



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



***“Formação de complexos entre compostos híbridos
pirrolbenzodiazepinas-cumarinas com DNA
por estudos de docking molecular”***

SERGIO RICARDO PIZANO RODRIGUES

**São Carlos
2011**

SERGIO RICARDO PIZANO RODRIGUES

***“Formação de complexos entre compostos híbridos
pirrolbenzodiazepinas-cumarinas com DNA
por estudos de docking molecular”***

Monografia apresentada ao
Programa de Mestrado em
Biotecnologia do Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal de São Carlos.

Bolsa CAPES

Orientadores: **Prof^a Dr^a Ignez Caracelli**
Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector

São Carlos
2011

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

R696fc

Rodrigues, Sergio Ricardo Pizano.

Formação de complexos entre compostos híbridos
pirrolbenzodiazepinas-cumarinas com DNA por estudos de
docking molecular / Sergio Ricardo Pizano Rodrigues. -- São
Carlos : UFSCar, 2011.
180 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2011.

1. Biotecnologia. 2. Ácido desoxirribonucléico. 3.
Simulação computacional. 4. Bioinformática. I. Título.

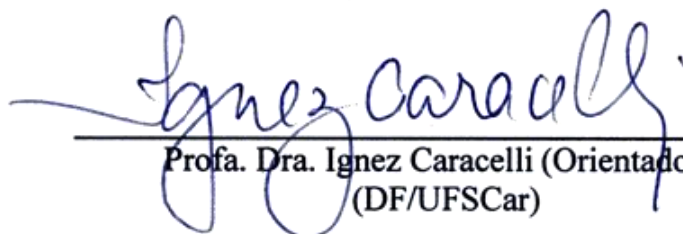
CDD: 660.6 (20^a)

Sergio Ricardo Pizano Rodrigues

Dissertação de Mestrado submetida
à Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia,
da Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Aprovado em: 24/03/2011

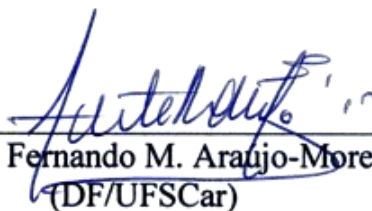
BANCA EXAMINADORA



Profª. Dra. Ignez Caracelli (Orientadora)
(DF/UFSCar)



Profª. Dra. Hideko Yamanaka
(IQ/UNESP)



Prof. Dr. Fernando M. Araujo-Moreira
(DF/UFSCar)

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Terezinha Aparecida Pizano Rodrigues e Sérgio Aparecido Rodrigues.*

Agradecimentos

Aos meus pais, Terezinha e Sérgio, e a minha irmã Michele, por toda dedicação, carinho e apoio.

Aos meus orientadores, Profa. Dra. Ignez Caracelli e Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector, pela dedicação ao meu crescimento como pesquisador, pelos ensinamentos, pelos conselhos e conversas construtivas, pelo precioso convívio, por toda a ajuda durante o percurso e, sobretudo, por apostarem em mim.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos que contribuíram para minha formação.

Aos amigos do Grupo de Física Teórica de Materiais e Biomoléculas (BioMat) e do Laboratório de Cristalografia Estereodinâmica e Modelagem Molecular (LaCrEMM) da UFSCar pelos momentos agradáveis de trabalho, de descontração e pelo companheirismo.

À amiga Deborah Julia Caracelli Zukerman pela divertida convivência que proporciona, pelas risadas e por se dispor a ouvir sempre que precisei.

À amiga Maria da Costa Pacheco Bortolomai e a sua família pelo acolhimento e suporte demonstrados durante uma etapa do trabalho.

Aos meus tios, Rita de Cássia Pisano Santiago e Geraldo Santiago Júnior, e a sua família pelo apoio que me deram durante esta etapa e pela credibilidade depositada em mim.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela Bolsa concedida.

Meus agradecimentos...

Rodrigues, Sergio Ricardo Pizano. **Formação de complexos entre compostos híbridos pirrolbenzodiazepinas-cumarinas com DNA por estudos de docking molecular**. 2011. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2011.

RESUMO

Compostos da família das pirrolbenzodiazepinas (PBD) são conhecidos por apresentarem atividade antitumoral promissora. Dentre elas, as chamadas híbridas que possuem uma porção PDB uma cadeia espaçadora e outro grupo funcional, como as cumarinas deste trabalho, têm sido muito exploradas. Sabe-se que estes compostos se ligam ao DNA, mas não há dados estruturais mostrando como a ligação ocorre. Para suprir esta falta de informação foram realizados cálculos de docking molecular para estudar a formação de complexos entre estas PBDs híbridas e o DNA. Os compostos estudados foram modelados e as coordenadas de complexos DNA-receptores com diferentes ligantes foram obtidas do Protein Data Bank. O redocking serviu para validar as condições dos experimentos e os escores foram utilizados como parâmetro de avaliação dos complexos formados. A análise das interações intermoleculares, conhecimento essencial para o entendimento das estruturas obtidas, foi feita utilizando visualização molecular de alta resolução. Os resultados dos experimentos *in silico* mostraram a formação de complexos no modo de ligação misto, com os ligantes intercalando a porção PBD entre bases do DNA e a porção cumarina ocupando o sulco menor, mostrando ter preferência pela intercalação entre bases GG. Mais ainda, é possível postular que o complexo se torne um aduto com a formação de uma ligação covalente entre a porção PBD intercalada e uma base nucleotídica G. Finalmente foi estabelecida uma correlação entre os resultados do docking e as atividades biológicas dos compostos estudados.

Palavras-chave: DNA, docking, pirrolbenzodiazepinas híbridas, cumarina.

Rodrigues, Sergio Ricardo Pizano. **Complex formation between pirrolbenzodiazepines-coumarins hybrids with DNA by molecular docking studies**. 2011. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2011.

ABSTRACT

Compounds of the pirrolbenzodiazepine (PBD) family are known for their promising antitumor activity. Among these, the hybrids, those that have a portion PDB a chain spacer and another functional group, such as the coumarins of this work, have been extensively explored. It is also known that these compounds bind to DNA, but there is no structural data showing how it occurs. To overcome this lack of information molecular docking calculations were performed to study the formation of complexes between these PBD-hybrids and DNA. The compounds were modeled and the coordinates of complexes DNA-receptors with different ligands were obtained from the Protein Data Bank. The redocking served to validate the conditions of the experiments and the scores were used as the parameter to evaluate the complexes formed. The analysis of the intermolecular interactions, an essential knowledge for understanding the obtained structures were analyzed using high-resolution molecular imaging. The results of the *in silico* experiments showed the formation of complexes in the mixed-mode with the PBD ligand moiety intercalating between the DNA bases and the coumarin portion occupying the minor groove, and a preference for intercalation between GG bases. Moreover, it is possible to postulate that the complex becomes an adduct with the formation of a covalent bond between the intercalated portion PBD and a nucleotide base G. Finally, a correlation between the docking results and the biological activities of the studied compounds was established.

Keywords: DNA, docking, hybrid pyrrolbenzodiazepines, coumarin.

LISTA DE FIGURAS

| | página |
|---|--------|
| Capítulo 1 – Introdução | |
| Figura 1. 1 Fotografia 51 – a imagem do padrão de difração de raio X para o DNA obtida pela primeira vez por Rosalind Franklin (extraído de Franklin e Gosling, 1953). | 25 |
| Figura 1. 2 Esquema da composição das unidades fundamentais do DNA, os nucleotídeos. Apresentam três grupos distintos: fosfato, pentose (desoxirribose para o DNA) e as bases nitrogenadas (A, G, T ou C). A posição X nas bases representa o ponto de ligação com a desoxirribose. | 26 |
| Figura 1. 3 Esquema de uma cadeia trinucleotídica, destacando com a seta as extremidades 5' e 3'. | 27 |
| Figura 1. 4 Pareamento específico entre os nucleotídeos A-T e G-C, mantido por ligações de hidrogênio (linhas tracejadas). | 28 |
| Figura 1. 5 Interações no DNA: ligações de hidrogênio (linhas tracejadas) e interação π entre os anéis das bases nitrogenadas adenina (A) e Timina (T). | 28 |
| Figura 1. 6 Estrutura da dupla hélice do DNA, conformação B (em condições fisiológicas de hidratação). A linha tracejada representa o eixo longitudinal da dupla hélice. | 29 |
| Figura 1. 7 Porção pirrolbenzodiazepina (PBD) comum a todos os compostos desta família. X e R correspondem às posições onde ocorrem substituições para derivar novos compostos dessa família. A numeração padrão dos átomos desta plataforma de anéis está apresentada. A região N10-C11 está contornada por seu papel central na reatividade com o DNA. | 34 |
| Figura 1. 8 Composto SJG-136. Observa-se a estrutura do dímero com duas porções PBDs ligadas por um espaçador. | 36 |
| Capítulo 2 – Materiais e Métodos | |
| Figura 2. 1 Etapas do estudo de docking adotado no presente trabalho. | 45 |
| Figura 2. 2 Fluxograma da operação de um algoritmo genético (adaptação de Miranda, 2000; Corrêa, 2010). | 46 |
| Figura 2. 3 PBDs ligados a uma porção cumarina através de uma cadeia alifática de comprimento variável na posição C8 (adaptada de Wells et al., 2008). | 49 |
| Figura 2. 4 Esquema apresentando o fundamento do redocking. O processo inicia-se com um complexo cristalográfico. Com as estruturas tridimensionais das moléculas isoladas, reconstrói-se o complexo computacionalmente e procede-se à comparação com o complexo cristalográfico. | 51 |
| Capítulo 3 – Resultados e Discussão | |
| Figura 3. 1 Fluxograma de trabalho apresentando os experimentos realizados ao longo do estudo | 56 |
| Figura 3. 2 Complexos modelados com as estruturas 1vzk e 1g3x | 59 |
| Figura 3. 3 Complexos com os ligantes 1,2 e 3 na estrutura 2da8. | 61 |
| Figura 3. 4 Pose obtida para o ligante 1 na 2ky7: (A) aduto e (B) complexo. | 63 |
| Figura 3. 5 Pose obtida para o ligante 2 na 2ky7: (A) aduto e (B) complexo. | 64 |

| | | |
|---------------------|--|----|
| Figura 3. 6 | Pose obtida para o ligante 3 na 2ky7: (A) aduto e (B) complexo. | 65 |
| Figura 3. 7 | Valores de ΔE para a porção PBD separada. A linha vermelha no ponto zero representa o escore do redocking. | 67 |
| Figura 3. 8 | Interações da porção PBD com os nucleotídeos C1, C2, G5 e G6 no modo de ligação intercalado (1k9g). Distâncias em Å. | 67 |
| Figura 3. 9 | Gráfico de barras dos valores de ΔE para a porção cumarina isolada. | 68 |
| Figura 3. 10 | Interações, com distâncias em Å, da porção cumarina com os nucleotídeos C1, C2, G5 e G6 no modo de ligação intercalado (1k9g). | 69 |
| Figura 3. 11 | Valores de ΔE para as porções PBD e cumarina com o espaçador 1. | 70 |
| Figura 3. 12 | Valores de ΔE para as porções PBD e cumarina com o espaçador 2. | 71 |
| Figura 3. 13 | Valores de ΔE para as porções PBD e cumarina com o espaçador 3. | 72 |
| Figura 3. 14 | Valores de ΔE para o ligante 1 nos DNAs estudados. | 74 |
| Figura 3. 15 | Pose dos ligantes relativa ao 1k9g, mostrando o modo de ligação misto verificado como preferencial para o ligante 1 no DNA. O DNA está representado com superfície. | 74 |
| Figura 3. 16 | Valores de ΔE para o ligante 2 nos DNAs estudados. | 75 |
| Figura 3. 17 | Pose dos ligantes relativa ao 1k9g, mostrando o modo de ligação misto verificado como preferencial para o ligante 2 no DNA. O DNA está representado com superfície. | 76 |
| Figura 3. 18 | Valores de ΔE para o ligante 3 nos DNAs estudados. | 76 |
| Figura 3. 19 | Pose dos ligantes relativa ao 1k9g, mostrando o modo de ligação misto verificado como preferencial para o ligante 3 no DNA. O DNA está representado com superfície. | 77 |
| Figura 3. 20 | Porcentagem de contribuição para os escores de cada porção dos ligantes híbridos | 78 |
| Figura 3. 21 | Ligante mutante A modelado para o experimento controle 4.0: porção PBD-espaçador da estrutura do ligante 2ky7 unida à porção cumarina do ligante 1 do conjunto estudado. | 80 |
| Figura 3. 22 | Ligante mutante B modelado para o experimento controle 4.0: porção PBD-espaçador do ligante 1 unida à porção naftalimida do ligante 2ky7. | 81 |
| Figura 3. 23 | Complexo com o ligante mutante A, no qual a porção PBD está intercalada entre bases AA do DNA, de modo semelhante ao obtido no experimento 2 para os ligantes 1, 2 e 3 que também possuem a porção cumarina. (B) Complexo com o ligante mutante B, no qual a porção naftalimida intercala entre as bases AA do DNA, de modo semelhante ao ligante da estrutura 2ky7. | 83 |
| Figura 3. 24 | Esquema da estrutura 3D da daunomicina extraída do Protein Data Bank sob código 427d. | 83 |
| Figura 3. 25 | Valores de ΔE para a daunomicina no modo intercalado. Os nucleotídeos entre os quais o ligante intercala está indicado no topo de cada barra. | 85 |
| Figura 3. 26 | Pose dos ligantes relativa ao 1k9g, mostrando o modo de ligação misto verificado como preferencial para as PBDs híbridas 1, 2 e 3 no DNA. O DNA está representado com superfície. | 86 |

| | |
|---|-----|
| Figura 3. 27 Comparação das poses da PBD-naftalimida obtidas por cálculos de docking para a formação de complexo e de aduto, mostrando a guanina onde ocorre a alquilação e consequente formação da ligação covalente guanina-PBD. | 87 |
| Capítulo 4 – Conclusões | |
| Figura 4. 1 Modo de ligação misto sugerido para os ligantes estudados. | 93 |
| Figura 4. 2 Modo de ligação adotado por PBDs híbridas com as porções naftalimida e cumarina. | 94 |
| Figura 4. 3 Distância (Å) dos anéis PBD e dos anéis das guaninas na região de intercalação com o DNA 1k9g. | 96 |
| Anexo 3.1 Redocking com cada estrutura de DNA utilizada no estudo | |
| Figura 3. 1a.1 Sobreposição dos ligantes cristalográficos de 1vzk e 1g3x com as respectivas soluções calculadas no redocking. | 104 |
| Figura 3. 1a.2 Sobreposição da pose obtida com redocking e da pose do ligante original da 2da8 | 105 |
| Figura 3. 1a.3 Sobreposições dos resultados do redocking em 2ky7. (A) Ligante original e pose do aduto; (B) ligante original e pose do complexo; e (C) poses do aduto e do complexo | 106 |
| Figura 3. 1a.4 Sobreposição dos ligantes originais dos complexos 1d67, 1k9g e 2rou com as respectivas soluções selecionadas do redocking. | 107 |
| Anexo 3.2 Experimento 1: ligação no sulco ou no modo intercalado | |
| Figura 3. 2a.1 Ligante 1 no sulco menor do DNA 1vzk. | 108 |
| Figura 3. 2a.2 Ligante 1 no DNA-receptor 1g3x. | 109 |
| Figura 3. 2a.3 Ligante 2 no sulco menor do DNA 1vzk. | 110 |
| Figura 3. 2a.4 Ligante 2 no DNA-receptor 1g3x. | 111 |
| Figura 3. 2a.5 Ligante 3 no sulco menor do DNA 1vzk. | 112 |
| Figura 3. 2a.6 Ligante 3 no DNA-receptor 1g3x. | 113 |
| Anexo 3.3 Experimento 2 – Bis-intercalação com estrutura 2da8 | |
| Figura 3. 3a.1 Ligante 1 no DNA-receptor 2da8 | 114 |
| Figura 3. 3a.2 Ligante 2 no DNA-receptor 2da8 | 115 |
| Figura 3. 3a.3 Ligante 3 no DNA-receptor 2da8 | 116 |
| Anexo 3.4 Experimento 3: Modo misto – aduto e complexo | |
| Figura 3. 4a.1 Interações do ligante 1 no teste com aduto (2ky7) | 117 |
| Figura 3. 4a.2 Interações do ligante 1 no complexo com 2ky7 | 118 |
| Figura 3. 4a.3 Interações do ligante 2 no teste com aduto (2ky7) | 119 |
| Figura 3. 4a.4 Interações do ligante 2 no complexo 2ky7 | 120 |
| Figura 3. 4a.5 Interações do ligante 3 no teste com aduto (2ky7) | 121 |
| Figura 3. 4a.6 Interações do ligante 3 no complexo com 2ky7 | 122 |
| Anexo 3.5 Experimento 4.1: complexos com PBD e cumarina separadamente | |
| Porção pirrolbenzodiazepina (PBD) | |
| Figura 3. 5a.1 Interações da porção PBD no receptor 1g3x | 123 |
| Figura 3. 5a.2 Interações da porção PBD no receptor 1d67 | 124 |
| Figura 3. 5a.3 Interações da porção PBD no receptor 1k9g | 125 |
| Figura 3. 5a.4 Interações da porção PBD no receptor 2rou | 126 |
| Figura 3. 5a.5 Interações da porção PBD no receptor 2da8 | 127 |

| | |
|---|-----|
| Porção cumarina | |
| Figura 3. 5a.6 Interações da porção cumarina no receptor 1g3x | 128 |
| Figura 3. 5a.7 Interações da porção cumarina no receptor 1d67 | 129 |
| Figura 3. 5a.8 Interações da porção cumarina no receptor 1k9g | 130 |
| Figura 3. 5a.9 Interações da porção cumarina no receptor 2rou | 131 |
| Figura 3. 5a.10 Interações da porção cumarina no receptor 2da8 | 132 |

Anexo 3.6 Experimento 4.2: Porções PBD e cumarina mais os espaçadores

Porção PBD-espaçador 1

| | |
|---|-----|
| Figura 3. 6a.1 Interações de PBD-espaçador 1 em 1g3x | 133 |
| Figura 3. 6a.2 Interações de PBD-espaçador 1 em 1d67 | 134 |
| Figura 3. 6a.3 Interações de PBD-espaçador 1 em 1k9g | 135 |
| Figura 3. 6a.4 Interações de PBD-espaçador 1 em 2rou | 136 |
| Figura 3. 6a.5 Interações de PBD-espaçador 1 em 2da8 | 137 |

Porção PBD-espaçador 2

| | |
|--|-----|
| Figura 3. 6a.6 Interações de PBD-espaçador 2 em 1g3x | 138 |
| Figura 3. 6a.7 Interações de PBD-espaçador 2 em 1d67 | 139 |
| Figura 3. 6a.8 Interações de PBD-espaçador 2 em 1k9g | 140 |
| Figura 3. 6a.9 Interações de PBD-espaçador 2 em 2rou | 141 |
| Figura 3. 6a.10 Interações de PBD-espaçador 2 em 2da8 | 142 |

Porção PBD-espaçador 3

| | |
|--|-----|
| Figura 3. 6a.11 Interações de PBD-espaçador 3 em 1g3x | 143 |
| Figura 3. 6a.12 Interações de PBD-espaçador 3 em 1d67 | 144 |
| Figura 3. 6a.13 Interações de PBD-espaçador 3 em 1k9g | 145 |
| Figura 3. 6a.14 Interações de PBD-espaçador 3 em 2rou | 146 |
| Figura 3. 6a.15 Interações de PBD-espaçador 3 em 2da8 | 147 |

Porção cumarina-espaçador 1

| | |
|---|-----|
| Figura 3. 6a.16 Interações de cumarina-espaçador 1 em 1g3x | 148 |
| Figura 3. 6a.17 Interações de cumarina-espaçador 1 em 1d67 | 149 |
| Figura 3. 6a.18 Interações de cumarina-espaçador 1 em 1k9g | 150 |
| Figura 3. 6a.19 Interações de cumarina-espaçador 1 em 2rou | 151 |
| Figura 3. 6a.20 Interações de cumarina-espaçador 1 em 2da8 | 152 |

Porção cumarina-espaçador 2

| | |
|---|-----|
| Figura 3. 6a.21 Interações de cumarina-espaçador 2 em 1g3x | 153 |
| Figura 3. 6a.22 Interações de cumarina-espaçador 2 em 1d67 | 154 |
| Figura 3. 6a.23 Interações de cumarina-espaçador 2 em 1k9g | 155 |
| Figura 3. 6a.24 Interações de cumarina-espaçador 2 em 2rou | 156 |
| Figura 3. 6a.25 Interações de cumarina-espaçador 2 em 2da8 | 157 |

Porção cumarina-espaçador 3

| | |
|---|-----|
| Figura 3. 6a.26 Interações de cumarina-espaçador 3 em 1g3x | 158 |
| Figura 3. 6a.27 Interações de cumarina-espaçador 3 em 1d67 | 159 |

| | |
|---|-----|
| Figura 3. 6a.28 Interações de cumarina-espaçador 3 em 1k9g | 160 |
| Figura 3. 6a.29 Interações de cumarina-espaçador 3 em 2rou | 161 |
| Figura 3. 6a.30 Interações de cumarina-espaçador 3 em 2da8 | 162 |

Anexo 3.7 Experimento 4.3: ligantes 1, 2 e 3 com 1d67, 1k9g, 2rou e 2da8

| | |
|---|-----|
| Figura 3. 7a.1 Interações do ligante 1 em 1d67 | 163 |
| Figura 3. 7a.2 Interações do ligante 1 em 1k9g | 164 |
| Figura 3. 7a.3 Interações do ligante 1 em 2rou | 165 |
| Figura 3. 7a.4 Interações do ligante 2 em 1d67 | 166 |
| Figura 3. 7a.5 Interações do ligante 2 em 1k9g | 167 |
| Figura 3. 7a.6 Interações do ligante 2 em 2rou | 168 |
| Figura 3. 7a.7 Interações do ligante 3 em 1d67 | 169 |
| Figura 3. 7a.8 Interações do ligante 3 em 1k9g | 170 |
| Figura 3. 7a.9 Interações do ligante 3 em 2rou | 171 |

Anexo 3.8 Experimentos 4.0: controle para composição do ligante

| | |
|---|-----|
| Figura 3. 8a.1 Interações da PBD-espaçador do ligante 2ky7 no DNA-receptor 2ky7 | 172 |
| Figura 3. 8a.2 Interações da naftalimida-espaçador do ligante 2ky7 no receptor 2ky7 | 173 |
| Figura 3. 8a.3 Interações do ligante 2ky7 substituído com porção cumarina no receptor 2ky7 | 174 |
| Figura 3. 8a.4 Interações do ligante 1 substituído com porção naftalimida no receptor 2ky7 | 175 |

Anexo 3.9 Experimento 5.0: controle para sequência (DNA-daunomicina)

| | |
|--|-----|
| Figura 3. 9a.1 Interações do complexo 1g3x-daunomicina (intercalação em AA) | 176 |
| Figura 3. 9a.2 Interações do complexo 1d67-daunomicina (intercalação em AC) | 177 |
| Figura 3. 9a.3 Interações do complexo 1k9g-daunomicina (intercalação em GG) | 178 |
| Figura 3. 9a.4 Interações do complexo 2rou-daunomicina (intercalação em GC) | 179 |
| Figura 3. 9a.5 Interações do complexo 2da8-daunomicina (intercalação em AT) | 180 |

LISTA DE TABELAS

| | página |
|---|--------|
| Capítulo 1 – Introdução | |
| Tabela 1. 1 Estrutura de algumas pirrolbenzodiazeponas | 34 |
| Tabela 1. 2 Estruturas de pirrolbenzodiazepinas híbridas | 36 |
| Tabela 1. 3 Intervalos de ΔT_m medidos de 0 a 72 horas de incubação (Wells et al., 2008) | 38 |
| Capítulo 2 – Materiais e Métodos | |
| Tabela 2. 1 Códigos PDB das estruturas de DNA, suas sequências e o modo de ligação investigado | 47 |
| Tabela 2. 2 Esquema da estrutura dos ligantes do estudados | 49 |
| Capítulo 3 – Resultados e Discussão | |
| Tabela 3. 1 Escores do redocking para os DNAs utilizados como alvo no estudo (kcal/mol) | 56 |
| Tabela 3. 2 Escores para os ligantes 1, 2 e 3 nas estruturas 1vzk e 1g3x (kcal/mol) | 57 |
| Tabela 3. 3 Escores dos ligantes 1, 2 e 3 em 2da8 (kcal/mol) | 59 |
| Tabela 3. 4 Escores dos testes em 2ky7 com os ligantes 1, 2 e 3 (kcal/mol) | 61 |
| Tabela 3. 5 ΔE do docking dos ligantes 1, 2 e 3 (kcal/mol) | 83 |
| Anexo 3.1 Redocking com cada estrutura de DNA utilizada no estudo | |
| Tabela 3. 1a.1 Escores do redocking para 1vzk e 1g3x (kcal/mol) | 102 |
| Tabela 3. 1a.2 Escores do redocking para a formação de aduto e de complexo na 2ky7 (kcal/mol) | 103 |
| Tabela 3. 1a.3 Escores do redocking para os DNAs utilizados como alvo no estudo (kcal/mol) | 104 |
| Anexo 3.2 Experimento 2 Experimento 1: ligação no sulco ou no modo intercalado | |
| Tabela 3. 2a.1 Interações do ligante 1 em 1vzk | 108 |
| Tabela 3. 2a.2 Interações do ligante 1 em 1g3x | 109 |
| Tabela 3. 2a.3 Interações do ligante 2 em 1vzk | 110 |
| Tabela 3. 2a.4 Interações do ligante 2 em 1g3x | 111 |
| Tabela 3. 2a.5 Interações do ligante 3 em 1vzk | 112 |
| Tabela 3. 2a.6 Interações do ligante 3 em 1g3x | 113 |
| Anexo 3.3 Experimento 2 – Bis-intercalação com estrutura 2da8 | |
| Tabela 3. 3a.1 Interações do ligante 1 em 2da8 | 114 |
| Tabela 3. 3a.2 Interações do ligante 2 em 2da8 | 115 |
| Tabela 3. 3a.3 Interações do ligante 3 em 2da8 | 116 |

Anexo 3.4 Experimento 3: Modo misto – aduto e complexo

| | |
|---|-----|
| Tabela 3. 4a.1 Interações do ligante 1 no teste com aduto (2ky7) | 117 |
| Tabela 3. 4a.2 Interações do ligante 1 no complexo com 2ky7 | 118 |
| Tabela 3. 4a.3 Interações do ligante 2 no teste com aduto (2ky7) | 119 |
| Tabela 3. 4a.4 Interações do ligante 2 no complexo 2ky7 | 120 |
| Tabela 3. 4a.5 Interações do ligante 3 no teste com aduto (2ky7) | 121 |
| Tabela 3. 4a.6 Interações do ligante 3 no complexo com 2ky7 | 122 |

Anexo 3.5 Experimento 4.1: complexos com PBD e cumarina separadamente

Porção pirrolbenzodiazepina (PBD)

| | |
|--|-----|
| Tabela 3. 5a.1 Interações da porção PBD em 1g3x | 123 |
| Tabela 3. 5a.2 Interações da porção PBD em 1d67 | 124 |
| Tabela 3. 5a.3 Interações da porção PBD em 1k9g | 125 |
| Tabela 3. 5a.4 Interações da porção PBD em 2rou | 126 |
| Tabela 3. 5a.5 Interações da porção PBD em 2da8 | 127 |

Porção cumarina

| | |
|--|-----|
| Tabela 3. 5a.6 Interações da porção cumarina em 1g3x | 128 |
| Tabela 3. 5a.7 Interações da porção cumarina em 1d67 | 129 |
| Tabela 3. 5a.8 Interações da porção cumarina em 1k9g | 130 |
| Tabela 3. 5a.9 Interações da porção cumarina em 2rou | 131 |
| Tabela 3. 5a.10 Interações da porção cumarina em 2da8 | 132 |

Anexo 3.6 Experimento 4.2: Porções PBD e cumarina mais os espaçadores

Porção PBD-espaçador 1

| | |
|---|-----|
| Tabela 3. 6a.1 Interações de PBD-espaçador 1 em 1g3x | 133 |
| Tabela 3. 6a.2 Interações de PBD-espaçador 1 em 1d67 | 134 |
| Tabela 3. 6a.3 Interações de PBD-espaçador 1 em 1k9g | 135 |
| Tabela 3. 6a.4 Interações de PBD-espaçador 1 em 2rou | 136 |
| Tabela 3. 6a.5 Interações de PBD-espaçador 1 em 2da8 | 137 |

Porção PBD-espaçador 2

| | |
|--|-----|
| Tabela 3. 6a.6 Interações de PBD-espaçador 2 em 1g3x | 138 |
| Tabela 3. 6a.7 Interações de PBD-espaçador 2 em 1d67 | 139 |
| Tabela 3. 6a.8 Interações de PBD-espaçador 2 em 1k9g | 140 |
| Tabela 3. 6a.9 Interações de PBD-espaçador 2 em 2rou | 141 |
| Tabela 3. 6a.10 Interações de PBD-espaçador 2 em 2da8 | 142 |

| | |
|---|-----|
| Porção PBD-espaçador 3 | |
| Tabela 3. 6a.11 Interações de PBD-espaçador 3 em 1g3x | 143 |
| Tabela 3. 6a.12 Interações de PBD-espaçador 3 em 1d67 | 144 |
| Tabela 3. 6a.13 Interações de PBD-espaçador 3 em 1k9g | 145 |
| Tabela 3. 6a.14 Interações de PBD-espaçador 3 em 2rou | 146 |
| Tabela 3. 6a.15 Interações de PBD-espaçador 3 em 2da8 | 147 |
| Porção cumarina-espaçador 1 | |
| Tabela 3. 6a.16 Interações de cumarina-espaçador 1 em 1g3x | 148 |
| Tabela 3. 6a.17 Interações de cumarina-espaçador 1 em 1d67 | 149 |
| Tabela 3. 6a.18 Interações de cumarina-espaçador 1 em 1k9g | 150 |
| Tabela 3. 6a.19 Interações de cumarina-espaçador 1 em 2rou | 151 |
| Tabela 3. 6a.20 Interações de cumarina-espaçador 1 em 2da8 | 152 |
| Porção cumarina-espaçador 2 | |
| Tabela 3. 6a.21 Interações de cumarina-espaçador 2 em 1g3x | 153 |
| Tabela 3. 6a.22 Interações de cumarina-espaçador 2 em 1d67 | 154 |
| Tabela 3. 6a.23 Interações de cumarina-espaçador 2 em 1k9g | 155 |
| Tabela 3. 6a.24 Interações de cumarina-espaçador 2 em 2rou | 156 |
| Tabela 3. 6a.25 Interações de cumarina-espaçador 2 em 2da8 | 157 |
| Porção cumarina-espaçador 3 | |
| Tabela 3. 6a.26 Interações de cumarina-espaçador 3 em 1g3x | 158 |
| Tabela 3. 6a.27 Interações de cumarina-espaçador 3 em 1d67 | 159 |
| Tabela 3. 6a.28 Interações de cumarina-espaçador 3 em 1k9g | 160 |
| Tabela 3. 6a.29 Interações de cumarina-espaçador 3 em 2rou | 161 |
| Tabela 3. 6a.30 Interações de cumarina-espaçador 3 em 2da8 | 162 |
| Anexo 3.7 Experimento 4.3: ligantes 1, 2 e 3 com 1d67, 1k9g, 2rou e 2da8 | |
| Tabela 3. 7a.1 Interações do ligante 1 em 1d67 | 163 |
| Tabela 3. 7a.2 Interações do ligante 1 em 1k9g | 164 |
| Tabela 3. 7a.3 Interações do ligante 1 em 2rou | 165 |
| Tabela 3. 7a.4 Interações do ligante 2 em 1d67 | 166 |
| Tabela 3. 7a.5 Interações do ligante 2 em 1k9g | 167 |
| Tabela 3. 7a.6 Interações do ligante 2 em 2rou | 168 |
| Tabela 3. 7a.7 Interações do ligante 3 em 1d67 | 169 |
| Tabela 3. 7a.8 Interações do ligante 3 em 1k9g | 170 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 3. 7a.9 Interações do ligante 3 em 2rou | 171 |
|---|-----|

Anexo 3.8 Experimento 4.0: Controle para composição do ligante

| | |
|--|-----|
| Tabela 3. 8a.1 Interações da PBD-espaçador do ligante 2ky7 no DNA-receptor 2ky7 | 172 |
|--|-----|

| | |
|--|-----|
| Tabela 3. 8a.2 Interações da naftalimida-espaçador do ligante 2ky7 no receptor 2ky7 | 173 |
|--|-----|

| | |
|---|-----|
| Tabela 3. 8a.3 Interações do ligante 2ky7 substituído com porção cumarina no receptor 2ky7 | 174 |
|---|-----|

| | |
|---|-----|
| Tabela 3. 8a.4 Interações do ligante 1 substituído com porção naftalimida no receptor 2ky7 | 175 |
|---|-----|

Anexo 3.9 Experimento 5.0: controle para sequência (DNA-daunomicina)

| | |
|--|-----|
| Tabela 3. 9a.1 Interações do complexo 1g3x-daunomicina (intercalação em AA) | 176 |
|--|-----|

| | |
|--|-----|
| Tabela 3. 9a.2 Interações do complexo 1d67-daunomicina (intercalação em AC) | 177 |
|--|-----|

| | |
|--|-----|
| Tabela 3. 9a.3 Interações do complexo 1k9g-daunomicina (intercalação em GG) | 178 |
|--|-----|

| | |
|--|-----|
| Tabela 3. 9a.4 Interações do complexo 2rou-daunomicina (intercalação em GC) | 179 |
|--|-----|

| | |
|--|-----|
| Tabela 3. 9a.5 Interações do complexo 2da8-daunomicina (intercalação em AT) | 180 |
|--|-----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------------------|--|
| DNA | <i>Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucléico)</i> |
| RMSD | <i>Root Mean Square Deviation</i> |
| PBD | <i>Pirrolbenzodiazepina</i> |
| GOLD | <i>Genetic Optimization for Ligand Docking</i> |
| AG | <i>Algoritmo Genético</i> |
| RMN | <i>Ressonância Magnética Nuclear</i> |
| CSD | Cambridge Structural Database |
| PDB | Protein Data Bank |
| PDBSum | PDBSum |
| NDB | Nucleic Acid Database |
| Å | ångstrom |
| T_m | Temperatura de desnaturação do DNA no ponto médio da curva de absorção |

Lista de nucleotídeos:

| | | | |
|----------|----------|----------|---------|
| C | Citosina | A | Adenina |
| T | Timina | G | Guanina |

SUMÁRIO

| | página |
|--|-----------|
| Resumo | |
| Abstract | |
| Lista de Figuras | |
| Lista de Abreviaturas e Siglas | |
| Apresentação | 21 |
| Capítulo 1 – Introdução | 24 |
| 1.1 O DNA | 25 |
| 1.2 Ligação de pequenas moléculas ao DNA | 29 |
| 1.3 Docking Molecular de complexos DNA-ligante | 32 |
| 1.4 Pirrolbenzodiazepinas (PBDs). | 34 |
| 1.4.1 Experimentos <i>in vitro</i> realizados em outros trabalhos sobre PBDs híbridas | 38 |
| 1.5 Justificativa | 40 |
| 1.6 Objetivos | 41 |
| 1.6.1 Gerais | 41 |
| 1.6.1 Específicos | 41 |
| Capítulo 2 – Materiais e Métodos | 42 |
| 2.1 Docking | 43 |
| 2.2 Algoritmo Genético (AG) e GOLD | 45 |
| 2.3 Seleção das estruturas dos DNAs receptores | 48 |
| 2.4 Obtenção e preparo da estrutura dos ligantes | 49 |
| 2.5 Validação dos parâmetros do docking ou redocking | 50 |
| 2.6 Análise dos resultados dos cálculos de docking | 51 |
| 2.7 Comparação dos resultados dos cálculos de docking | 52 |
| Capítulo 3 – Resultados e Discussão | 53 |
| 3.1 Avaliação dos modos de ligação | 57 |
| 3.1.1 Experimento 1: sulco menor ou intercalação | 57 |
| 3.1.2 Experimento 2: avaliação do modo de ligação bis-intercalado | 59 |
| 3.1.3 Experimento 3: modo de ligação misto; formação de aduto no sulco menor ou de complexos. | 61 |
| 3.2 Influência da composição do ligante para o modo de ligação. | 65 |
| 3.2.1 Experimento 4.1: Influência das porções cumarina e PBD para o modo de ligação | 66 |
| 3.2.2 Experimento 4.2: Porção PBD mais espaçadores e porção cumarina mais espaçadores | 69 |
| 3.2.3 Experimento 4.3: Estudo da formação de complexos com os ligantes inteiros 1, 2 e 3 | 73 |
| 3.2.3.1 Ligante 1 | 73 |
| 3.2.3.2 Ligante 2 | 75 |
| 3.2.3.3 Ligante 3 | 76 |
| 3.2.4 Experimento 4.0 (controle): influência da porção cumarina e da porção naftalimida em PBDs híbridas | 79 |

| | |
|--|------------|
| 3.2.5 Experimento 5.0: controle da preferência de sequência | 83 |
| 3.3 Considerações sobre os experimentos e comparação com os dados na literatura | 85 |
| 3.3.1 Modo de ligação | 85 |
| 3.3.2 Mecanismo de ligação | 86 |
| 3.3.3 Estabilização da dupla hélice e preferência de sequência | 89 |
| Capítulo 4 – Conclusões | 91 |
| 4.1 Modo de ligação | 92 |
| 4.2 Contribuição da composição do ligante para o modo de ligação | 93 |
| 4.3 Influência da sequência | 95 |
| 4.4 Mecanismo de ligação | 95 |
| 4.5 Perspectivas | 96 |
| Referências | 97 |
| Anexos | 103 |
| Anexo 3.1 Redocking com cada estrutura de DNA utilizada no estudo | 102 |
| Anexo 3.2 Experimento 1: ligação no sulco ou no modo intercalado | 106 |
| Anexo 3.3 Experimento 2: Bis-intercalação com estrutura 2da8 | 112 |
| Anexo 3.4 Experimento 3: Modo misto – aduto e complexo | 115 |
| Anexo 3.5 Experimento 4.1: complexos com PBD e cumarina separadamente | 121 |
| Anexo 3.6 Complexos com as porções PBD e cumarina mais os espaçadores | 131 |
| Anexo 3.7 Experimento 4.3: ligantes 1, 2 e 3 com 1d67, 1k9g, 2rou e 2da8 | 161 |
| Anexo 3.8 Experimentos 4.0: controle para composição do ligante | 170 |
| Anexo 3.9 Experimento 5.0: controle para sequência (DNA-daunomicina) | 174 |

Apresentação

Este trabalho apresenta o estudo da formação de complexos entre pequenas moléculas e o DNA. As pequenas moléculas que se ligam ao DNA ocupam um rol central na farmacologia e bioquímica devido ao seu papel-chave nos processos de função, replicação, transcrição, recombinação e mutagênese. Algumas classes de compostos, como antibióticos, antineoplásicos e marcadores moleculares de aplicação técnica, têm sua atividade devido à interação direta com a estrutura da dupla hélice.

Inserido no campo da biologia estrutural e fazendo uso de ferramentas de química e bioquímica computacional, o presente trabalho pode ser útil para o entendimento dos mecanismos de ligação dos compostos estudados e das características estruturais dos mesmos.

O Capítulo 1 apresenta uma descrição do DNA, com ênfase em sua estrutura bem como sobre a interação de pequenas moléculas com o DNA, sobre seus modos de ligação e sobre as interações intermoleculares. Esta última parte é fundamental para o planejamento das simulações e para a análise dos resultados de docking. O Capítulo 2 contempla os materiais e métodos, onde há uma descrição dos DNA-receptores, dos ligantes estudados, derivados de compostos híbridos pirrolbenzodiazepinas-cumarinas, e do método de simulação, o docking molecular, e a importância da visualização molecular para a avaliação das interações moleculares. No Capítulo 3, são apresentados e discutidos os resultados dos cálculos e análises de docking, com ênfase na avaliação de modo de ligação dos compostos ao DNA, na influência da estrutura do ligante, e da sequência de dos DNA-receptores para a formação dos complexos. Este capítulo contém anexos onde estão organizadas as tabelas de interações e figuras dos complexos resultantes da análise

auxiliada por visualização molecular. Optou-se por adotar os anexos devido ao grande número de informações (número de complexos analisados e interações intermoleculares gerados). No Capítulo 4, são apresentadas as conclusões do trabalho, mostrando os modos de ligação e no Capítulo 5, as referências.

CAPÍTULO 1

Introdução

1.1 O DNA

Nos estudos sobre a formação de complexos moleculares em nível estrutural, é fundamental a descrição da estrutura da macromolécula que atuará como receptor, bem como da família dos ligantes que se pretende investigar, pois constituem os conceitos-chave para o entendimento das interações moleculares envolvidas e a descrição do sistema. Assim, será feita uma breve descrição primeiramente da estrutura do DNA e dos ligantes da família das pirrolbenzodiazepinas.

A estrutura tridimensional do ácido desoxirribonucleico (DNA – da sigla em inglês para *deoxyribonucleic acid*) foi elucidada com o auxílio dos resultados de experimentos de cristalografia por difração de raios X, realizados por Rosalind E. Franklin (Franklin e Gosling, 1953) que produziu a imagem do padrão de difração desta estrutura, a fotografia 51 (Figura 1.1), e Maurice H. F. Wilkins (Wilkins, Stokes e Wilson, 1953). O modelo da estrutura do DNA foi proposto por James Watson e Francis Crick na década de 50 (Watson e Crick, 1953).

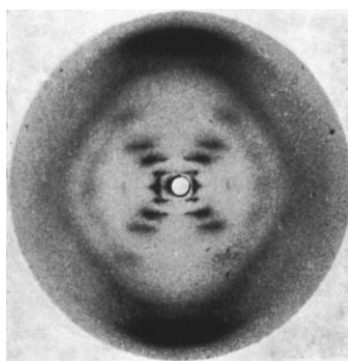


Figura 1.1 Fotografia 51 – a imagem do padrão de difração de raio X para o DNA obtida pela primeira vez por Rosalind Franklin (extraído de Franklin e Gosling, 1953).

O modelo proposto para a molécula da hereditariedade descreve uma estrutura composta por duas cadeias polinucleotídicas, cada uma delas formada pela união covalente e sequencial de nucleotídeos, pareadas e enoveladas em uma dupla hélice. O nucleotídeo, a unidade fundamental dos ácidos nucleicos, é composto de três porções distintas: o ácido fosfórico, ou apresentado na forma de fosfato (PO_4^-), responsável por sua natureza ácida, uma pentose do tipo desoxirribose e uma base

nitrogenada, a qual pode variar, originando os quatro diferentes nucleotídeos encontrados no DNA. Os nucleotídeos do DNA são: adenina (A) e guanina (G) – que contêm bases púricas – e timina (T) e citosina (C) – que contêm bases pirimídicas (Figura 1.2).

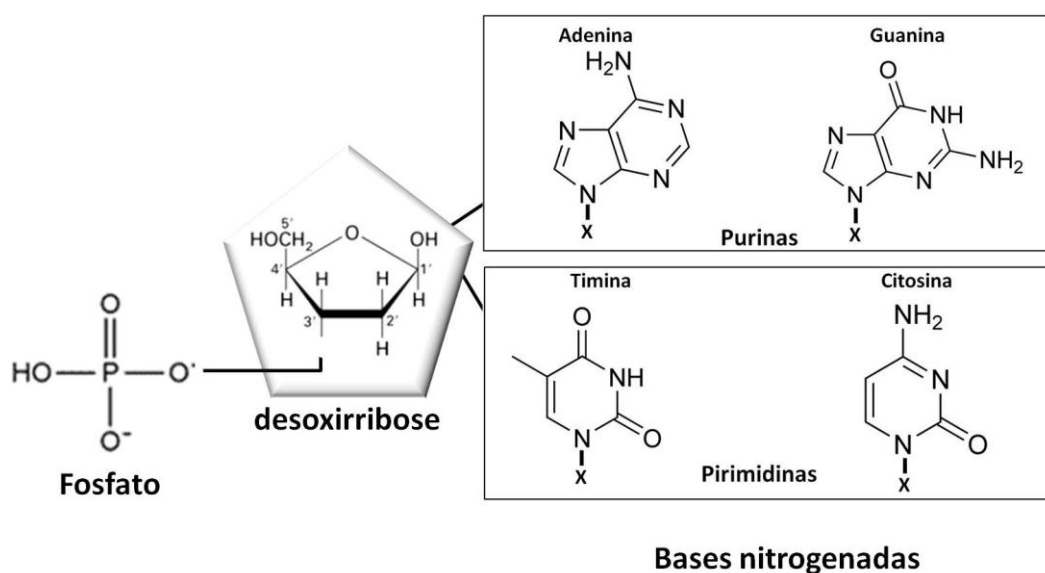


Figura 1.2 Esquema da composição das unidades fundamentais do DNA, os nucleotídeos. Apresentam três grupos distintos: fosfato, pentose (desoxirribose para o DNA) e as bases nitrogenadas (A, G, T ou C). A posição X nas bases representa a posição de ligação com a desoxirribose.

Os nucleotídeos formam cadeias polinucleotídicas ao se unirem da seguinte forma: o fosfato de um nucleotídeo ligado ao carbono C3' da pentose liga-se ao carbono C5' da pentose do outro nucleotídeo (ligação fosfodiéster). Deste modo, a cada ligação, restam livres na extremidade da cadeia em formação o C5' do nucleotídeo inicial e o C3' do nucleotídeo final. Portanto, diz-se que uma cadeia polinucleotídica apresenta uma extremidade 5' e uma extremidade 3' (Figura 1.3).

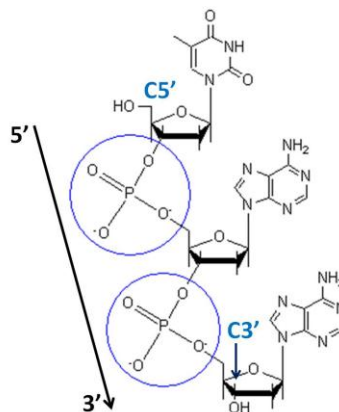


Figura 1.3 Esquema de uma cadeia trinucleotídica, destacando com a seta as extremidades 5' e 3'.

O DNA do núcleo das células humanas é composto por duas cadeias polinucleotídicas pareadas, sendo as bases nitrogenadas dos nucleotídeos fundamentais para este pareamento, uma vez que ele é mantido por ligações de hidrogênio que se formam entre elas. Ao longo das cadeias, o pareamento dos nucleotídeos é específico e dá-se por meio do reconhecimento molecular. A base do nucleotídeo adenina (A) reconhece a base do nucleotídeo timina (T), e vice-versa, e a base do nucleotídeo guanina (G) reconhece a base do nucleotídeo citosina (C), e vice-versa. Esta especificidade ocorre devido ao número complementar de grupos doadores e aceptores de ligação de hidrogênio: dois para o par A-T e três para o par G-C (Figura 1.4). Este é o padrão descrito para o pareamento das bases no DNA, mas, obviamente, existem exceções a esse padrão (erros de pareamento – *mismatching*). Há também exceções ao modelo de dupla hélice para o DNA de algumas regiões dos cromossomos como, por exemplo, a existência de estruturas tipo quadruplex nos telômeros (Parkinson, Lee e Neidle, 2002).

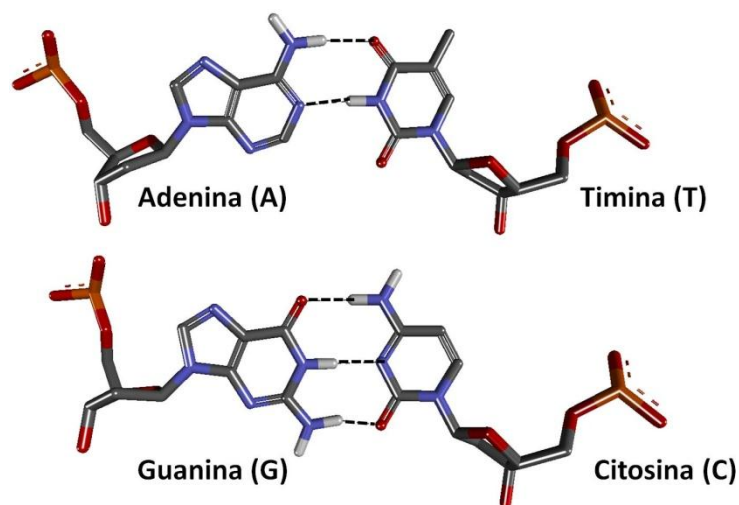


Figura 1.4 Pareamento específico entre os nucleotídeos A-T e G-C, mantido por ligações de hidrogênio (linhas tracejadas).

As ligações de hidrogênio são um tipo de ligação não covalente fundamental na manutenção da estrutura do DNA. Outra interação fraca que tem sido verificada e tem ganhado atenção nas estruturas de macromoléculas biológicas são as interações entre os elétrons π dos anéis aromáticos. No caso do DNA, elas estão presentes entre os anéis heteroaromáticos das bases nitrogenadas adjacentes (Kool, 2000) (Figura 1.5).

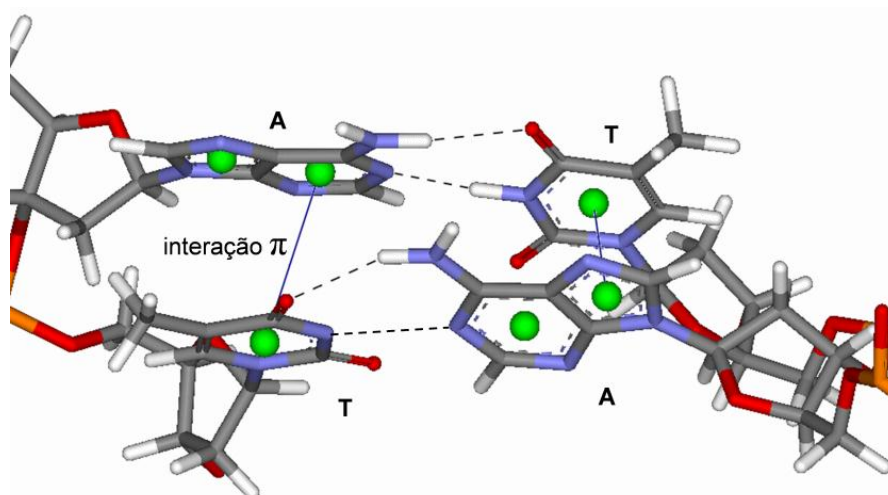


Figura 1.5 Interações no DNA: ligações de hidrogênio (linhas tracejadas) e interação π entre os anéis das bases nitrogenadas adenina (A) e Timina (T).

Como resultado das ligações e interações entre os nucleotídeos, as duas cadeias polinucleotídicas pareadas do DNA não se encontram em conformação estendida.

Ao contrário, elas se dispõem torcidas ao redor de um eixo imaginário ao longo de seus comprimentos, resultando na estrutura de uma dupla hélice (Figura 1.6). Neste modelo, o corrimão da fita é composto pela pentose e o fosfato carregado negativamente, que aponta para fora da estrutura e as bases nitrogenadas com carga nula ocupam o centro da hélice. A torção da hélice é do tipo mão direita e resulta na formação de dois sulcos ao longo da estrutura, o maior e o menor (Figura 1.6).

A literatura traz discussões a respeito da contribuição das interações e suas energias para a conformação final do DNA. A estrutura da dupla hélice é a forma mais estável da cadeia do DNA e que, surpreendentemente, além das ligações de hidrogênio, as interações de empilhamento dos anéis são fundamentais para atingir tal estabilidade (Kool, 2001).

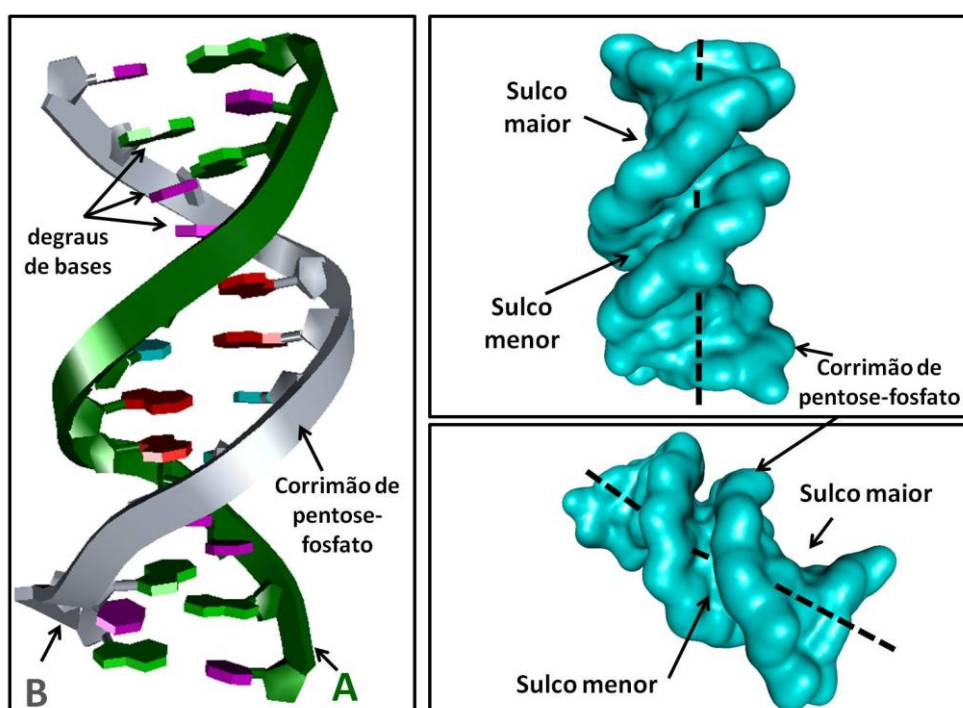


Figura 1.6 Estrutura da dupla hélice do DNA, conformação B (em condições fisiológicas de hidratação). A linha tracejada representa o eixo longitudinal da dupla hélice.

1.2 LIGAÇÃO DE PEQUENAS MOLÉCULAS AO DNA

A elucidação da estrutura do DNA contribuiu para a compreensão de processos envolvendo a estrutura do material genético. Desde então, foi possível entender a interação do DNA com outros fatores, a maioria de natureza proteica, em processos básicos como replicação, tradução e reparo. A partir do entendimento que o DNA interage com outras moléculas dos sistemas biológicos, surge o interesse em avaliar quais moléculas exógenas podem interagir com a estrutura de ácidos nucleicos. Alguns dos compostos que interagem com DNA são de interesse farmacológico e terapêutico, com atividades antibióticas e anticarcinógenas (Meyer et al., 2003). Neste contexto, diversas classes de compostos foram descritas. Entre eles podem ser citados: cisplatina (Todd & Lippard, 2010), brometo de etídio (composto fluorescente utilizado para marcar DNA), benzimidazóis (Mallena et al., 2004), acridinas (Malinina et al., 2002), antibióticos da família das antraciclinas (Howerton, Nagpals & Williams, 2003), compostos de coordenação com metais (Seng et al., 2008; Seng et al. 2010) e os antibióticos antitumorais da família das pirrolbenzodiazepinas, entre várias outras classes de pequenas moléculas.

Pequenas moléculas se ligam ao DNA basicamente por dois modos de ligação: ligação nos sulcos e por intercalação entre as bases. Compostos intercaladores ligam-se ao DNA inserindo sua porção contendo preferencialmente anéis fusionados entre os anéis das bases nitrogenadas. Para tanto, a estrutura da dupla hélice é deformada, de modo que a hélice fica distorcida na região em que a molécula se liga. Ligantes do sulco menor não induzem uma perturbação drástica na estrutura do DNA (Chaires, Dattagupta, & Crothers, 2006, 2008). A maneira pela qual os compostos se associam ao DNA podem promover efeitos nocivos, devido a grandes deformações, ou até mesmo a quebra do DNA. Em outras situações, quando a deformação é menor, podem resultar em aplicações terapêuticas e tecnológicas.

Estudar o modo de ligação e a extensão das interações é fundamental para o entendimento dos mecanismos de ação envolvidos com estes ligantes. Crucial para a formação dos complexos macromolécula-ligantes é o reconhecimento molecular, o qual ocorre por conta das interações que as moléculas realizam entre si. Interações

comumente relatadas nos sistemas biológicos são as ligações de hidrogênio. Elas são ubiquamente distribuídas, incluindo interações entre as moléculas do solvente, interações de solutos com o solvente e interações que sustentam estruturas complexas, como as de proteínas e ácidos nucleicos. Surgem entre dois átomos eletronegativos, os quais estão próximos devido à presença de um átomo de hidrogênio entre ambos. Um dos átomos funciona como o doador (em grupos N-H, O-H, C-H e etc.) e o outro como acceptor de hidrogênio (Ermondi e Caron, 2006), geralmente átomos de O, N e halogênios. Este tipo de interação está por toda a extensão do DNA entre as bases nitrogenadas de duas cadeias opostas.

Outro tipo de interação, também importante e frequente no reconhecimento molecular, são as de van der Waals. Originam-se da assimetria transitória da distribuição eletrônica em torno de um átomo. Esta assimetria induz assimetria complementar no átomo adjacente, o que resulta em uma atração entre eles (Caracelli & Zukerman-Schpector, 2006). A repulsão de van der Waals ocorre quando dois átomos se aproximam de tal modo que sobrepõem suas nuvens eletrônicas. Também relevantes, sobretudo para a aproximação das moléculas, são as interações entre cargas eletrostáticas (Ermondi e Caron, 2006). Estudos com estruturas moleculares de ligantes e receptores auxiliam na compreensão da formação de complexos e na otimização de potenciais ligantes, agilizando o processo de desenvolvimento de novos compostos. Estudos estruturais com ácidos nucleicos podem até alcançar a área de *drug-delivery*, a qual envolve o planejamento de cápsulas moleculares para fármacos, visando atingir alvos específicos. Sawada et al. (2009) relatam a obtenção de mono e dinucleotídeos encapsulados em gaiolas moleculares de forma estável. Tal descoberta poderá contribuir com estudos que visam o reconhecimento de fragmentos de DNA em um sistema isolado.

Com os recentes avanços das técnicas de determinação de estruturas moleculares, tanto de macromoléculas biológicas como de compostos orgânicos e inorgânicos menores, tem-se observado um grande número de estudos que resolvem a estrutura não somente de proteínas, mas também do DNA. O interesse pelo planejamento e desenvolvimento de compostos que interagem com o DNA tem crescido,

principalmente em vista do atual sequenciamento do genoma humano. Sobretudo, observa-se crescer o interesse por compostos que podem apresentar aplicações terapêuticas. Além disso, alguns compostos que interagem com o DNA abrem possibilidades para o desenvolvimento de técnicas aplicadas à marcação desta macromolécula, explorando as propriedades fluorescentes que alguns podem apresentar quando complexadas com a mesma.

1.3 DOCKING MOLECULAR DE COMPLEXOS DNA-LIGANTE

Uma fase importante que precede os testes clínicos é o desenvolvimento de compostos-líderes. Esta etapa envolve o teste de um número de diferentes ligantes, da ordem de milhares, em células ou modelos animais a fim de obter uma família de compostos com atividade biológica desejável. A automatização deste processo permitiu sua realização em escala industrial; mesmo assim, aplica-se uma parcela do tempo em procedimentos de extração e isolamento, no caso de compostos naturais, no planejamento da síntese dos diferentes compostos e nos testes biológicos para então procederem-se os testes clínicos.

É neste sentido que os métodos computacionais têm grande contribuição. Recentemente, o descobrimento de fármacos tem sido impulsionado pela disponibilidade de estruturas 3D obtidas por difração de raios X, por RMN ou por modelagem molecular, como o docking molecular (Mandal et al., 2009). Estas informações alimentam banco de dados e aperfeiçoam o desenvolvimento de *softwares* para o estudo de sistemas biológicos.

Na química computacional há ferramentas que permitem trabalhar com os dados estruturais tanto dos compostos como dos receptores-alvos. É no planejamento das estruturas de melhores ligantes guiado pela estrutura dos receptores biológicos que se define o planejamento racional de fármacos. Ferramentas de docking molecular representam uma dessas abordagens computacionais, que têm auxiliado e agilizado processos de desenvolvimento.

No Grupo de Física Teórica de Materiais e Biomoléculas – BioMat – do Departamento de Física da Universidade Federal de São Carlos, simulações de docking molecular têm sido valiosas no estudo da interação de pequenos compostos com o DNA. Quando o grupo se formou em 2004, os trabalhos eram voltados para estudos de simulação computacional via docking, de complexos formados de enzimas-ligantes. Em 2006, foram iniciados os estudos tendo o DNA como receptor. Quando o trabalho foi apresentado, em abril de 2008, havia apenas duas publicações com DNA e docking (Reis, 2008). Tanto os programas computacionais como os de visualização gráfica, foram desenvolvidos para trabalhar principalmente com proteínas e não com DNA; hoje, dado o crescente interesse na área, tanto um como outro tem ampliado suas facilidades para o trabalho com DNA.

Os estudos com DNA-receptores e ligantes desenvolvidos no BioMat continuaram. Em 2008 (Seng et al., 2008) foram realizados cálculos de docking para compostos organometálicos, que permitiram construir um modelo para explicar dados experimentais. Estes estudos apresentam uma parametrização cuidadosa para a realização de simulações e para a análise das mesmas por visualização molecular. Os resultados de docking puderam ser relacionados com medidas de dicroísmo circular e de clivagem de DNA combinada com eletroforese. Em outro estudo mais recente do BioMat (Seng et al., 2010), foi possível mostrar a eficiência do docking para avaliar a preferência de sequência de compostos intercaladores, testando a ligação de compostos de coordenação de zinco em estruturas de DNA no modo intercalado, em diferentes sequências. Os resultados de docking e de dicroísmo circular apontaram seletividade pelas bases AT para os compostos contendo Zn. Neste caso, os resultados do docking também puderam explicar a seletividade de bases, principalmente devido ao tipo de interações intermoleculares nos complexos DNA-ligantes e explicar os resultados de técnicas experimentais realizadas no trabalho (Seng et al, 2010).

Estes dados mostram a importância de estudos de docking e modelagem molecular para o planejamento e o entendimento de modos de ligação e de mecanismos de ação.

1.4 PIRROLBENZODIAZEPINAS (PBDs)

A família das pirrolbenzodiazepinas (PBDs) compreende compostos orgânicos com atividade antitumoral e antibiótica. Sua estrutura consiste de três anéis conjugados (anéis A, B e C) com centro quiral no átomo de carbono C11a (Figura 1.7), o que dá a essa molécula uma forma tridimensional que possibilita ajuste ideal dentro do sulco menor do DNA (Thurston, 2007).

A variedade de ligantes desta família tem sua estrutura baseada na antramicina, uma pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepina natural, isolada pela primeira vez da bactéria *Streptomyces refuineus* na década de 60 por M. D. Tendler e S. Korman, que cunharam o termo refuína para se referir ao princípio ativo do caldo de fermentação obtido com o microrganismo (Leimgrub, Batcho e Schenker, 1965; Leimgrub et al., 1965). Verificou-se que o caldo extraído apresentava atividade antibiótica e antitumoral, as quais foram atribuídas posteriormente a antramicina (Tabela 1.1).

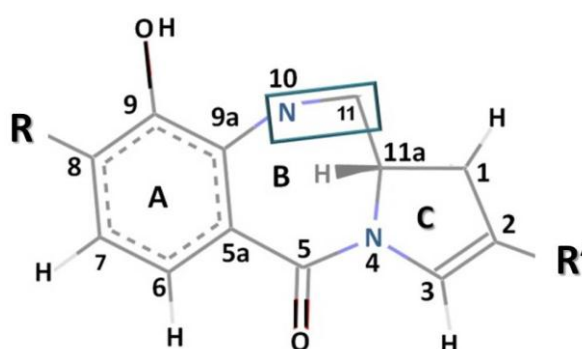
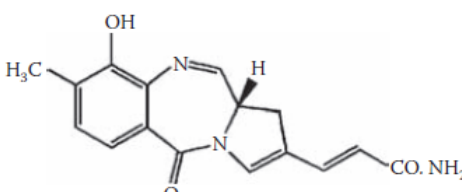
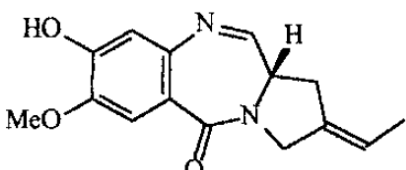
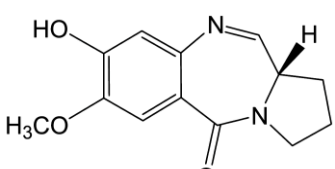
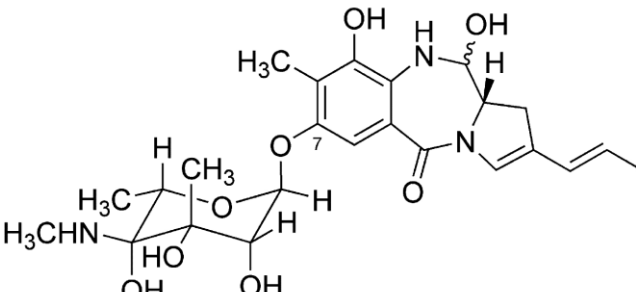


Figura 1.7 Porção pirrolbenzodiazepina (PBD) comum a todos os compostos desta família. R e R' correspondem às posições onde ocorrem substituições para obter novos compostos dessa família. A numeração padrão dos átomos desta plataforma de anéis está apresentada. A região N10-C11 está contornada por seu papel central na reatividade com o DNA.

| Composto | estrutura |
|--------------|--|
| antramicina |  |
| tomaimicina |  |
| DC-81 |  |
| sibiromicina |  |

A antramicina é um composto que se liga ao DNA de modo covalente, formando adutos com o nitrogênio N2 do nucleotídeo guanina. Em 1994, foi elucidada a estrutura cristalográfica do complexo antramicina-DNA. A estrutura está depositada no *Protein Data Bank* (www.rcsb.org/pdb) sob código 274d. Atualmente, além da estrutura do DNA-antramicina, existem apenas outras três entradas no *Protein Data Bank* de pirrobenzodiazepinas ligadas ao DNA: códigos 1ky7 (Rettig et al., 2010), 2ktt (Rettig et al., 2009) e 2k4l (Antonow et al., 2008).

Após o isolamento da antramicina, trabalhou-se com novas rotas sintéticas e uma diversidade de compostos PBDs pôde ser produzida e testada. Na Tabela 1.1, são

apresentados alguns compostos de destaque nessa família: tomamicina (isolada na década de 70), DC-81 e sibiromicina (Thurston, 2007).

Em seguida, houve o desenvolvimento de dímeros de PBDs, ou seja, compostos contendo dois anéis PBD, ligados por um espaçador (cadeia com tamanho variável) pelo carbono C8 do anel A (Figura 1.8). Estes são capazes de ligar a dois pontos do DNA, realizando interações com as duas fitas, o que levou ao uso do termo *cross-linking agents* para se referir a tais compostos. Novamente, este mecanismo foi estudado, tornando possível obter uma série de ligantes candidatos e o representante mais notável dentre tais PBDs é o ligante SJG-136, descrito por vários autores: Alley et al. (2004), Hartley et al. (2004) e Pepper et al. (2004), que apresentaram características pré-clínicas favoráveis desse composto.

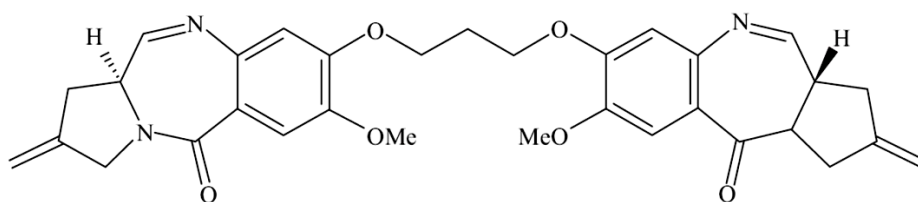
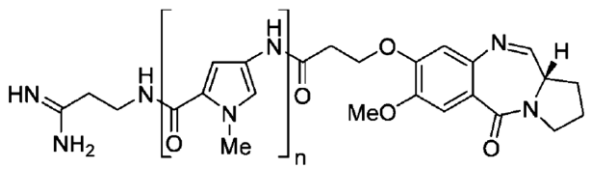
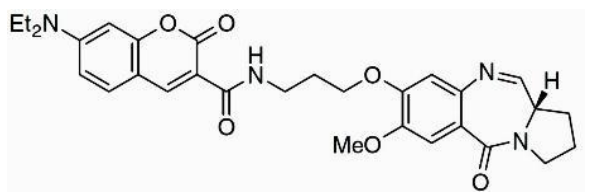
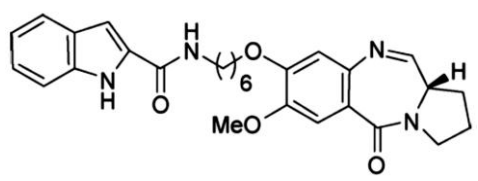
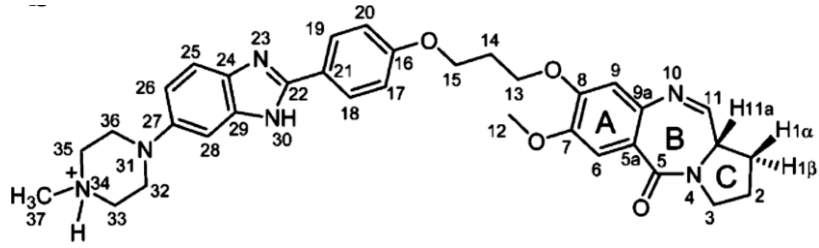
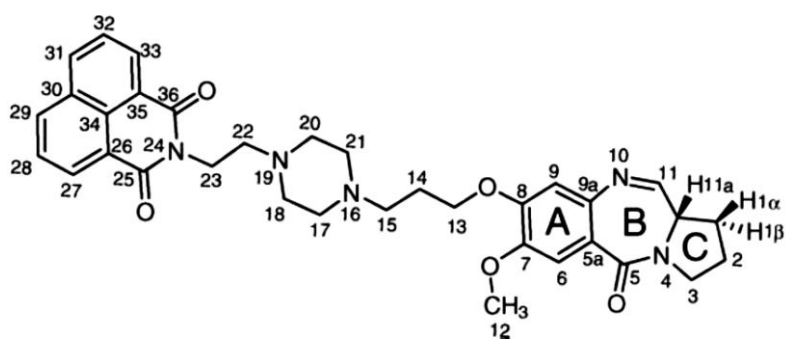
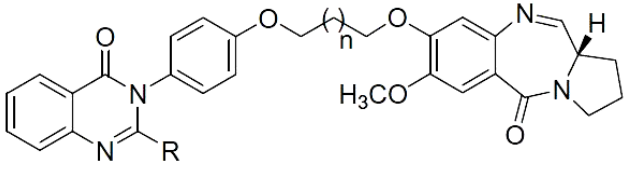


Figura 1.8 Composto SJG-136. Observa-se a estrutura do dímero com duas porções PBDs ligadas por um espaçador.

Outra linha de estudos é a relativa às PBDs unidas a outros grupos funcionais contendo anéis (PBDs híbridas). A mesma estratégia descrita para os dímeros é empregada, onde o segundo conjunto de anéis é ligado à PBD por um espaçador no átomo C8 do anel A. Têm sido relatada a síntese de PBDs híbridas com: indóis (Lee et al., 2009), polipirróis (Wells et al., 2006), naftalimidás (Rettig et al., 2009), benzimidazóis (Rettig et al., 2009), quinazolinás (Kamal et al., 2010) e cumarinas (Wells et al., 2008). A Tabela 1.2 mostra a estrutura geral destes compostos e as respectivas referências de onde foram extraídas.

Tabela 1.2 Estruturas de pirrolbenzodiazepinas híbridas

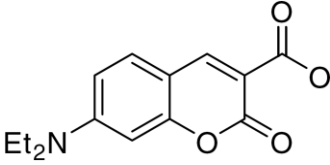
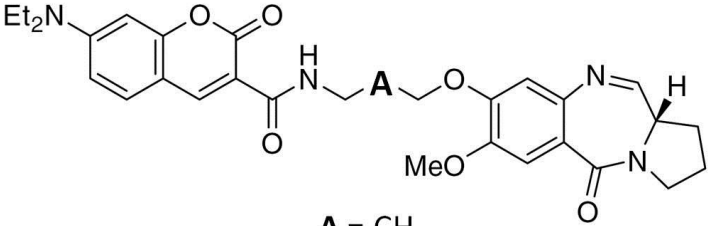
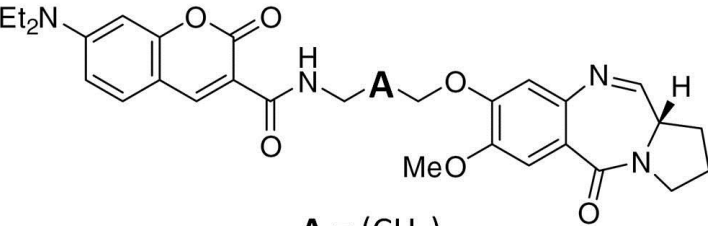
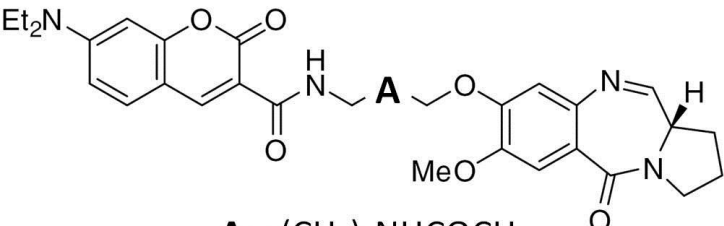
| PBD com | Estrutura do composto híbrido | Referência |
|--------------|--|---------------------|
| polipirrol |  | Wells et al. 2006 |
| cumarina |  | Wells et al., 2008 |
| indol |  | Lee et al., 2009 |
| benzimidazol |  | Rettig et al., 2009 |
| naftalimida |  | Rettig et al., 2010 |
| quinazolina |  | Kamal et al., 2010 |

1.4.1 Experimentos *in vitro* realizados em outros trabalhos sobre PBDs híbridas

Wells et al. (2008) relatam os resultados de síntese, de localização celular com fluorescência, de estabilização de DNA de timo bovino (CT-DNA) e de citotoxicidade em duas linhagens de células tumorais para três ligantes híbridos PBD-cumarina e para porção cumarina. A porção 7-dietilaminocumarina comum aos três ligantes é responsável pela fluorescência quando são submetidos a comprimentos de onda de luz visível. A localização celular mostrou que os compostos podem se concentrar no núcleo celular, sendo um indício de que se ligam ao DNA. Os autores mostram que dois dos compostos híbridos apresentam citotoxicidade em células de tumor de ovário e de melanoma, sendo o efeito mais acentuado para as células de melanoma.

Os ligantes híbridos PBD-cumarina (Tabela 1.3) estudados *in silico* no presente trabalho têm dados experimentais *in vitro* descritos por Wells et al. (2008) em DNA de timo bovino. A sequência de DNA estudada não é especificada, mas somente a porcentagem de bases (42% G+C).

Para avaliar a estabilização da dupla hélice pelos compostos, Wells e colaboradores utilizaram o perfil da temperatura de desnaturação (T_m). Esta medida pode ser empregada para verificar o efeito da presença de ligantes na desnaturação do DNA. A desnaturação da dupla hélice é medida por absorbância em UV-visível (260 nm) da solução contendo DNA, sendo a quantidade de luz absorvida proporcional à quantidade de bases não pareadas. O valor de T_m é obtido no ponto médio do intervalo de temperatura em que se dá a desnaturação da dupla hélice (Khandelwal e Bhyravabhotla, 2010). Compostos que se ligam ao DNA causam aumento da T_m por estabilizarem a dupla hélice com suas interações. A diferença entre a T_m de soluções de DNA e de DNA-ligantes dá o valor de ΔT_m . Os valores de ΔT_m para os ligantes 1, 2 e 3 medidos pelos autores estão apresentados na Tabela 1.3 (Wells et al., 2008).

| Ligante | Intervalo ΔT_m (°C) | |
|---|-----------------------------|----------|
| | 0 hora | 72 horas |
|  cumarina | 0,1 | 0,2 |
|  $A = CH_2$ Ligante 1 | 2,9 | 3,9 |
|  $A = (CH_2)_6$ Ligante 2 | 1,1 | 2,9 |
|  $A = (CH_2)_3NHCOCH_2$ Ligante 3 | 0,3 | 1,0 |

Com base nos valores de ΔT_m obtidos (Tabela 1.3), os autores sugerem que os ligantes 1, 2 e 3 formem adutos com o DNA no sulco menor. A formação de ligação covalente entre DNA e antramycin se dá por alquilação do nucleotídeo guanina e este é o mecanismo sugerido pelos autores para tais PBDs híbridas.

O modo de ligação e a possibilidade da formação de adutos pela ligação ao sulco menor do DNA serão estudados *in silico* no presente trabalho, avaliando a formação

de complexos DNA-ligantes com docking molecular. Os experimentos *in silico* de docking feitos neste estudo estão descritos no Capítulo 2 deste trabalho.

1.5 JUSTIFICATIVA

Estudar a ligação entre macromoléculas e ligantes visando ao desenho de candidatos a fármacos exige a compreensão e integração dos conceitos de diferentes áreas do conhecimento. Além dos dados dos experimentos *in vitro* ou *in vivo* dos compostos que se pretende investigar, o conhecimento de estruturas moleculares e das interações (química supramolecular) é fundamental para este tipo de pesquisa, pois fornece as bases para entender mecanismos de ação. O conhecimento bioquímico dos sistemas biológico sobre o qual se pretende atuar também é vital para o estudo de fármacos.

O interesse e a importância das simulações aplicadas à bioquímica, à biologia molecular e ao desenvolvimento de fármacos, têm crescido e permitido a elucidação dos mecanismos em seu nível molecular e atômico proporcionando um entendimento detalhado do sistema estudado. Dessa forma, tem sido possível planejar experimentos e acelerar processos. Considerando que uma diversidade de compostos da família das pirrolbenzodiazepinas são sintetizados na busca de melhores fármacos antitumorais e antibióticos, o presente estudo avaliou a formação dos complexos de PBD conjugadas com cumarinas em diferentes sequências de DNA. A perspectiva é que a abordagem estrutural e computacional empregada possa reunir dados sobre a ligação destes compostos com o DNA que possam ser correlacionados com os dados de atividade existentes na literatura, contribuindo assim, para o desenho de fármacos guiado pela estrutura e por mecanismos de ação.

Os ligantes híbridos PBD-cumarina estudados *in silico* neste trabalho têm dados experimentais *in vitro* descritos por Wells et al. (2008) em CT-DNA. Estas PBDs híbridas têm em sua estrutura a porção cumarina, um composto de baixo custo e síntese bem estabelecida. Estes ligantes apresentam atividade antitumoral em duas linhagens de células estudadas. Além disso, sua fluorescência ao absorver comprimentos de onda

visível torna interessante a investigação de preferência de sequências e modos de ligação visando à aplicação como marcadores. Não há uma descrição do ponto de vista estrutural mostrando como os compostos interagem com o DNA.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Gerais

Entender os mecanismos moleculares da formação de complexos e as interações de ligantes com o DNA, em nível estrutural, utilizando docking molecular, e investigar os modos de ligação e a dependência ou não de sequências do DNA para a formação dos complexos ou adutos.

1.6.2 Específicos

Utilizando esta metodologia, têm-se os objetivos:

- avaliar o modo de ligação de PBDs híbridos com cumarinas no DNA;
- avaliar a preferência dos compostos por sequências específicas de DNA;
- correlacionar com dados experimentais da literatura;
- estabelecer relações estrutura-atividade para os compostos estudados;
- propor mecanismos de ligação de compostos derivados de pirrolbenzodiazepinas híbridas no DNA;
- propor um modelo estrutural para o complexo e/ou aduto DNA-PBD híbrida.

CAPÍTULO 2

Materiais e Métodos

2.1 DOCKING

O docking molecular pode ser definido como a predição da estrutura de complexos receptor-ligante (Brooijmans e Kuntz, 2003) onde há uma busca do melhor ajuste entre duas estruturas tridimensionais. São utilizados programas computacionais para realização dos cálculos, o que torna essa etapa do estudo mais ágil e prática, mas isto é apenas uma das etapas do processo. Uma parte importante deste tipo de simulação são as escolhas dos receptores, a escolha do sitio de ligação, a avaliação das interações intermoleculares e o posicionamento do ligante no sitio. Todas estas etapas são acompanhadas por visualização molecular e envolvem decisões a serem tomadas pelo pesquisador.

Em qualquer programa escolhido para a realização do docking, há duas partes importantes: (i) um **algoritmo** para a busca de graus de liberdade conformacional e de configuração dos ligantes e (ii) uma **função score** ou **função de avaliação** das soluções calculadas (Brooijmans e Kuntz, 2003). A natureza do algoritmo pode ser de três tipos:

- sistemática: baseado em uma grade ou matriz de valores dentro da cavidade de busca para cada grau de liberdade explorado.
- determinística: para gerar cada etapa seguinte, as alterações são determinadas pelo estado inicial, tendo cada etapa seguinte energia menor ou igual a do estado inicial.
- estocástica: alterações randômicas, geralmente mudando um grau de liberdade do sistema por vez. Exemplos de algoritmos de busca estocástica são os baseados em métodos de Monte Carlo e de Algoritmos genéticos. Apenas o último será descrito por ser o algoritmo de busca do programa de docking utilizado neste trabalho, o GOLD 4.1.1 (*Genetic Optimization for Ligand Docking*) (Jones et al., 1997; Jones et al., 1995).

Inicialmente, o docking molecular era utilizado para predizer e reproduzir a estrutura de complexos apenas entre proteínas e ligantes. O sucesso destes estudos iniciais tornou o uso deste método uma ferramenta no descobrimento e otimização de fármacos (Brooijmans e Kuntz, 2003). No BioMat, em 2006, este processo de simulação

computacional começou a ser utilizado para o estudo de docking tendo o DNA como receptor (Reis, 2008), ampliando estudos anteriores realizados com enzimas.

O método adotado foi escolhido visando permitir o estudo da ligação de ligantes no DNA. Isto implica que o planejamento anterior aos cálculos contemple duas partes: a seleção e o preparo das estruturas de DNA que serão os receptores-alvo e a seleção e o preparo das estruturas dos ligantes. Um esquema das etapas do estudo está apresentado na Figura 2.1.

Como mostra o fluxograma, para entender o sistema é fundamental selecionar as estruturas adequadas para o estudo. Para tanto, buscam-se estruturas do receptor disponíveis nos bancos de dados e avaliam-se quais delas permitirão estudar o sistema. Em se tratando do DNA, as buscas foram feitas no *Nucleic Acid DataBase*, o qual direciona o pesquisador ao *Protein Data Bank* para obtenção das estruturas tridimensionais selecionadas. As estruturas de DNA foram selecionadas visando ao estudo do modo de ligação no sulco menor, modo intercalado, ambos simultaneamente (misto), ou bisintercalado. Houve interesse em diferentes sequências para os modos de ligação estudados.

O programa empregado nas simulações foi o GOLD, o qual será discutido a seguir. Os detalhes das etapas apresentadas no esquema da Figura 2.1 são descritos adiante.

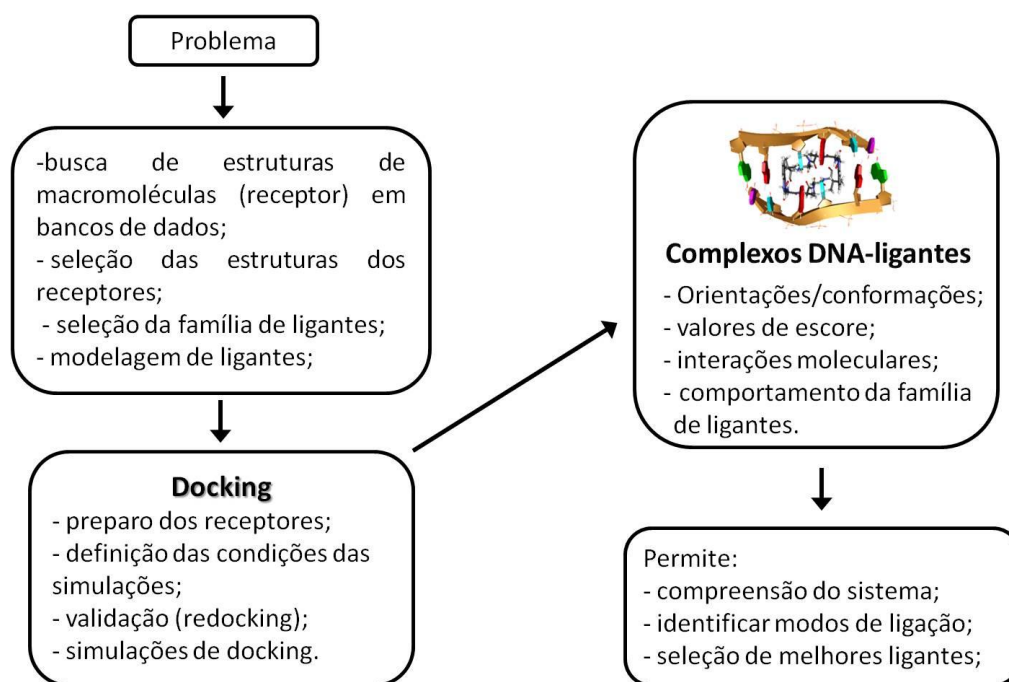


Figura 2.1 Etapas do estudo de docking adotado no presente trabalho.

2.2 ALGORITMO GENÉTICO (AG) E GOLD

Para simular a formação dos complexos foi utilizado o programa GOLD 4.1.1 (Jones et al., 1995 e Jones et al. 1997), o qual utiliza um algoritmo estocástico na busca de possíveis soluções, o algoritmo genético, realizando operações genéticas denominadas mutações, *crossovers* e migrações para obter uma população final de soluções. As soluções calculadas no AG são classificadas por uma função de ajuste (*fitness*) pré-definida. Um esquema do modo de operação do algoritmo genético está apresentado no esquema da Figura 2.2.

O Algoritmo Genético (AG) é um algoritmo estocástico utilizado para solucionar problemas de otimização. Os principais conceitos utilizados em AG são: (1) gene: representa cada parâmetro a ser explorado na otimização; (2) cromossomo: também chamado de indivíduo, é a cadeia de genes que representa uma solução possível para o problema; e (3) população: representa o conjunto de soluções no espaço de busca. Os ligantes podem ser considerados flexíveis no programa GOLD. Na linguagem usada, **solução** representa cada estrutura tridimensional do ligante que o cálculo de docking ajustou no sítio receptor; **orientação** representa a posição no sítio que agrupa uma ou

mais soluções com RMSD (*root mean square deviation*) reduzido e superposição gráfica que permitem afirmar que formam um grupo de soluções equivalentes.



Figura 2.2 Fluxograma da operação de um algoritmo genético (adaptação de Miranda, 2000; Corrêa, 2010).

Um número alto de soluções em um grupo será considerado como de certo peso estatístico que favorece a orientação por eles definida e uma delas será selecionada como representante da orientação. As duas primeiras definições referem-se aos complexos; o termo **conformação** é empregado para a estrutura tridimensional adotada pelo ligante.

A produção das soluções nos algoritmos genéticos consiste no cálculo de um grande número de indivíduos, realizando uma varredura tão extensa quanto necessária do espaço de soluções. Para cada indivíduo gerado, uma aptidão é calculada através de uma função de escore (*fitness*). A função de ajuste GoldScore que foi utilizada no presente estudo é dada pela relação

$$\text{GoldScore E} = S(\text{hb_ext}) + 1,3750S(\text{vdw_ext}) + S(\text{hb_int}) + S(\text{vdw_int})$$

onde,

- $S(\text{hb_ext})$: energia de ligação de hidrogênio entre o receptor e ligante no complexo;
- $S(\text{vdw_ext})$: energia de van der Waals entre o receptor e ligante no complexo;
- $S(\text{vdw_int})$: energia de van der Waals no ligante (intramolecular);
- $S(\text{hb_int})$: energia de ligação de hidrogênio do ligante (intramolecular).

O escore vdw_ext é multiplicado por um fator de 1,375 quando o escore total é calculado. Isto é uma correção empírica. O resultado total é multiplicado por -1. O campo de força (mecânica molecular) utilizado no programa GOLD é o Tripos 5.2 Force Field (Clark, Cramer III & Opdenbosch, 1989). O método utilizado foi validado para a função *GoldScore* e tem se mostrado adequado para os cálculos que o grupo vem desenvolvendo similares aos realizados neste trabalho (Seng et al., 2008; Seng et al., 2010, Reis, 2008).

Em geral, os cálculos de docking estão planejados para obter 10 saídas em cada etapa de cálculo. Porém este parâmetro pode ser alterado para obtenção de mais ou menos saídas. Quando o programa fornece menos saídas que o solicitado é porque o valor de RMSD entre os ligantes é menor que 1,5 Å, de forma que o programa considera que as saídas são iguais (convergência).

Os indivíduos (soluções) são ordenados conforme sua aptidão e os mais aptos são reutilizados pelo algoritmo em operações genéticas para gerar novas populações mais aptas. Esta é uma vantagem do AG, pois possibilita uma grande varredura do espaço de soluções e busca a melhor solução através da recombinação das melhores soluções já encontrada em um ciclo de operações.

As interações avaliadas durante os cálculos são as ligações de hidrogênio e as interações de van der Waals entre os átomos do receptor e do ligante e do ligante consigo mesmo em cada solução calculada. As ligações de hidrogênio são previstas para átomos eletronegativos. As penalidades são impostas para as interações entre os átomos

do próprio ligante. Portanto, a informação sobre a hibridização, o tipo dos átomos e sobre sua conectividade deve estar correta e adequada ao formato Tripos (Clark, Cramer III & Opdenbosch, 1989).

2.3 SELEÇÃO DAS ESTRUTURAS DOS DNAs RECEPTORES

Uma parte importante para a realização dos estudos de docking é a busca de informações estruturais sobre a macromolécula receptora. No presente trabalho, a busca foi realizada utilizando os bancos de dados *Protein Data Bank* (PDB) e PDBsum, os quais são bancos de dados de estruturas tridimensionais de proteínas, ácidos nucleicos e ligantes contidos nos complexos entre macromoléculas e ligantes. Também foi utilizado o *Nucleic Acid Database* (NDB), um banco de informações sobre complexos de ácidos nucleicos. Um ponto crucial no estudo é a existência, no banco de dados, de complexos DNA-ligantes a fim de que sejam utilizados receptores adequados para os ligantes de interesse e para que seja possível proceder a validação dos parâmetros selecionados na realização do docking ao reconstruir um complexo cristalográfico utilizando tais parâmetros. As estruturas selecionadas e utilizadas no estudo estão listadas na Tabela 2.1

| Tabela 2.1 Códigos PDB das estruturas de DNA, suas sequências e o modo de ligação investigado | | | | |
|--|----------------------------------|-------------------|--------------------|-------------------------|
| Código PDB | Permite testar o modo de ligação | Sequência 5' → 3' | Intercalação entre | Referência |
| 1vzk | Sulco menor | CGCGAATTCGCG | - | Mallena et al. (2004) |
| 1g3x | Intercalado/misto | CGCGAATTCGCG | AA (ou TT) | Malinina et al. (2002) |
| 2ky7 | Intercalado/misto | AACAATTGTT | AA (ou TT) | Rettig et al. (2010) |
| 1d67 | Intercalado/misto | TGATCA | GT (ou CA) | Gallois et al. (1993) |
| 1k9g | Intercalado/misto | CCTAGG | GG (ou CC) | Lisgarten et al. (2002) |
| 2rou | Intercalado/misto | GCGCGG | GC (ou CG) | Wang et al. (2008) |
| 2da8 | Bisintercalado/misto | GATATC | AT (ou TA) | Address et al. (1993) |

Os complexos DNA-ligantes (Tabela 2.1) depositados no PDB foram obtidos por difração de raios X (1vzk, 1g3x, 1d67, 1k9g) ou RMN (2ky7, 2rou, 2da8).

2.4 OBTENÇÃO E PREPARO DA ESTRUTURA DOS LIGANTES

Os ligantes estudados neste trabalho têm suas atividades contra células tumorais de câncer de ovário, câncer renal e melanoma e sua afinidade pelo DNA (estudos de desnaturação térmica) relatadas por Wells et al. (2008). O esquema da estrutura geral dos compostos estudados está apresentado na Figura 2.3.

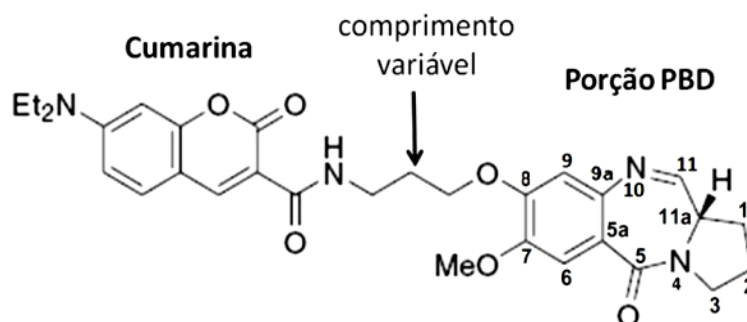
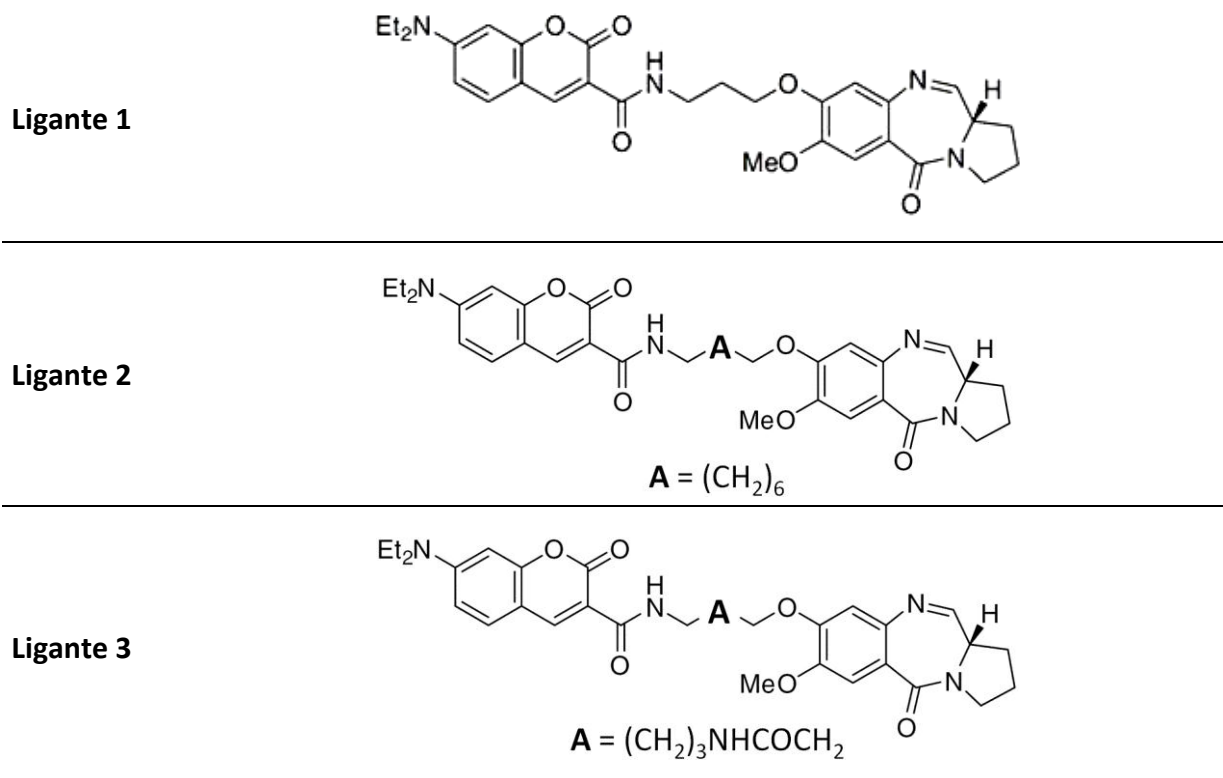


Figura 2.3 PBDs ligados a uma porção cumarina através de uma cadeia alifática de comprimento variável na posição C8 (adaptada de Wells et al., 2008).

Os compostos estudados estão apresentados na Tabela 2.2. Suas estruturas tridimensionais foram obtidas por modelagem molecular, partindo-se de estruturas cristalográficas das porções cíclicas, cumarina e pirrolbenzodiazepinas. A porção cumarina para o início da modelagem foi obtida do código **coumarin120** do banco de dados *SuperHapten* (<http://bioinformatics.charite.de/superhapten/>). A estrutura PBD inicial foi obtida dos arquivos eletrônicos da *International Union of Crystallography*, código referência **xu2391** (Zhao et al., 2008). A junção das porções de cumarinas e pirrolbenzodiazepinas e a adição de substituintes foram realizadas por modelagem molecular de pequenas moléculas, com o programa HyperChem 6.0. As geometrias foram calculadas com a função de mecânica molecular MM+ deste programa e método de otimização *Steepest Descent* com gradiente de 0,01 kcal/mol. Cálculos semi-empíricos adicionais com função PM6 ainda foram feitos sobre a estrutura dos compostos utilizando MOPAC2009 (Stewart, 2007; MOPAC2009).

Tabela 2.2 Esquema da estrutura dos ligantes estudados (adaptado de Wells et al., 2008)

É importante ressaltar que não há dados sobre a estrutura tridimensional para os complexos formados entre estes ligantes e o DNA, apenas dados provenientes de outras técnicas e relatados no trabalho de Wells e colaboradores (2008).

2.5 VALIDAÇÃO DOS PARÂMETROS DO DOCKING OU REDOCKING

No início do trabalho de docking, é necessário verificar se todas as escolhas feitas (a macromolécula, o estado da macromolécula, o sítio de ligação e o raio R utilizado nos cálculos para construir a esfera do espaço de busca) são adequadas.

Após a seleção das estruturas de complexos cristalográficos no *Protein Data Bank* contendo o receptor desejado, são separadas as coordenadas do receptor e do ligante e, com cálculos de docking, trabalha-se na reconstrução do complexo, procedimento esse denominado **redocking**. Caso o procedimento tenha parâmetros adequados, o complexo virtual obtido dos cálculos assemelha-se ao complexo cristalográfico. Caso isso não ocorra, são necessários ajustes nos parâmetros escolhidos pelo pesquisador para melhorar a simulação. Uma vez que a semelhança é alcançada,

considera-se que o procedimento está validado, com os parâmetros de ajuste selecionados e que serão utilizados nos cálculos subsequentes (Figura 2.3), e os resultados são comparados ao complexo cristalográfico.

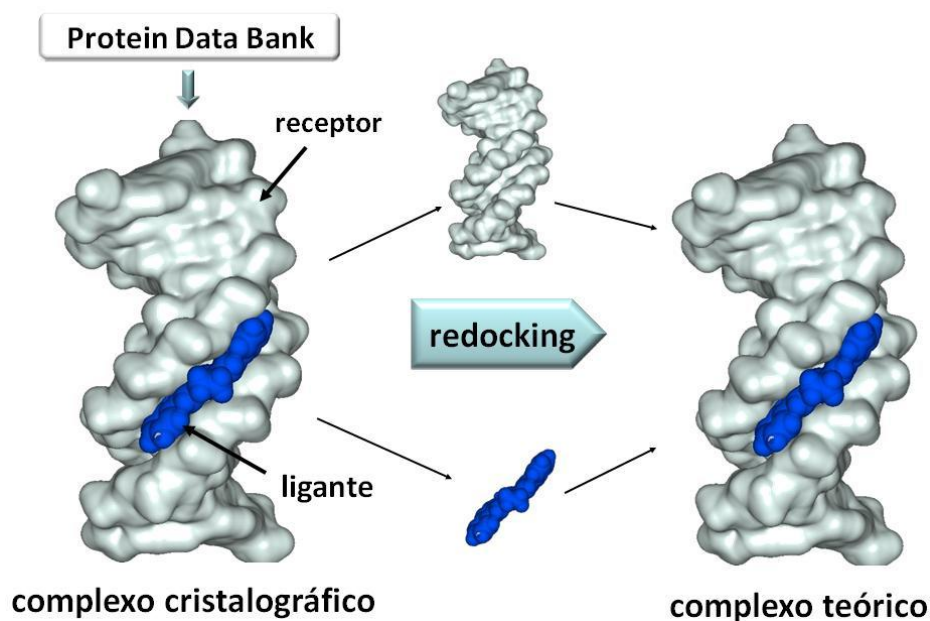


Figura 2.4 Esquema apresentando o fundamento do redocking. O processo inicia-se com um complexo cristalográfico. Com as estruturas tridimensionais das moléculas isoladas, reconstrói-se o complexo computacionalmente e procede-se à comparação com o complexo cristalográfico.

Os resultados obtidos para o redocking com cada um dos receptores (Tabela 2.1) estão apresentados no Anexo 3.1, página 101.

2.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS DOS CÁLCULOS DE DOCKING

A análise dos resultados obtidos dos cálculos de docking é feita por visualização molecular. Observa-se em primeiro lugar se ocorre um padrão de orientações dos compostos nos sítios de ligação. A partir do padrão, é feita a escolha do ligante com melhor orientação associado ao melhor escore para o padrão.

O passo seguinte envolve a inspeção das interações intermoleculares, avaliando-se as distâncias de ligação entre os átomos do ligante e do receptor, os ângulos das ligações e o tipo de interação. As interações envolvem interações eletrostáticas, de van der Waals, ligações de hidrogênio e interações π .

A análise dos complexos foi feita com programas de visualização molecular, principalmente o Accelrys Discovery Studio Visualizer™ 2.0.

2.7 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DOS CÁLCULOS DE DOCKING

Visando comparar os valores de escore para todos os DNAs estudados, cada resultado de escore de docking foi comparado ao escore do redocking no respectivo DNA. Para isso, foi estabelecido o delta escore (ΔE), a diferença entre o escore do redocking e do docking, calculado pela equação:

$$\Delta E = -(E_{\text{redocking}} - E_{\text{docking}})$$

As três situações possíveis são:

$\Delta E = 0$, o que significa que o ligante se acomoda no sítio receptor tão bem quanto o ligante original;

$\Delta E < 0$, nesse caso a formação do complexo é menos favorável que a do ligante original;

$\Delta E > 0$, nesse caso a formação do complexo é mais favorável que a do ligante original.

O valor da diferença entre os escores do redocking e do docking é multiplicado por -1 para facilitar a análise. Assim, ΔE positivos são verificados para ligantes com escores melhores que o redocking.

CAPÍTULO 3

Resultados e Discussão

Neste Capítulo estão descritos os experimentos realizados, os resultados obtidos e a discussão sobre os mesmos. O estudo foi realizado com os DNA-receptores listados na Tabela 2.1 e com os ligantes 1, 2 e 3 (Tabela 2.2). Um panorama dos estudos realizados é apresentado na forma de fluxograma na Figura 3.1, que foi dividido em três linhas principais, conforme será descrito a seguir.

Na primeira linha, os primeiros três experimentos tiveram como objetivo principal determinar o modo de ligação da família de compostos pirrolbenzodiazepinas (PBD) híbridas com cumarinas no DNA. Foram avaliados a ligação do composto ao sulco menor, a intercalação e a bis-intercalação. Os procedimentos adotados em relação às simulações de docking para este tipo de propósito foram utilizados com sucesso por Caracelli e colaboradores (Reis, 2008; Seng et al., 2008, Seng et al., 2010). Os experimentos estão apresentados de forma resumida a seguir.

Experimento 1 Foram feitos estudos de docking com os DNA-receptores 1vzk e 1g3x, que apresentam a mesma sequência, e que permite avaliar a ligação em dois modos distintos, sulco menor e intercalado.

Experimento 2 Os estudos de docking com a estrutura 2da8 permitiram avaliar modo de ligação bis-intercalado.

Experimento 3 Os cálculos de docking com a estrutura 2ky7 foram feitos com o propósito de simular a formação de aduto no sulco menor ou de complexos envolvendo intercalação e ligação ao sulco menor concomitantemente.

Na segunda linha, a ideia central foi a de estudar a influência da constituição do ligante na sua associação com o DNA. A terceira questão abordada neste trabalho foi a influência das sequências de DNA para a formação do complexo desta família de ligantes. Os procedimentos para avaliar a influência de sequências na formação de complexos foram utilizados anteriormente (Seng et al., 2010) no BioMat, em concordância com dados experimentais e, por esse motivo, foram aplicados também

neste trabalho. Alguns experimentos serviram aos dois propósitos conforme pode ser observado no fluxograma (Figura 3.1).

O ligante estudado pode ser considerado como formado de três partes distintas: a pirrolbenzodiazepina, o espaçador e a cumarina. Assim, cada parte do composto foi estudada separadamente e foi avaliado seu peso na orientação e conformação do ligante completo em relação ao DNA. O experimento 4.0 serviu como controle, pois foi feito o mesmo tipo de estudo para o ligante do complexo 2ky7 (obtido do PDB). O ligante de 2ky7 é composto de uma porção PBD, um espaçador e uma porção naftalimida. Os outros experimentos foram feitos com os compostos PBD-cumarínicos.

Experimento 4.0 Para avaliar a influência da porção funcional cumarina, os cálculos de docking foram feitos utilizando a estrutura 2ky7, substituindo a porção naftalimida de seu ligante original pela cumarina, e substituindo a cumarina do ligante 1 pela porção naftalimida.

Experimento 4.1 Neste caso os cálculos de docking tiveram como ligantes as porções PBD e cumarina separadamente e os DNA-receptores 1g3x, 1d67, 1k9g, 2rou e 2da8 com a finalidade de avaliar a preferência por diferentes sequências de bases, quando a ligação ocorre no modo intercalado.

Experimento 4.2 A fim de avaliar o efeito da adição do espaçador, foi feito docking nas mesmas estruturas de DNA do experimento anterior (1g3x, 1d67, 1k9g, 2rou e 2da8) com as porções funcionais e os espaçadores:

- (I) PBD + espaçador 1, PBD + espaçador 2 e PBD + espaçador 3; e
- (II) cumarina + espaçador 1, cumarina + espaçador 2 e cumarina + espaçador 3.

Experimento 4.3 Foram feitos cálculos de docking similares aos anteriores, com os mesmos receptores dos experimentos anteriores 1g3x, 1d67, 1k9g, 2rou e 2da8 e com os ligantes 1, 2 e 3 completos.

O experimento 5.0 serviu de controle, e os resultados dos Experimentos 4.1 e 4.3, puderam mostrar a preferência das porções dos compostos estudados neste trabalho por determinadas sequências de DNA.

Experimento 5.0

Foi utilizado o ligante daunomicina, um intercalador conhecido, nos receptores intercaladores 1g3x, 1d67, 1k9g, 2rou e 2da8, para testar a preferência de bases para intercalação. A estrutura cristalográfica do ligante foi extraída do PDB, entrada de código 427d (Schuerman e Van Meervelt, 2000), que contém um complexo DNA-daunomicina.

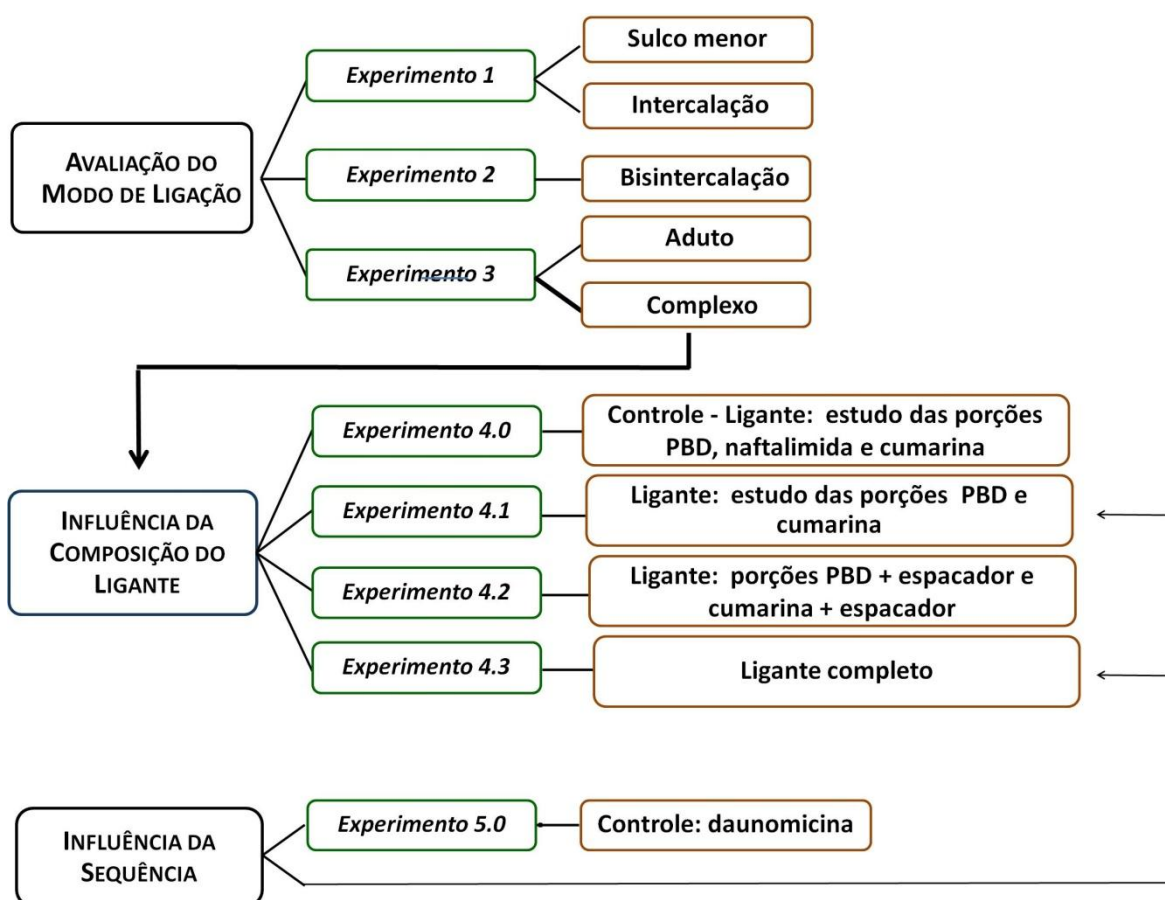


Figura 3.1 Fluxograma de trabalho apresentando os experimentos realizados ao longo do estudo.

Os resultados dos experimentos são detalhados a seguir. Em todos os casos, para cada DNA-receptor utilizado, para que os processos fossem validados, foram feitos os redockings (Tabela 3.1), conforme descrito no Anexo 3.1, antes que fossem feitos os estudos docking para os ligantes 1, 2 e 3.

Tabela 3.1 Escores do redocking para os DNAs utilizados como alvo no estudo (kcal/mol)

| Código PDB | Entre as bases | Sequência 5' → 3' | Escore do redocking |
|------------|----------------|-------------------|---------------------|
| 1vzk | - | CGCGAATTCGCG | 75,6 |
| 1g3x | AA | CGCGAATTCGCG | 80,1 |
| 1d67 | AC | TGATCA | 73,5 |
| 2da8 | AT | GATATC | 123,3 |
| 2ky7 | AA | AACAATTGTT | 95,23 |
| 1k9g | GG | CCTCGG | 43,2 |
| 2rou | GC | GCGCGG | 41,6 |

3.1 AVALIAÇÃO DOS MODOS DE LIGAÇÃO

Uma série de experimentos *in silico* foi feita para avaliar o possível modo de ligação ao DNA. Os modos de ligação inicialmente avaliados foram ligação ao sulco menor e intercalação separadamente, os modos mais comuns de interação de DNA-pequenas moléculas. Outros modos também foram estudados como o bis-intercalado e o modo que será chamado de misto, no qual o ligante se acomoda no sulco menor e ao mesmo tempo intercala entre as bases.

Em todos os casos foi feito o redocking, que mostra que o processo de simulação de docking consegue recriar o complexo obtido do banco de dados e ao mesmo tempo serve de controle para saber se a acomodação de outro ligante é igual, melhor ou pior do que a do complexo original, e os resultados se encontram no Anexo 3.1

3.1.1 Experimento 1: sulco menor ou intercalação

Para que fosse possível avaliar os modos de ligação sulco ou intercalado, foram estudados o comportamento dos ligantes nos receptores de mesma sequência, mas com diferentes possibilidades de modo de ligação. O receptor 1vzk permite avaliar se o modo preferencial de ligação ocorre no sulco menor, e o receptor 1g3x, se o modo preferencial é o intercalado.

Na Tabela 3.2, estão os escores obtidos dos cálculos de docking e da análise por visualização molecular para as melhores poses¹ de cada ligante em cada receptor. As interações e as figuras destes complexos estão no Anexo 3.2. Observa-se que os valores para os ligantes em 1vzk e em 1g3x são valores da mesma ordem, com uma diferença mais notável apenas para o ligante 1. Em outros estudos, a diferença de escores tem permitido determinar claramente o modo de ligação (sulco ou intercalação) sem ambiguidade. Por exemplo, os estudos de docking descritos em Seng et al., 2008 mostram uma diferença de cerca de 15 kcal/mol para um ligante nas mesmas duas sequências, indicando uma preferência dos ligantes formarem complexos com o DNA no modo intercalado, e que foi corroborada por dados experimentais. No caso presente, estas diferenças são bem menores para os ligantes 2 e 3, e mais significativas para o ligante 1. Também a análise por visualização molecular não permitiu uma escolha.

| Ligante | Modo de ligação | Escore (kcal/mol) | Diferença absoluta de escores entre os escores (kcal/mol) |
|---------|--------------------|-------------------|---|
| 1 | Sulco menor (1vzk) | 77,8 | 8,8 |
| | Intercalado (1g3x) | 69,0 | |
| 2 | Sulco menor (1vzk) | 73,6 | 1,1 |
| | Intercalado (1g3x) | 72,5 | |
| 3 | Sulco menor (1vzk) | 70,2 | 2,8 |
| | Intercalado (1g3x) | 73,0 | |

A pose obtida para os ligantes nos complexos 1vzk e 1g3x está exemplificada para o ligante 1 na Figura 3.2. As interações entre os ligantes e os DNA-receptores estão listadas nas tabelas e figuras do Anexo 3.2.

¹ Pose, orientação de um ligante em relação a um dado receptor, com uma dada conformação (Perola et al., 2002).

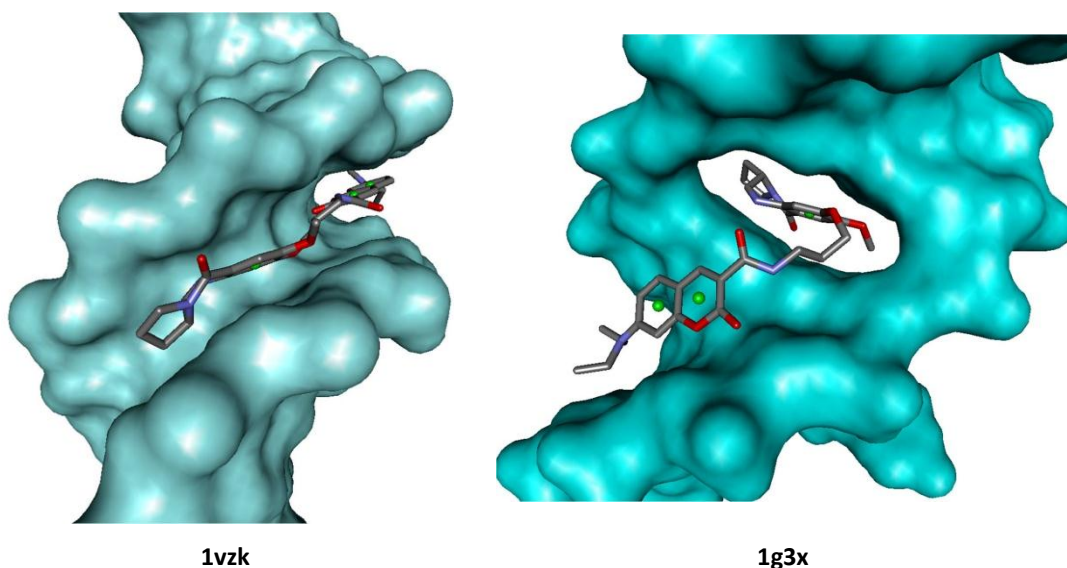


Figura 3.2 Complexos modelados com as estruturas 1vzk e 1g3x.

Os resultados deste experimento não permitiram identificar preferência por intercalação ou por ligação ao sulco menor e motivaram a investigação de outros modos de ligação.

3.1.2 Experimento 2: avaliação do modo de ligação bis-intercalado

Outros modos de ligação são conhecidos para o DNA. Um destes modos de ligação é a bis-intercalação, no qual o ligante intercala duas porções de sua estrutura entre as bases em regiões diferentes da dupla hélice. Estes compostos apresentam duas porções contendo anéis fusionados.

Os ligantes 1, 2 e 3 aqui estudados possuem duas porções cíclicas, com anéis fusionados, a porção PBD e a porção cumarina; portanto, buscou-se avaliar se estas duas porções poderiam intercalar simultaneamente no DNA, adotando assim o modo de ligação bis-intercalado.

Para avaliar a bis-intercalação para os ligantes 1, 2 e 3, a estrutura 2da8 (Address, Sinsheimer e Feigon, 1993) foi selecionada e contém o ligante 2-carboxiquinoxalina que possui dois conjuntos de anéis, ligando-se ao DNA por duas intercalações.

Os escores para os ligantes 1, 2 e 3 no receptor 2da8 estão apresentados na Tabela 3.3. A sobreposição do resultado do redocking com a estrutura inicial do ligante está apresentada na Figura 3.1a.2 do Anexo 3.1.

Apesar de a estrutura do receptor permitir o estudo do modo de ligação bis-intercalado, os cálculos de docking produziram saídas com os ligantes 1 e 2 apresentando apenas uma intercalação e ocupação do sulco menor simultaneamente (Figura 3.3A e B).

| Ligante | Escore do redocking |
|---------|---------------------|
| 1 | 67,6 |
| 2 | 73,1 |
| 3 | 76,6 |

Na estrutura de DNA com ligantes bis-intercalados, o sulco menor torna-se mais amplo, como é verificado na estrutura 2da8. Devido a isso, a cadeia espaçadora encontra maior liberdade de posicionamento no sulco menor, o que não proporcionou um padrão de ligação para os resultados dos cálculos de docking para estes ligantes. As interações destes complexos estão apresentadas nas Tabelas 3.3a.1, 3.3a.2 e 3.3a.3 e nas Figuras 3.3a.1, 3.3a.2 e 3.3a.3 do Anexo 3.3.

Apenas o ligante 3 apresentou o modo bis-intercalado (Figura 3.3C), no entanto, sem uma diferença significativa de escore dos outros ligantes para sugerir que este seja o modo de ligação envolvido. Mesmo o ligante 2, com tamanho semelhante ao de 3, realiza apenas uma intercalação. O anel cumarínico apresenta-se posicionado no sulco menor em dois dos complexos (ligantes 1 e 2).

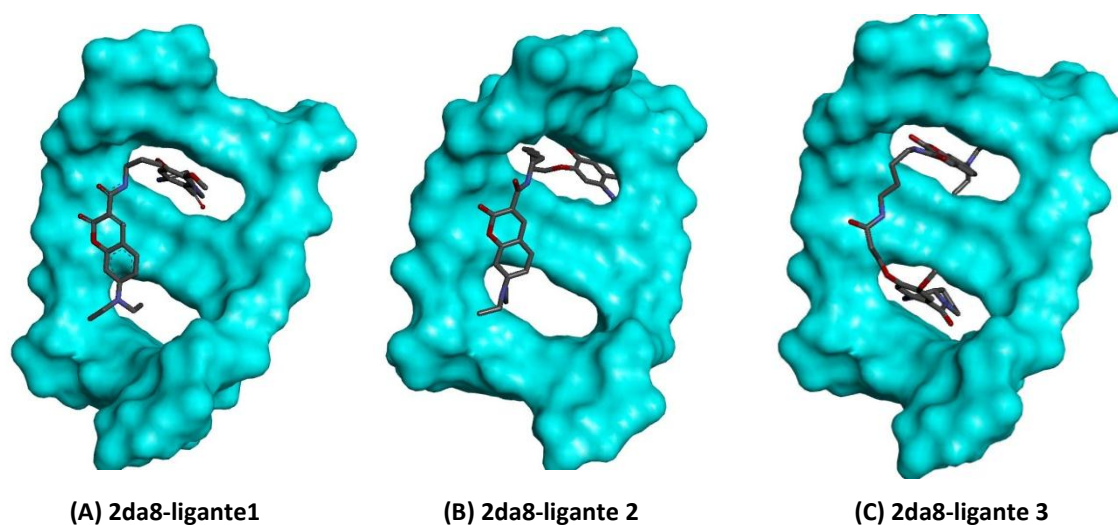


Figura 3.3 Complexos com os ligantes 1, 2 e 3 na estrutura 2da8.

Com os resultados obtidos dos cálculos e a visualização molecular, pode-se sugerir que o modo de ligação bisintercalado não deve estar envolvido na ligação destes compostos ao DNA.

3.1.3 Experimento 3: modo de ligação misto; formação de aduto no sulco menor ou de complexos.

A ligação por meio de uma intercalação entre as bases e ocupação do sulco menor simultaneamente também é um mecanismo descrito para pequenas moléculas que se ligam ao DNA. Como abordado no Capítulo 1 deste trabalho, este modelo tem sido recentemente elucidado, mas nenhum termo foi empregado para descrevê-lo. Aqui, o termo **modo de ligação misto** será empregado para se referir ao mesmo. Ligantes também podem formar complexos covalentes com o DNA, e nesse caso são adutos. O Experimento 3 foi realizado a fim avaliar a ligação no modo misto associada com a ocorrência da formação de aduto no sulco menor ou de formação de complexo.

A estrutura de DNA utilizada neste experimento foi a de código 2ky7 (Rettig et al., 2010), escolhida por conter uma PBD conjugada com naftalimida e ligada ao DNA no modo misto. Nesta estrutura, o ligante faz uma ligação irreversível com o DNA no sulco menor, ocorrendo a formação de um aduto com a guanina G8. Por isso, esta estrutura também é adequada para avaliação da formação de aduto no sulco menor.

Os escores dos complexos e dos adutos com o receptor 2ky7 e os ligantes 1, 2 e 3 estão apresentados na Tabela 3.4. No caso de formação dos complexos a porção PBD ficou intercalada entre as bases, enquanto que no caso de adutos, a PBD permanece no sulco menor pela imposição da formação de ligação covalente com a G8. As interações dos complexos deste experimento estão apresentadas nas tabelas e figuras do Anexo 3.4, página 114.

| Ligante | Escore | | Diferença absoluta (complexo) – (aduto) |
|---------|-----------------------------|-----------------------------|--|
| | PBD intercalada complexo | PBD no sulco menor aduto | |
| 1 | 82,3 | 78,1 | 4,2 |
| 2 | 93,0 | 92,5 | 0,5 |
| 3 | 94,9 | 93,9 | 1,0 |

Os resultados e a análise dos resultados obtidos para os ligantes 1, 2 e 3 estão apresentados a seguir.

Ligante 1 – Formação de Aduto: o ligante se posiciona no sulco menor (Figura 3.4A). Não foi observada a intercalação de nenhuma porção do ligante 1.

Ligante 1 – Formação de Complexo: a porção PBD ficou intercalada entre bases AA, com o espaçador e a cumarina ocupando o sulco menor (Figura 3.4B).

Comparativamente, o escore do complexo e do aduto para o ligante 1 diferem em apenas 4,2 kcal/mol, com uma pequena preferência pela formação do complexo. Avaliando as interações para os dois casos, esta diferença no escore é atribuída à ocorrência de interações π na intercalação da porção PBD e na porção cumarina, que se orienta perpendicularmente às bases do sulco menor (Tabelas e Figuras 3.4a.1 e 3.4a.2 do Anexo 3.4). A cumarina também apresenta dois oxigênios aceptores de ligação de hidrogênio e grupos CH que fazem interações C-H...O com os açúcares apenas quando está ligada no sulco menor, ou seja, no complexo.

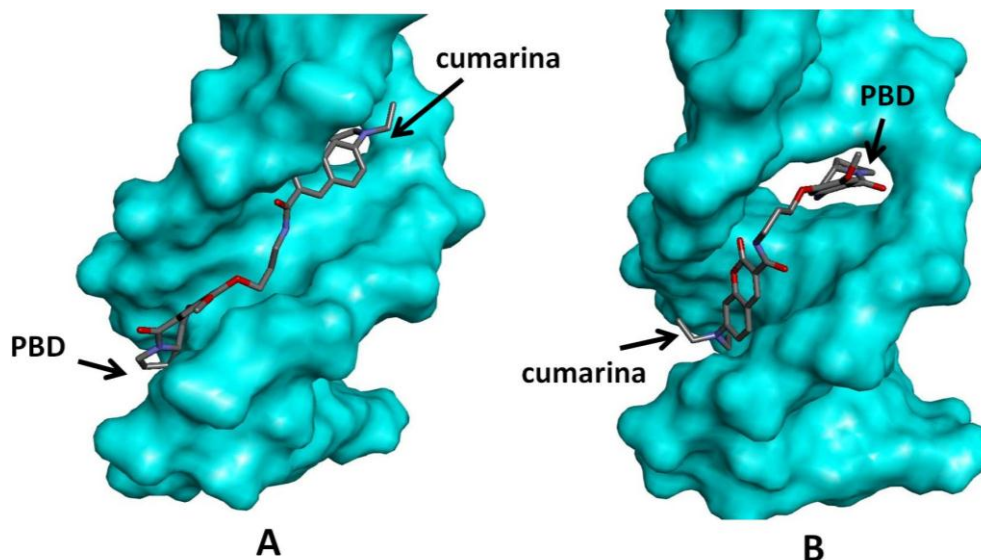


Figura 3.4 Pose obtida para o ligante 1 na 2ky7: (A) aduto e (B) complexo.

Ligante 2 – Formação de Aduto: a porção PBD ocupa o sulco menor (Figura 3.5A). O posicionamento do ligante 2 difere do ligante 1, pois a porção cumarina apresentou-se intercalada. A intercalação da cumarina neste complexo foi possibilitada pelo tamanho do espaçador, o qual contém 11 átomos no ligante 2 e apenas 6 átomos no ligante 1.

Ligante 2 – Formação de Complexo: neste caso a porção PBD intercala e a cumarina ocupa o sulco menor (Figura 3.5B).

Somente a diferença entre os escores não permite sugerir preferência entre aduto e complexo; porém, novamente a cumarina realiza maior número de ligações de hidrogênio C-H...O no sulco menor e a porção PBD faz uma interação π com as adeninas na intercalação (Tabelas e Figuras 3.4a.3 e 3.4a.4 do Anexo 3.4).

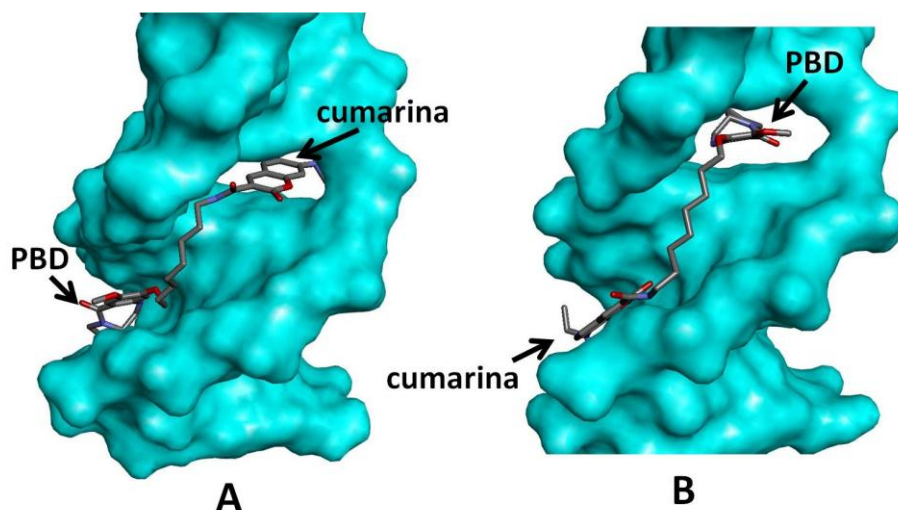


Figura 3.5 Pose obtida para o ligante 2 na 2ky7: (A) aduto e (B) complexo.

Ligante 3 – Formação de Aduto: a porção PBD ocupa o sulco menor e a porção cumarina intercala (Figura 3.6A), de maneira semelhante ao ligante 2. O ligante 3 também possui um espaçador longo, com 11 átomos, mas de composição diferente.

Ligante 3 – Formação de Complexo: a porção PBD intercalada e a cumarina ocupa o sulco menor (Figura 3.6B).

O ligante 3 apresenta interações semelhantes às do ligante 2 no aduto e no complexo com 2ky7. Portanto, a cumarina apresenta mais ligações de hidrogênio quando ocupa o sulco menor e a porção PBD apresenta interações π apenas na formação do complexo.

Apesar dos escores sozinhos não permitirem a distinção de preferência pela formação do aduto ou do complexo no modo de ligação misto, as análises de interações entre anéis com a porção PBD e as ligações de hidrogênio realizadas pela porção cumarina verificadas na formação do complexo devem contribuir para preferência pelo modo misto em que a porção PBD intercala entre as bases e a cumarina ocupa o sulco menor (Tabelas e Figuras 3.4a.5 e 3.4a.6 do Anexo 3.4).

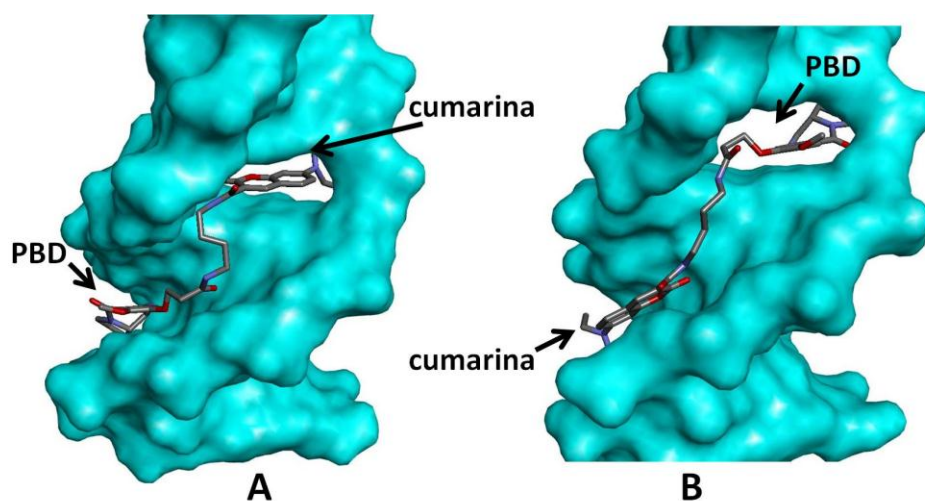


Figura 3.6 Pose obtida para o ligante 3 na 2ky7: (A) aduto e (B) complexo.

Os resultados aqui obtidos unidos aos do Experimento 1 parecem indicar que a ligação no DNA pelo *modo misto* seja o mecanismo envolvido na ligação destes compostos à dupla hélice.

Nos resultados do Experimento 2, o modo bis-intercalado mostrou-se improvável, com os ligantes 1 e 2 adotando o modo misto, mesmo havendo possibilidade de bis-intercalação. Portanto, somando os resultados do Experimento 3 aos resultados dos dois experimentos anteriores, sugere-se que o modo de ligação misto seja o modo envolvido na ligação destes ligantes no DNA.

3.2 INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DO LIGANTE PARA O MODO DE LIGAÇÃO.

Uma vez que na Seção 3.1 concluiu-se que o *modo misto* é o modo preferencial de ligação dos ligantes 1, 2 e 3 ao DNA, com a formação de complexo com o receptor, novos experimentos foram planejados para avaliar a influência da composição da PBD híbrida na ligação ao DNA.

No Experimento 4.1, foram estudadas as porções cumarina e PBD separadamente; em seguida, no Experimento 4.2 foi avaliada a influência da adição do

espaçador, considerando a porção PBD ligada aos diferentes espaçadores e depois a cumarina. Os resultados foram comparados com o Experimento 4.3 para os ligantes completos. Os detalhes são apresentados em cada etapa.

A estrutura 2ky7 foi considerada como um modelo e foram feitos experimentos tidos como controle (Experimento 4.0), para avaliar o comportamento de PBDs híbridas com composições distintas.

3.2.1 Experimento 4.1: Influência das porções cumarina e PBD para o modo de ligação

Os ligantes estudados são compostos que apresentam em comum duas porções funcionais contendo anéis – a pirrolbenzodiazepina (PBD) e a cumarina – conectadas por uma cadeia espaçadora que varia em tamanho (Tabela 2.2).

A fim de avaliar a contribuição destas partes para o modo de ligação, foram feitas simulações com as porções PBD e cumarina separadamente. Os resultados da etapa de simulações com a porção PBD separadamente estão apresentados a seguir e as interações e os complexos estão nas Tabelas 3.5a.1 a 5.5a.5 e Figuras 3.5a.1 a 5.5a.5 do Anexo 3.5.

Foram considerados os valores de ΔE , uma comparação com o redocking, conforme descrito na Seção 2.7. Na Figura 3.7, estão apresentados os valores de ΔE para cada DNA-receptor, com a porção PBD. As condições para a porção PBD nos receptores 1k9g e 2rou são mais favoráveis que no outros casos.

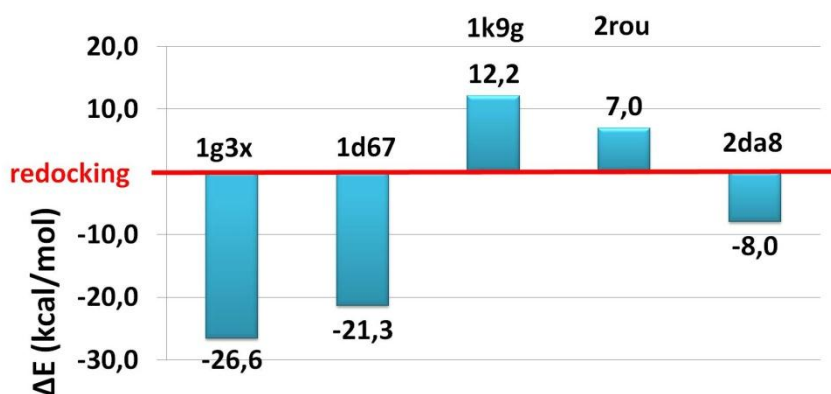


Figura 3.7 Valores de ΔE para a porção PBD separada. A linha vermelha no ponto zero representa o escore do redocking.

Na Figura 3.8 observa-se o complexo com 1k9g; as interações π verificadas na intercalação envolvem os dois anéis das guaninas adjacentes. Também foi verificada proximidade entre o anel A da porção PBD e as guaninas G5 e G6. Quando as bases da intercalação eram adeninas, não foram verificadas interações com os dois anéis das bases simultaneamente. Estas observações podem estar relacionadas com a preferência de sequência verificada. As interações com todas as estruturas de DNA testadas estão apresentadas nas Tabelas 3.5a.1 a 5.5a.5 e Figuras 3.5a.1 a 5.5a.5 do Anexo 3.5.

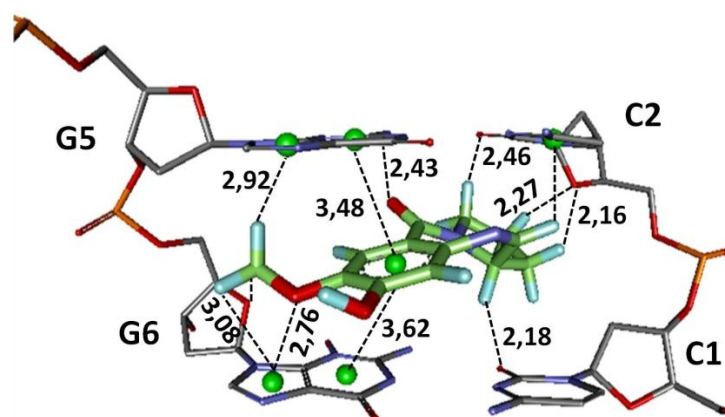


Figura 3.8 Interações da porção PBD com os nucleotídeos C1, C2, G5 e G6 no modo de ligação intercalado (1k9g). Distâncias em Å.

Experimentos análogos foram realizados para a porção cumarina separadamente. Os valores de ΔE em cada simulação estão apresentados no gráfico da

Figura 3.9. As interações com as estruturas de DNA testadas estão apresentadas nas Tabelas 3.5a.6 a 5.5a.10 e Figuras 3.5a.6 a 5.5a.10 do Anexo 3.5.

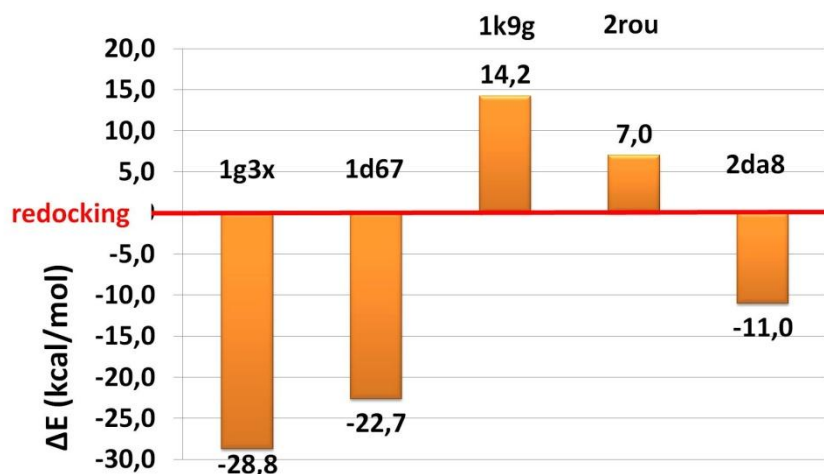


Figura 3.9 Gráfico de barras dos valores de ΔE para a porção cumarina isolada.

Na Figura 3.10, pode ser percebido que, da mesma forma que para a porção PBD, os receptores onde houve melhores resultados para a intercalação foram 1k9g e 2rou.

Quando a intercalação ocorreu entre bases AA, na estrutura 1g3x, o complexo apresentou ΔE de -28,8 kcal/mol. As intercalações entre bases AC e AT (1d67 e 2da8) também apresentaram valores desta ordem. Estes foram os complexos menos favoráveis para intercalação.

Já nos complexos com intercalação entre GG e GC, os ΔE obtidos são positivos, da mesma ordem dos complexos com a porção PBD, sendo ligeiramente mais alto em 1k9g e idêntico em 2rou. As interações da cumarina em 1k9g estão apresentadas na Figura 3.10.

A centróide do anel aromático da cumarina está mais distante das guaninas quando comparado ao complexo com a porção PBD. Apesar de escores parecidos, a maior proximidade dos anéis da guanina poderia indicar preferência pela porção PBD na intercalação.

Nos dois casos avaliados, PBD e cumarina, a formação de complexos parece ser mais favorável com os receptores, 1k9g e 2rou, mas com uma preferência por 1k9g onde a intercalação ocorre entre as bases GG enquanto que para 2rou, ocorre entre bases GC.

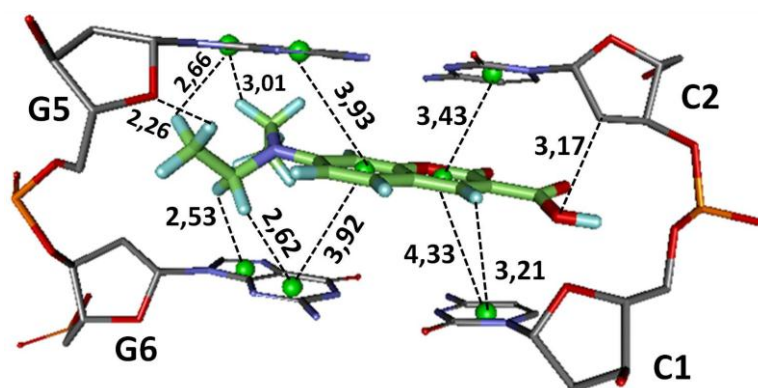


Figura 3.10 Interações, com distâncias em Å, da porção cumarina com os nucleotídeos C1, C2, G5 e G6 no modo de ligação intercalado (1k9g).

3.2.2 Experimento 4.2: Porção PBD mais espaçadores e porção cumarina mais espaçadores

Uma das questões que motivou o Experimento 4.1, descrito na seção anterior, foi a de descobrir se há uma preferência pela parte do ligante que vai ocupar a intercalação, a cumarina ou PBD. Com os resultados não foi possível apontar uma preferência para a porção que intercala, assim o Experimento 4.2 foi realizado para verificar essa possibilidade. Neste experimentos, foram testadas as porções PBD e cumarina somadas aos espaçadores. As interações dos complexos simulados nesta etapa estão apresentadas nas Tabelas e Figuras do Anexo 3.6.

Comparando os escores dos complexos obtidos com as duas porções cíclicas, para os três espaçadores, os valores mais altos de ΔE foram verificados com a porção PBD intercalada, como pode ser observado nas Figuras 3.11, 3.12 e 3.13. Em todos os casos a preferência ocorre pelos mesmos receptores 1k9g e 2rou, como já havia ocorrido no Experimento 4.1. A presença da cadeia espaçadora contribui para elevar ligeiramente o

escore dos complexos e permite apontar com clareza a preferência pela intercalação da porção PBD em relação à cumarina.

O posicionamento obtido envolve a intercalação da porção cíclica, tanto para o teste com PBD como para os testes com a cumarina. O espaçador, em todos os casos, tende a se aproximar do corrimão de pentose fosfato; uma liberdade maior de posicionamento do espaçador foi verificada, o que pode ser atribuído à ausência de uma segunda porção funcional que defina seu posicionamento no sulco menor.

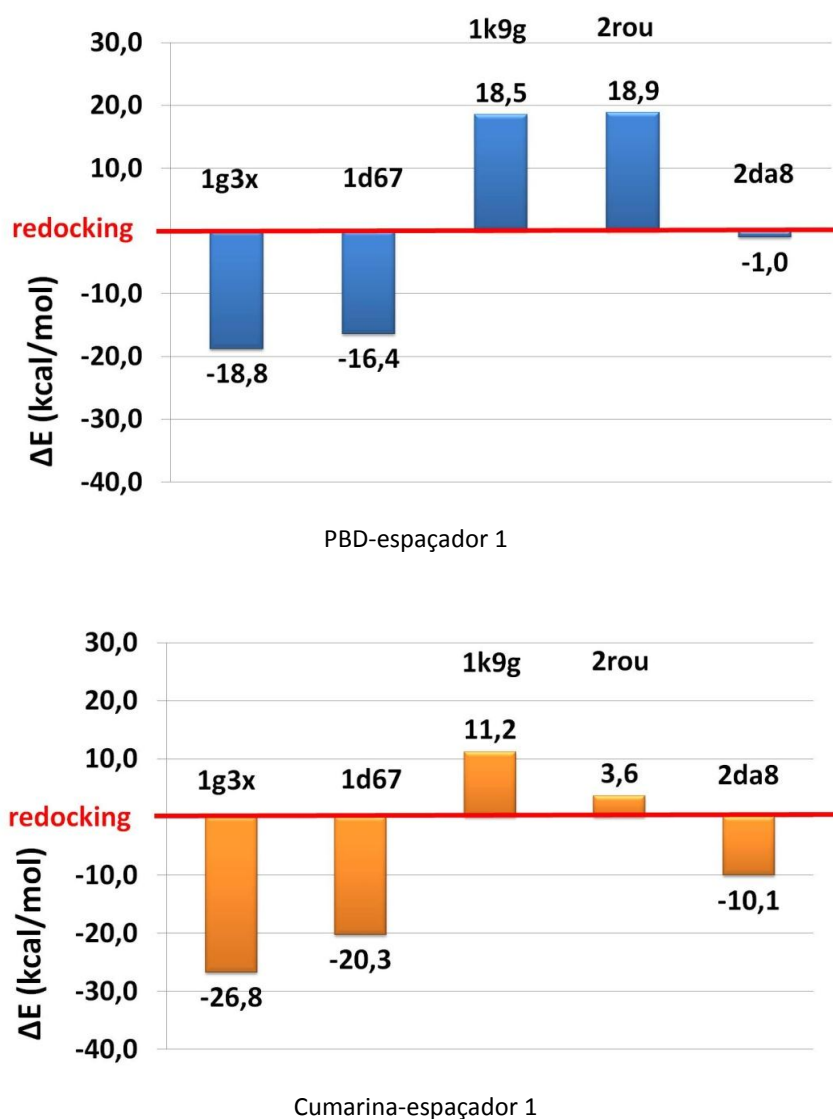


Figura 3.11 Valores de ΔE para as porções PBD e cumarina com o espaçador 1.

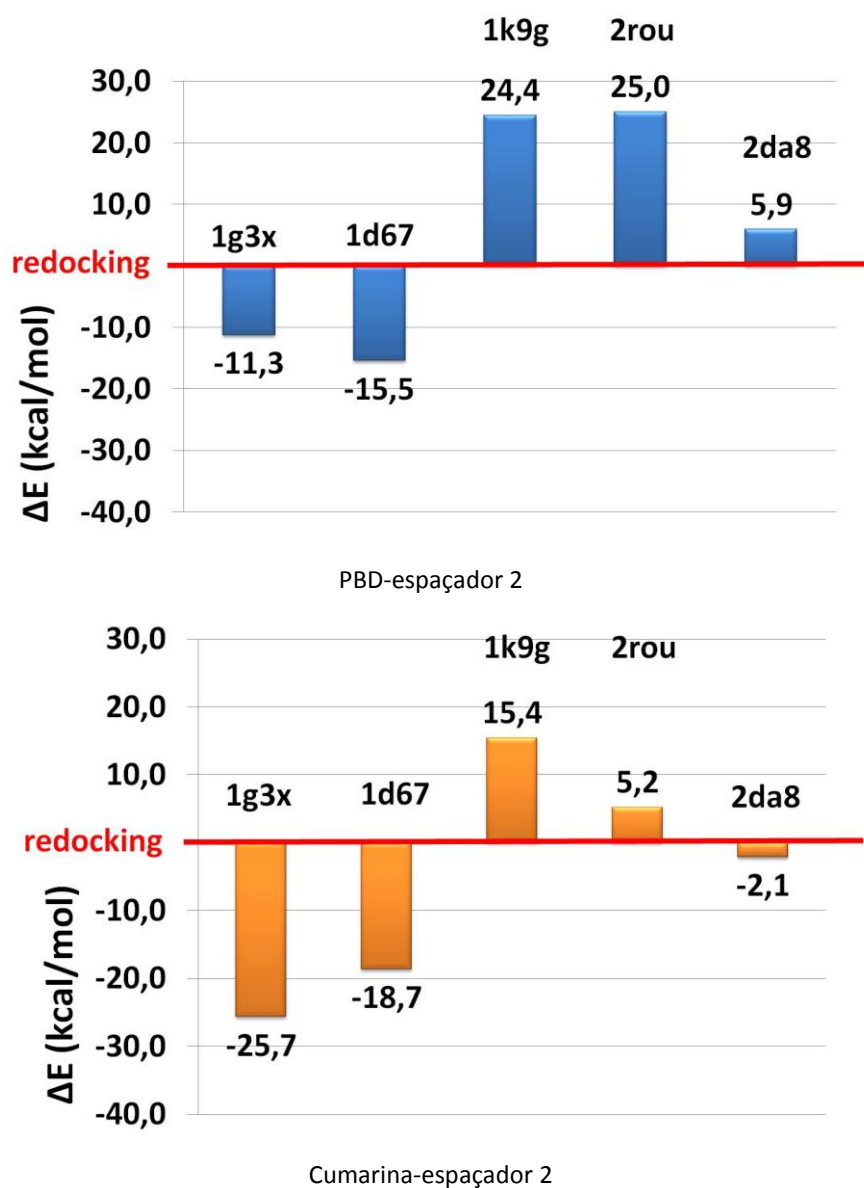


Figura 3.12 Valores de ΔE para as porções PBD e cumarina com o espaçador 2.

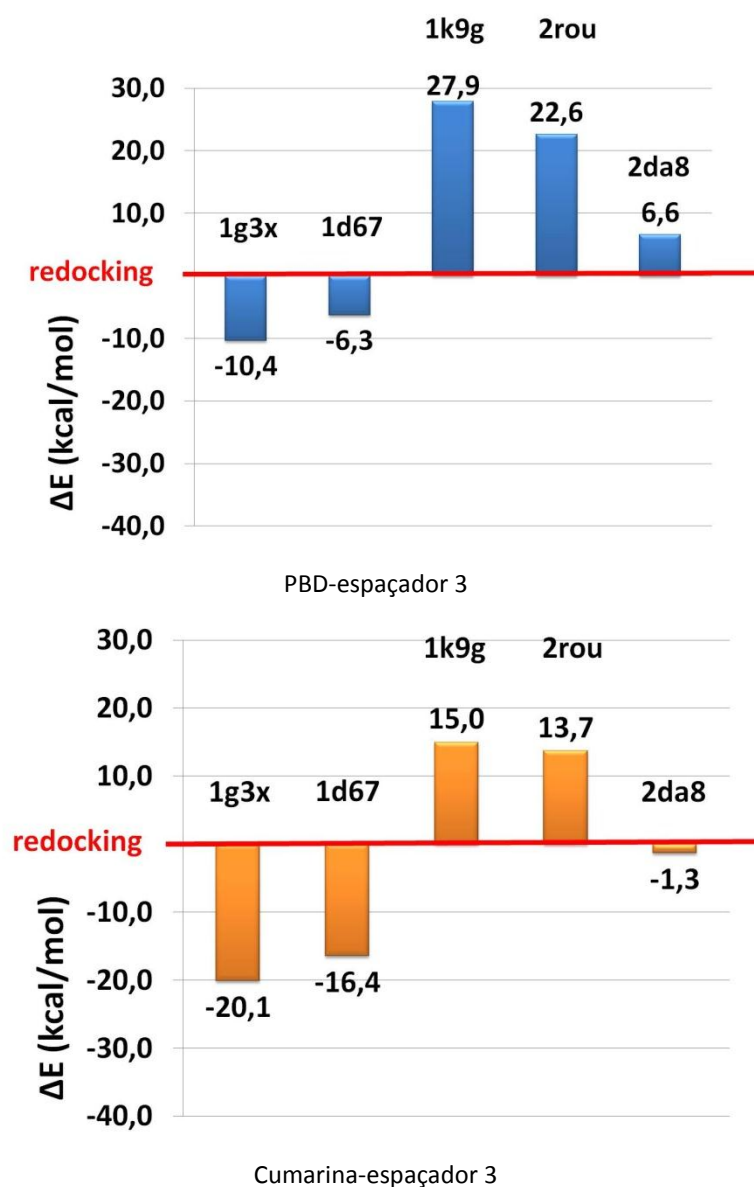


Figura 3.13 Valores de ΔE para as porções PBD e cumarina com o espaçador 3.

Dos resultados com os ligantes contendo uma das porções cíclicas e uma cadeia espaçadora, é possível afirmar que a adição dos espaçadores às porções funcionais favorece a intercalação da porção PBD.

O próximo passo foi o estudo dos ligantes 1, 2 e 3 inteiros nos mesmos receptores para avaliação do complexo.

3.2.3 Experimento 4.3: Estudo da formação de complexos com os ligantes inteiros 1, 2 e 3

Os experimentos descritos até aqui permitiram sugerir um modo de ligação preferencial e a contribuição de cada porção funcional do ligante e sua influência sobre o modo de ligação.

No Experimento 4.3, os ligantes 1, 2 e 3 inteiros foram testados com os mesmos receptores descritos nas seções anteriores, de forma a avaliar a formação do complexo no modo misto. Como consequência destes experimentos, foram avaliadas também a influência das diferentes sequências (Tabela 2.1).

As interações dos complexos estão apresentadas e esquematizadas nas Tabelas 3.7a.1 a 3.7a.9 e Figuras 3.7a.1 a 3.7a.9 do Anexo 3.7. É necessário lembrar que os complexos com os ligantes 1, 2 e 3 inteiros e as estruturas 1g3x e 2da8 já foram apresentados nas seções 3.1.1 e 3.1.2 deste Capítulo e serão aqui retomados para comparação. Os complexos com 1g3x e 2da8 estão apresentados nos Anexos 3.2 e 3.3, respectivamente. A seguir estão discutidos os resultados para cada ligante em cada um dos DNAs estudados. Como descrito no Capítulo 2, os escores são analisados em comparação ao escore do redocking (ΔE).

3.2.3.1 Ligante 1

Para os DNA-receptores 1g3x, 1d67, 1k9g, 2rou e 2da8, o posicionamento obtido para o ligante 1 envolve a intercalação e a ocupação do sulco menor. Em todos os casos, verificou-se que a porção intercalada entre as bases é a PBD. Este resultado está em concordância com o observado nos Experimentos 4.1 e 4.2 com as porções funcionais dos ligantes.

Os valores de ΔE mais favoráveis foram verificados para 1k9g e 2rou, seguidos de 2da8 (Figura 3.14). Os complexos com 1g3x e 1d67 apresentaram os menores escores.

O modo de ligação misto foi mais favorável para sequências contendo GG ou GC (1k9g e 2rou), em acordo com o verificado para os testes com as porções funcionais separadas.

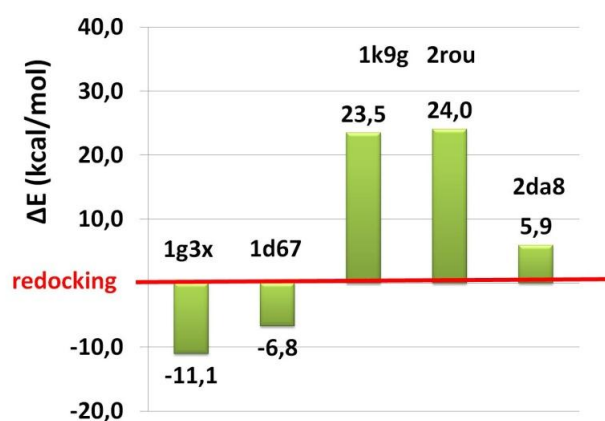


Figura 3.14 Valores de ΔE para o ligante 1 nos DNAs estudados.

A Figura 3.15 mostra o posicionamento do ligante 1 no DNA 1k9g. O posicionamento relativo do ligante no DNA mostra a porção PBD intercalada, enquanto a porção cumarina e o espaçador ocupam o sulco menor.

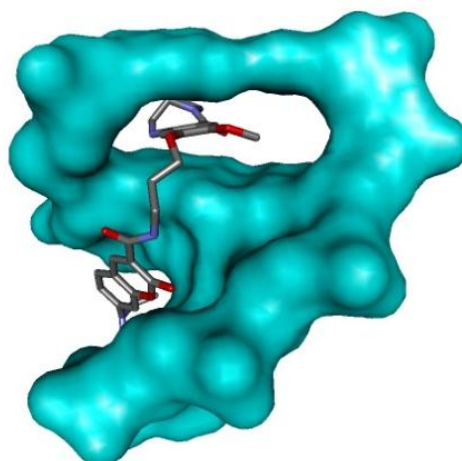


Figura 3.15 Pose dos ligantes relativa ao 1k9g, mostrando o modo de ligação misto verificado como preferencial para o ligante 1 no DNA. O DNA está representado com superfície.

3.2.3.2 Ligante 2

Os valores de ΔE do ligante 2 apresentaram o mesmo padrão para os complexos no modo misto com as estruturas 1g3x, 1d67, 1k9g, 2rou e 2da8. O ligante 2 também intercala a porção PBD em todos os casos.

A ordem decrescente dos valores de ΔE para o modo misto é 1k9g > 2rou > 2da8 > 1d67 > 1g3x (Figura 3.16). Assim, o modo misto mais favorável envolve intercalação entre GG e GC, assim como verificado anteriormente para o ligante 1.

A mesma dependência de sequência com o modo de ligação adotado foi verificada. Os complexos com o modo de ligação misto para sequências contendo GG ou GC (1k9g e 2rou) apresentaram os melhores escores.

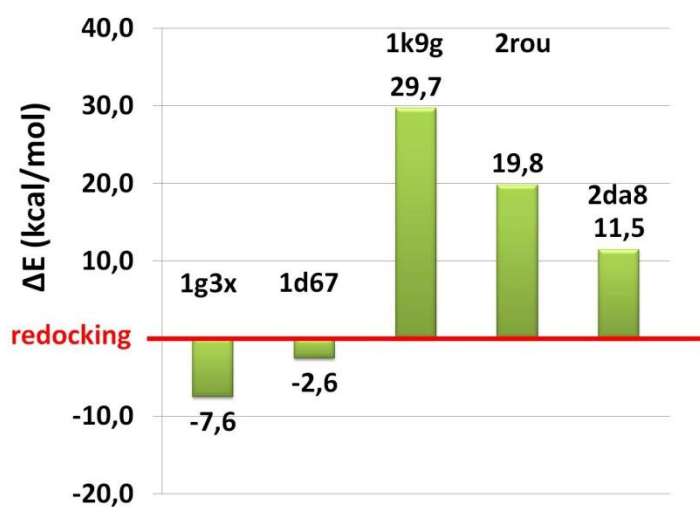


Figura 3.16 Valores de ΔE para o ligante 2 nos DNAs estudados

A Figura 3.17 mostra o posicionamento do ligante 2 no DNA-receptor 1k9g. O posicionamento relativo do ligante no DNA mostra a porção PBD intercalada, enquanto a porção cumarina e o espaçador ocupam o sulco menor.

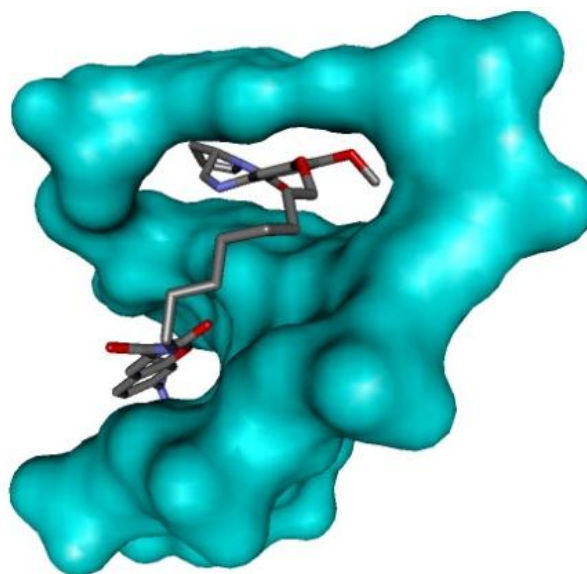


Figura 3.17 Pose dos ligantes relativa ao 1k9g, mostrando o modo de ligação misto verificado como preferencial para o ligante 2 no DNA. O DNA está representado com superfície.

3.2.3.3 Ligante 3

Os valores de ΔE do ligante 3 (Figura 3.18) apresentaram o mesmo padrão dos ligantes 1 e 2 para os complexos no modo misto (1k9g > 2rou > 2da8 > 1d67 > 1g3x). Nestes complexos, o ligante 3 apresenta o posicionamento misto, com a porção PBD intercalada.

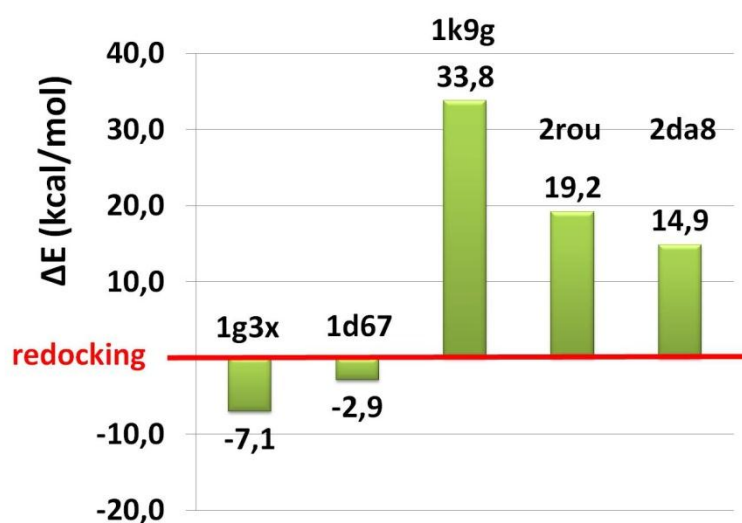
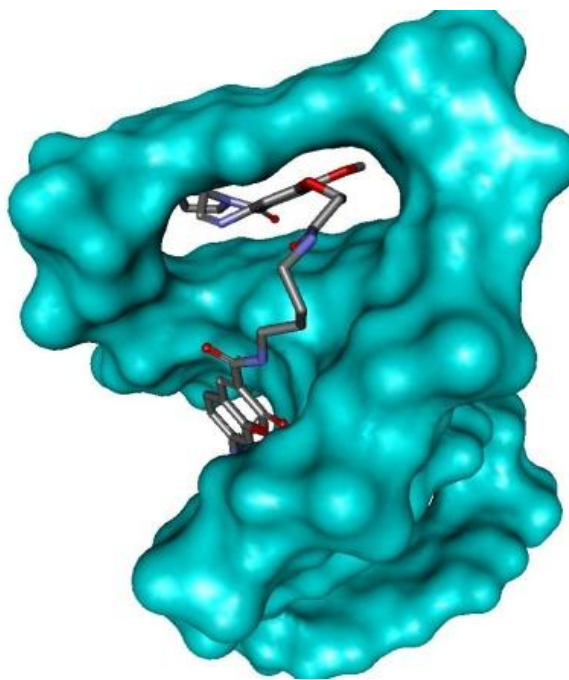


Figura 3.18 Valores de ΔE para o ligante 3 nos DNAs estudados.

Os complexos com o modo de ligação misto para sequências contendo GG ou GC (1k9g e 2rou) também apresentaram os melhores escores com o ligante 3.

A Figura 3.19 mostra o posicionamento do ligante 3 no DNA 1k9g. O posicionamento relativo do ligante no DNA mostra a porção PBD intercalada, enquanto a porção cumarina e o espaçador ocupam o sulco menor.

Estes resultados estão de acordo com o posicionamento obtido para as porções dos ligantes, onde o anel PBD atua como intercalador e a cumarina se acomoda no sulco menor.



Ligante 3

Figura 3.19 Pose dos ligantes relativa ao 1k9g, mostrando o modo de ligação misto verificado como preferencial para o ligante 3 no DNA. O DNA está representado com superfície.

Tendo obtido os escores para os complexos com os ligantes inteiros e suas porções isoladamente, é possível verificar a contribuição de cada porção para o modo de ligação obtido (Figura 3.20).

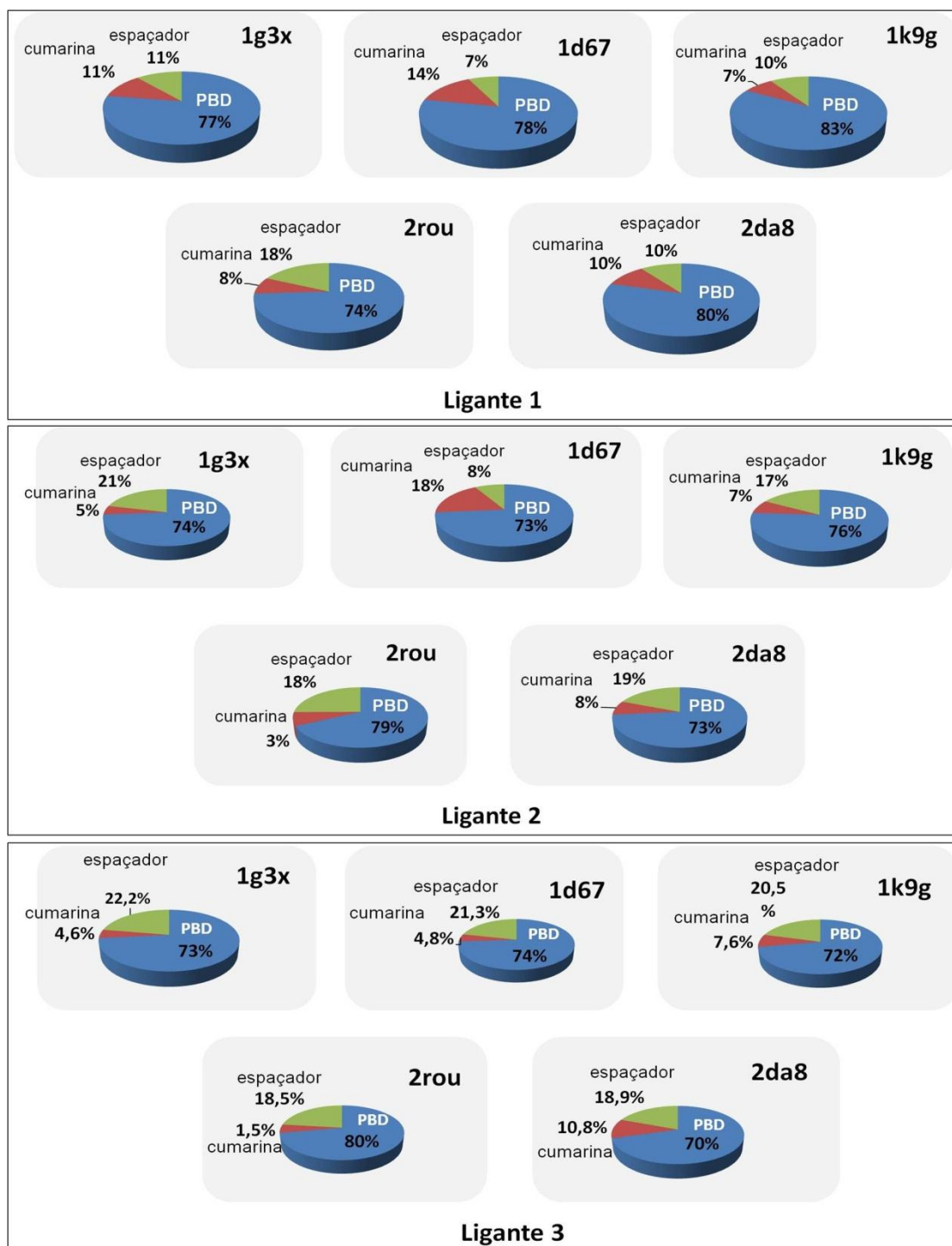


Figura 3.20 Porcentagem de contribuição para os escores de cada porção dos ligantes híbridos.

A porcentagem da porção PBD foi calculada a partir da diferença entre o escore dos ligantes inteiros e o escore dos anéis PBD sozinhos. Para a cumarina, a porcentagem foi calculada da diferença entre o escore do ligante inteiro e o escore das

estruturas PBD-espaçadores. Em todos os casos, predomina a contribuição da intercalação da porção PBD, a qual varia de 70 a 83% do valor dos escores. A menor contribuição para a maioria dos casos é da porção cumarina. Portanto, a cumarina juntamente ao espaçador têm uma contribuição que varia 27 a 30%. Estes resultados confirmam a preferência para a intercalação da porção PBD para o modo de ligação misto dos ligantes híbridos PBD-cumarina estudados.

Na estrutura 2rou, a porção cumarina apresenta uma baixa contribuição para os três ligantes. Este resultado parece indicar que a cumarina possui também preferência pela sequência de bases onde se liga no sulco menor, apresentando menor preferência para repetições de GC no sulco menor, como ocorre em 2rou. No entanto, o reconhecimento de bases no sulco pela porção cumarina ainda merece maior investigação.

3.2.4 Experimento 4.0 (controle): influência da porção cumarina e da porção naftalimida em PBDs híbridas

Os ligantes utilizados no experimento 4.0 foram o ligante da estrutura 2ky7 e o ligante 1. O ligante da estrutura 2ky7 também é uma PBD híbrida, constituída de uma porção PBD, um espaçador e uma porção naftalimida. Foi feita uma análise semelhante à descrita nos Experimentos 4.1, 4.2 e 4.3. Na estrutura resolvida por NMR disponível no *Protein Data Bank* (2ky7), o ligante híbrido apresenta a porção PBD no sulco menor e a porção naftalimida intercalada entre AA. No redocking do ligante da 2ky7, obteve-se a mesma pose do complexo original para o ligante (Figura 3.1a.3 do Anexo 3.1), mostrando que a porção PBD se posiciona no sulco, enquanto que a porção naftalimida fica intercalada. Este resultado pode parecer contraditório com o encontrado nos Experimentos 4.1, 4.2 e 4.3 em que a porção PBD fica intercalada e a cumarina se posiciona no sulco menor. Assim, a fim de avaliar como estas porções podem influenciar o modo de ligação das pirrolbenzodiazepinas quando conjugadas a elas, foram feitas simulações criando dois ligantes “mutantes”. Especificamente, buscou-se verificar se a porção PBD e o espaçador do ligante 2ky7, ao se combinar com a cumarina, poderiam se comportar como do ligante 1 estudado neste trabalho e se, por sua vez, a porção PBD e o

espaçador do ligante 1 poderia mudar seu comportamento quando combinado com a naftalimida do ligante 2ky7. A descrição desta etapa está descrita a seguir. Assim, o primeiro teste desta série (4.0) foi feito para avaliar o comportamento de PBDs híbridas com duas composições distintas e serviu de comparação para os resultados com as porções funcionais dos ligantes 1, 2 e 3.

O mutante A foi construído adicionando a porção cumarina ao ligante da 2ky7 (Figura 3.21) e o mutante B, tem a porção naftalimida adicionada ao ligante 1 estudado neste trabalho (Figura 3.22).

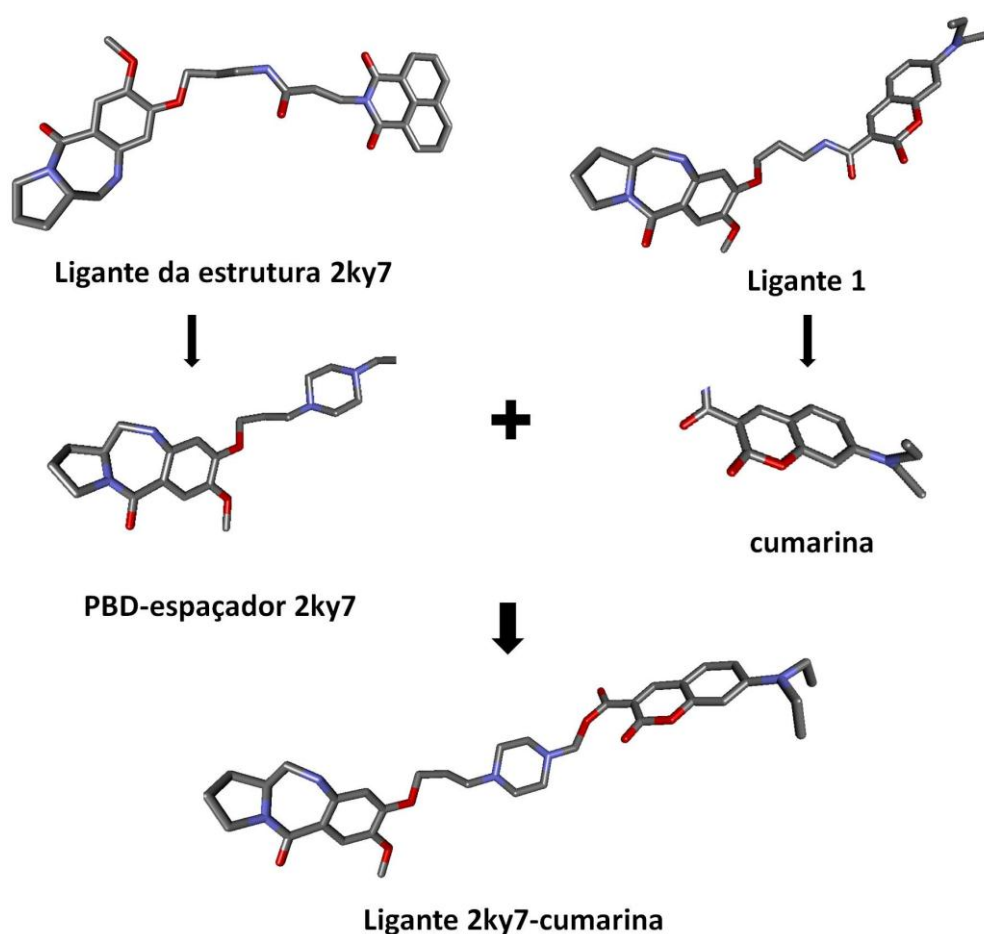


Figura 3.21 Ligante mutante A modelado para o experimento controle 4.0: porção PBD-espaçador da estrutura do ligante 2ky7 unida à porção cumarina do ligante 1 do conjunto estudado.

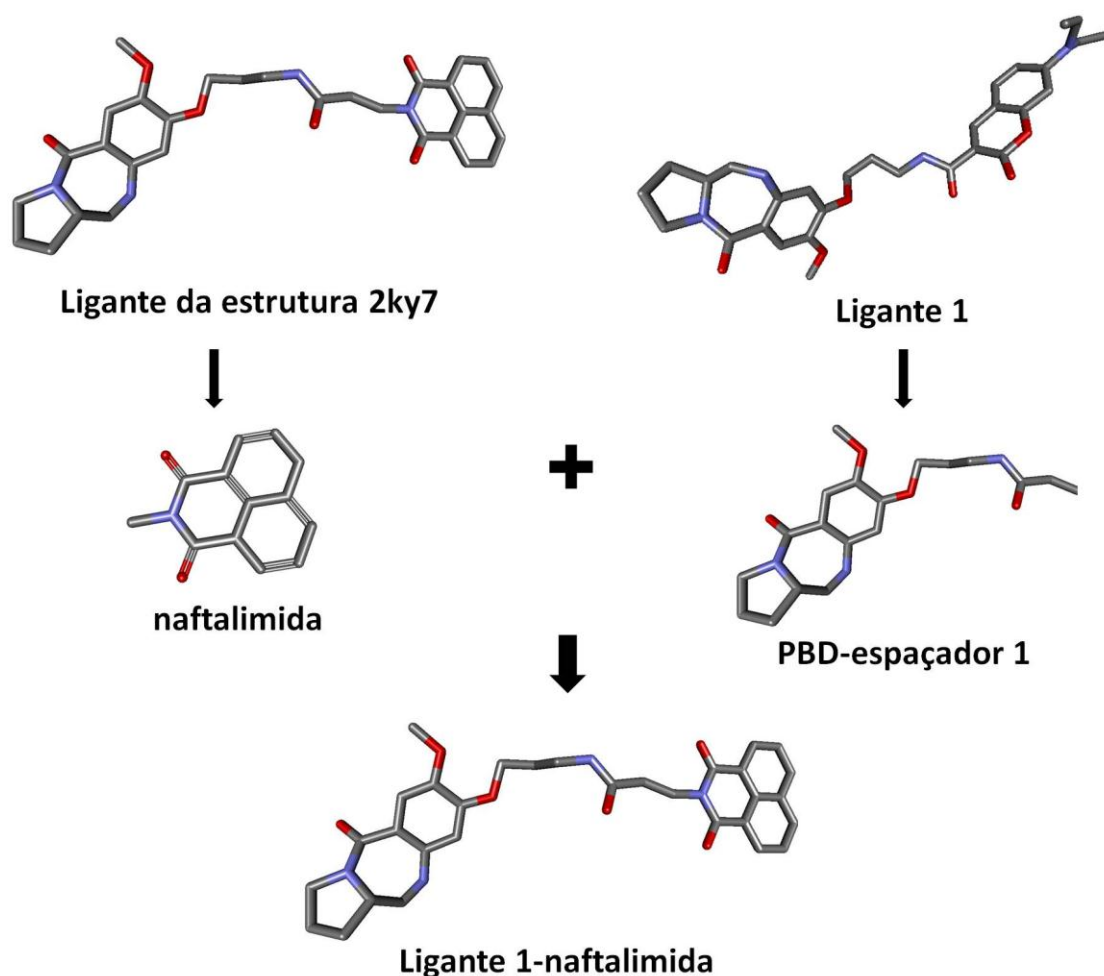


Figura 3.22 Ligante mutante B modelado para o experimento controle 4.0: porção PBD-espçador do ligante 1 unida à porção naftalimida do ligante 2ky7.

Foram feitas as simulações com os ligantes mutantes A e B (Figura 3.21 e Figura 3.22, respectivamente). Os resultados do estudo de docking para estes ligantes mutantes estão relatados a seguir. O posicionamento obtido com este experimento está apresentado na Figura 3.23.

- **Complexo com o mutante A:** No primeiro caso, com o mutante A, foram obtidas apenas soluções em que a porção PBD está posicionada no sulco menor e a naftalimida está intercalada (Figura 3.23A). O escore médio destas soluções é de 82,5 kcal/mol.

- **Complexo com o mutante B:** Para o segundo caso, com o ligante 2ky7 adicionado com a cumarina, foram obtidas soluções com a cumarina intercalada (Figura 3.23B) em que o escore médio obtido é de 73,7 kcal/mol.

Os escores obtidos nestes testes indicam a cumarina como a porção com menor potencial para intercalar. Isto explica o fato da porção PBD se apresentar intercalada quando conjugada com a cumarina, mas não quando conjugada aos anéis da naftalimida.

O experimento também envolveu simulações de docking com as estruturas das porções funcionais do ligante 2ky7, a PBD e a naftalimida, contendo apenas o espaçador desta estrutura. Portanto, as simulações de docking foram feitas primeiramente com a porção PBD mais o espaçador e com a porção naftalimida mais o espaçador do ligante 2ky7. Os resultados são descritos a seguir e apresentados no Anexo 3.8

- **Complexo com PBD-espaçador da 2ky7:** As interações e o posicionamento obtidos com esta estrutura estão apresentados na Tabela 3.8a.1 e na Figura 3.8a.1 do Anexo 3.8. Foi obtida a intercalação da porção PBD e a ocupação do sulco menor pelo espaçador da molécula. Este comportamento é semelhante ao resultado obtido para a porção PBD com os espaçadores do ligante do presente estudo.

- **Complexo com a naftalimida-espaçador da 2ky7:** As interações e o posicionamento obtidos com esta estrutura estão apresentados na Tabela 3.8a.2 e na Figura 3.8a.2 do Anexo 3.8. Neste caso, a porção intercalada é a naftalimida. O espaçador ocupa o sulco menor também neste complexo. Este comportamento é semelhante ao resultado obtido para a porção cumarina com os espaçadores do ligante do presente estudo.

Estes resultados são interessantes, pois mostram que a natureza da outra porção funcional contribui na definição do posicionamento de ligantes PBDs híbridos e que a porção cumarina é um intercalador menos favorável do que a naftalimida, sendo necessário investigar o modo de ligação de PBDs híbridas com diferentes composições. Assim, os resultados deste experimento corroboram os resultados obtidos nos experimentos de docking feitos com os ligante 1, 2 e 3.

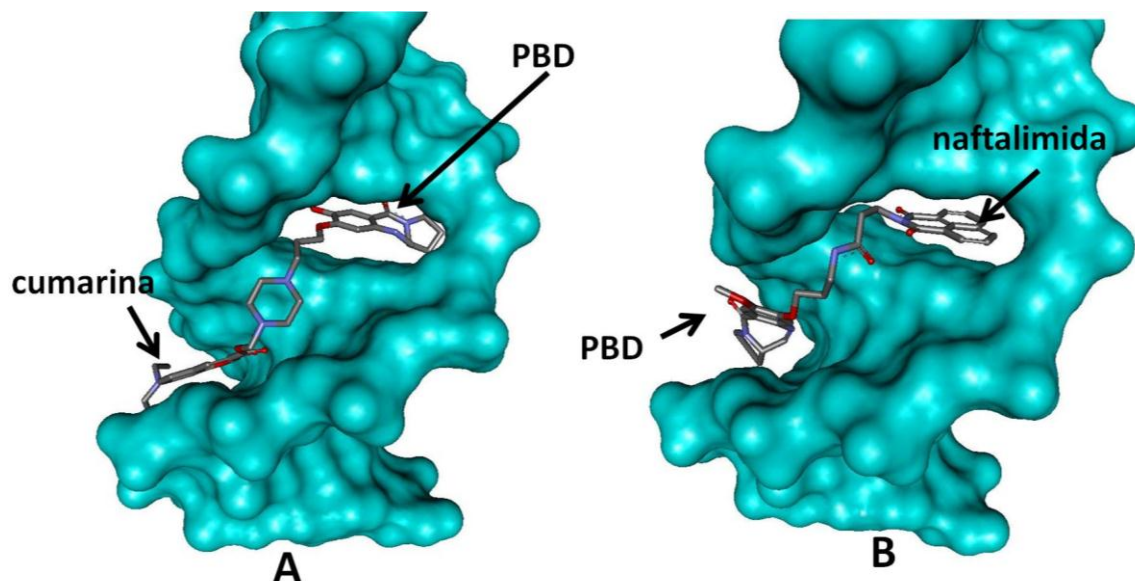


Figura 3.23 Complexo com o ligante mutante A, no qual a porção PBD está intercalada entre bases AA do DNA, de modo semelhante ao obtido no experimento 2 para os ligantes 1, 2 e 3 que também possuem a porção cumarina. (B) Complexo com o ligante mutante B, no qual a porção naftalimida intercala entre as bases AA do DNA, de modo semelhante ao ligante da estrutura 2ky7.

3.2.5 Experimento 5.0: controle da preferência de sequência

Os Experimentos 4.1 e 4.3, feitos com os DNA-receptores 1g3x, 1d67, 1k9g, 2rou e 2da8 permitiram a ocorrência de uma intercalação entre as bases e a ocupação do sulco menor, caracterizando um modo de ligação misto. Este experimento fez uso de estrutura de DNA-intercaladores com diferentes sequências; portanto, utilizou-se um controle para comparação dos resultados de preferência de sequência. Para isso, o

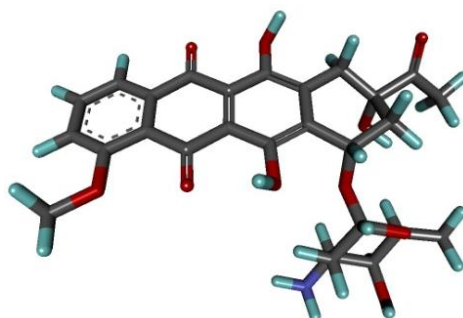


Figura 3.24 Esquema da estrutura 3D da daunomicina extraída do Protein Data Bank sob código 427d.

composto daunomicina (Figura 3.24), um antibiótico da família das antraciclinas, foi utilizado.

Este composto é um ligante intercalador (Schuerman e Van Meervelt, 2000). Remeta et al. , 1993 e Chaires et al., 1982 avaliam a ligação deste composto em DNA com diferentes sequências de nucleotídeos com uma intercalação preferencial em bases GG. As sequências de nucleotídeos na intercalação utilizadas no presente trabalho também estão presentes no referido estudo (AA, AT, AC, GC e GG). O escore do redocking das estruturas está apresentado na Tabela 3.5.

| Código PDB | Entre as bases | Sequência 5' → 3' | ΔE |
|------------|----------------|-------------------|------------|
| 1g3x | AA | CGCGAATTCGCG | -19,1 |
| 1d67 | AC | TGATCA | 2,1 |
| 2da8 | AT | GATATC | 2,8 |
| 1k9g | GG | CCTCGG | 29,7 |
| 2rou | GC | GCGCGG | 26,5 |

O valor de comparação entre o escore de redocking e de docking em cada estrutura, denominado delta escore (ΔE), foi utilizado. Como descrito no capítulo anterior, valores de ΔE negativos representam escores abaixo do valor do redocking. Os valores de ΔE para os complexos com a daunomicina podem ser visualizados no gráfico de barras apresentado na Figura 3.25. As interações das estruturas de DNA com a daunomicina estão apresentadas nas Tabelas 3.9a.1 a 3.9a.5 e Figuras 3.9a.1 a 3.9a.5 do Anexo 3.9.

Nos complexos obtidos para daunomicina, verificou-se que, na estrutura em que a intercalação acontece entre duas adeninas adjacentes, ou seja, AA (1g3x), o valor de escore é menor do que o escore do redocking. Por outro lado, para as sequências contendo guanina, como GG e GC (1k9g e 2rou), foram obtidos os maiores ΔE para daunomicina, sendo ainda ligeiramente maior para GG.

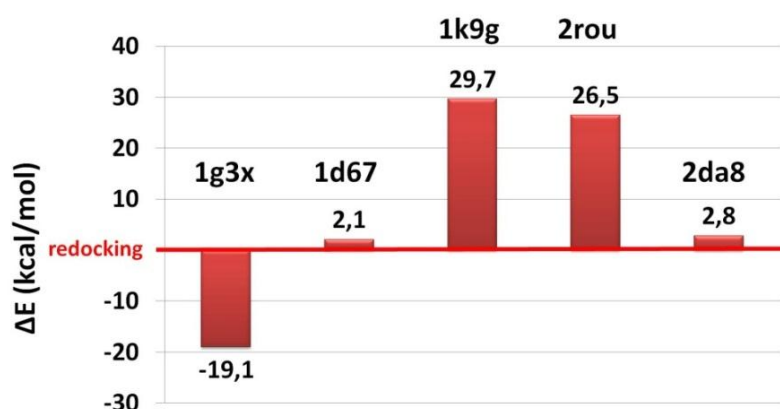


Figura 3.25 Valores de ΔE para a daunomicina no modo intercalado. Os nucleotídeos entre os quais o ligante intercala está indicado no topo de cada barra.

Na literatura, a daunomicina é descrita por intercalar entre sequências contendo guaninas, com preferência para DNA contendo estas bases na mesma fita (Chaires, Dattagupta e Crothers, 1982; Remeta et al., 1993). Este resultado mostra que as simulações realizadas nesta etapa também permitem reproduzir a preferência de sequência verificada nos resultados experimentais citados.

3.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE OS EXPERIMENTOS E COMPARAÇÃO COM OS DADOS NA LITERATURA

3.3.1 Modo de ligação

Os experimentos *in silico* realizados neste trabalho permitem explicar o modo como os ligante PBD-cumarina formam complexos com DNA. Com base nos resultados apresentados, é possível sugerir que o modo preferencial de ligação adotado pelos ligantes híbridos 1, 2 e 3 é o modo misto (Figura 3.26). Este modo é caracterizado pela intercalação de uma parte da estrutura do ligante, geralmente contendo anéis fusionados, entre as bases do DNA e pela ocupação do sulco menor por outra parte do ligante. A região da dupla hélice onde ocorre a intercalação sofre distorção para distanciar os degraus de bases nitrogenadas adjacentes durante a acomodação do

ligante. No caso dos ligantes estudados, o modo misto significa que a porção PBD fica intercalada enquanto que a cadeia espaçadora e a cumarina ocupam o sulco menor. Nesse caso, a pergunta que surge é se possível esperar que após a formação do complexo a porção PBD pode sofrer alquilação com uma base guanina. Na Seção 3.3.2 esta questão é analisada.

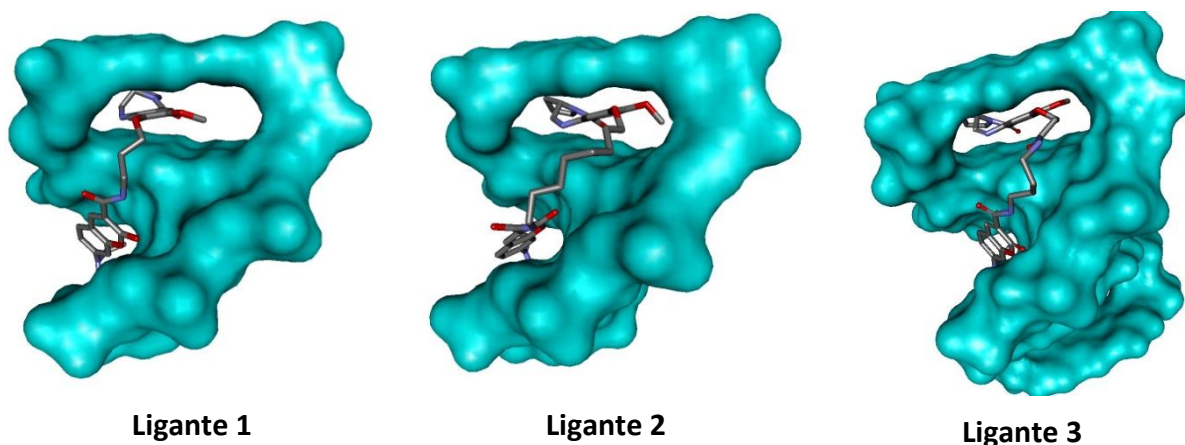


Figura 3.26 Pose dos ligantes relativa ao 1k9g, mostrando o modo de ligação misto verificado como preferencial para as PBDs híbridas 1, 2 e 3 no DNA. O DNA está representado com superfície.

3.3.2 Mecanismo de ligação

O campo de estudos de PBDs híbridas é recente e tem havido relatos de modos de ligação distintos para híbridos com diferentes grupos, tal como a ligação ao sulco menor apenas para PBDs conjugadas com quinazolina (Kamal et al., 2010) ou a ligação no modo misto para PBDs conjugadas com naftalimida (Rettig et al., 2010). A este tipo de PBDs tem sido atribuída a formação de adutos no sulco menor, formados a partir da ligação covalente com a guanina. No caso da estrutura tridimensional de 2ky7, observa-se a porção naftalimida intercalada e a cadeia espaçadora e a porção PBD ocupando o sulco menor. Os experimentos *in silico* realizados neste trabalho com esta mesma estrutura, permitiram recriar a estrutura original, tanto quando o objetivo foi obter o complexo como quando o objetivo era obter o aduto, conforme descrito no Anexo 3.1, Seção 3.1a.3 e apresentado na Figura 3.27. Na figura observa-se que as poses são equivalentes. Este fato permite sugerir que primeiro se formaria o complexo e depois o aduto.

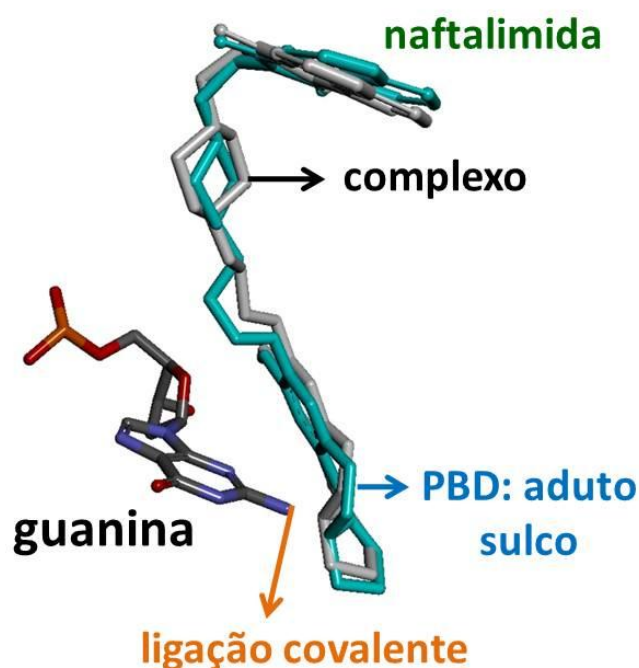


Figura 3.27 Comparação das poses da PBD-naftalimida obtidas por cálculos de docking para a formação de complexo e de aduto, mostrando a guanina onde ocorre a alquilação e consequente formação da ligação covalente guanina-PBD.

No caso dos ligantes 1, 2 e 3, é possível supor que possa ocorrer um mecanismo similar, em que os ligantes se acomodem formando os complexos e posteriormente, formem-se os adutos. Nesse caso, os estudos sugerem que a PBD ficaria intercalada, com uma posterior formação de aduto com uma guanina. Os resultados foram mais favoráveis, no casos dos complexos, para a intercalação com as guaninas.

A formação de adutos com o DNA não é um mecanismo exclusivo da ligação ao sulco menor, mas pode ocorrer por meio da intercalação entre bases; de fato, a naftalimida é uma porção que tem sido relatada como intercaladora do DNA associada à formação de adutos no sulco. Davey et al. (2010) relatam a obtenção de complexos com este composto intercalando no DNA e sugerem a facilitação da alquilação por meio deste modo de ligação. Estes relatos mostram que a sugestão da formação do aduto não é

suficiente para predizer o modo de ligação (ligação ao sulco ou intercalação), visto que também é possível que ele seja associado ao modo intercalado.

Somado a isso, novos modos de ligação têm sido descritos para PBDs híbridas, com a possibilidade do composto se ligar ao DNA com uma porção intercalada e outra porção acomodada no sulco menor (Gerratana, 2010). A formação de adutos com o DNA também envolve intercalação entre bases de guanina para acridinas híbridas; neste caso, a ligação ao DNA envolve uma etapa inicial rápida, na qual o composto intercala entre as bases, permitindo a formação do aduto (Choudhury & Bierbach, 2010). Este mesmo processo poderia ocorrer com os ligantes 1, 2 e 3.

Wells e colaboradores (2008), que estudaram os ligantes 1, 2 e 3, supõem que a porção PBD ocupa o sulco menor, como no caso da antramizina. Utilizam para essa conclusão, além do conhecimento da estrutura do aduto DNA-antramizina, a medida do ΔT_m como parâmetro para descrever a interação DNA-ligantes, pois permite verificar se os ligantes são capazes de estabilizar a dupla hélice, conforme descrito na Seção 1.3. No entanto, apenas o perfil de temperatura de desnaturação não é um parâmetro suficiente para identificar o modo de ligação. Xiao et al. (2001) relatam valores entre 0,5°C e 6,0°C para compostos intercaladores em CT-DNA, os quais são valores de mesma ordem daqueles descritos para os híbridos PBD-cumarina (Wells et al., 2008).

Estudos para identificar modos de ligação no DNA geralmente envolvem testes mais específicos, tais como medidas de viscosidade ou dicroísmo circular (Palchadhuri e Hergenrother, 2007; Seng et al., 2008, Seng et al., 2010). Portanto, considerando as possíveis aplicações terapêuticas e tecnológicas, é importante elucidar o mecanismo de ligação destes compostos, uma vez que apresentam efeito sobre a T_m do DNA. É neste sentido que os resultados aqui apresentados podem ajudar a esclarecer o modo como os compostos interagem com o DNA.

Entre as estruturas em que o modo misto foi verificado, os complexos com 1k9g e 2rou se mostraram mais favoráveis e suas sequências contém guanina e citosina no ponto de intercalação. Assim, os resultados obtidos permitem sugerir formação dos

complexos em que os ligantes se posicionam com a porção PBD intercalada entre as bases, a porção cumarina ocupa o sulco menor e o espaçador muda seus ângulos de torção (conformação) de modo a ajustá-lo ao sulco, em sequências contendo repetições de guanina e citosina.

A convergência entre os resultados obtidos em cada etapa colabora para o modelo proposto. As simulações com as porções funcionais mostraram que a PBD é melhor intercalador que a cumarina presente nos ligantes e os resultados com suas estruturas completas estão de acordo com este modelo. Dos três anéis da porção PBD, apenas o anel A é planar. A intercalação de compostos contendo anéis não planares é possível e já foi descrita na literatura, tal como o mecanismo envolvido na ligação do complexo metálico de polipiridil-Ru(II) (Xiong et al, 1999). Mesmo assim, interações π foram verificadas com o anel A e com as bases de guanina.

3.3.3 Estabilização da dupla hélice e preferência de sequência.

Os três ligantes foram investigados quanto à capacidade de inibir o crescimento de células tumorais (Wells et al., 2008). O ligante 1 foi descrito como o mais ativo e o ligante 3 como o menos ativo entre eles. Os valores de temperatura de fusão medidos com 1, 2 e 3 por Wells e colaboradores (2008) apresentam um comportamento similar aos de PBDs não-covalentes apresentados por Antonow e colaboradores (2007) e de outras compostos intercaladores (Xiong et al, 1999). A porção PBD destes compostos é derivada do ligante DC-81 (Tabela 1.1) que apresenta menor capacidade de estabilizar a dupla hélice que os híbridos estudados. Os resultados para a porção cumarínica sozinha também indicam uma ligação de menor afinidade pelo DNA. Portanto, assim como sugerem os autores (Wells et al., 2008), os ligantes inteiros (1, 2 e 3) mostraram-se melhores do que as porções funcionais separadamente.

Os modelos com melhor correlação com o perfil de desnaturação térmica foram obtidos com a estrutura 2rou. Neste DNA, o complexo mais favorável foi para o ligante 1, seguido de 2 e 3. Apesar de os autores não elucidarem a sequência em que os compostos são incubados, pode-se sugerir que a ligação dos mesmos ocorra em uma

repetição de GC nos experimentos realizados por Wells e colaboradores (2008). Também é possível sugerir que um comportamento diferente poderia ser obtido na presença de diferentes segmentos com diferentes sequências, com o ligante 3 apresentando melhores resultados em repetições de guanina (1k9g). Este resultado pode ser útil para o planejamento de nucleotídeos carregadores de fármacos ou de marcadores moleculares.

No presente trabalho foi possível obter estruturas de complexos DNA-ligantes, indicando que o mecanismo envolvido das atividades destes compostos seja ligação ao DNA. Adicionalmente, o estudo de docking e a visualização molecular forneceram bases para descrição dos complexos e para sugerir um modo de ligação que explica os dados de ΔT_m experimentais.

CAPÍTULO 4

Conclusões

Este capítulo reúne as conclusões obtidas com os experimentos *in silico* realizados neste trabalho.

Os compostos 1, 2 e 3 estudados são híbridos que possuem uma porção pirrolbenzodiazepina (PBD) e uma porção 7-dietil-aminocumarina ligadas por um espaçador, cujo tamanho é variável. O interesse em estudar estas PBDs surgiu porque há experimentos que mostram que tais compostos podem se ligar ao DNA e apresentar atividade antitumoral em linhagens de tumor de ovário e melanoma com potenciais aplicações terapêuticas. As PBDs híbridas com cumarinas apresentam fluorescência quando absorvem luz visível, o que pode ser explorado para marcação do DNA. Os estudos de PBDs híbridas são recentes em comparação com aqueles relativos aos compostos de estrutura simples (não híbridos).

A fim de contribuir com a descrição estrutural de complexos de PBD-DNA foram considerados três compostos com a constituição PBD-cadeia espaçadora-cumarina, para os quais foi feita a modelagem de forma a obter sua estrutura tridimensional e a avaliação do modo de ligação ao DNA. Também se avaliou a contribuição de cada porção para o modo de ligação verificado e foi possível propor um mecanismo para a ligação destes compostos no DNA. O relato das conclusões inicia-se pelo modo de ligação.

4.1 MODO DE LIGAÇÃO

Nos primeiros experimentos deste trabalho foram feitos testes em estruturas de DNA de mesma sequência de nucleotídeos para dois modos de ligação individualmente: sulco menor e intercalado. Os resultados dessas simulações não permitiram distinguir entre a intercalação ou a ligação ao sulco. Considerando que compostos químicos podem apresentar outros modos de ligação no DNA, avaliou-se a formação de complexos com outras estruturas de DNA que permitissem este estudo. Entre estes modos está a bis-intercalação, a qual foi avaliada no Experimento 2; no entanto, a intercalação concomitante em duas regiões do DNA também se mostrou um modo de ligação improvável para os compostos estudados.

No Experimento 3, foi avaliada a possibilidade de ligação ao sulco menor com uma intercalação simultânea, o modo de ligação misto. Em todos os casos, o modo de ligação misto se mostrou mais favorável do que a intercalação, a ligação ao sulco menor e a bis-intercalação (Figura 4.1). Portanto, propõe-se a ligação no modo misto para os ligantes 1, 2 e 3.

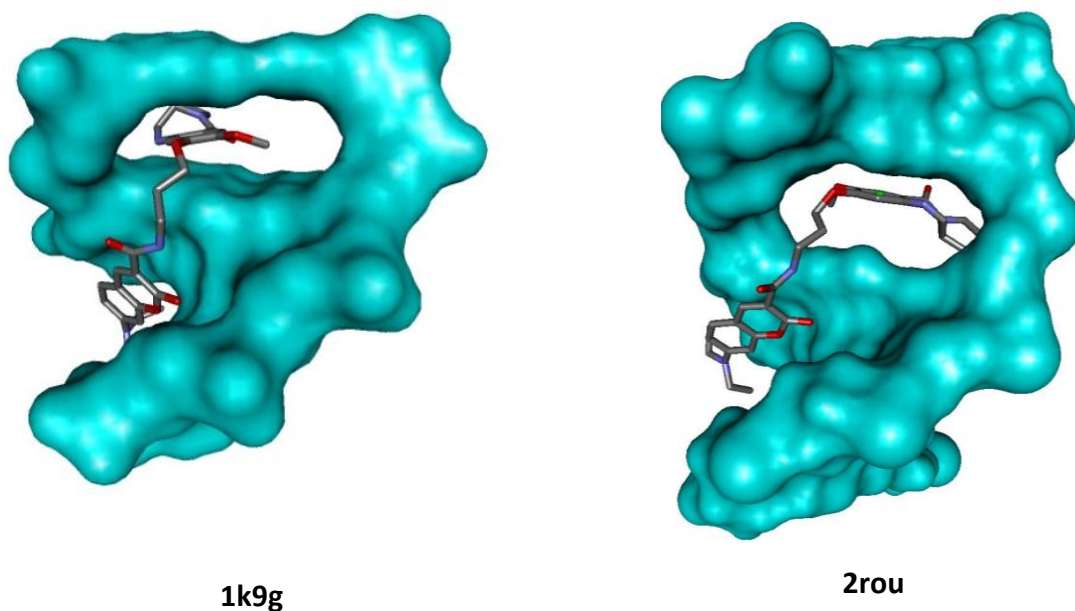


Figura 4.1 Modo de ligação misto sugerido para os ligantes estudados.

4.2 CONTRIBUIÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO LIGANTE PARA O MODO DE LIGAÇÃO.

No Experimento 4.0, a porção cumarina do ligante 1 foi substituída pela porção naftalimida do ligante da estrutura 2ky7 para avaliar a influência da porção funcional com a qual a PBD está conjugada. O contrário também foi feito. Os resultados apontaram diferença entre o modo de ligação adotado por PBDs conjugadas à porção cumarina e à porção naftalimida. Este resultado pôde ser explicado pelas preferências pela intercalação das porções conjugadas. A porção naftalimida se mostrou um melhor intercalador que a cumarina estudada, o que explica o fato da porção PBD ocupar o sulco quando conjugada com a naftalimida e não com a cumarina (ligantes 1, 2 e 3). Os resultados do estudos mostraram que a preferência de intercalação é

naftalimida > PBD > cumarina

sendo a cumarina a porção menos favorável entre as três. Tal preferência pode ser atribuída à presença de elétrons π delocalizados nessa mesma ordem. Este resultado está esquematizado na Figura 4.2.

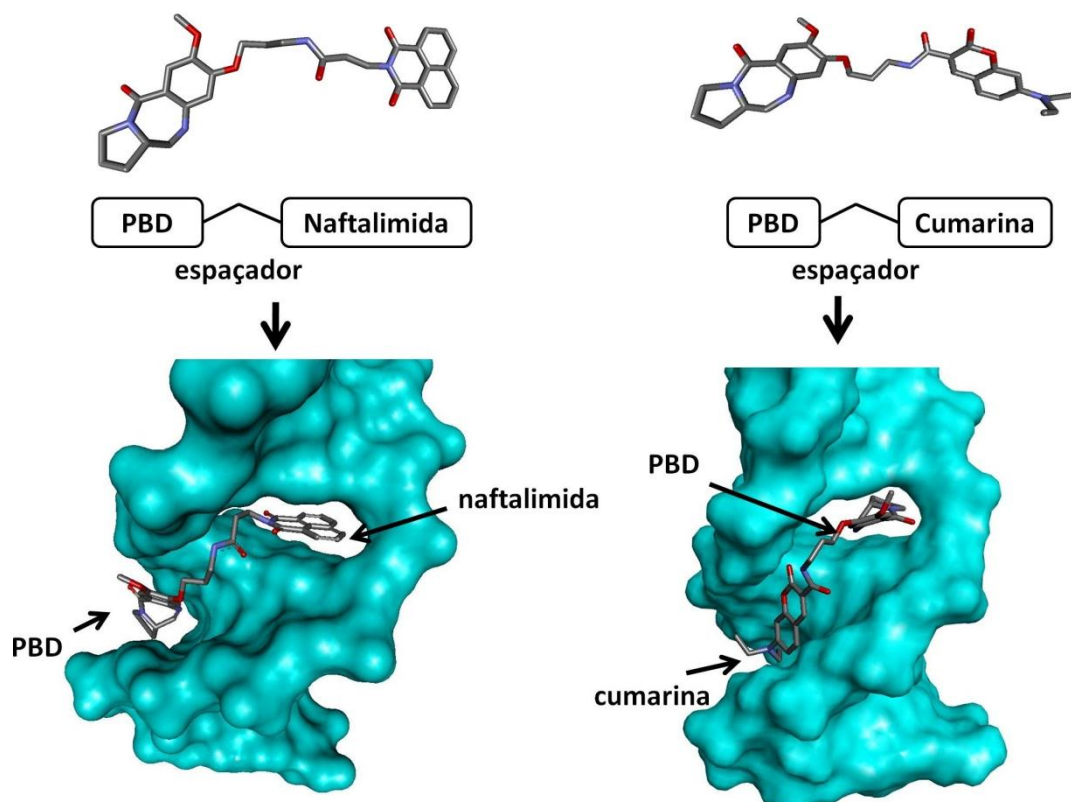


Figura 4.2 Modo de ligação adotado por PBDs híbridas com as porções naftalimida e cumarina.

Para avaliar a contribuição das porções PBD, espaçador e cumarina que formam os ligantes 1, 2 e 3, foram feitos os Experimentos 4.1, 4.2 e 4.3. Neles, foi possível verificar que a porção PBD unida aos espaçadores dos ligantes apresenta melhor intercalação entre bases do que a porção cumarina. Isto se reflete no posicionamento dos ligantes inteiros, aonde a contribuição da porção PBD chega a 83%.

4.3 INFLUÊNCIA DA SEQUÊNCIA

Os Experimentos 4.1 e 4.3 foram feitos com estruturas de diferentes sequências. Pode-se verificar a seguinte preferência de sequências para a porção PBD intercaladora: GG > GC > AT > AA. A preferência de sequência para a porção cumarina ligada ao sulco parece ser por purinas, pois tanto em 1k9g quanto em 2rou há interações com guanina e adenina.

4.4 MECANISMO DE LIGAÇÃO

Tendo verificado o modo de ligação para os compostos como sendo o misto, avaliou-se se seria possível sugerir a formação do aduto neste modo de ligação. Os resultados indicaram que a formação do aduto não altera o posicionamento obtido para o ligante e poderiam ocorrer após a formação do complexo.

Reunindo os resultados aqui apresentados, é possível sugerir um mecanismo de ligação envolvendo o modo misto, no qual a PBD intercala preferencialmente entre bases GG e a cumarina e o espaçador ocupam o sulco menor, assim como mostrado em cada etapa dos experimentos descritos. Os compostos dessa família são capazes de formar adutos com o DNA. Como discutido no capítulo anterior, a formação de adutos com o DNA não é um mecanismo associado apenas à ligação ao sulco menor, mas pode ocorrer por meio da intercalação entre bases. Deste modo, similarmente ao que acontece com outros compostos, pode-se sugerir que a formação de um complexo no modo misto seja uma etapa prévia à formação do aduto, com a intercalação da porção PBD dos ligantes facilitando a aproximação necessária para a formação da ligação com a guanina. O ligante 1 foi aquele que ficou mais próximo dos anéis das guaninas na intercalação GG (Figura 4.3) e pode ser correlacionado com melhor atividade biológica publicada na literatura.

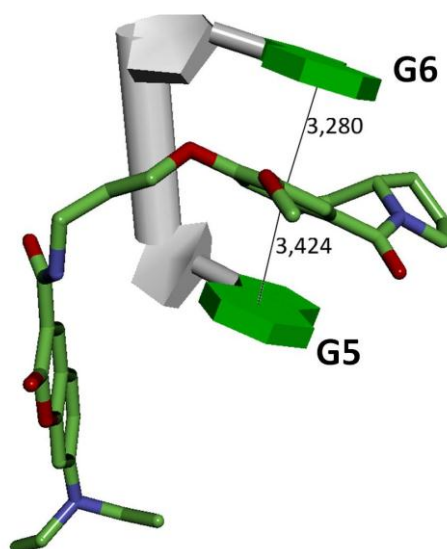


Figura 4.3 Distância (Å) dos anéis PBD e dos anéis das guaninas na região de intercalação com o DNA 1k9g.

4.5 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos e apresentados neste trabalho permitiram descrever complexos entre ligantes híbridos cumarina-PBD quanto ao modo de ligação e interações. Este tipo de informação é essencial para o melhoramento de ligantes candidatos a fármacos e o planejamento de aplicações tecnológicas. É possível explorar a estrutura do espaçador e de substituintes na cumarina a fim de possibilitar interações estratégicas com as bases e os açúcares do DNA.

Foi verificada preferência por sequência e contribuições diferentes para cada porção funcional dos ligantes. O estudo fornece base para o planejamento de ligantes PBD-cumarina e de outras PBDs conjugadas, permitindo entender o papel de cada uma dessas porções funcionais. Com a possibilidade de modelar sequências de DNA e com a modelagem de pequenas moléculas, diferentes grupos na cadeia espaçadora podem ser explorados. Assim, o tipo de estudo aqui apresentado pode guiar o desenho de novos compostos.

Referências

- Accelrys Discovery Studio Visualizer™ - Accelrys Software Inc. Discovery Studio Visualizer 2.0
- Address, K. J.; Sinsheimer, J. S.; Feigon, J.: Solution structure of a complex between n-mecys(3),n-mecys(7) tandem and d(gatatc) 2. *Biochemistry* **1993**, *32*, 2498-2508.
- Alley, M. C.; Hollingshead, M. G.; Pacula-Cox, C. M.; Wand, W. R.; Hartley, J. A.; Howard, P. W.; Gregson, S. J.; Thurston, D. E.; Sausville, E. A.: SJG-136 (NSC 694501), a novel rationally designed DNA minor groove interstrand cross-linking agent with potent and broad spectrum antitumor activity. Part 2: Efficacy evaluations. *Cancer Research* **2004**, *64*, 6700-6706.
- Antonow, D.; Barata, T.; Jenkins, T. C.; Parkinson, G. N.; Howard, P. W.; Thurston, D. E.; Zloh, M.: Solution Structure of a 2:1 C2-(2-Naphthyl) Pyrrolo 2,1-c 1,4 benzodiazepine DNA Adduct: Molecular Basis for Unexpectedly High DNA Helix Stabilization. *Biochemistry* **2008**, *47*, 11818-11829.
- Brooijmans, N.; Kuntz, I. D.: Molecular recognition and docking algorithms. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **2003**, *32*, 335-373.
- Caracelli, I.; Zukerman-Schpector, J. *Introdução a Biofísica Estrutural*. São Carlos: EdUFSCar, 2006, 69p.
- Chaires, J. B.: A thermodynamic signature for drug-DNA binding mode. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2006**, *453*, 26-31.
- Chaires, J. B.; Dattagupta, N.; Crothers, D. M.: Self-association of daunomycin. *Biochemistry* **1982**, *21*, 3927-3932.
- Chaires, J. B.; Dattagupta, N.; Crothers, D. M.: Studies on interaction of anthracycline antibiotics and deoxyribonucleic-acid - equilibrium binding-studies on interaction of daunomycin with deoxyribonucleic-acid. *Biochemistry* **1982**, *21*, 3933-3940.
- Chaires, J. B.; Mergny, J. L.: Targeting DNA. *Biochimie* **2008**, *90*, 973-975.
- Clark, M.; Cramer, R. D.; Vanopdenbosch, N.: Validation of the general-purpose tripos 5.2 force-field. *Journal of Computational Chemistry* **1989**, *10*, 982-1012.
- Corrêa, D. S. *Docking de compostos da família das ariloxazinas em enzimas relacionadas com a malária*. 2010. 155f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.
- Davey, G. E.; Wu, B.; Dong, Y. C.; Surana, U.; Davey, C. A.: DNA stretching in the nucleosome facilitates alkylation by an intercalating antitumour agent. *Nucleic Acids Research* **2010**, *38*, 2081-2088.
- Ermondi, G.; Caron, G.: Recognition forces in ligand-protein complexes: Blending information from different sources. *Biochemical Pharmacology* **2006**, *72*, 1633-1645.
- Franklin, R. E.; Gosling, R. G.: Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature*

- 1953**, 171, 740-741.
- Gallois, B.; Destaintot, B. L.; Brown, T.; Hunter, W. N.: The structure of an idarubicin-d(tgatca) complex at high-resolution. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **1993**, 49, 311-317.
- Gerratana, B.: Biosynthesis, Synthesis, and Biological Activities of Pyrrolobenzodiazepines *Medicinal Research Reviews* **2010**, 1-40.
- Hartley, J. A.; Spanswick, V. J.; Brooks, N.; Clingen, P. H.; McHugh, P. J.; Hochhauser, D.; Pedley, R. B.; Kelland, L. R.; Alley, M. C.; Schultz, R.; Hollingshead, M. G.; Schweikart, K. M.; Tomaszewski, J. E.; Sausville, E. A.; Gregson, S. J.; Howard, P. W.; Thurston, D. E.: SJG-136 (NSC 694501), a novel rationally designed DNA minor groove interstrand cross-linking agent with potent and broad spectrum antitumor activity. Part 1: Cellular pharmacology, in vitro and initial in vivo antitumor activity. *Cancer Research* **2004**, 64, 6693-6699.
- Howerton, S. B.; Nagpal, A.; Williams, L. D.: Surprising roles of electrostatic interactions in DNA-ligand complexes. *Biopolymers* **2003**, 69, 87-99.
- Hyperchem, Release 6.01 for Windows, Molecular Modeling System, *Hypercube, Inc.*, Gainesville, FL, 2000.
- Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.: A genetic algorithm for flexible molecular overlay and pharmacophore elucidation. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **1995**, 9, 532-549.
- Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R.: Development and validation of a genetic algorithm for flexible ligand docking. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **1997**, 214, 154-COMP.
- Kamal, A.; Bharathi, E. V.; Ramaiah, M. J.; Dastagiri, D.; Reddy, J. S.; Viswanath, A.; Sultana, F.; Pushpavalli, S.; Pal-Bhadra, M.; Srivastava, H. K.; Sastry, G. N.; Juvekar, A.; Sen, S.; Zingde, S.: Quinazolinone linked pyrrolo 2,1-c 1,4 benzodiazepine (PBD) conjugates: Design, synthesis and biological evaluation as potential anticancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, 18, 526-542.
- Khandelwal, G.; Bhyravabhotla, J.: A Phenomenological Model for Predicting Melting Temperatures of DNA Sequences. *Plos One* **2010**, 5.
- Kool, E. T.: Hydrogen bonding, base stacking, and steric effects in DNA replication. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **2001**, 30, 1-22.
- Kool, E. T.; Morales, J. C.; Guckian, K. M.: Mimicking the structure and function of DNA: Insights into DNA stability and replication. *Angewandte Chemie-International Edition* **2000**, 39, 990-1009.
- Lee, C. H.; Hu, W. P.; Hong, C. H.; Yu, H. S.; Liao, W. T.; Chen, C. Y.; Chen, Y. L.; Chen, B. H.; Chen, G. S.; Wang, J. J.: Pyrrolo 2,1-c 1,4 benzodiazepine and indole conjugate (IN6CPBD) has better efficacy and superior safety than the mother compound DC-81 in suppressing the growth of established melanoma in vivo.

- Chemico-Biological Interactions* **2009**, *180*, 360-367.
- Leimgrub, W.; Batcho, A. D.; Schenker, F.: Structure of anthramycin. *Journal of the American Chemical Society* **1965**, *87*, 5793-&.
- Leimgrub, W.; Stefanov, V.; Schenker, F.; Karr, A.; Berger, J.: Isolation and characterization of anthramycin a new antitumor antibiotic. *Journal of the American Chemical Society* **1965**, *87*, 5791-&.
- Lisgarten, J. N.; Coll, M.; Portugal, J.; Wright, C. W.; Aymami, J.: The antimalarial and cytotoxic drug cryptolepine intercalates into DNA at cytosine-cytosine sites. *Nature Structural Biology* **2002**, *9*, 57-60.
- Malinina, L.; Soler-Lopez, M.; Aymami, J.; Subirana, J. A.: Intercalation of an acridine-peptide drug in an AA/TT base step in the crystal structure of d(CGCGAATTCGCG) (2) with six duplexes and seven Mg²⁺ ions in the asymmetric unit. *Biochemistry* **2002**, *41*, 9341-9348.
- Mallena, S.; Lee, M. P. H.; Bailly, C.; Neidle, S.; Kumar, A.; Boykin, D. W.; Wilson, W. D.: Thiophene-based diamidine forms a "super" AT binding minor groove agent. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 13659-13669.
- Mandal, S.; Moudgil, M.; Mandal, S. K.: Rational drug design. *European Journal of Pharmacology* **2009**, *625*, 90-100.
- Meyer, E. A.; Castellano, R. K.; Diederich, F.: Interactions with aromatic rings in chemical and biological recognition. *Angewandte Chemie-International Edition* **2003**, *42*, 1210-1250.
- Miranda, M.N. (2000). Algoritmos Genéticos: Fundamentos e Aplicações. Grupo de Telemática e Automação – UFRJ - <http://www.gta.ufrj.br/~marcio/genetic.html>
- MOPAC2009, James J. P. Stewart, Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA, <http://OpenMOPAC.net>, 2008
- Palchaudhuri, R.; Hergenrother, P. J.: DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Current Opinion in Biotechnology* **2007**, *18*, 497-503.
- Parkinson, G. N.; Lee, M. P. H.; Neidle, S.: Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nature* **2002**, *417*, 876-880.
- Pepper, C. J.; Hambly, R. M.; Fegan, C. D.; Delavault, P.; Thurston, D. E.: The novel sequence-specific DNA cross-linking agent SJG-136 (NSC 694501) has potent and selective in vitro cytotoxicity in human B-cell chronic lymphocytic leukemia cells with evidence of a p53-independent mechanism of cell kill. *Cancer Research* **2004**, *64*, 6750-6755.
- Perola, E.; Walters, W. P.; Charifson, P. S.: A detailed comparison of current docking and scoring methods on systems of pharmaceutical relevance. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* **2004**, *56*, 235-249.

Protein Data Bank (PDB): www.rcsb.org/pdb.

Protein Data Bank Summary (PDBsum): <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/>

- Reis, E.C. *Docking e análise do modo de ligação de três moléculas pequenas, um benzimidazol e dois compostos de crômio, nos sulcos do dna 5'-CGCGAATTCGCG-3'*. 2008. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Materiais) – Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”, Bauru, 2008.
- Remeta, D. P.; Mudd, C. P.; Berger, R. L.; Breslauer, K. J.: Thermodynamic characterization of daunomycin dna interactions - comparison of complete binding profiles for a series of dna host duplexes. *Biochemistry* **1993**, *32*, 5064-5073.
- Rettig, M.; Kamal, A.; Ramu, R.; Mikolajczak, J.; Weisz, K.: Spectroscopic and calorimetric studies on the DNA recognition of pyrrolo 2,1-c 1,4 benzodiazepine hybrids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, *17*, 919-928.
- Rettig, M.; Langel, W.; Kamal, A.; Weisz, K.: NMR structural studies on the covalent DNA binding of a pyrrolobenzodiazepine-naphthalimide conjugate. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2010**, *8*, 3179-3187.
- Rettig, M.; Weingarth, M.; Langel, W.; Kamal, A.; Kumar, P. P.; Weisz, K.: Solution Structure of a Covalently Bound Pyrrolo 2,1-c 1,4 benzodiazepine-Benzimidazole Hybrid to a 10mer DNA Duplex. *Biochemistry* **2009**, *48*, 12223-12232.
- Sawada, T.; Yoshizawa, M.; Sato, S.; Fujita, M.: Minimal nucleotide duplex formation in water through enclathration in self-assembled hosts. *Nature Chemistry* **2009**, *1*, 53-56.
- Schuerman, G. S.; Van Meervelt, L.: Conformational flexibility of the DNA backbone. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 232-240.
- Seng, H. L.; Ong, H. K. A.; Abd Rahman, R.; Yamin, B. M.; Tiekink, E. R. T.; Tan, K. W.; Maah, M. J.; Caracelli, I.; Ng, C. H.: Factors affecting nucleolytic efficiency of some ternary metal complexes with DNA binding and recognition domains. Crystal and molecular structure of Zn(phen)(edda). *Journal of Inorganic Biochemistry* **2008**, *102*, 1997-2011.
- Seng, H. L.; Von, S. T.; Tan, K. W.; Maah, M. J.; Ng, S. W.; Rahman, R.; Caracelli, I.; Ng, C. H.: Crystal structure, DNA binding studies, nucleolytic property and topoisomerase I inhibition of zinc complex with 1,10-phenanthroline and 3-methyl-picolinic acid. *Biometals* **2010**, *23*, 99-118.
- Stewart, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *Journal Molecular Modeling*, **2007**, *13*, 1173-1213.
- Thurston, D.E. *Chemistry and Pharmacology of Anticancer Drugs*. Capítulo 3. Florida:

- CRC Press Taylor & Francis Group, **2007**, 290p.
- Todd, R. C.; Lippard, S. J.: Structure of duplex DNA containing the cisplatin 1,2- $\{Pt(NH_3)_2\}^{2+}$ -d(GpG) cross-link at 1.77 angstrom resolution. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2010**, *104*, 902-908.
- Wang, Y. Z.; Schnetz-Boutaud, N. C.; Kroth, H.; Yagi, H.; Sayer, J. M.; Kurnar, S.; Jerina, D. M.; Stone, M. P.: 3'-intercalation of a N-2-dG 1R-trans-anti-Benzo c phenanthrene DNA adduct in an iterated (CG)₃ repeat. *Chemical Research in Toxicology* **2008**, *21*, 1348-1358.
- Watson, J. D.; Crick, F. H. C.: Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* **1953**, *171*, 964-967.
- Wells, G.; Martin, C. R. H.; Howard, P. W.; Sands, Z. A.; Laughton, C. A.; Tiberghien, A.; Woo, C. K.; Masterson, L. A.; Stephenson, M. J.; Hartley, J. A.; Jenkins, T. C.; Shnyder, S. D.; Loadman, P. M.; Waring, M. J.; Thurston, D. E.: Design, synthesis, and biophysical and biological evaluation of a series of Pyrrolobenzodiazepine - Poly(N-methylpyrrole) conjugates. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49*, 5442-5461.
- Wells, G.; Suggitt, M.; Coffils, M.; Baig, M. A. H.; Howard, P. W.; Loadman, P. M.; Hartley, J. A.; Jenkins, T. C.; Thurston, D. E.: Fluorescent 7-diethylaminocoumarin pyrrolobenzodiazepine conjugates: Synthesis, DNA interaction, cytotoxicity and differential cellular localization. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2008**, *18*, 2147-2151.
- Zhao, D. M.; Ma, C.; Sha, Y.; Liu, J. H.; Cheng, M. S.: (11aS)-8-Hydroxy-7-methoxy-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-pyrrolo 2,1-c - 1,4 benzodiazepine-3,11-dione. *Acta Crystallographica Section E-Structure Reports Online* **2008**, *64*, O266-U5014.

Anexos

Capítulo 3

Nesta seção estão descritos os resultados de redocking. Como mencionado no Capítulo 2, o processo de redocking é aquele onde o pesquisador determina os parâmetros necessários para reconstruir o complexo selecionado do *Protein Data Bank*. Além disso, os escores de redocking permitirão observar se os ligantes a serem testados se acomodam no sítio receptor da mesma forma que o ligante original, melhor ou pior. Também servirá para guiar os experimentos realizados com os ligantes 1, 2 e 3 descritos no Capítulo 3 e permitirá uma comparação com os diversos DNA-receptores.

3.1a.1 Redocking em 1vzk e 1g3x – sulco menor ou intercalação

Os receptores dos complexos 1vzk e 1g3x apresentam a mesma sequência, mas acomodam diferentes ligantes. Em 1vzk o ligante se acomoda no sulco menor, enquanto que em 1g3x, o ligante fica intercalado.

A Tabela 3.1a.1 apresenta o escore do redocking para 1vzk e 1g3x. A Figura 3.1a.1 permite verificar a sobreposição do ligante cristalográfico e da pose¹ obtida com o redocking.

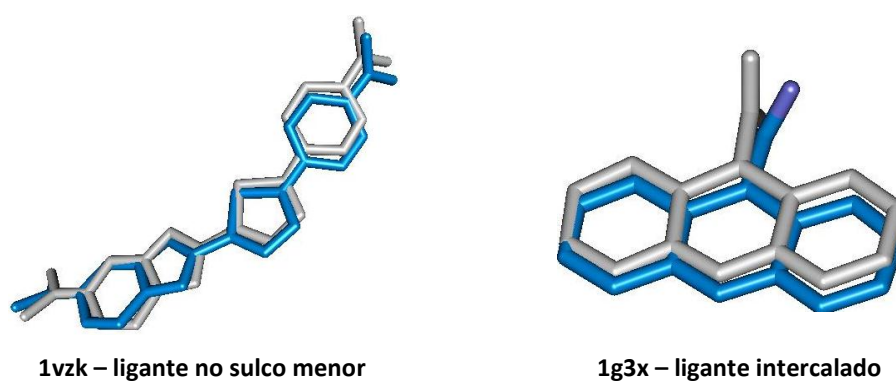


Figura 3.1a.1 Sobreposição dos ligantes cristalográficos de 1vzk e 1g3x com as respectivas soluções calculadas no redocking.

| Tabela 3.1a.1 Escores do redocking para 1vzk e 1g3x (kcal/mol) | | |
|--|-------------------|---------------------|
| Código PDB | Sequência 5' → 3' | Escore do redocking |
| 1vzk | CGCGAATTCGCG | 75,6 |
| 1g3x | CGCGAATTCGCG | 80,1 |

¹ Pose, orientação de um ligante em relação a um dado receptor, com uma dada conformação (Perola et al., 2002).

3.1a.2 Redocking em 2da8 - modo bisintercalado

A sobreposição da pose obtida com o redocking e a orientação do ligante original está apresentada na Figura 3.1a.2. O escore do redocking obtido foi 123,33 kcal/mol.

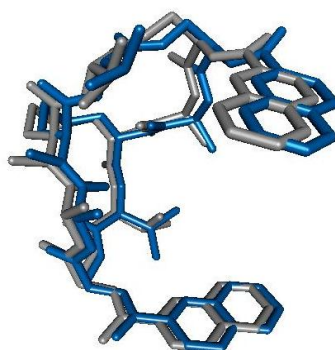


Figura 3.1a.2 Sobreposição da pose obtida com redocking e da pose do ligante original da 2da8.

O complexo original pôde ser reproduzido neste experimento. Assim, procedeu-se o estudo da bis-intercalação com os ligantes 1, 2 e 3.

3.1a.3 Redocking na 2ky7 – modo de ligação misto (aduto ou complexo)

Os resultados de redocking para formação de aduto e de complexo estão comparados a seguir. A Tabela 3.1a.2 apresenta os escores do redocking para o aduto e o complexo. A Figura 3.1a.3 mostra a sobreposição da pose obtida com o redocking e a orientação do ligante original, nos dois casos, e a sobreposição das poses obtidas para o aduto e o complexo.

| Tabela 3.1a.2 Escores do redocking para a formação de aduto e de complexo na 2ky7 (kcal/mol) | | |
|---|----------|---------------------|
| Sequência 5' → 3' | Teste | Escore do redocking |
| AACAATTGTT | aduto | 93,33 |
| | complexo | 95,23 |

Verificou-se que, para o ligante original, a aplicação de *constrain* para formação do aduto resultou em pose semelhante à formação do complexo. Os escores (Tabela 3.1a.2) também foram semelhantes nos dois testes. Isto mostra que as duas condições permitiram reconstruir o complexo da 2ky7. Sendo assim, o experimento foi feito com os ligantes 1, 2 e 3.

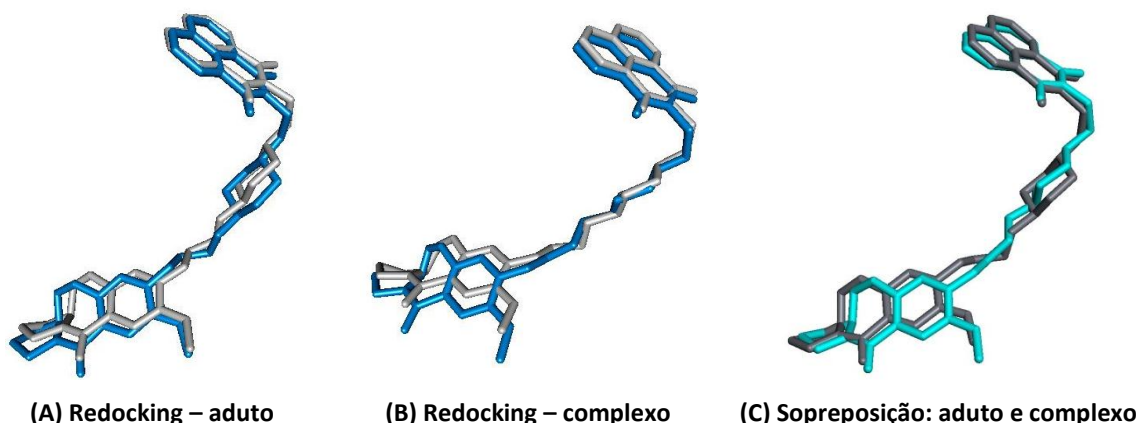


Figura 3.1a.3 Sobreposições dos resultados do redocking em 2ky7. (A) Ligante original e pose do aduto; (B) ligante original e pose do complexo; e (C) poses do aduto e do complexo.

3.1a.4 Redocking em 1d67, 1k9g e 2rou

Foi possível reproduzir a pose dos ligantes presentes nos complexos DNA-ligantes do banco de dados *Protein Data Bank*. Os escores do redocking para as estruturas 1d67, 1k9g, 2rou e 2da8 estão apresentados na Tabela 3.1a.3. Os valores para 1g3x e 2da8 estão novamente apresentados para comparação. As poses geradas no redocking estão apresentadas na Figura 3.1a.4 em sobreposição a estrutura inicial do ligante.

| Tabela 3.1a.3 Escores do redocking para os DNAs utilizados como alvo no estudo (kcal/mol) | | | |
|--|----------------|-------------------|---------------------|
| Código PDB | Entre as bases | Sequência 5' → 3' | Escore do redocking |
| 1g3x | AA | CGCGAATTCGCG | 80,1 |
| 1d67 | AC | TGATCA | 73,5 |
| 1k9g | GG | CCTCGG | 43,2 |
| 2rou | GC | GCGCGG | 41,6 |
| 2da8 | AT | GATATC | 123,33 |

O redocking foi considerado na comparação com os escores para os diversos cálculos realizados com diferentes estruturas de DNA. Para isso, o valor ΔE foi calculado para cada solução selecionada dos testes segundo o que foi descrito na Seção 2.7 do capítulo anterior.



Figura 3.1a.4 Sobreposição dos ligantes originais dos complexos 1d67, 1k9g e 2rou com as respectivas soluções selecionadas do redocking.

Nesta seção estão descritos os resultados do Experimento 1, descrito no Capítulo 3, Seção 3.1.1, para a avaliação dos modos de ligação ao DNA-receptor.

Ligante 1

3.2a.1 Receptor 1vzk – CGCGAATTCGCG

Tabela 3.2a.1 Interações do ligante 1 em 1vzk

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante | Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|-------------------|---------------|---------------|-------------------|---------------|---------------------|
| C21/O4' | 3,17 | C11a | A17/H | 2,26 | O1' |
| C21/O4' | 2,17 | H11A | C11/O4' | 2,71 | CM1' |
| A6/N3 | 2,62 | N10 | A18/O1P | 3,21 | CM2' |
| A6/H | 2,45 | N10 | T8/O2 | 3,07 | N15 |
| T7/O4' | 2,65 | N10 | T8/O2 | 2,05 | HN15 |
| C21/C4' | 3,27 | N4 | A17/O3' | 2,41 | HM23' |
| C21/H | 2,32 | N4 | A18/O1P | 2,59 | HM23' |
| T20/C4' | 3,17 | OC7 | C11/O4' | 2,39 | HM11' |
| T20/H | 2,09 | OC7 | C11/O4' | 2,30 | HM12' |
| A6/O4' | 2,50 | HC11 | T19/O2 | 2,71 | H132 |
| T8/O4' | 3,22 | C13 | T8/O4' | 2,35 | H131 |
| A17/C2 | 2,77 | OC2' | H1'/T20 | 3,24 | Centróide do anel A |
| A17/H | 1,95 | OC2' | H1'/C9 | 2,79 | Centróide O1'-C9' |
| A18/N3 | 2,20 | OC2' | H4'/A18 | 2,84 | Centróide C5'-C10' |
| A17/C2 | 2,93 | O1' | | | |

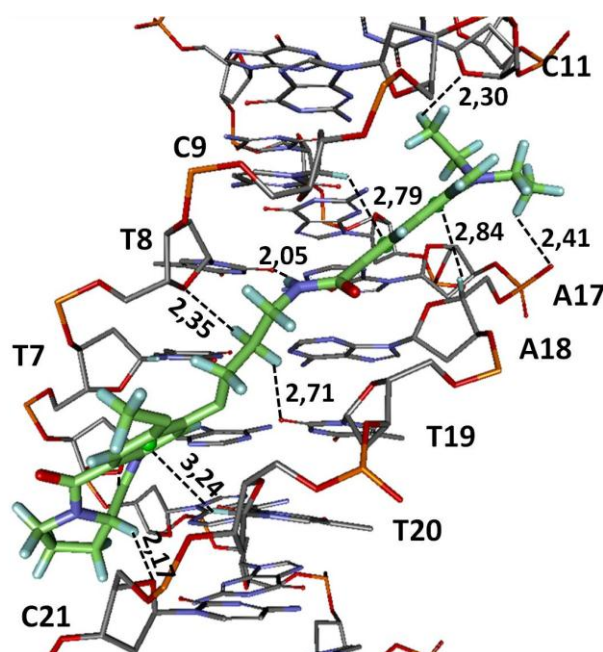


Figura 3.2a.1 Ligante 1 no sulco menor do DNA 1vzk.

3.2a.2 Receptor 1g3x – CGCGAATTCGCG

Tabela 3.2a.2 Interações do ligante 1 em 1g3x

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|--------------------|---------------|--------------------|
| A5/N6 | 2,37 | OC5 |
| A5/H61 | 2,54 | OC5 |
| A5/H62 | 2,44 | OC5 |
| A5/N7 | 3,11 | C3 |
| A5/N7 | 2,44 | H32 |
| T20/O4' | 3,21 | C13 |
| C21/C4' | 2,93 | OC2' |
| C21/C1' | 2,98 | OC2' |
| C21/H4' | 2,61 | OC2' |
| C21/H1' | 2,70 | OC2' |
| C21/H1' | 2,67 | O1' |
| G22/O4' | 3,12 | C8' |
| A5/O4' | 2,76 | H5' |
| G22/O4' | 2,15 | H8' |
| C23/O4' | 2,50 | H721' |
| T20/O4' | 2,45 | H131 |
| T20/O4' | 2,73 | H121 |
| A6/Centróide N1-C | 4,03 | Centróide anel A |
| A5/Centróide N1-C | 3,05 | N10 |
| A5/Centróide C4-N9 | 2,84 | HC11 |
| O2/C21 | 2,82 | Centróide O1'-C9' |
| H22/G4 | 2,14 | Centróide C5'-C10' |

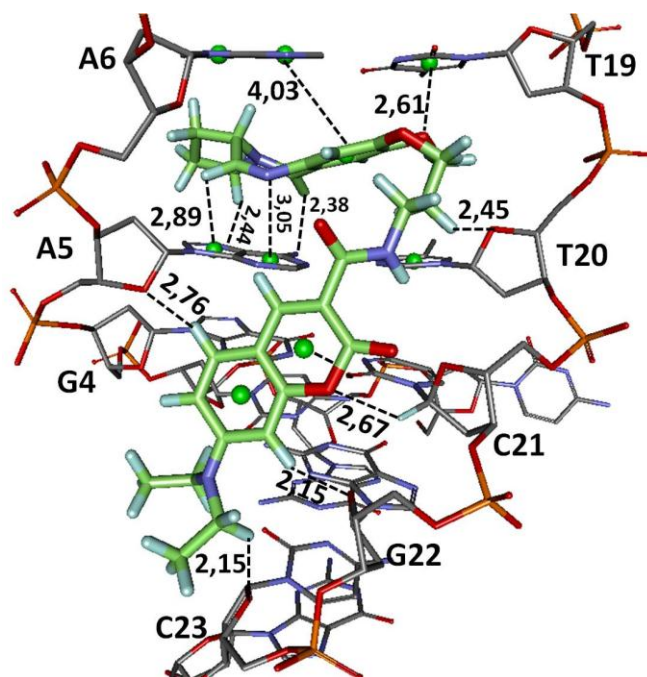


Figura 3.2a.2 Ligante 1 no DNA-receptor 1g3x.

Ligante 2

3.2a.3 Receptor 1vzk - CGCGAATTCGCG

| Tabela 3.1.2.1a Interações do ligante 2 em 1vzk | | |
|---|---------------|--------------------|
| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
| C21/O4' | 3,17 | C11a |
| C21/O4' | 2,17 | H11A |
| A6/H | 2,45 | N10 |
| C21/C4' | 3,27 | N4 |
| C21/H | 2,32 | N4 |
| A6/O4' | 2,50 | HC11 |
| A17/C2 | 2,77 | OC2' |
| A17/H | 1,95 | OC2' |
| A17/C2 | 2,93 | O1' |
| A17/H | 2,26 | O1' |
| C11/O4' | 2,71 | CM1' |
| T19/C4' | 3,18 | OC16 |
| T19/H | 2,25 | OC16 |
| T8/O2 | 3,07 | N15 |
| T8/H | 2,60 | N15 |
| T8/O2 | 2,05 | HN15 |
| A17/O3' | 2,41 | HM23' |
| C11/O4' | 2,39 | HM11' |
| C11/O4' | 2,30 | HM12' |
| T8/O4' | 2,35 | H131 |
| T20/H4' | 2,88 | Centróide anel A |
| C9/H1' | 2,79 | Centroide O1'-C9' |
| A18/H4' | 2,84 | Centroide C5'-C10' |

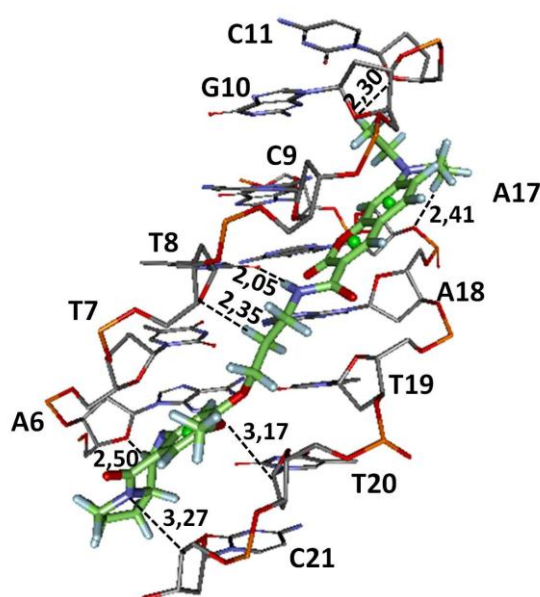


Figura 3.2a.3 Ligante 2 no sulco menor do DNA-receptor 1vzk.

3.2a.4 Receptor 1g3x - CGCGAATTCGCG

Tabela 3.1.2.2a Interações do ligante 2 em 1g3x

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|--------------------|---------------|------------------|
| A5/N6 | 2,67 | OC5 |
| A5/N3 | 3,23 | C12 |
| A5/N3 | 2,24 | H122 |
| T20/O4' | 3,05 | CM |
| T20/O4' | 2,59 | HM3 |
| T20/O4' | 2,61 | HM2 |
| C9/O4' | 3,08 | C5' |
| C9/O2 | 3,14 | C6' |
| A18/H5'1 | 2,77 | N7' |
| C9/O4' | 2,45 | H4' |
| C9/O4' | 2,41 | H5' |
| C9/O2 | 2,38 | H5' |
| C9/O2 | 2,52 | H6' |
| T19/O2 | 2,52 | H172 |
| T7/O2 | 2,71 | H182 |
| T8/O4' | 2,50 | H201 |
| A5/centroide C4-N9 | 2,66 | N10 |
| A5/centroide N1-C6 | 3,50 | Centroide anel A |
| A6/centroide N1-C6 | 3,86 | Centroide anel A |

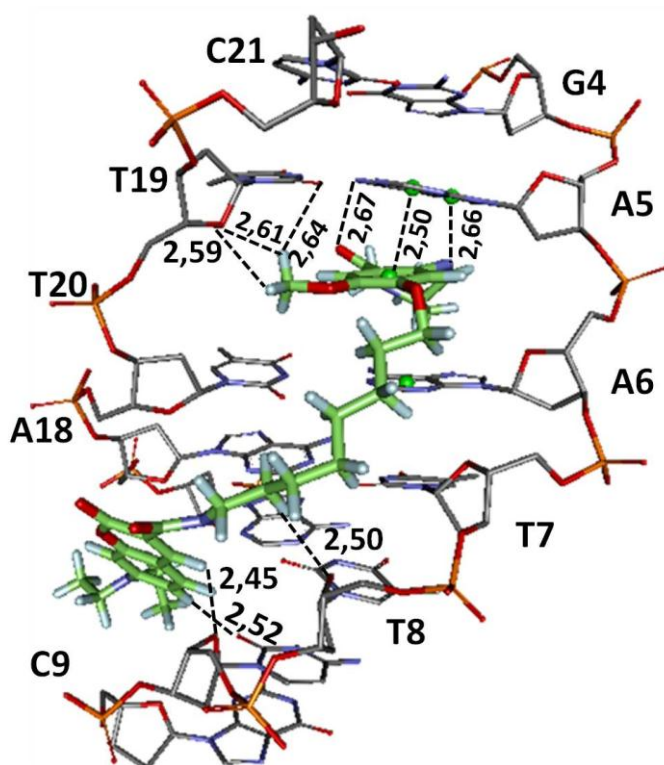


Figura 3.2a.4 Ligante 2 no DNA-receptor 1g3x.

Ligante 3

3.2a.5 Receptor 1vzk - CGCGAATTCGCG

Tabela 3.2a.5 Interações do ligante 3 em 1vzk

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante | Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|-------------------|---------------|---------------|-------------------|---------------|---------------|
| T8/O2 | 2,67 | HC9 | C21/O4' | 3,08 | N15 |
| C9/C4' | 2,97 | OC8 | C21/O4' | 2,15 | HN15 |
| C9/H | 2,57 | OC8 | G22/N3 | 2,61 | HM12' |
| C9/C4' | 3,13 | OC7 | C23/O4' | 2,71 | HM12' |
| /C9/H | 2,05 | OC7 | G22/O4' | 2,28 | HM13' |
| A17/N3 | 2,70 | HC11 | T19/O2 | 2,29 | H181 |
| T19/O4' | 2,31 | H122 | T20/O4' | 2,18 | H181 |
| T7/O2 | 3,02 | N17 | T19/O2 | 2,55 | H182 |
| T8/O4' | 3,18 | N17 | T20/O2 | 2,49 | H201 |
| T20/O4' | 3,21 | C18 | T7/O4' | 2,60 | H202 |
| G22/H | 2,46 | O1' | T19/C1' | 3,02 | OC14 |
| A5/N3 | 2,40 | H5' | T19/H | 2,05 | OC14 |
| G22/O4' | 3,15 | CM1' | T20/C5' | 2,98 | OC14 |
| G22/N3 | 3,21 | CM1' | T20/H | 2,01 | OC14 |
| T7/C5' | 2,87 | OC16 | T7/O2 | 2,45 | HN17 |
| T7/H | 2,39 | OC16 | T8/O4' | 2,31 | HN17 |
| T19/H | 2,05 | OC14 | | | |

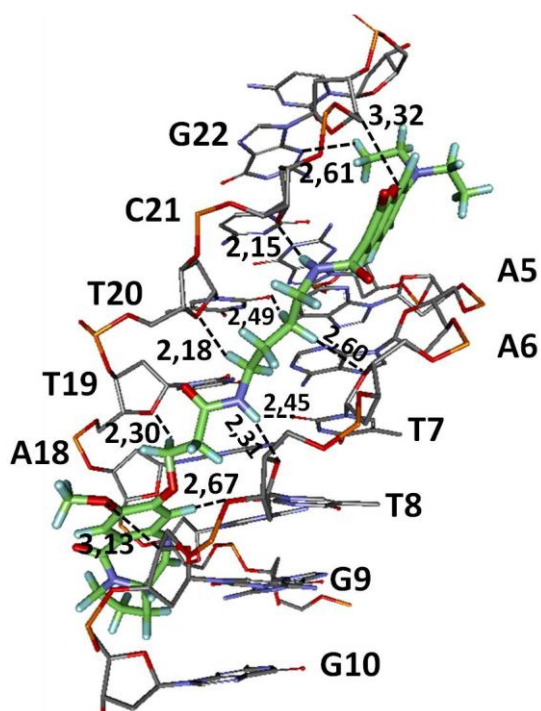


Figura 3.2a.5 Ligante 3 ligado no DNA-receptor 1vzk.

3.2a.6 Receptor 1g3x - CGCGAATTCGCG

Tabela 3.2a.6 Interações do ligante 3 em 1g3x

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante | Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|-------------------|---------------|---------------|---------------------|---------------|------------------|
| A6/N7 | 2.9425 | C1 | C11/O4' | 2.80599 | CM1' |
| A6/N7 | 2.27769 | H11 | A17/O3' | 3.03819 | CM2' |
| T19/H2'2 | 3.11604 | CM | A18/O1P | 3.25446 | CM2' |
| T20/O4' | 3.29139 | CM | T8/O2 | 2.49238 | HN15 |
| T20/O4' | 2.38973 | HM1 | A17/O3' | 2.21427 | HM22' |
| T19/O2 | 2.93458 | N17 | A18/O1P | 2.65403 | HM23' |
| G10/O1P | 2.54026 | OC2' | C11/O4' | 2.44155 | H712 |
| G10/H | 2.1256 | OC2' | C11/O4' | 2.77788 | HM12' |
| G10/C5' | 3.12602 | O1' | C11/O4' | 2.31819 | HM13' |
| G10/H5'1 | 2.07732 | O1' | T69/O2 | 2.63873 | HN17 |
| A18/O4' | 2.86527 | C5' | A6/Centroide N1-C6 | 4,43 | Centroide anel A |
| A17/N3 | 2.6839 | C6' | A6/Centroide N1-C6 | 2,88 | H11A |
| A18/O4' | 3.25922 | C6' | A6/Centroide C4-N9 | 2,82 | H11A |
| A18/O4' | 2.57268 | H5' | A5/Centroide C4-N9 | 2,50 | HC11 |
| A17/N3 | 2.23655 | H6' | T20/Centroide N1-C6 | 2,41 | HM1 |
| C11/O4' | 3.05548 | C71' | T19/Centroide N1-C6 | 2,92 | OC7 |

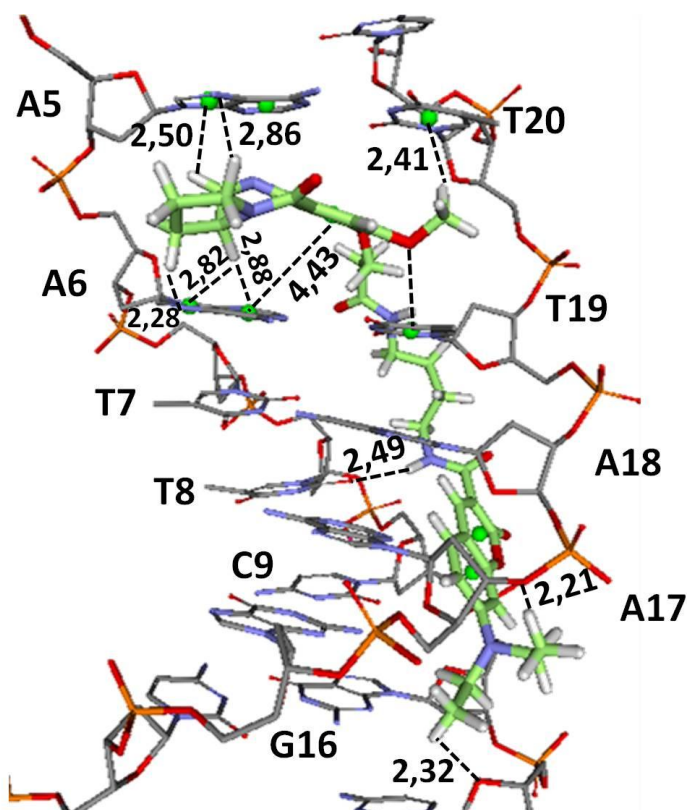


Figura 3.2a.6 Ligante 3 no DNA-receptor 1g3x.

Nesta seção estão descritos os resultados do Experimento 2, descrito no Capítulo 3, Seção 3.1.2, para a avaliação do modos de ligação **bis-intercalado** ao DNA-receptor.

LIGANTE 1

Tabela 3.3a.1 Interações do ligante 1 em 2da8

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|--------------------|---------------|-------------------|
| OC7 - /A2/C2 | 2,52 | OC7 |
| OC7 - /A2/H2 | 2,57 | OC7 |
| C12 - /T5/O2 | 2,98 | C12 |
| C13 - /T5/O4' | 3,18 | C13 |
| C13 - /T5/O2 | 3,23 | C13 |
| O1' - /T3/C4' | 3,29 | O1' |
| O1' - /T3/C1' | 3,27 | O1' |
| O1' - /T3/H4' | 2,51 | O1' |
| O1' - /T3/H1' | 2,53 | O1' |
| CM2' - /A2/O4' | 3,19 | CM2' |
| CM2' - /A2/H4' | 3,15 | CM2' |
| N15 - /A4/N3 | 3,07 | N15 |
| N15 - /A4/H1' | 2,24 | N15 |
| HN15 - /A4/N3 | 2,08 | HN15 |
| HM23' - /A2/O4' | 2,52 | HM23' |
| HM23' - /A2/N3 | 2,45 | HM23' |
| H141 - /T5/O4' | 2,58 | H141 |
| H131 - /T5/O4' | 2,41 | H131 |
| A2/centróide N1-C6 | 3,01 | OC7 |
| A4/centróide C4-N9 | 2,92 | N10 |
| A4/centróide N1-C6 | 3,38 | Centroide anel A |
| H1'/T3 | 2,78 | Centroide O1'-C9' |
| H1'/T3 | 2,68 | Centroide C5-C10 |
| O2/T3 | 2,62 | Centroide C5-C10 |

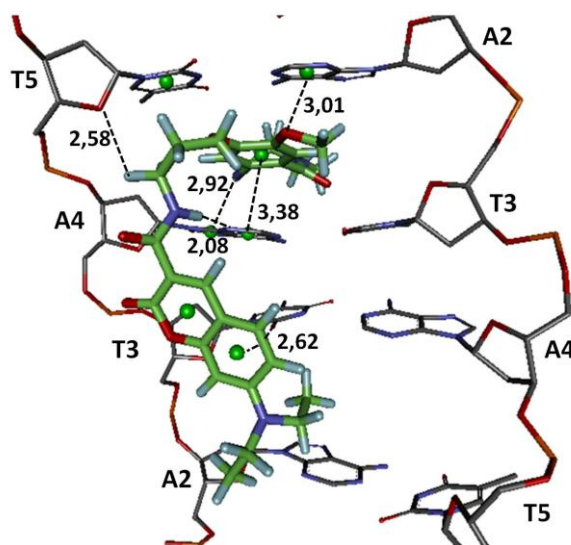
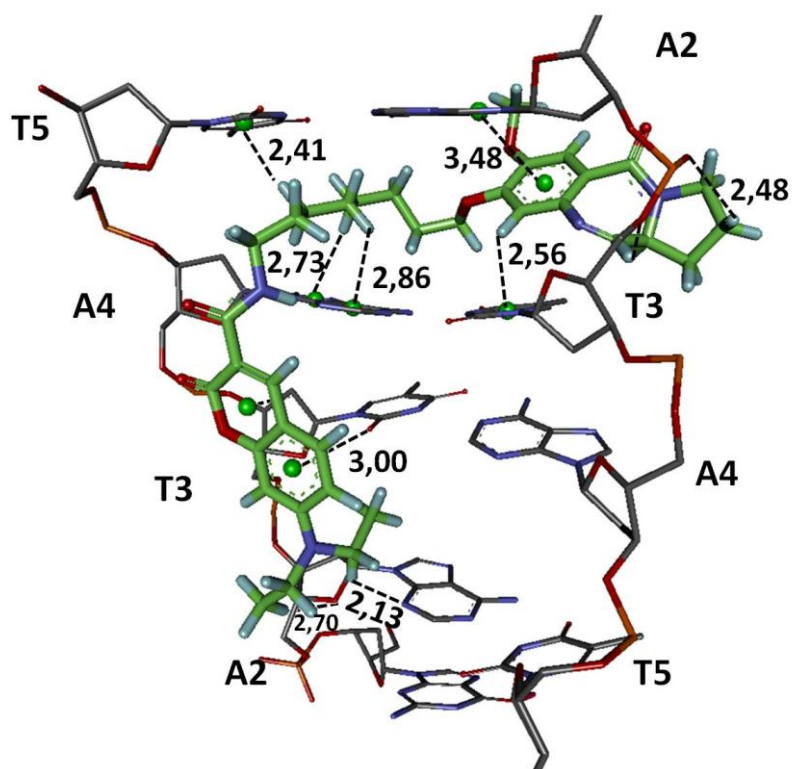


Figura 3.3a.1 Ligante 1 no DNA-receptor 2da8

LIGANTE 2

Tabela 3.3a.2 Interações do ligante 2 em 2da8

| Nucleotídeo/átomo | Distancia (Å) | Átomo ligante | Nucleotídeo/átomo | Distancia (Å) | Átomo ligante |
|-------------------|---------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------|
| T3/O5' | 2,75 | C11 | A4/N3 | 2,51 | N15 |
| G1/H2'' | 2,68 | OC5 | A4/N3 | 1,56 | HN15 |
| T3/OP2 | 3,08 | C2 | A2/O4' | 2,70 | HM22' |
| T3/OP2 | 2,48 | H22 | A2/O4' | 2,58 | H711' |
| T3/OP2 | 2,84 | C3 | A2/N3 | 2,13 | H711' |
| A2/C2' | 3,28 | N10 | T3/O4' | 2,47 | HM13' |
| A2/H2'' | 2,22 | N10 | A2/centróide C4-N9 | 3,48 | Centróide anel A |
| T3/O5' | 2,02 | HC11 | A2/H8 | 2,46 | Centróide anel A |
| T3/OP2 | 2,20 | H32 | T3/centróide N1-C6 | 2,56 | HC9 |
| A2/N7 | 3,08 | CM | T5/centróide N1-C6 | 2,41 | H191 |
| A2/N7 | 2,39 | HM1 | A4/centróide N1-C6 | 2,86 | H182 |
| A4/C4' | 2,98 | OC2' | A4/centróide C4-N9 | 2,73 | H172 |
| A4/H4' | 2,29 | OC2' | T3/H2'' | 2,98 | Centróide O1'-C9' |
| T3/H4' | 2,53 | O1' | T3/H1' | 2,51 | Centróide O1'-C9' |
| A2/N3 | 2,81 | C71' | T3/O2 | 3,00 | Centróide C5'-C10' |

**Figura 3.3a.2** Ligante 2 no DNA 2da8.

LIGANTE 3

Tabela 3.3a.3 Interações do ligante 3 em 2da8

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|--------------------|---------------|-------------------|
| T3/O2 | 2,46 | H122 |
| A4/N3 | 3,01 | C19 |
| T5/O4' | 3,18 | C21 |
| A4/H2'' | 2,66 | OC2' |
| A2/N7 | 2,90 | CM1' |
| T3/O4 | 3,16 | CM2' |
| T3/O4 | 2,09 | HM21' |
| A2/N7 | 2,58 | HM12' |
| A2/N7 | 2,39 | HM13' |
| A4/O4' | 2,56 | H182 |
| A4/N3 | 2,01 | H192 |
| T5/O4' | 2,13 | H211 |
| A2/H1' | 2,59 | N10 |
| A2/C1' | 3,19 | N10 |
| A2/centróide C4-N9 | 2,28 | HC11 |
| A4/centróide N1-C6 | 3,40 | Centróide O1'-C9' |
| A2/centróide N1-C6 | 3,92 | Centróide O1'-C9' |
| T3/centróide N1-C6 | 2,82 | H5' |

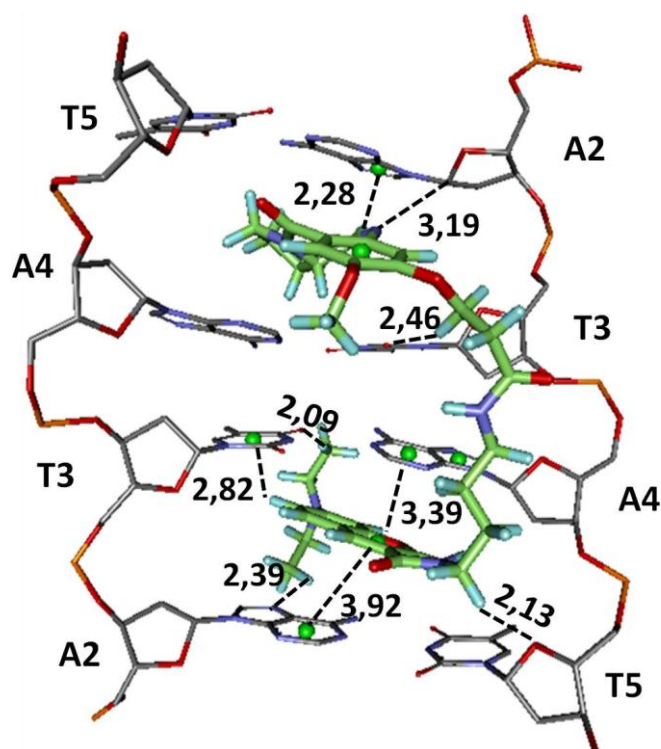


Figura 3.3a.3 Ligante 20 no DNA 2da8

Nesta seção estão descritos os resultados do Experimento 3, descrito no Capítulo 3, Seção 3.1.3, para a avaliação dos modos de ligação **misto** ao DNA-receptor, verificando também a possibilidade de formação de aduto ou complexo.

3.4a.1 Ligante 1 - Aduto

Tabela 3.4a.1 Interações do ligante 1 no teste com aduto (2ky7)

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante | Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|-------------------|---------------|---------------|-------------------|---------------|---------------|
| G8/N2 | 2,43 | C11 | T6/O4' | 2,34 | H5' |
| G8/N2 | 2,69 | C11a | A5/O4' | 3,29 | C72' |
| G8/N3 | 3,23 | C11a | A5/O4' | 3,31 | C71' |
| G8/N3 | 2,29 | H11A | T17/H5' | 2,42 | OC16 |
| T9/O4' | 2,68 | H11A | A5/O4' | 2,34 | H722' |
| G8/N2 | 2,44 | H12 | A5/N3 | 2,43 | HM22' |
| T9/H4' | 2,55 | N4 | A5/O4' | 2,36 | H711' |
| G8/C4' | 3,20 | OC7 | T7/O4' | 2,64 | H132 |
| G8/H4' | 2,25 | OC7 | T7/O2 | 2,50 | H132 |
| G8/O4' | 2,80 | C12 | A15/N3 | 2,26 | H131 |
| T7/O2 | 3,13 | C13 | A15/H2 | 2,06 | H131 |
| A15/N3 | 3,35 | C13 | G8/O4' | 2,44 | H122 |
| T16/C1' | 3,13 | OC2' | G8/O4' | 2,44 | H121 |
| T16/H1' | 2,13 | OC2' | G8/O3' | 3,37 | CM |
| T6/O4' | 3,27 | C5' | G8/O3' | 2,37 | HM1 |

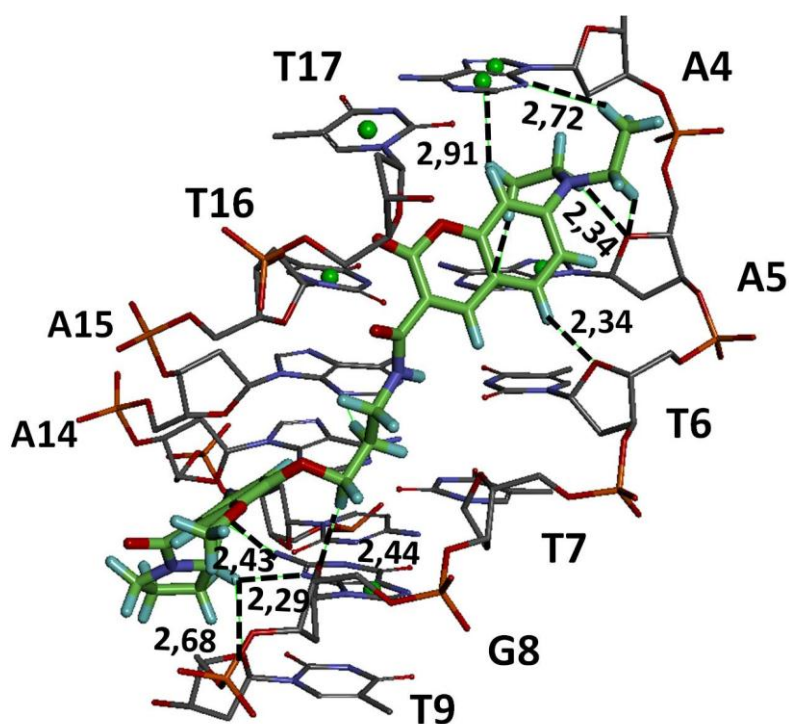


Figura 3.4a.1 Interações do ligante 1 no teste com aduto (2ky7).

3.4a.2 Ligante 1 - Complexo

Tabela 3.4a.2 Interações do ligante 1 no complexo com 2ky7

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante | Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|-------------------|---------------|---------------|--------------------|---------------|------------------|
| A5/N7 | 2,48 | H32 | A14/N3 | 3,03 | CM1' |
| T16/C1' | 2,91 | OC2' | A15/O4' | 2,81 | CM1' |
| T16/H1' | 1,83 | OC2' | T17/O4' | 2,96 | N15 |
| T16/C4' | 3,08 | O1' | T17/O4' | 2,14 | HN15 |
| T16/O4' | 2,47 | O1' | G8/O4' | 2,49 | H722' |
| T16/C1' | 2,80 | O1' | T7/O2 | 2,64 | H712' |
| T16/H4' | 2,68 | O1' | G8/N3 | 2,68 | H712' |
| T16/H1' | 2,30 | O1' | G8/N3 | 2,28 | H711' |
| T7/O4' | 2,95 | C5' | G8/N2 | 2,31 | HM11' |
| G8/O4' | 3,05 | C6' | A14/N3 | 2,47 | HM11' |
| T16/O4' | 3,04 | C8' | A15/O4' | 2,53 | HM12' |
| T7/O4' | 2,19 | H5' | A14/N3 | 2,62 | HM13' |
| T7/O3' | 2,48 | H5' | A15/O4' | 2,21 | HM13' |
| G8/O4' | 2,21 | H6' | T17/O2 | 2,56 | H131 |
| T16/O4' | 2,22 | H8' | A4/centróide N1-C6 | 3,56 | Centróide anel A |
| G8/O4' | 3,22 | C72' | A4/centróide N1-C6 | 2,89 | H11A |
| G8/N3 | 2,85 | C71' | A4/centróide C4-C9 | 2,40 | H11A |

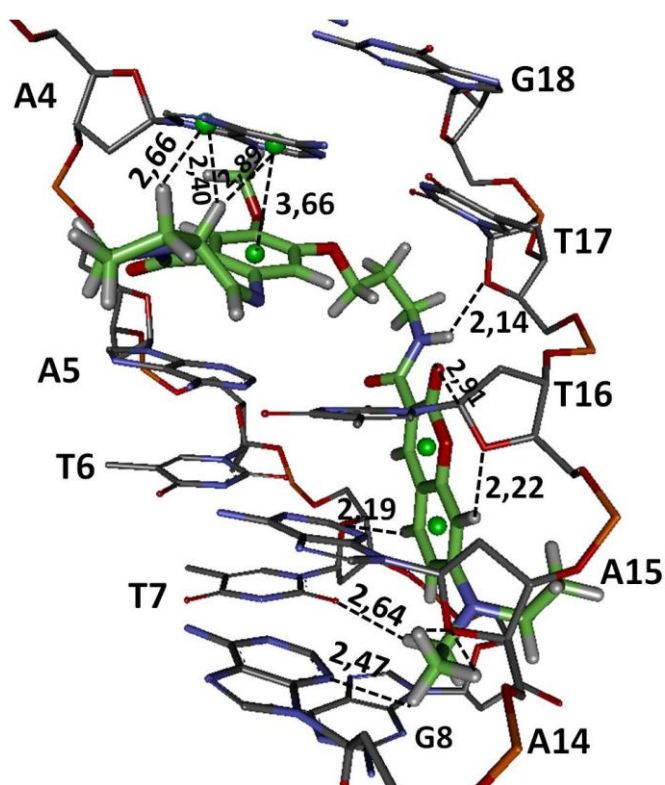


Figura 3.4a.2 Interações do ligante 1 no complexo com 2ky7.

3.4a.3 Ligante 2 - Aduto

| Tabela 3.4a.3 Interações do ligante 2 no teste com aduto (2ky7) | | |
|---|---------------|-------------------------|
| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
| G8/N2 | 2,27 | C11 |
| G8/N3 | 2,43 | H11A |
| T9/O4' | 2,74 | H11A |
| A14/H1' | 2,60 | N10 |
| T7/O2 | 2,91 | C12 |
| T7/O2 | 2,04 | H121 |
| G8/O4' | 2,42 | H122 |
| T17/O4' | 3,15 | C21 |
| A5/N7 | 3,11 | C71' |
| T16/N3 | 3,21 | HN15 |
| T16/H3 | 3,03 | HN15 |
| A5/N7 | 2,05 | H712' |
| T17/O4' | 2,42 | H212 |
| T7/O4' | 2,62 | H142 |
| T16/O2 | 2,50 | H191 |
| A4/Centroide N1-C6 | 3,53 | Centroide O1'-C9' |
| A5/Centroide N1-C6 | 3,33 | Centroide O1'-C9' |
| A4/Centroide C4-N9 | 3,65 | Centroide anel C5'-C10' |
| A5/Centroide C4-N9 | 3,86 | Centroide anel C5'-C10' |

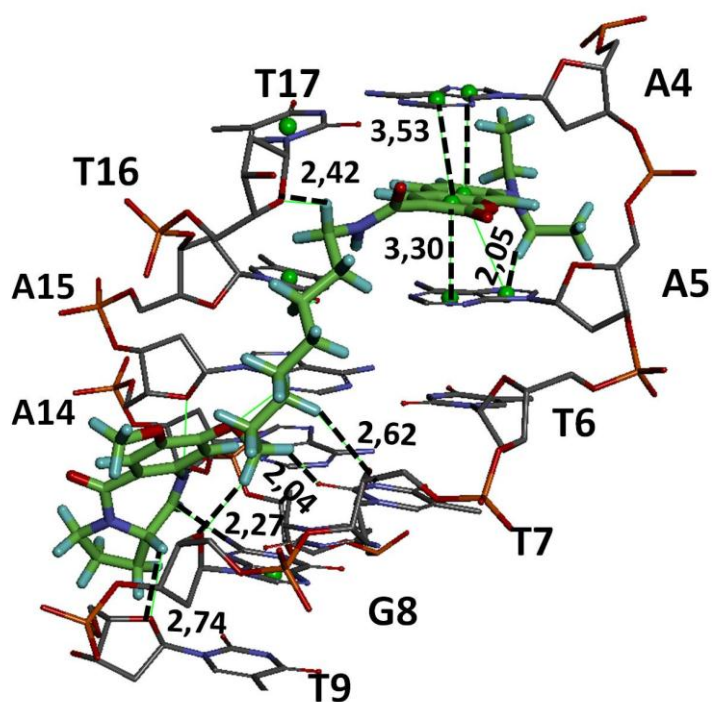


Figura 3.4a.3 Interações do ligante 2 no teste com aduto (2ky7).

3.4a.4 Ligante 2 - Complexo

Tabela 3.4a.4 Interações do ligante 2 no complexo com 2ky7

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante | Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|-------------------|---------------|---------------|--------------------|---------------|-------------------|
| A4/N7 | 2,44 | H11A | A14/O3' | 2,23 | HM22' |
| A5/O4' | 2,76 | HM2 | T10/O4' | 2,63 | HM13' |
| T16/O2 | 2,80 | C14 | T16/O2 | 2,37 | H142 |
| T16/O2 | 2,77 | C17 | T16/O2 | 2,06 | H172 |
| G8/O4' | 2,60 | C21 | T7/O4' | 2,34 | H201 |
| A14/C2 | 2,64 | OC2' | T7/O2 | 2,31 | H202 |
| G8/N2 | 2,65 | O1' | T17/O4' | 2,37 | H131 |
| G8/H | 2,00 | O1' | T16/O2 | 2,45 | H132 |
| A14/H1' | 2,73 | O1' | G8/O4' | 2,01 | H211 |
| A14/O4' | 2,57 | H8' | A4/centróide N1-C6 | 3,38 | Centróide anel A |
| A14/O3' | 3,06 | CM2' | A5/centróide N1-C6 | 3,77 | Centróide anel A |
| G8/N9 | 3,29 | N15 | A15/H4' | 2,92 | Centróide O1'-C9' |
| T7/O2 | 2,55 | HN15 | G8/N3 | 3,23 | Centróide O1'-C9' |

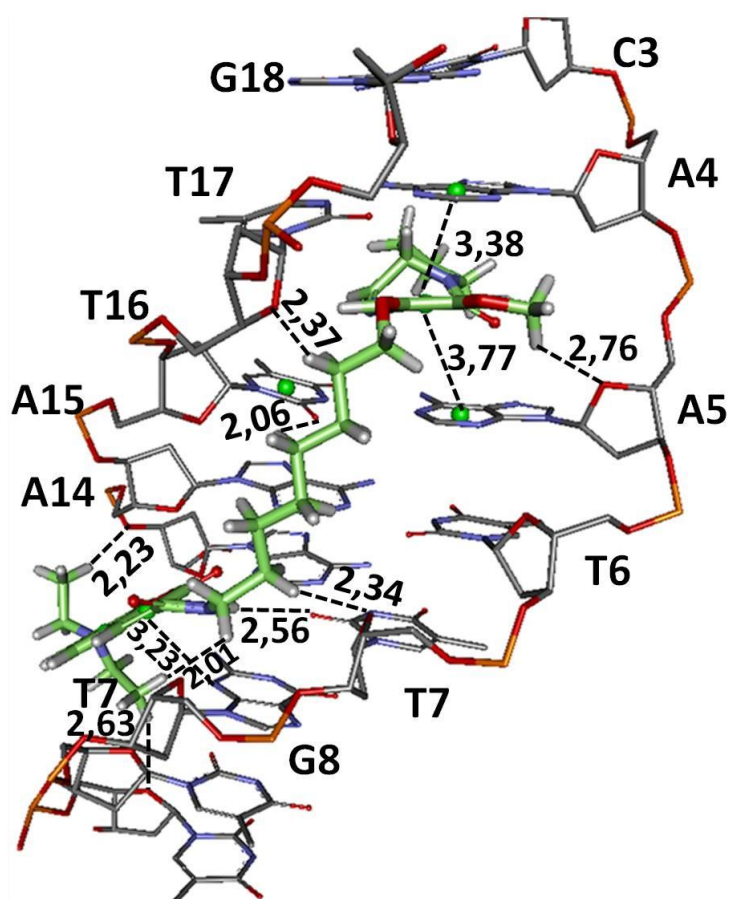
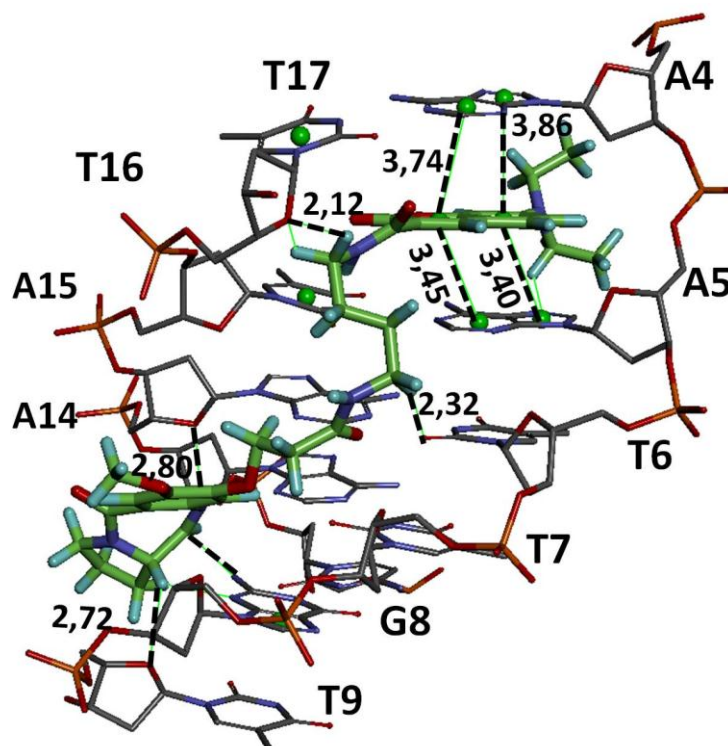


Figura 3.4a.4 Interações do ligante 2 no complexo com 2ky7

3.4a.5 Ligante 3 - Aduto

Tabela 3.4a.5 Interações do ligante 2 no teste com aduto (2ky7)

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante | Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|-------------------|---------------|---------------|--------------------|---------------|-------------------------|
| T7/O2 | 2,67 | HC9 | T16/O2 | 2,96 | N15 |
| A15/N3 | 2,87 | HC9 | T16/O2 | 2,00 | HN15 |
| G8/N2 | 2,31 | C11 | A5/N7 | 2,46 | H711 |
| G8/N3 | 3,20 | C11a | T17/O4' | 2,12 | H212 |
| G8/N3 | 2,39 | H11A | T6/O2 | 2,32 | H181 |
| T9/O4' | 2,72 | H11A | T7/O4' | 2,66 | H132 |
| G8/C2 | 3,27 | N10 | T17/O4' | 2,28 | H211 |
| A14/H2 | 3,08 | N10 | A15/C2 | 3,08 | OC14 |
| G8/C4' | 3,06 | OC7 | A15/H2 | 2,06 | OC14 |
| G8/H4' | 2,35 | OC7 | A4/Centroide N1-C6 | 3,73 | Centroide O1'-C9' |
| T6/O2 | 3,38 | C18 | A5/Centroide N1-C6 | 3,45 | Centroide O1'-C9' |
| T17/O4' | 2,62 | C21 | A4/Centroide C4-N9 | 3,86 | Centroide anel C5'-C10' |
| A5/N7 | 3,19 | C71' | A5/Centroide C4-N9 | 3,40 | Centroide anel C5'-C10' |

**Figura 3.4a.5** Interações do ligante 3 no teste com aduto (2ky7).

3.4a.6 Ligante 3 - Complexo

Tabela 3.4a.6 Interações do ligante 3 no complexo com 2ky7

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante | Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|-------------------|---------------|---------------|---------------------|---------------|------------------|
| A5/O4' | 2,86 | C6 | A5/O4' | 2,28 | HM3 |
| A5/O4' | 2,12 | HC6 | T16/O2 | 2,35 | N17 |
| A5/C5' | 3,09 | OC5 | T16/O2 | 3,03 | C20 |
| A5/H5'' | 2,47 | OC5 | G8/C5' | 3,25 | OC16 |
| A4/C2' | 2,90 | N4 | A15/N3 | 2,47 | HN15 |
| A4/H2' | 2,19 | N4 | A14/O3' | 2,57 | HM21' |
| A5/N1 | 2,96 | OC8 | T16/O2 | 2,31 | H202 |
| A5/C2 | 2,77 | OC8 | T16/O2 | 2,39 | H132 |
| A5/H2 | 2,79 | OC8 | T16/N3 | 2,73 | H132 |
| A5/N3 | 3,19 | OC7 | T16/O2 | 1,40 | HN17 |
| A4/C3' | 3,10 | H31 | A5/Centróide N1-C6 | 2,90 | Centróide anel A |
| A4/C2' | 3,05 | H31 | A4/Centróide N1-C6 | 4,34 | Centróide anel A |
| A4/H3' | 2,39 | H31 | T17/Centróide N1-C6 | 2,81 | H131 |
| A4/H2' | 2,49 | H31 | T16/Centróide N1-C6 | 3,00 | H132 |
| A4/H2'' | 3,21 | H31 | A4/Centróide c4-N9 | 2,89 | H11A |
| A5/O4' | 3,29 | CM | | | |

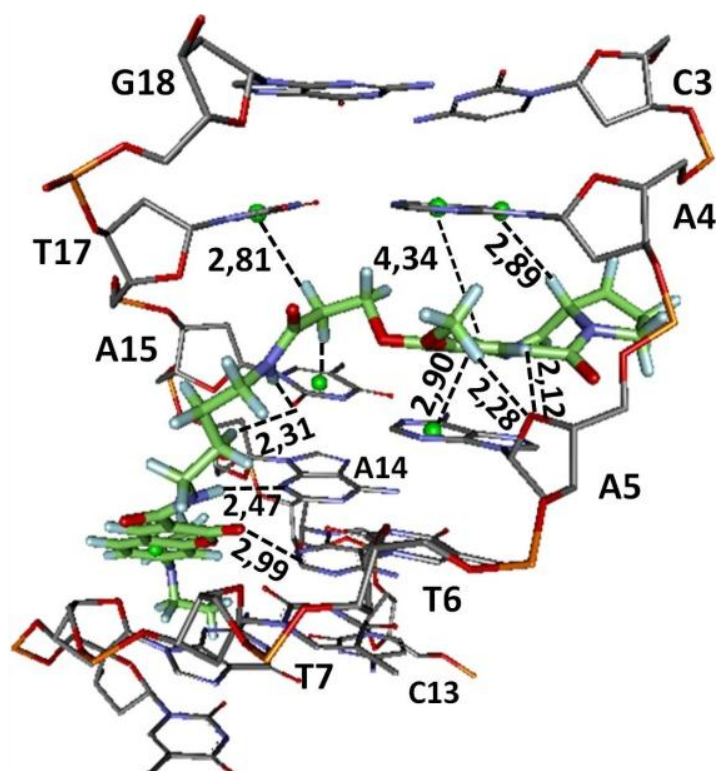


Figura 3.4a.6 Interações do ligante 3 no complexo com 2ky7

Nesta seção estão descritos os resultados do Experimento 4.1, descrito no Capítulo 3, Seção 3.2.1, com a finalidade de avaliar a preferência por diferentes sequências de bases, quando a ligação ocorre no modo intercalado. Neste caso os cálculos de docking tiveram como ligantes as porções PBD e cumarina separadamente e os DNA-receptores 1g3x, 1d67, 1k9g, 2rou e 1da8

PORÇÃO PIRROLBENZODIAZEPINA (PBD)

3.5a.1 Receptor 1g3x

| Tabela 3.5a.1 Interações da porção PBD em 1g3x | | |
|--|---------------|------------------|
| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
| T19/C2' | 3,20 | OC7 |
| T19/H2'2 | 2,63 | OC7 |
| T20/O4' | 2,77 | OC8 |
| T20/O4' | 1,81 | H8 |
| T19/C2' | 3,18 | OC8 |
| T19/H2'2 | 2,10 | OC7 |
| A5/centroide N1-C6 | 2,56 | HC11 |
| T19/centroide N1-C6 | 3,88 | Centroide anel A |
| T20/centroide N1-C6 | 3,67 | Centroide anel A |

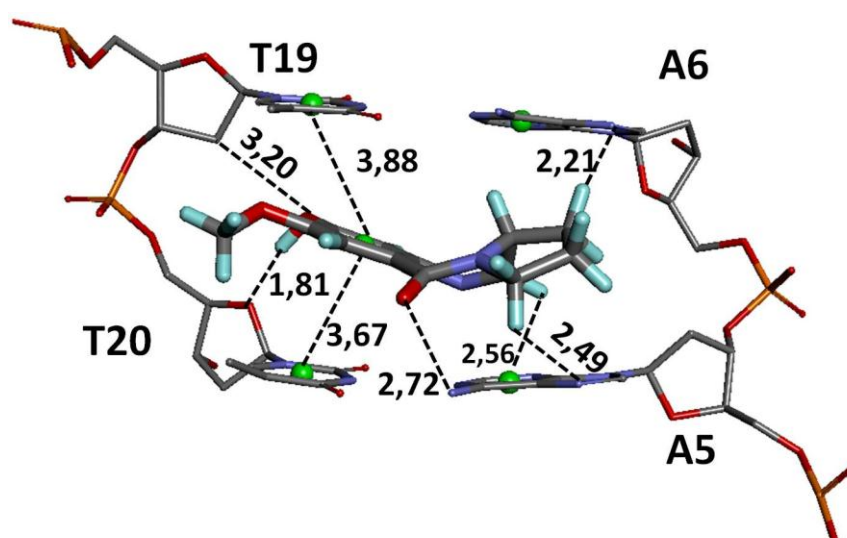


Figura 3.5a.1 Interações (em Å) da porção PBD no receptor 1g3x.

PORÇÃO PIRROLBENZODIAZEPINA (PBD)

3.5a.2 Receptor 1d67

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|--------------------|---------------|------------------|
| C5/O2 | 2,92 | C1 |
| C5/O2 | 2,07 | H11 |
| A6/O4' | 2,43 | H22 |
| A6/centroide N1-C6 | 2,97 | H11 |
| T1/centroide N1-C6 | 3,79 | Centroide anel A |
| G2/centroide N1-C6 | 3,79 | Centroide anel A |
| G2/centroide C4-N9 | 2,78 | H6 |

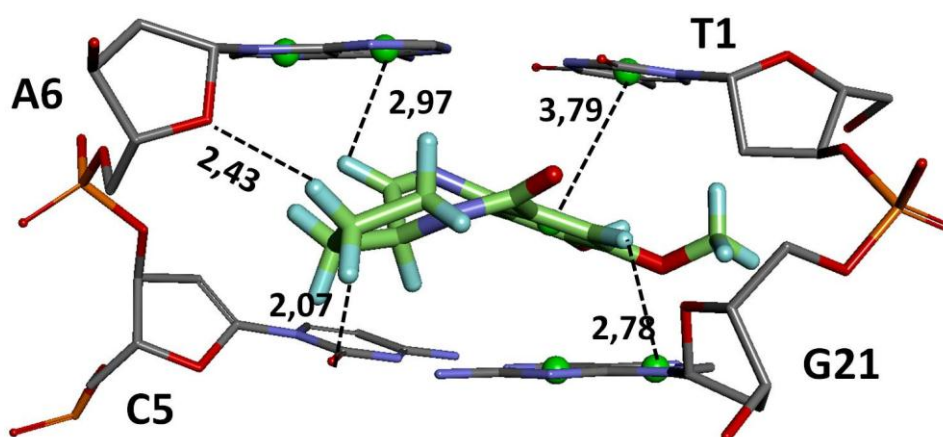


Figura 3.5a.2 Interações (em Å) da porção PBD no receptor 1d67.

PORÇÃO PIRROLBENZODIAZEPINA (PBD)

3.5a.3 Receptor 1k9g

Tabela 3.5a.3 Interações da porção PBD em 1k9g

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|--------------------|---------------|------------------|
| G6/O4' | 3,21 | CM |
| G6/O4' | 2,20 | HM1 |
| C2/O4' | 2,92 | C1 |
| C2/O4' | 2,16 | H12 |
| C2/O4' | 2,95 | C2 |
| C2/O4' | 2,27 | H22 |
| C2/O2 | 3,29 | C3 |
| G6/O6 | 2,99 | OC8 |
| C2/O2 | 2,46 | H11a |
| C2/centroide N1-C6 | 2,48 | H11 |
| G5/centroide C4-N9 | 2,92 | HM1 |
| G6/centroide C4-N9 | 2,76 | OC7 |
| G5/centroide N1-C6 | 3,48 | Centroide anel A |
| G6/centroide N1-C6 | 3,62 | Centroide anel A |

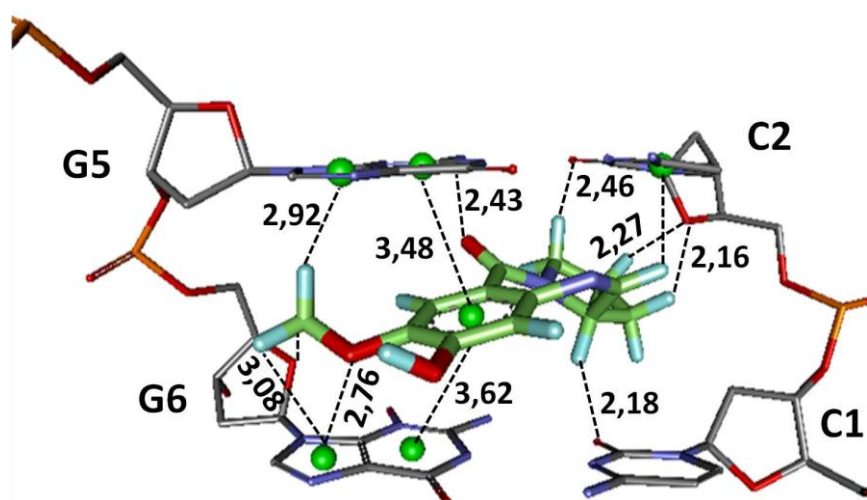


Figura 3.5a.3 Interações (em Å) da porção PBD no receptor 1k9g.

PORÇÃO PIRROLBENZODIAZEPINA (PBD)

3.5a.4 Receptor 2rou

Tabela 3.5a.4 Interações da porção PBD em 2rou

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|---------------------|---------------|------------------|
| C21/O4' | 3,05 | C1 |
| C21/O4' | 2,70 | H11 |
| C21/O5' | 2,58 | H12 |
| C21/O4' | 2,48 | H11 |
| C7/O4' | 2,71 | OC8 |
| C7/O4' | 2,72 | H8 |
| C7/centroide N1-C6 | 3,95 | Centroide anel A |
| G20/centroide N1-C6 | 4,02 | Centroide anel A |
| G20/centroide C4-N9 | 2,76 | H32 |
| C21/centroide N1-C6 | 2,43 | H11 |

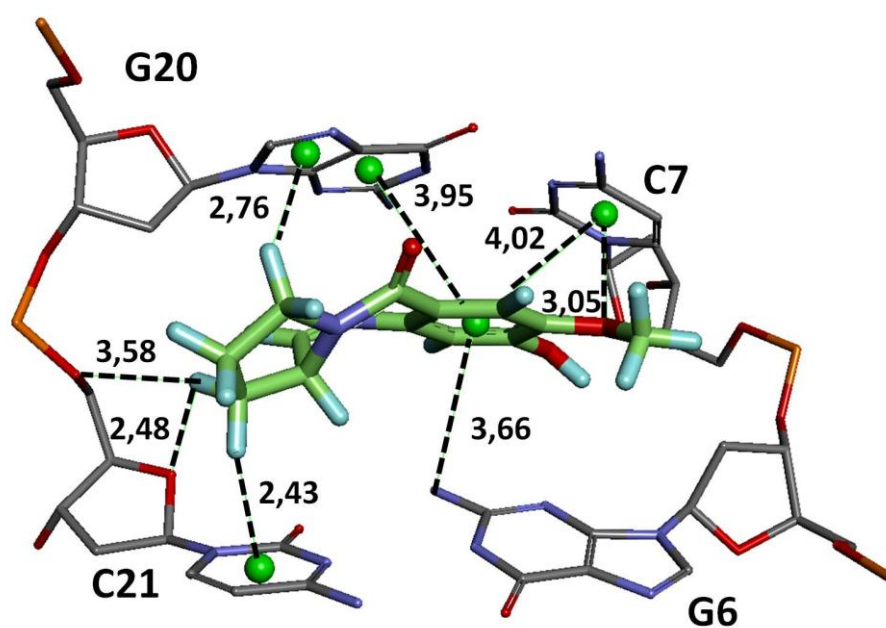


Figura 3.5a.4 Interações (em Å) da porção PBD no receptor 2rou.

PORÇÃO PIRROLBENZODIAZEPINA (PBD)

3.5a.5 Receptor 2da8

| Tabela 3.5a.5 Interações da porção PBD em 2da8 | | |
|--|---------------|------------------|
| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
| A4/N3 | 3,25 | C11a |
| A4/N3 | 2,20 | H11a |
| T5/O4' | 3,20 | C1 |
| T5/O4' | 2,41 | H12 |
| T5/O4' | 2,72 | H22 |
| T5/O4' | 2,78 | HC11 |
| T3/centroide N1-C6 | 2,83 | HM1 |
| A2/centroide N1-C6 | 2,29 | HM2 |
| A2/centroide C4-N9 | 3,79 | Centroide anel A |
| A4/centroide N1-C6 | 3,36 | Centroide anel A |

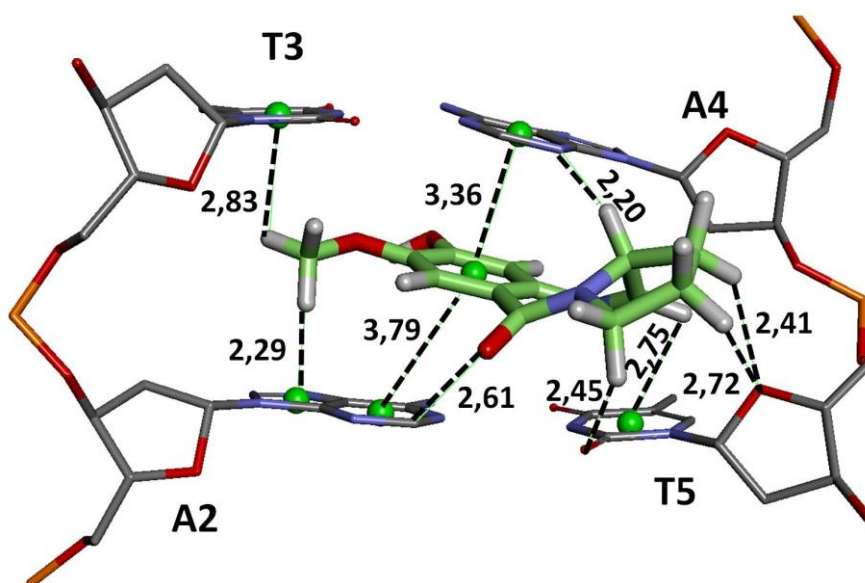


Figura 3.5a.5 Interações (em Å) da porção PBD no receptor 2da8.

PORÇÃO CUMARINA

3.5a.6 Receptor 1g3x

Tabela 3.5a.6 Interações da porção cumarina em 1g3x

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|---------------------|---------------|--------------------|
| A6/C1' | 3,18 | OC2' |
| T20/O4' | 3,18 | C72' |
| T19/O2 | 2,84 | C71' |
| A5/C2' | 3,06 | O3 |
| A5/H2'1 | 2,22 | O3 |
| A6/C8 | 3,14 | O3 |
| A6/H8 | 2,68 | O3 |
| T20/O4' | 2,10 | H721' |
| T20/O4' | 2,54 | HM11' |
| A6/centroide C4-N9 | 3,39 | Centroide O1'-C9' |
| A6/centroide N1-C6 | 3,51 | Centroide O1'-C9' |
| A5/centroide C4-N9 | 3,74 | Centroide O1'-C9' |
| A5/centroide N1-C6 | 3,86 | Centroide O1'-C9' |
| A6/centroide N1-C6 | 3,91 | Centroide C5'-C10' |
| A5/centroide N1-C6 | 3,99 | Centroide C5'-C10' |
| T20/centroide N1-C6 | 2,16 | H722' |
| T19/centroide N1-C6 | 2,84 | HM22' |

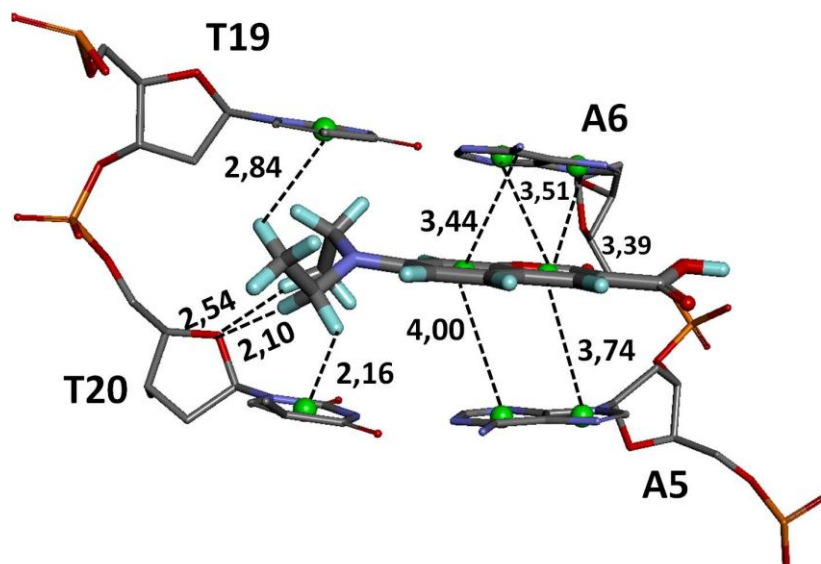


Figura 3.5a.6 Interações (em Å) da porção cumarina no receptor 1g3x.

PORÇÃO CUMARINA

3.5a.7 Receptor 1d67

Tabela 3.4.2.2a Interações da porção cumarina em 1d67

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|--------------------|---------------|--------------------|
| G2/O4' | 3,05 | C71' |
| G2/O4' | 3,28 | CM2' |
| A3/O4' | 3,04 | CM2' |
| C5/C2' | 3,05 | O3 |
| C5/H | 2,41 | O3 |
| A3/O4' | 2,37 | HM22' |
| G2/O4' | 2,57 | HM23' |
| A3/O4' | 2,74 | HM23' |
| G2/O4' | 2,16 | H712' |
| T1/O2 | 2,37 | H711' |
| C5/centróide N1-C6 | 3,97 | Centroide O1'-C9' |
| A6/centróide N1-C6 | 3,45 | Centroide O1'-C9' |
| A6/centróide N1-C6 | 3,92 | Centróide C5'-C10' |
| G2/centróide N1-C6 | 3,70 | Centróide C5'-C10' |
| G2/centróide N1-C6 | 2,88 | H6' |

Figura 3.5a.7 Interações (em Å) da porção cumarina no receptor 1d67.

PORÇÃO CUMARINA

3.5a.8 Receptor 1k9g

| Tabela 3.5a.8 Interações da porção cumarina em 1k9g | | |
|---|---------------|--------------------|
| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
| G6/N7 | 2,91 | C71' |
| G6/O6 | 3,11 | C71' |
| G6/O4' | 2,99 | CM2' |
| C1/C2' | 3,17 | O3 |
| C1/H | 2,19 | O3 |
| C2/H | 2,71 | O3 |
| G6/O5' | 2,67 | HM22' |
| G6/O4' | 2,25 | HM23' |
| G6/O6 | 2,17 | H711' |
| C1/centróide N1-C6 | 3,43 | Centróide O1'-C9' |
| G5/centróide N1-C6 | 3,91 | Centróide C5'-C10' |
| G6/centróide N1-C6 | 3,93 | Centróide C5'-C10' |
| G6/centróide C4-N9 | 2,66 | HM21' |
| G6/centróide C4-N9 | 2,42 | HM23' |
| G5/centróide C4-N9 | 2,53 | H721' |
| G5/centróide C4-N9 | 2,41 | H722' |
| G5/centróide N1-C6 | 2,62 | H722' |
| C2/centróide N1-C6 | 3,21 | H4' |

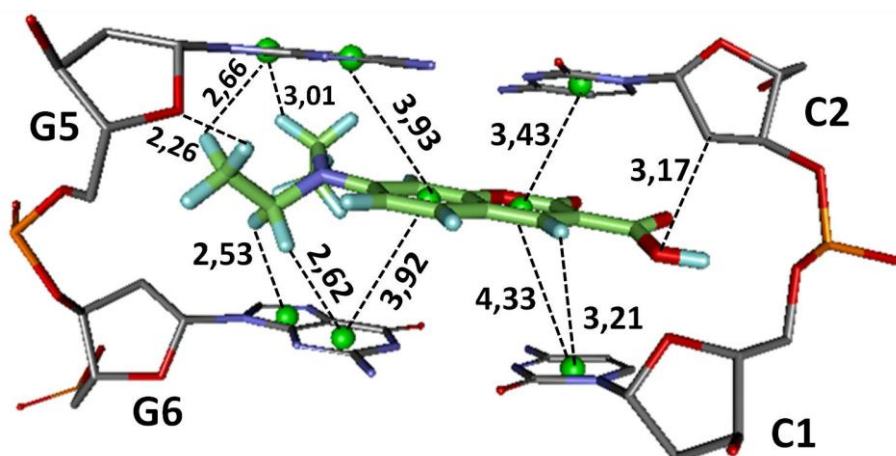


Figura 3.5a.8 Interações (em Å) da porção cumarina no receptor 1k9g.

PORÇÃO CUMARINA

3.5a.9 Receptor 2rou

Tabela 3.5a.9 Interações da porção cumarina em 2rou

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|---------------------|---------------|--------------------|
| C21/O4' | 3,12 | CM2' |
| C5/H2'' | 2,69 | O3 |
| G6/OP2 | 2,90 | O3 |
| G6/OP2 | 1,91 | HH3 |
| C21/O4' | 2,38 | HM21' |
| C21/O4' | 2,40 | HM12' |
| C7/centróide N1-C6 | 2,97 | H5' |
| G20/centróide C4-N9 | 2,90 | H711' |
| C21/centróide N1-C6 | 2,81 | HM13' |
| G6/centróide N1-C6 | 3,02 | Centróide O1'-C9' |
| G6/centróide C4-N9 | 3,50 | Centróide O1'-C9' |
| G6/centróide N1-C6 | 3,76 | Centróide C5'-C10' |

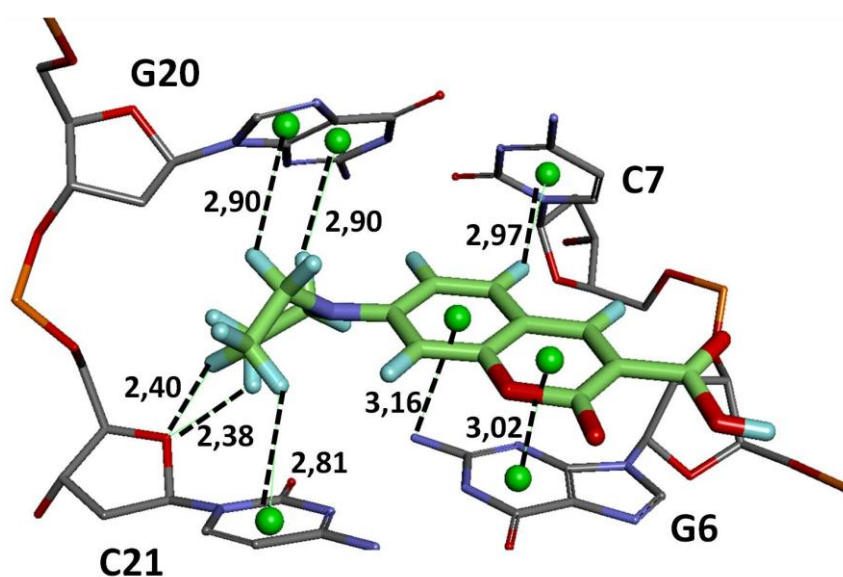


Figura 3.5a.9 Interações (em Å) da porção cumarina no receptor 2rou.

PORÇÃO CUMARINA

3.5a.10 Receptor 2da8

Tabela 3.5a.10 Interações da porção cumarina em 2da8

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|--------------------|---------------|--------------------|
| A4/O3' | 3,12 | CM1' |
| T5/O4' | 2,78 | CM1' |
| A4/N3 | 2,24 | H712' |
| T5/O4' | 2,62 | HM11' |
| A4/O3' | 2,48 | HM12' |
| T5/O4' | 2,04 | HM13' |
| A4/H2 | 3,07 | Centróide C5'-C10' |
| A4/centróide N1-C6 | 3,75 | Centróide C5'-C10' |
| T3/centróide N1-C6 | 3,80 | Centróide O1'-C9' |
| A2/centróide N1-C6 | 3,23 | Centróide O1'-C9' |

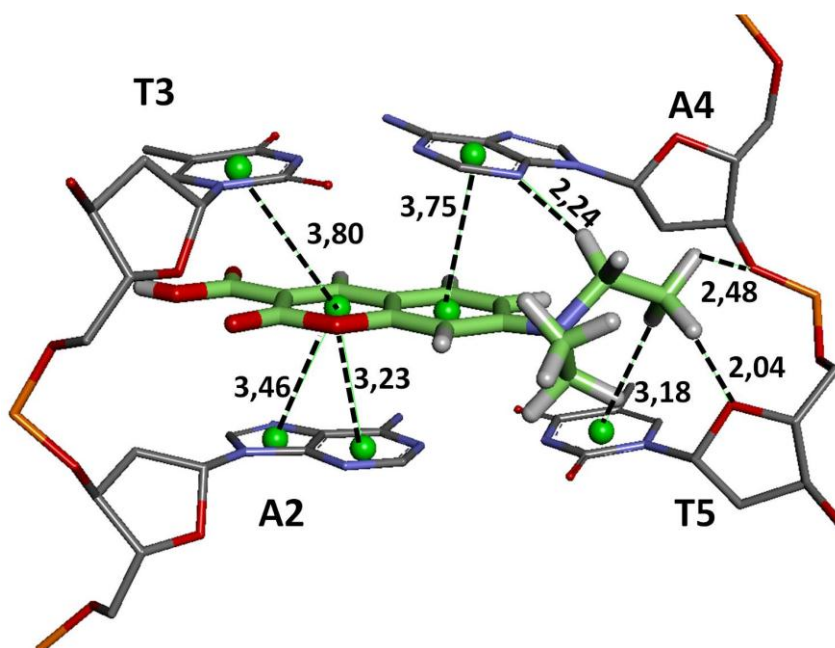


Figura 3.5a.10 Interações (em Å) da porção cumarina no receptor 2da8.

Nesta seção estão os resultados do Experimento 4.2, descritos no Capítulo 3, Seção 3.2.2, com a finalidade de avaliar o efeito da adição do espaçador às porções PBD ou cumarina. Os receptores-DNA são foram 1g3x, 1d67, 1k9g, 2rou e 1da8, com as porções funcionais e os espaçadores:

- (I) PBD + espaçador 1, PBD + espaçador 2 e PBD + espaçador 3; e
- (II) cumarina + espaçador 1, cumarina + espaçador 2 e cumarina + espaçador 3.

PORÇÃO PBD-ESPAÇADOR 1

3.6a.1 Receptor 1g3x

Tabela 3.6a.1 Interações de PBD-espaçador 1 em 1g3x

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante | Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|-------------------|---------------|---------------|---------------------|---------------|---------------|
| A6/N7 | 3,23 | C1 | C21/C4' | 3,06 | H21 |
| A6/N7 | 2,78 | H11 | C21/O4' | 2,22 | H21 |
| A6/H62 | 3,20 | H11 | C21/C1' | 3,28 | H21 |
| A5/N7 | 3,14 | C3 | C21/N1 | 3,26 | H21 |
| A5/N7 | 2,48 | H32 | C21/H5'2 | 2,20 | H21 |
| T20/O4' | 2,66 | C12 | A05/H2 | 2,56 | H22 |
| T20/O4' | 3,14 | C13 | T20/O2 | 2,49 | H22 |
| T20/O2 | 2,86 | C3' | T20/H1' | 3,22 | H22 |
| C21/O4' | 2,62 | C3' | C21/O4' | 2,96 | H22 |
| T20/O4' | 2,62 | H132 | C21/C2 | 3,12 | H22 |
| T19/O2 | 2,70 | H131 | C21/O2 | 2,87 | H22 |
| T20/O4' | 2,47 | H122 | C21/C4' | 3,03 | H23 |
| T20/O4' | 2,33 | H121 | C21/O4' | 2,34 | H23 |
| T20/O2 | 2,60 | H121 | C21/H5'2 | 3,19 | H23 |
| T20/O2 | 2,67 | H21 | C21/H4' | 2,83 | H23 |
| T20/H1' | 1,94 | H21 | T19/centróide N1-C6 | 2,63 | OC7 |
| C21/C5' | 3,06 | H21 | T20/centróide N1-C6 | 2,58 | HM2 |

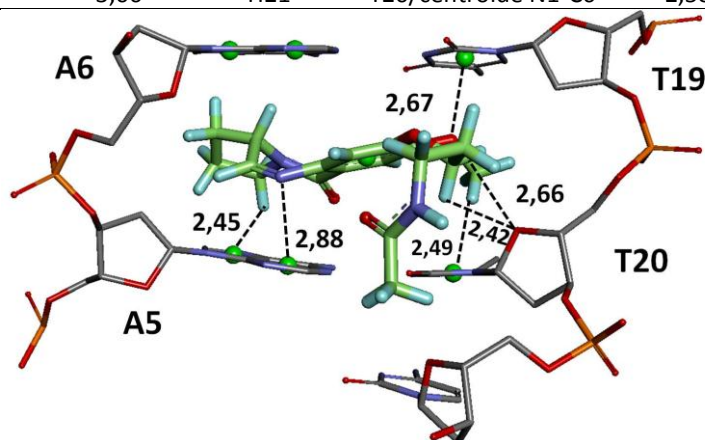


Figura 3.6a.1 Interações (em Å) de PBD-espaçador 1 em 1g3x.

PORÇÃO PBD-ESPAÇADOR 1

3.6a.1 Receptor 1d67

| Tabela 3.6a.2 Interações de PBD-espaçador 1 em 1d67 | | |
|---|---------------|---------------|
| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
| A6/C2 | 3,00 | OC5 |
| A6/H | 2,58 | OC5 |
| C5/O2 | 3,25 | C11a |
| C5/O2 | 2,26 | H11A |
| A6/O4' | 3,19 | C1 |
| A6/O4' | 2,58 | H12 |
| A6/O4' | 2,99 | C2 |
| A6/O4' | 2,08 | H22 |
| A6/O4' | 2,75 | HC11 |
| C5/N4 | 2,61 | OC16 |
| C5/C5 | 3,24 | OC16 |
| C5/H | 1,62 | OC16 |
| C5/H | 2,51 | OC16 |
| T1/centróide N1-C6 | 2,53 | HM2 |
| G2/centróide N1-C6 | 2,99 | HC6 |
| G2/centróide C4-N9 | 2,64 | HM1 |
| G6/centróide C4-N9 | 2,63 | HC11 |

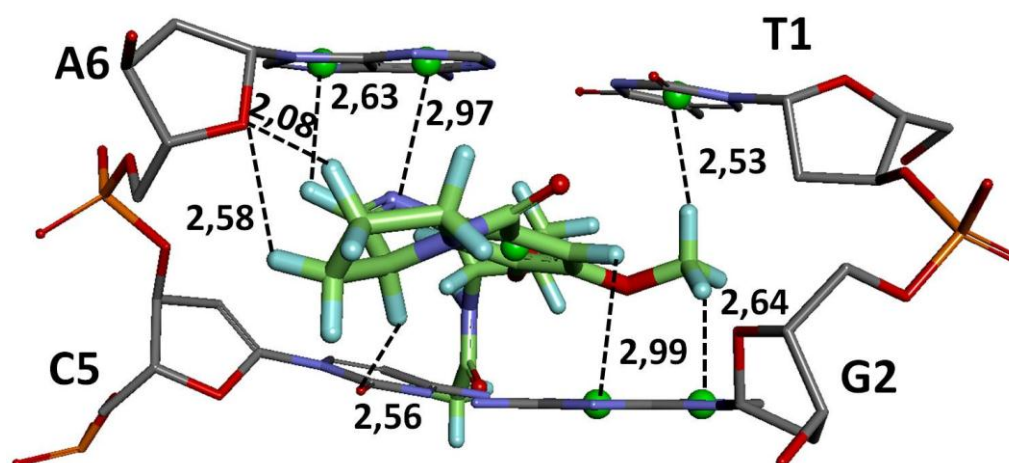


Figura 3.6a.2 Interações (em Å) de PBD-espaçador 1 em 1d67.

PORÇÃO PBD-ESPAÇADOR 1

3.6a.3 Receptor 1k9g

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|--------------------|---------------|------------------|
| G5/N7 | 3,04 | C3 |
| G5/N7 | 3,17 | N4 |
| G6/N2 | 2,78 | OC8 |
| G6/H | 2,40 | OC8 |
| G5/N7 | 2,37 | H32 |
| C2/O2 | 2,78 | C3' |
| T3/O4' | 2,62 | C3' |
| G5/N2 | 2,98 | OC16 |
| G5/H | 2,58 | OC16 |
| C2/O2 | 2,47 | H121 |
| T3/O4' | 2,45 | H22 |
| C2/O2 | 2,04 | H23 |
| T3/O4' | 2,10 | H23 |
| G6/centróide N1-C6 | 4,02 | Centróide anel A |
| G5/centróide N1-C6 | 2,74 | N10 |
| C1/centróide N1-C6 | 2,50 | HM3 |
| C2/centróide N1-C6 | 2,48 | OC7 |

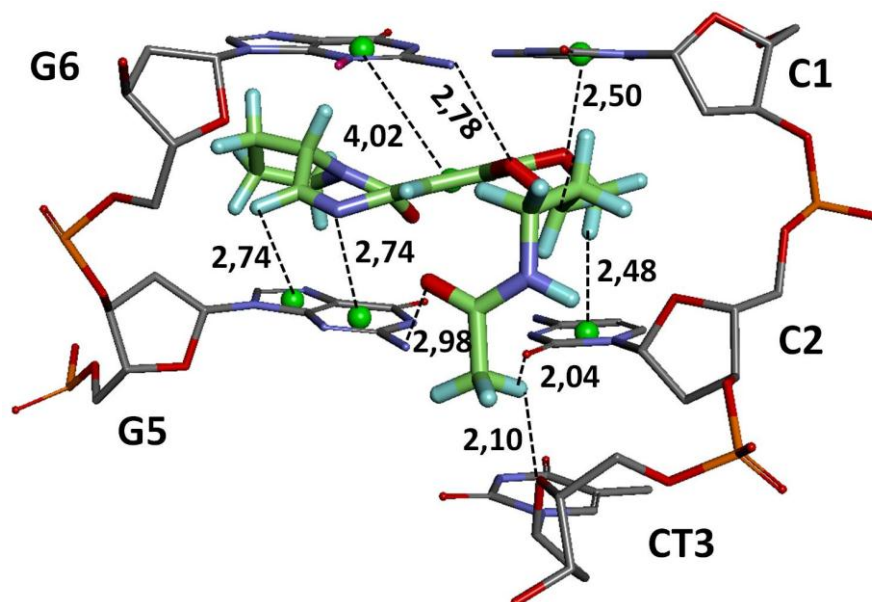


Figura 3.6a.3 Interações (em Å) de PBD-espaçador 1 em 1k9g.

PORÇÃO PBD-ESPAÇADOR 1

3.6a.4 Receptor 2rou

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|---------------------|---------------|------------------|
| C21/O4' | 3,24 | C11 |
| C21/O5' | 2,74 | H12 |
| C21/O4' | 2,52 | H12 |
| C21/O4' | 2,61 | HC11 |
| G6/N3 | 3,32 | C12 |
| C7/O4' | 3,01 | C12 |
| C7/O4' | 2,74 | C13 |
| G22/N3 | 3,13 | C3' |
| G6/N3 | 2,74 | N15 |
| G6/N3 | 2,04 | HN15 |
| C7/O4' | 2,10 | H132 |
| C7/O4' | 2,78 | H131 |
| G6/N3 | 2,26 | H122 |
| C7/O4' | 2,47 | H121 |
| G22/N3 | 2,58 | H21 |
| G22/N3 | 2,77 | H23 |
| C23/O4' | 2,57 | H23 |
| G20/centróide N1-C6 | 3,47 | Centróide anel A |
| C21/centróide N1-C6 | 2,32 | H11 |
| C7/centróide N1-C6 | 2,89 | OC7 |

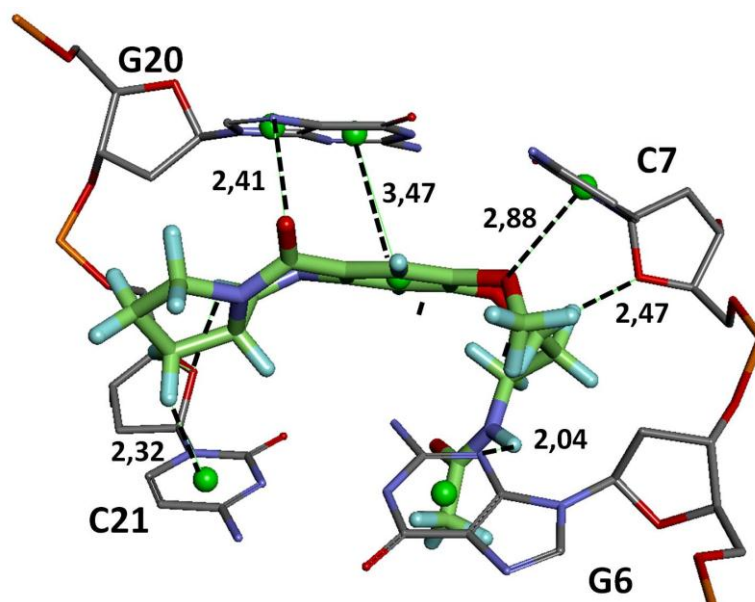


Figura 3.6a.4 Interações (em Å) de PBD-espaçador 1 em 2rou.

PORÇÃO PBD-ESPAÇADOR 1

3.6a.5 Receptor 2da8

| Tabela 3.6a.5 Interações de PBD-espçador 1 em 2da8 | | |
|--|---------------|------------------|
| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
| T5/O4' | 3,05 | C11 |
| A2/C2 | 3,23 | OC5 |
| A2/H2 | 2,42 | OC5 |
| A4/N3 | 2,73 | H11A |
| T5/O4' | 2,98 | C2 |
| T5/O4' | 2,09 | H22 |
| A4/O3' | 2,56 | HC11 |
| T5/O4' | 2,31 | HC11 |
| G1/N7 | 2,79 | C3' |
| A2/N7 | 3,13 | C3' |
| T3/O4 | 2,77 | H122 |
| A2/N7 | 2,11 | H21 |
| A2/H62 | 2,19 | H21 |
| G1/N7 | 2,76 | H22 |
| G1/N7 | 2,56 | H23 |
| A2/centróide N1-C6 | 3,82 | Centróide anel A |
| T3/centróide N1-C6 | 2,68 | HM3 |
| A4/centróide C4-N9 | 3,03 | HC9 |
| A4/centróide N1-C6 | 3,48 | Centróide anel A |
| T5/centróide N1-C6 | 2,65 | N10 |

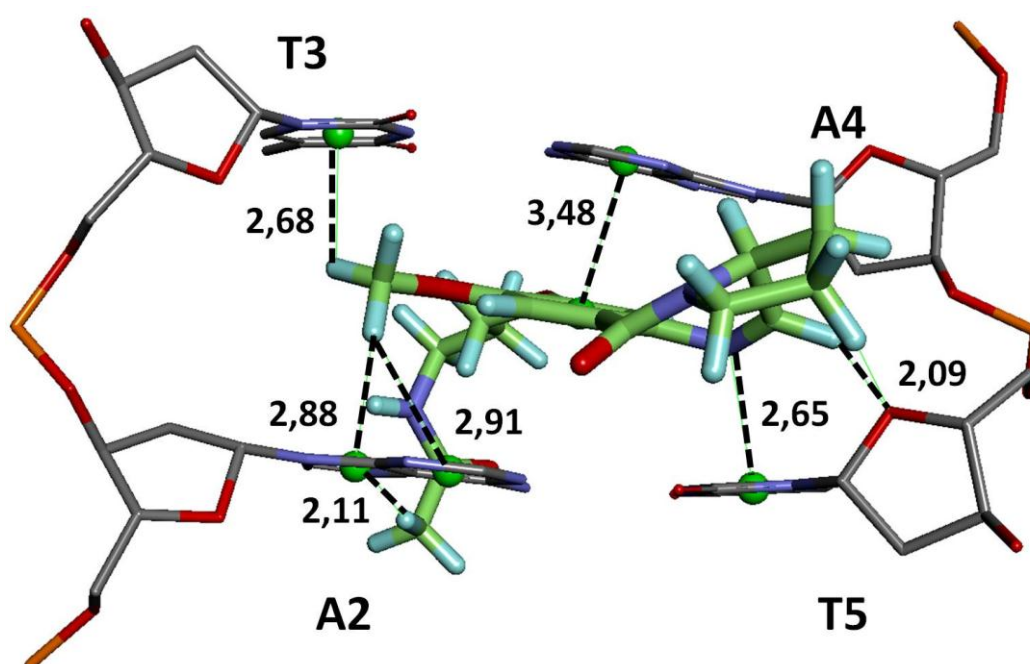


Figura 3.6a.5 Interações (em Å) de PBD-espçador 1 em 2da8.

PORÇÃO PBD-ESPAÇADOR 2

3.6a.6 Receptor 1g3x

Tabela 3.6a.6 Interações de PBD-espaçador 2 em 1g3x

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante | Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|-------------------|---------------|---------------|---------------------|---------------|------------------|
| A5/N7 | 3,05 | C11a | T19/O5' | 3,23 | N15 |
| A5/N7 | 2,13 | H11A | T20/H | 2,14 | N15 |
| A5/N7 | 3,17 | N4 | T19/O2P | 2,01 | HN15 |
| T20/O4' | 3,33 | C13 | T19/O5' | 2,53 | HN15 |
| A6/N1 | 2,53 | H122 | T19/N3 | 2,64 | H141 |
| T19/N3 | 2,59 | H122 | T20/O4' | 2,04 | H172 |
| A6/O4' | 2,99 | CM | T20/O2P | 2,20 | H191 |
| A6/O4' | 2,29 | HM2 | T20/O4' | 2,62 | H132 |
| T20/O4' | 2,95 | C17 | T20/O2 | 2,67 | H132 |
| T20/O2P | 3,17 | C19 | T19/O1P | 2,39 | H31 |
| T19/O1P | 3,31 | C3' | T19/O5' | 2,27 | H33 |
| T19/O5' | 2,93 | C3' | T20/O2P | 2,72 | H33 |
| T20/O2P | 3,08 | C3' | A5/centróide N1-C6 | 3,62 | Centróide anel A |
| T20/O2P | 2,51 | C16 | A5/centróide C4-N9 | 3,30 | Centróide anel A |
| T20/O2P | 2,64 | OC16 | A6/centróide N1-C6 | 4,13 | Centróide anel A |
| T20/H | 2,19 | OC16 | T19/centróide N1-C6 | 2,57 | H141 |
| T19/O2P | 3,02 | N15 | T20/centróide N1-C6 | 2,72 | H142 |

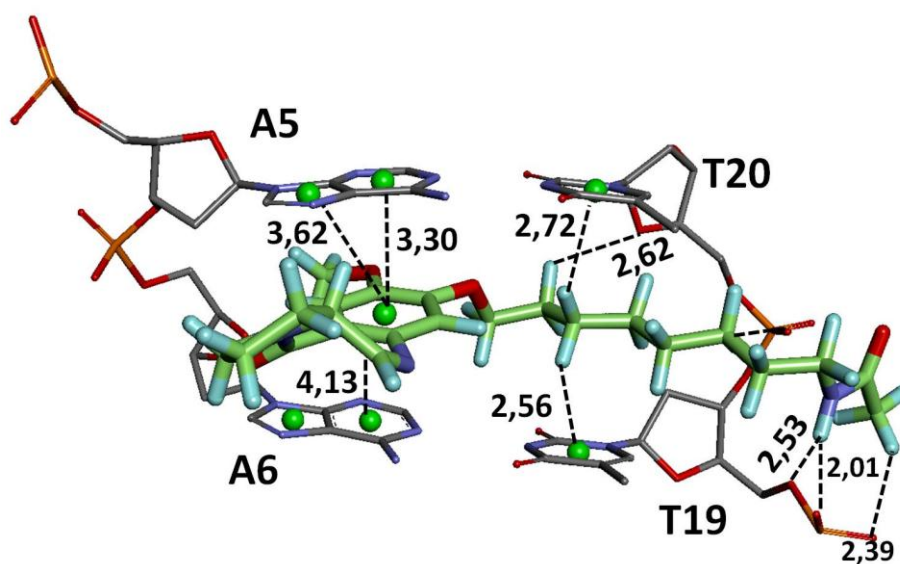


Figura 3.6a.6 Interações (em Å) de PBD-espaçador 2 em 1g3x.

PORÇÃO PBD-ESPAÇADOR 2

3.6a.7 Receptor 1d67

| Tabela 3.6a.7 Interações de PBD-espçador 2 em 1g3x | | |
|--|---------------|------------------|
| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
| A6/N6 | 2,41 | OC5 |
| A6/H | 2,35 | OC5 |
| G2/O6 | 3,08 | C11a |
| G2/O6 | 2,20 | H11a |
| G2/N3 | 3,13 | OC8 |
| G2/H | 2,60 | OC8 |
| A3/O4' | 2,97 | C13 |
| A6/O4' | 2,52 | CM |
| A6/O4' | 2,19 | HM3 |
| A6/O4' | 2,45 | HM1 |
| A6/O4' | 2,64 | HM2 |
| A3/O2P | 3,09 | C3' |
| A3/O2P | 2,33 | OC16 |
| G2/O1P | 3,18 | N15 |
| G2/O1P | 2,16 | HN15 |
| G2/O3' | 2,53 | H172 |
| A3/O4' | 2,55 | H131 |
| A3/O4' | 2,37 | H132 |
| G2/O5' | 2,51 | H31 |
| A3/O2P | 2,47 | H32 |
| G2/centróide N1-C6 | 3,82 | Centróide anel A |
| A6/centróide N1-C6 | 3,88 | Centróide anel A |
| T1/centróide N1-C6 | 2,94 | N10 |

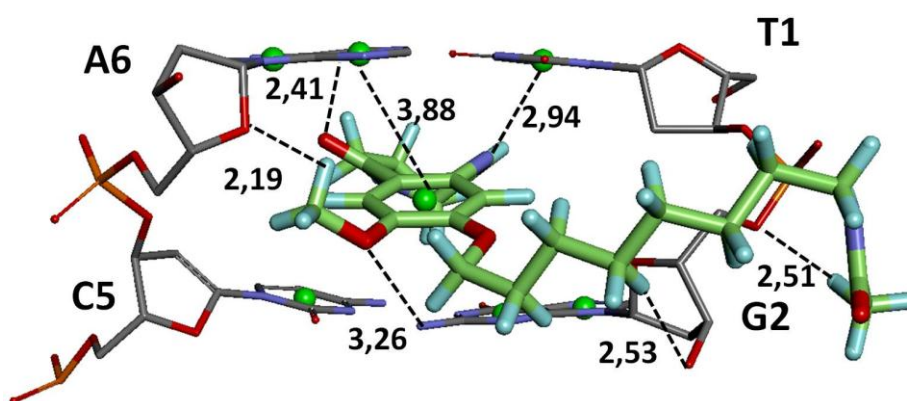


Figura 3.6a.7 Interações (em Å) de PBD-espçador 2 em 1d67.

PORÇÃO PBD-ESPAÇADOR 2

3.6a.8 Receptor 1k9g

| Tabela 3.6a.8 Interações de PBD-espçador 2 em 1k9g | | |
|--|---------------|------------------|
| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
| G6/N7 | 2,97 | C11a |
| G6/N7 | 2,12 | H11A |
| G5/N7 | 3,29 | C3 |
| G5/N3 | 3,07 | N10 |
| G6/N2 | 2,84 | OC8 |
| G6/H | 2,45 | OC8 |
| G5/N7 | 2,57 | H32 |
| C2/O4' | 3,36 | C13 |
| T3/C1' | 3,40 | OC16 |
| T3/H | 2,59 | OC16 |
| C2/O2 | 2,13 | H141 |
| C2/O4' | 2,38 | H131 |
| T3/O4' | 2,52 | H211 |
| G5/centróide N1-C6 | 3,86 | Centróide anel A |
| G5/centróide C6-N9 | 3,06 | N10 |
| G6/centróide N1-C6 | 3,88 | Centróide anel A |
| C1/centróide N1-C6 | 2,70 | OC7 |
| C2/centróide N1-C6 | 2,86 | H122 |

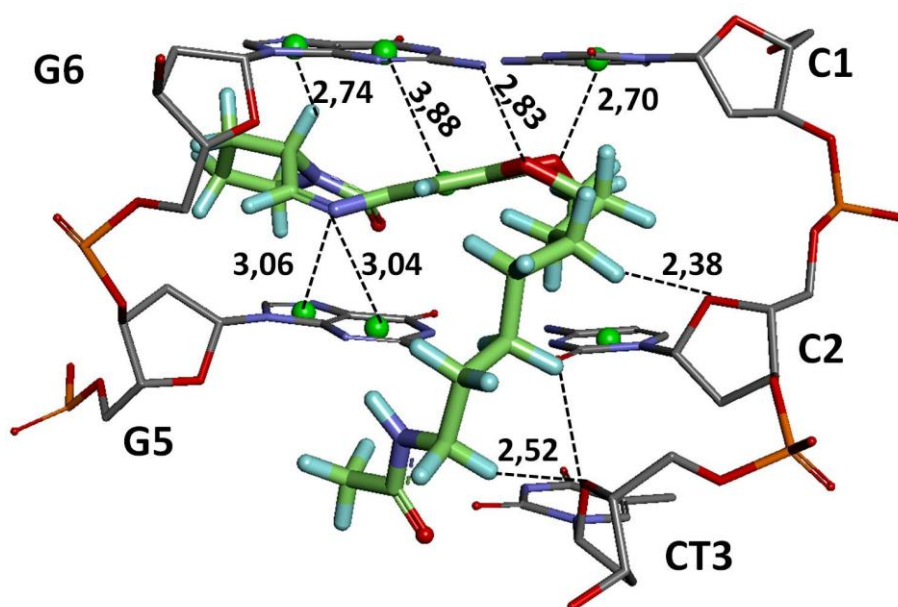


Figura 3.6a.8 Interações (em Å) de PBD-espçador 2 em 1k9g.

PORÇÃO PBD-ESPAÇADOR 2

3.6a.9 Receptor 2rou

| Tabela 3.6a.9 Interações de PBD-espaçador 2 em 2rou | | |
|---|---------------|------------------|
| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
| G6/C2' | 2,69 | OC5 |
| G6/H2'1 | 2,27 | OC5 |
| G6/H2'2 | 2,26 | OC5 |
| G20/N2 | 2,52 | OC8 |
| C7/O4' | 2,67 | CM |
| C7/O4' | 2,48 | HM3 |
| C7/O4' | 2,39 | HM2 |
| C21/O4' | 3,10 | C18 |
| G20/O5' | 3,01 | C3' |
| C21/OP2 | 3,03 | N15 |
| C21/OP2 | 2,02 | HN15 |
| C21/O4' | 2,12 | H182 |
| G20/N3 | 2,12 | H131 |
| G20/O5' | 2,20 | H33 |
| C7/centróide N1-C6 | 3,41 | Centróide anel A |
| C7/centróide N1-C6 | 3,21 | OC7 |
| C7/centróide N1-C6 | 3,09 | HC6 |
| G20/centróide N1-C6 | 3,09 | HC9 |

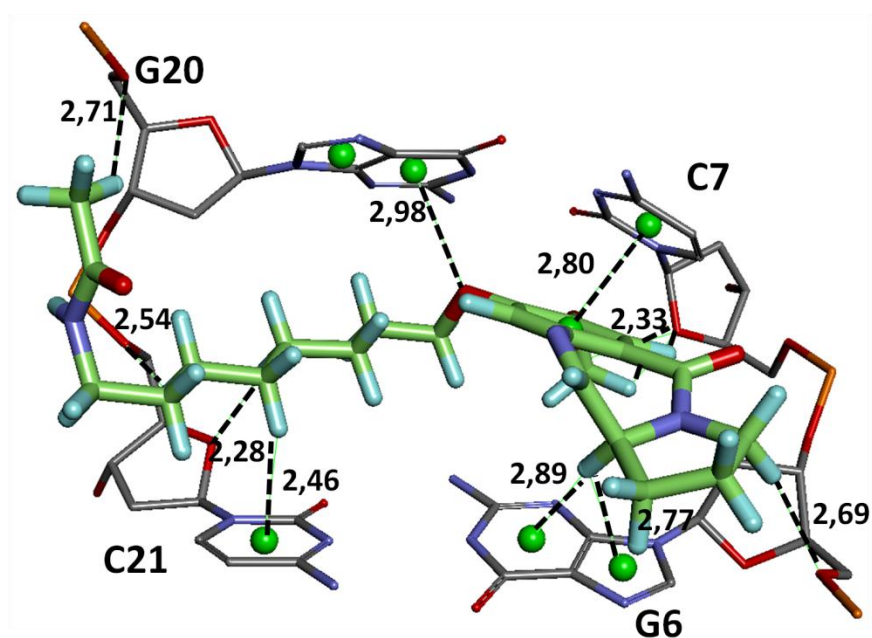


Figura 3.6a.9 Interações (em Å) de PBD-espaçador 2 em 2rou

PORÇÃO PBD-ESPAÇADOR 2

3.6a.10 Receptor 2da8

Tabela 3.6a.10 Interações de PBD-espaçador 2 em 2da8

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante | Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|-------------------|---------------|---------------|--------------------|---------------|------------------|
| A4/C2' | 3,36 | C11 | T3/O4' | 2,34 | HM3 |
| T5/O4' | 3,37 | C11 | T3/O4' | 2,75 | HM1 |
| A4/N3 | 3,29 | C11a | A2/N3 | 2,49 | HM2 |
| A4/N3 | 2,28 | H11A | A2/N7 | 3,14 | C17 |
| A4/O3' | 2,43 | H12 | A2/N7 | 2,56 | H171 |
| T5/O4' | 3,28 | H12 | G1/O3' | 2,39 | H33 |
| T5/O4' | 3,19 | C2 | T5/centróide N1-C6 | 2,78 | N10 |
| T5/O4' | 2,24 | H22 | A4/centróide N1-C6 | 3,82 | Centróide anel A |
| A4/O3' | 2,68 | HC11 | A2/centróide N1-C6 | 3,62 | Centróide anel A |
| T5/O4' | 2,70 | HC11 | A2/centróide C6-N9 | 2,52 | H122 |
| T3/O4' | 2,98 | CM | T3/centróide N1-C6 | 2,77 | H121 |

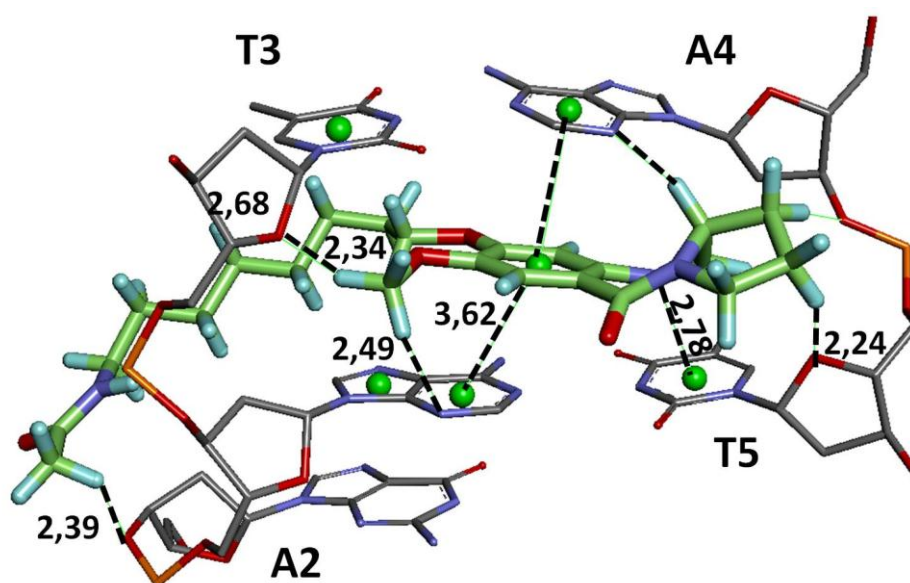


Figura 3.6a.10 Interações (em Å) de PBD-espaçador 2 em 2da8.

PORÇÃO PBD-ESPAÇADOR 3

3.6a.11 Receptor 1g3x

Tabela 3.6a.11 Interações de PBD-espaçador 3 em 1g3x

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante | Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|-------------------|---------------|---------------|---------------------|---------------|---------------|
| A6/N1 | 3,28 | C4 | C3/O5' | 3,13 | C21 |
| A5/N3 | 3,15 | C11a | C3/C5' | 3,05 | OC16 |
| A5/N3 | 2,27 | H11A | C3/C3' | 3,27 | OC16 |
| A6/O4' | 3,18 | C2 | C3/H5'1 | 2,60 | OC16 |
| A6/O4' | 2,26 | H21 | C3/H3' | 2,24 | OC16 |
| A6/N3 | 3,28 | C3 | G4/O6 | 2,70 | H181 |
| A6/N3 | 3,18 | N10 | T20/O4 | 2,69 | H181 |
| A6/O4' | 2,70 | HC11 | G4/N7 | 2,34 | H192 |
| A6/N3 | 2,69 | H32 | C3/O2P | 2,52 | H211 |
| T20/O4' | 2,37 | HM3 | C3/O5' | 2,15 | H211 |
| A5/N6 | 2,95 | N15 | A6/centróide C4-N9 | 2,97 | HC11 |
| A5/H62 | 2,29 | N15 | A6/centróide N1-C6 | 3,11 | N10 |
| T20/O4 | 3,36 | C18 | T19/centróide N1-C6 | 3,19 | OC7 |
| G4/N7 | 3,19 | C19 | T20/centróide N1-C6 | 2,83 | HM3 |
| C3/O2P | 3,16 | C21 | T20/centróide N1-C6 | 2,73 | HM1 |

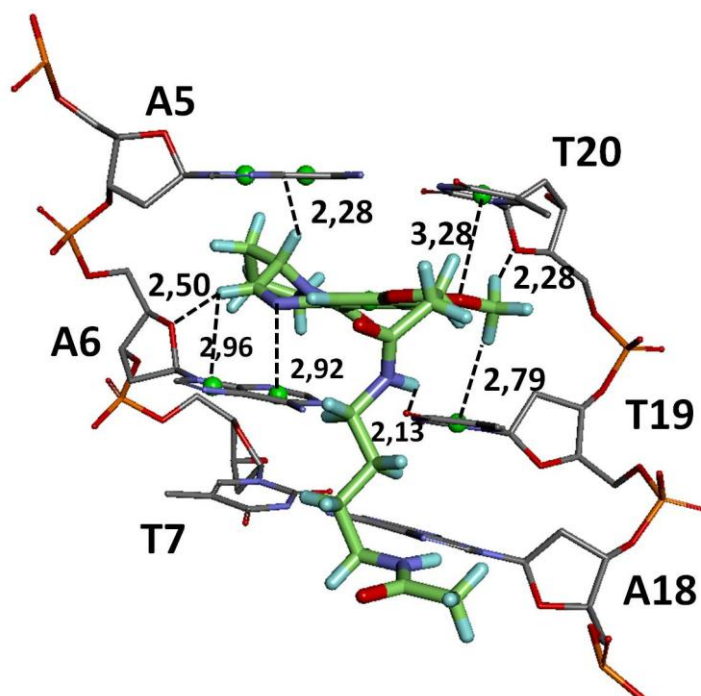


Figura 3.6a.11 Interações (em Å) de PBD-espaçador 3 em 1g3x.

PORÇÃO PBD-ESPAÇADOR 3

3.6a.12 Receptor 1d67

| Tabela 3.6a.12 Interações de PBD-espaçador 3 em 1d67 | | |
|--|---------------|---------------|
| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
| A6/O4' | 2,06 | H22 |
| A6/N6 | 2,97 | N10 |
| G2/N7 | 3,27 | CM |
| G2/N7 | 2,20 | HM1 |
| T4/O1P | 3,24 | N15 |
| T4/O1P | 2,25 | HN15 |
| T4/O2P | 2,36 | H32' |
| T1/centróide N1-C6 | 3,03 | HM2 |
| A6/centróide C4-N9 | 2,64 | HC11 |

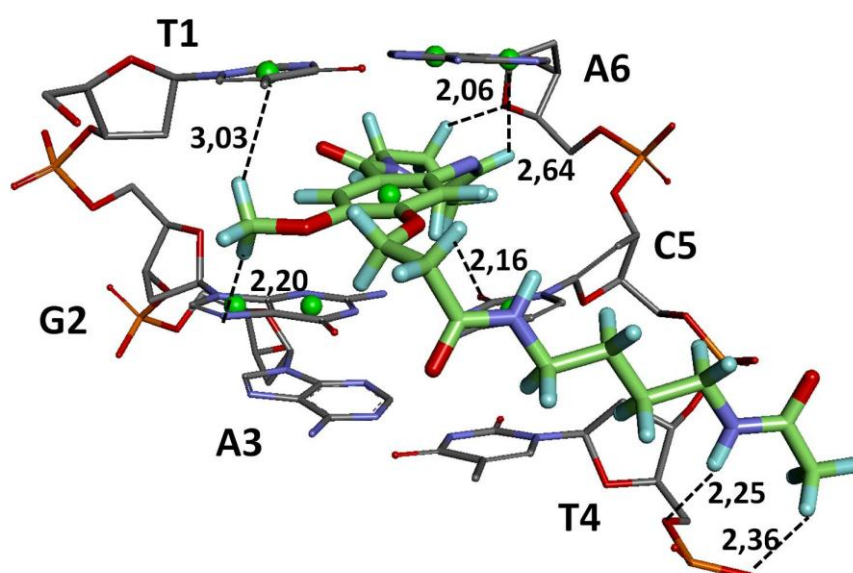


Figura 3.6a.12 Interações (em Å) de PBD-espçador 3 em 1d67.

PORÇÃO PBD-ESPAÇADOR 3

3.6a.13 Receptor 1k9g

Tabela 3.6a.13 Interações de PBD-espaçador 3 em 1k9g

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|--------------------|---------------|------------------|
| G6/N7 | 2,83 | C1 |
| G6/N7 | 2,43 | H11 |
| G5/N7 | 3,00 | N4 |
| C2/O4' | 3,18 | C13 |
| C2/O4' | 3,01 | N17 |
| C2/O3' | 3,15 | C19 |
| C2/O3' | 2,07 | H191 |
| C2/O4' | 2,22 | H131 |
| C2/O4' | 2,30 | HN17 |
| C2/O3' | 2,71 | H31' |
| G5/centróide N1-C6 | 2,98 | N10 |
| G5/centróide N1-C6 | 3,73 | Centróide anel A |
| C2/centróide N1-C6 | 2,67 | HM2 |
| C1/centróide N1-C6 | 2,46 | HM3 |

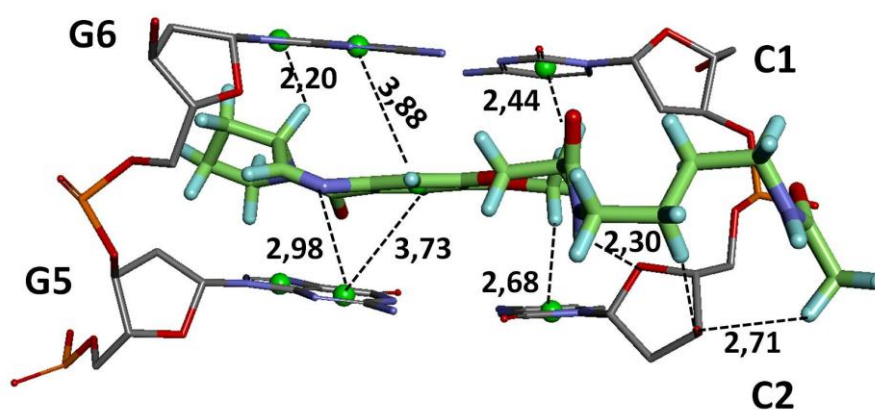


Figura 3.6a.13 Interações (em Å) de PBD-espaçador 3 em 1k9g.

PORÇÃO PBD-ESPAÇADOR 3

3.6a.14 Receptor 2rou

Tabela 3.6a.14 Interações de PBD-espaçador 3 em 2rou

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante | Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|-------------------|---------------|---------------|---------------------|---------------|------------------|
| C21/O4' | 3,13 | C11 | G6/O4' | 2,60 | H192 |
| C21/O5' | 3,27 | C1 | G6/O4' | 2,76 | H201 |
| C21/O4' | 3,26 | C1 | G6/N3 | 2,23 | H131 |
| C21/O5' | 2,29 | H12 | C7/C5' | 2,95 | OC14 |
| C21/O4' | 2,56 | H12 | C7/H5'1 | 2,30 | OC14 |
| G20/N3 | 3,07 | N10 | C5/O3' | 2,34 | H31' |
| C21/O5' | 2,50 | HC11 | C5/O4' | 2,72 | H32' |
| C7/O4' | 2,73 | C12 | C5/O3' | 2,46 | H33' |
| G6/N3 | 3,04 | C13 | G20/centróide N1-C6 | 3,33 | Centróide anel A |
| C7/O4' | 2,21 | H121 | G21/centróide N1-C6 | 2,49 | H22 |
| C7/O4' | 2,41 | H122 | G21/centróide N1-C6 | 3,04 | H11A |
| G6/O4' | 3,27 | C19 | C7/centróide N1-C6 | 2,93 | OC7 |
| C5/O3' | 2,78 | C3' | | | |

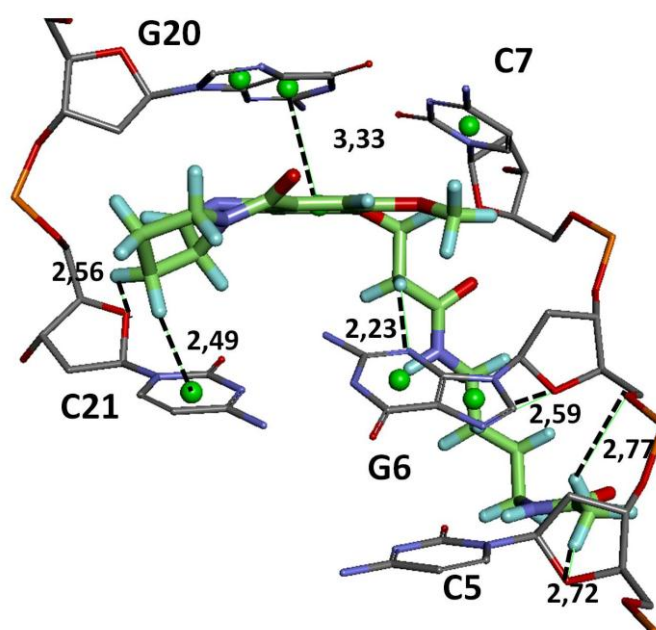


Figura 3.6a.14 Interações (em Å) de PBD-espaçador 3 em 2rou.

PORÇÃO PBD-ESPAÇADOR 3

3.6a.15 Receptor 2da8

| Tabela 3.6a.15 Interações de PBD-espçador 3 em 2da8 | | |
|---|---------------|------------------|
| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
| T5/O4 | 2,51 | C1 |
| T5/O4 | 2,06 | H11 |
| A2/C1' | 3,25 | OC8 |
| A2/H1' | 2,21 | OC8 |
| A2/C2' | 3,31 | OC7 |
| A2/C1' | 3,07 | OC7 |
| A2/H2'' | 2,60 | OC7 |
| A2/H1' | 2,38 | OC7 |
| T3/O4' | 3,23 | C13 |
| T5/OP1 | 3,04 | N15 |
| T5/OP1 | 2,06 | HN15 |
| T3/O3' | 2,73 | H192 |
| T3/O4' | 2,43 | H131 |
| A4/O5' | 2,70 | H212 |
| T3/O4' | 2,59 | HN17 |
| A2/centróide N1-C6 | 3,79 | Centroide anel A |
| A2/centróide C4-N9 | 3,64 | Centroide anel A |
| T3/centróide N1-C6 | 3,43 | Centroide anel A |
| A4/centróide N1-C6 | 2,97 | N10 |

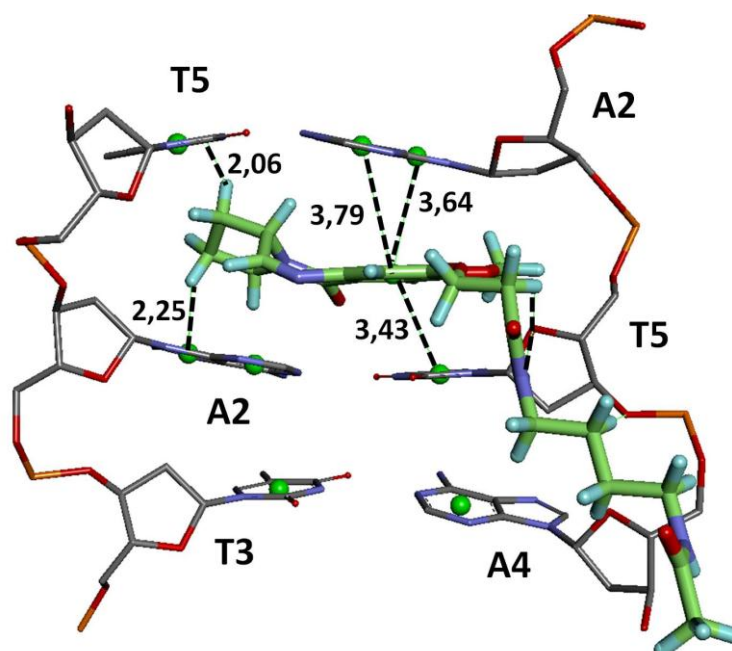


Figura 3.6a.15 Interações (em Å) de PBD-espçador 3 em 2da8.

PORÇÃO CUMARINA-ESPAÇADOR 1

3.6a.16 Receptor 1g3x

| Tabela 3.6a.16 Interações de cumarina-espaçador 1 em 1g3x | | |
|---|---------------|-------------------|
| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
| T19;O2P | 3,19 | C12 |
| A5/N3 | 3,02 | N7' |
| T20/O4' | 3,04 | C4' |
| T20/O4' | 2,14 | H4' |
| A6/O4' | 3,16 | CM1' |
| A6/O4' | 2,13 | HM13' |
| T19/O2P | 2,30 | H121 |
| A5/centróide C4-N9 | 2,44 | HM23' |
| A6/centróide C4-N9 | 2,23 | H721' |
| T19/centróide N1-C6 | 3,82 | Centroide O1'-C9' |
| T20/centróide N1-C6 | 3,31 | Centroide O1'-C9' |

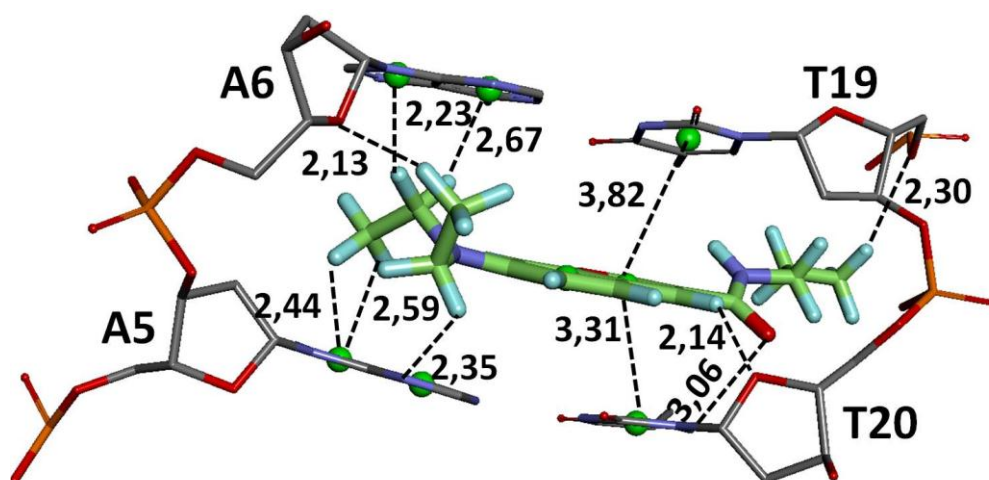


Figura 3.6a.16 Interações (em Å) de cumarina-espaçador 1 em 1g3x.

PORÇÃO CUMARINA-ESPAÇADOR 1

3.6a.17 Receptor 1d67

| Tabela 3.6a.17 Interações de cumarina-espaçador 1 em 1d67 | | |
|---|---------------|-------------------------|
| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
| G2/O4' | 2,75 | H6' |
| G2/O4' | 3,33 | C71' |
| T1/O2 | 3,02 | CM1' |
| A3/O4' | 2,75 | CM2' |
| A3/O4' | 2,18 | HM22' |
| A3/O4' | 2,38 | HM23' |
| G2/O4' | 2,56 | H711' |
| T1/O2 | 2,17 | HM13' |
| A6/N7 | 2,55 | H22 |
| G2/centróide N1-C6 | 3,82 | Centroide anel C5'-C10' |
| G2/N2 | 3,25 | Centroide anel C5'-C10' |
| C5/centróide N1-C6 | 3,03 | OC16 |
| A6/centróide N1-C6 | 3,34 | Centroide anel O1'-C9' |
| A6/centróide C4-N9 | 3,82 | Centroide anel O1'-C9' |

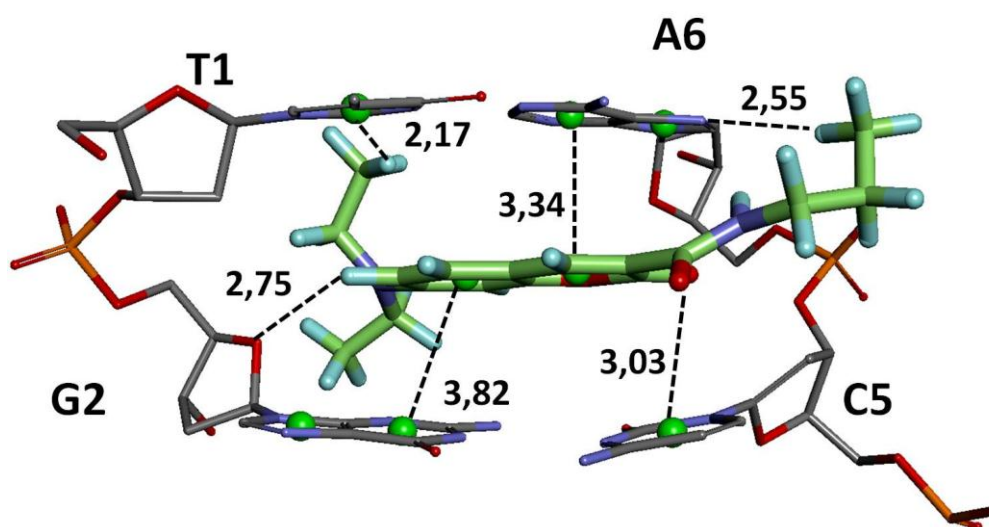


Figura 3.6a.17 Interações (em Å) de cumarina-espaçador 1 em 1d67.

PORÇÃO CUMARINA-ESPAÇADOR 1

3.6a.18 Receptor 1k9g

| Tabela 3.6a.18 Interações de cumarina-espaçador 1 em 1k9g | | |
|---|---------------|-------------------------|
| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
| C2/O4' | 3,28 | C12 |
| C1/O2 | 3,17 | C13 |
| C2/O4' | 2,88 | C14 |
| G6/O4' | 3,18 | C5' |
| G6/O4' | 2,34 | H5' |
| G5/N2 | 2,56 | OC16 |
| G5/H | 2,30 | OC16 |
| G6/N7 | 2,75 | H712' |
| C2/O4' | 2,42 | H141 |
| C2/O4' | 2,44 | H142 |
| C2/O2 | 2,45 | H142 |
| C1/O2 | 2,10 | H131 |
| G5/centróide N1-C6 | 3,26 | Centroide anel O1'-C9' |
| G5/centróide C4-N9 | 3,55 | Centroide anel C5'-C10' |
| G6/centróide N1-C6 | 3,62 | Centroide anel O1'-C9' |
| G6/centróide C4-N9 | 3,25 | Centroide anel C5'-C10' |

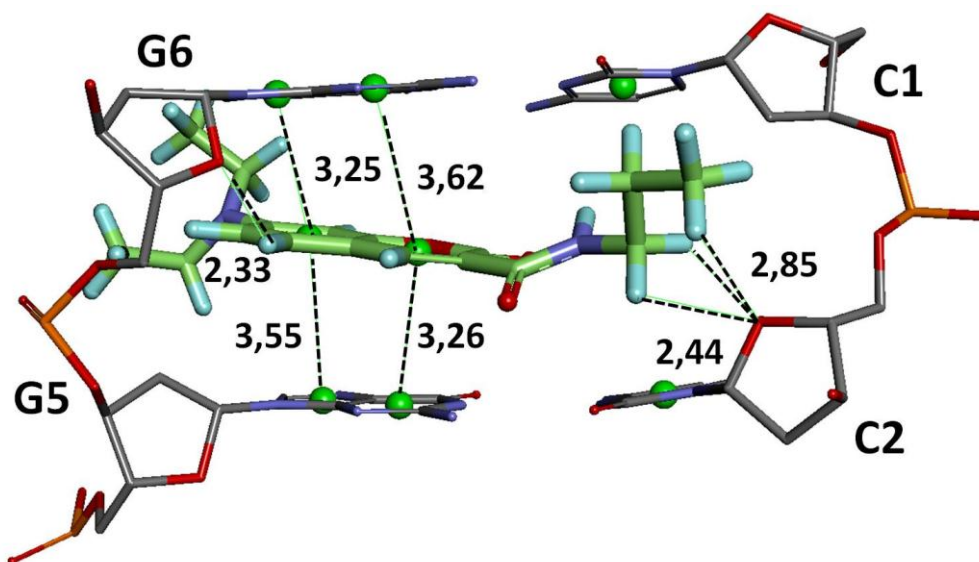


Figura 3.6a.18 Interações (em Å) de cumarina-espaçador 1 em 1k9g.

PORÇÃO CUMARINA-ESPAÇADOR 1

3.6a.19 Receptor 2rou

Tabela 3.6a.19 Interações de cumarina-espaçador 1 em 2rou

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante | Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|-------------------|---------------|---------------|---------------------|---------------|-------------------------|
| C21/OP2 | 3,27 | C12 | G8/O4' | 2,38 | HM21' |
| C21/OP2 | 3,12 | C13 | C7/O4' | 2,21 | H712' |
| C21/O5' | 3,16 | C13 | C7/O4' | 2,67 | H711' |
| C21/C5' | 2,97 | OC2' | G6/N3 | 2,63 | HM11' |
| C21/H5'1 | 2,34 | OC2' | C21/OP2 | 2,54 | H141 |
| C7/O4' | 3,37 | C72' | C21/OP2 | 2,64 | H131 |
| C7/O4' | 2,73 | C71' | C21/O5' | 2,25 | H131 |
| C7/O2 | 3,23 | CM2' | C21/OP2 | 2,56 | H22 |
| G8/O4' | 3,10 | CM2' | G6/H21 | 2,52 | Centroide anel C5'-C10' |
| C21/O5' | 3,10 | N15 | C7/centróide N1-C6 | 2,65 | H6' |
| C21/O5' | 2,72 | HN15 | G20/N2 | 3,71 | Centroide anel C5'-C10' |
| C21/O4' | 2,44 | HN15 | G20/centróide N1-C6 | 3,91 | Centroide anel O1'-C9' |
| C7/O2 | 2,25 | HM21' | | | |

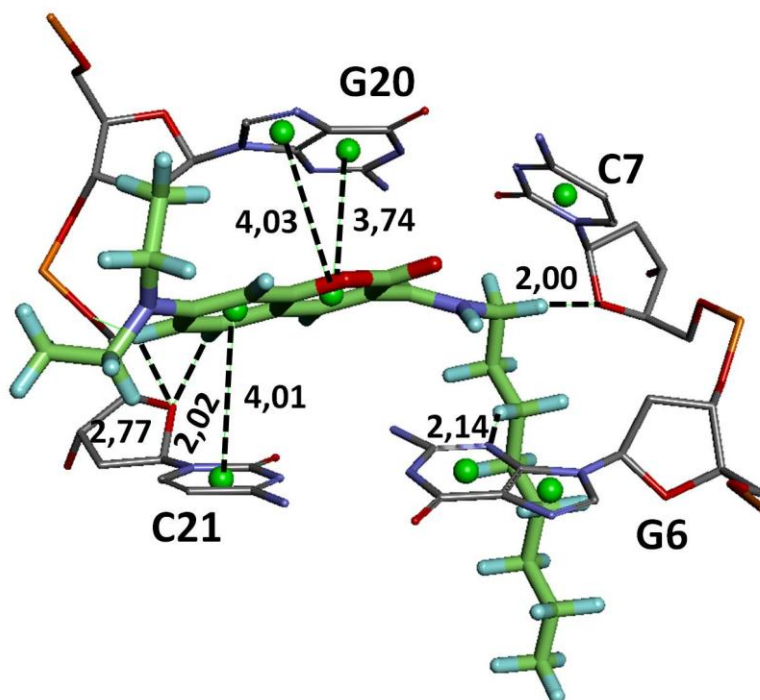


Figura 3.6a.19 Interações (em Å) de cumarina-espçador 1 em 2rou.

PORÇÃO CUMARINA-ESPAÇADOR 1

3.6a.20 Receptor 2da8

| Tabela 3.6a.20 Interações de cumarina-espaçador 1 em 2da8 | | |
|---|---------------|-------------------------|
| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
| A4/N3 | 3,14969 | C71' |
| A4/O3' | 3,24995 | CM1' |
| T5/O4' | 2,7224 | CM1' |
| T5/O2 | 3,04712 | CM2' |
| T5/O2 | 2,2047 | HM22' |
| A4/N3 | 2,11413 | H712' |
| T5/O4' | 2,5541 | HM11' |
| T5/O4' | 2,10975 | HM13' |
| A2/N7 | 2,43536 | H122 |
| A4/H2 | 3,02 | Centroide anel C5'-C10' |
| A2/centróide N1-C6 | 3,28 | Centroide anel O1'-C9' |
| A2/centróide C4-N9 | 3,44 | Centroide anel O1'-C9' |
| T3/centróide N1-C6 | 3,77 | Centroide anel O1'-C9' |

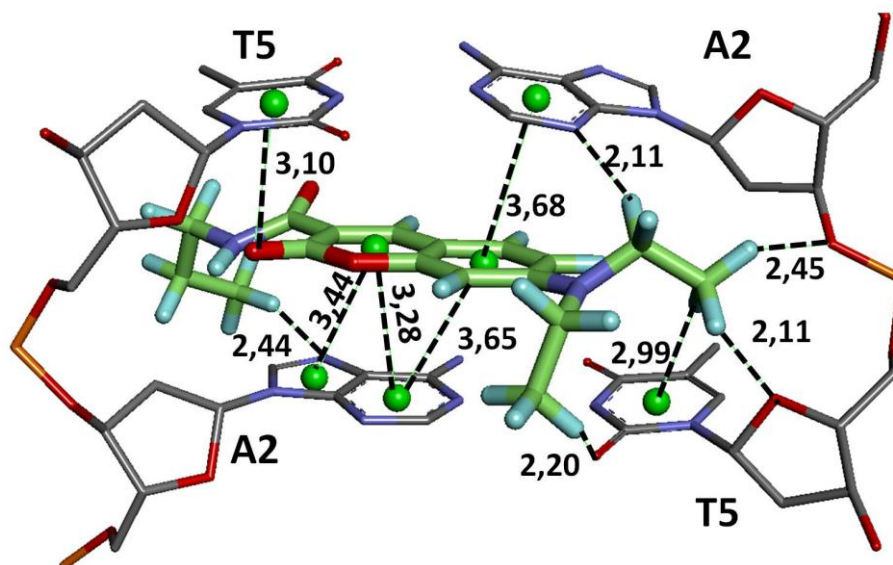


Figura 3.6a.20 Interações (em Å) de cumarina-espaçador 1 em 2da8.

PORÇÃO CUMARINA-ESPAÇADOR 2

3.6a.21 Receptor 1g3x

Tabela 3.6a.21 Interações de cumarina-espçador 2 em 1g3x

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|--------------------|---------------|-------------------------|
| T19/O2P | 3,00616 | C17 |
| T19/O2P | 3,01561 | C18 |
| T20/O2P | 3,33956 | C18 |
| T20/O2P | 3,19605 | C20 |
| T19/C2' | 2,73529 | OC2' |
| T19/H2'1 | 2,74789 | OC2' |
| T19/H2'2 | 2,12415 | OC2' |
| A6/O4' | 2,88845 | C71' |
| A5/N3 | 3,23767 | CM1' |
| A6/N3 | 2,34021 | H721' |
| A6/O4' | 2,73507 | H722' |
| A6/O4' | 2,40237 | H711' |
| A5/N3 | 2,24526 | HM12' |
| T19/O2P | 2,37003 | H171 |
| T19/O2P | 2,40953 | H181 |
| T19/O5' | 2,57618 | H181 |
| T20/O2P | 2,4104 | H202 |
| A6/centróide N1-C6 | 3,36 | Centroide anel C5'-C10' |
| A5/centróide N1-C6 | 2,92 | H5' |

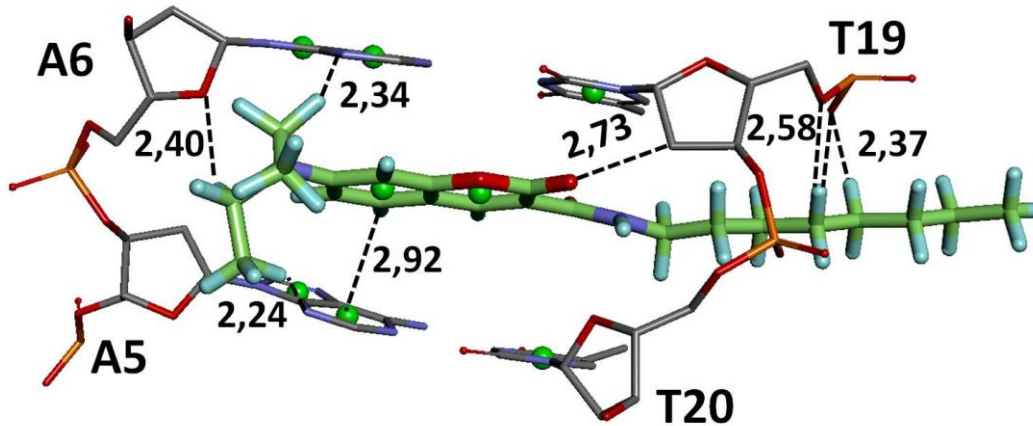


Figura 3.6a.21 Interações (em Å) de cumarina-espçador 2 em 1g3x.

PORÇÃO CUMARINA-ESPAÇADOR 2

3.6a.22 Receptor 1d67

Tabela 3.6a.22 Interações de cumarina-espaçador 2 em 1d67

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|--------------------|---------------|-------------------------|
| A3/N7 | 3,25 | C12 |
| A3/N7 | 2,19 | H122 |
| G2/O6 | 2,89 | C18 |
| G2/N7 | 3,37 | C19 |
| G2/O6 | 2,72 | C19 |
| T1/C2' | 2,87 | OC2' |
| T1/H | 2,27 | OC2' |
| A6/O4' | 2,96 | C72' |
| A6/O4' | 3,24 | C71' |
| A6/N3 | 2,56 | H721' |
| A6/O4' | 2,43 | H722' |
| T4/O4 | 2,66 | H141 |
| G2/O6 | 2,29 | H181 |
| G2/O6 | 2,18 | H191 |
| G2/O6 | 2,55 | H201 |
| A6/centróide N1-C6 | 3,56 | Centroide anel C5'-C10' |
| G2/N2 | 3,27 | Centroide anel C5'-C10' |
| G2/centróide N1-C6 | 3,50 | Centroide anel O1'-C9' |
| T1/centróide N1-C6 | 3,12 | OC2' |

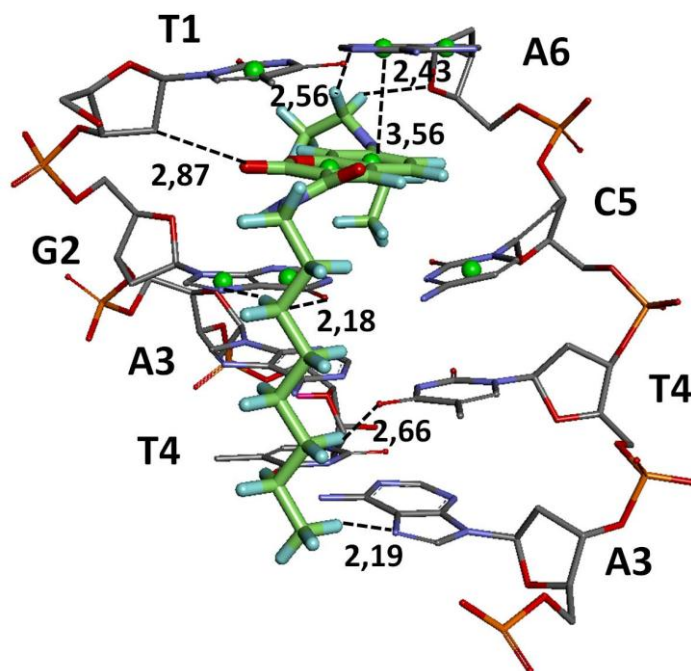


Figura 3.6a.22 Interações (em Å) de cumarina-espaçador 2 em 1d67.

PORÇÃO CUMARINA-ESPAÇADOR 2

3.6a.23 Receptor 1k9g

Tabela 3.6a.23 Interações de cumarina-espaçador 2 em 1k9g

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|--------------------|---------------|-------------------------|
| C2/O4' | 3,12 | C18 |
| C2/O4' | 2,86 | C19 |
| G6/O5' | 2,74 | H8' |
| G6/O2P | 3,03 | CM1' |
| G6/N2 | 3,18 | N15 |
| G6/O2P | 2,68 | HM23' |
| G6/O2P | 2,31 | HM12' |
| C2/O2 | 2,74 | H212 |
| C2/O5' | 2,61 | H172 |
| C2/O4' | 2,62 | H182 |
| C2/O4' | 2,05 | H192 |
| C1/O2 | 2,70 | H211 |
| G6/centróide C4-N9 | 3,66 | Centroide anel C5'-C10' |
| G5/centróide C4-N9 | 3,52 | Centroide anel C5'-C10' |
| G6/centróide C4-N9 | 2,27 | Centroide anel O1'-C9' |
| G6/centróide N1-C6 | 3,06 | Centroide anel O1'-C9' |
| G5/centróide N1-C6 | 3,78 | Centroide anel O1'-C9' |
| C2/centróide N1-C6 | 2,84 | H212 |

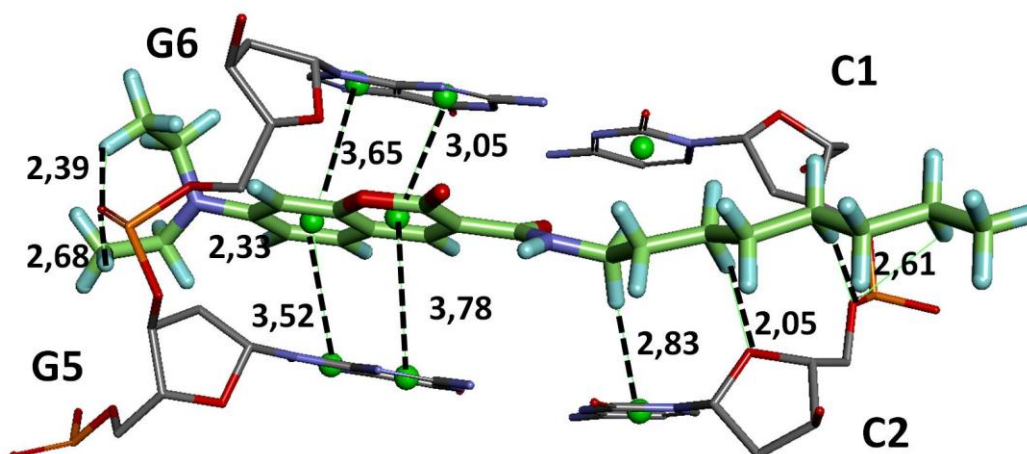


Figura 3.6a.23 Interações (em Å) de cumarina-espaçador 2 em 1k9g.

PORÇÃO CUMARINA-ESPAÇADOR 2

3.6a.24 Receptor 2rou

Tabela 3.6a.24 Interações de cumarina-espaçador 2 em 2rou

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|---------------------|---------------|-------------------------|
| C23/O3' | 3,40 | C12 |
| C23/O4' | 2,36 | H122 |
| C7/O4' | 3,18 | C20 |
| C7/O4' | 2,75 | C21 |
| C21/O5' | 3,26 | C5' |
| C21/O4' | 2,67 | C5' |
| C21/O5' | 2,86 | C6' |
| C21/O4' | 3,02 | C6' |
| C21/O4' | 2,02 | H5' |
| C21/O5' | 2,02 | H6' |
| C21/O4' | 2,77 | H6' |
| G20/N2 | 2,37 | OC16 |
| G20/H21 | 2,52 | OC16 |
| G20/H22 | 2,44 | OC16 |
| C7/O2 | 2,20 | H212 |
| G6/N3 | 2,13 | H191 |
| C7/O4' | 2,00 | H211 |
| G20/centróide N1-C6 | 3,74 | Centroide anel O1'-C9' |
| C21/centróide N1-C6 | 4,01 | Centroide anel C5'-C10' |
| C7/centróide N1-C6 | 2,96 | H211 |

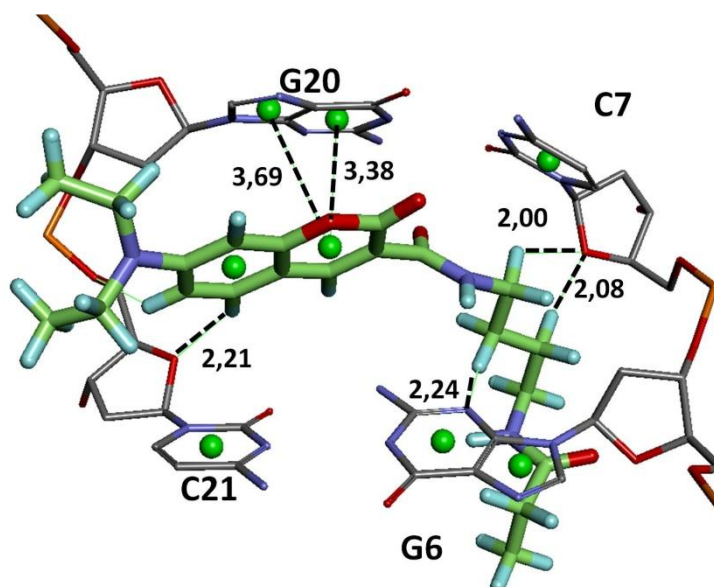


Figura 3.6a.24 Interações (em Å) de cumarina-espaçador 2 em 2rou.

PORÇÃO CUMARINA-ESPAÇADOR 2

3.6a.25 Receptor 2da8

| Tabela 3.6a.25 Interações de cumarina-espaçador 2 em 2da8 | | |
|---|---------------|-------------------------|
| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
| A4/O5' | 3,18 | C12 |
| A4/O5' | 2,50 | H121 |
| T5/OP1 | 3,09 | C14 |
| T5/O4' | 3,17 | C21 |
| A2/N7 | 3,37 | CM2' |
| A2/N7 | 2,51 | HM22' |
| T5/O4' | 2,44 | H212 |
| T5/OP1 | 2,11 | H142 |
| A4/O3' | 2,32 | H181 |
| A4/N3 | 2,76 | H201 |
| A4/O3' | 2,67 | H211 |
| A2/centróide N1-C6 | 3,34 | Centroide anel O1'-C9' |
| A4/centróide N1-C6 | 3,79 | Centroide anel O1'-C9' |
| A2/centróide C4-N9 | 3,28 | Centroide anel C5'-C10' |
| T3/centróide C4-N9 | 3,60 | Centroide anel C5'-C10' |

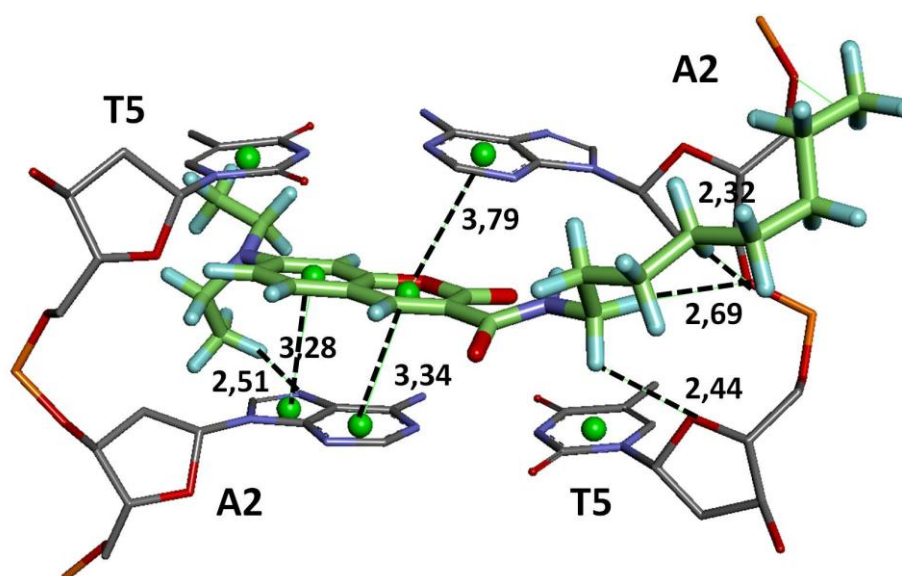


Figura 3.6a.25 Interações (em Å) de cumarina-espaçador 2 em 2da8.

PORÇÃO CUMARINA-ESPAÇADOR 3

3.6a.26 Receptor 1g3x

Tabela 3.6a.26 Interações de cumarina-espaçador 3 em 1g3x

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante | Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|-------------------|---------------|---------------|---------------------|---------------|-------------------------|
| T20/O1P | 3,37 | C12 | A6/O4' | 2,36 | H721' |
| T19/O1P | 3,22 | C13 | A5/N3 | 2,12 | H722' |
| T19/O5' | 3,29 | C13 | A6/N3 | 2,17 | H711 |
| T20/O1P | 2,31 | H122 | A6/O4' | 2,59 | H712 |
| T19/O2P | 3,30 | N17 | A6/N3 | 2,71 | H712 |
| T19/O5' | 3,33 | N17 | T20/O2P | 2,53 | H201 |
| T20/O2P | 3,11 | N17 | T20/O2P | 2,60 | H202 |
| T20/O2P | 3,05 | C20 | T19/O1P | 2,73 | H131 |
| T19/C2' | 3,08 | OC2' | T19/O5' | 2,28 | H131 |
| T19/H2'1 | 3,16 | OC2' | T19/O1P | 2,70 | H132 |
| T19/H2'2 | 2,12 | OC2' | T19/O2P | 2,32 | HN17 |
| T20/C5' | 3,14 | OC2' | T19/O5' | 2,66 | HN17 |
| T20/C4' | 3,13 | OC2' | T19/centróide N1-C6 | 3,79 | Centroide anel O1'-C9' |
| T20/C1' | 3,26 | OC2' | T20/centróide N1-C6 | 3,71 | Centroide anel O1'-C9' |
| T20/H5'1 | 2,41 | OC2' | A5/centróide N1-C6 | 3,95 | Centroide anel C5'-C10' |
| A5/N3 | 3,17 | C72' | A6/centróide N1-C6 | 3,90 | Centroide anel C5'-C10' |
| A6/O4' | 3,31 | C72' | | | |

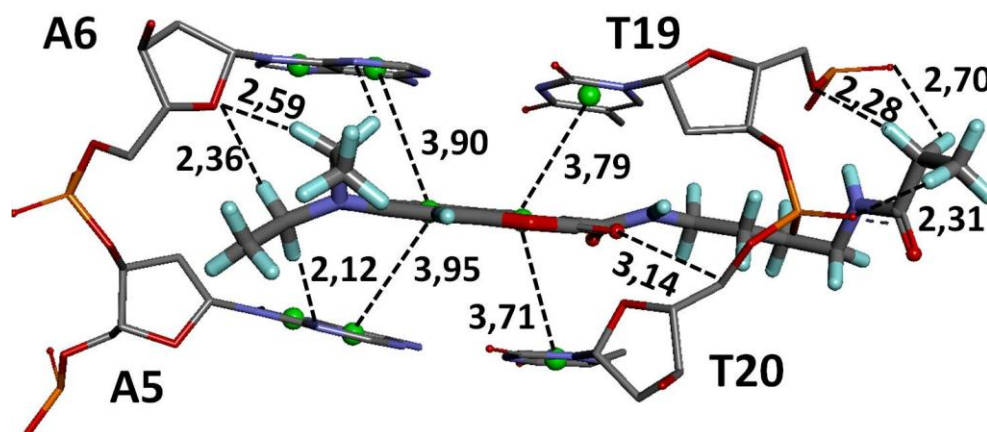


Figura 3.6a.26 Interações (em Å) de cumarina-espaçador 3 em 1g3x.

PORÇÃO CUMARINA-ESPAÇADOR 3

3.6a.27 Receptor 1d67

Tabela 3.6a.27 Interações de cumarina-espaçador 3 em 1d67

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|--------------------|---------------|-------------------------|
| T4/O2 | 3,17 | C13 |
| C5/O4' | 3,07 | N17 |
| C5/O4' | 3,38 | C19 |
| C5/O2 | 3,03 | C19 |
| A6/O4' | 2,79 | C21 |
| G2/N7 | 2,62 | H8' |
| G2/N7 | 3,37 | CM1' |
| G2/N7 | 3,34 | CM2' |
| G2/O6 | 2,96 | CM2' |
| G2/N2 | 3,12 | N15 |
| G2/O6 | 2,21 | HM22' |
| G2/N7 | 2,33 | HM23' |
| G2/N7 | 2,28 | HM12' |
| A6/O4' | 2,20 | H212 |
| C5/O2 | 1,94 | H191 |
| T4/O2 | 2,74 | H131 |
| C5/O4' | 3,27 | H131 |
| A6/O4' | 2,48 | H211 |
| C5/O4' | 2,08 | HN17 |
| G2/centróide N1-C6 | 3,30 | Centroide anel O1'-C9' |
| T1/centróide N1-C6 | 3,52 | Centroide anel C5'-C10' |
| G2/centróide C4-N9 | 2,83 | H8' |
| A6/centróide N1-C6 | 2,64 | OC16 |

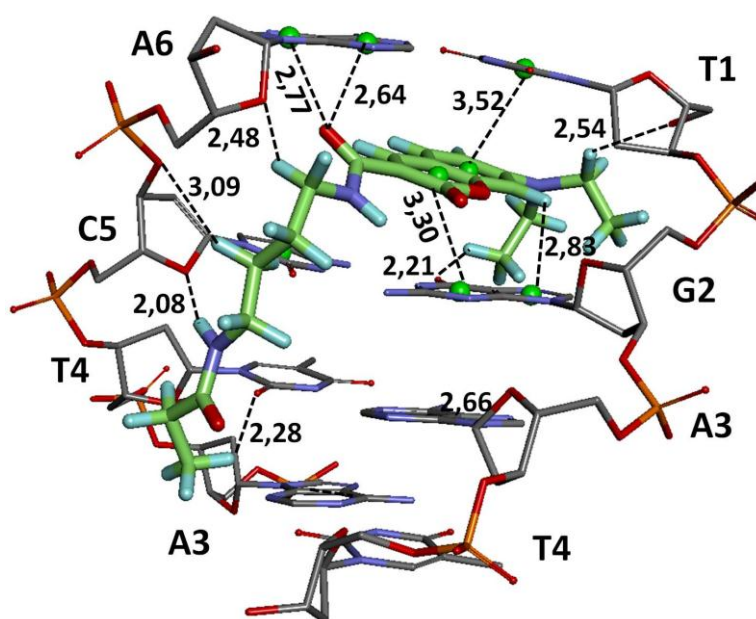


Figura 3.6a.27 Interações (em Å) de cumarina-espçador 3 em 1d67.

PORÇÃO CUMARINA-ESPAÇADOR 3

3.6a.28 Receptor 1k9g

| Tabela 3.6a.28 Interações de cumarina-espaçador 3 em 1k9g | | |
|---|---------------|-------------------------|
| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
| T3/O1P | 3,20 | C13 |
| C2/O3' | 3,05 | C14 |
| C2/O4' | 3,17 | C18 |
| C1/O2 | 3,15 | C20 |
| C2/O4' | 3,06 | C21 |
| G6/O4' | 2,14 | H5' |
| G6/N7 | 3,28 | CM1' |
| C2/O2 | 3,21 | OC16 |
| G5/N2 | 2,77 | OC16 |
| G5/H | 2,66 | OC16 |
| C2/C2 | 3,30 | N15 |
| C2/O2 | 3,40 | N15 |
| G6/N7 | 2,37 | HM11' |
| C2/O4' | 2,64 | H212 |
| C2/O2 | 2,39 | H212 |
| C2/O4' | 2,34 | H182 |
| C1/O2 | 2,05 | H201 |
| T3/O1P | 2,51 | H132 |
| C2/O4' | 2,54 | H211 |
| T3/C5' | 3,16 | OC14 |
| G5/centróide C4-N9 | 3,49 | Centroide anel C5'-C10' |
| G6/centróide C4-N9 | 3,30 | Centroide anel C5'-C10' |
| G5/centróide N1-C6 | 3,16 | Centroide anel O1'-C9' |
| G6/centróide N1-C6 | 3,62 | Centroide anel O1'-C9' |

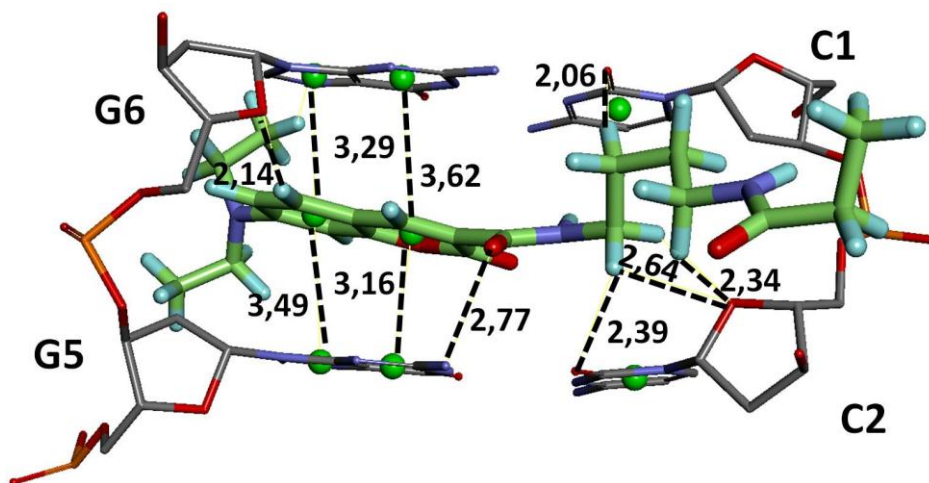


Figura 3.6a.28 Interações (em Å) de cumarina-espçador 3 em 1k9g.

PORÇÃO CUMARINA-ESPAÇADOR 3

3.6a.29 Receptor 2rou

| Tabela 3.6a.29 Interações de cumarina-espaçador 3 em 2rou | | |
|---|---------------|-------------------------|
| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
| C7/O4' | 2,84 | C19 |
| G6/N3 | 3,24 | C20 |
| C7/O4' | 2,84 | C21 |
| C21/O5' | 3,20 | C6' |
| C21/O4' | 3,28 | C6' |
| C21/O4' | 2,21 | H5' |
| C21/O5' | 2,37 | H6' |
| C21/O4' | 2,75 | H6' |
| C21/OP2 | 3,01 | CM1' |
| G20/N2 | 2,74 | OC16 |
| G20/H21 | 2,57 | OC16 |
| C21/OP2 | 2,55 | HM22' |
| C21/OP2 | 2,62 | HM12' |
| C21/OP2 | 2,45 | HM13' |
| C7/O4' | 2,16 | H212 |
| C7/O4' | 2,08 | H192 |
| G6/N3 | 2,24 | H201 |
| G6/N3 | 2,65 | H131 |
| G20/centróide C4-N9 | 3,95 | Centroide anel C5'-C10' |
| G20/centróide N1-C6 | 3,38 | Centroide anel O1'-C9' |
| G20/centróide N1-C6 | 3,69 | Centroide anel O1'-C9' |

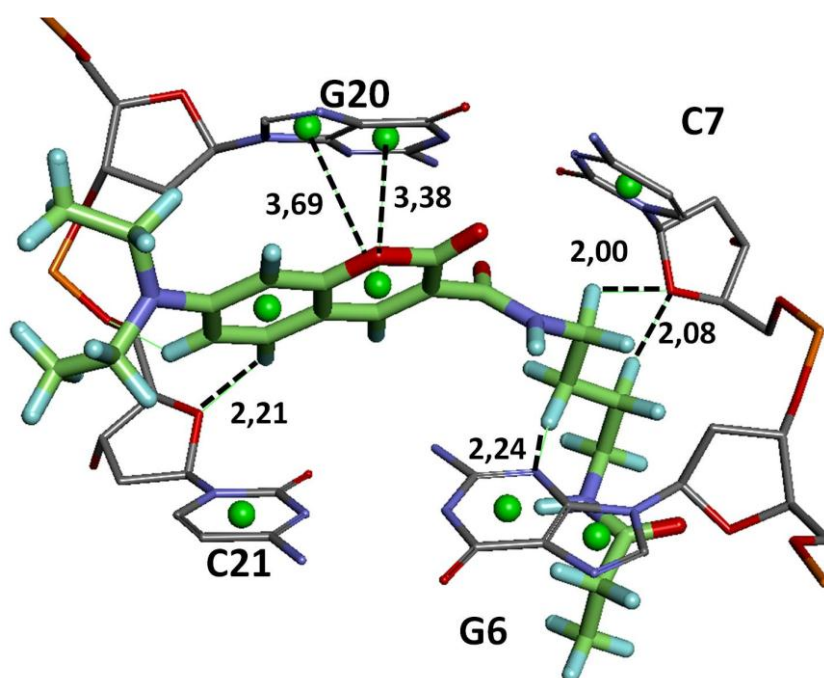


Figura 3.6a.29 Interações (em Å) de cumarina-espaçador 3 em 2rou.

PORÇÃO CUMARINA-ESPAÇADOR 3

3.6a.30 Receptor 2da8

Tabela 3.6a.30 Interações de cumarina-espaçador 3 em 2da8

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|--------------------|---------------|-------------------------|
| T3:O3' | 3,19 | C13 |
| A4:O4' | 3,38 | N17 |
| A4:O3' | 3,23 | C19 |
| T5:O4' | 3,22 | C19 |
| A4:N3 | 3,00 | N15 |
| T5:O2 | 2,75 | H212 |
| T5:O4' | 2,46 | H192 |
| A4:O3' | 2,14 | H191 |
| T5:O4' | 3,04 | H191 |
| A4:N3 | 2,72 | H201 |
| T3:O3' | 2,37 | H132 |
| A4:O5' | 2,73 | H132 |
| A4:O4' | 2,40 | HN17 |
| A2/centróide C4-N9 | 3,37 | Centroide anel C5'-C10' |
| T3/centróide N1-C6 | 3,89 | Centroide anel C5'-C10' |
| A2/centróide N1-C6 | 3,65 | Centroide anel O1'-C9' |
| A2/centróide N1-C6 | 3,07 | Centroide anel O1'-C9' |

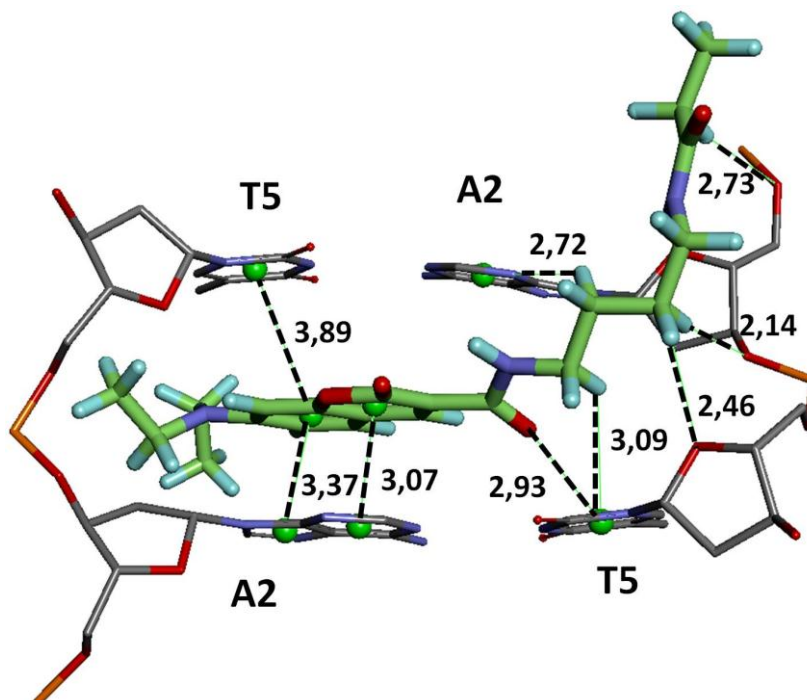


Figura 3.6a.30 Interações (em Å) de cumarina-espaçador 3 em 2da8.

Nesta seção estão os resultados do Experimento 4.3, descritos no Capítulo 3, Seção 3.2.3. Foi estudada a formação dos complexos com ligantes completos 1, 2 e 3 e os DNA-receptores são foram 1g3x, 1d67, 1k9g, 2rou e 2da8. Os dados para 1g3x se encontram no Anexo 3.2 e para 2da8, no Anexo 3.3.

LIGANTE 1

3.7a.1 Receptor 1d67

Tabela 3.7a.1 Interações do ligante 1 em 1d67

| Nucleotídeo/átomo | Distancia (Å) | Átomo ligante | Nucleotídeo/átomo | Distancia (Å) | Átomo ligante |
|-------------------|---------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------|
| T1/O4 | 3,08 | C11a | T4/O2 | 2,32 | H5' |
| HT1/O4 | 2,56 | H11A | C5/O4' | 2,50 | H5' |
| T1/O4 | 3,19 | C1 | C5/O4' | 2,35 | H6' |
| T1/O4 | 2,54 | H11 | C5/O2 | 2,74 | H6' |
| A6/O4' | 3,02 | C12 | C5/O2 | 2,46 | HN15 |
| C5/O2 | 2,95 | C13 | C5/O2 | 2,62 | H132 |
| T4/C1' | 3,02 | OC2' | C5/O2 | 2,34 | H131 |
| T4/H | 1,98 | OC2' | G2/N2 | 2,40 | H131 |
| C5/C5' | 3,09 | OC2' | A6/O4' | 2,46 | H122 |
| C5/H | 2,30 | OC2' | A6/centróide N1-C6 | 3,56 | Centróide anel A |
| T4/O2 | 2,42 | C2' | C5/centróide N1-C6 | 2,47 | N10 |
| T4/C1' | 2,97 | O1' | G2/centróide N1-C6 | 2,65 | OC5 |
| T4/H | 2,11 | O1' | T4/O2 | 2,84 | Centróide O1'-C9' |
| C5/O4' | 3,13 | C5' | A3/H2 | 2,89 | Centróide C5'-C10' |
| C5/O4' | 3,07 | C6' | | | |

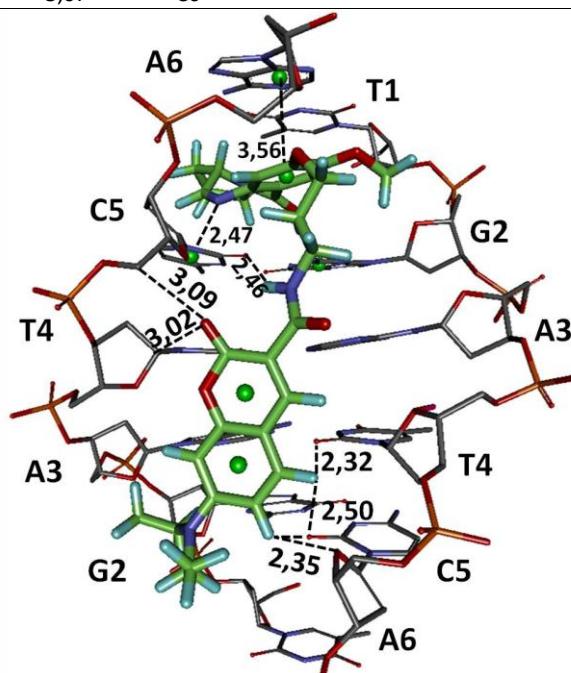


Figura 3.7a.1 Interações (em Å) do ligante 1 em 1d67.

LIGANTE 1

3.7a.2 Receptor 1k9g

| Tabela 3.7a.2 Interações do ligante 1 em 1k9g | | |
|---|---------------|------------------|
| Nucleotídeo/átomo | Distancia (Å) | Átomo ligante |
| G6/N7 | 3,24 | C11a |
| G6/N7 | 2,23 | H11A |
| G6/O6 | 2,51 | H11A |
| A4/N3 | 2,42 | O1' |
| A4/N3 | 3,11 | C9' |
| A4/N3 | 2,91 | C8' |
| T3/O2 | 2,68 | CM1' |
| A4/O4' | 2,98 | CM1' |
| G5/O3' | 3,21 | CM2' |
| G5/N3 | 2,77 | H721' |
| G5/O4' | 2,24 | H722' |
| G5/O3' | 2,41 | HM21' |
| A4/O4' | 2,71 | H711' |
| T3/O2 | 2,53 | HM11' |
| A4/O4' | 2,63 | HM11' |
| T3/O2 | 2,66 | HM12' |
| A4/O4' | 2,68 | HM12' |
| T3/O2 | 2,30 | HM13' |
| G6/Centróide N1-C6 | 3,28 | Centróide anel A |
| G5/Centróide N1-C6 | 3,42 | Centróide anel A |
| G5/Centróide C4-N9 | 2,69 | N10 |
| G6/Centróide C4-N9 | 2,98 | H11A |

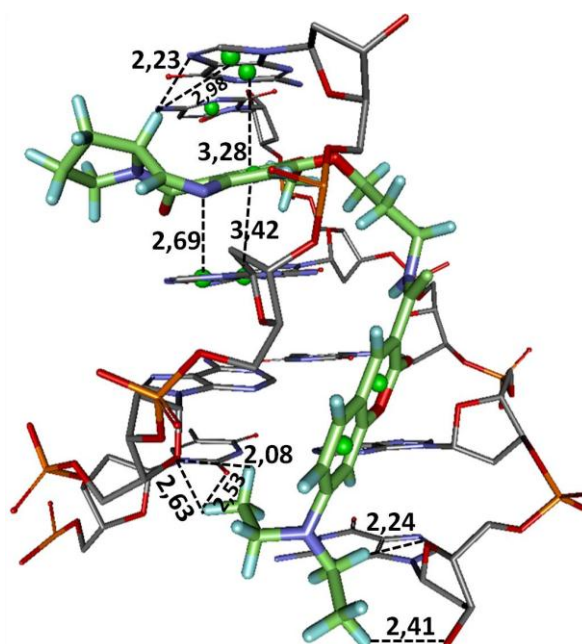


Figura 3.7a.2 Interações (em Å) do ligante 1 em 1k9g.

LIGANTE 1

3.7a.3 Receptor 2rou

Tabela 3.7a.3 Interações do ligante 1 em 2rou

| Nucleotídeo/átomo | Distancia (Å) | Átomo ligante | Nucleotídeo/átomo | Distancia (Å) | Átomo ligante |
|-------------------|---------------|---------------|---------------------|---------------|--------------------|
| C21/O5' | 3,21 | C1 | G6/O4' | 2,64 | C10' |
| C21/O4' | 3,10 | C1 | C5/O4' | 3,24 | CM1' |
| C21/N1 | 2,33 | H11 | C5/O3' | 2,92 | CM2' |
| C21/O5' | 2,27 | H12 | G6/N3 | 2,67 | N15 |
| C21/O4' | 2,24 | H12 | G6/N3 | 1,71 | HN15 |
| G22/N2 | 2,51 | OC2' | C5/O3' | 2,03 | HM22' |
| G22/H22 | 1,89 | OC2' | C5/O4' | 2,54 | HM13' |
| G6/H1' | 3,18 | C2' | C7/O4' | 2,59 | H142 |
| G22/H22 | 2,67 | C2' | G6/N3 | 2,69 | H122 |
| C5/O2 | 3,15 | O1' | C7/O4' | 2,34 | H121 |
| G22/N2 | 3,22 | O1' | G20/centróide N1-C6 | 3,07 | Centróide anel A |
| G22/H21 | 2,97 | O1' | C7/centróide N1-C6 | 2,99 | OC8 |
| G22/H22 | 2,78 | O1' | C21/centróide N1-C6 | 2,35 | H11 |
| G6/O4' | 3,15 | C9' | G6/O4' | 2,86 | Centroide O1'-C10' |

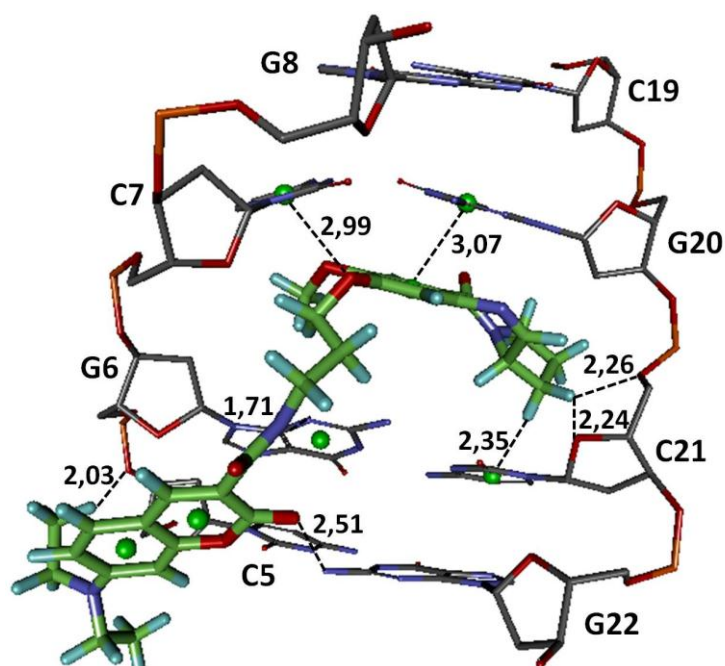


Figura 3.7a.3 Interações (em Å) do ligante 1 em 2rou.

LIGANTE 2

3.7a.4 Receptor 1d67

Tabela 3.7a.4 Interações do ligante 2 em 1d67

| Nucleotídeo/átomo | Distancia (Å) | Átomo ligante | Nucleotídeo/átomo | Distancia (Å) | Átomo ligante |
|-------------------|---------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------|
| G2/O6 | 3,05 | C11a | HN15 - /T4/O2 | 1,82 | HN15 |
| G2/O6 | 2,14 | H11A | H721' - /A3/O4' | 2,04 | H721' |
| G2/N2 | 2,94 | OC8 | HM23' - /G2/O4' | 2,45 | HM23' |
| G2/H | 2,55 | OC8 | H142 - /C5/O2 | 2,64 | H142 |
| C5/C2' | 2,95 | OC7 | H172 - /C5/O4' | 2,53 | H172 |
| C5/C1' | 2,89 | OC7 | H172 - /C5/O2 | 2,71 | H172 |
| C5/O2 | 2,97 | C13 | H131 - /C5/O3' | 2,68 | H131 |
| A6/N7 | 3,12 | CM | H131 - /A6/O5' | 2,87 | H131 |
| A6/N7 | 2,38 | HM2 | H131 - /A6/O4' | 2,76 | H131 |
| C5/O2 | 3,07 | C14 | H132 - /C5/O4' | 2,64 | H132 |
| T4/C4' | 3,17 | OC2' | H132 - /C5/O2 | 2,32 | H132 |
| T4/C1' | 2,78 | OC2' | H211 - /T4/O3' | 2,75 | H211 |
| T4/H | 2,64 | OC2' | T1/centróide N1-C6 | 3,28 | N10 |
| T4/H | 2,08 | OC2' | G2/centróide N1-C6 | 2,99 | HC9 |
| C5/O2 | 3,10 | C5' | C5/centróide N1-C6 | 3,67 | Centróide anel A |
| C5/O4' | 2,74 | H4' | A6/centróide N1-C6 | 4,40 | Centróide anel A |
| C5/O2 | 2,51 | H5' | G2/H22 | 3,05 | Centróide C5'-C10' |
| A3/O4' | 2,78 | C72' | A3/N2 | 2,98 | Centróide O1'-C9' |
| T4/O2 | 2,83 | N15 | A6/centróide C4-N9 | 2,54 | H121 |

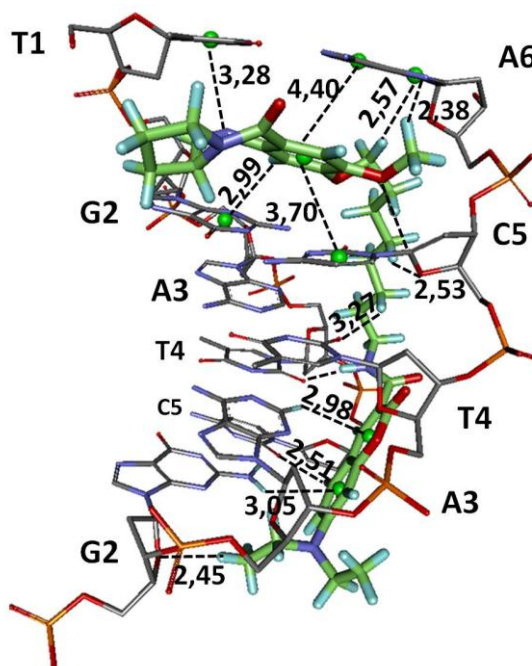


Figura 3.7a.4 Interações (em Å) do ligante 2 em 1d67

LIGANTE 2

3.7a.5 Receptor 1k9g

Tabela 3.7a.5 Interações do ligante 2 em 1k9g

| Nucleotídeo/átomo | Distancia (Å) | Átomo ligante | Nucleotídeo/átomo | Distancia (Å) | Átomo ligante |
|-------------------|---------------|---------------|--------------------|---------------|-------------------|
| G6/N7 | 2,97 | C11a | A4/N3 | 2,24 | H8' |
| G6/N7 | 2,10 | H11A | G5/N3 | 2,02 | HM21' |
| G5/N7 | 3,05 | C3 | A4/N3 | 2,49 | HM22' |
| G6/N2 | 2,92 | OC8 | A4/O4' | 2,54 | H711' |
| G6/H | 2,45 | OC8 | A4/O3' | 2,44 | HM11' |
| G5/N9 | 2,71 | HC11 | C2/O2 | 2,39 | H142 |
| G5/N7 | 2,28 | H32 | C2/O4' | 2,20 | H141 |
| C2/O4' | 3,14 | C14 | G6/centróide N1-C6 | 3,91 | Centróide anel A |
| G5/N2 | 2,38 | OC2' | G5/centróide N1-C6 | 3,89 | Centróide anel A |
| G5/H | 1,78 | OC2' | C1/centróide N1-C6 | 2,69 | OC7 |
| A4/C2 | 3,05 | O1' | C2/centróide N1-C6 | 2,75 | HM3 |
| A4/H | 2,16 | O1' | A4/O4' | 3,27 | Centróide O1'-C9' |
| A4/N3 | 3,26 | C8' | | | |

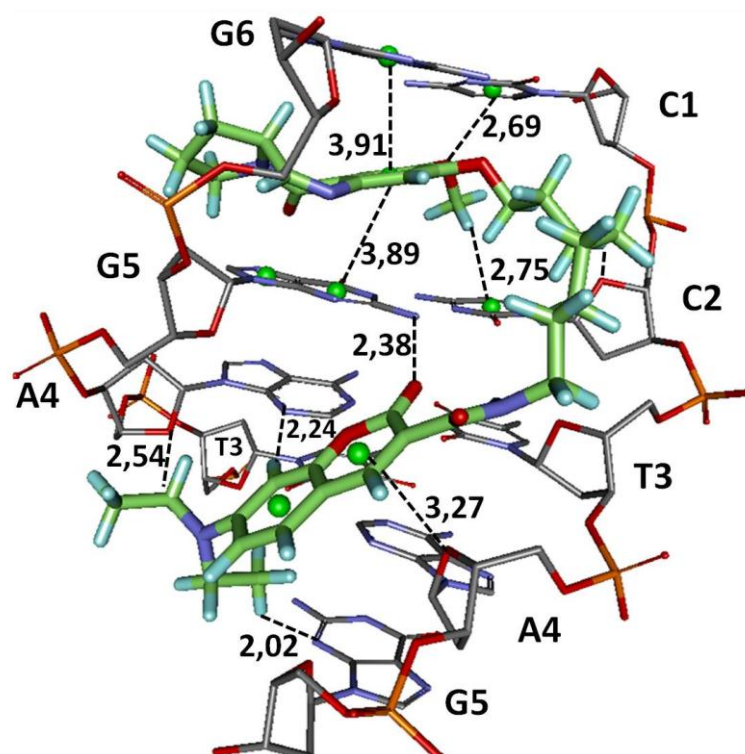


Figura 3.7a.5 Interações (em Å) do ligante 2 em 1k9g.

LIGANTE 2

3.7a.6 Receptor 2rou

| Tabela 3.7a.6 Interações do ligante 2 em 2rou | | |
|---|---------------|-------------------|
| Nucleotídeo/átomo | Distancia (Å) | Átomo ligante |
| G6/O5' | 2,52 | H22 |
| G6/N7 | 3,24 | C3 |
| G6/N7 | 2,48 | H32 |
| G6/H1' | 3,15 | OC2' |
| C7/C5' | 2,56 | OC2' |
| C7/C4' | 2,48 | OC2' |
| C7/H5' | 1,86 | OC2' |
| C7/H4' | 2,27 | OC2' |
| G6/C1' | 3,19 | O1' |
| G6/H1' | 2,27 | O1' |
| G6/O4' | 3,28 | CM1' |
| C23/O2 | 2,75 | CM2' |
| C23/O2 | 2,21 | HM23' |
| G24/O4' | 2,50 | HM23' |
| G6/O4' | 2,36 | HM11' |
| C5/O2 | 2,62 | HM13' |
| C21/O4' | 2,49 | H172 |
| C21/O5' | 2,62 | H131 |
| C21/O4' | 2,51 | H131 |
| C7/O2 | 2,34 | H211 |
| G6/centróide N1-C6 | 4,21 | Centróide anel A |
| G6/centróide C4-N9 | 3,02 | H142 |
| G5/H1' | 2,52 | Centróide O1'-C9' |

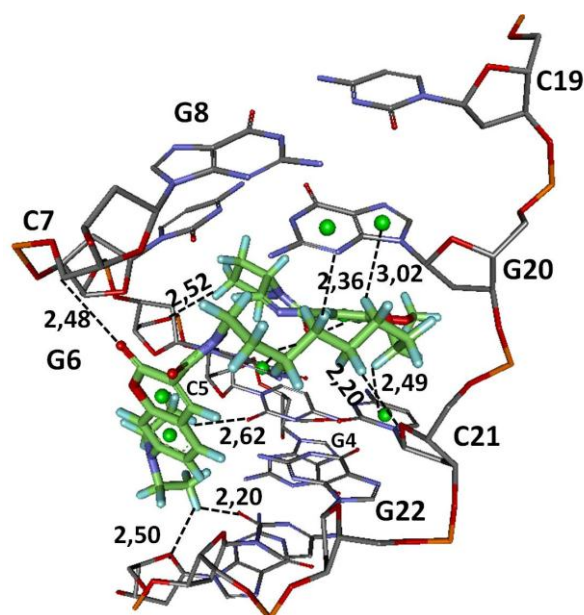


Figura 3.7a.6 Interações (em Å) do ligante 2 em 2rou

LIGANTE 3

3.7a.7 Receptor 1d67

Tabela 3.7a.7 Interações do ligante 3 em 1d67

| Nucleotídeo/átomo | Distancia (Å) | Átomo ligante | Nucleotídeo/átomo | Distancia (Å) | Átomo ligante |
|-------------------|---------------|---------------|--------------------|---------------|-------------------|
| T1/O4 | 2,40 | H11A | T4/O4' | 2,72 | H5' |
| T1/H | 2,61 | N4 | C5/O2 | 2,28 | H8' |
| A6/C2 | 2,85 | OC7 | G2/O4' | 2,76 | HM21' |
| A6/H | 2,59 | OC7 | A6/O4' | 2,21 | HM11' |
| A6/O4' | 3,02 | C13 | T4/O2 | 2,67 | H201 |
| C5/O2 | 2,36 | N17 | C5/O4' | 2,62 | H202 |
| T4/H | 2,71 | OC2' | A6/O4' | 2,03 | H131 |
| C5/H | 2,45 | OC2' | C5/O2 | 1,36 | HN17 |
| C5/O2 | 3,00 | C8' | G2/centróide N1-C6 | 4,03 | Centróide anel A |
| G2/N2 | 3,05 | N7' | A6/centróide N1-C6 | 4,09 | Centróide anel A |
| G2/H | 2,23 | N7' | A6/centróide N1-C6 | 2,49 | OC8 |
| T4/O4' | 2,65 | H4' | A3/H2 | 2,97 | Centróide O1'-C9' |

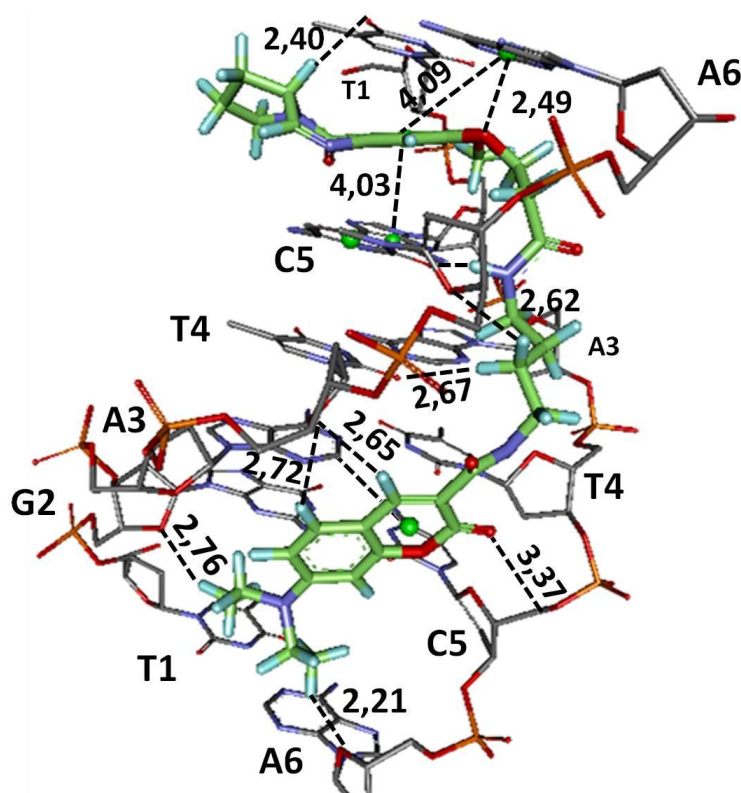


Figura 3.7a.7 Interações (em Å) do ligante 3 em 1d67.

LIGANTE 3

3.7a.8 Receptor 1k9g

Tabela 3.7a.8 Interações do ligante 3 em 1d67

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante | Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|-------------------|---------------|---------------|--------------------|---------------|---------------|
| G6/N7 | 2,43 | H11A | G5/O3' | 3,28 | CM2' |
| G5/N7 | 3,11 | C3 | G5/H | 2,63 | OC16 |
| G5/N7 | 3,08 | N4 | T3/O2 | 3,39 | N15 |
| G6/N2 | 2,98 | OC8 | T3/O2 | 2,52 | HN15 |
| G6/H | 2,49 | OC8 | G5/N3 | 2,57 | H721' |
| C1/O2 | 3,30 | C13 | G5/O4' | 2,20 | H722' |
| C2/O2 | 3,37 | C20 | G5/O3' | 2,34 | HM21' |
| T3/O4' | 3,06 | C20 | A4/O4' | 2,07 | HM12' |
| G5/H | 2,49 | C21 | T3/O2 | 2,05 | HM11' |
| T3/O2 | 2,51 | OC2' | A4/O4' | 2,55 | HM13' |
| T3/H1' | 2,71 | OC2' | T3/O4' | 2,05 | H201 |
| A4/C1' | 3,00 | OC2' | C2/O2 | 2,36 | H202 |
| G5/O4' | 2,97 | C5' | T3/O4' | 3,20 | H202 |
| A4/N3 | 2,55 | C8' | C2/O4' | 2,65 | H131 |
| G5/O4' | 1,97 | H5' | C1/O2 | 2,40 | H132 |
| A4/N3 | 1,98 | H8' | G5/Centroide N1-C6 | 3,21 | N10 |
| G5/O4' | 3,14 | C72' | G6/Centroide N1-C6 | 3,00 | HC9 |
| T3/O2 | 2,84 | CM1' | C1/Centroide N1-C6 | 2,96 | OC7 |
| A4/O4' | 2,73 | CM1' | C2/Centroide N1-C6 | 2,87 | H122 |

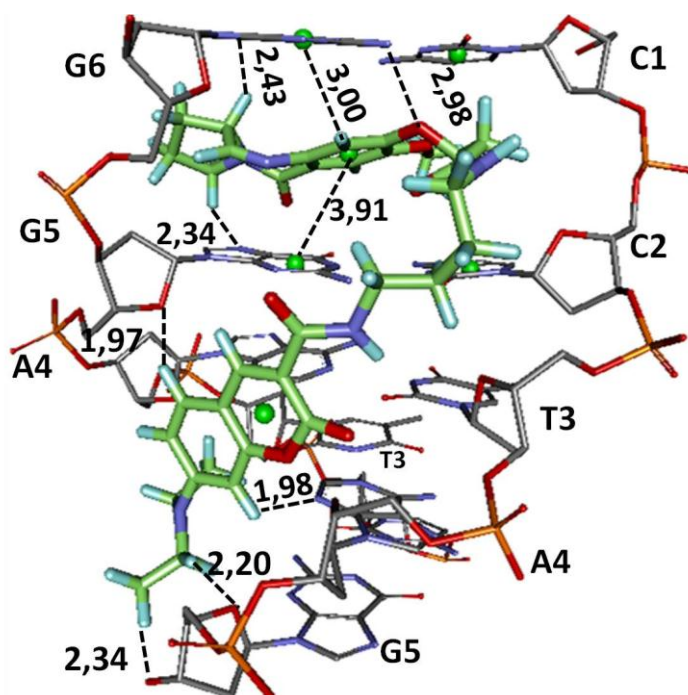


Figura 3.7a.8 Interações (em Å) do ligante 3 em 1k9g.

LIGANTE 3

3.7a.9 Receptor 2rou

Tabela 3.7a.9 Interações do ligante 3 em 2rou

| Nucleotídeo/átomo | Distancia (Å) | Átomo ligante | Nucleotídeo/átomo | Distancia (Å) | Átomo ligante |
|-------------------|---------------|---------------|--------------------------|---------------|--------------------|
| G20/H22 | 2,77 | OC8 | G4/N3 | 2,45 | HM12' |
| C7/O2 | 3,13 | CM | G4/N3 | 2,64 | HM11' |
| G8/O4' | 3,28 | CM | G4/N3 | 2,70 | HM13' |
| C7/O2 | 2,60 | HM3 | G6/N3 | 2,63 | H212 |
| G8/O4' | 2,70 | HM3 | G22/O4' | 3,00 | H181 |
| C7/O2 | 2,74 | HM2 | C21/O2 | 2,33 | H182 |
| G6/N3 | 3,24 | C20 | G22/N3 | 2,77 | H201 |
| C5/C1' | 3,05 | O1' | G6/N3 | 2,50 | H202 |
| C5/H1' | 2,22 | O1' | G22/N3 | 3,23 | H202 |
| G24/O4' | 1,95 | H5' | G20/centróide anel N1-C6 | 3,85 | Centróide anel A |
| C5/O4' | 2,37 | H8' | G20/centróide anel C4-N9 | 3,29 | Centróide anel A |
| G4/N3 | 2,79 | CM1' | G6/centróide anel N1-C6 | 2,70 | Centróide C5'-C10' |

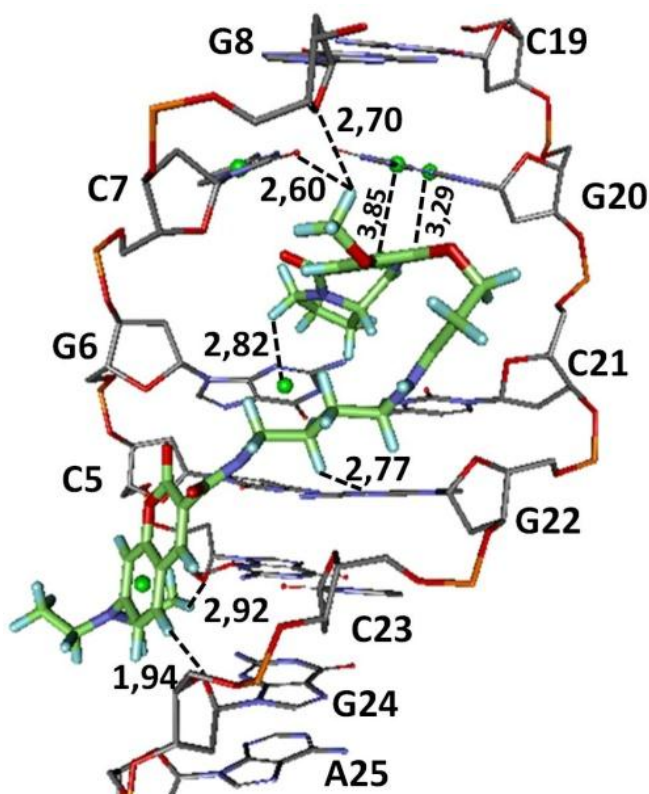


Figura 3.7a.9 Interações (em Å) do ligante 3 em 2rou.

Nesta seção estão os resultados do Experimento 4.0, descritos no Capítulo 3, Seção 3.2.4. Os cálculos de docking foram realizados com o DNA-receptor 2ky7. Foram investigadas as porções que influem na intercalação.

3.8a.1 PBD-espaçador do ligante 2ky7

| Tabela 3.8a.1 Interações da PBD-espaçador do ligante 2ky7 no DNA-receptor 2ky7 | | |
|--|---------------|------------------|
| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
| A4/N7 | 2,99 | O5 |
| T17/O4' | 3,21 | C14 |
| T16/O2 | 2,54 | N16 |
| A5/N7 | 2,78 | C1A |
| T6/O2 | 3,09 | C20 |
| T7/O4' | 3,31 | C20 |
| A5/N7 | 2,17 | H1A |
| T16/O4' | 2,57 | H18 |
| DT6/O2 | 2,62 | H20A |
| T7/O4' | 2,29 | H20A |
| T17/O4' | 2,29 | H14 |
| T16/O2 | 1,50 | HN16 |
| T7/O4' | 2,60 | H32 |
| A4/centroide N1-C6 | 3,78 | Centroide anel A |
| A5/centroide N1-C6 | 3,60 | Centroide anel A |
| T17/centroide N1-C6 | 2,66 | H14 |
| T17/centroide N1-C6 | 2,85 | H13A |

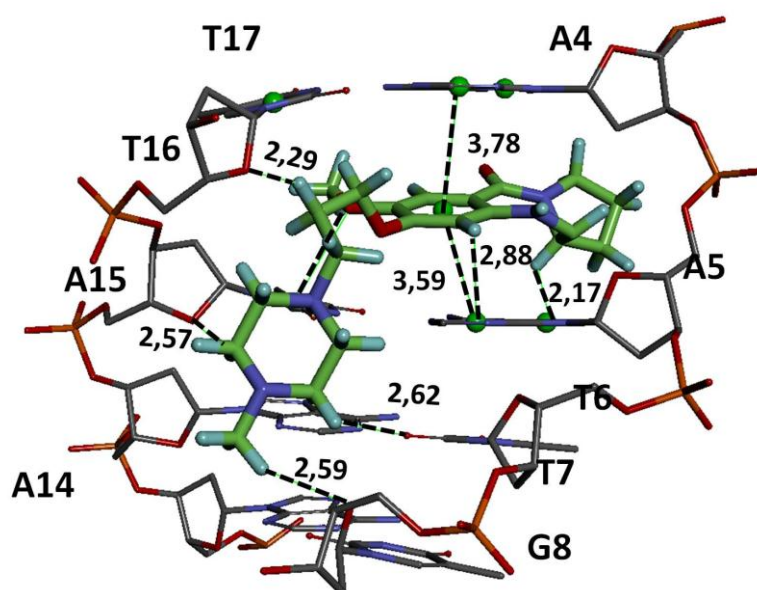
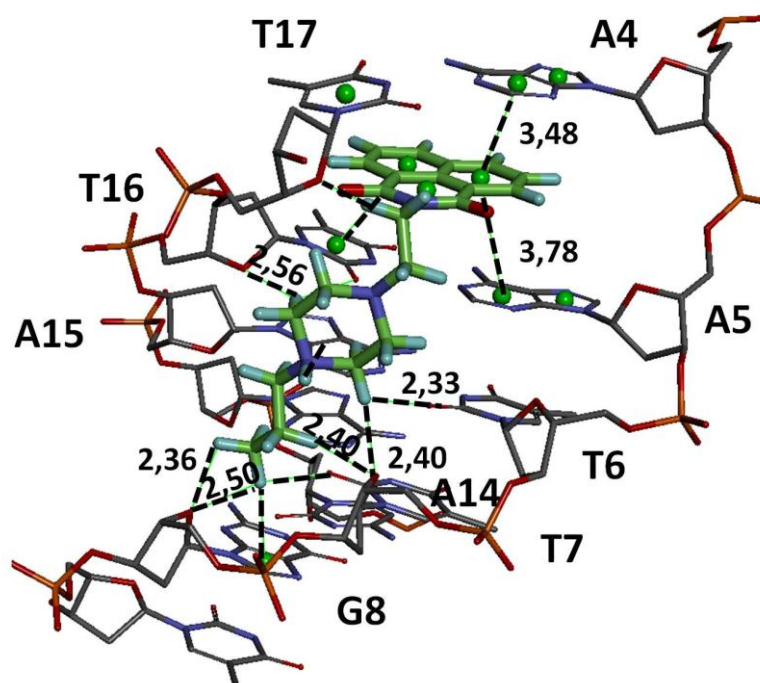


Figura 3.8a.1 Interações (em Å) da PBD-espçador do ligante 2ky7 no DNA-receptor 2ky7.

3.8a.2 Ligante naftalimida-espaçador

Tabela 3.8a.2 Interações da naftalimida-espaçador do ligante 2ky7 no receptor 2ky7

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante | Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|-------------------|---------------|---------------|---------------------|---------------|-------------------|
| T7/O2 | 2,80 | C13 | T6/O2 | 2,33 | H21 |
| G8/O4' | 2,87 | C13 | T7/O4' | 2,41 | H21 |
| T7/O4' | 3,34 | C14 | T16/O2 | 2,32 | H21A |
| T16/O2 | 3,40 | C17 | T17/O4' | 2,10 | H23 |
| T16/O2 | 3,15 | N19 | T17/O2 | 2,64 | H23A |
| T6/O2 | 2,93 | C21 | T7/O2 | 2,46 | H13 |
| T16/O2 | 3,24 | C21 | G8/O4' | 2,50 | H13 |
| T17/O4' | 3,08 | C23 | T7/O2 | 2,51 | H13A |
| T16/C2' | 3,23 | O25 | T7/O4' | 2,40 | H14A |
| T16/C1' | 3,04 | O25 | T7/O2 | 2,56 | H14A |
| T16/H2'' | 2,55 | O25 | A15/N3 | 2,54 | H15A |
| T16/H1' | 2,23 | O25 | G8/O4' | 2,37 | H26 |
| T16/O4' | 2,56 | H17 | A4/centroide N1-C6 | 3,48 | Centroide C30-C31 |
| T16/O2 | 2,54 | H17 | A5/centroide N1-C6 | 3,78 | Centroide C30-C31 |
| T17/O4' | 2,69 | H18A | T17/centroide N1-C6 | 3,12 | O25 |
| T6/O2 | 2,72 | H20A | T16/centroide N1-C6 | 3,55 | Centroide C26-C27 |

**Figura 3.8a.2** Interações (em Å) da naftalimida-espaçador do ligante 2ky7 no receptor 2ky7.

3.8a.3 Ligante 2ky7-cumarina

Tabela 3.8a.3 Interações do ligante 2ky7 substituído com porção cumarina no receptor 2ky7

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante | Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|-------------------|---------------|---------------|---------------------|---------------|--------------------|
| A5/O4' | 2,54 | CM | T17/O4' | 2,63 | H15A |
| A4/C2 | 2,98 | OC7 | T16/O4 | 2,44 | H11A |
| A4/H2 | 2,65 | OC7 | T16/O2 | 1,81 | HN16 |
| T17/O4' | 3,04 | C15 | T7/O4' | 2,52 | H32 |
| T16/O2 | 2,83 | N16 | T16/H5' | 2,72 | O1' |
| T7/O4' | 3,27 | C20 | G8/O4' | 2,92 | C4' |
| T16/O3' | 2,69 | H17A | G8/N3 | 2,48 | H4' |
| T7/O4' | 2,52 | H20A | G8/N3 | 2,67 | H5' |
| T17/O2 | 2,20 | H13 | T7/H1' | 2,33 | OC2 |
| T17/O2 | 2,56 | H13A | G8/C1' | 3,25 | OC2 |
| T17/N3 | 2,48 | H13A | A15/H4' | 2,26 | Centroide C5'-C10' |
| A5/O4' | 2,25 | H12A | T17/centroide N1-C6 | 2,86 | H13a |
| A5/O4' | 2,19 | H12B | T16/centroide N1-C6 | 2,77 | HN10 |
| T16/O2 | 2,53 | H14 | A4/centroide N1-C6 | 3,23 | Centroide anel A |
| T17/O4' | 2,50 | H15 | A5/centroide N1-C6 | 3,68 | Centroide anel A |

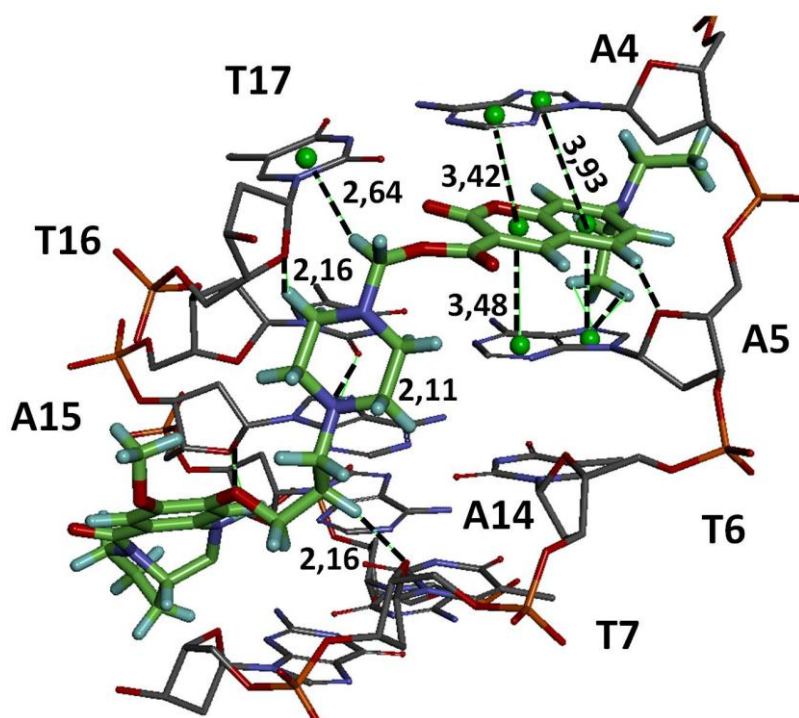


Figura 3.8a.3 Interações (em Å) do ligante 2ky7 substituído com cumarina no receptor 2ky7.

3.8a.4 Ligante 1-naftalimida

Tabela 3.8a.4 Interações do ligante 1 substituído com porção naftalimida no receptor 2ky7

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante | Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|-------------------|---------------|---------------|--------------------|---------------|------------------|
| A5/O4' | 3,03 | C10 | T17/O4' | 2,74 | N15 |
| A5/O4' | 2,23 | H21 | T17/O4' | 2,03 | HN15 |
| T17/O4 | 2,33 | H23 | T16/O2 | 2,07 | H132 |
| A15/N3 | 2,56 | H31 | T16/O4' | 2,57 | H122 |
| G8/O4' | 2,52 | H11A | T17/OP1 | 2,75 | CM |
| G8/N3 | 3,10 | C1 | T17/OP1 | 2,46 | HM1 |
| T9/O4' | 3,27 | C1 | T17/OP1 | 2,33 | HM3 |
| T9/O4' | 2,33 | H11 | A5/centroide N1-C6 | 3,52 | Centroide N1-C14 |
| G8/N3 | 2,48 | H12 | A4/centroide N1-C6 | 3,98 | Centroide N1-C14 |
| A15/C1' | 2,97 | N10 | A4/centroide N1-C6 | 3,37 | Centroide C8-C12 |
| A15/H1' | 2,09 | N10 | A5/centroide C4-N9 | 3,89 | Centroide C8-C12 |
| A5/C2 | 3,16 | OC16 | A4/centroide C4-N9 | 3,24 | Centroide C8-C12 |
| A5/H2 | 2,29 | OC16 | T16/H5' | 2,84 | Centroide anel A |

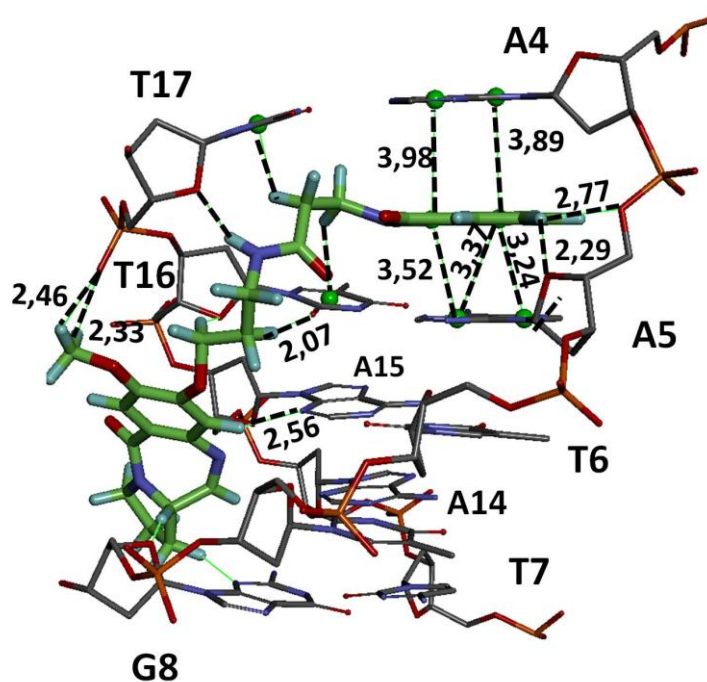


Figura 3.8a.4 Interações (em Å) do ligante 1 substituído com naftalimida no receptor 2ky7.

Nesta seção estão os resultados do Experimento 5.0, descritos no Capítulo 3, Seção 3.2.5. Os cálculos de docking foram realizados com os DNA-receptores receptores 1g3x, 1d67, 1k9g, 2rou e 2da8 e o ligante em todos os casos foi a daunomicina.

3.9a.1 Receptor 1g3x

Tabela 3.9a.1 Interações do complexo 1g3x-daunomicina (intercalação em AA)

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante | Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|-------------------|---------------|---------------|---------------------|---------------|------------------|
| T19/H5M3 | 2,43 | O8 | T20/O4' | 2,57 | O17 |
| T19/C5M | 2,49 | O10 | T20/H5'1 | 2,53 | O17 |
| T19/H5M1 | 2,13 | O10 | T19/O2P | 2,60 | H |
| T19/H5M3 | 1,98 | O10 | T19/O2P | 2,27 | H |
| T19/O2P | 2,79 | O12 | T19/O5' | 2,68 | H |
| T19/C5M | 3,05 | O12 | T19/O2P | 2,34 | H |
| T19/H5M1 | 2,16 | O12 | T19/O1P | 2,78 | H |
| T19/H6 | 2,27 | O12 | T19/O2P | 1,95 | H |
| T20/O2P | 2,74 | O13 | T20/O4' | 1,72 | H |
| T20/H | 2,41 | O13 | T20/N1 | 2,58 | H |
| T19/O2P | 2,88 | C14 | A5/centroide C4-N9 | 2,81 | H |
| T19/O2P | 2,68 | O14 | A5/centroide N1-C6 | 3,68 | Centroide C1-C20 |
| T20/O2P | 3,42 | C15 | A6/centroide N1-C6 | 3,64 | Centroide C1-C20 |
| T19/C2' | 3,15 | O17 | T20/centroide N1-C6 | 4,08 | Centroide C5-C6 |
| T19/H2'2 | 2,09 | O17 | T20/centroide N1-C6 | 3,85 | Centroide C8-C9 |
| T20/C5' | 3,39 | O17 | T19/centroide N1-C6 | 3,69 | Centroide C8-C9 |

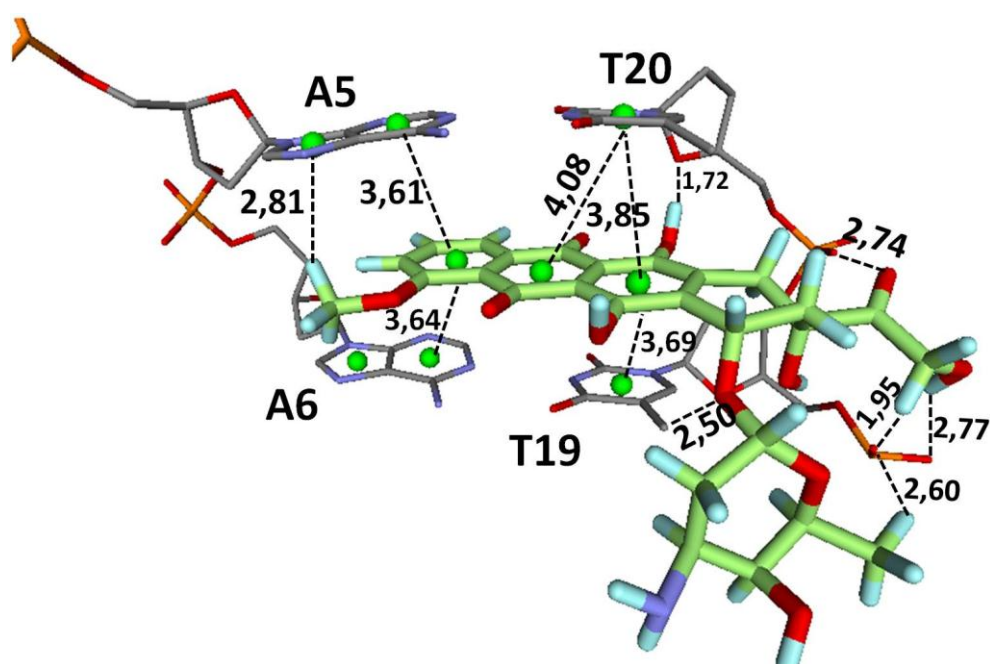


Figura 3.9a.1 Interações (em Å) do complexo 1g3x-daunomicina (intercalação em AA).

3.9a.2 Receptor 1d67

Tabela 3.9a.2 Interações do complexo 1d67-daunomicina (intercalação em AC)

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante | Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|-------------------|---------------|---------------|--------------------|---------------|------------------|
| C5/O2 | 3,12 | O8 | A6/O4' | 2,46 | H4 |
| A6/O4' | 3,47 | O8 | A3/O4' | 2,46 | H8 |
| G2/N2 | 2,98 | O10 | A3/O4' | 2,43 | H10 |
| G2/H | 2,29 | O10 | G2/O4' | 2,41 | H13 |
| G2/N2 | 3,10 | O12 | A6/N7 | 2,41 | H15 |
| G2/N3 | 3,01 | O12 | C5/O2 | 2,54 | H21 |
| G2/H | 2,22 | O12 | T4/O2 | 1,87 | H22 |
| G2/H | 2,14 | O12 | C5/O4' | 1,98 | H23 |
| A3/O4' | 3,16 | O12 | C5/O2 | 2,76 | H23 |
| G2/C4' | 3,39 | O13 | A3/N3 | 2,57 | H24 |
| G2/H | 2,47 | O13 | A3/N3 | 2,42 | H26 |
| A3/O4' | 3,05 | C14 | T4/O4' | 2,29 | H28 |
| G2/O4' | 3,46 | C15 | C5/centroide N1-C6 | 3,59 | O4 |
| C5/O2 | 3,23 | C3' | A6/centroide N1-C6 | 4,06 | Centroide C5-C6 |
| T4/O2 | 2,76 | N3' | A6/centroide N1-C6 | 3,95 | Centroide C8-C9 |
| C5/O4' | 3,04 | N3' | G2/centroide N1-C6 | 3,91 | Centroide C8-C9 |
| A3/N3 | 3,24 | C4' | C5/centroide N1-C6 | 3,93 | Centroide C5-C6 |
| T4/O4' | 3,26 | C6' | C5/centroide N1-C6 | 3,95 | Centroide C1-C20 |
| T4/H | 2,62 | C6' | | | |

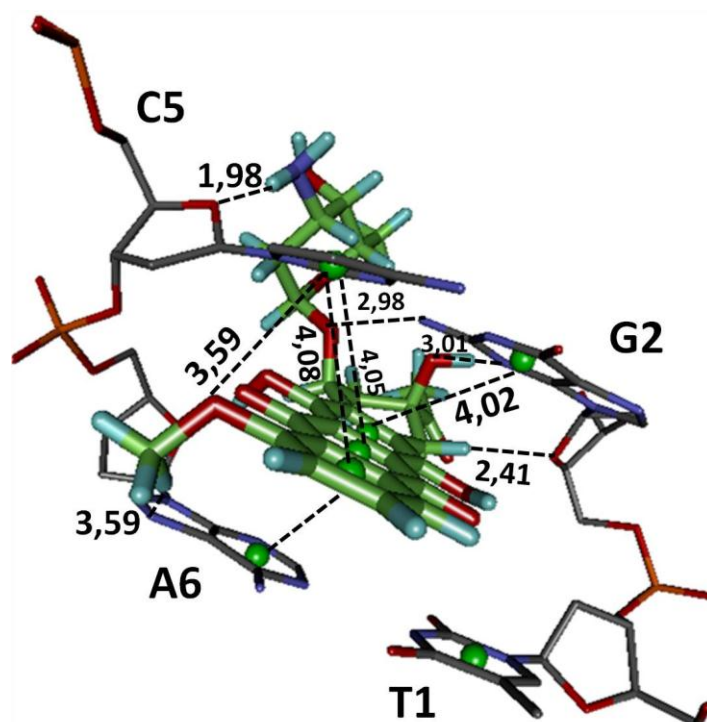


Figura 3.9a.2 Interações (em Å) do complexo 1d67-daunomicina (intercalação em AC).

3.9a.3 Receptor 1k9g

Tabela 3.9a.3 Interações do complexo 1k9g-daunomicina (intercalação em GG)

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante | Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|-------------------|---------------|---------------|--------------------|---------------|-----------------|
| G5/H | 2,69 | O8 | T3/O4' | 2,38 | H8 |
| G6/H | 2,78 | O8 | C2/O2 | 2,64 | H13 |
| G5/N2 | 2,39 | O10 | G6/N7 | 2,33 | H15 |
| G5/H | 1,52 | O10 | G6/O6 | 2,70 | H15 |
| C2/O2 | 2,91 | O12 | G5/N2 | 2,64 | H21 |
| T3/O4' | 3,19 | O12 | G5/N3 | 2,09 | H21 |
| G5/N2 | 2,81 | O12 | A4/N3 | 2,54 | H22 |
| G5/H | 2,36 | O12 | G5/O4' | 1,69 | H23 |
| G5/H | 2,58 | O12 | T3/O2 | 2,67 | H24 |
| C2/O2 | 3,28 | C15 | A4/O4' | 2,05 | H25 |
| G6/N7 | 3,22 | C21 | T3/O2 | 2,45 | H26 |
| G5/N3 | 3,03 | C3' | G5/N2 | 2,43 | H26 |
| G5/O4' | 2,75 | N3' | A4/O4' | 2,19 | H27 |
| T3/O2 | 3,33 | C4' | T3/O4' | 2,67 | H28 |
| A4/O4' | 3,06 | O4' | T3/O2 | 2,49 | H29 |
| T3/O2 | 3,00 | C5' | A4/O4' | 2,11 | H29 |
| T3/O2 | 3,04 | C6' | G5/centroide C4-N9 | 3,71 | O4 |
| A4/O4' | 2,58 | C6' | G5/centroide N1-C6 | 3,56 | Centroide C8-C9 |
| G6/O4' | 2,44 | H4 | G5/centroide N1-C6 | 3,40 | Centroide C5-C6 |
| C2/O2 | 2,42 | H8 | G6/centroide N1-C6 | 3,94 | Centroide C5-C6 |

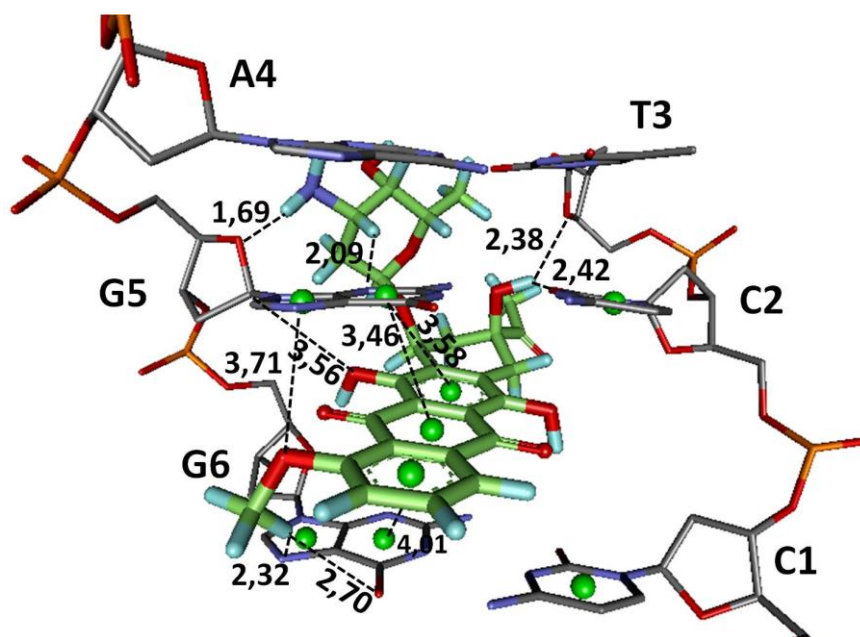


Figura 3.9a.3 Interações (em Å) do complexo 1k9g-daunomicina (intercalação em GG).

3.9a.4 Receptor 2rou

Tabela 3.9a.4 Interações do complexo 2rou-daunomicina (intercalação em GC)

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante | Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|-------------------|---------------|---------------|---------------------|---------------|-----------------|
| G6/OP2 | 3,28 | C3 | C7/O2 | 3,09 | C6' |
| G6/OP2 | 2,38 | O4 | G8/O4' | 3,27 | C6' |
| G6/H2' | 2,17 | O6 | G6/OP2 | 2,68 | H3 |
| G6/N2 | 2,89 | O10 | G20/N1 | 2,31 | H6 |
| G6/N2 | 2,32 | O12 | G20/N3 | 2,53 | H6 |
| G6/H22 | 2,08 | O12 | C21/O2 | 1,85 | H8 |
| C21/O2 | 2,82 | O12 | G20/N3 | 2,34 | H11 |
| G20/C2' | 2,74 | O13 | C7/N1 | 2,64 | H18 |
| G20/C1' | 2,84 | O13 | C7/O4' | 1,97 | H19 |
| G20/H2'' | 2,10 | O13 | G6/N3 | 2,35 | H20 |
| G20/H1' | 2,62 | O13 | C7/O2 | 2,61 | H28 |
| G20/N3 | 3,16 | C14 | G8/O4' | 2,43 | H28 |
| C21/N4 | 2,96 | O19 | G20/N2 | 2,46 | H29 |
| C21/H42 | 2,49 | O19 | G20/centroide C1-N6 | 2,10 | H6 |
| G6/N3 | 3,24 | C2' | G20/centroide C4-N9 | 3,45 | O13 |
| C7/O4' | 2,90 | C2' | G6/centroide C1-N6 | 3,20 | Centroide C8-C9 |
| C7/O4' | 2,50 | O4' | G6/centroide C1-N6 | 3,28 | Centroide C5-C6 |
| C7/H4' | 2,66 | O4' | G6/centroide C4-N9 | 3,43 | Centroide C5-C6 |
| C7/H1' | 2,69 | O5' | C7/centroide C1-N6 | 2,57 | H18 |

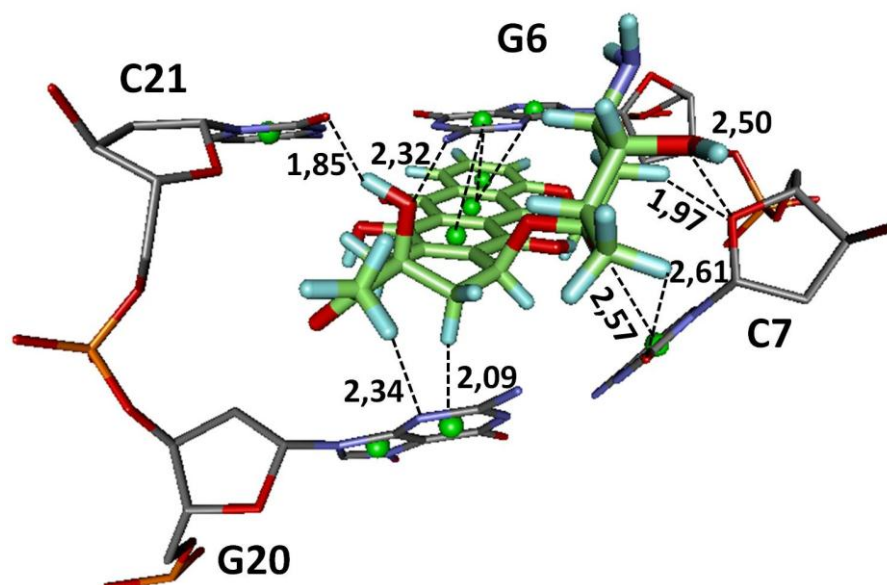


Figura 3.9a.4 Interações (em Å) do complexo 2rou-daunomicina (intercalação em GC).

3.9a.5 Receptor 2da8

Tabela 3.9a.5 Interações do complexo 2da8-daunomicina (intercalação em AT)

| Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante | Nucleotídeo/átomo | Distância (Å) | Átomo ligante |
|-------------------|---------------|---------------|--------------------|---------------|------------------|
| A2/H2'' | 2,89 | O4 | T5/O2 | 2,20 | O12 |
| A2/H8 | 3,35 | O4 | A2/C2 | 3,24 | O12 |
| T3/C5 | 3,28 | O4 | A2/H2 | 2,20 | O12 |
| T3/C7 | 3,33 | O4 | A2/N3 | 3,35 | C3' |
| T3/C6 | 3,29 | O4 | G1/N2 | 2,90 | N3' |
| T3/H73 | 2,58 | O4 | G1/H22 | 1,97 | N3' |
| T3/H6 | 3,25 | O4 | A2/O4' | 2,93 | N3' |
| A2/C2' | 3,13 | O6 | T3/O4' | 2,04 | H4 |
| A2/C1' | 2,97 | O6 | T5/O2 | 1,20 | H8 |
| A2/H2'' | 2,42 | O6 | A2/N3 | 2,33 | H21 |
| A2/H1' | 2,50 | O6 | A2/O4' | 1,89 | H22 |
| A2/C1' | 3,29 | O8 | A2/centroide C4-N9 | 3,38 | Centroide C5-C6 |
| A2/H1' | 2,25 | O8 | A2/centroide N1-C6 | 3,64 | Centroide C5-C6 |
| T3/O4' | 3,03 | O8 | A2/centroide N1-C6 | 3,20 | Centroide C7-C8 |
| A2/C2 | 3,18 | O10 | T3/centroide N1-C6 | 3,40 | Centroide C1-C20 |
| A2/H2 | 2,70 | O10 | T3/centroide N1-C6 | 3,82 | Centroide C1-C20 |

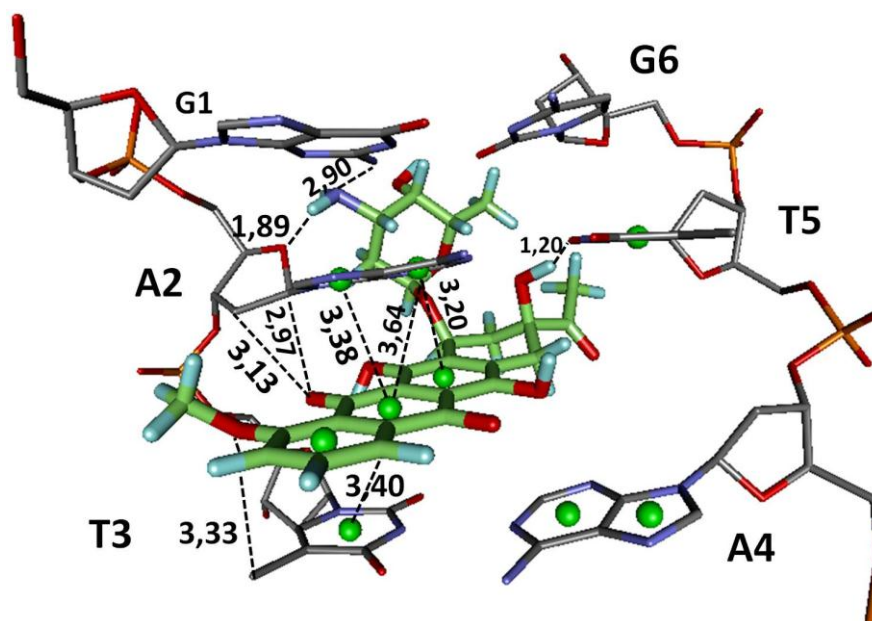


Figura 3.9a.5 Interações (em Å) do complexo 2da8-daunomicina (intercalação em AT).