila		
40% (v/v) Formamida		
40% (v/v) 1-Propanol		
5% (v/v) Acetato de etila		
40% (v/v) Acetona		
0,25% (v/v) Diclorometano		
7% (v/v) 1-Butanol		
40% (v/v) 2,2,2-Trifluoroetanol		
30% (v/v) 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol		

100% (v/v) Água		
75% (m/v) Ácido tricloroacético		
250 mM L-Arginina		
250 mM L-Arginina		
250 mM Ácido L-glutâmico		
500 mM Glicina		
500 mM L-Prolina		
120 mM L-Histidina		
500 mM β -Alanina		
500 mM L-Serina		
500 mM Dicloridrato de L-arginina etil éster		
500 mM Dicloridrato de L-Argininamida		
500 mM Ácido 6-aminohexanóico		
500 mM Diglicina		
200 mM Triglicina		
5% (m/v) Triptona		
2,5 M Betaínamono-hidrato		
750 mM D-(+)-Trehalose dihidrato		
2 M Xilitol		
2 M D-Sorbitol		
2 M Sacarose		
500 mM Hidroxiectoína		
2,5 M N-óxido de trimetilamina dihidrato		
2 M Metil- α -D-glicopiranosídeo		
10% (v/v) Trietilenoglicol		
500 mM Tetrahidrocloreto de espermina		
500 mM Spermidina		
500 mM Ácido 5-aminovalérico		
500 mM Ácido glutárico		
80 mM Ácido adípico		
500 mM Dicloridrato de etilenodiamina		
500 mM Cloridrato de guanidina		
500 mM Uréia		
500 mM N-Metiluréia		
200 mM N-Etiluréia		
30% (m/v) N-Metilformamida		
3% (m/v) Hipotaurina		
150 mM Cloridrato de TCEP		
20 mM GSH (L-Glutationa reduzida)		
20 mM GSSG (L-Glutationa oxidada)		
5% (m/v) Cloridrato de benzamidina		
50 mM EDTA		
100 mM Cloreto de magnésio hexahidratado		
100 mM Cloreto de cálcio di-hidratado		
100 mM Cloreto de cádmio hidratado		
100 mM Cloreto de cobalto (II) hexahidratado		
1 M Sulfobetaína não-detergente 195 (NDSB-195)		
1 M Sulfobetaína não-detergente 201 (NDSB-201)		
1 M Sulfobetaína não-detergente 211 (NDSB-211)		
1 M Sulfobetaína não-detergente 221 (NDSB-221)		
800 mM Sulfobetaína não-detergente 256 (NDSB-256)		
500 mM Taurina		

500 mM Acetamida		
500 mM Ácido oxálico dihidrato		
500 mM Malonato de sódio pH 7		
500 mM Ácido succínico pH 7		
5% (v/v) Tacsinato pH 7		
25% (m/v) Brometo de tetraetilamônio		
25% (m/v) Acetilcolina		
25% (m/v) Acetato de 1-etil-3-metilimidazol		
25% (m/v) Cloreto de 1-butil-3-metilimidazol		
25% (m/v) Nitrato de etilamônio		
500 mM Sulfato de amônio		
500 mM Cloreto de amônio		
500 mM Sulfato de magnésio hidratado		
500 mM Tiocianato de potássio		
250 mM Cloreto de gadolínio (III) hexahidratado		
250 mM Cloreto de cério		
250 mM Ácido 4-aminobutírico (GABA)		
500 mM Nitrato de lítio		
500 mM Ácido DL-málico pH 7		
500 mM Citrato de lítio tribásico tetra-hidratado		
250 mM Acetato de amônio		
250 mM Benzosulfonato de sódio		
250 mM <i>p</i> -Toluenosulfonato de sódio		
1 M Cloreto de sódio		
1,4 M Cloreto de potássio		
700 mM Fosfato de sódio monobásico monohidratado		
1,3 M Fosfato de potássio dibásico		
1 M Sulfato de sódio deca-hidratado		
1,4 M Cloreto de lítio		
1 M Brometo de sódio		
40% (v/v) Glicerol		
400 mM Cloreto de lítio		
50% (v/v) Glicerol		
10% (v/v) Etilenoglicol		
10% (v/v) Polietilenoglicol 200		
5% (v/v) Polietilenoglicol monometil éter 550		
5% (m/v) Polietilenoglicol monometil éter 750		
50% (v/v) Formamida		
10% (v/v) Polietilenoglicol 400		
25% (v/v) Pentaeritritol etoxilato (15/4 EO/OH)		
10% (m/v) 1,2-Propanodiol		
3% (m/v) Polietilenoglicol monometil éter 1900		
3% (m/v) Polietilenoglicol 3350		
3% (m/v) Polietilenoglicol 8000		
2% (m/v) Polivinilpirrolidona K15		
2% (m/v) Polietilenoglicol 20000		
10 mM (2-Hidroxipropil)- β -ciclodextrina		
80 mM α -Ciclodextrina		
10 mM β -Ciclodextrina		
50 mM Metil- β -ciclodextrina		

Todos os aditivos foram usados na proporção 1:100 na condição de cristalização contendo 0,1 M HEPES-NaOH pH 7,5, 2 M (NH₄)₂SO₄ e 2% PEG 400.

APÊNDICE C – CURVAS DOSE-RESPOSTA DOS ONZE SAIS SÓDICOS DERIVADOS DE 1,2,4-OXADIAZÓIS TESTADOS POR SUA ATIVIDADE INIBITÓRIA FRENTE À ENZIMA HKT DE *AEDES AEGYPTI*, LINHAGEM RECLAB.

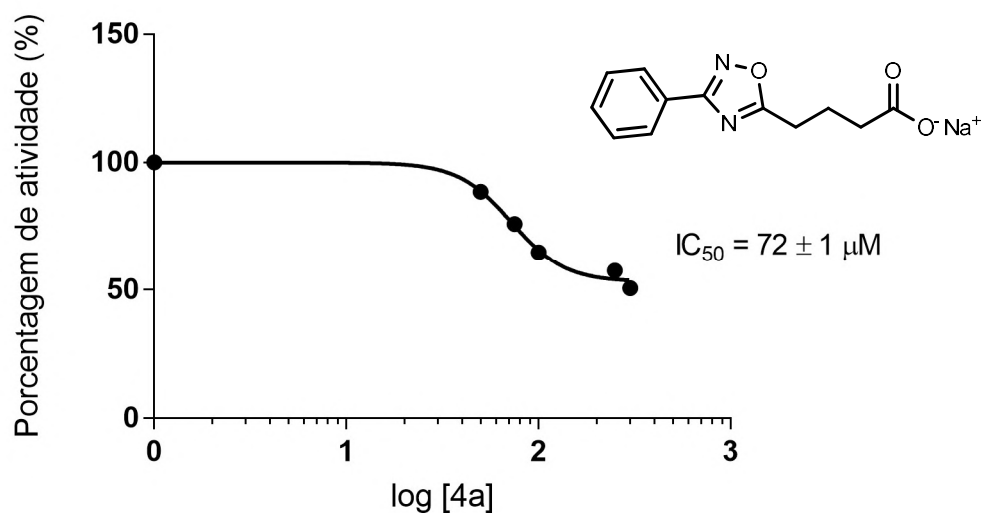


Figura L—Curva dose-resposta da porcentagem de atividade em relação à concentração do composto 4a.

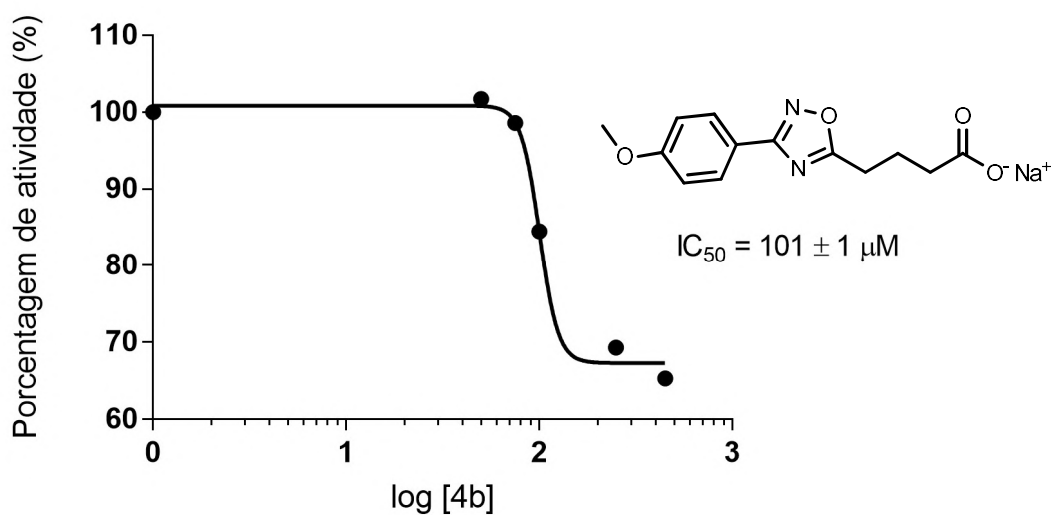


Figura M—Curva dose-resposta da porcentagem de atividade em relação à concentração do composto 4b.

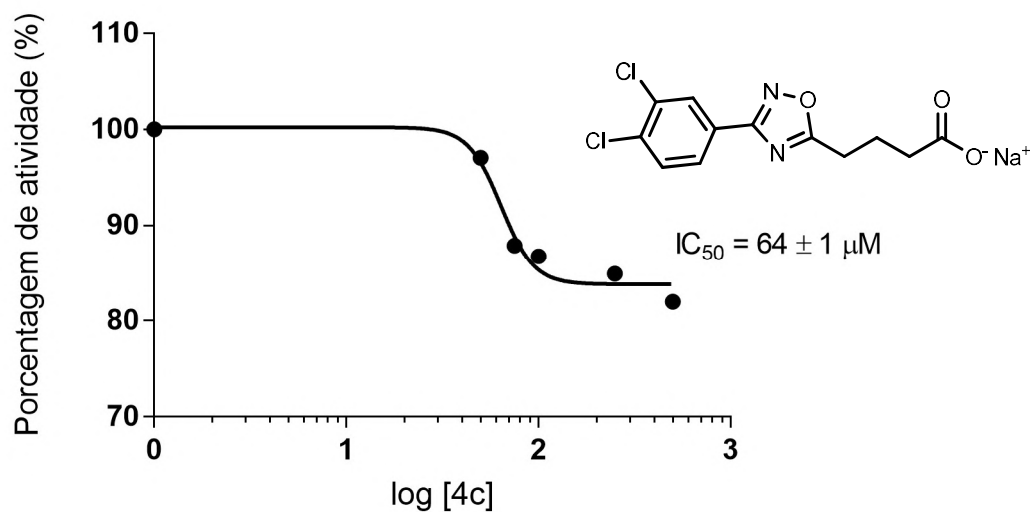


Figura N—Curva dose-resposta da porcentagem de atividade em relação à concentração do composto 4c.

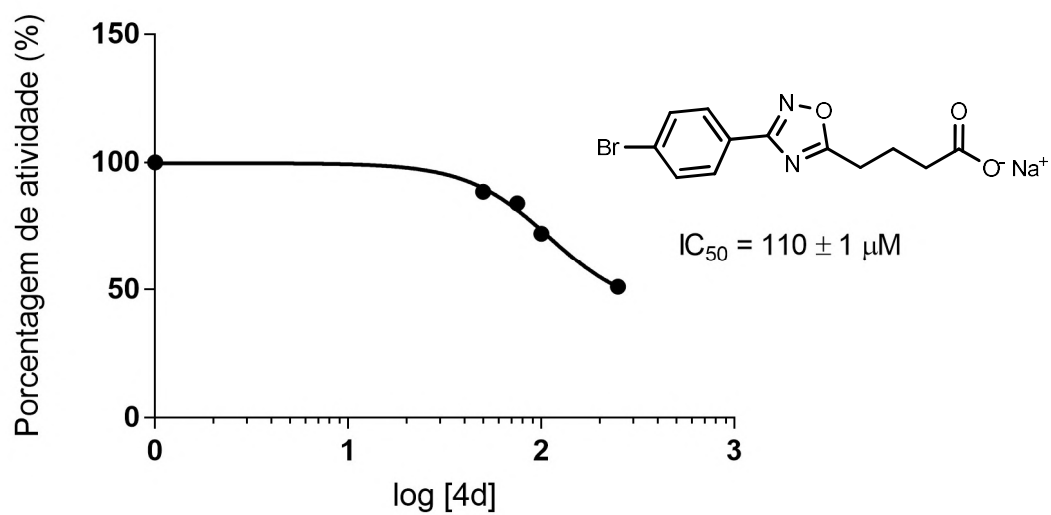


Figura O—Curva dose-resposta da porcentagem de atividade em relação à concentração do composto 4d.

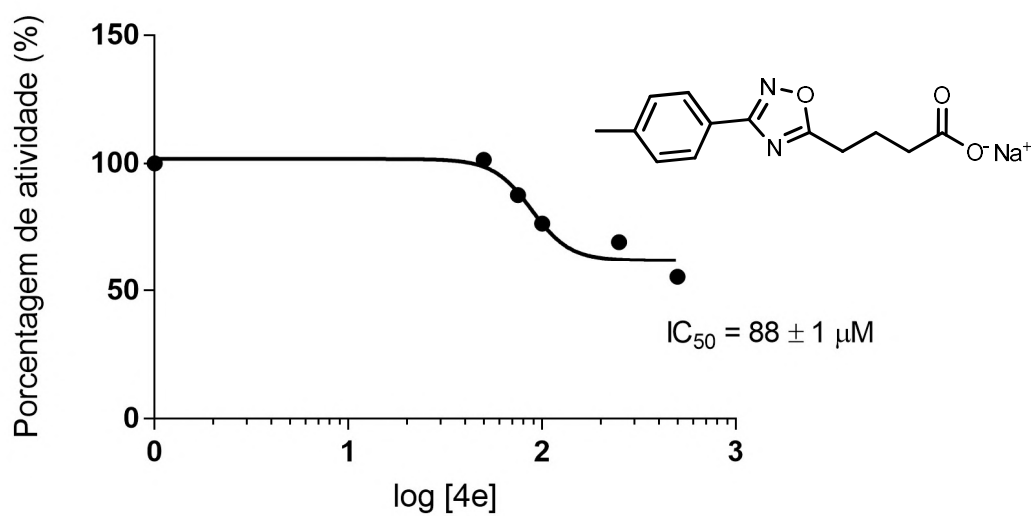


Figura P—Curva dose-resposta da porcentagem de atividade em relação à concentração do composto 4e.

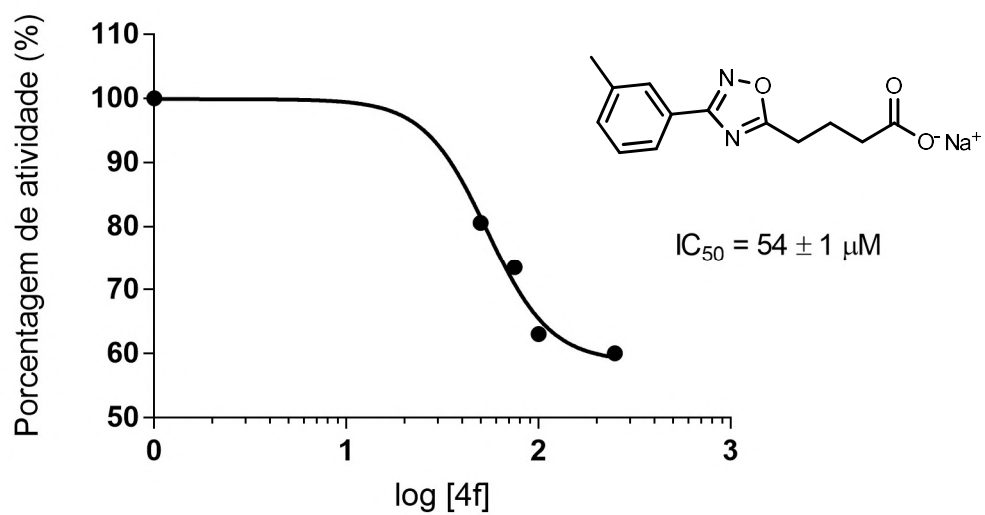


Figura Q—Curva dose-resposta da porcentagem de atividade em relação à concentração do composto 4f.

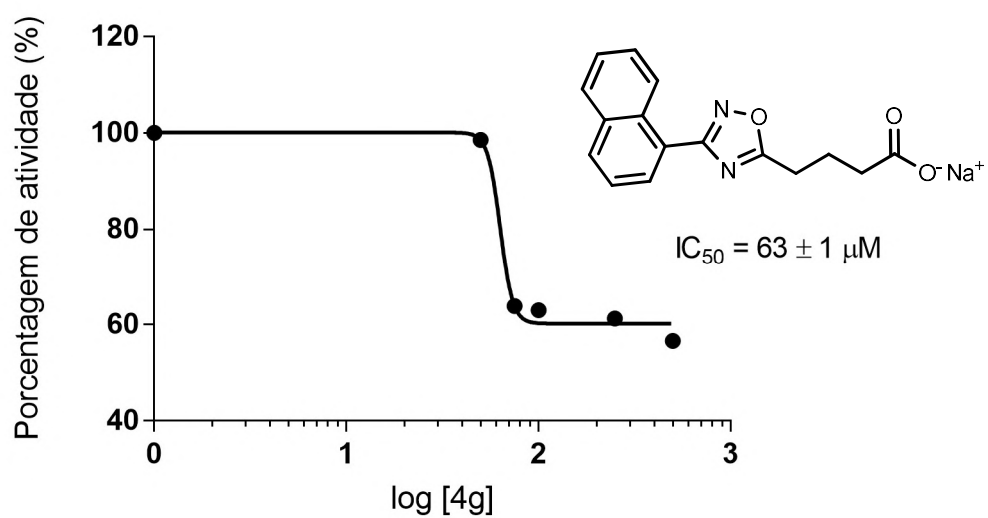


Figura R—Curva dose-resposta da porcentagem de atividade em relação à concentração do composto 4g.

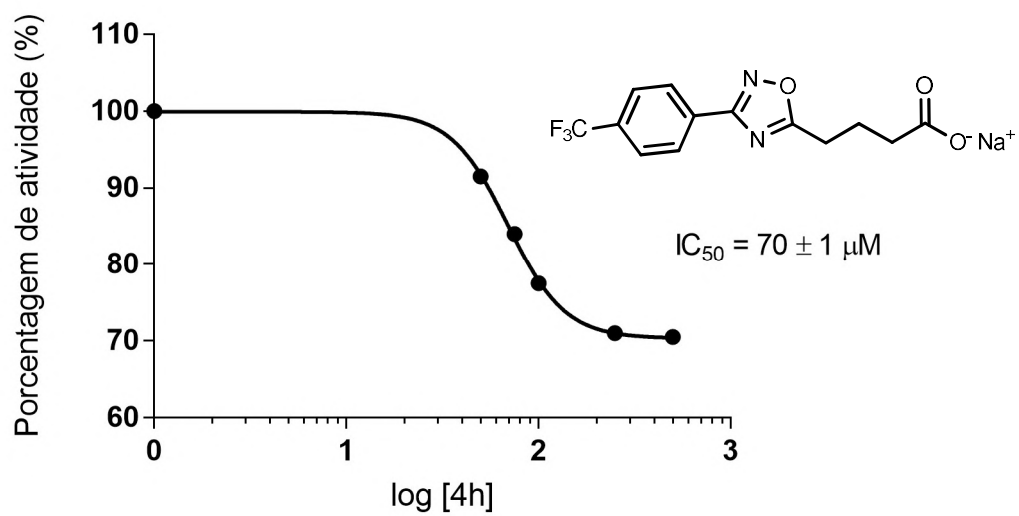


Figura S—Curva dose-resposta da porcentagem de atividade em relação à concentração do composto 4h.

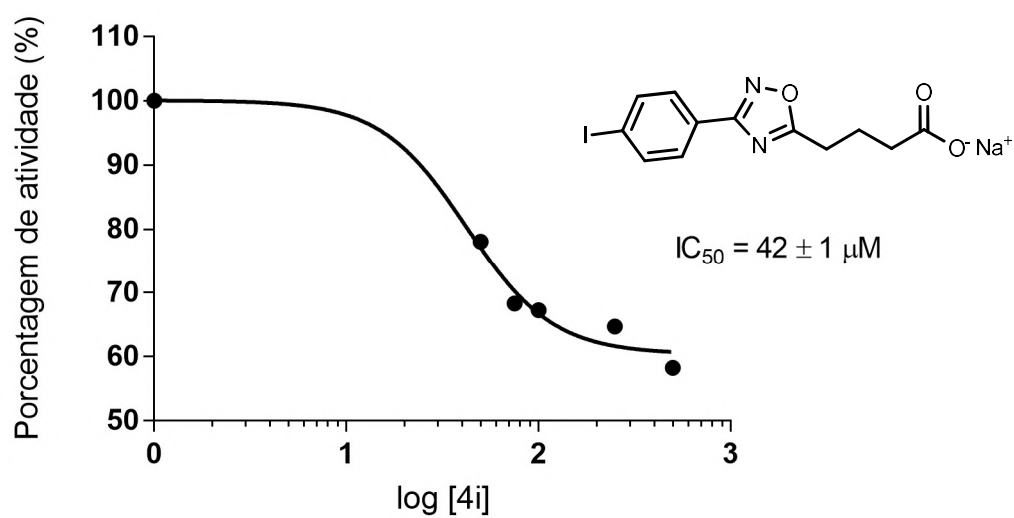


Figura T—Curva dose-resposta da porcentagem de atividade em relação à concentração do composto 4i.

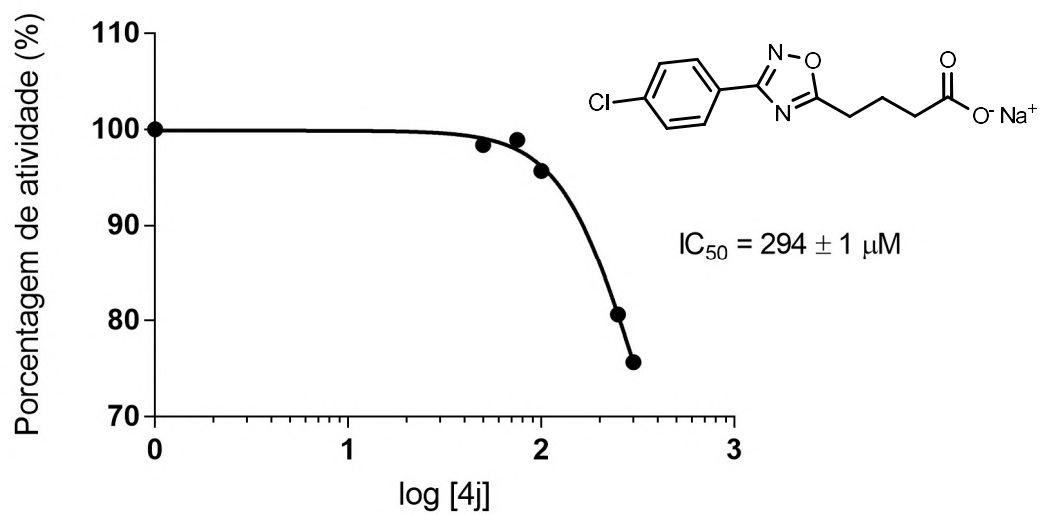


Figura U—Curva dose-resposta da porcentagem de atividade em relação à concentração do composto 4j.

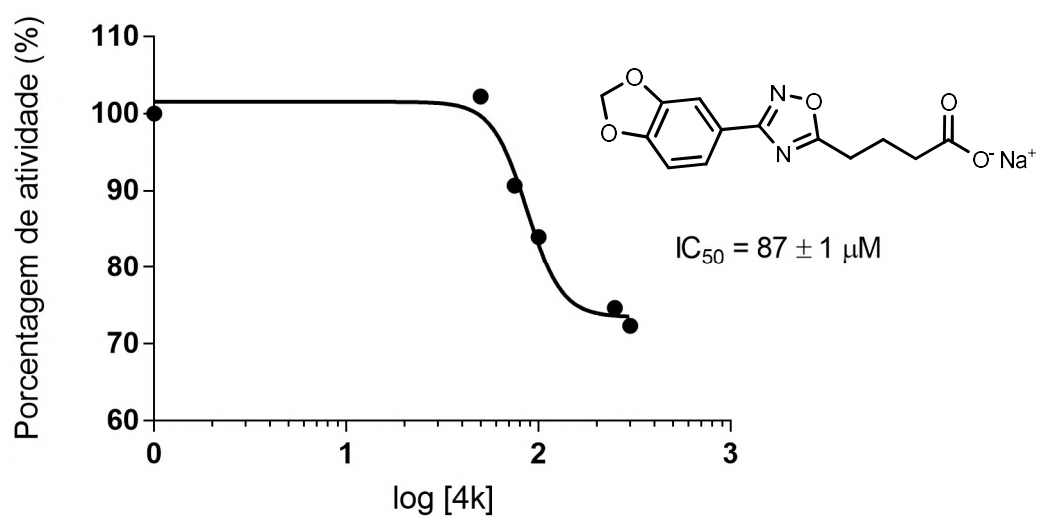


Figura V—Curva dose-resposta da porcentagem de atividade em relação à concentração do composto 4k.

APÊNDICE D – METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO DA CLONAGEM E EXPRESSÃO DA HKT EM CÉLULAS DE INSETO Sf9.

Os tópicos seguintes foram apresentados na Qualificação de Doutorado e decidiu-se que os experimentos seriam descontinuados. Portanto, a título de informação, eles foram movidos para o Apêndice.

Estes tópicos são dependentes das etapas de extração de RNA, RT-PCR e clonagem em pGEM-T *easy*, anteriormente citadas nas subseções 3.5.1 a 3.5.4 da seção de Procedimentos Experimentais.

Digestão com as enzimas de restrição *KpnI* e *XbaI*

A digestão das construções plasmidiais foi realizada com as enzimas de restrição *KpnI* e *XbaI* (NEB®) para liberar o inserto do vetor pGEM-T *easy* e realizar a subclonagem destes insertos no vetor de expressão pIZT. A reação foi realizada com 10 µL das minipreparações, 2 µL de cada enzima de restrição, 4 µL do NEBuffer 2.1 10X e água ultrapura para completar o volume de reação para 40 µL. A reação foi incubada a 37°C por 2 horas.

Subclonagem no plasmídeo de expressão pIZT

O inserto digerido foi purificado com o mesmo *kit* de purificação de PCR e posteriormente inserido ao vetor pIZT, que possibilita a expressão da proteína em células Sf9. A ligação foi realizada em 3 diferentes proporções de DNA:Vetor (1:2, 3:2 e 5:2) e incubadas a 4 °C por 16 horas nas mesmas condições descritas na seção 3.5.4. Em seguida, as células TOP10 competentes foram transformadas com as ligações recém-preparadas e plaqueadas em LB/Ágar contendo zeocina a 30 µg/mL. Inóculos cresceram em LB para obter as minipreparações conforme descrito na seção 3.5.4. Essas minipreparações plasmidiais foram enviadas para sequenciamento automático no sequenciador ABI PRISM ® 3100 (Applied Biosystems®) no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do IAM/FIOCRUZ - PE para confirmação da identidade e integridade das sequências clonadas. Todas as imagens de alinhamento sequencial foram geradas pelo programa *BioEdit* (HALL, 1999).

Mutagênese sítio-dirigida

Após a constatação da mutação no gene obtido por extração, foi necessário realizar uma mutagênese sítio dirigida para adicionar a citosina deletada e corrigir a sequência do gene da

HKT de acordo com a sequência usada como modelo para a clonagem. A reação da mutagênese foi preparada com a adição de 1 µL da construção em HKT-pIZT, 1 µL de 10 mM dNTP, 5 µL de tampão de reação da *PfuTurbo* DNA polimerase 10X, 2,5 U *PfuTurbo* DNA polimerase, 25 ng de cada oligonucleotídeo e 33 µL de água ultrapura aos respectivos microtubos previamente identificados (AGILENT TECHNOLOGIES, 2002) (Tabela A). A amplificação seguiu com dois programas no termociclador para aumentar as chances de sucesso da reação. Os programas foram definidos com a primeira desnaturação a 95 °C por 2 minutos, 16 ciclos de 95 °C por 1 minuto para desnaturação, 55 °C por 1 minuto para anelamento e 68 °C por 5 ou 6 minutos para extensão. As reações foram feitas em duplicata de duas minipreparações selecionadas.

Tabela A - Oligonucleotídeos iniciadores desenhados para a mutagênese sítio-dirigida da HKT de *Aedes aegypti*.

Oligonucleotídeo	Sequência
HKT MUT Fw	5'- GAA CTC TCG CCC ATG GAT ACC AGC TCG CC -3'
HKT MUT Rv	5'- GGC GAG CTG GTA TCC ATG GGC GAG AGT TC -3'

Os produtos da mutagênese foram posteriormente incubados com 1 µL da enzima *DpnI* a 37 °C por 1 hora. Em seguida, 1 µL de cada reação foi transformada em células de *E. coli* cepa XL1-*Blue* competentes (Stratagene®) conforme descrito na seção 3.1.4 para concluir a mutagênese do DNA. As células transformadas foram plaqueadas em meio LB/Ágar contendo tetraciclina a 12 µg/mL e incubadas a 37 °C por 16 horas. As minipreparações plasmidiais mutadas foram preparadas como descrito na seção 1.4 e submetidas ao sequenciamento automático para confirmação da adição do nucleotídeo. Três das nove amostras sequenciadas não obtiveram sucesso na mutagênese e foram descartadas.

Expressão e purificação da HKT recombinante em Sf9

Transfecção e coleta de meio para purificação da HKT recombinante

Para expressar a HKT recombinante, células Sf9 foram transfectadas via lipossoma no período de confluência. A cultura de células foi mantida a 27 °C em meio Sf-900 II SFM® e a manutenção foi realizada de acordo com o manual (INVITROGEN LIFE TECHNOLOGIES, 2002a). Para realizar a transfecção, os frascos de cultura de células foram observados em microscópio óptico invertido e após a constatação visual da confluência, as células foram repicadas para placas de Petri de 35 mm de diâmetro contendo 2 mL de meio Sf-900 II SFM®

sem antibiótico. O DNA a ser transfectado foi preparado com incubação inicial com Cellfectin® e posterior adição do lipossoma à cultura das células, conforme descrito no manual (INVITROGEN LIFE TECHNOLOGIES, 2002b). Em seguida, as células foram mantidas sob agitação orbital *overnight* a temperatura ambiente. Um controle negativo foi mantido, em que somente *Cellfectin* e água foram adicionadas à uma das culturas. No dia seguinte, as placas foram incubadas a 27 °C novamente e somente após 48 horas da transfecção, iniciou-se a seleção de células transfectadas usando meio Sf-900 II SFM suplementado com zeocina a 300 µg/mL. Nas duas primeiras semanas, as células foram monitoradas diariamente para troca de meio e descarte de células não-transfectadas. Após a confluência na placa de Petri, as células foram repicadas para frascos de cultura de 25 e 75 cm² de superfície de crescimento, além da diminuição da concentração do antibiótico de 300 µg/mL para 150 µg/mL após o segundo repique no frasco de 75 cm³. Após passagem para o frasco de 75 cm³, as culturas foram bem estabelecidas e o repique foi realizado a cada 7 dias, aproximadamente. A partir do terceiro repique da cultura de células no frasco de 75 cm³, o meio em que as células cresceram e chegaram à confluência foi centrifugado a 2.000 g, 4 °C por 5 minutos e o sobrenadante foi estocado a -80 °C para posterior purificação da proteína recombinante. Foi observada a morte gradual da cultura controle e posteriormente descartada, mostrando a eficiência da transfecção.

Purificação por cromatografia de afinidade

Os meios estocados a partir da cultura de células foram descongelados lentamente em banho de gelo e transferidos para um tubo cônico de 50 mL contendo 200 µL da resina Ni-NTA Agarose® (Thermo Fisher Scientific) pré-equilibrada com 3 lavagens com PBS 1X de 10 mL cada. A incubação foi realizada sob agitação leve a 4 °C por 1 hora para que a 6x-His *tag* interaja com o níquel imobilizado na resina. Após a incubação, a mistura foi centrifugada a 5.000 g, 4 °C por 2 minutos e o sobrenadante descartado. A resina foi transferida para um microtubo e lavada três vezes com PBS 1X. O processo de eluição da HKT_6xHis da resina contendo Ni²⁺ ocorreu em 500 µL de solução de 0,5 M Imidazol em 100 mM Tris-HCl pH 8 por 1 hora e posterior eluição em solução de 1 M Imidazol em 100 mM Tris-HCl pH 8 por mais 1 hora. Foram adicionados 200 µL de PBS 1X contendo 10% de glicerol à resina e todos os eluídos foram estocados a -80 °C até a sua utilização. A proteína recombinante foi submetida ao SDS-PAGE 10% para constatar a eficiência da purificação.

Imunodeteccção com Anti-His

Para confirmar a expressão e purificação da HKT_6xHis, foi realizado um ensaio de imunodeteccção com o anticorpo monoclonal Anti-His (Sigma-Aldrich®). Para isso, as amostras a serem detectadas e os controles foram submetidos à SDS-PAGE 10% e as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare®) por eletroforese em cuba semi seca (Hoefer®) contendo 250 mL de tampão de transferência (44 mM Tris-HCl, 37 mM Glicina e 8% de Etanol). Após a transferência, a membrana foi corada com corante vermelho de Ponceau para identificação do marcador de peso molecular e confirmação da transferência das proteínas.

Em seguida, a membrana foi adicionada ao equipamento *Snap ID* (Merck®) que proporciona maior rapidez aos experimentos de *blotting*. Todos os reagentes utilizados na imunodeteccção foram diluídos em TBS-T 1X para incubação com a membrana. As etapas de preparo da membrana consistiram em incubação com caseína 2% em TBS-T 1X, subsequente lavagem com 30 mL de TBS-T 1X e incubação por 20 minutos com o anticorpo primário Anti-His produzido em camundongo (Sigma-Aldrich®) em proporção 1:2500 em TBS-T 1X. Após a incubação, foram realizadas três lavagens de 30 mL cada com TBS-T 1X e em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário Anti-Mouse IgG extraído de coelho (Jackson ImmunoResearch Laboratories®) em proporção 1:10000 em TBS-T 1X. Outras quatro lavagens de 30 mL cada com TBS-T 1X foram executadas para retirar o excesso dos anticorpos que não interagiram com as proteínas imobilizadas na membrana. Após esse preparo, a membrana foi umedecida com solução de Luminata Forte (Merck®) e revelada com filme para imunodeteccção *Amersham Hyperfilm* (GE Healthcare®).

Subclonagem em pIZT para expressão em Sf9

Após a obtenção das minipreparações plasmidiais da construção em pGEM-T *easy*, seguimos as próximas etapas primeiramente com a linhagem RecLab. As amostras da linhagem RecLab foram submetidas à digestão dupla com as enzimas de restrição *KpnI* e *XbaI* para liberação do inserto a ser subclonado no plasmídeo de expressão pIZT. A digestão dupla foi bem-sucedida, constatada a partir do tamanho do fragmento liberado na eletroforese (Figura X).

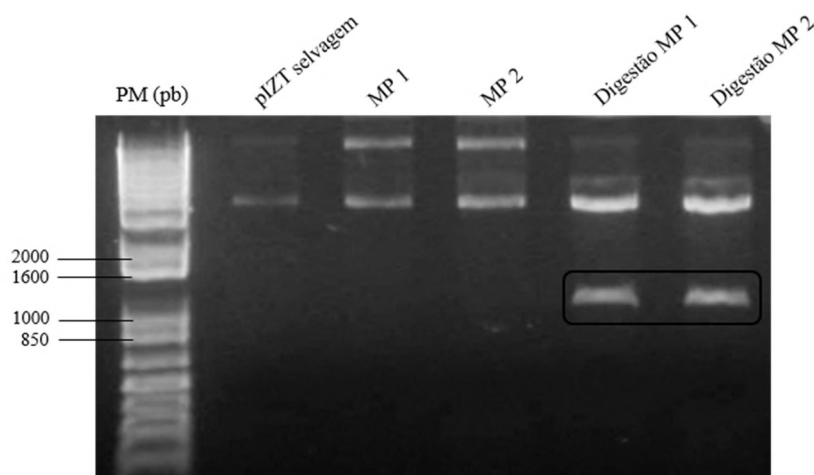


Figura X - Eletroforese em gel de agarose 1% das amostras da reação de digestão dupla das minipreparações plasmidiais (MP) incubadas com as enzimas de restrição KpnI e XbaI. As bandas destacadas foram excisadas e extraídas do gel. O controle negativo foi adicionado ao experimento, substituindo as minipreparações pelo vetor pIZT sem inserto. MP: minipreparação plasmidial. Marcador: 1kb *Plus Ladder* (Invitrogen®).

As minipreparações plasmidiais em pIZT foram submetidas ao sequenciamento automático e uma mutação pontual foi observada em todas as sequências. A deleção da citosina na posição 1078 mudou a fase de leitura dos códons seguintes, causando a perda da cauda de 6xHis e do epítipo V5 importantes para a purificação e imunodetecção da proteína (Figuras W e Y). Por causa disso, foi necessário planejar uma mutagênese sítio-dirigida para corrigir o gene de acordo com a sequência escolhida como modelo (AF435806.1). Contudo, outra sequência da HKT proveniente do sequenciamento do genoma do *Aedes aegypti* (AAEL003508-PA) foi anotada, e então percebemos que não houve mutação e sim provável erro de anotação da sequência do mRNA da HKT submetida em 2006. Isso foi importante pois só realizamos a mutagênese nas construções em pIZT em que os acessórios para purificação são adicionados no C-terminal. A mutação modificou a fase de leitura dos códons, traduzindo a sequência para outros resíduos que não são os de interesse após a mutação. Já as construções plasmidiais em pET para expressão em *E. coli* não foram modificadas já que as proteínas de fusão são adicionadas no N-terminal.

Mutagênese sítio-dirigida

A mutagênese realizada com o kit *QuikChange II* (AGILENT TECHNOLOGIES, 2002) obteve sucesso em 80% das reações, mostrando a eficiência do *kit* e dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados (Figura Z). Além disso, a adição da citosina foi confirmada nos dois

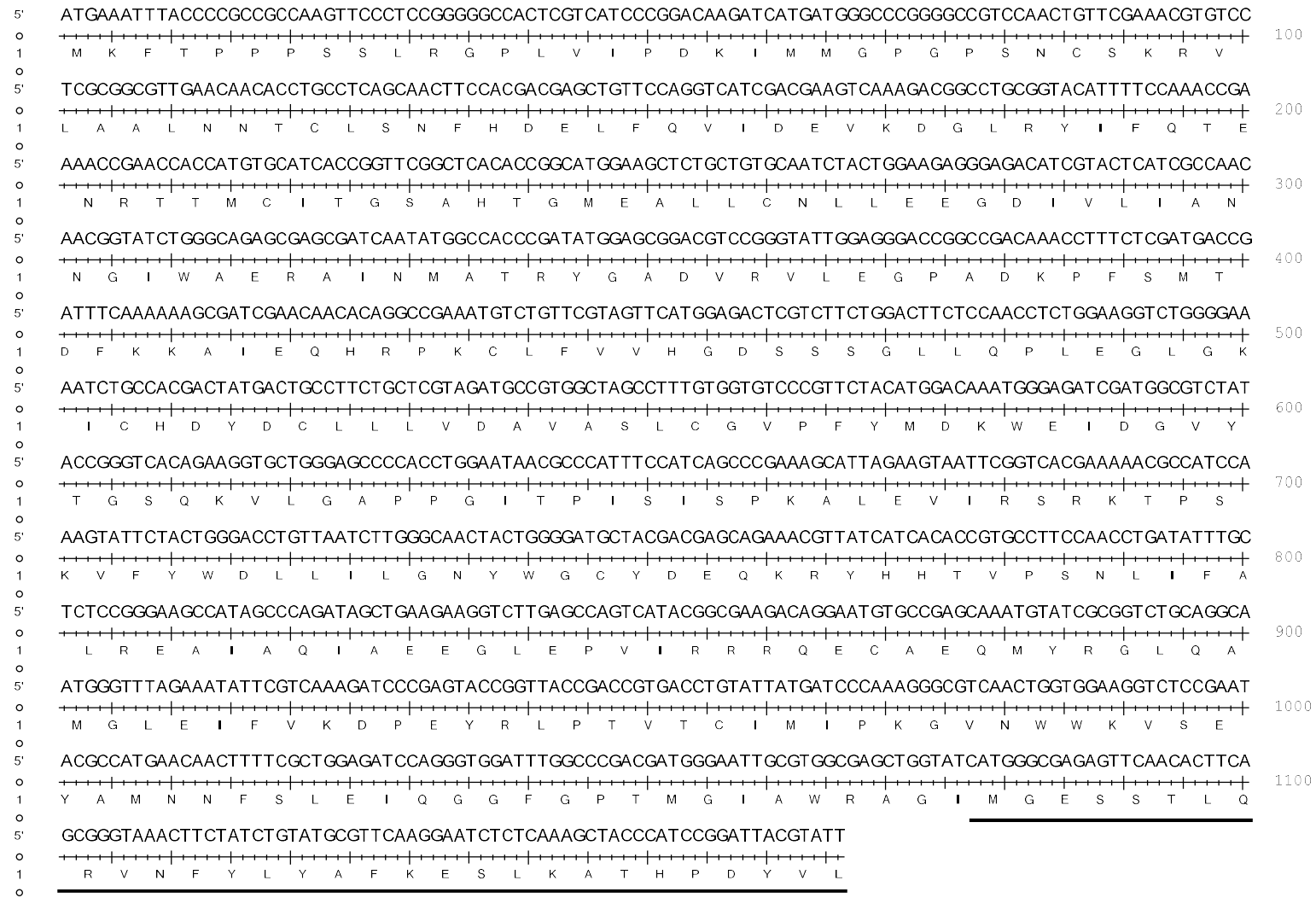


Figura W - Sequência de DNA da RL_HKT e sua tradução em fase de leitura. As modificações dos resíduos após a mutação estão sublinhadas.



Figura Y - Alinhamento da sequência da HKT depositada no UniProtKB (Q95V15) com as traduzidas a partir do gene obtido das larvas da linhagem RecLab antes (RL_HKT) e após a mutagenese (RL_HKT_MUT).

tempos de extensão do DNA nos ciclos, o que dá a preferência ao protocolo com menor tempo de extensão na reação.

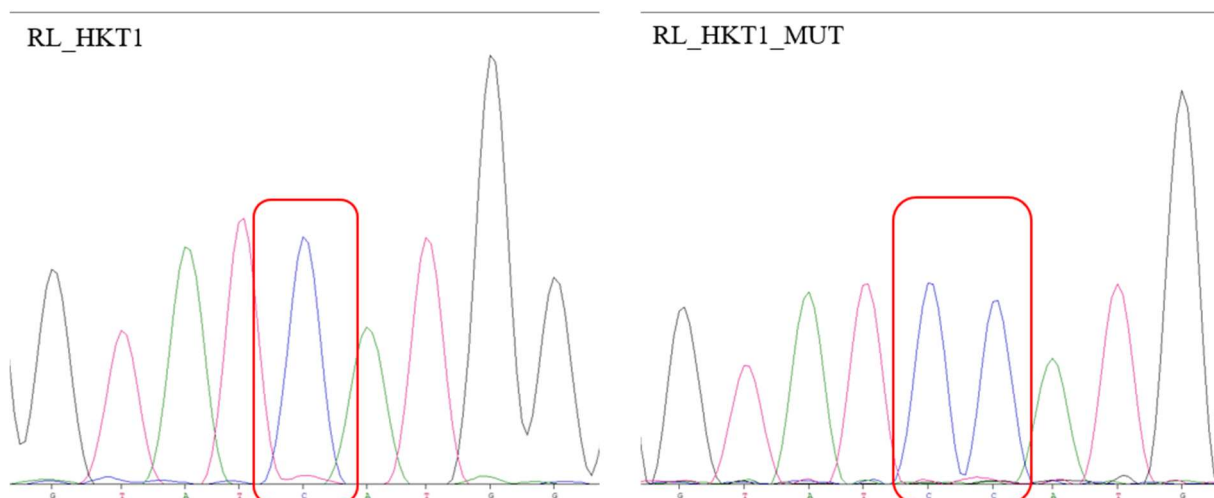


Figura Z - Trecho do eletroferograma das minipreparações plasmidiais antes (RL_HKT1) e após a mutagênese sítio-dirigida (RL_HKT1_MUT) para adicionar a citosina ausente e obter as sequências com a fase de leitura esperada. As alterações estão destacadas em vermelho.

Purificação e imunodeteção da HKT expressa em Sf9

As minipreparações plasmidiais obtidas após a mutagênese foram adicionadas às células Sf9 por transfeccção via lipossoma para expressão da HKT. Após o estabelecimento das culturas, os meios em que as células expressaram a proteína foram submetidos à purificação por cromatografia de afinidade. Após a imobilização da proteína de interesse na resina de agarose/ Ni^{2+} , a proteína foi eluída com tampão contendo imidazol. As alíquotas da proteína eluída foram submetidas à SDS-PAGE 10% para análise do sucesso da purificação. Observamos que 0,5 M de imidazol foi suficiente para eluir quase que completamente a proteína da resina com Ni^{2+} imobilizado. A banda da HKT foi fracamente observada entre 40 e 50 kDa na alíquota da resina estocada, confirmando eluição da proteína em até 1 M de imidazol (Figura AA).

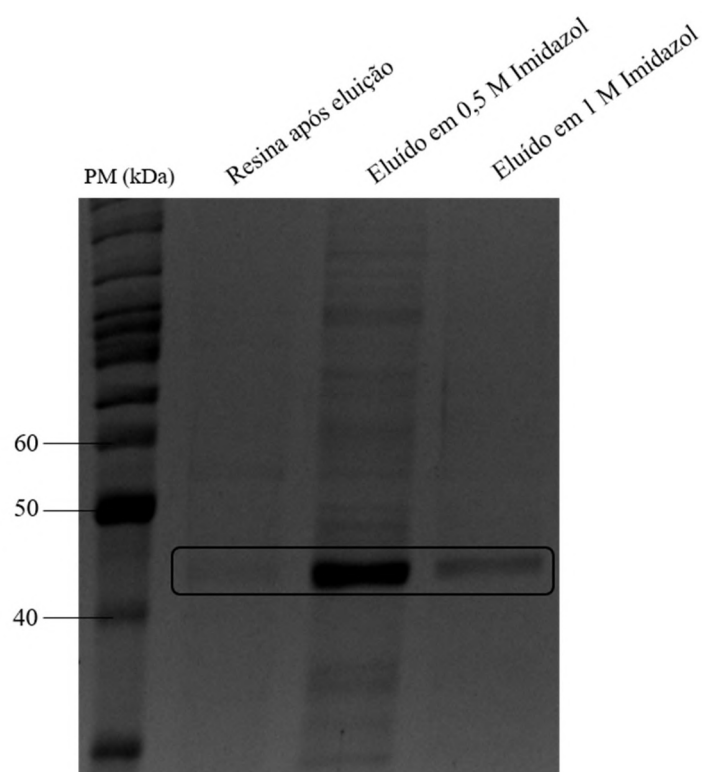


Figura AA - SDS-PAGE 10% da purificação da HKT expressa por células Sf9. Marcador: *Benchmark Protein Ladder* (Invitrogen®).

Para confirmar a identidade da proteína purificada, foram realizados ensaios de imunodeteção com o anticorpo Anti-His extraído de camundongo. Quatro frascos de cultura foram mantidos com células Sf9 transfectadas e a purificação dos meios de cada frasco foi feita separadamente. As alíquotas da primeira eluição de cada frasco foram submetidas à SDS-PAGE 10%, transferidas para membrana de nitrocelulose e então a imunodeteção foi realizada (Figura AB).



Figura AB - Imunodeteção da HKT expressa em células Sf9 usando o anticorpo monoclonal Anti-His. Os meios de quatro culturas foram purificados e as alíquotas detectadas são relativas à eluição com 0,5 M imidazol.

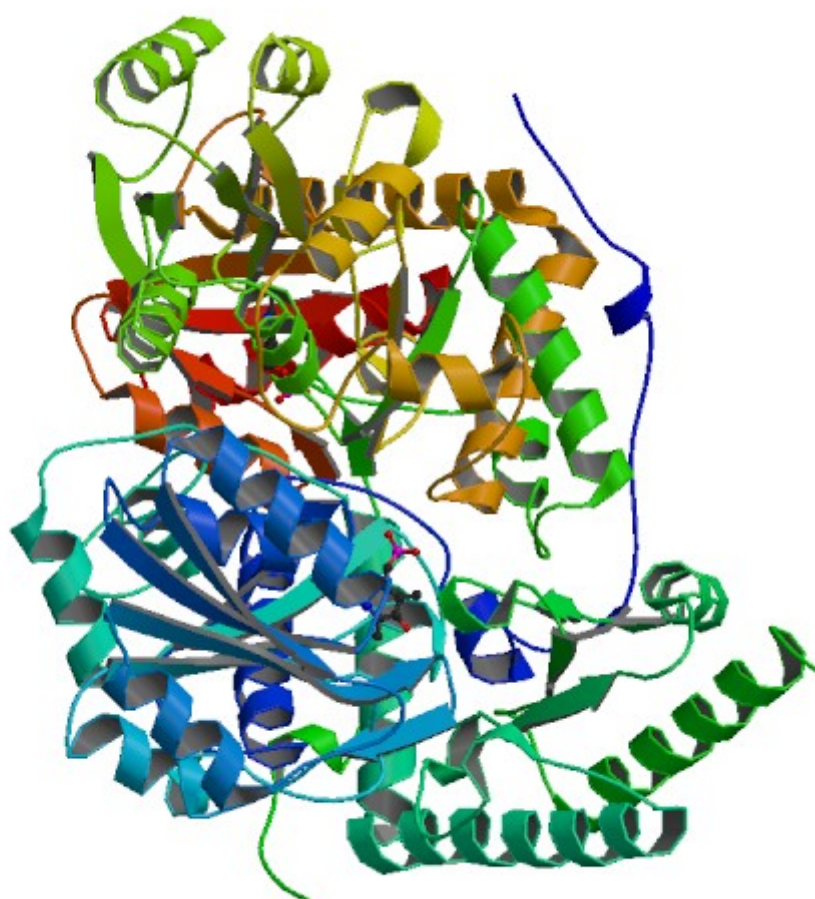
Três das quatro amostras foram detectadas pelo anticorpo e ainda com respostas de diferentes intensidades. Isso pode ser justificado pelo tempo de repique das células, pois foi realizada mais de uma transfecção como precaução. Além disso, algumas culturas estavam com problemas de crescimento, em que a confluência só era alcançada após os sete dias esperados.

**ANEXO A - DEPÓSITO DA ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DA HKT DE
Aedes Aegypti (LINHAGEM RECLAB) NO BANCO DE DADOS DE PROTEÍNAS**

Navigation Tabs



Biological Assembly 1



 **3D View:** Structure | Electron Density | Ligand Interaction

Standalone Viewers

Protein Workshop | Ligand Explorer

Global Symmetry: Cyclic - C2 (3D View)

Global Stoichiometry: Homo 2-mer - A2

Biological assembly 1 assigned by authors and generated by PISA (software)

Display Files ▼

Download Files ▼

6MFB

Crystal structure of 3-hydroxykynurenine transaminase from Aedes aegypti

DOI: 10.2210/pdb6MFB/pdb

Classification: **TRANSFERASE**Organism(s): **Aedes aegypti**Expression System: **Escherichia coli**

Deposited: 2018-09-10 Released: 2019-09-18

Deposition Author(s): **Maciel, L.G., Oliveira, A.A., Romao, T.P., Silva Filha, M.H.N.L., dos Anjos, J.V., Soares, T.A., Guido, R.V.C.**

Experimental Data Snapshot

Method: X-RAY DIFFRACTION

Resolution: 2.5 Å

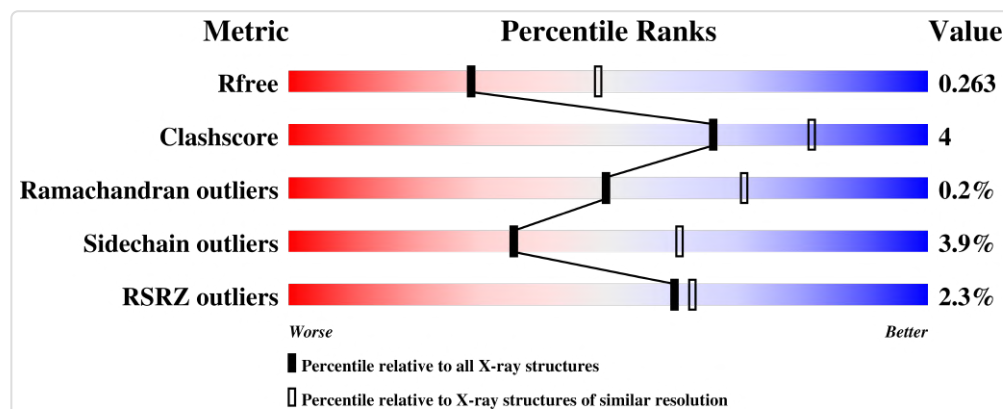
R-Value Free: 0.261

R-Value Work: 0.187

wwPDB Validation

3D Report

Full Report



This is version 1.0 of the entry. See complete history.

Literature

Crystal structure of 3-hydroxykynurenine transaminase from Aedes aegypti

Maciel, L.G., Oliveira, A.A., Romao, T.P., Silva Filha, M.H.N.L., dos Anjos, J.V., Soares, T.A., Guido, R.V.C.*To be published.*

Macromolecules

Find similar proteins by: Sequence | Structure

Entity ID: 1

Molecule	Chains	Sequence Length	Organism	Details
Serine--pyruvate aminotransferase	A, C, B, D	386	Aedes aegypti	Mutation(s): 0 EC: 2.6.1.44 , 2.6.1.51

Find proteins for [Q0IG34](#) (*Aedes aegypti*)

Go to UniProtKB: [Q0IG34](#)

Small Molecules

Ligands 1 Unique

ID	Chains	Name / Formula / InChI Key	2D Diagram	3D Interactions
PLP	A, B, C, D	PYRIDOXAL-5'-PHOSPHATE VITAMIN B6 Phosphate C ₈ H ₁₀ N O ₆ P NGVDGCNIFYWLIFO- UHFFFAOYSA-N		Ligand Interaction

Experimental Data & Validation

Experimental Data

Method: X-RAY DIFFRACTION

Resolution: 2.5 Å

R-Value Free: 0.261

R-Value Work: 0.187

Space Group: [P 2₁ 2₁ 2₁](#)

Unit Cell:

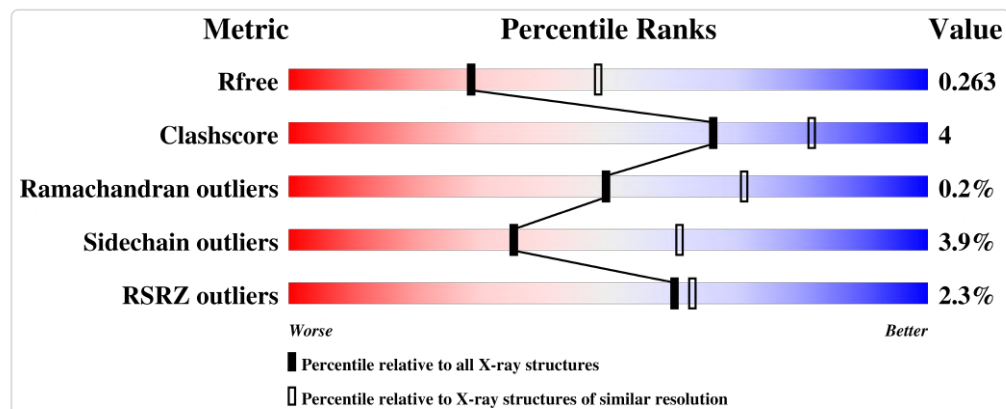
Length (Å)	Angle (°)
a = 86.706	α = 90.00
b = 115.729	β = 90.00
c = 172.163	γ = 90.00

Software Package:

Software Name	Purpose
XDS	data reduction
Aimless	data scaling
PHASER	phasing
REFMAC	refinement

Structure Validation

[View Full Validation Report or Ramachandran Plots](#)

**Entry History****Deposition Data**

Deposited Date: 2018-09-10

Released Date: 2019-09-18

Deposition Author(s): Maciel, L.G., Oliveira, A.A., Romao, T.P., Silva Filha, M.H.N.L., dos Anjos, J.V., Soares, T.A., Guido, R.V.C.

Revision History

- **Version 1.0: 2019-09-18**

Type: Initial release

RCSB PDB is funded by the National Science Foundation (DBI-1832184), the US Department of Energy (DE-SC0019749), and the National Cancer Institute, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, and National Institute of General Medical Sciences of the National Institutes of Health under grant R01GM133198.

**ANEXO B - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA CIENTÍFICA *BIOORGANIC AND
MEDICINAL CHEMISTRY***



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmcDiscovery of 1,2,4-oxadiazole derivatives as a novel class of noncompetitive inhibitors of 3-hydroxykynurenine transaminase (HKT) from *Aedes aegypti*

Larissa G. Maciel^a, Andrew A. Oliveira^b, Tatiany P. Romão^c, Laylla L.L. Leal^a, Rafael V.C. Guido^b, Maria Helena N.L. Silva-Filha^c, Janaína V. dos Anjos^{a,*}, Thereza A. Soares^{a,*}

^a Department of Fundamental Chemistry – Federal University of Pernambuco, Av. Jornalista Aníbal Fernandes, s/n°Cidade Universitária – Recife, PE 50740-560, Brazil

^b Sao Carlos Institute of Physics – University of São Paulo, Av. Joao Dagnone, 1100 Jardim Santa Angelina, São Carlos, SP 13563-120, Brazil

^c Instituto Aggeu Magalhães (IAM) – FIOCRUZ, Av. Professor Moraes Rego s/n°, Recife, PE 50740-560 Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Kinetic constants

New HKT recombinant

Expression in *Escherichia coli*

Xanthurenic acid detection

ABSTRACT

The mosquito *Aedes aegypti* is the vector of arboviruses such as Zika, Chikungunya, dengue and yellow fever. These infectious diseases have a major impact on public health. The unavailability of effective vaccines or drugs to prevent or treat most of these diseases makes vector control the main form of prevention. One strategy to promote mosquito population control is the use of synthetic insecticides to inhibit key enzymes in the metabolic pathway of these insects, particularly during larval stages. One of the main targets of the kynurenine detoxification pathway in mosquitoes is the enzyme 3-hydroxykynurenine transaminase (HKT), which catalyzes the conversion of 3-hydroxykynurenine (3-HK) into xanthurenic acid (XA). In this work, we report eleven newly synthesized oxadiazole derivatives and demonstrate that these compounds are potent noncompetitive inhibitors of HKT from *Ae. aegypti*. The present data provide direct evidence that HKT can be explored as a molecular target for the discovery of novel larvicides against *Ae. aegypti*. More importantly, it ensures that structural information derived from the HKT 3D-structure can be used to guide the development of more potent inhibitors.

1. Introduction

Arboviruses are responsible for diseases such as Zika, Chikungunya, dengue and yellow fever which have spread at high rates throughout the world in the last years.^{1–4} Therefore, increasing mortality and morbidity rates have been reported in association with these diseases.^{5–8} More recently, Zika viruses have spread around the world, with a particularly aggravating effect of the congenital syndrome in newborns whose mothers were infected in pregnancy.^{9,10} The World Health Organization have reported the Zika virus transmission in 52 countries and territories of the Americas between 2015 and 2018, and 31 countries worldwide have reported infantile microcephaly and/or CNS malformation cases until March 2017.^{11,12}

The mosquito *Aedes aegypti* is the primary vector responsible for the transmission of the Zika, Chikungunya and dengue viruses. The control of this species has been impaired due to the great adaptability of the mosquito to urban environments, high anthropophilic behavior in addition to other biological features.^{2,13} Moreover, vaccine development against all arboviruses and their multiple serotypes transmitted by a given vector has a high cost and requires exceedingly long periods of development.^{14,15} In the absence of effective vaccines, the most

accessible alternative to decrease the transmission of these diseases remains vector control. In this scenario, the discovery of novel insecticides with innovative mode of action is needed, in particular, in view of the spread resistance to synthetic compounds such as organophosphates and pyrethroids, which have been largely employed against *Ae. aegypti* control.^{16–19} Nowadays the mosquito mechanism of resistance is better understood.^{20–22} It is known that insects can become insensitive to insecticide through metabolic resistance in which insecticide-resistant strains metabolize the insecticide more efficiently than insecticide-susceptible strains, and/or through target modification in which the insecticide-target molecule may change the structure/sequence or even behavioral modifications with indoor feeders becoming outdoor feeders. Therefore, it is indispensable for novel larvicides to exhibit high specificity and low toxicity in order to minimize the emergence of resistant mosquitoes and toxic effects in other species.²⁰

An important metabolic pathway in mosquitoes is the kynurenine pathway, which is the major tryptophan catabolism pathway in living organisms. The tryptophan can be oxidized to quinolinic acid, kynurenic acid, or xanthurenic acid depending on the organism.^{23–25} In humans, some metabolites from this pathway are involved in several neurologic disorders and the quinolinic acid can react to form

* Corresponding authors.

E-mail addresses: janaína.anjos@ufpe.br (J.V. dos Anjos), thereza.soares@ufpe.br (T.A. Soares).

<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.115252>

Received 14 August 2019; Received in revised form 5 December 2019; Accepted 5 December 2019

Available online 09 December 2019

0968-0896/© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺).^{25,26} The metabolite 3-hydroxykynurenine (3-HK) has been associated with oxidative stress caused by spontaneous oxidation of reactive oxygen species.^{27,28} In this case, 3-HK can be either hydrolyzed by the enzyme kynureninase or can be the precursor for xanthurenic acid synthesis by the enzymes kynurenine aminotransferase I and II.²⁹ In mosquitoes, this pathway comprises the tryptophan degradation, taking to the chemically stable xanthurenic acid (XA). This acid is synthesized from the 3-HK in an irreversible reaction catalyzed by the enzyme 3-hydroxykynurenine transaminase (HKT).^{30–33} The absence of kynureninase in mosquitoes makes HKT the only enzyme responsible for 3-HK regulation in mosquitoes.³³ Further, previous reports have shown that xanthurenic acid is essential for the sexual reproduction of *Plasmodium falciparum* in the malaria vector *Anopheles* spp.³⁴ Therefore, inhibition of the enzymatic conversion of 3-HK into xanthurenic acid in the kynurenine pathway is an attractive strategy to control *Ae. aegypti* development and *Anopheles* spp. via the accumulation of 3-HK.

Recently, the three-dimensional structure of HKT from *Ae. aegypti* in its holo form was solved. However, the crystallographic structure of HKT from *Anopheles gambiae* (AgHKT) co-crystallized with the competitive inhibitor 4-(2-aminophenyl)-4-oxobutyric acid (4-OB) was previously determined at 2.7 Å resolution.³⁵ These HKTs from *An. gambiae* and *Ae. aegypti* are orthologs with 79% of sequence identity, and identical residues within a radius of 7 Å from the active site.³⁶ Therefore, the X-ray structure of HKT from *An. gambiae* may provide valuable structural information for the design of inhibitors against HKT from *Ae. aegypti*.³⁶ Previously, we have recognized the striking structural similarity between 4-(2-aminophenyl)-4-oxobutyric acid inhibitor and 1,2,4-oxadiazole derivatives (Fig. 1). We have shown that these heterocyclic compounds could have similar binding modes and equivalent affinity for HKT as the crystallographic inhibitor 4-(2-aminophenyl)-4-oxobutyric acid. Furthermore, toxicity bioassays performed for fourth-instar larvae of *Ae. aegypti* have shown that several 1,2,4-oxadiazole derivatives exhibit potent activity against *Ae. aegypti* larvae (ca. of 15 ppm) and low toxicity in mammals.³⁶

In this work, we report the discovery of 1,2,4-oxadiazole as inhibitors of HKT from *Ae. aegypti*. We developed a high yield procedure for the expression and purification of an active recombinant form of HKT and a biochemical protocol for the detection of the xanthurenic acid yielded by HKT catalysis. We subsequently performed enzyme inhibitory assays using the recombinant HKT and a series of novel, water-soluble, 1,2,4-oxadiazole derivatives. This work provides direct evidence that HKT can be explored as a molecular target for the discovery of novel larvicides against *Ae. aegypti*.

2. Results and discussion

2.1. In silico analysis of HKT

Gene analysis of *Aedes aegypti* HKT showed that it has four introns and five exons. For reasons of splicing processing in the prokaryotic

expression system and the size of the introns in this species, it was necessary to use the cDNA for ligase independent cloning (LIC). The HKT mRNA sequence was obtained from the GenBank (access number AF435806.1) and has 1167-base pairs (bp) length. Oligonucleotides were designed from this sequence to perform a ligase independent cloning (LIC) into the expression vector. Annotation of respective translated mRNA (access number AAL29468.1) has 389 amino acids and predicted size of 43 kDa. Residues G25, S43 and R356 are located in the active site and are conserved in relation to HKT orthologs from *An. gambiae*.

2.2. cDNA amplification via RT-PCR

RT-PCR was performed using total RNA extracted from pools of fourth-instar RecLab (RL) *Ae. aegypti* larvae. Samples were submitted to the reaction and a fragment of around 1100-bp was amplified. The fragments were purified, cloned in pGEM-T Easy© vector and sequenced to confirm their identity and to evaluate the integrity of these cDNA sequences. The translated protein sequences from *Ae. aegypti* HKT (RL_AeHKT) cDNA constructs were aligned with HKT sequence deposited in UniProtKB (Q95V15). The sequences showed to be identical to the reference except for a polymorphism H360M detected in all clones (Fig. 2). This mutation is provoked by the deletion of one cytosine, which caused a change in the reading frame, altering some following amino acids from these sequences. The recombinant RL_AeHKT differs in ATG codon for translated methionine in comparison to the CATG codon for translated histidine from the reference sequence Q95V15_AeHKT. This polymorphism in clones that have a quite distinct geographical origin is an evidence that this mutation is well established within the species.³⁷ Four constructs were obtained and two of them were selected for cloning into the pETTrxA-1a/LIC expression vector.

2.3. Expression and purification of recombinant HKT

Rosetta 2 DE3 *Escherichia coli* cells transformed with the constructs were inoculated into the auto-inducer ZYM-5052 culture medium.³⁸ Bacterial growth was performed at 37 °C until reach OD₆₀₀ of 0.6 and then the temperature was decreased to 22 °C to induce protein expression. The recombinant RL_AeHKT is N-terminally fused to Thioredoxin A (Trx) and a 6x-His tag to increase the solubility of the protein, and to allow its purification by Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC), respectively. The purification protocol was based on Ni²⁺ affinity chromatography to extract the recombinant HKT from bacterial lysate and subsequently, incubation with TEV protease to remove Trx and 6x-His tags. RL_AeHKT-Trx exhibited a migration profile of approximately 50 kDa, which is consistent with the predicted size of 54 kDa (43 kDa³² of HKT e 11 kDa of Trx³⁹). After all the purification steps, RL_AeHKT showed integrity at the electrophoresis level (Fig. 3) and a yield of 30 mg per liter of induced bacterial culture.

2.4. Synthesis of 1,2,4-oxadiazoles-like sodium salts

1,2,4-Oxadiazoles are five-membered heterocyclic compounds, which contain an oxygen atom in position 1, and two nitrogen atoms in positions 2 and 4 (Fig. 1). The oxadiazole moiety is resistant to hydrolysis and can act as a bioisostere of esters and amides, being a promising scaffold for the design of bioactive molecules. Previous studies performed by our group have shown that larvicides containing the 1,2,4-oxadiazole group could be potentially used as inhibitors of the HKT enzyme³⁶. The water-soluble larvicides were obtained via a three-step synthesis, starting with the respective amidoxime and glutaric anhydride to form 4-[3-(aryl)-1,2,4-oxadiazole-5-yl]butanoic acids. After recrystallization, these compounds reacted with sodium hydroxide in methanolic medium yielding the corresponding sodium salts, which were tested for inhibitory activity against HKT (Scheme 1). Most of the compounds 3a-k was already tested as larvicides against *Aedes aegypti* by our group, but there is no report of larvicidal activity of the

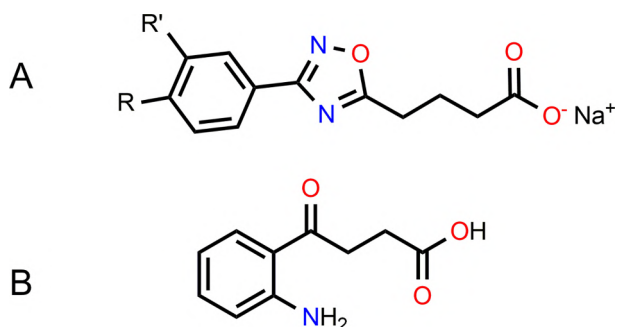


Fig. 1. Structure of (A) 1,2,4-oxadiazole scaffold and (B) 4-(2-aminophenyl)-4-oxobutyric acid (4-OB).

A

```

1 - ATG AAA TTT ACC CCG CCG CCA AGT TCC CTC CGG GGG CCA CTC GTC ATC CCG GAC AAG ATC - 60
1 - M K F T P P P S S L R G P L V I P D K I - 20

61 - ATG ATG GGC CCG GGG CCG TCC AAC TGT TCG AAA CGT GTC CTC GCG GCG TTG AAC AAC ACC - 120
21 - M M G P G P S N C S K R V L A A L N N T - 40

121 - TGC CTC AGC AAC TTC CAC GAC GAG CTG TTC CAG GTC ATC GAC GAA GTC AAA GAC GGC CTG - 180
41 - C L S N F H D E L F Q V I D E V K D G L - 60

181 - CGG TAC ATT TTC CAA ACC GAA AAC CGA ACC ACC ATG TGC ATC ACC GGT TCG GCT CAC ACC - 240
61 - R Y I F Q T E N R T T M C I T G S A H T - 80

241 - GGC ATG GAA GCT CTG CTG TGC AAT CTA CTG GAA GAG GGA GAC ATC GTA CTC ATC GCC AAC - 300
81 - G M E A L L C N L L E E G D I V L I A N - 100

301 - AAC GGT ATC TGG GCA GAG CGA GCG ATC AAT ATG GCC ACC CGA TAT GGA GCG GAC GTC CGG - 360
101 - N G I W A E R A I N M A T R Y G A D V R - 120

361 - GTA TTG GAG GGA CCG GCC GAC AAA CCT TTC TCG ATG ACC GAT TTC AAA AAA GCG ATC GAA - 420
121 - V L E G P A D K P F S M T D F K K A I E - 140

421 - CAA CAC AGG CCG AAA TGT CTG TTC GTA GTT CAT GGA GAC TCG TCT TCT GGA CTT CTC CAA - 480
141 - Q H R P K C L F V V H G D S S S G L L Q - 160

481 - CCT CTG GAA GGT CTG GGG AAA ATC TGC CAC GAC TAT GAC TGC CTT CTG CTC GTA GAT GCC - 540
161 - P L E G L G K I C H D Y D C L L L V D A - 180

541 - GTG GCT AGC CTT TGT GGT GTC CCG TTC TAC ATG GAC AAA TGG GAG ATC GAT GGC GTC TAT - 600
181 - V A S L C G V P F Y M D K W E I D G V Y - 200

601 - ACC GGG TCA CAG AAG GTG CTG GGA GCC CCA CCT GGA ATA ACG CCC ATT TCC ATC AGC CCG - 660
201 - T G S Q K V L G A P P G I T P I S I S P - 220

661 - AAA GCA TTA GAA GTA ATT CGG TCA CGA AAA ACG CCA TCC AAA GTA TTC TAC TGG GAC CTG - 720
221 - K A L E V I R S R K T P S K V F Y W D L - 240

721 - TTA ATC TTG GGC AAC TAC TGG GGA TGC TAC GAC GAG CAG AAA CGT TAT CAT CAC ACC GTG - 780
241 - L I L G N Y W G C Y D E Q K R Y H H T V - 260

781 - CCT TCC AAC CTG ATA TTT GCT CTC CGG GAA GCC ATA GCC CAG ATA GCT GAA GAA GGT CTT - 840
261 - P S N L I F A L R E A I A Q I A E E G L - 280

841 - GAG CCA GTC ATA CGG CGA AGA CAG GAA TGT GCC GAG CAA ATG TAT CGC GGT CTG CAG GCA - 900
281 - E P V I R R R Q E C A E Q M Y R G L Q A - 300

901 - ATG GGT TTA GAA ATA TTC GTC AAA GAT CCC GAG TAC CGG TTA CCG ACC GTG ACC TGT ATT - 960
301 - M G L E I F V K D P E Y R L P T V T C I - 320

961 - ATG ATC CCA AAG GGC GTC AAC TGG TGG AAG GTC TCC GAA TAC GCC ATG AAC AAC TTT TCG - 1020
321 - M I P K G V N W W K V S E Y A M N N F S - 340

1021 - CTG GAG ATC CAG GGT GGA TTT GGC CCG ACG ATG GGA ATT GCG TGG CGA GCT GGT ATC ATG - 1080
341 - L E I Q G G F G P T M G I A W R A G I M - 360

1081 - GGC GAG AGT TCA ACA CTT CAG CGG GTA AAC TTC TAT CTG TAT GCG TTC AAG GAA TCT CTC - 1140
361 - G E S S T L Q R V N F Y L Y A F K E S L - 380

1141 - AAA GCT ACC CAT CCG GAT TAC GTA - 1166
381 - K A T H P D Y V - 400

```

Fig. 2. Open reading frame (ORF) coding sequence for the recombinant RL AeHKT and the corresponding translated amino acid sequence, showing predicted molecular weight of 43,427 Daltons. Residues from polymorphism H360M are colored with blue (A). Predicted *Aedes aegypti* HKT protein sequence from UniProtKB (Q95V15) aligned with clones RL_AeHKT1 and RL_AeHKT2. Semi- and non-conserved amino acids are colored with green and orange background, respectively. Red arrows indicate the conserved amino acids participating in substrate and inhibitor recognition in the HKT active site, as revealed by the crystal structure of AgHKT in complex with the inhibitor 4-OB³⁵ (B). Sequence alignment of C-terminal regions (from amino acid number 340) of RL_AeHKT1, Q95V15 and *Anopheles gambiae* HKT amino acid sequence from UniProtKB (Q7PRG3). Semi-conserved amino acids in green background and non-conserved amino acids in orange background (C).

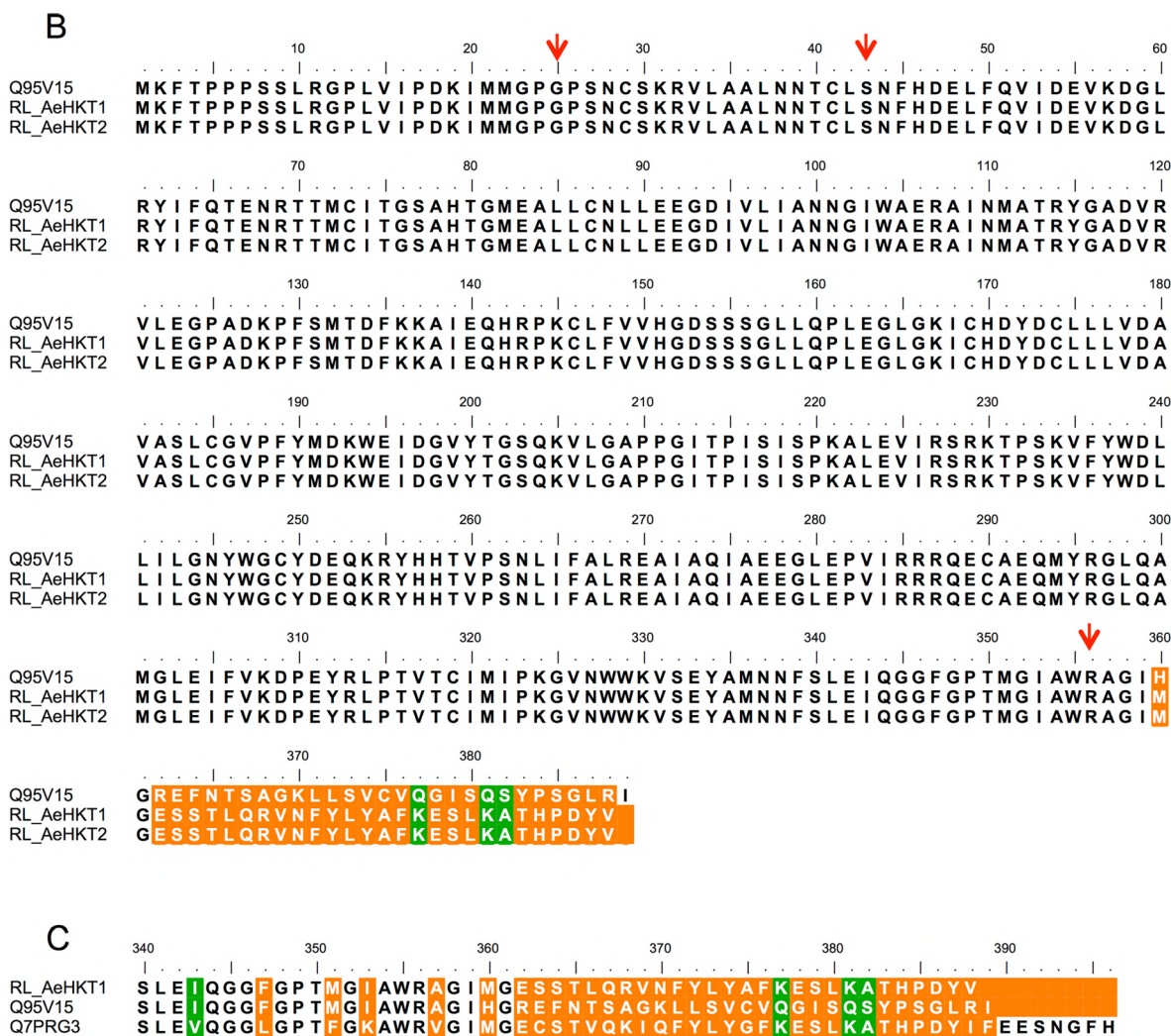


Fig. 2. (continued)

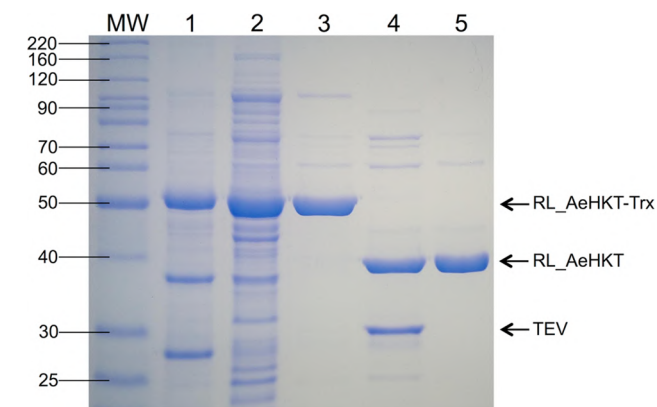
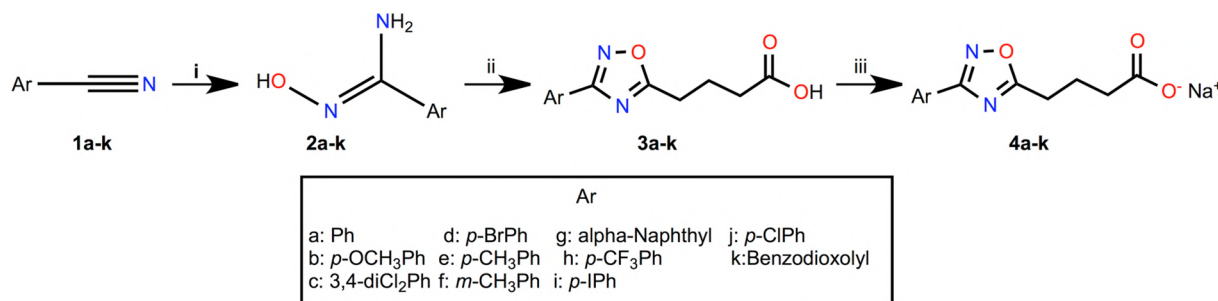


Fig. 3. SDS-PAGE-based analysis of samples collected along the purification steps of recombinant RL_AeHKT-Trx. (1) Total lysate; (2) Soluble fraction before affinity column; (3) RL_AeHKT-Trx eluted fraction by a Ni^{2+} affinity chromatography; (4) Removal of the fusion protein by TEV protease (33 kDa); (5) RL_AeHKT eluted fraction by a Ni^{2+} affinity chromatography. SDS-PAGE 10% stained with Coomassie blue. The tagged protein (RL_AeHKT-Trx), cleaved protein (RL_AeHKT) and protease used (TEV) are indicated with arrows. Molecular markers (MW) in kDa.

compounds 3c, 3e, 3g, 3h and their salt-derivatives. Since they are a series derived from canonical 3a ($\text{LC}_{50} = 92.7$ ppm), we can infer that the salt-derivatives 4a-k show larvicidal activity as well.³⁶

2.5. Biochemical assays

Enzymatic assays were conducted by a new standardized protocol modified from Han and coworkers³² and developed to evaluate the conversion of 3-HK to xanthurenic acid (XA) by HKT. The assays were performed on a 96-well round bottom microplate, allowing for simultaneous reading of multiple samples, and thus for a faster and cheaper characterization of RL_AeHKT activity and/or inhibition. The method is based on XA-Fe^{3+} complex detection, first described by Lepkovski and coworkers to detect XA in pyridoxine-deficient mice.^{40,41} More recently, Lima and coworkers used the same complexation reaction to quantify XA in *Ae. aegypti* midgut.⁴² The reaction was set by the combination of 2 μg of recombinant enzyme RL_AeHKT, 2 mM of amino donor substrate (3- D_3 -L-HK), 2 mM of amino acceptor sodium pyruvate and 40 μM of the cofactor pyridoxal-5'-phosphate (PLP) in a 100 μL final volume. Reactions were stopped by addition of 100 μL of a 10 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ solution in 0.1 M HCl. The assays were performed in duplicate, and a calibration curve was built to quantify the amount of XA generated by RL_AeHKT ($R^2 = 0.98$). The absorbance values of the complex were read at 570 nm after 5 min of incubation at 50 $^\circ\text{C}$. Protein samples derived from two clones obtained were tested, and no differences in XA concentrations were observed, indicating that both clones are equally functional. The blank analysis was performed to verify the specificity of the complexation of Fe^{3+} to XA, instead of other components such as PLP or pyruvate. Although the mutation H360M is near to one of the important residues on the active site (R356), the



Scheme 1. Synthesis of oxadiazole salts tested as HKT inhibitors. i: $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ and Na_2CO_3 (4 eq.), ethanol/ H_2O , r.t.; ii: glutaric anhydride (1.5 eq.), neat; iii: NaOH (1 eq.) and methanol, r.t.

enzymatic activity of the recombinant RL_AeHKT was confirmed by the formation of XA. The stability of the purified RL_AeHKT was tested in a sample stocked in $11 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, without glycerol at -20°C for four months. At the enzymatic activity level, the stocked protein showed similar rate as the freshly purified protein (available in SI).

2.6. Enzyme Kinetics

The steady-state kinetic constants of RL_AeHKT were estimated from absorbance changes during the catalysis of the substrate 3- D_3 -L-HK at pH 7.5 at 50°C using a BIOTEK® ELx808 absorbance spectrophotometer at 570 nm. Values for Michaelis-Menten constant (K_M) and maximal enzyme turnover (k_{cat}) with their standard errors were calculated by fitting the experimental measurements to the Michaelis-Menten model incorporated in GraphPad Prism7.0. Catalytic efficiency (k_{cat}/K_M) values with their standard errors were obtained by fitting the experimental data to the normalized Michaelis-Menten equation. Progress curves were carried from 0 to 25 min (with 5 min interval) to determine the total reaction time in order to standardize the new protocol and estimate the kinetics constants. The interval of the first-order reaction was observed from 0 to 5 min of incubation, and a plateau was reached after 20 min. Kinetics constants were calculated using the reaction conditions described in the previous section and varying 3- D_3 -L-HK concentrations from 0.5 to 10 mM (Table 1). Previously, Han and coworkers³² measured the kinetics constants for HKT from *Ae. aegypti* expressed in Sf9 cells (AeHKT). Although a direct comparison of our measurements to the latter work is not straightforward due to different expression conditions and biochemical assays, we measured similar K_M values for HKT expressed in *E. coli* ($K_M = 3.3 \text{ mM}$) compared to the enzyme expressed in Sf9 cells ($K_M = 3.0 \text{ mM}$).³² It indicates that there are no differences in substrate specificity between the recombinant enzymes from the prokaryotic and eukaryotic organisms. In contrast, AgHKT has higher affinity for 3- D_3 -L-HK than both recombinant HKT from *Aedes aegypti* expressed in different systems. This difference in K_M is even more remarkable in tests with L-kynurenine as substrate. One of the probable reasons for this difference in substrate recognition is the presence of D- isomer in 3- D_3 -L-HK commercial substrate, as discussed by Canavesi and coworkers.⁴³ Despite this difficulty, our interest here is the HKT detoxification activity in the conversion of 3-HK to XA, besides

XA is the key compound in XA-Fe^{3+} detection. In terms of turnover rate, the measured RL_AeHKT k_{cat} is almost four-times lower than the AeHKT and two-times lower than AgHKT. However, the decrease in the catalytic efficiency of recombinant HKT expressed in *E. coli* compared to the one expressed in Sf9 cells was counterbalanced by a higher yield of purified protein. Hence, the former is a recombinant protein expression system cheaper and less time-consuming than that in insect cells, which is required for further inhibitory studies by novel variants of 1,2,4-oxadiazoles currently being synthesized in our group.

The effect of pH and temperature on RL_AeHKT activity was evaluated in the range between 6 and 10 and 30 to 70°C , respectively (Fig. 4). Optimal RL_AeHKT activity was observed at pH 8, slightly lower than pH 9 measured for the HKT recombinant expressed in Sf9 cells.³² During the measurements, there was an atypical increase in the measured RL_AeHKT activity at pH 10 (Fig. 4). Although the pH of the solution was controlled during the conversion of 3-HK into XA by HKT, the quantification of the amount of converted XA was performed through the addition of the same volume of $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in HCl solution. The addition of HCl rapidly decreases the final pH of the solution. It is known that iron (III) hydroxide species are formed in acid to neutral pH, and its accumulation makes the solution turbid. Consistently, we observed that upon the addition of the HCl solution to the HKT-catalyzed reaction at pH 10, the solution changed from light green/translucent to pale white/turbid appearance. The solution remained light green and transparent in all the lower pH values investigated in this work. Another possible explanation for the apparent increase in RL_AeHKT activity at pH 10 would be the formation of iron carbonate salts in alkaline pH. These salts are insoluble and begin to precipitate, making the solution turbid and preventing accurate reading via the colorimetric assay used here. However, our measurements undoubtedly indicate that RL_AeHKT exhibits optimal enzymatic activity around pH 8 (Fig. 4), and the measurement at pH 10 was reported for the sake of scientific completeness. In temperature arrays, RL_AeHKT exhibited higher activity at 50°C with a decrease in the enzymatic activity at temperatures above that value. Additionally, the HEPES buffer was chosen for the experiments due to its reported low interference and high stability in biological assays⁴⁵ as well as our experiments showed that RL_AeHKT is more soluble at this buffer.

Table 1

Comparison of the kinetics parameters of the RL_AeHKT from *Aedes aegypti* with the recombinant HKT expressed in insect cells and the homologue HKT from *Anopheles gambiae*.

Enzyme	Substrate	K_M (mM)	K_{cat} (min^{-1})	K_{cat}/K_M ($\text{min}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$)
RL_AeHKT	3- D_3 -L-hydroxykynurenine	3.3 ± 0.8	492.3 ± 46	149.2 ± 50
AeHKT ³²	3- D_3 -L-hydroxykynurenine	3.0 ± 0.4	1760 ± 80	587 ± 107
AgHKT ⁴⁴	3- D_3 -L-hydroxykynurenine	2.0 ± 0.3	988.5 ± 113	494.3 ± 80
AgHKT ⁴³	L-kynurenine	1.4 ± 0.2	–	–

RL_AeHKT kinetics constants were derived by using final concentrations of 3- D_3 -L-HK of 0.5, 1.75, 3.0, 4.0, 8.5 and 10 mM in the presence of 5 mM sodium pyruvate. The parameters were calculated by fitting experimental data into Michaelis-Menten regression in GraphPad Prism 7.0

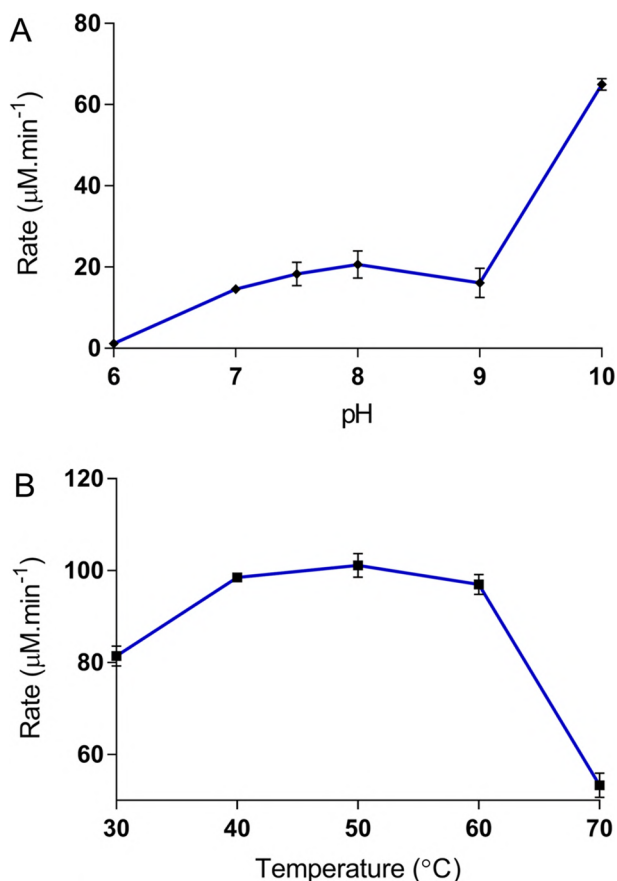


Fig. 4. Effect of pH (A) and temperature (B) on RL_AeHKT activity. The pH evaluation tests were conducted using buffers Tris-HCl pH 6, 7 and 8, HEPES pH 7.5, Borate pH 9 and Carbonate pH 10. These buffers were tested in RL_AeHKT activity during incubation time of the assay, before the addition of $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in HCl solution to detect $\text{XA}\cdot\text{Fe}^{3+}$ complex. The temperature was analyzed by incubation the complete reaction for 5 min at 30, 40, 50, 60 and 70°C .

2.7. Inhibition assays

The inhibitory activity of eleven new 1,2,4-oxadiazole derivatives was assessed in duplicate by adding 0.5–0.05 mM of each diluted salt in 200 mM HEPES buffer pH 7/100 mM NaCl. In each assay, a negative control was taken into account to calculate the final activity percentage. The obtained IC_{50} values range from 42 to 294 μM , which are promising results for the first series of RL_AeHKT inhibitors. Eight out of the eleven inhibitors showed IC_{50} values below 100 μM (Table 2). The most potent compounds exhibited inhibition activity in the two-digits micromolar range (**4i**, $\text{IC}_{50} = 42 \mu\text{M}$ and **4f**, $\text{IC}_{50} = 54 \mu\text{M}$).

Despite the chemical diversity of aromatic ring substituents in the synthesized compounds, there is not a clear relationship between the substitution pattern at the aromatic ring and the experimental IC_{50} values obtained herein (Table 2). For instance, the most promising RL_AeHKT inhibitor **4i** has an iodine atom in the *para* position, indicating that an electronegative, soft and bulky group at this position is favorable for inhibitory activity. However, inhibitors **4d** and **4j** containing bromine and chlorine atoms at the same aromatic ring position exhibited only moderate inhibition. Nevertheless, a potential structural feature associated to the increased inhibition of RL_AeHKT is the occurrence of bulky groups at the *meta* position (**4c**, **4f**, **4g**, **4k**) of compounds, exhibiting IC_{50} values below 100 μM (Table 2). Our previous findings indicate that chemical substitutions on the aromatic ring do not significantly affect the binding of 1,2,4-oxadiazole derivatives to HKT.³⁶ This is so because upon binding to the enzyme, the aromatic ring in the oxadiazole scaffold is positioned partially outside the active

site pocket (Fig. 5).³⁶ The present findings are consistent with our previous molecular docking calculations predicting that these compounds could be potential HKT inhibitors.³⁶

These assays demonstrate that 1,2,4-oxadiazole derivatives inhibit the conversion of 3-hydroxykynurenine in xanthurenic acid by the enzyme RL_AeHKT. Therefore, the next step was to determine the type of inhibition underlying this class of compounds towards RL_AeHKT. Kinetics assays were performed for four concentrations of our canonical compound **4a** at different concentrations of the substrate 3-D,L-HK (Fig. 6). Different types of inhibition can be identified from changes in the slope (V_{max}) and y-intercept location (K_M/V_{max}) of the regressions in the Lineweaver-Burk plots.⁴⁶ The addition of compound **4a** triggered changes in the regression slope and y-intercept which is representative of a noncompetitive mixed inhibition, i.e. it displays properties of both competitive and uncompetitive inhibitions (Fig. 6). Therefore, it can be inferred from our assay that compound **4a** decreases RL_AeHKT enzymatic activity through the binding to both the free as well as the substrate-bound enzyme. For example, this type of inhibition was observed in assays between human alanine-glyoxylate transaminase and pyruvate as inhibitor.⁴⁷ These two enzymes share 44% of identity and 67% of sequence similarity and both are PLP-dependent enzymes. The nonlinear regression fit of the raw data showed a $K_i = 360 \mu\text{M}$ and $\alpha K_i = 1224 \mu\text{M}$, indicating that the inhibitor exhibits higher affinity for the free form of the enzyme ($\alpha > 1$). The K_i value for compound **4a** is similar to the co-crystallized inhibitor from AgHKT, 4-OB ($K_i = 300 \mu\text{M}$).³⁵ This means that the series of compounds related here have similar behavior as the reference compound, showing potential to guide improvements aiming the development of more potent HKT inhibitors.

2.8. Potential molecular interactions of 1,2,4-Oxadiazoles with human kynurenine aminotransferase I and II

A potential undesirable protein target for 1,2,4-oxadiazoles are the human kynurenine aminotransferases I (KAT-I) and II (KAT-II). Like HKT, KATs catalyze the irreversible transamination of 3-HK to XA via a PLP-dependent transamination reaction (for a reviews see^{48,49}). As per request of a Reviewer, we have applied molecular docking calculations to explore the potential binding of the canonical **4a** compound to the X-ray structures of KAT-I and KAT-II (Fig. 7). It should be mentioned that HKT and KATs have a low sequence identity (less than 20%^{50,51}) and their X-ray structures exhibit RMSD values between backbone atoms of 14.6 Å for KAT-I and 10.7 Å for KAT-II (PDB ID 2VGZ⁵² and 4WLH⁵³). These findings suggest that HKT and KATs accumulated enough evolutionary changes to have different structures, and supposedly, substrate specificity and efficiency. The molecular docking calculations for binding of the canonical compound **4a** to KAT-I and KAT-II suggest that the oxadiazole derivatives bind unspecifically to different regions of both enzymes (Fig. 7). Although compound **4a** can also bind to the active site of both enzymes, the molecule binds in a rather distinct orientation compared to the respective co-crystallized inhibitors. Furthermore, the conformers bound to the active site exhibit binding energies of the same order of magnitude as the conformers bound outside the active site. Overall, these calculations suggest that 1,2,4 oxadiazole-derivatives do not display specificity to inhibit human KAT-I and KAT-II. However, one should be cautious with the use of such simplistic computational approaches to address the rather complicated phenomena of enzyme inhibition in the absence of any experimental measurements. Experimental studies such the one presented here should be performed for human KAT-I and KAT-II in order to reliably verify if 1,2,4-oxadiazoles can inhibit these enzymes and therefore be toxic to humans.

3. Conclusions

Population control remains the only effective means to curb the

Table 2
Molecular structures of 1,2,4-oxadiazole-based inhibitors and corresponding IC₅₀ and LC₅₀ values.

Compound	Inhibitor	IC ₅₀ (μM) ^a	LC ₅₀ (ppm) ^{36,b}
4a		72 ± 1	92.7
4b		101 ± 1	> 100
4c		64 ± 1	–
4d		110 ± 1	10.6
4e		88 ± 1	–
4f		54 ± 1	75.9
4 g		63 ± 1	–
4 h		70 ± 1	–
4i		42 ± 1	16.2
4j		294 ± 1	34.9
4 k		87 ± 1	72.9

^a The compounds were tested in concentrations of 0.5, 0.25, 0.1, 0.075 and 0.05 mM. Higher concentrations of compounds 4b, 4j and 4 k were replaced by 0.45, 0.3 and 0.3 mM, respectively, to better estimate IC₅₀ values. IC₅₀ mean values with standard deviation.

^b There is no report of larvicidal LC₅₀ for the compounds 4c, 4e, 4 g and 4 h.

spread of most mosquito-borne diseases. This is particularly the case for *Ae. aegypti*, the transmission vector of several widespread arboviruses such as Zika, hantavirus, dengue and yellow fever. Poverty is the main determinant of arboviral infections, and even within wealthy industrialized nations, the outbreaks of arboviral transmission can arise. For instance, dengue fever, the most common arboviral infection in the world, has already spread to the continental United States.⁵⁶ Vaccines against arboviral infections are virtually nonexistent with a few exceptions (e.g. 17D yellow fever virus, dengue virus vaccine)^{57,58}. Even though, the development of vaccines that protect against all serotypes of a given virus and/or all viruses transmitted by a given vector is a Herculean task that most likely will require time to be successfully accomplished. For this reason, current disease prevention relies on

vector control interventions.

We have previously identified the enzyme 3-hydroxykynurenine transaminase (HKT) as a potential target for 1,2,4-oxadiazole derivatives with larvicidal activity against *Ae. aegypti*.^{36,59,60} In insects, inhibition of HKT disrupts the detoxification metabolism of *Ae. aegypti* via the accumulation of 3-HK.³⁴ In the present work, we established RL_AeHKT as a molecular target for 1,2,4-oxadiazoles larvicides acting by a noncompetitive inhibition mechanism. This has been accomplished through the construction and high-yield expression of a recombinant RL_AeHKT in *E. coli*, and the standardization of a fast and low-cost absorbance spectroscopy biochemical protocol to determine HKT activity. Although the unavailability of a pure L-isomer of 3-HK in commercial sources is a limitation of this new detection method due the

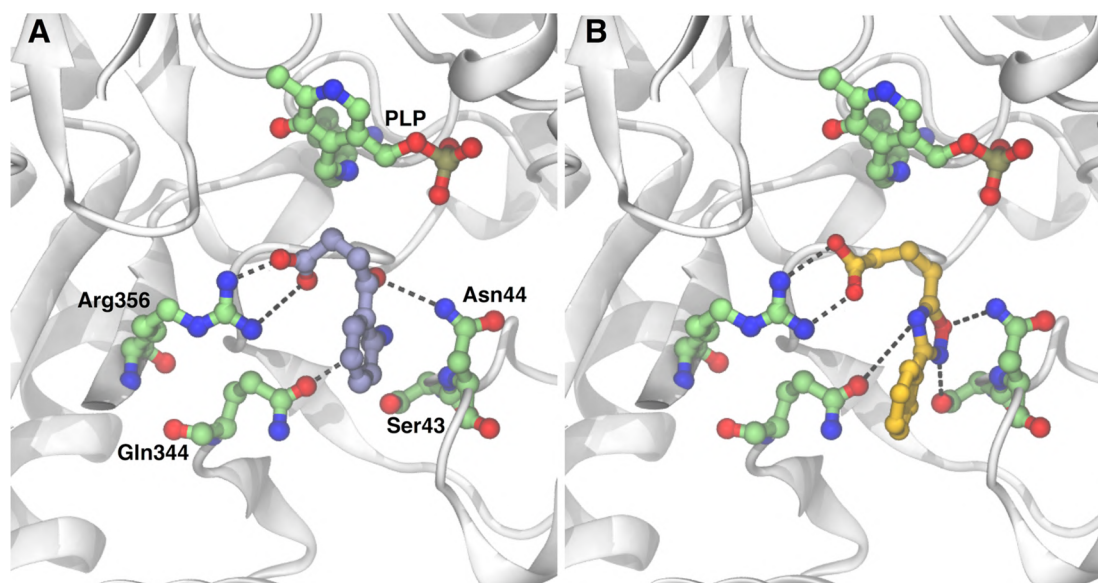


Fig. 5. Comparison of the binding mode of the co-crystallized inhibitor 4-OB (4-(2-aminophenyl)-4-oxobutyric acid) and the canonical compound **4a**. X-ray structure of *Anopheles gambiae* HKT bound to 4-OB (A) and X-ray structure with compound **4a** docked in the active site (B).³⁶ 4-OB is shown in lilac, compound **4a** in orange.

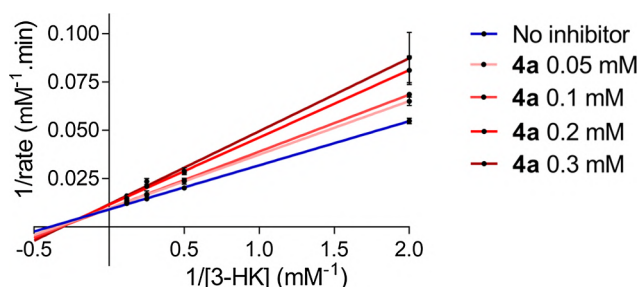


Fig. 6. Kinetics inhibitory profile of RL AeHKT by 1,2,4-oxadiazole derivatives. The substrate 3-D,L-HK concentrations tested were 0.5, 2.0, 4.0 and 8.5 mM in 0.05, 0.1, 0.2 and 0.3 mM of inhibitor **4a**.

requirement of XA for the sensing of XA-Fe³⁺ complex, it requires a smaller amount of 3-D,L-HK (2 mM) compared to previously published assays for AeHKT and AnHKT assays (10 and 5 mM, respectively).^{32,44} Moreover, the colorimetric detection dismisses the use of organic solvents as mobile phase, equipment and chromatography columns, which makes the assay so much cheaper than LC-based methods.^{32,44} The analysis of HKT activity is also faster in colorimetric assays because there is no need to separate the reaction components prior to detection of XA, removing the runtime of total time of analysis. Canavesi and co-workers eliminated this drawback referent to 3-D,L-HK using L-kynurenine as substrate and LC-MS/MS detection, but this protocol still requires the chromatography separation.⁴³ Another issue can be testing compounds that absorbs in the range of 570 nm and this could interfere in XA-Fe³⁺ complex detection. However, only highly-conjugated organic compounds can absorb in visible region of ultraviolet spectra, such as β -carotene ($\lambda_{\text{max}} = 452$ nm) and cyanidin chloride ($\lambda_{\text{max}} = 545$ nm) and this is not the case of 1,2,4-oxadiazoles studied here.⁶¹

We have produced and expressed the recombinant RL AeHKT to evaluate the inhibitory potential and inhibitory mechanism of the previously as well as newly synthesized oxadiazole-like derivatives. The presented findings attest to the inhibitory potential of oxadiazole derivatives against the enzyme HKT, which is expected to lead to the accumulation of the highly toxic substrate 3-HK in *Ae. aegypti* larvae. Given the great structural homology between HKT from *Ae. aegypti* and *An. gambiae*, we conjecture that 1,2,4-oxadiazoles may also inhibit HKT in the latter organism.

4. Methods

In order to test the hypothesis of inhibition of synthesized oxadiazole-like compounds towards HKT, we produced the recombinant enzyme in a heterologous expression system and developed the methodology to analyze the inhibition assay. All reagents, when not specified, were purchased from Sigma-Aldrich®.

4.1. *Aedes aegypti* colonies

The RecLab strain of *Ae. aegypti* (from Recife – PE) kept in the insectarium from the Department of Entomology of IAM/FIOCRUZ was used. RecLab is a reference susceptible colony originated from Recife city and it was established from eggs collected in mosquito breeding sites in Recife, Brazil. This strain has been maintained for > 15 years.^{62,63} To perform this experiment, 20 fourth-instar larvae were collected, washed in distilled water and kept on ice to perform RNA extraction.

4.2. RNA extraction, RT-PCR and cloning methods

Total RNA was extracted from a pool of five fourth-instar larvae using AmbionTM TRIzolTM Reagent (Thermo Fischer Scientific®) and chloroform solution in water, as described by Romão, T.P. and co-workers.⁶⁴ The sample was precipitated with propan-2-ol, washed with 70% ethanol, centrifuged at 20,817 g for 20 min at 4 °C and suspended in DEPC water. Reverse transcription was performed at 37 °C for 1 h in a 20 μ L final volume containing 5 μ L of RNA treated with rDNase, 15U reverse transcriptase AMV®, 0.5 μ g Oligo dT, 1 mM each dNTP, distilled water up to 13 μ L, 4 μ L cDNA Synthesis Buffer and 40U RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor, all reagents from Invitrogen®. Two oligonucleotides were designed from the sequence deposited in GenBank accession AF435806.1 (forward primer, 5'-CAC GGATCCATGAAATTTACCCGCGC-3'; reverse primer, 5'-CACCTCGAG AATACGTAATCCGGATGGGTAGCTTTG-3'). PCR was performed in a 25 μ L final volume containing 0.25 μ M each dNTP, 3U Platinum Taq DNA Polymerase from Invitrogen®, 5 μ L cDNA and 0.4 μ M of each primer. Each sample was amplified using a BIOMETRA® thermal cycler under the following conditions: initial denaturing at 94 °C for 3 min, then 34 cycles of denaturing at 94 °C for 50 s, annealing at 60 °C for 1 min and extension at 72 °C for 50 s followed by a final step at 72 °C for

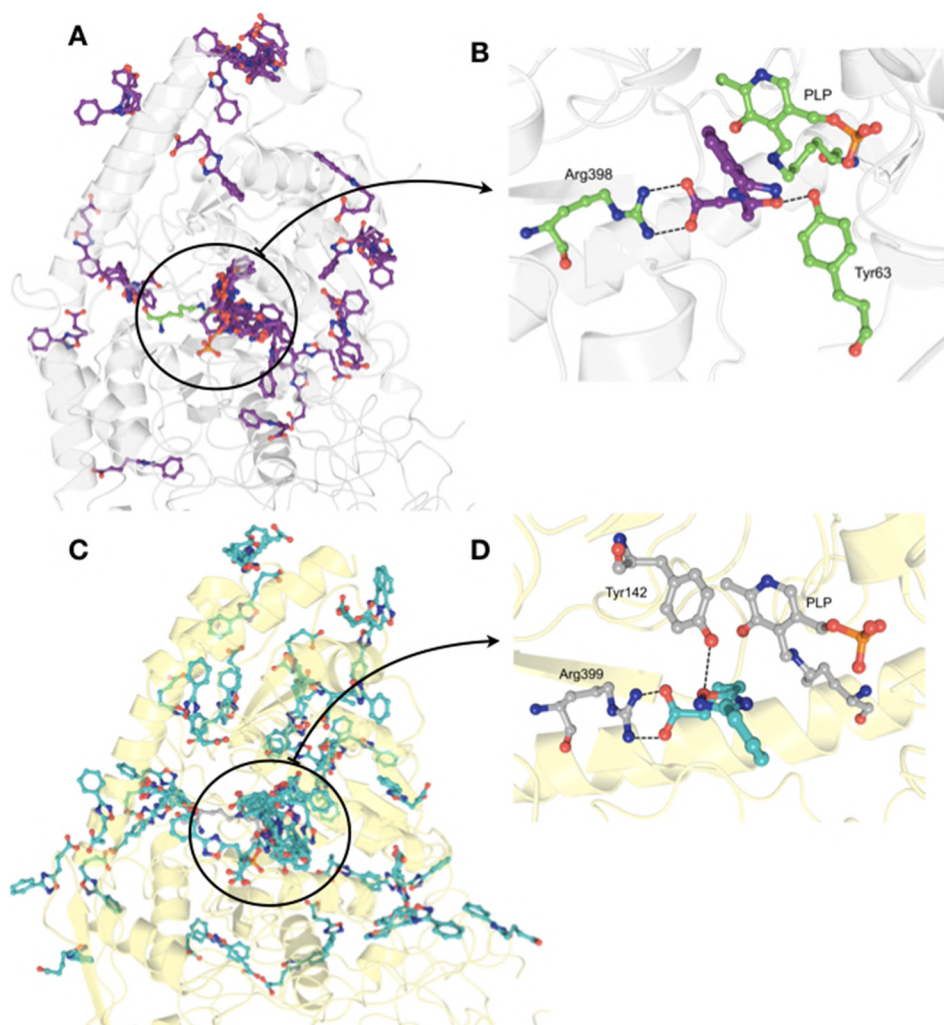


Fig. 7. Lowest energy conformations out of ca. 10^8 sampled conformations of compound **4a** upon binding to the X-ray structure of KAT-I (A) and KAT-II (C).^{52–55} The molecular docking calculations cannot discriminate one single binding site of **4a** to KAT-I and KAT-II. Detail of the active site of KAT-I (B) and KAT-II (D) containing one of the multiple bound conformers of **4a**. The residues forming hydrogen-bonds or electrostatic interactions to **4a** in the respective enzymes are labeled. Compound **4a** is shown either in purple (B) or cyan (D). KAT-I is represented in white cartoon with PLP in green, and KAT-II in yellow cartoon with PLP in gray. For comparison with **4a** bound to HKT refer to Fig. 5.

10 min. PCR products were analyzed in 1% agarose electrophoresis gel. The amplified fragments were cloned into Promega® pGEM-T Easy plasmid vector and amplified. The plasmidial DNAs were purified with QIAprep Spin Miniprep kit from Qiagen® and submitted to automatic sequencing. Alignment and analysis of the nucleotide sequences were performed with BioEdit software and EditSeq from DNASTAR® package.^{65,66} After confirmation, the constructs were subcloned in the plasmid pETTrxA-1a/LIC and used for the expression of the RL_AeHKT recombinant protein. Amplification of RL_AeHKT gene to add LIC overhangs were conducted in a 50 μ L final volume containing 0.2 μ M of each newly designed oligonucleotides (forward primer, 5'-CAGGGCGC CATGAAATTTACCCGCGG-3'; reverse primer, 5'-GACCCGACGCGGTT ATACGTAATCCGGATGGGT-3'), 1 μ L HKT-pGEM-T Easy construct, 0.2 μ M each dNTP and 1U Phusion High Fidelity DNA Polymerase from Thermo Scientific®. Complementary overhangs for LIC are underlined on both primers. Each sample was amplified using a BIORAD® T100 thermal cycler under the following conditions: initial denaturing at 98 °C for 3 min, then 35 cycles of denaturing at 98 °C for 30 s, annealing at 68 °C for 30 s and extension at 72 °C for 45 s followed by a final step at 72 °C for 10 min. Insert and vector treatment and annealing were performed as described by Geerlof, A. – EBML Hamburg.⁶⁷

4.3. Expression of recombinant HKT

The expression of the recombinant protein was carried in Rosetta 2 DE3 cells transformed with HKT_pETTrxA-1a/LIC construct. The cultures were grown in ZYM-5052 culture medium at 37 °C until OD₆₀₀ of

0.6 and expression was driven by incubation at 22 °C for 24 h. The cells were harvested by centrifugation of 7965g for 20 min at 4 °C, re-suspended in lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 8, 200 mM NaCl, 10% glycerol, 10 mM Imidazole pH 8 and 1% Tween 20) and then lysed by sonication (8 pulses of 30 s with 45 s interval). Soluble fractions were obtained after a centrifugation of 29040g for 40 min at 4 °C. Protein purification steps were executed in AKTÄ pure system (GE Healthcare®). At first, ionic affinity chromatography with HisTrap HP 5 mL column was performed using buffer A (20 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazole pH 8 and 10% glycerol) for column equilibration, injection and washing, followed by gradient elution with buffer B (20 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazole pH 8 and 10% glycerol). The recombinant RL_AeHKT-Trx was eluted in approximately 60% of buffer B. Then, a desalting chromatography (50 mM Tris-HCl pH 8, 200 mM NaCl) with HiTrap Desalting column was made to remove imidazole excess prior to TEV cleavage. About 10% (v/v) of 2 mg/mL TEV protease was added to RL_AeHKT-Trx sample and incubated at 4 °C for 16 h. RL_AeHKT was purified from TEV and Trx mixture by another ionic affinity chromatography, and the highly purified protein was submitted to desalting and concentration by Amicon® Ultra 15 mL Centrifugal Filter – 30,000 NMWL. All the steps of expression and purification were monitored by SDS-PAGE.

4.4. Synthesis and characterization of oxadiazole salts – general methods

A series of eleven oxadiazole salts were synthesized by our research group. The reactions were monitored by TLC analysis with TLC plates

containing GF₂₅₄ from E. Merck®. Compounds were characterized by Electro-thermal Mel-temp® apparatus to determine melting points. A Varian® UNMRS 400 MHz spectrometer, referenced as follows: ¹H (400 MHz), internal standard SiMe₄ at δ = 0.00 ppm, ¹³C (100 MHz), internal standard SiMe₄ at δ = 77.23 ppm was used to obtain ¹H e ¹³C spectra, respectively. NMR data were processed with ACD/Spectrus Processor®.⁶⁸ Elemental analyses were performed on Perkin Elmer® 2400 CHNS/O Series II Analyzer. Arylamidoximes were synthesized as described in literature.⁶⁹

4.5. Synthesis of 4-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)butanoic acids

Glutaric anhydride (30 mmol) and the corresponding arylamidoxime (20 mmol) were put in a round-bottom flask in an oil-bath at 473 K. After one hour, the end of the reaction was verified by TLC analysis in 7:3 hexane/ethyl acetate mobile phase. Then, 10 mL of saturated NaHCO₃ solution and 10 mL of dichloromethane were added to the cold flask and the reaction mixture was allowed to stir overnight. After the phase separation, the aqueous phase was acidified until precipitation of the title compound occurred and then dissolved in dichloromethane, dried over Na₂SO₄ and recrystallized from a mixture of chloroform and hexane. Substances 3a,⁷⁰ 3b,³⁶ 3d,⁷¹ 3e,⁷² 3f,³⁶ 3i,³⁶ 3j⁷² and 3k³⁶ were synthesized previously and their data were compared to previous literature.

4-[3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]butanoic acid (3c) (2.8 g, 69%); mp 99–100 °C (from CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, SiMe₄) δ (ppm): 2.22 (q; 2H; *J* = 7.2 Hz, 7.6 Hz; CH₂); 2.57 (t; 2H; *J* = 7.2 Hz; CH₂); 3.05 (t; 2H; *J* = 7.6 Hz; CH₂); 7.55 (d; 1H; *J* = 8.4 Hz; Harom); 7.90 (d; 1H; *J* = 8.4 Hz; Harom); 8.17 (s; 1H; Harom); 10.36 (s; 1H; OH). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 21.2; 25.6; 32.8; 126.4; 126.6; 129.3; 131.0; 133.3; 135.5; 166.7; 178.5; 179.4. Elemental analysis for C₁₂H₁₀Cl₂N₂O₃Calcd: C, 47.86; H, 3.35; Found: C, 46.79; H, 2.85.

4-[3-(Naphthalen-2-yl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]butanoic acid (3 g) (2.1 g, 57%); mp 94–96 °C (from CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, SiMe₄) δ (ppm): 2.13 (q; 2H; *J* = 7.2 Hz, 7.6 Hz; CH₂); 2.56 (t; 2H; *J* = 7.2 Hz; CH₂); 2.98 (t; 2H; *J* = 7.6 Hz; CH₂); 7.42–7.53 (m, 3H, Harom); 7.83 (dd; 2H; *J* = 8.0 Hz, 8.4 Hz; Harom); 8.13 (dd; 1H, *J* = 0.8 Hz, 1.2 Hz; Harom); 8.78 (d; 1H; *J* = 8.4 Hz; Harom). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 21.3; 25.6; 32.7; 123.7; 125.0; 126.2; 126.3; 127.6; 128.6; 129.3; 130.5; 131.8; 133.8; 168.6; 177.9; 178.5. Elemental analysis for C₁₆H₁₄N₂O₃Calcd: C, 68.07; H, 5.00; Found: C, 67.76; H, 4.44.

4-[3-[4-(Trifluoromethyl)phenyl]-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-butanoic acid (3 h) (1.8 g, 46%); mp 75–78 °C (from CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, SiMe₄) δ (ppm): 2.23 (q; 2H; *J* = 7.2 Hz, 7.6 Hz; CH₂); 2.57 (t; 2H; *J* = 7.2 Hz; CH₂); 3.07 (t; 2H; *J* = 7.6 Hz; CH₂); 7.74 (d; 2H; *J* = 8.0 Hz; Harom); 8.19 (d; 2H; *J* = 8.0 Hz; Harom); 10.40 (s; 1H; OH). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz, SiMe₄) δ (ppm): 21.3; 25.6; 32.6; 125.6; 125.8; 127.7; 128.7; 130.1; 178.0; 178.6; 179.4. Elemental analysis for C₁₃H₁₁F₃N₂O₃Calcd: C, 52.01; H, 3.69; Found: C, 52.16; H, 3.38.

4.6. Synthesis of sodium 4-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)butanoate salts

In a round-bottom flask, the respective 4-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)butanoic acid (0.8 mmol) and 3.2 mL of 1% NaOH methanol solution (freshly prepared) were mixed and the reaction was allowed to stir for one hour. After the time, methanol was evaporated and the product was recrystallized from chloroform.

Sodium 4-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)butanoate (4a) (0.17 g, 89%); mp 225–226 °C (from CHCl₃); ¹H NMR (D₂O, 400 MHz, SiMe₄) δ (ppm): 1.87 (q; 2H; *J* = 7.2 Hz, 7.6 Hz; CH₂); 2.15 (t; 2H; *J* = 7.2 Hz; CH₂); 2.75 (t; 2H; *J* = 7.6 Hz; CH₂); 7.29–7.40 (m; 3H; Harom); 7.61 (dd; 2H; *J* = 7.6 Hz, 1.6 Hz; Harom). ¹³C NMR (D₂O, 100 MHz, SiMe₄) δ (ppm): 25.3; 28.2; 39.2; 127.8; 129.6; 131.7; 134.3; 170.0; 183.4;

184.5. Elemental analysis for C₁₂H₁₁N₂NaO₃Calcd: C, 56.70; H, 4.36. Found: C, 55.93; H, 4.18.

Sodium 4-[3-(4-methoxyphenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]butanoate (4b) (0.19 g, 91%); mp 243–244 °C (from CHCl₃); ¹H NMR (D₂O, 400 MHz, SiMe₄) δ (ppm): 1.88 (q; 2H; *J* = 7.6 Hz, 7.6 Hz; CH₂); 2.17 (t; 2H; *J* = 7.6 Hz; CH₂); 2.76 (t; 2H; *J* = 7.6 Hz; CH₂); 3.65 (s; 3H; CH₃); 6.74 (d; 2H; *J* = 8.8 Hz; Harom); 7.46 (d; 2H; *J* = 8.8 Hz; Harom). ¹³C NMR (D₂O, 100 MHz, SiMe₄) δ (ppm): 25.3; 28.2; 39.2; 57.9; 116.8; 120.4; 131.3; 163.9; 169.6; 183.1; 184.4. Elemental analysis for C₁₃H₁₃N₂NaO₄ Calcd: C, 54.93; H, 4.61. Found: C, 53.88; H, 4.66.

Sodium 4-[3-(3,4-dichlorophenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]butanoate (4c) (0.22 g, 90%); mp 244–245 °C (from CHCl₃); ¹H NMR (D₂O, 400 MHz, SiMe₄) δ (ppm): 1.97 (q; 2H; *J* = 7.2 Hz, 7.6 Hz; CH₂); 2.21 (t; 2H; *J* = 7.2 Hz; CH₂); 2.91 (t; 2H; *J* = 7.6 Hz; CH₂); 7.36 (d; 1H; *J* = 8.8 Hz; Harom); 7.46 (dd; 1H; *J* = 8.8 Hz, 2.0 Hz; Harom); 7.62 (d; 1H; *J* = 2.0 Hz; Harom). ¹³C NMR (D₂O, 100 MHz, SiMe₄) δ (ppm): 25.3; 28.3; 39.1; 127.9; 129.0; 131.1; 133.6; 135.1; 137.7; 168.4; 184.0; 184.5. Elemental analysis for C₁₂H₉Cl₂N₂NaO₃Calcd: C, 44.61; H, 2.81. Found: C, 43.77; H, 2.78.

Sodium 4-[3-(4-bromophenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]butanoate (4d) (0.23 g, 92%); mp 285–286 °C (from CHCl₃); ¹H NMR (D₂O, 400 MHz, SiMe₄) δ (ppm): 1.93 (q; 2H; *J* = 7.2 Hz, 7.6 Hz; CH₂); 2.19 (t; 2H; *J* = 7.2 Hz; CH₂); 2.86 (t; 2H; *J* = 7.6 Hz; CH₂); 7.36 (d; 2H; *J* = 8.4 Hz; Harom); 7.42 (d; 2H; *J* = 8.4 Hz; Harom). ¹³C NMR (D₂O, 100 MHz, SiMe₄) δ (ppm): 25.3; 28.3; 39.2; 126.8; 128.2; 131.1; 134.6; 169.4; 183.7; 184.5. Elemental analysis for C₁₂H₁₀BrN₂NaO₃Calcd: C, 43.27; H, 3.03. Found: C, 42.53; H, 2.98.

Sodium 4-[3-(p-tolyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]butanoate (4e) (0.18 g, 91%); mp 246–247 °C (from CHCl₃); ¹H NMR (D₂O, 400 MHz, SiMe₄) δ (ppm): 1.90 (q; 2H; *J* = 8.0 Hz, 7.6 Hz; CH₂); 2.16 (t; 2H; *J* = 7.6 Hz; CH₂); 2.22 (s; 1H; CH₃); 2.80 (t; 2H; *J* = 8.0 Hz; CH₂); 7.16 (d; 2H; *J* = 8.0 Hz; Harom); 7.56 (d; 2H; *J* = 8.0 Hz; Harom). ¹³C NMR (D₂O, 100 MHz, SiMe₄) δ (ppm): 23.2; 25.3; 28.2; 39.1; 125.0; 129.7; 132.3; 145.3; 170.1; 183.4; 184.6. Elemental analysis for C₁₃H₁₃N₂NaO₃Calcd: C, 58.21; H, 4.88. Found: C, 57.53; H, 4.57.

Sodium 4-[3-(m-tolyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]butanoate (4f) (0.15 g, 83%); mp 244–245 °C (from CHCl₃); ¹H NMR (D₂O, 400 MHz, SiMe₄) δ (ppm): 1.91 (q; 2H; *J* = 7.6 Hz, 7.2 Hz; CH₂); 2.18 (t; 2H; *J* = 7.2 Hz; CH₂); 2.22 (s, 1H, CH₃); 2.82 (t; 2H; *J* = 7.6 Hz; CH₂); 7.51–7.24 (m; 4H; Harom). ¹³C NMR (D₂O, 100 MHz, SiMe₄) δ (ppm): 23.0; 25.2; 28.2; 38.9; 126.7; 127.9; 130.1; 131.6; 135.0; 141.9; 170.2; 183.4; 184.3. Elemental analysis for C₁₃H₁₃N₂NaO₃Calcd: C, 58.21; H, 4.88. Found: C, 56.58; H, 4.69.

Sodium 4-[3-(naphthalen-2-yl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]butanoate (4 g) (0.18 g, 79%); mp 195–197 °C (from CHCl₃); ¹H NMR (D₂O, 400 MHz, SiMe₄) δ (ppm): 1.80 (q; 2H; *J* = 7.2 Hz, 8.0 Hz; CH₂); 2.11 (t; 2H; *J* = 7.2 Hz; CH₂); 2.67 (t; 2H; *J* = 8.0 Hz; CH₂); 7.16–7.25 (m; 4H; Harom); 7.54 (dd; 2H; *J* = 7.2 Hz, 7.6 Hz; Harom); 8.08 (d; 1H; *J* = 7.6 Hz; Harom). ¹³C NMR (D₂O, 100 MHz, SiMe₄) δ (ppm): 25.1; 28.1; 38.9; 124.9; 127.6; 127.6; 129.0; 130.0; 131.1; 131.5; 132.3; 134.4; 135.9; 170.0; 182.3; 184.2. Elemental analysis for C₁₆H₁₃N₂NaO₃Calcd: C, 63.16; H, 4.31. Found: C, 60.94; H, 4.19.

Sodium 4-[3-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl] butanoate (4 h) (0.22 g, 90%); mp 277–278 °C (from CHCl₃); ¹H NMR (D₂O, 400 MHz, SiMe₄) δ (ppm): 1.95 (q; 2H; *J* = 7.2 Hz, 7.6 Hz; CH₂); 2.19 (t; 2H; *J* = 7.2 Hz; CH₂); 2.88 (t; 2H; *J* = 7.6 Hz; CH₂); 7.60 (d; 2H; *J* = 8.4 Hz; Harom); 7.79 (d; 2H; *J* = 8.4 Hz; Harom). ¹³C NMR (D₂O, 100 MHz, SiMe₄) δ (ppm): 25.3; 28.3; 39.1; 124.9; 127.6; 128.5; 128.6; 130.1; 131.5; 134.7; 135.1; 169.3; 184.0; 184.5. Elemental analysis for C₁₃H₁₀F₃N₂NaO₃Calcd: C, 48.46; H, 3.13. Found: C, 46.24; H, 3.09.

Sodium 4-[3-(4-iodophenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]butanoate (4i) (0.25 g, 88%); mp 285–286 °C (from CHCl₃); ¹H NMR (D₂O, 400 MHz, SiMe₄) δ (ppm): 1.96 (q; 2H; *J* = 7.6 Hz, 7.6 Hz; CH₂); 2.20 (t; 2H; *J* = 7.6 Hz; CH₂); 2.90 (t; 2H; *J* = 7.6 Hz; CH₂); 7.40 (d; 2H; *J* = 7.6 Hz; Harom); 7.68 (d; 2H; *J* = 7.6 Hz; Harom). ¹³C NMR (D₂O,

100 MHz, SiMe₄) δ (ppm): 25.3; 28.3; 39.1; 100.6; 127.5; 131.1; 140.8; 169.7; 183.8; 184.5. Elemental analysis for C₁₂H₁₀IN₂NaO₃Calcd: C, 37.92; H, 2.65. Found: C, 37.88; H, 2.85.

Sodium 4-[3-(4-chlorophenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]butanoate (4j) (0.19 g, 89%); mp 277–278 °C (from CHCl₃); ¹H NMR (D₂O, 400 MHz, SiMe₄) δ (ppm): 1.96 (q; 2H; *J* = 7.6 Hz, 7.2 Hz; CH₂); 2.19 (t; 2H; *J* = 7.2 Hz; CH₂); 2.89 (t; 2H; *J* = 7.6 Hz; CH₂); 7.39 (dd; 2H; *J* = 7.6 Hz, 2.0 Hz; Harom); 7.67 (dd; 2H; *J* = 7.6 Hz, 2.0 Hz; Harom). ¹³C NMR (D₂O, 100 MHz, SiMe₄) δ (ppm): 25.3; 28.3; 39.1; 126.7; 131.2; 131.8; 139.8; 169.5; 183.8; 184.6. Elemental analysis for C₁₂H₁₀ClN₂NaO₃Calcd: C, 49.93; H, 3.49. Found: C, 48.29; H, 3.33.

Sodium 4-[3-(benzodioxol-5-yl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]butanoate (4 k) (0.19 g, 87%); mp 257–259 °C (from CHCl₃); ¹H NMR (D₂O, 400 MHz, SiMe₄) δ (ppm): 1.92 (q; 2H; *J* = 7.6 Hz, 7.2 Hz; CH₂); 2.18 (t; 2H; *J* = 7.6 Hz; CH₂); 2.83 (t; 2H; *J* = 7.2 Hz; CH₂); 5.87 (s; 2H; CH₂); 6.73 (d; 1H; *J* = 8.4 Hz; Harom); 7.03 (d; 1H; *J* = 1.6 Hz; Harom); 7.20 (dd; 1H; *J* = 8.4 Hz, 1.6 Hz; Harom). ¹³C NMR (D₂O, 100 MHz, SiMe₄) δ (ppm): 25.3; 28.2; 39.1; 104.5; 109.4; 111.3; 121.7; 124.9; 150.2; 152.5; 169.7; 183.3; 184.5. Elemental analysis for C₁₃H₁₁N₂NaO₅Calcd: C, 56.73; H, 4.03. Found: C, 51.26; H, 3.70.

4.7. Biochemical assay

The developed method for the enzymatic assay was adapted from Han and coworkers.³² Stock solutions were freshly prepared, except for 3-hydroxy-D,L-kynurenine (3-D,L-HK) which was kept in -20 °C. 3-D,L-HK and sodium pyruvate were directly diluted in 200 mM HEPES buffer pH 7.5/100 mM NaCl, while 20 mM pyridoxal 5'-phosphate (PLP) was first dissolved in 0.1 M NaOH and then diluted in HEPES/NaCl buffer until 0.5 mM. A solution of 20 mM xanthurenic acid was prepared in 0.1 M NaOH to perform calibration curves. The reactions were carried out in a 96-well round bottom microplate containing 8 μ L of 25 mM 3-D,L-HK, 8 μ L of 0.5 mM PLP and 4 μ L of 50 mM sodium pyruvate, 2 μ g of recombinant RL_AeHKT and HEPES/NaCl buffer to a 100 μ L final volume. The plates were incubated at 50 °C for 5 min and then 100 μ L of 10 mM FeCl₃·6H₂O in 0.1 M HCl was added to interrupt the reaction and generate the XA-Fe³⁺ complex. Mixes were prepared to avoid differences between replicates. Samples were performed in duplicate and absorbances were read at 570 nm. All data were analyzed using GraphPad Prism7.0 software package using the Michaelis-Menten equation. Kinetics and inhibition parameters were determined by non-linear regression.

4.8. Kinetics analysis

Kinetics assays were performed as described above. 3-D,L-HK concentrations tested are 0.5, 1.75, 3, 4, 8.5 and 10 mM in the presence of 5 mM sodium pyruvate. pH assays were performed by adding 60% of reaction volume of 200 mM Tris-HCl buffer pH 6, 7 and 8, 200 mM Borate buffer pH 9 and 200 mM Carbonate buffer pH 10, all containing 100 mM NaCl. The effect of the temperature was evaluated by incubation of all reaction components in a heater at 30, 40, 50, 60 and 70 °C. All experiments were conducted in duplicate and blank samples were analyzed simultaneously to each read.

4.9. Inhibition assays

The inhibition assays were performed with pre-incubation of each compound in five concentrations ranging from 0.5 mM to 0.05 mM with PLP and RL_AeHKT. To achieve that, solution mixes were prepared to ensure that the same amount of enzyme and co-factor was present in the different inhibitor concentrations. Blank samples and negative controls were incubated at the same time as the samples. After 30 min of incubation at 50 °C, the samples were mixed to the other reaction components and the assays were performed as described in the Biochemical assay subsection. All compounds tested were diluted in

200 mM HEPES buffer pH 7.5/100 mM NaCl and the samples were evaluated in duplicate. In each test, the negative control was added to calculate the activity percentage. Molecular docking calculations have been performed for KAT-I and KAT-II as per request of one Reviewer without any experimental evidence to validate the simulations.

4.10. Molecular docking calculations

The hybrid search method based on the Lamarckian genetic algorithm (LGA) implemented in the suite of programs AutoDock v4.0 was used in conjunction with the semi-empirical free energy force field for the molecular docking calculations.^{73,74} This energy function describes the energetics of the binding process involving two molecules in an aqueous environment using pair-wise terms to evaluate the interaction between the two molecules coupled to an empirical method to estimate the contribution of the surrounding solvent.⁷⁴ Hence, the free energy of binding is given by i. the difference between the energy of the ligand and the protein in a separated unbound state and ii. the energy of the ligand-protein complex. During the conformational search, the intramolecular energetics of the transition from the unbound state to the bound conformation is evaluated for each of the molecules separately, and subsequently the intermolecular energetics of bringing the two molecules together into the bound complex is evaluated. The binding energy between two molecules is given by

$$\Delta G = (V_{\text{bound}}^{\text{ligand-ligand}} - V_{\text{unbound}}^{\text{ligand-ligand}}) + (V_{\text{bound}}^{\text{protein-protein}} - V_{\text{unbound}}^{\text{protein-protein}}) + (V_{\text{bound}}^{\text{ligand-protein}} - V_{\text{unbound}}^{\text{ligand-protein}}) + \Delta S_{\text{conf}} \quad (1)$$

Eq. (1) includes four terms to describe the intramolecular energies for the bound and unbound states of the guest molecule and for the bound and unbound states of the host framework, two terms to describe the change in intermolecular energy between the bound and unbound states and a one term to represent an estimate of the conformational entropy lost upon binding.^{73,74} Pair-wise atomic interactions account for dispersion/repulsion, hydrogen bonding, electrostatics, and desolvation as described

$$V = W_{\text{vdw}} \sum_{ij} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + W_{\text{hond}} \sum_{ij} E(t) \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) + W_{\text{coul}} \sum_{ij} \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} + W_{\text{sol}} \sum_{ij} (S_i V_j + S_j V_i) e^{(-r_{ij}^2/2\sigma^2)} \quad (2)$$

where W corresponds to weighting constants optimized to calibrate the empirical free energy based on a set of experimentally characterized protein complexes.⁷⁴ The 6/12 potential describes dispersion/repulsion interactions with parameters A and B taken from the Amber force field.⁷⁵ The 10/12 potential is a directional H-bond term whose interaction directionality E(t) is dependent on the angle t away from ideal bonding geometry. A screened Coulomb potential is used to describe electrostatic interactions. The fourth term is a desolvation potential based on the volume (V) of the atoms surrounding a given atom, weighted by a solvation parameter (S) and an exponential term based on the distance weighting σ . Rotatable bonds included all torsional degrees of freedom.^{73,74}

Molecular docking calculations were performed using the X-ray structures of the human kynurenine aminotransferase (KAT) I and II.^{52–55} During the conformational search the oxadiazole ligand were fully flexible concerning its degrees of translation, orientation and conformation with respect to the protein structure, which was kept rigid. Each sampled conformation was evaluated and ranked according to the empirical energy function (equation (2)). Grid maps with 126 × 126 × 126 points of dimension and a grid spacing of 0.20 Å (active site only) and 0.502 Å (full protein) were calculated using AutoGrid4.⁷⁶ The Amber forcefield available with the distribution of

AutoDock v4.0 was used.⁷⁵ Electrostatic interactions were evaluated with a screened Coulomb potential.⁷⁷ A desolvation potential was used which is based on the volume of the atoms surrounding a given atom, weighted by a solvation parameter and an exponential term based on the distance, with a distance weighting factor of 3.5 Å.⁷⁸

The Lamarckian Genetic Algorithm (LGA) was used to perform the conformational search following the same protocol as previously described.^{79,80} Briefly, LGA parameters were defined as follows: the initial population of random individuals had a size of 150 individuals with a maximum number of 2.5×10^6 energy evaluations and a maximum number of generations equal to 27,000. An elitism rate of 1 was applied to ensure that the top individual always survives into the next generation in conjunction with mutation and crossover rates of 0.02 and 0.08, respectively. A maximum of 300 iterations per local search was used. The probability of performing a local search on an individual was 0.06 where the maximum number of consecutive successes or failures before doubling or halving the search step was 4. A total of 200 generations were sampled. The final lowest energy structures were clustered based on a RMS positional deviation of 2.0 Å.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We thank Dr. Roberto D. Lins for using the AKTÄ to perform HKT purifications at the Dept. of Virology, IAM-FIOCRUZ. We also thank for the insectarium support from IAM-FIOCRUZ and the Program for Technological Development in Tools for Health (PDTIS-FIOCRUZ) for the use of its automatic sequencing facilities. Financial support for this research project was provided by the Brazilian funding agencies FACEPE (APQ-0732-1.06/14), BioMol/CAPES (BioComp 23038.004630/2014-35), INCT-Fx/CNPq (465259/2014-6) and FAPESP (2013/07600-3). Molecular docking calculations were performed and included in the manuscript as requested by one of the Reviewers.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.115252>.

References

- Weaver SC, Reisen WK. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res.* 2010;85(2):328–345. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.008>.
- Mayer SV, Tesh RB, Vasilakis N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. *Acta Trop.* 2017;166:155–163. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.11.020>.
- Sukhralia S, Verma M, Gopirajan S, et al. From dengue to Zika: the wide spread of mosquito-borne arboviruses. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019;38(1):3–14. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3375-7>.
- Callender DM. Management and control of yellow fever virus: Brazilian outbreak January–April, 2018. *Glob Public Health.* 2019;14(3):445–455. <https://doi.org/10.1080/17441692.2018.1512144>.
- Ventura CV, Maia M, Bravo-Filho V, Góis AL, Belfort R. Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. *Lancet.* 2016;387(10015):228. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00006-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00006-4).
- Henriques-Souza A, de Azevedo Marques ET, Antunes de Brito CA, et al. Guillain-Barré syndrome, acute disseminated encephalomyelitis and encephalitis associated with Zika virus infection in Brazil: detection of viral RNA and isolation of virus during late infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2017;97(5):1405–1409. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0106>.
- van Aalst M, Nelen CM, Goorhuis A, Stijns C, Grobusch MP. Long-term sequelae of chikungunya virus disease: a systematic review. *Travel Med Infect Dis.* 2017;15:8–22. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2017.01.004>.
- Brizzzi K. Neurologic manifestation of Chikungunya virus. *Curr Infect Dis Rep.* 2017;19(2):6. <https://doi.org/10.1007/s11908-017-0561-1>.
- Platt DJ, Miner JJ. Consequences of congenital Zika virus infection. *Curr Opin Virol.* 2017;27:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.09.005>.
- Meneses JDA, Ishigami AC, de Mello LM, et al. Lessons learned at the epicenter of Brazil's congenital Zika epidemic: evidence from 87 confirmed cases. *Clin Infect Dis.* 2017;64(10):1302–1308. <https://doi.org/10.1093/cid/cix1366>.
- PAHO/WHO. Zika cases and congenital syndrome associated with Zika virus reported by countries and territories in the Americas, 2015–2018. Cumulative cases. 2018; 2018 Published 2018 (accessed June 17, 2019).
- World Health Organization. Situation report: Zika virus, microcephaly, Guillain-Barré syndrome, 10 March 2017. 2017; 2017.
- Liu-Helmersson J, Stenlund H, Wilder-Smith A, Rocklöv J. Vectorial capacity of *Aedes aegypti*: effects of temperature and implications for global dengue epidemic potential. *Moreira LA, ed. PLoS One.* 2014;9(3):e89783. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089783>.
- Goyal M, Chauhan A, Goyal V, Jaiswal N, Singh S, Singh M. Recent development in the strategies projected for chikungunya vaccine in humans. *Drug Des Devel Ther.* 2018;12:4195–4206. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S181574>.
- das Neves Almeida R, Racine T, Magalhães K, Kobinger G. Zika virus vaccines: challenges and perspectives. *Vaccines.* 2018;6(3):62. <https://doi.org/10.3390/vaccines6030062>.
- Viana-Medeiros PF, Bellinato DF, Martins AJ, Valle D. Insecticide resistance, associated mechanisms and fitness aspects in two Brazilian *Stegomyia aegypti* (= *Aedes aegypti*) populations. *Med Vet Entomol.* 2017;31(4):340–350. <https://doi.org/10.1111/mve.12241>.
- Bellinato DF, Viana-Medeiros PF, Araújo SC, Martins AJ, Lima JBP, Valle D. Resistance status to the insecticides temephos, deltamethrin, and diflubenzuron in Brazilian *Aedes aegypti* populations. *Biomed Res Int.* 2016;2016:1–12. <https://doi.org/10.1155/2016/8603263>.
- de Araújo AP, Paiva MHS, Cabral AM, et al. Screening *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from Pernambuco, Brazil for resistance to temephos, diflubenzuron, and cypermethrin and characterization of potential resistance mechanisms. *J Insect Sci.* 2019;19(3):1–15. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iez054> (16).
- Nkya TE, Akhouayri I, Kisinza W, David J-P. Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: facts, evidences and prospects. *Insect Biochem Mol Biol.* 2013;43(4):407–416. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.10.006>.
- Liu N. Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions. *Annu Rev Entomol.* 2015;60(1):537–559. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020828>.
- Sokhna C, Ndiath MO, Rogier C. The changes in mosquito vector behaviour and the emerging resistance to insecticides will challenge the decline of malaria. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(10):902–907. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12314>.
- Kasai S, Komagata O, Itokawa K, et al. Mechanisms of Pyrethroid resistance in the dengue mosquito vector, *Aedes aegypti*: target site insensitivity, penetration, and metabolism. *Kittayapong P, ed. PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(6):e2948. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002948>.
- Li J, Li G. Transamination of 3-hydroxykynurenine to produce xanthurenic acid: a major branch pathway of tryptophan metabolism in the mosquito, *Aedes aegypti*, during larval development. *Insect Biochem Mol Biol.* 1997;27(10):859–867. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(97\)00068-4](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(97)00068-4).
- Li J, Beertsen BT, James AA. Oxidation of 3-hydroxykynurenine to produce xanthommatin for eye pigmentation: a major branch pathway of tryptophan catabolism during pupal development in the Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol.* 1999;29(4):329–338. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(99\)00007-7](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(99)00007-7).
- Chen Y, Guillemin GJ. Kynurenine pathway metabolites in humans: disease and healthy states. *Int J Tryptophan Res.* 2009;2(1):1–19. <https://doi.org/10.4137/IJTR.S2097>.
- Schwarcz R, Stone TW. The kynurenine pathway and the brain: challenges, controversies and promises. *Neuropharmacology.* 2017;112(August):237–247. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.08.003>.
- Vazquez S, Garner B, Sheil MM, Truscott RJW. Characterisation of the major auto-oxidation products of 3-hydroxykynurenine under physiological conditions. *Free Radic Res.* 2000;32(1):11–23. <https://doi.org/10.1080/10715760000300021>.
- Giles GI, Collins CA, Stone TW, Jacob C. Electrochemical and in vitro evaluation of the redox-properties of kynurenine species. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;300(3):719–724. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02917-0](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02917-0).
- Sathyasaikumar KV, Taranina M, Wu H-Q, et al. Xanthurenic acid formation from 3-hydroxykynurenine in the mammalian brain: neurochemical characterization and physiological effects. *Neuroscience.* 2017;367(3):85–97. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.10.006>.
- Han Q, Fang J, Li J. 3-Hydroxykynurenine transaminase identity with alanine glyoxylate transaminase. *J Biol Chem.* 2002;277(18):15781–15787. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201202200>.
- Han Q, Kim SR, Ding H, Li J. Evolution of two alanine glyoxylate aminotransferases in mosquito. *Biochem J.* 2006;397(3):473–481. <https://doi.org/10.1042/BJ20060469>.
- Han Q, Li J. Comparative characterization of *Aedes* 3-hydroxykynurenine transaminase/alanine glyoxylate transaminase and *Drosophila* serine pyruvate aminotransferase. *FEBS Lett.* 2002;527(1–3):199–204. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03229-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03229-5).
- Han Q, Beertsen BT, Li J. The tryptophan oxidation pathway in mosquitoes with emphasis on xanthurenic acid biosynthesis. *J Insect Physiol.* 2007;53(3):254–263. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2006.09.004>.
- Garcia GE, Wirtz RA, Barr JR, Woolfitt A, Rosenberg R. Xanthurenic acid induces gametogenesis in *Plasmodium*, the Malaria Parasite. *J Biol Chem.* 1998;273(20):12003–12005. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.20.12003>.

35. Rossi F, Garavaglia S, Giovenzana GB, Arca B, Li J, Rizzi M. Crystal structure of the *Anopheles gambiae* 3-hydroxykynurenine transaminase. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103(15):5711–5716. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510233103>.
36. Oliveira VS, Pimenteira C, da Silva-Alves DCB, et al. The enzyme 3-hydroxykynurenine transaminase as potential target for 1,2,4-oxadiazoles with larvicidal activity against the dengue vector *Aedes aegypti*. *Bioorg Med Chem*. 2013;21(22):6996–7003. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.09.020>.
37. Matthews BJ, Dudchenko O, Kingan S, et al. Improved *Aedes aegypti* mosquito reference genome assembly enables biological discovery and vector control. *bioRxiv*. 2017;240747. <https://doi.org/10.1101/240747>.
38. Studier FW. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expr Purif*. 2005;41(1):207–234. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>.
39. Novagen I. pET system manual. <http://research.fhcr.org/content/dam/stripe/hahn/methods/biochem/pet.pdf>. Published 1991. Accessed June 18, 2019.
40. Lepkovsky S, Roboz E, Haagen-Smit AJ. Xanthurenic acid and its role in the tryptophan metabolism of pyridoxine-deficient rats. *J Biol Chem*. 1943;149:195–201.
41. Lepkovsky S, Nielsen E. A green pigment-producing compound in urine of pyridoxine-deficient rats. *J Biol Chem*. 1942;144:135–138.
42. Lima VLA, Dias F, Nunes RD, et al. The antioxidant role of xanthurenic acid in the *Aedes aegypti* Midgut digestion of a blood meal. Hansen IA, ed. *PLoS One*. 2012;7(6):e38349. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038349>.
43. Canavesi R, Miggiano R, Stella M, et al. Study of *Anopheles gambiae* 3-hydroxykynurenine transaminase activity and inhibition by LC-MS/MS method. *J Pharm Biomed Anal*. 2019;173:154–161. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.05.025>.
44. Rossi F, Lombardo F, Paglino A, et al. Identification and biochemical characterization of the *Anopheles gambiae* 3-hydroxykynurenine transaminase. *FEBS J*. 2005;272(21):5653–5662. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04961.x>.
45. Good NE, Winget GD, Winter W, Connolly TN, Izawa S, Singh RMM. Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry*. 1966;5(2):467–477. <https://doi.org/10.1021/bi00866a011>.
46. Lineweaver H, Burk D. The determination of enzyme dissociation constants. *J Am Chem Soc*. 1934;56(3):658–666. <https://doi.org/10.1021/ja01318a036>.
47. Cellini B, Bertoldi M, Montioli R, Paiardini A, Borri Voltattorni C. Human wild-type alanine:glyoxylate aminotransferase and its naturally occurring G82E variant: functional properties and physiological implications. *Biochem J*. 2007;408(1):39–50. <https://doi.org/10.1042/BJ20070637>.
48. Rossi F, Schwarcz R, Rizzi M. Curiosity to kill the KAT (kynurenine amino-transferase): structural insights into brain kynurenic acid synthesis. *Curr Opin Struct Biol*. 2008;18(6):748–755. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.09.009>.
49. Rossi F, Miggiano R, Ferraris DM, Rizzi M. The synthesis of kynurenic acid in mammals: an updated kynurenine aminotransferase structural KATatalogue. *Front Mol Biosci*. 2019;6(February):1–9. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00007>.
50. Sievers F, Wilm A, Dineen D, et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol*. 2011;7(539) <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>.
51. Sievers F, Higgins DG. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein Sci*. 2018;27(1):135–145. <https://doi.org/10.1002/pro.3290>.
52. Rossi F, Garavaglia S, Montalbano V, Walsh MA, Rizzi M. Crystal structure of human kynurenine aminotransferase II, a drug target for the treatment of schizophrenia. *J Biol Chem*. 2008;283(6):3559–3566. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707925200>.
53. Nadvi NA, Salam NK, Park J, et al. High resolution crystal structures of human kynurenine aminotransferase-I bound to PLP cofactor, and in complex with aminooxyacetate. *Protein Sci*. 2017;26(4):727–736. <https://doi.org/10.1002/pro.3119>.
54. Han Q, Robinson H, Cai T, Tagle DA, Li J. Structural insight into the inhibition of human kynurenine aminotransferase I/Glutamine transaminase K. *J Med Chem*. 2009;52(9):2786–2793. <https://doi.org/10.1021/jm9000874>.
55. Han Q, Cai T, Tagle DA, Robinson H, Li J. Substrate specificity and structure of human aminoadipate aminotransferase/kynurenine aminotransferase ii. *Biosci Rep*. 2008;28(4):205–215. <https://doi.org/10.1042/BSR20080085>.
56. George SL. Prospects for a dengue vaccine: progress and pitfalls. *Mo Med*. 2014;111(3):337–342. <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed12&NEWS=N&AN=25211865>.
57. Wieten RW, Goorhuis A, Jonker EFF, et al. 17D yellow fever vaccine elicits comparable long-term immune responses in healthy individuals and immune-compromised patients. *J Infect*. 2016;72(6):713–722. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2016.02.017>.
58. Scott LJ. Tetraivalent dengue vaccine: a review in the prevention of dengue disease. *Drugs*. 2016;76(13):1301–1312. <https://doi.org/10.1007/s40265-016-0626-8>.
59. Neves Filho RAW, da Silva CA, da Silva CSB, et al. Improved microwave-mediated synthesis of 3-(3-Aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)propionic acids and their larvicidal and fungal growth inhibitory properties. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2009;57(8):819–825. <https://doi.org/10.1248/cpb.57.819>.
60. da Silva-Alves DCB, dos Anjos JV, Cavalcante NNM, Santos GKN, Navarro DMDAF, Srivastava RM. Larvicidal isoxazoles: synthesis and their effective susceptibility towards *Aedes aegypti* larvae. *Bioorg Med Chem*. 2013;21(4):940–947. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.12.006>.
61. Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS. Ultraviolet spectroscopy. *Introduction to spectroscopy – a guide for students of organic chemistry*. 2nd ed. Saunders College Publishing; 1996:267–302.
62. Kuno G. Early history of laboratory breeding of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) focusing on the origins and use of selected strains. *J Med Entomol*. 2010;47(6):957–971. <https://doi.org/10.1603/ME10152>.
63. Melo-Santos MAV, Varjal-Melo JJM, Araújo AP, et al. Resistance to the organophosphate temephos: mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. *Acta Trop*. 2010;113(2):180–189. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.10.015>.
64. Romão TP, de Melo Chalegre KD, Key S, et al. A second independent resistance mechanism to *Bacillus sphaericus* binary toxin targets its alpha-glucosidase receptor in *Culex quinquefasciatus*. *FEBS J*. 2006;273(7):1556–1568. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05177.x>.
65. DNASTAR. EditSeq®. 2006.
66. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser*. 1999;41:95–98. <http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>.
67. Georloff A. Ligase Independent Cloning (LIC). <https://doi.org/10.1002/9783527678679.dg06795>.
68. Inc. ACD. ACD/Spectrum Processor. 2017. www.acdlabs.com.
69. Eloy F, Lenaers R. The chemistry of amidoximes and related compounds. *Chem Rev*. 1962;62(2):155–183. <https://doi.org/10.1021/cr60216a003>.
70. Huhtiniemi T, Suuronen T, Rinne VM, et al. Oxadiazole-carbonylaminothiureas as SIRT1 and SIRT2 Inhibitors. *J Med Chem*. 2008;51(15):4377–4380. <https://doi.org/10.1021/jm800639h>.
71. Tale RHH, Rodge AHH, Keché APP, et al. Synthesis and anti-bacterial, anti-fungal activity of novel 1,2,4-oxadiazole. *J Chem Pharm Res*. 2011;3(2):496–505.
72. Lueg C, Schepmann D, Günther R, Brust P, Wünsch B. Development of fluorinated CB2 receptor agonists for PET studies. *Bioorg Med Chem*. 2013;21(23):7481–7498. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.09.040>.
73. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*. 2009;30(16):2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>.
74. Huey R, Morris GM, Olson AJ, Goodsell DS. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *J Comput Chem*. 2007;28(6):1145–1152. <https://doi.org/10.1002/jcc.20634>.
75. Weiner SJ, Kollman PA, Singh UC, et al. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. *J Am Chem Soc*. 1984;106(3):765–784. <https://doi.org/10.1021/ja00315a051>.
76. Goodford PJ. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *J Med Chem*. 1985;28(7):849–857. <https://doi.org/10.1021/jm00145a002>.
77. Mehler EL, Solmajer T. Electrostatic effects in proteins: comparison of dielectric and charge models. *Protein Eng Des Sel*. 1991;4(8):903–910. <https://doi.org/10.1093/protein/4.8.903>.
78. Stouten PFW, Frömmel C, Nakamura H, Sander C. An effective solvation term based on atomic occupancies for use in protein simulations. *Mol Simul*. 1993;10(2–6):97–120. <https://doi.org/10.1080/08927029308022161>.
79. Soares TA, Goodsell DS, Briggs JM, Ferreira R, Olson AJ. Docking of 4-oxalocrotonate tautomerase substrates: implications for the catalytic mechanism. *Biopolymers*. 1999;50(3):319–328. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(199909\)50:3<319::AID-BIP7>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(199909)50:3<319::AID-BIP7>3.0.CO;2-8).
80. Soares TA, Goodsell DS, Ferreira R, Olson AJ, Briggs JM. Ionization state and molecular docking studies for the macrophage migration inhibitory factor: The role of lysine 32 in the catalytic mechanism. *J Mol Recognit*. 2000;13(3):146–156. [https://doi.org/10.1002/1099-1352\(200005/06\)13:3<146::AID-JMR497>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1099-1352(200005/06)13:3<146::AID-JMR497>3.0.CO;2-4).

ANEXO C -ARTIGO SUBMETIDO NA REVISTA CIENTÍFICA *METHODSX*

Methods article template for submitting to [MethodsX](#)

- Please fill in the template below and delete all instructional text in italics
- If you have any questions, please contact the journal at mexjm@elsevier.com

Method Article – Title Page

Title	<i>Fast and low-cost evaluation of hydroxykynurenine activity</i>
Authors	<i>Larissa G. Maciel*, Janaína V. dos Anjos* and Thereza Soares</i>
Affiliations	<i>Department of Fundamental Chemistry - Federal University of Pernambuco (UFPE)</i>
Corresponding Author's email address	<i>larissamaciel00@gmail.com janaína.anjos@ufpe.br</i>
Keywords	<i>Kynurenine pathway HKT activity Inhibition assay</i>
Direct Submission or Co-Submission	<i>Co-submissions are papers that have been submitted alongside an original research paper accepted for publication by another Elsevier journal</i> <i>Co-Submission</i> • <i>Co-Submission with Bioorganic and Medicinal Chemistry Journal:</i> ○ DOI: https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.115252

ABSTRACT

The enzyme 3-hydroxykynurenine transaminase (HKT) acts as an important enzyme in tryptophan catabolism of disease-carrier insects, e.g. *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae*. HKT is a detoxification enzyme that converts 3-hydroxykynurenine (a precursor for reactive nitrogen and oxygen species) into xanthurenic acid (stable and nontoxic compound). We have previously synthesized eleven new oxadiazole derivatives and demonstrated their noncompetitive inhibitory activity towards HKT from *A. aegypti* (<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.115252>). These findings are presented in a research paper accompanying the present technical report on a new assay to overcome the fact that the substrate and product of the HKT-catalyzed reaction exhibit maximum absorption at very near wavelength (370 and 369 nm, respectively). The methods previously described in the literature rely on chromatographic separation prior to absorbance quantification, which limits their use for inhibitor screening. Due to HKT attractive features as a molecular target for larvicidal compounds, we report herein a new, faster and affordable methodology to evaluate the enzymatic activity of recombinant HKT, and therefore allow for the fast screening of potential HKT inhibitors via absorbance spectrophotometer. The advantages of the proposed methodology to previously described ones are:

- It is faster and cheaper than HPLC-based assays because it does not require the use of chromatography columns and solvents to separate reaction components;
- It uses of 96-well plates, enabling the simultaneous quantification of samples;
- It can be applied to all transaminases that have xanthurenic acid as a product.

SPECIFICATIONS TABLE

Subject Area	<i>Chemistry</i>
More specific subject area	<i>Enzyme activity and inhibition assay.</i>
Method name	<i>Detection of xanthurenic acid – Fe³⁺ complex in enzymatic assay.</i>
Name and reference of original method	Evaluation of HKT activity from <i>Aedes aegypti</i> and <i>Anopheles gambiae</i> via HPLC-UV and LC-MS/MS methods [3] Q. Han, J. Li, Comparative characterization of <i>Aedes</i> 3-hydroxykynurenine transaminase/alanine glyoxylate transaminase and <i>Drosophila</i> serine pyruvate aminotransferase, FEBS Lett. 527 (2002) 199–204. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03229-5. [8] R. Canavesi, R. Miggiano, M. Stella, U. Galli, F. Rossi, M. Rizzi, E. Del Grosso, M. Stella, U. Galli, F. Rossi, M. Rizzi, E. Del Grosso, Study of

	<i>Anopheles gambiae</i> 3-hydroxykynurenine transaminase activity and inhibition by LC-MS/MS method, J. Pharm. Biomed. Anal. 173 (2019) 154–161. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.05.025.
Resource availability	<i>All reagents were purchased in Sigma-Aldrich, except: 1 M HEPES pH 7.5 – Gibco®, Iron (III) chloride hexahydrate – Dinâmica® and Recombinant HKT – Expressed in house.</i> <i>Set of adjustable-volume micropipettes and tips.</i> <i>Microcentrifuge and conical tubes for reagent dilutions.</i> <i>Nunc™ 96-Well Polystyrene Round Bottom Microwell Plates from Thermo Scientific™</i> <i>ELx808 BIOTEK® or any absorbance spectrophotometer with measurements at 570 nm</i> <i>GraphPad Prism 7.0 or any graphical software</i>

Introduction

The search for new chemical insecticides has gained importance in recent years due to the growing outbreaks of arboviruses (Yellow Fever, Dengue, Zika and Chikungunya Fever) and the regular frequency of the occurrence of malaria in tropical regions [1]. Most insects have exhibited some kind of resistance to known insecticides [2], stimulating the research for new biological targets and, consequently, new classes of insecticides to be developed. A particular biochemical route in these arboviruses vectors has been shown to be a potential molecular target, the so-called kynurenine pathway, which is the main route for metabolizing tryptophan in insects [3,4]. In this pathway, tryptophan is oxidized to quinolinic or kynurenic acid or xanthurenic acid (XA) depending on the organism. In mosquitoes, the chemically stable XA is biosynthesized from 3-hydroxykynurenine in a process catalyzed by 3-hydroxykynurenine transaminase (HKT), the sole enzyme responsible for 3-HK regulation in mosquitoes [5–8]. Therefore, the inhibition of the enzymatic conversion of 3-HK into xanthurenic acid provides in a powerful approach to control *A. aegypti* development via the accumulation of 3-HK, a toxic metabolite to living organisms, since it can be spontaneously oxidized into reactive oxygen species, leading to oxidative stress in mosquito's neuronal cells [4].

We have previously identified the enzyme HKT as a potential molecular target for inhibition by oxadiazole derivatives [6]. This finding has encouraged us to develop a reliable method capable to measure HKT inhibition without separation of 3-HK and XA, which have maximum absorption at very near wavelength ($\lambda_{\max}$ = 370 and 369 nm, respectively). This new approach offers a rapid, low-cost and more straightforward means to screen for HKT antagonists. In what follows, we describe the standardization of an absorbance-based biochemical protocol to evaluate HKT activity by means of XA-Fe³⁺ complex ($\lambda_{\max}$ = 570 nm). The assays were performed on a 96-well round bottom microplate, allowing simultaneous reading of multiple samples in a characterization of HKT activity. The formed xanthurenic acid is detected as a complex with Fe³⁺, first described by Lepkovski and coworkers to detect XA in pyridoxine-deficient mice [9]. This colorimetric test abolishes the use of organic solvents as mobile phase, equipment and chromatography columns, thus making the assay less expensive than LC-based methods established in earlier literature [3,8]. The analysis of HKT activity is faster in colorimetric assays because there is no requirement to separate reaction components prior to detection of xanthurenic acid, removing the runtime of total time of analysis. The colorimetric test described herein is also almost universal, once different types of inhibitors can be tested with exception to highly-conjugated organic compounds that absorbs in visible region of ultraviolet spectra [10].

Method details

All solutions were freshly prepared except for 25 mM 3-D,L-hydroxykynurenine solution, which was prepared previously and then stocked at -20 °C.

Stock solutions:

- 0.1 M HCl
- 0.1 M NaOH
- HEPES Buffer:
10 mL of 1 M HEPES-NaOH pH 7.5
1.25 mL of 4 M NaCl
Ultrapure H₂O up to 50 mL

Stock reagents:

- 100 mM Iron (III) chloride hexahydrate : 135.2 mg in 0.1 M HCl up to 5 mL
- 20 mM Pyridoxal-5'-phosphate hydrate: 34.3 mg in 0.1 M NaOH up to 7 mL

Working reagents:

- 25 mM 3-D,L-hydroxykynurenine (3-HK) solution: 11.22 mg in HEPES Buffer up to 2 mL
- 20 mM Xanthurenic acid (XA) solution: 16.4 mg in 0.1 M NaOH up to 4 mL
- 0.5 mM Pyridoxal-5'-phosphate hydrate (PLP) solution: 0.25 mL of 20 mM stock reagent in HEPES Buffer up to 10 mL
- 50 mM Sodium Pyruvate solution: 55 mg in HEPES Buffer up to 10 mL
- 10 mM Iron (III) chloride hexahydrate (Fe³⁺) solution: 1 mL of 100 mM stock reagent in 0.1 M HCl up to 10 mL
- 0.1 µg/µL recombinant 3-hydroxykynurenine transaminase (HKT) from *Aedes aegypti*.

HKT activity measurement

The experiments were performed in a round-bottom 96-well transparent plate and the samples have a final volume of 100 µL. Each reaction contains 2 µg of HKT, 2 mM 3-HK solution, 2 mM Sodium pyruvate solution, 40 µM PLP solution and HEPES Buffer to complete the reaction volume. Mixes were designed to ensure that the reaction only starts when the enzyme is added into the reaction. For this reason, Mix 1 contains the enzyme and its cofactor PLP and Mix 2, the others reaction components. Mix 3 contains only PLP and HEPES Buffer and it is used to compose the blank. Therefore, the blank is made by the combination of Mix 3 (28 µL) and Mix 2 (72 µL) and the sample is made by the combination of Mix 1 (28 µL) and Mix 2 (72 µL), and each experiment has a total volume of 100 µL. Each sample or blank should be analyzed, at least, in duplicate.

Mix 1:

Reagent	Initial concentration	Volume (μL)	Final concentration
HKT	0.1 μg/μL	20	2 μg
PLP	500 μM	8	40 μM
Total:		28 μL	

Mix 2:

Reagent	Initial concentration	Volume (μL)	Final concentration
3-HK	25 mM	8	2 mM
Pyruvate	50 mM	4	2 mM
Buffer	-	60	-
Total:		72 μL	

Mix 3:

Reagent	Initial concentration	Volume (μL)	Final concentration
Buffer	-	20	-
PLP	500 μM	8	40 μM
Total:		28 μL	

In order to determine the total reaction time, it is necessary to characterize the progress curve. This curve will give information about the reaction kinetics. In our experiments, it can be visualized three regions: a linear part that shows a first-order dependence between concentration and time (0-5 minutes); a transition region (5-15 minutes); and a plateau region (15-25 minutes), that is reached when chemical equilibrium takes place. Therefore, the assay must be performed in a time interval to allow the differentiation of these three distinct regions, once the region of interest *de facto* is only the first one (Figure 2A).

To decrease error between replicates is recommended calculating the total number of samples required to the experiment and then preparing each mix to contain “n+1” samples to ensure that there will be enough reagents for all experiments to be performed.

Ex: Compare activity between 3 batches of purified HKT in duplicate. To calculate the rate, it is necessary to perform reads in two periods of time (in this case, 0 and 5 minutes).

Mix 1: 3 batches x 2 replicates x 2 periods of time = 12 samples

Mix 2: 3 batches x 2 replicates x (2 periods of time + 1 blank) = 18 samples

Mix 3: 3 batches x 2 replicates x 1 blank = 6 samples

Therefore, the total volume of Mix 1 must be multiplied by 13, the total volume of Mix 2 by 19 and the total volume of Mix 3 by 7.

Table 1. Visual example of a plate in comparative rate experiment between 3 batches of purified HKT performed in duplicate.

	Blank 1	Blank 2	0 min - 1	0 min - 2	5 min - 1	5 min - 2
Batch 1	Mix 3 + 2	Mix 3 + 2	Mix 1 + 2	Mix 1 + 2	Mix 1 + 2	Mix 1 + 2
Batch 2	Mix 3 + 2	Mix 3 + 2	Mix 1 + 2	Mix 1 + 2	Mix 1 + 2	Mix 1 + 2
Batch 3	Mix 3 + 2	Mix 3 + 2	Mix 1 + 2	Mix 1 + 2	Mix 1 + 2	Mix 1 + 2

After preparing all the mixes, the following steps have to be executed:

1. Set the heater at 50 °C
2. Add 72 μL of Mix 2 in each well
3. Add 28 μL of Mix 3 in BLANK and 28 μL of Mix 1 in SAMPLES
4. Add 100 μL of 10 mM Fe³⁺ in BLANK and SAMPLES of TIME 0 min
5. Read the plate at 570 nm
6. Incubate the plate at 50 °C for 5 minutes
7. Add 100 μL of 10 mM Fe³⁺ in SAMPLES of TIME 5 min
8. Read the plate at 570 nm.

Calibration curve

A calibration curve must be executed to quantify the amount of xanthurenic acid generated by HKT. The samples contain both mix A (with fixed Pyruvate and PLP concentrations) and mix B (with variable XA concentration) in a final volume of 100 μL . Each XA concentration must be read in triplicate. A linear regression of the data generates the calibration curve (Figure 1).

Mix A (for all wells):

Reagent	Initial concentration	Volume (μL)	Final concentration
Pyruvate	50 mM	4	2mM
PLP	500 μM	8	40 μM
Total:		12 μL	

Mix B (for each XA concentration):

Final concentration XA (mM)	Volume XA (μL)	Volume Buffer (μL)
0.0	-	88
0.2	1	87
0.4	2	86
0.6	3	85
0.8	4	84
1.0	5	83
1.2	6	82
1.4	7	81
1.6	8	80
1.8	9	79
2.0	10	78
4.0	20	68
6.0	30	58
8.0	40	48
Total in each well:		88 μL

After preparing all the mixes, the following steps have to be executed:

1. Add 12 μL of Mix A in each well
2. Add 88 μL of Mix B in the respective wells
3. Add 100 μL of 10 mM Fe^{3+} in all samples
4. Read the plate at 570 nm.

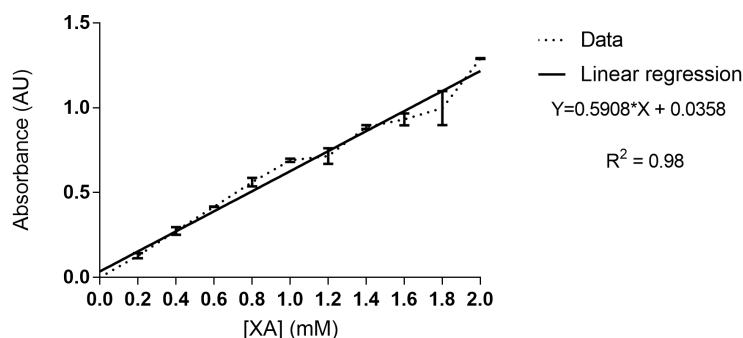


Figure 1. Calibration curve used for quantification of biochemical and inhibition data. Each sample contains 2 mM sodium pyruvate, 40 μM PLP, 10 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in 0.1 M HCl and variable concentration of XA (0 - 2 mM) in a final volume of 200 μL .

Enzyme kinetics

The estimation of the kinetics constants can be performed by adjusting the amount (or volume) of 3-HK, Pyruvate and Buffer solutions in Mix 2. In these experiments, we tested four different 3-HK concentrations (0.5, 2.0, 4.0 and 8.5 mM) to determine the kinetics constants [5] (Figure 2E). The preparation of the mixes and general procedures are similar to described in "HKT activity measurements" section.

pH evaluation

The pH screening can be executed by replacing the Buffer described in “Stock solutions” subsection by any buffer of your choice. In our experiments, the assay was tested in pH ranging from 6 to 9 in different buffers (Tris-HCl, HEPES and Borate Buffers), but the enzyme has its best activity between pH 7 and 9. As HKT theoretical isoelectric point is around 6, possibly this is the reason there is no relevant activity at this point (Figure 2B). The preparation of the mixes and general procedures are the same as described in “HKT activity measurements” section.

Temperature evaluation

The temperature screening can also be evaluated by changing the incubation temperature. This methodology was already tested in temperatures from 30 to 70 °C, yielding comparable results with the literature (Figure 2C). The preparation of the mixes and general procedures are the same as described in “HKT activity measurements” section.

Inhibition assays

In order to test compounds as HKT inhibitors, the preparation of the mixes and general procedures are slightly different from the section “HKT activity measurements”. The methodology requires a pre-incubation of Mix 1 and Mix 3 with the testing compound at 50 °C for 30 minutes. Then, Mix 2 is added and the experiment may continue. Mixes 1 and 3 have to be prepared for each concentration of the tested compound. Each sample or blank must be read at least in duplicate. Blank and negative control (assay without any testing compound) must be executed in the same lineup as the samples. To estimate IC₅₀ of each compound is recommended testing at least 5 concentrations (Figure 2D). The suggestion of setting the mixes to “n+1” samples is also valid in this section.

Mix 1:

Reagent	Initial concentration	Volume (μL)	Final concentration
HKT	0.1 μg/μL	20	2μg
PLP	500 μM	8	40 μM
Compound	*	30	*
Total:		58 μL	

Mix 2:

Reagent	Initial concentration	Volume (μL)	Final concentration
3-HK	25 mM	8	2 mM
Pyruvate	50 mM	4	2mM
Buffer	-	30	-
Total:		42 μL	

Mix 3:

Reagent	Initial concentration	Volume (μL)	Final concentration
Buffer	-	20	-
PLP	500 μM	8	40 μM
Compound	*	30	*
Total:		58 μL	

*The initial concentration of the testing compound must be **3.33 times** higher than the desired final concentration (adjusted into 30 μL of 100 μL). This is the ratio between the initial and final concentration to reach the standardized volumes (30 μL of testing compound in a total of 100 μL of reaction).

After preparing mixes 1 and 3, the following steps have to be executed:

1. Set the water bath at 50 °C
2. Incubate mixes 1 and 3 at 50 °C for 30 minutes
3. In meanwhile, prepare Mix 2
4. Set the heater at 50 °C
5. Add 42 μL of Mix 2 in each well
6. Add 58 μL of Mix 3 in BLANK and 58 μL of Mix 1 in SAMPLES
7. Add 100 μL of 10 mM Fe³⁺ in BLANK and SAMPLES of TIME 0 min
8. Read the plate at 570 nm
9. Incubate the plate at 50 °C for 5 minutes
10. Add 100 μL of 10 mM Fe³⁺ in SAMPLES of TIME 5 min
11. Read the plate at 570 nm.

Method validation

The characterization of recombinant HKT from *Aedes aegypti* expressed in *Escherichia coli* was achieved using this methodology. The results are comparable to those related in the literature for the same enzyme expressed in insect cells. Several experiments performed with HKT in this assay conditions are displayed as examples (Figure 2).

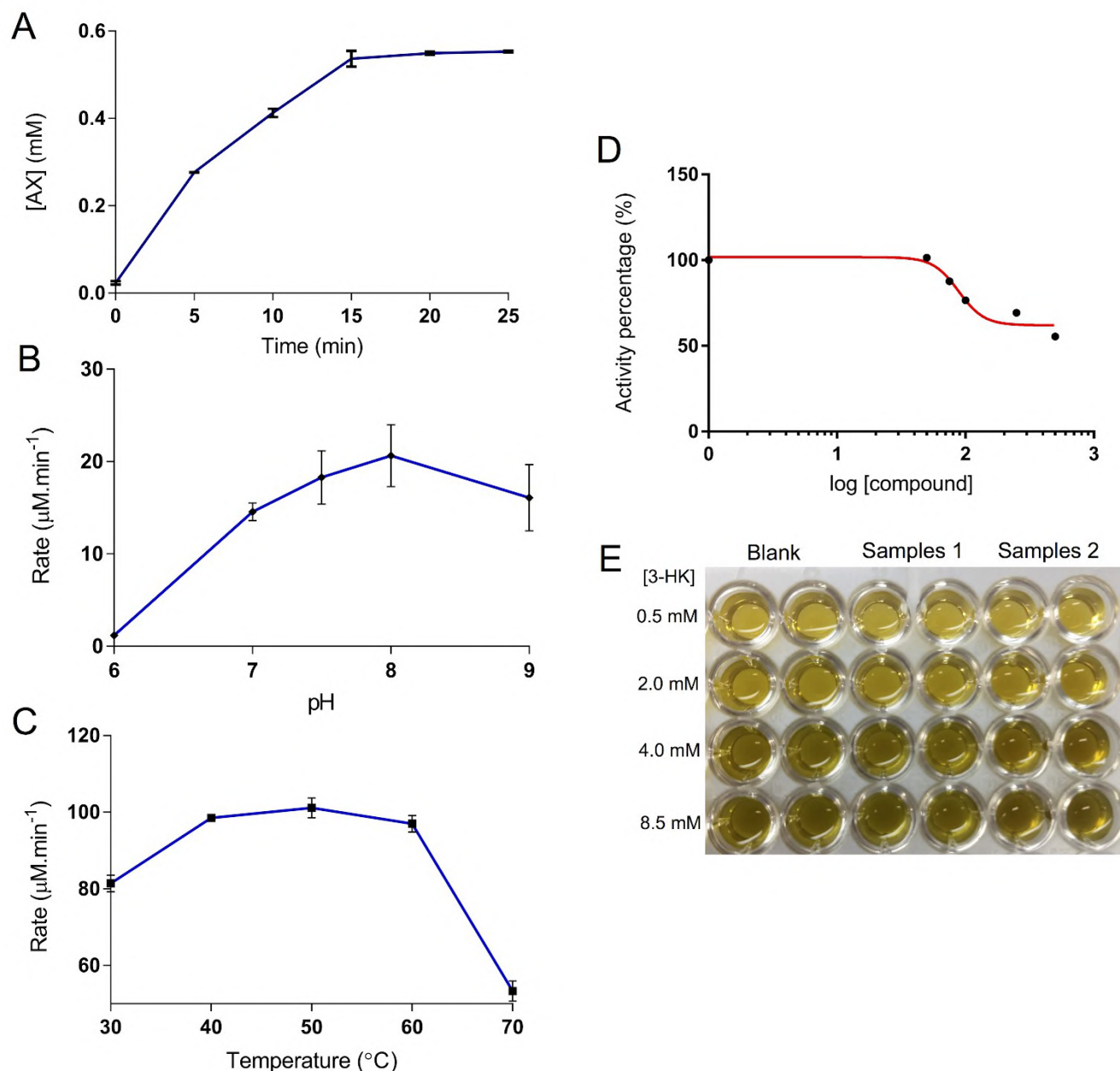


Figure 2. The progress curve (A), pH evaluation in buffers Tris pH 6,7 and 8, HEPES pH 7.5 and Borate pH 9 (B), temperature evaluation (C), the non-linear regression curve of inhibition data from the compound sodium 4-[3-(p-tolyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]butanoate to estimate its IC₅₀(D) and a picture of the plate after a experiment (E).

Conclusion

We have described a new, fast and affordable methodology to evaluate recombinant HKT activity which allows for the screening potential HKT inhibitors via absorbance spectrophotometer. This method is based on the complexation reaction between xanthurenic acid (product of conversion of 3-kydroxykynurenine by HKT) with ferric ion in a 96-well round bottom microplate, allowing simultaneous reading of multiple samples. Attention must be paid to the solutions stock conditions particularly to the 3-HK solution, since this is an unstable molecule and its oxidation products could interfere in the formation of XA-Fe³⁺ complex or HKT catalysis [11]. To overcome this issue, these solutions must be freshly prepared and stocked at low temperatures even during the experiments. Another drawback could be the pH evaluation above 9, as mentioned in our previous work [5]. The conditions described here prevent the formation of insoluble Fe³⁺ species which lead to anomalous absorbances and/or false positives. However, these extreme values of pHs are not the common optimal pH for HKT enzymes [5,7]. To the best of our knowledge, this

is the faster and cheaper method of screening for new HKT inhibitors ever reported, with an actual cost per sample 7 times smaller than the previous HPLC-based methodology.

Acknowledgements: We are thankful to Mr. Andrew Oliveira and Dr. Rafael Guido for helping in cloning, expression and purification of recombinant HKT and also Dr. Tatiany Romão and Dr. Maria Helena Neves for the use of spectrophotometer and for providing the DNA to achieve the cloning step. Financial support for this research project was provided by the Brazilian funding agencies FACEPE (APQ-0732-1.06/14), BioMol/CAPES (BioComp 23038.004630/2014-35), INCT-Fx/CNPq (465259/2014-6) and FAPESP (2013/07600-3).

Declaration of interests:

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References:

- [1] A. Higuera, J.D. Ramírez, Molecular epidemiology of dengue, yellow fever, Zika and chikungunya arboviruses: An update, *Acta Trop.* 190 (2019) 99–111. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.11.010>.
- [2] N. Liu, Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions., *Annu. Rev. Entomol.* 60 (2015) 537–59. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020828>.
- [3] Q. Han, J. Li, Comparative characterization of *Aedes* 3-hydroxykynurenine transaminase/alanine glyoxylate transaminase and *Drosophila* serine pyruvate aminotransferase, *FEBS Lett.* 527 (2002) 199–204. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03229-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03229-5).
- [4] Q. Han, B.T. Beerntsen, J. Li, The tryptophan oxidation pathway in mosquitoes with emphasis on xanthurenic acid biosynthesis, *J. Insect Physiol.* 53 (2007) 254–263. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2006.09.004>.
- [5] L.G. Maciel, A.A. Oliveira, T.P. Romão, L.L.L. Leal, R.V.C. Guido, M.H.N.L. Silva-filha, V. Janaina, T.A. Soares, Discovery of 1,2,4-oxadiazole derivatives as a novel class of noncompetitive inhibitors of 3-hydroxykynurenine transaminase (HKT) from *Aedes aegypti*, *Bioorg. Med. Chem.* 28 (2020) 115252. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.115252>.
- [6] V.S. Oliveira, C. Pimenteira, D.C.B. da Silva-Alves, L.L.L. Leal, R.A.W. Neves-Filho, D.M.A.F. Navarro, G.K.N. Santos, K.A. Dutra, J. V. dos Anjos, T.A. Soares, The enzyme 3-hydroxykynurenine transaminase as potential target for 1,2,4-oxadiazoles with larvicide activity against the dengue vector *Aedes aegypti*, *Bioorg. Med. Chem.* 21 (2013) 6996–7003. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.09.020>.
- [7] F. Rossi, F. Lombardo, A. Paglino, C. Cassani, G. Miglio, B. Arca, M. Rizzi, Identification and biochemical characterization of the *Anopheles gambiae* 3-hydroxykynurenine transaminase, *FEBS J.* 272 (2005) 5653–5662. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04961.x>.
- [8] R. Canavesi, R. Miggiano, M. Stella, U. Galli, F. Rossi, M. Rizzi, E. Del Grosso, M. Stella, U. Galli, F. Rossi, M. Rizzi, E. Del Grosso, Study of *Anopheles gambiae* 3-hydroxykynurenine transaminase activity and inhibition by LC-MS/MS method, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 173 (2019) 154–161. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.05.025>.
- [9] S. Lepkovsky, E. Nielsen, A green pigment-producing compound in urine of pyridoxine-deficient rats, *J. Biol. Chem.* 144 (1942) 135–138.
- [10] D.L. Pavia, G.M. Lampman, G.S. Kriz, Ultraviolet Spectroscopy, in: *Introd. to Spectroscopy - A Guid. Students Org. Chem.*, Second Edi, Saunders College Publishing, 1996: pp. 267–302.
- [11] S. Vazquez, B. Garner, M.M. Sheil, R.J.W. Truscott, Characterisation of the major autoxidation products of 3-hydroxykynurenine under physiological conditions, *Free Radic. Res.* 32 (2000) 11–23. <https://doi.org/10.1080/10715760000300021>.