

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Bioquímica e Imunologia

DÉBORA MARIA ABRANTES COSTA

**Caracterização estrutural das enzimas *cis*-naftaleno dihidrodiol  
desidrogenase e salicilato hidroxilase recombinantes de *Pseudomonas putida*  
G7 envolvidas na degradação do naftaleno**

Belo Horizonte

2014

**Débora Maria Abrantes Costa**

**Caracterização estrutural das enzimas *cis*-naftaleno dihidrodiol desidrogenase e salicilato hidroxilase recombinantes de *Pseudomonas putida* G7 envolvidas na degradação do naftaleno**

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Área de concentração: Estrutura e Função de Proteínas e Peptídeos.

**Orientador: Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem**

Belo Horizonte

2014

Dedico esse trabalho a meus pais, Isabel e  
Valter, e ao meu marido Sandro.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre iluminar meu caminho.

Aos meus pais, Isabel e Valter, pelo amor incondicional e por todo o apoio. Devo essa conquista a eles.

Ao meu marido Sandro pelo amor, compreensão e ajuda. Ao Gabriel pelo carinho.

Às minhas irmãs, Luciana e Patrícia pela amizade e amor.

À minha avó Clarice pelo amor, pelo carinho e por sempre torcer por mim (em memória).

À minha avó Vani e a todos os meus familiares e amigos que participaram desta conquista.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem, pelos ensinamentos científicos, pelas oportunidades oferecidas e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Alvan C. Hengge da *Utah State University* por todo o aprendizado durante ao Doutorado Sanduíche e pela hospitalidade.

A todos os alunos e ex-alunos do BIOEST (Laboratório de Biologia Estrutural) e aos alunos do laboratório do Prof. Dr. Alvan Hengge pela troca de conhecimentos e pela ajuda.

A todos os laboratórios e alunos do Departamento de Bioquímica e Imunologia que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos responsáveis pelas linhas de difração de raios-X MX1 e MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Vale S.A. pelo apoio financeiro.

## RESUMO

O conhecimento da estrutura tridimensional de enzimas nos permite determinar seus mecanismos de ação, atuar de forma orientada na estrutura destas moléculas e, eventualmente, alterar propriedades físico-químicas objetivando alguma aplicação biotecnológica específica, além de contribuir para o conhecimento básico da relação estrutura-função de proteínas. As enzimas *cis*-naftaleno dihidrodiol desidrogenase (NahB) e salicilato hidroxilase (NahG) de *Pseudomonas putida* G7 estão envolvidas na degradação do naftaleno, um hidrocarboneto aromático policíclico (HAPs). A maioria dos HAPs são tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos. A biorremediação é uma estratégia para a eliminação dos HAPs do meio ambiente, a qual utiliza enzimas ou microorganismos que possuem a capacidade de metabolizar esses compostos e transformá-los em substâncias menos tóxicas. No presente trabalho foram feitas a caracterização estrutural da proteína NahB e as caracterizações bioquímica e estrutural da NahG. Os genes *nahB* e *nahG* foram clonados e expressos em células de *Escherichia coli* Rosetta<sup>TM</sup> (DE3) cultivadas a 18° C por 16 horas. A análise do *pellet* e do sobrenadante revelou que as proteínas estavam na fração solúvel. As proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade e exclusão molecular. A proteína NahB recombinante apresenta massa molecular de 29,5 kDa e foi denominada 6xHis-NahB, a NahG recombinante possui massa molecular de 48,9 kDa e foi denominada 6xHis-NahG. Para obter as proteínas corretamente enoveladas, estáveis e monodispersas foram testados diferentes protocolos de lise celular e de purificação, além da adição de ligantes. Após otimização, foram obtidos cristais de ambas as proteínas, os quais foram submetidos à difração de raios-X. Um cristal da 6xHis-NahB difratou até 1.64 Å e sua estrutura foi resolvida pelo método de Substituição Molecular. A enzima 6xHis-NahB apresenta o clássico motivo de Rossmann de ligação de nucleotídeo, formado por uma folha beta central constituída por sete fitas-β e por nove α-hélices, sendo que são 3 hélices de cada lado flanqueando a folha beta. Para resolução da estrutura tridimensional da 6xHis-NahG foi utilizado o método dos átomos pesados. Um cristal nativo da enzima 6xHis-NahG difratou até 2.20 Å e um cristal derivado com iodo até 2.00 Å. Esta enzima foi caracterizada pela presença de três folhas beta constituída por oito, quatro e três fitas-β e por quatorze α-hélices, sendo estruturalmente similar a outras hidroxilases dependentes de FAD. A 6xHis-NahG converte ácido salicílico em catecol via hidroxilação descarboxilativa e os valores de  $K_M$  para a enzima sem cauda de seis histidinas foram 27,31; 1,26 e 22,74 μM para o substrato ácido salicílico e para as coenzimas FAD e NADH, respectivamente.

Palavras chave: difração de raios-X, *Pseudomonas*, biorremediação, naftaleno desidrogenase, salicilato hidroxilase.

Suporte financeiro: CAPES, CNPq, FAPEMIG e VALE S.A..

## ABSTRACT

The three dimensional structure of enzymes allows us to determine their action mechanism, to act in a targeted manner in the structure of these molecules and eventually change physicochemical properties in favor of any specific biotechnological applications, and contribute to a basic understanding of the proteins structure-function. *cis*-Naphthalene dihydrodiol dehydrogenase (NahB) and salicylate hydroxylase (NahG) enzymes from *Pseudomonas putida* G7 are involved in degradation of naphthalene, a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH). Most PAHs are toxics, mutagenics and carcinogenics. Bioremediation is a strategy for the removal of PAHs from the environment, which uses enzymes or microorganisms that have the ability to metabolize these compounds and turn them into less toxic substances. In the present study the structural characterization of the NahB protein and the biochemical and structural characterizations of NahG were done. The *nahB* and *nahG* genes were cloned and expressed in *Escherichia coli* Rosetta<sup>TM</sup> (DE3) cells at 18° C for 16 hours, leading to expression of the enzymes in the soluble fraction. The recombinant proteins were purified by affinity and molecular exclusion chromatographies. In order to obtain folded, stable and monodisperse proteins, different protocols for cell lysis and purification were tested, besides the addition of ligands. After optimization, protein crystals of both enzymes were obtained and analyzed using a X-ray diffraction experiment. 6xHis-NahB crystal diffracted to 1.64 Å and its structure was solved by the Molecular Replacement method. The 6xHis-NahB enzyme has the classic Rossmann motif of nucleotide binding, comprising a central beta-sheet consisting of seven β-strands and nine α-helices, having three helices each side flanking the β-sheet. The heavy atoms method was used to solve the 6xHis-NahG three dimensional structure. A native crystal of the 6xHis-NahG enzyme diffracted to 2.20 Å and an iodine derivative to 2.00 Å. This enzyme is characterized by the presence of three β-sheets composed of eight, four and three β-strands and fourteen α-helices, and is structurally similar to other FAD-dependent hydroxylases. The 6xHis-NahG converts salicylic acid to catechol by decarboxylative hydroxylation and  $K_M$  values of the enzyme without six histidines tag were 27.31, 1.26 and 22.74 μM for the substrate salicylic acid, FAD and NADH coenzymes, respectively.

Keywords: X-ray diffraction, *Pseudomonas*, bioremediation, naphthalene dehydrogenase, salicylate hydroxylase.

Financial Support: CAPES, CNPq, FAPEMIG e VALE S.A..

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principal mecanismo de degradação bacteriana aeróbica dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Adaptado de Bamforth & Singleton, 2005. ....	6
Figura 2 - Degradação do naftaleno em <i>Pseudomonas putida</i> G7. Enzimas: NahAaAbAcAd, NahB, NahC, NahD, NahE, NahF e NahG; Substratos e produtos: I – naftaleno, II – cis-1,2-dihidroxi-1,2-dihidroxi-naftaleno, III – 1,2-dihidroxi-naftaleno, IV – ácido 2-hidroxi-2H-cromeno-2-carboxílico, V – ácido trans-o-hidroxibenzilidenopiruvato, VI – salicilaldeído, VII – ácido salicílico, VIII – catecol. Adaptado de KEGG Pathway, <a href="http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map=map00626&amp;show_description=show">http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map=map00626&amp;show_description=show</a> . ....	9
Figura 3 - Reação catalisada pela enzima NahB de <i>Pseudomonas putida</i> G7. A enzima converte o substrato cis-naftaleno dihidrodilol no produto 1,2-dihidroxi-naftaleno e utiliza NAD <sup>+</sup> como coenzima. Adaptado de BRENDA ( <a href="http://www.brenda-enzymes.org/">http://www.brenda-enzymes.org/</a> ). ....	11
Figura 4 - SDR clássica (3 $\alpha$ /20 $\beta$ hidroxioesteroide desidrogenase - PDB 2hsd) mostrada como uma representação em fita. O clássico enovelamento de Rossmann é mostrado com a folha- $\beta$ central em azul, as $\alpha$ -hélices em vermelho e os domínios adicionais são mostrados em cinza. A coenzima está mostrada por representação de bola e bastão (Kavanagh et al., 2008). ....	12
Figura 5 - Reação catalisada pela enzima NahG de <i>Pseudomonas putida</i> G7. A enzima converte o substrato ácido salicílico no produto catecol na presença de O <sub>2</sub> e H <sup>+</sup> , utilizando NADH como coenzima e liberando CO <sub>2</sub> . Adaptado de BRENDA ( <a href="http://www.brenda-enzymes.org/">http://www.brenda-enzymes.org/</a> ). ....	14
Figura 6 – Ilustração do método de difusão de vapor para cristalização de proteínas. (a) gota suspensa; (b) gota depositada. A solução proteica está representada de vermelho e a precipitante indicada pela seta. Adaptado de Caffrey and Cherezov, 2009. ....	18
Figura 7 - Mapa do vetor pET-28a-TEV. Vetor originado do vetor pET-28a da Novagen, no qual o sítio de reconhecimento da trombina foi substituído pelo sítio de reconhecimento da protease TEV (Carneiro, et al., 2006). ....	35
Figura 8 – Mapa do vetor pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO (Invitrogen). Adaptado do manual do pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO. ....	37
Figura 9 – Mapa do vetor pGEM <sup>®</sup> -T (Promega). Adaptado do manual do pGEM <sup>®</sup> -T. ....	38

Figura 10 - Mapa do vetor pET-28a original (Novagen). Adaptado do manual dos vetores pET-28a-c(+). .....	39
Figura 11 – Fórmula estrutural de composto similar ao substrato da enzima NahB adicionado no lisado celular para aumentar a estabilidade da proteína. (a) Catecol. (b) Substrato natural da enzima NahB.....	46
Figura 12- Fórmula estrutural da carbenoxolona, composto adicionado durante a expressão para aumentar a estabilidade da enzima 6xHis-NahB. ....	47
Figura 13 – Estruturas químicas dos compostos utilizados para cocristalização ou <i>soaking</i> com a enzima 6xHis-NahB.(a) 2,3-dihidroinaftaleno. (b) 1,2-dihidroinaftaleno (produto da reação catalizada por NahB). (c) 1,2-dihidro-2-ácido carboxílico nafataleno. (d) 2,3-dihidroxi-bifenil.....	52
Figura 14 – Resumo do método de mutagênese sítio-dirigida QuikChange Lightning (Agilent Technologies). Adaptado do manual de instruções <i>QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit</i> . ....	57
Figura 15 - Análise em gel SDS–PAGE 12%, após coloração com Comassie Blue, da indução da expressão da proteína 6xHis-NahB nas frações solúvel e insolúvel. P – Marcador de peso molecular de proteína Fermentas; 1 – fração não induzida; 2 – 16 h após a indução com IPTG; 3 – fração insolúvel obtida pelo protocolo inicial; 4 – fração solúvel obtida pelo protocolo inicial. ....	63
Figura 16 - Perfil cromatográfico de eluição da 6xHis-NahB em coluna de afinidade HisTrap™ HP 5 mL. Foi aplicado fração obtida de um litro de cultura da 6xHis-NahB produzida pelo protocolo inicial. A seta indica o pico correspondente à proteína 6xHis-NahB. ....	63
Figura 17 - Perfil cromatográfico de eluição da 6xHis-NahB em coluna de exclusão molecular Hiload™ 16/60 Superdex 200. A proteína foi obtida pelo protocolo inicial na ausência de ligantes.....	64
Figura 18 - Perfil cromatográfico de eluição da 6xHis-NahB em coluna de exclusão molecular Hiload™ 16/60 Superdex 200. A proteína foi obtida pelo protocolo inicial na presença de catecol. A seta indica o pico correspondente à proteína 6xHis-NahB.....	65
Figura 19 - Perfil cromatográfico de eluição da 6xHis-NahB em coluna de afinidade HisTrap™ HP 5 mL . Foi aplicado a fração proveniente de um litro de cultura da 6xHis-NahB	

obtida pelo protocolo otimizado na presença de catecol. A seta indica o pico correspondente à proteína 6xHis-NahB.....	67
Figura 20 – Perfil eletroforético da purificação da proteína 6xHis-NahB. SDS_PAGE 12% após coloração com Comassie Blue das frações eluídas pelas colunas de purificação. P – Marcador de peso molecular de proteína Fermentas; 1 – proteína após cromatografia por afinidade produzida pelo protocolo otimizado; 2 – proteína após cromatografia por exclusão molecular produzida pelo protocolo otimizado.....	67
Figura 21 - Perfil cromatográfico de eluição da 6xHis-NahB em coluna de exclusão molecular HiloLoad™ 16/60 Superdex 200. A proteína foi obtida pelo protocolo otimizado na presença de catecol. A seta indica o pico correspondente à proteína 6xHis-NahB.....	68
Figura 22 - Comparação dos perfis cromatográficos de exclusão molecular obtidos para a 6xHis-NahB pelos protocolos inicial e otimizado.....	69
Figura 23 - Distribuição de tamanho por massa em função do tempo para a proteína 6xHis-NahB produzida pelo protocolo inicial sem ligantes.....	70
Figura 24 - Distribuição de tamanho por massa em função do tempo para a proteína 6xHis-NahB produzida pelo protocolo inicial na presença de catecol.....	71
Figura 25 - Análise da proteína 6xHis-NahB por dicroísmo circular em diferentes temperaturas. A proteína foi obtida pelo protocolo inicial na ausência de catecol. ....	73
Figura 26 - Análise da proteína 6xHis-NahB por dicroísmo circular em diferentes temperaturas. A proteína foi obtida pelo protocolo inicial na presença de catecol. ....	74
Figura 27 - Deconvolução dos dados do espectro da Figura 26 feito pelo programa CDNN2.1 para a proteína 6xHis-NahB obtida pelo protocolo inicial na presença de catecol. ....	74
Figura 28 - Análise da proteína 6xHis-NahB por dicroísmo circular em diferentes temperaturas. A proteína foi obtida pelo protocolo inicial na ausência e presença de catecol.	75
Figura 29 - Cristais da 6xHis-NahB obtidos nos ensaios iniciais utilizando robô de cristalização (A - F) e manuais (G e H). Condição A: 0,2 M tartarato de sódio/potássio, 20% (p/v) PEG 3350; Condição B: 0,2 M acetato de sódio, 0,1 M bis tris propano pH 8,5, 20% (p/v) PEG 3350; Condição C: 0,18 M citrato tri-amônio, 20% (p/v) PEG 3350; Condição D: 0,24 M malonato di-sódico pH 7,00, 20% (p/v) PEG 3350; Condição E:, 0,15 M DL-malonato di-sódico pH 7,00, 20% (p/v) PEG 3350; Condição F: 2,0 M sulfato de lítio, 8% 2-metil-2,4-pentanediol, 0,10 M imidazol pH 6,50; Condição G: 0,1 M HEPES sódio pH 7,5, 10% v/v	

isopropanol, 20% p/v polietilenoglicol 4.000; Condição H: 0,2 M cloreto de cálcio dihidratado, 0,1 M HEPES sódio pH 7,5, 28% v/v polietilenoglicol 400.....	76
Figura 30 - Cristais da 6xHis-NahB com carbenoxolona ou catecol obtidos no refinamento. Condição A: 0.1 M HEPES sódio pH 7.5, 24% v/v Polietilenoglicol 400, 0.2 M cloreto de cálcio dihidratado; Condição B: 0.1 M HEPES sódio pH 7.2, 26% v/v Polietilenoglicol 400, 0.2 M cloreto de cálcio dihidratado; Condição C: 0.1 M HEPES sódio pH 7.5, 28% v/v Polietilenoglicol 400, 0.3 M cloreto de cálcio dihidratado.....	77
Figura 31 – Cristal da 6xHis-NahB com o qual foi feito <i>soaking</i> em solução crioprotetora com NAD <sup>+</sup> 10 mM por 1 min. Condição: 0.1 M HEPES sódio pH 7.8, 26% v/v Polietilenoglicol 400, 0.2 M cloreto de cálcio dihidratado. ....	78
Figura 32 - Imagem de difração de um cristal da proteína 6xHis-NahB. Os dados de difração foram coletados a 1,64 Å.....	84
Figura 33 - Estrutura tridimensional da enzima 6xHis-NahB em que se observa o clássico motivo Rossmann de ligação de nucleotídeo, caracterizado por uma folha beta central flanqueada por 3 hélices de ambos os lados. As estruturas secundárias e a região N-terminal e C-terminal estão caracterizadas. ....	86
Figura 34 - Alinhamento feito pelo programa ClustalOmega da NahB de <i>P. putida</i> G7 (P23262) com a enzima bifenil desidrogenase (BphB <sub>B-356</sub> ) de <i>Pandoraea pnomenusa</i> . Representação dos aminoácidos conservados: * resíduos idênticos; : substituições conservadas; . substituições semi-conservadas. ....	87
Figura 35 – Estrutura da 6xHis-NahB (roxo) sobreposta à apoenzima da BphB <sub>B-356</sub> (ciano) (PDB 3ZV4). No modelo 3D da 6xHis-NahB não foi observada densidade eletrônica do resíduo de aminoácido Val186 até o Leu215, que estão representados. Na apoenzima da BphB <sub>B-356</sub> , também não foi observada densidade eletrônica na região correspondente.....	88
Figura 36 – Estrutura da 6xHis-NahB (roxo) sobreposta à BphB <sub>B-356</sub> complexada com NAD <sup>+</sup> (verde) (PDB 2Y99). No modelo 3D da 6xHis-NahB não foi observada densidade eletrônica do resíduo de aminoácido Val186 até o Leu215, que estão representados. Na BphB <sub>B-356</sub> complexada com NAD <sup>+</sup> foi observada densidade eletrônica na região correspondente. A seta indica parte do loop da BphB <sub>B-356</sub> que se estabilizou devido à interação com o NAD <sup>+</sup> , o qual está representado em azul . ....	89
Figura 37 - Estrutura da 6xHis-NahB (roxo) sobreposta à BphB <sub>B-356</sub> (amarelo) complexada com NAD <sup>+</sup> (azul) e 2,3-dihidroxibifenil (azul) (PDB 3ZV5). No modelo 3D da 6xHis-NahB	

não foi observada densidade eletrônica do resíduo de aminoácido Val186 até o Leu215. O NAD<sup>+</sup> e o produto da enzima BphB<sub>B-356</sub> estão em azul. A seta indica o loop da BphB<sub>B-356</sub> que ficou estável devido à interação com NAD<sup>+</sup> e o 2,3-dihidroxibifenil..... 90

Figura 38 - Estrutura da 6xHis-NahB (roxo) sobreposta à apoenzima da BphB<sub>B-356</sub> (ciano) (PDB 3ZV4); à BphB<sub>B-356</sub> complexada com NAD<sup>+</sup> (azul) (PDB 2Y99) e à BphB<sub>B-356</sub> complexada com NAD<sup>+</sup> e 2,3-dihidroxibifenil (amarelo) (PDB 3ZV5). A seta indica o loop flexível da BphB<sub>B-356</sub>. ..... 91

Figura 39 - Amplificação do gene *nahG*. Gel de agarose 1% corado com SYBER<sup>®</sup> Safe. P - Padrão O'GeneRuler<sup>™</sup> 1 kb DNA Ladder; 1 a 3 - inserto *nahG* purificado..... 92

Figura 40 - PCR de colônia pGEM-T-*nahG*. Gel de agarose 1% corado com SYBER<sup>®</sup> Safe. P- Padrão O'GeneRuler<sup>™</sup> 1 kb DNA Ladder; 1 a 7- Clones positivos do pGEM-T-*nahG* ..... 93

Figura 41 - PCR de colônia pET28a-TEV-NahG. Gel de agarose 1% corado com SYBER<sup>®</sup> Safe. P- Padrão O'GeneRuler<sup>™</sup> 1 kb DNA Ladder; 1 a 7- Clones positivos do pET28a-TEV-NahG..... 93

Figura 42 - Perfil cromatográfico de eluição da 6xHis-NahG em coluna de afinidade HisTrap<sup>™</sup> HP 5 mL. Foi aplicado fração proveniente de um litro de cultura da proteína. A seta indica o pico correspondente a proteína 6xHis-NahG..... 94

Figura 43 - Análise em gel SDS-PAGE 12% da proteína 6xHis-NahG purificada por cromatografia de afinidade. P – Marcador de peso molecular de proteína Fermentas; 1 a 8 – Frações da purificação por afinidade da 6xHis-NahG..... 95

Figura 44 - Perfil cromatográfico de eluição da 6xHis-NahG em coluna de exclusão molecular Hiload<sup>™</sup> 16/60 Superdex 200. A seta indica o pico correspondente à proteína 6xHis-NahG. 96

Figura 45 - Análise em gel SDS-PAGE 12% da proteína 6xHis-NahG purificada por cromatografia de exclusão molecular. P – Marcador de peso molecular de proteína Fermentas; X – Amostra proveniente da cromatografia com coluna de dessalinização. 1 a 6 – Diferentes frações obtidas na purificação por exclusão molecular. .... 96

Figura 46 - Distribuição de tamanho por massa para a proteína 6xHis-NahG..... 98

Figura 47 - Cristais da 6x-His NahG na presença de ácido salicílico obtidos no ROBOLAB. A e C: exposição à luz visível; B e D: exposição à luz ultravioleta. Condição A/B: 1,8 M fosfato de sódio monobásico monohidratado, fosfato de potássio dibásico pH 6,9; Condição C/D: 1,5 M sulfato de amônio, 0,1 M Tris pH 8.5, 12% v/v glicerol. .... 99

Figura 48 - Critais da 6x-His NahG na presença de ácido salicílico e NADH obtidos no refinamento. Condição A: 0.1 M Tris pH 9.0, 1.26 M sulfato de amônio, 20% v/v glicerol; Condição B: 0.1 M Tris pH 8,5; 1,26 M sulfato de amônio, 20% v/v glicerol. ....	100
Figura 49 - Imagem de difração de um cristal da proteína 6xHis-NahG. Os dados de difração foram coletados a 2,00 Å.....	104
Figura 50 - Estrutura tridimensional da enzima 6xHis-NahG, com a representação das fitas-β e α-hélices e as regiões N- e C-terminais. ....	108
Figura 51 - Estrutura tridimensional da enzima 6xHis-NahG, evidenciando o domínio de ligação do FAD/NAD(P) em rosa e o domínio C-terminal em azul. ....	108
Figura 52 - Estrutura tridimensional da enzima 6xHis-NahG com as localizações dos átomos de iodo (roxo) utilizados para resolução do problema das fases. ....	109
Figura 53 - Sobreposição da 6xHis-NahG (verde) com a 3-hidroxibenzoato-6-hidroxilase (PBB 4BK2) (amarelo) complexada com FAD e fosfatidilglicerol (ambos em azul). Em vermelho os resíduos 36 e 52 da 6xHis-NahG. As setas indicam as posições do <i>loop</i> na apoenzima (amarelo) e na enzima complexada com FAD e substrato (verde). ....	111
Figura 54 - Alinhamento feito pelo programa ClustalW2 da NahG de <i>P. putida</i> G7 (P23262) com as enzimas 3-hidroxibenzoato-6-hidroxilase (Q0SFK6); urato oxidase (A6T923); monoxigenase PhzS (Q9HWG9); 2-metil-3-hidroxipiridina-5-ácido carboxílico oxigenase (Q988D3) e 2,6-dihidroxipiridina-3-hidroxilase (Q93NG3). Representação dos aminoácidos conservados: * resíduos idênticos; : substituições conservadas; . substituições semi-conservadas.....	113
Figura 55 - Estrutura cristalográfica da 6xHis-NahG (verde) sobreposta com a 3-hidroxibenzoato-6-hidroxilase (PBB 4BK2) (amarelo) complexada com FAD e fosfatidilglicerol (ambos em azul). Em vermelho os resíduos de aminoácidos Leu36, Phe37, Glu38, Arg192, Asp314, His110, His322 e Arg111 da 6xHis-NahG que provavelmente interagem com o FAD. ....	114
Figura 56 - Estrutura cristalográfica da 6xHis-NahG (verde) sobreposta com a 3-hidroxibenzoato-6-hidroxilase (PBB 4BK2) (amarelo) complexada com FAD e fosfatidilglicerol (ambos em azul). Em vermelho os resíduos de aminoácido Lys165, Ala167 e Arg169 da 6xHis-NahG.....	115
Figura 57- Estrutura cristalográfica da 6xHis-NahG (verde) sobreposta com a urato hidroxilase (magenta) complexada com FAD e ácido úrico (ambos em azul) (PBB 3RP7). Em	

amarelo o resíduo de aminoácido 226 da 6xHis-NahG.A, visualização de toda a estrutura. B, visualização de detalhes.....	116
Figura 58 - Efeito do substrato ácido salicílico e das coenzimas FAD e NADH nas atividades das enzimas 6xHis-NahG (A), GH-NahG (B). Continua.....	118

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Iniciadores utilizados na amplificação do gene <i>nahG</i> de <i>Pseudomonas putida</i> G7 e respectivas temperaturas de anelamentos. Os sítios da enzimas de restrição utilizadas estão em negrito.....	35
Tabela 2 – Sequência dos sítios das enzimas de restrição utilizadas para subclonagem no vetor de expressão.....	35
Tabela 3 - Protocolo da reação de PCR utilizada na amplificação do gene <i>nahG</i> . ....	36
Tabela 4 - Programa para amplificação do gene <i>nahG</i> por PCR.....	36
Tabela 5 - Sequência nucleotídica dos iniciadores utilizados para sequenciamento dos plasmídeos recombinantes.....	40
Tabela 6- Antibióticos utilizados e suas respectivas concentrações.....	42
Tabela 7 - Características das proteínas recombinantes determinadas no ExPASy Bioinformatics Resource Portal .....	46
Tabela 8 – Iniciadores utilizados para mutagênese sítio-dirigida da 6xHis-NahG utilizando o kit <i>QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis</i> .....	58
Tabela 9 - Iniciadores utilizados para mutagênese sítio-dirigida da 6xHis-NahG utilizando o kit Q5 <sup>®</sup> <i>Site-Directed Mutagenesis</i> . ....	58
Tabela 10 - Reação para mutagênese sítio dirigida utilizando o kit <i>QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis</i> .....	59
Tabela 11- Programa para mutagênese sítio dirigida utilizando o kit <i>QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis</i> .....	59
Tabela 12- Reação para mutagênese sítio dirigida utilizando o kit <i>Q5 Site-Directed Mutagenesis</i> . ....	60
Tabela 13- Programa para mutagênese sítio dirigida utilizando o kit <i>Q5 Site-Directed Mutagenesis</i> . ....	60
Tabela 14 - Estatísticas dos dados de difração e de refinamento dos cristais de 6xHis-NahB obtido nos ensaios iniciais. Os valores estatísticos para as faixas de mais baixa e mais alta resolução estão entre parênteses. ....	81
Tabela 15 - Estatísticas dos dados de difração e de refinamento dos cristais de 6xHis-NahB obtido após refinamento. Os valores estatísticos para as faixas de mais baixa e mais alta resolução estão entre parênteses. ....	83

Tabela 16 - Estatísticas dos dados de difração de um cristal nativo da 6xHis-NahG utilizado na tentativa de resolução da estrutura por Substituição Molecular. Os valores estatísticos para as faixas de mais baixa e mais alta resolução estão entre parênteses. ....	102
Tabela 17 - Estatísticas dos dados de difração de um cristal derivado da 6xHis-NahG utilizado para resolução da estrutura por SAD e SIRAS. Os valores estatísticos para as faixas de mais baixa e mais alta resolução estão entre parênteses. ....	103
Tabela 18 – Sinal anômalo para um cristal derivado da 6xHis-NahG que difratou até 2,0 Å. O sinal anômalo está representado por $\langle d''/\sigma \rangle$ por faixa de resolução e a completeza por %Comp. ....	104
Tabela 19 – Coordenadas fracionárias dos íons de iodo, presentes na estrutura cristalográfica da 6xHis-NahG, utilizados para resolver o problema das fases. ....	105
Tabela 20 - Estatísticas dos dados de difração de um cristal nativo da 6xHis-NahG utilizado para resolução da estrutura por SIRAS. Os valores estatísticos para as faixas de mais baixa e mais alta resolução estão entre parênteses. ....	106
Tabela 21 – Dados da resolução da estrutura e do refinamento da 6xHis-NAHG por SAD e SIRAS. ....	107
Tabela 22 – Enzimas identificadas como estruturalmente similares à NahG pelo servidor Dali. ....	110
Tabela 23 – Atividade das enzimas 6xHis-NahG, GH-NahG, 6xHis-NahG-E38A e 6xHis-NahG-R192A sobre o ácido salicílico, FAD e NADH. ....	117
Tabela 24 - Estatísticas dos dados de difração de raios-X para cristais da 6xHis-NahB. ....	141
Tabela 25 - Estatísticas dos dados de difração de raios-X para cristais da 6xHis-NahG. Em todos os cristais a proteína foi produzida na presença de ácido salicílico no tampão de lise. ....	145
Tabela 26 - Soluções preparadas no ROBOLAB para o refinamento das condições de cristalização da 6xHis-NahB. Das 168 soluções preparadas, nas soluções numeradas de 49 a 72 obteve-se os melhores cristais. ....	147
Tabela 27 - Soluções preparadas no ROBOLAB para o refinamento das condições de cristalização da 6xHis-NahG. Das 72 soluções preparadas, nas soluções numeradas de 49 a 72 obteve-se os melhores cristais. ....	154

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD	<i>circular dichroism</i> (dicroísmo circular)
Da	dalton
DLS	<i>dynamic light scattering</i> (espalhamento dinâmico da luz)
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
D.O.	densidade óptica
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
et al.	e demais colaboradores
g	grama
°C	graus Celsius
HAPs	hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
h	hora
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo
kb	quilobase
kDa	quiloDalton ( $10^3$ Da)
L	litro
LB	meio de cultura Luria-Bertani
LLG	<i>log-likelihood gain</i>
MAD	<i>multiwavelength anomalous diffraction</i> (difração anômala com múltiplos comprimentos de onda)
MIR	<i>multiple isomorphous replacement</i> (substituição isomórfica múltipla)
mL	mililitro ( $10^{-3}$ L)
$\mu$ L	microlitro ( $10^{-6}$ L)
min	minuto

M	concentração molar (moles/L)
mM	concentração milimolar ( $10^{-3}$ moles/L)
$\mu$ M	concentração micromolar ( $10^{-6}$ moles/L)
mmol	milimol ( $10^{-3}$ moles)
mL	mililitro ( $10^{-3}$ L)
$\mu$ L	microlitro ( $10^{-6}$ L)
nm	nanômetro ( $10^{-9}$ m)
pb	pares de bases
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
pH	potencial hidrogeniônico
PM	peso molecular
pmol	picomol ( $10^{-12}$ moles)
%	porcentagem
% (p/p)	porcentual peso por peso
% (p/v)	porcentual peso por volume
% (v/v)	porcentual volume por volume
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
rpm	rotações por minuto
SAD	<i>single anomalous diffraction</i> (difração anômala simples)
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i> (eletroforese em gel de poliacrilamida com sulfato dodecil de sódio)
SIR	<i>single isomorphous replacement</i> (substituição isomórfica simples)
SIRAS	<i>single isomorphous replacement with anomalous scattering</i> (substituição isomórfica simples com espalhamento anômalo)
s	segundo
SDS	dodecil sulfato de sódio

SDRs	<i>short-chain dehydrogenases/reductases</i> (redutases/desidrogenases de cadeia curta)
TAE	tampão Tris - acetato - EDTA
TE	tampão Tris - EDTA
TFZ	<i>Translation Function Z Score</i>
Tris	tris (hidroximetil) - aminometano
U	unidade de atividade enzimática
V	volts
W	watts

Abreviações (em uma e três letras) dos resíduos de aminoácidos

A	Ala	Alanina	N	Asn	Asparagina
C	Cys	Cisteína	P	Pro	Prolina
D	Asp	Aspartato	Q	Gln	Glutamina
E	Glu	Glutamato	R	Arg	Arginina
F	Phe	Fenilalanina	S	Ser	Serina
G	Gly	Glicina	T	Thr	Treonina
H	His	Histidina	V	Val	Valina
I	Ile	Isoleucina	W	Trp	Triptofano
K	Lys	Lisina	Y	Tyr	Tirosina
L	Leu	Leucina			
M	Met	Metionina			

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 REMEDIAÇÃO DE COMPOSTOS TÓXICOS .....	3
<b>1.1.1 Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1.2 Biorremediação</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1.3 Microorganismos degradadores de HAP's</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1.4 Enzimas e microorganismos na biorremediação</b> .....	<b>6</b>
1.2 DEGRADAÇÃO DE HAPS POR <i>PSEUDOMONAS PUTIDA G7</i> .....	7
<b>1.2.1 Naftaleno</b> .....	<b>7</b>
<b>1.2.2 <i>cis</i>-Naftaleno Dihidrodiol Desidrogenase</b> .....	<b>10</b>
<b>1.2.3 Salicilato hidroxilase</b> .....	<b>13</b>
1.3 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL .....	15
<b>1.3.1 Determinação do estado de oligomerização</b> .....	<b>15</b>
<b>1.3.2 Estudo da estrutura secundária</b> .....	<b>16</b>
<b>1.3.3 Determinação da estrutura tridimensional</b> .....	<b>16</b>
1.3.3.1 Cristais .....	17
1.3.3.2 Coletando dados de difração de raios-X.....	18
1.3.3.3 Dos dados de difração ao mapa de densidade eletrônica.....	19
1.3.3.4 Substituição Molecular .....	21
1.3.3.5 Substituição Isomórfica .....	22
1.3.3.6 Difração Anômala.....	24
1.4 CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA .....	24
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>27</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30

<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>31</b>
4.1 CULTIVO DE <i>PSEUDOMONAS PUTIDA G7</i> .....	32
4.2 EXTRAÇÃO DE DNA DE <i>PSEUDOMONAS PUTIDA G7</i> .....	32
4.3 ANÁLISE DA QUALIDADE E QUANTIDADE DE DNA .....	33
4.4 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE .....	33
4.5 DESENHO DOS INICIADORES .....	34
4.6 AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>NAHG</i> .....	35
4.7 CLONAGEM E SUBCLONAGEM.....	36
4.8 PREPARO DE CÉLULAS COMPETENTES .....	41
4.9 TRANSFORMAÇÃO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	41
4.10 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL .....	42
4.11 PCR DE COLÔNIA.....	43
4.12 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	43
4.13 LISE BACTERIANA .....	44
4.14 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	44
4.15 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTEICA .....	45
4.16 DIFERENTES PROTOCOLOS PARA PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES .....	46
4.17 CLIVAGEM COM A PROTEASE TEV .....	47
4.18 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE PROTÉICA E ESTADO DE OLIGOMERIZAÇÃO .....	48
4.19 DETERMINAÇÃO DO ESTADO DE OLIGOMERIZAÇÃO .....	48
4.20 DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA .....	49
4.21 ENSAIOS DE CRISTALIZAÇÃO .....	50
4.22 COLETA E ANÁLISE DOS DADOS DE DIFRAÇÃO.....	53
4.23 CINÉTICA DO ESTADO ESTACIONÁRIO.....	54

4.24 MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA.....	55
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>61</b>
5.1 <i>CIS</i> -NAFTALENO DIHIDRODIOL DESIDROGENASE.....	62
<b>5.1.1 Amplificação e clonagem .....</b>	<b>62</b>
<b>5.1.2 Subclonagem em vetor de expressão .....</b>	<b>62</b>
<b>5.1.3 Expressão e purificação .....</b>	<b>62</b>
<b>5.1.4 Diferentes protocolos para produção das proteínas recombinantes .....</b>	<b>64</b>
<b>5.1.5 Caracterização do estado oligomérico e análise da estabilidade proteica.....</b>	<b>70</b>
<b>5.1.6 Caracterização da estrutura secundária .....</b>	<b>72</b>
<b>5.1.7 Ensaio de cristalização .....</b>	<b>75</b>
<b>5.1.8 Coleta, análise de dados de difração e resolução da estrutura.....</b>	<b>79</b>
<b>5.1.9 Análise da estrutura tridimensional .....</b>	<b>85</b>
5.2 SALICILATO HIDROXILASE .....	92
<b>5.2.1 Amplificação e clonagem .....</b>	<b>92</b>
<b>5.2.2 Subclonagem em vetor de expressão .....</b>	<b>93</b>
<b>5.2.3 Expressão e purificação .....</b>	<b>94</b>
<b>5.2.4 Caracterização do estado monomérico .....</b>	<b>97</b>
<b>5.2.5 Ensaio de cristalização .....</b>	<b>98</b>
<b>5.2.6 Coleta, análise de dados de difração e resolução da estrutura.....</b>	<b>101</b>
<b>5.2.7 Análise da estrutura tridimensional .....</b>	<b>107</b>
<b>5.2.8 Mutagênese sítio-dirigida .....</b>	<b>111</b>
<b>5.2.9 Cinética do estado estacionário .....</b>	<b>117</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>122</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>129</b>
7.1 <i>CIS</i> -NAFTALENO DIHIDRODIOL DESIDROGENASE.....	130
7.2 SALICILATO HIDROXILASE .....	131

<b>8 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>132</b>
8.1 <i>CIS</i> -NAFTALENO DIHIDRODIOL DESIDROGENASE.....	133
8.2 SALICILATO HIDROXILASE .....	134
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>135</b>
<b>10 ANEXO.....</b>	<b>140</b>
10.1 ANEXO I .....	141
10.2 ANEXO II.....	145
10.3 ANEXO III .....	147
10.4 ANEXO IV .....	154

# **1 INTRODUÇÃO**

A difração de raios-x é uma das técnicas mais eficientes para a determinação da estrutura tridimensional de proteínas (Wlodawer, et al., 2013). O número de estruturas macromoleculares depositadas no *Protein Data Bank*<sup>1</sup> (PDB) até fevereiro de 2014 chega a quase 100.000, sendo a grande maioria determinada por métodos cristalográficos (Berman, et al., 2000). O nascimento da cristalografia moderna está associado a dois experimentos cruciais realizados no início do século XX: a descoberta da difração de raios X por Max von Laue em 1912 e a demonstração feita no ano seguinte por William Lawrence Bragg e William Henry Bragg de que esse fenômeno poderia ser usado para determinar a posição dos átomos em um cristal (Eckert, 2012). Considerando-se esses eventos e a importância da Cristalografia na determinação das estruturas de moléculas, evidenciada pelos 23 Prêmios Nobel na área, a Assembleia Geral das Nações Unidas de 03 de julho de 2012 proclamou o ano de 2014 como Ano Internacional da Cristalografia.

Os modelos tridimensionais obtidos por difração de raios-X podem ser utilizados como ferramentas para revelar detalhes moleculares de processos essenciais à vida, como a catálise de reações metabólicas, a ligação de anticorpos a antígenos, a interação de proteínas com o DNA. O conhecimento detalhado dos mecanismos moleculares pode ser aplicado em diversas áreas, como poluição ambiental, tratamento de doenças, desenho racional de fármacos (Carvalho, et al., 2009; Terrell, et al., 2013; Zoete V, 2013). Entre essas áreas, pode-se destacar a utilização de enzimas ou microrganismos modificados para a remediação de compostos tóxicos do meio ambiente. Uma das grandes preocupações ambientais é a contaminação pelo petróleo e seus derivados, uma vez que esses recursos são amplamente utilizados pela sociedade e muitos dos seus compostos, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), são tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (Haritash & Kaushik, 2009).

Considerando-se a grande utilização do petróleo e seus derivados pela sociedade, os acidentes que levam à contaminação de ambientes e as características tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas desses compostos, o estudo das proteínas envolvidas nessas vias de degradação torna-se essencial e promissor. Conhecendo-se a estrutura tridimensional e o mecanismo de ação de enzimas é possível atuar de forma orientada na estrutura destas moléculas e eventualmente alterar propriedades físico-químicas objetivando alguma aplicação

---

<sup>1</sup> [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)

biotecnológica específica, avaliando a interação e sinergismo entre as enzimas de uma mesma via metabólica, além de contribuir para o conhecimento básico da relação estrutura-função de proteínas.

## 1.1 REMEDIAÇÃO DE COMPOSTOS TÓXICOS

### 1.1.1 Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

O petróleo é constituído por uma mistura complexa de compostos orgânicos, sendo os principais componentes alcanos e hidrocarbonetos aromáticos. Ele também apresenta pequenas quantidades de compostos que contêm oxigênio, nitrogênio, enxofre e alguns compostos organometálicos complexados principalmente com níquel e vanádio (Van Hamme, et al., 2003).

Entre os componentes do petróleo pode-se destacar os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), que são compostos químicos formados por dois ou mais anéis benzênicos fundidos. Esses compostos causam grande preocupação devido à ampla distribuição ambiental, à baixa solubilidade e às características tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas desses contaminantes (Haritash & Kaushik, 2009).

Os HAPs são originados tanto de forma natural como antropogênica. As principais fontes naturais são os combustíveis fósseis, como o petróleo e o carvão e a combustão incompleta de matéria orgânica. Apesar dessa origem natural, as atividades antropogênicas constituem os principais processos responsáveis pela contaminação dos ecossistemas (Bamforth & Singleton, 2005), as quais estão relacionadas com a produção industrial dos HAPs para: fabricação de corantes, de fibras sintéticas e outros; a produção de carvão vegetal; a extração e gaseificação do carvão mineral e com os processos de extração, transporte, refino, transformação e utilização do petróleo e de seus derivados (Calvo, et al., 2009; Haritash & Kaushik, 2009).

Os HAPs são contaminantes ubíquos no meio ambiente e, devido à sua alta hidrofobicidade, tendem a interagir com a fase não aquosa e a matéria orgânica do solo, dificultando a degradação microbiana (Johnsen, et al., 2005; Pacwa-Plociniczak, et al., 2014). Dessa forma, os HAPs persistem nos ecossistemas por anos e a descontaminação de

ambientes com esses poluentes é problemática (Habe & Omori, 2003; Haritash & Kaushik, 2009).

### **1.1.2 Biorremediação**

Uma estratégia para eliminação dos HAPs dos ambientes contaminados é através da biorremediação, a qual utiliza microorganismos autóctones ou alóctones, ou enzimas isoladas para degradar os contaminantes em substâncias inertes ou menos tóxicas (Alcalde, et al., 2006). Além disso, podem ser utilizados consórcios de microorganismos, como fungos ou bactérias, assim como consórcios enzimáticos (Balaji, et al., 2014; Xu, et al., 2013). Esta técnica biotecnológica é geralmente mais segura, menos agressiva e tem um melhor custo benefício quando comparada aos métodos físico-químicos tradicionais, tais como incineração e lavagem do solo (Alcalde, et al., 2006).

A biorremediação do petróleo é uma área de grande interesse biotecnológico, devido à vasta utilização e à importância desse recurso para a economia mundial. Por isso, essa área de pesquisa tem sido alvo de vários estudos há algumas décadas por exemplo, em novembro de 2002, iniciou-se um processo de biorremediação microbiana usando microorganismos presentes no petróleo em conjunto com processos mecânicos como mecanismo principal de remoção de HAPs despejados na costa norte da Espanha por um derramamento de petróleo do navio *Prestige* (Alcalde, et al., 2006). Além disso, pode-se citar a utilização de consórcios microbianos para a degradação de hidrocarbonetos do petróleo presentes em solos contaminados com diesel (Bento, et al., 2003; Ghazali, et al., 2004).

### **1.1.3 Microorganismos degradadores de HAP's**

A degradação microbiológica representa o principal mecanismo responsável pela recuperação ecológica de sítios contaminados com HAPs. Bactérias e fungos capazes de degradar esses compostos têm sido identificados e os genes, envolvidos no catabolismo desses compostos, catalogados. Vários estudos demonstraram a capacidade de espécies fúngicas, como *Phanerochaete chrysosporium*, *Bjerkandera adusta*, *Pleurotus ostreatus* e *Cunninghamella elegans* de metabolizar HAPs. A biodegradação desses compostos pelos fungos ocorre por, pelo menos, dois mecanismos: o sistema do citocromo P450 e/ou enzimas extracelulares solúveis envolvidas no catabolismo da lignina (Peng, et al., 2008). Vários

fungos capazes de secretar enzimas extracelulares que degradam hidrocarbonetos aromáticos policíclicos foram identificados e utilizados como um consórcio para biorremediação de solos contaminados com HAPs (Balaji, et al., 2014).

Com relação às bactérias, vários estudos tem identificado espécies capazes de degradar HAPs, como as bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Cycloclasticus*, *Burkholderia*, *Rhodococcus*, *Polaromonas*, *Neptunomonas*, *Janibacter*, *Nocardia*, *Bacillus*, *Deltaproteobacteria*, *Alcaligenes*, *Mycobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Achromobacter* e *Pasteurell* (Deng, et al., 2014; Kappell, et al., 2014; Lu, et al., 2011). Nas últimas duas décadas, análises genéticas da degradação aeróbica de HAPs têm dado foco aos genes catabólicos do naftaleno em espécies do gênero *Pseudomonas* (Habe & Omori, 2003).

O principal mecanismo para a degradação bacteriana aeróbica dos HAPs é a oxidação inicial do anel benzênico através de um complexo dioxigenase para formar *cis*-dihidrodióis. Esses dihidrodióis são desidrogenados para formar intermediários dihidroxilados, os quais são, posteriormente, metabolizados via catecol até dióxido de carbono e água (Figura 1) (Bamforth & Singleton, 2005).

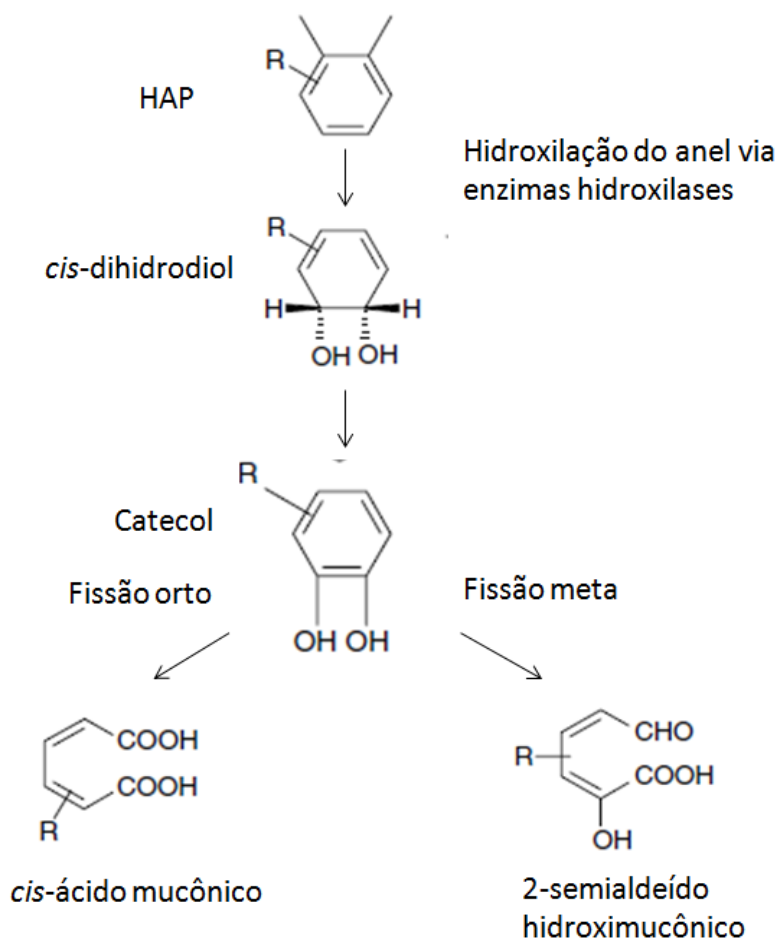


Figura 1 - Principal mecanismo de degradação bacteriana aeróbica dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Adaptado de Bamforth & Singleton, 2005.

#### 1.1.4 Enzimas e microorganismos na biorremediação

A utilização de microorganismos para biorremediação apresenta algumas limitações. Para a sobrevivência desses são necessários níveis adequados de temperatura, de pH, de oxigênio, de nutrientes e, além disso, os contaminantes tem que estar disponíveis, uma vez que, devido à forte adsorção dos HAPs ao solo, muitas vezes eles não ficam biodisponíveis. No caso da utilização de microorganismos da microbiota local, geralmente há poucas espécies que degradam os poluentes e essas estão em baixa densidade. A inoculação de microorganismos aloctones, principalmente os organismos geneticamente modificados (OGMs), pressupõem duas principais considerações: os microorganismos têm que ser resistentes às diversas condições ambientais e a introdução deles pode levar a uma competição

com a microbiota local, gerando um desequilíbrio no ecossistema (Ahuja, et al., 2004; Alcalde, et al., 2006). Soma-se a isto o fato de que existem severas restrições para o uso descontrolado de OGMs no meio ambiente.

Visto que a biotransformação envolve uma série de reações catalisadas por enzimas, alguns dos fatores adversos mencionados acima podem ser eliminados ou diminuídos se enzimas forem utilizadas no lugar de microorganismos. Muitos xenobióticos, como os HAPs, podem ser submetidos à biorremediação enzimática. Através do uso da tecnologia do DNA recombinante é possível produzir enzimas em larga escala, com estabilidade e atividade catalítica aumentadas, portanto, capazes de atuarem em ambientes extremos, com diferentes valores de pH e temperatura. Como as enzimas são altamente específicas, elas não geram subprodutos tóxicos e, além disso, as enzimas são biodegradáveis, ou seja, elas são degradadas *in situ* pela microbiota local após o tratamento. Portanto, a produção de enzimas para uso em biorremediação é uma área promissora para aumentar a eficiência e a segurança das técnicas biotecnológicas disponíveis (Ahuja, et al., 2004; Alcalde, et al., 2006).

## 1.2 DEGRADAÇÃO DE HAPS POR *Pseudomonas putida* G7

### 1.2.1 Naftaleno

O naftaleno é um dos hidrocarbonetos aromáticos mais comumente encontrado no meio ambiente e classificado como um possível carcinógeno para humanos pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer e pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA, 2004; IARC, 2002; Kulakov, et al., 2000; North, et al., 2008), uma vez que foi comprovada sua ação carcinogênica em ratos e camundongos (Abdo, et al., 2001; Abdo, 1992; Buckpitt, et al., 2002; NTP, 1992; NTP, 2000). Esse composto tem sido usado como modelo de degradação dos HAPs e a sua degradação bacteriana é bem entendida. O metabolismo do naftaleno foi bem estudado em *Pseudomonas putida* G7 que possui um plasmídeo NAH7 de 83 kb que codifica enzimas capazes de degradar esse contaminante (Habe & Omori, 2003).

Os genes para degradação do naftaleno em *P. putida* G7 são organizados em dois óperons: um deles codifica enzimas envolvidas na conversão do naftaleno a salicilato

(*nahAaAbAcAdBFCED*), o outro codifica enzimas responsáveis pela conversão do salicilato em piruvato e acetil coenzima A (*nahGTHINLOMKJ*). A primeira via de degradação é chamada de superior, enquanto a segunda é a inferior. A regulação de ambos os óperons é mediada por uma proteína denominada NahR, que age como um regulador positivo de ambos os promotores, com o salicilato sendo o indutor do sistema (Ferrero, et al., 2002).

As enzimas e os respectivos substratos e produtos da via superior de degradação do naftaleno e da primeira enzima da via inferior estão representados na Figura 2. As reações foram adaptadas da via de degradação do naftaleno descrita no KEEG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) *Pathway Database*<sup>2</sup>. O primeiro passo no catabolismo do naftaleno consiste na incorporação de oxigênio molecular no núcleo aromático do naftaleno (I) para formar o *cis*-naftaleno dihidrodiol. Essa reação é catalisada pelo complexo enzimático da naftaleno dioxigenase (NahAaAbAcAd). O *cis*-naftaleno dihidrodiol é então desidrogenado a 1,2-dihidroxi-naftaleno pela enzima *cis*-naftaleno dihidrodiol desidrogenase (NahB). A próxima enzima da via é a 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase (NahC), que leva à formação do ácido 2-hidroxi-2H-cromeno-2-carboxílico. Esse é convertido em ácido *trans*-o-hidroxibenzilidenopiruvato pela enzima 2-hidroxi-2H-cromeno-2-carboxilato isomerase (NahD). A enzima hidroxibenzilidenopiruvato hidratase-aldolase (NahE) catalisa a formação do salicilaldeído a partir do ácido *trans*-o-hidroxibenzilidenopiruvato. A última enzima da via superior de degradação do naftaleno, a salicilaldeído desidrogenase (NahF), leva à formação do ácido salicílico a partir do salicilaldeído. O salicilato é metabolizado pela via de *meta* clivagem à catecol pela enzima salicilato hidroxilase (NahG) ou à *ortho* clivagem e em seguida a intermediários do ciclo do ácido cítrico, pelas próximas enzimas da via inferior de degradação do naftaleno, NahH, NahI, NahJ, NahK, NahL, NahM, NahN e NahO (Habe & Omori, 2003).

---

<sup>2</sup> <http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00626.html>

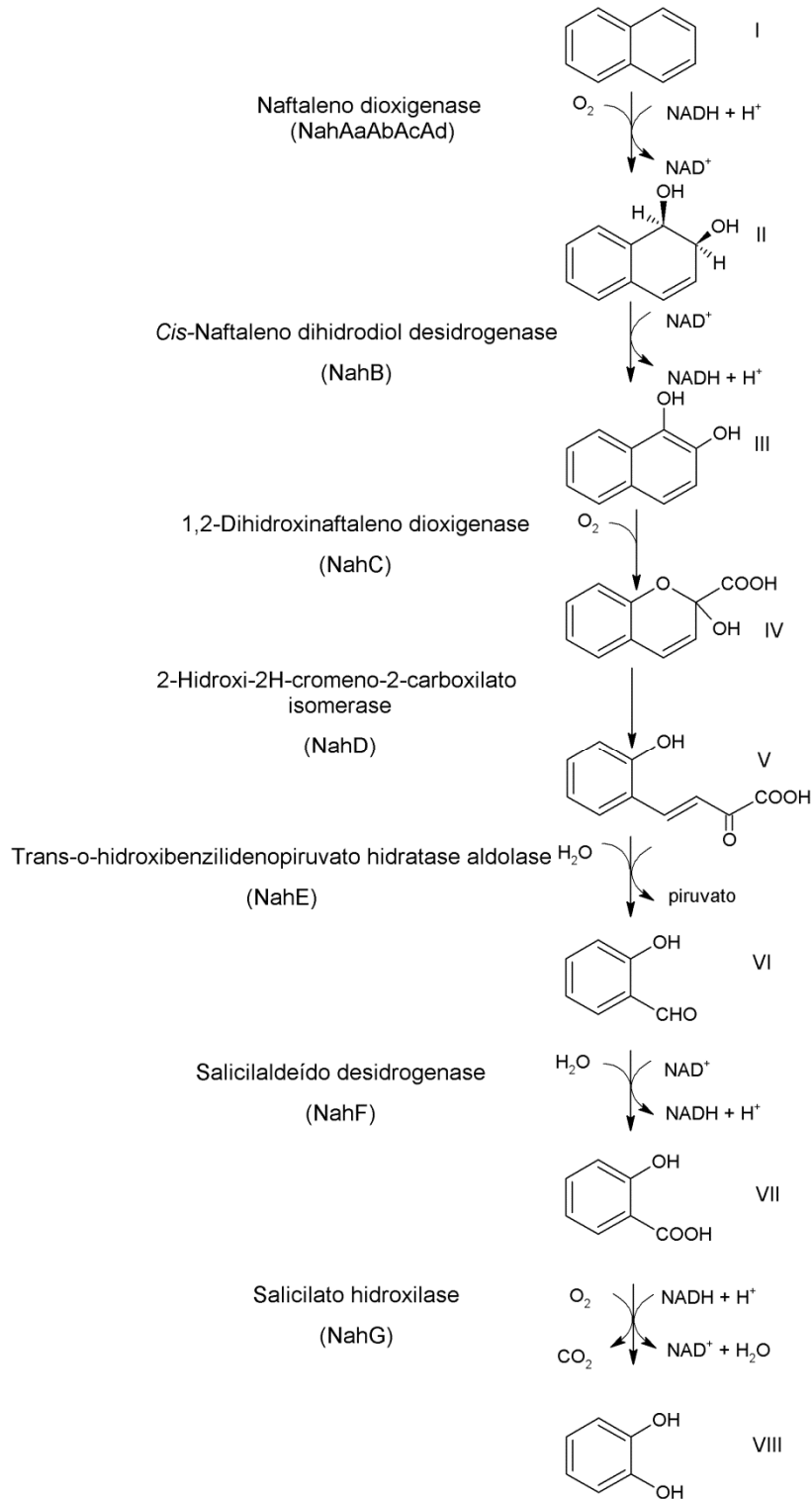


Figura 2 - Degradação do naftaleno em *Pseudomonas putida* G7. Enzimas: NahAaAbAcAd, NahB, NahC, NahD, NahE, NahF e NahG; Substratos e produtos: I – naftaleno, II – cis-1,2-dihidroxi-1,2-dihidroxi-naftaleno, III – 1,2-dihidroxi-naftaleno, IV – ácido 2-hidroxi-2H-cromeno-2-carboxílico, V – ácido trans-o-hidroxi-benzilidenopiruvato, VI – salicilaldeído, VII – ácido salicílico, VIII – catecol. Adaptado de KEGG Pathway, [http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?map=map00626&show\\_description=show](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map=map00626&show_description=show).

A seqüência nucleotídica completa e revisada do plasmídeo NAH7 com 82.232 pb de *Pseudomonas putida* G7 foi depositada no banco de dados de nucleotídeos do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)<sup>3</sup> por SOTA e colaboradores em 2010 (número de acesso: AB237655.1) (Sota, et al., 2006; Tsuda & Iino, 1990).

Entre as enzimas das vias superior e inferior de degradação do naftaleno em *Pseudomonas putida*, as enzimas NahAb, NahAc, NahAd, NahC, NahD, NahH e NahJ tiveram sua estrutura tridimensional resolvida e depositada no PDB por diversos grupos de pesquisa. No grupo de Biologia Estrutural da Universidade Federal de Minas Gerais, onde esta tese foi desenvolvida, as enzimas NahF, NahI, NahK e NahK complexada com NahL são estudadas há algum tempo e também tiveram suas estruturas tridimensionais resolvidas (algumas já depositadas no PDB). Nesta tese de doutorado foram resolvidas ainda as estruturas das enzimas NahB e NahG.

### 1.2.2 *cis*-Naftaleno Dihidrodiol Desidrogenase

A proteína NahB (*cis*-1,2-dihidro-1,2-dihidroxi-naftaleno desidrogenase ou *cis*-naftaleno dihidrodiol desidrogenase) nativa de *Pseudomonas putida* G7, de acordo com sua seqüência depositada no banco de dados do NCBI (Número de acesso: AF125184) (Barriault, et al., 1999) e análise feita pelo programa ProtParam presente no servidor *ExPASy Proteomics Server*<sup>4</sup>, possui 259 resíduos de aminoácidos e peso molecular (PM) de 27.520,7. De acordo com dados da literatura, nos quais o peso molecular da proteína foi determinado por cromatografia de exclusão molecular utilizando coluna Shepadex G200, a enzima nativa apresenta-se tetramérica em solução (Patel & Gibson, 1974). No banco de dados de enzimas BRENDA<sup>5</sup>, a enzima NahB é classificada com número EC (*Enzyme Commission*) 1.3.1.29 e catalisa a reação de desidrogenação do *cis*-naftaleno dihidrodiol (*cis*-1,2-dihidronaftaleno-1,2-diol ou *cis*-1,2-dihidro-1,2-dihidroxi-naftaleno) em 1,2-dihidroxi-naftaleno (naftaleno-1,2-diol) na presença de NAD<sup>+</sup> (Figura 3).

---

<sup>3</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<sup>4</sup> <http://web.expasy.org/protparam/>

<sup>5</sup> <http://www.brenda-enzymes.org>

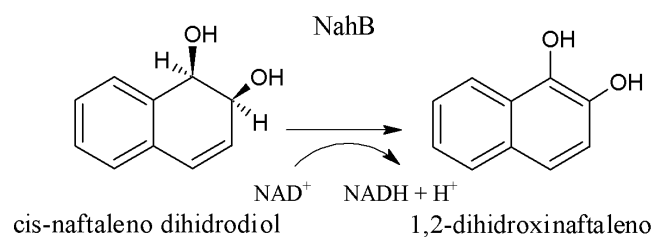


Figura 3 - Reação catalisada pela enzima NahB de *Pseudomonas putida* G7. A enzima converte o substrato *cis*-naftaleno dihidrodiol no produto 1,2-dihidroxi-naftaleno e utiliza NAD<sup>+</sup> como coenzima. Adaptado de BRENDA (<http://www.brenda-enzymes.org/>).

A avaliação da atividade enzimática da NahB pode ser feita a partir da análise em espectrofotômetro a 340 nm pela formação do NADH (Barriault, et al., 1999). O NADH absorve nesse comprimento de onda, enquanto o NAD<sup>+</sup> não tem absorção significativa a 340 nm.

O banco de dados Pfam 24.0 (*Protein Families Database*)<sup>6</sup> é um portal representativo de famílias protéicas. A partir da análise da sequência da enzima NahB, verificou-se que essa pertence a família de proteínas redutases/desidrogenases de cadeia curta (*Short-chain dehydrogenases/reductases* - SDRs).

As SDRs constituem uma grande família de enzimas oxidoreduções dependentes de NAD(P)(H), que apresentam motivo e mecanismo similares. A identidade da estrutura primária entre as proteínas dessa família é baixa, cerca de 15 a 30 %, entretanto elas apresentam um domínio estrutural conservado. Esse é formado por uma folha- $\beta$  central flanqueada por duas ou três  $\alpha$ -hélices de cada lado, o que representa o clássico enovelamento Rossmann (*Rossmann fold*) de ligação de nucleotídeo (Figura 4). O mecanismo catalítico de grande parte das SDRs baseia-se em um resíduo central de tirosina com resíduos adjacentes de serina, lisina e asparagina formando a tétrede Asn-Ser-Tyr-Lys (Hozjan, et al., 2008; Kallberg, et al., 2002; Kavanagh, et al., 2008; Persson, et al., 2003).

<sup>6</sup> <http://pfam.sanger.ac.uk/search/sequence>

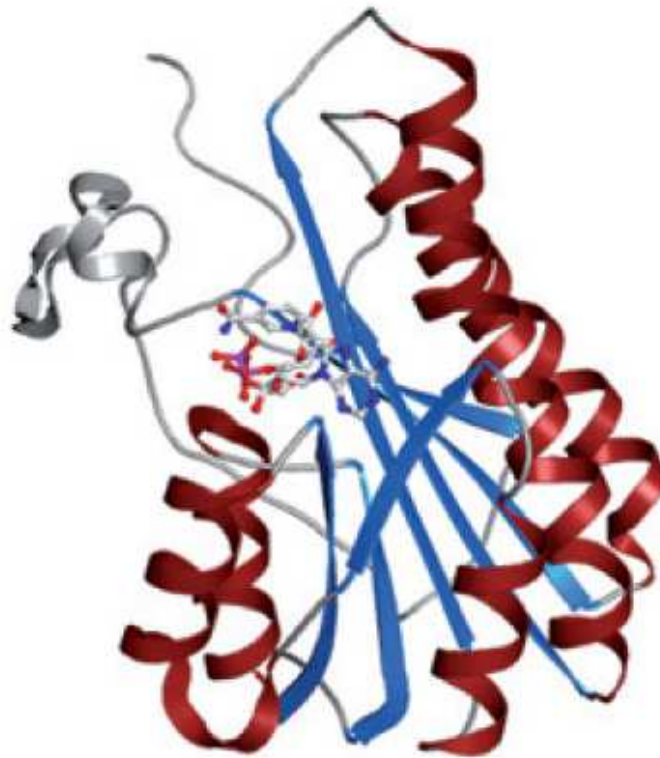


Figura 4 - SDR clássica (3 $\alpha$ /20 $\beta$  hidroxisteroide desidrogenase - PDB 2hsd) mostrada como uma representação em fita. O clássico enovelamento de Rossmann é mostrado com a folha- $\beta$  central em azul, as  $\alpha$ -hélices em vermelho e os domínios adicionais são mostrados em cinza. A coenzima está mostrada por representação de bola e bastão (Kavanagh et al., 2008).

Além das características da enzima NahB citadas anteriormente, outros parâmetros da mesma foram analisados por programas de bioinformática, para evidenciar, por exemplo, a facilidade de cristalização. O programa XtalPred Server<sup>7</sup> prediz a “cristabilidade” de uma proteína a partir da comparação de características bioquímicas e biofísicas obtidas com a estrutura primária da proteína submetida com correspondentes distribuições de probabilidade de cristalização já calculadas para outras proteínas. A predição é feita combinando-se a probabilidade de cristalização calculada para 8 características diferentes, sendo o resultado dado em classes de cristalização, que variam de 1 (cristalização ótima) até 5 (cristalização muito difícil). A análise da enzima NahB sugere que ela pertença à classe 1. Além disso, o programa *Regional Order Neural Network* (RONN)<sup>8</sup> faz a predição de regiões desordenadas na proteína, as quais dificultam o processo de cristalização. Esta predição é feita

<sup>7</sup> <http://ffas.burnham.org/XtalPred-cgi/xtal.pl>

<sup>8</sup> <http://www.strubi.ox.ac.uk/RONN>

a partir de um algoritmo que foi desenvolvido para identificar regiões desordenadas em uma proteína alvo quando comparada com um grande conjunto de proteínas já identificadas com regiões ordenadas e desordenadas. A análise da enzima NahB sugere que ela tem poucas regiões desordenadas, que seriam entre os aminoácidos 129 a 149 e 186 a 199 da sequência da proteína nativa.

A proteína NahB apresenta proteínas similares depositadas no PDB. A estrutura cristalográfica da bifenil desidrogenase de *Pandoraea pnomenusa* cepa B-356 (PDB ID 2Y93) (Dhindwal, et al., 2011), a qual possui 37% de identidade com a NahB pode ser utilizada como modelo de fase para determinação da estrutura tridimensional desta pela técnica de Substituição Molecular. Para realização desta técnica é necessário ter uma proteína com estrutura tridimensional conhecida e que possui certo grau de identidade com a proteína cuja estrutura deseja-se determinar. A primeira é conhecida como modelo de fase, pois deste modelo são utilizadas as fases dos fatores de estrutura como estimativa inicial, as quais não são obtidas experimentalmente. De posse destas fases, é possível calcular a densidade eletrônica inicial para a proteína cuja estrutura deseja-se determinar. Com a densidade eletrônica calculada, segue-se a construção do modelo e o refinamento da estrutura. O refinamento do modelo consiste em se modificar as posições dos átomos (mediante o ajuste aos dados experimentais) para que o modelo atômico possa de fato representar a estrutura da nova proteína. Mais detalhes sobre Determinação da Estrutura Tridimensional serão apresentados no item 1.3.3.

### **1.2.3 Salicilato hidroxilase**

A proteína NahG (salicilato hidroxilase ou salicilato monoxigenase) nativa de *Pseudomonas putida* G7, de acordo com sua sequência depositada no banco de dados do NCBI (Número de acesso: BAE92165.1) (Sota, et al., 2006; Tsuda & Iino, 1990) e análise feita pelo programa ProtParam, possui 434 resíduos de aminoácidos e PM de 46.963,8. Dados obtidos em cromatografia de exclusão molecular indicam que a proteína salicilato hidroxilase nativa de *Pseudomonas putida* G7 é um monômero em solução (You, et al., 1990).

No banco de dados de enzimas BRENDA, a enzima NahG é classificada com número EC 1.14.13.1 e catalisa a reação de descarboxilação do ácido salicílico em catecol na presença de NADH, O<sub>2</sub> e H<sup>+</sup>, liberando CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e NAD<sup>+</sup> (Figura 5) .

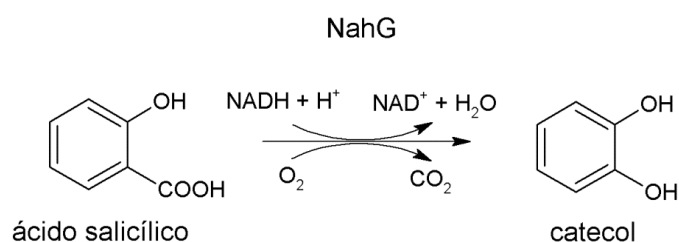


Figura 5 - Reação catalisada pela enzima NahG de *Pseudomonas putida* G7. A enzima converte o substrato ácido salicílico no produto catecol na presença de  $O_2$  e  $H^+$ , utilizando NADH como coenzima e liberando  $CO_2$ . Adaptado de BRENDA (<http://www.brenda-enzymes.org/>).

A partir da análise da sequência da enzima NahG no banco de dados Pfam 24.0, verificou-se que ela pertence a família de proteínas com domínios semelhantes ao Rossmann que ligam NAD(P) [*NAD(P)-binding Rossmann-like domain*] ou à família de proteínas com domínio de ligação ao FAD (*FAD binding domain*).

A análise da enzima NahG pelo programa XtalPred Server sugere que ela pertence à classe 3, que é uma classe de “cristabilidade” média. Além disso, a análise da enzima NahG pelo programa *Regional Order Neural Network* sugeriu que ela tem poucas regiões desordenadas, que seriam entre os aminoácidos 101 a 106, 131 a 139, 247 a 265 e 367 a 375 da sequência da proteína nativa.

A avaliação da atividade enzimática da NahG pode ser feita a partir da análise, em espectrofotômetro, do decréscimo na absorvância a 340 nm, devido à oxidação do NADH a  $NAD^+$  (You, et al., 1990).

A enzima NahG apresenta proteínas similares depositadas no PDB. Antes do ano de 2012, a proteína com maior similaridade com a NahG de *P. putida* G7 era a monoxigenase PhzS (Greenhagen, et al., 2008), a qual possuiu 26% de identidade em 364 resíduos de aminoácidos que se alinham nas duas enzimas, de acordo com o programa *Blast* do PDB<sup>9</sup>. A partir de 2012, foram depositadas as estruturas da monoxigenase R204Q HPXO complexada com FAD de *Klebsiella pneumoniae* (PDB ID 3RP8) (Hicks, et al., 2013) com 28% de identidade (336 resíduos de aminoácidos alinhados) e da 3-hidroxibenzoato 6-hidroxilase (Montersino, et al., 2013) com 27% de identidade (403 resíduos de aminoácidos alinhados).

<sup>9</sup> <http://www.rcsb.org/pdb/search/advSearch.do>

Essas estruturas poderiam ser utilizadas como modelo de fase na tentativa de se resolver a estrutura da NahG por Substituição Molecular. Entretanto, é importante ressaltar que esse valor de identidade é observado em apenas parte da sequência proteica e isso pode dificultar a resolução por Substituição Molecular.

O mecanismo catalítico das salicilato hidroxilases, as quais são flavoproteínas, consiste na ligação randômica do salicilato e de um agente redutor externo como o NADH ou NADPH para formar um complexo enzima-substrato reduzido. O FAD complexado com a enzima torna-se reduzido e, em seguida, um oxigênio molecular liga-se no complexo para a produção de catecol, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O (Zhao, et al., 2005).

### 1.3 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

A determinação da estrutura das enzimas envolvidas na degradação do naftaleno é importante, pois, com isso, é possível caracterizar a relação estrutura-função das mesmas. Assim, podem ser propostas modificações na sequência de aminoácidos da proteína que promovam aumento da sua estabilidade e da sua atividade catalítica, para que, futuramente, essas macromoléculas sejam utilizadas como biorremediadoras ou biomarcadoras, através de técnicas moleculares.

#### 1.3.1 Determinação do estado de oligomerização

O Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS – Dynamic Light Scattering) é uma técnica experimental capaz de medir as flutuações da intensidade da luz espalhada por partículas em movimento browniano em solução. A velocidade de movimentação das partículas em solução é inversamente proporcional ao tamanho das mesmas. Logo, uma molécula proteica monomérica e pequena move-se mais rapidamente do que um dímero ou uma molécula maior. Além disso, proteínas de mesmo peso molecular, mas de diferentes formas são caracterizadas por diferentes coeficientes de difusão. Os coeficientes de difusão das partículas são obtidos a partir das análises das flutuações instantâneas da luz espalhada pelas partículas em solução. Os raios hidrodinâmicos das partículas são obtidos a partir da equação de Stokes-Einstein, na qual utiliza-se o coeficiente de difusão da partícula (Banachowicz, 2006; Dev & Surolia, 2006). Na equação de Stokes-Einstein descrita em

seguida,  $D$  é a constante de difusão,  $k_B$  é a constante de Boltzmann,  $\eta$  é a viscosidade do meio,  $r$  é o raio hidrodinâmico da partícula e  $T$  é a temperatura absoluta da medida.

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r}$$

O DLS é uma técnica bastante útil para o estudo da cristalização de proteínas. Amostras monodispersas são mais facilmente cristalizadas do que amostras polidispersas. O estado monodisperso é aquele em que a solução apresenta apenas a proteína em seu estado monomérico ou oligomérico natural. Já no estado polidisperso, a solução é formada pela proteína em seu estado natural em baixa concentração e grande quantidade de agregados proteicos (Banachowicz, 2006; Ferredamare & Burley, 1994).

### 1.3.2 Estudo da estrutura secundária

O Dicroísmo Circular (CD – *Circular Dichroism*), outra técnica experimental utilizada nesta tese, mede a diferença de absorção da luz circularmente polarizada para a esquerda e da luz circularmente polarizada para a direita por uma molécula quiral. Essa diferença de absorção, medida em um espectropolarímetro, é fornecida em termos de elipcidade ( $\theta$ ), expressa em milidegrees (mdeg). Entretanto, para macromoléculas como as proteínas, é mais utilizado expressar em termos de elipcidade molar, que considera a massa molecular da proteína e seu número de resíduos. O espectro de CD para as  $\alpha$ -hélices é caracterizado por duas bandas negativas a 222 e 208 nm e uma banda positiva a 192 nm. Para a folha- $\beta$ , o espectro é caracterizado por uma banda negativa a 215 nm e uma positiva a 198 nm (Ranjbar & Gill, 2009; Sreerama & Woody, 2004).

### 1.3.3 Determinação da estrutura tridimensional

A técnica de Difração de Raios-X é o principal método para se obter um modelo detalhado de uma macromolécula, permitindo a resolução de átomos individuais de muitas moléculas idênticas em um arranjo ordenado, como um cristal. A determinação da estrutura tridimensional de uma proteína por Difração de Raios-X implica em obter cristais de alta qualidade da proteína purificada, medir as direções e intensidades dos raios-X difratados pelo cristal, utilizar programas computacionais para calcular e mostrar, por meio de imagens, a

densidade eletrônica dentro do cristal e construir um modelo tridimensional da molécula que seja consistente com os dados medidos.

Para a elaboração dos tópicos deste item foram utilizados os livros *Crystallography Made a Crystal Clear – A Guide for Users of Macromolecular Models* (Rhodes, 2006) e *Biomolecular Crystallography – Principles, Practice and Application to Structural Biology* (Rupp, 2009).

#### 1.3.3.1 Cristais

Cristal é um objeto formado por um arranjo tridimensional ordenado de átomos e moléculas ligados por interações não covalentes. Os cristais podem ser divididos em células unitárias, que correspondem à menor e mais simples estrutura que se repete tridimensionalmente por todo o cristal. Conhecendo-se a estrutura de uma célula unitária, elucida-se a estrutura de todo o cristal, uma vez que a célula unitária se repete por translação por todo o cristal, ou seja, se repete em todos os eixos tridimensionais da rede cristalina.

O crescimento de cristais de proteína é feito através de uma precipitação lenta e controlada. As proteínas são dissolvidas em solução aquosa contendo um precipitante, como compostos iônicos ou polietilenoglicol (PEG), a uma concentração abaixo daquela necessária para a precipitação da mesma.

A obtenção de cristais de macromoléculas de alta qualidade tem sido o grande gargalo na determinação de estruturas proteicas (Saridakis & Chayen, 2009). Muitas variáveis influenciam na formação desses cristais, como o grau de purificação e a concentração proteica, a concentração e o tipo do precipitante, pH, temperatura, presença de ligantes. A dificuldade da obtenção de bons cristais levou ao desenvolvimento de robôs de cristalização, que são capazes de testar várias condições diferentes.

Uma técnica de cristalização amplamente utilizada é a difusão de vapor, na qual a solução de proteína juntamente com uma solução precipitante são mantidas em um recipiente fechado com um reservatório da solução precipitante adequada. Na técnica da gota suspensa (*hanging drop*) as soluções proteica e precipitante são adicionadas como uma gota à superfície de uma lamínula. A lamínula é colocada invertida sobre um recipiente contendo a mesma solução precipitante, vedando-o para formar uma câmara de cristalização. Com a

difusão do vapor do solvente, a gota se torna supersaturada possibilitando a formação de cristais. O mesmo processo ocorre para o método da gota depositada (*sitting drop*), sendo que neste caso a gota fica contida em um pedestal separado da solução precipitante. Na Figura 6 estão representados os métodos de gota suspensa e gota depositada.

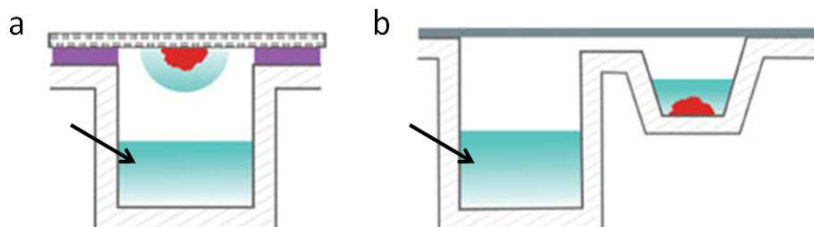


Figura 6 – Ilustração do método de difusão de vapor para cristalização de proteínas. (a) gota suspensa; (b) gota depositada. A solução proteica está representada de vermelho e a precipitante indicada pela seta. Adaptado de Caffrey and Cherezov, 2009.

Cristais derivados podem ser necessários para determinação da fase e para estudos de interação proteína-ligante. Na primeira situação, objetiva-se obter um cristal cujas proteínas estejam complexadas com átomos pesados como mercúrio, iodo, chumbo, o que pode permitir a determinação experimental das fases dos fatores de estrutura, como será detalhado no item 1.3.3.5 Substituição Isomórfica. A obtenção de cristais derivados pode ser feita por cocristalização, na qual o ligante é colocado juntamente com a solução proteica e cristalizam juntos, ou por imersão do cristal nativo em uma solução que contenha o ligante, técnica conhecida como *soaking*. Os ligantes são substâncias que interagem com as proteínas, como seus substratos ou moléculas similares.

### 1.3.3.2 Coletando dados de difração de raios-X

Na coleta de dados de difração, um cristal é colocado entre uma fonte de raios-X e um detector. Nos padrões de difração obtidos, os pontos escuros, que são os máximos de interferência construtiva, são chamados de reflexões, pois eles emergem do cristal como se fossem refletidos por planos de átomos dentro do cristal. A intensidade e a direção de cada reflexão são medidas. A intensidade é uma medida de o quanto um ponto é mais escuro que os outros, enquanto a posição é especificada por um conjunto de coordenadas  $h$ ,  $k$  e  $l$  para cada reflexão. Essas coordenadas ou índices de Miller, assim como a intensidade, são

associados a cada reflexão no espaço recíproco, que é o espaço tridimensional imaginário do padrão de difração.

O espaçamento dos pontos da rede recíproca, ou seja, o espaçamento entre as reflexões no padrão de difração é inversamente relacionado ao espaçamento dos pontos da rede cristalina no espaço real. Logo, a partir dessa relação e das posições das reflexões é possível determinar as dimensões e a simetria da célula unitária a partir dos padrões de difração.

#### 1.3.3.3 Dos dados de difração ao mapa de densidade eletrônica

Cada reflexão do padrão de difração produzida que chegou ao detector pode ser descrita como a soma da contribuição das ondas espalhadas por cada um átomos (mais precisamente elétrons) do cristal. A soma que descreve um raio difratado é chamada de equação do fator de estrutura, a soma para a reflexão  $hkl$  é chamada fator de estrutura  $F(hkl)$ . Como o fator de estrutura é uma soma de várias equações de ondas, cada uma sendo o resultado da difração de um átomo, sua equação pode ser descrita como uma soma de Fourier, que é uma forma de representação de uma função periódica, como a soma dos termos seno e cosseno os quais descrevem uma onda complexa.

A difração revela a distribuição de elétrons ou a densidade eletrônica de uma molécula, uma vez que os elétrons são os responsáveis pelo espalhamento dos raios-X. Como nos cristais as moléculas são organizadas em um arranjo ordenado, a densidade eletrônica pode ser descrita por uma função periódica representada por uma soma de Fourier. A densidade eletrônica na posição  $x$ ,  $y$  e  $z$  na célula unitária é representada por  $\rho(x, y, z)$ .

Se inserirmos planos paralelos imaginários na célula unitária, podemos descrever o fator de estrutura como uma soma de Fourier na qual cada termo descreve a difração pelos elétrons presentes em um mesmo conjunto de planos paralelos e equidistantes. Nessa soma, cada termo contém um valor numérico médio da densidade eletrônica desse conjunto específico de planos.

A transformada de Fourier relaciona precisamente a posição dos átomos em uma molécula e seu padrão de difração. A densidade eletrônica em um ponto da célula unitária  $\rho(x, y, z)$  pode ser calculada pela transformada de Fourier inversa dos fatores de estrutura. Isso

implica que, se forem medidos a amplitude, e a fase de cada reflexão, obtêm-se os valores dos fatores de estrutura e, conseqüentemente, a densidade eletrônica.

Pelo padrão de difração determinamos a intensidade de cada reflexão.. A amplitude do fator de estrutura é proporcional à raiz quadrada da intensidade medida. Contudo, a fase da onda é perdida no processo físico de medida da intensidade. Esse fato é conhecido como o problema das fases. Apesar de não ser possível obter a fase pelos padrões de difração, é possível utilizar as fases de um modelo estrutural similar corretamente posicionado, como na técnica de Substituição Molecular, ou obter as fases a partir da introdução de átomos pesados na estrutura da proteína, como nas técnicas de Substituição Isomórfica Simples e Substituição Isomórfica Múltipla, Essas técnicas serão descritas posteriormente.

Como o modelo tridimensional de uma proteína é construído a partir dos dados experimentais, ele pode apresentar erros. Quando essa medida é utilizada para o cálculo de outras grandezas, o erro se propaga. Dessa forma, é necessário que a qualidade dos dados de difração e das outras grandezas obtidas a partir desses dados seja avaliada, para que o modelo proteico final seja confiável. Com relação aos dados de difração, podem-se citar os seguintes parâmetros para avaliar a sua qualidade:

- Faixa de resolução: indica as resoluções mínima e máxima de um conjunto de dados e são, exatamente, as maiores e menores distâncias entre os planos imaginários criados para explicar a difração por uma série de reflexões.
- Número de observações: número de todas as reflexões medidas e aceitas na faixa de resolução estabelecida para aquele conjunto de dados.
- Número de reflexões únicas: número de reflexões distintas em um conjunto de dados. A reflexões idênticas ou relacionadas pela simetria do cristal são consideradas reflexões equivalentes e teoricamente devem possuir a mesma intensidade.
- Completeza dos dados: porcentagem das reflexões medidas num total de reflexões teoricamente esperadas para a faixa de resolução estabelecida.

- $\langle I_{hkl}/\sigma(I_{hkl}) \rangle$  : indica o valor médio, por faixa de resolução, da razão entre as intensidades das reflexões ( $hkl$ ) e seus respectivos erros. É utilizado para definir a resolução máxima de um conjunto de dados.
- Multiplicidade: razão entre o número de reflexões totais e o número de reflexões únicas, por faixa de resolução.
- $R_{\text{merge}}$ : mede a consistência dos dados em relação às intensidades das reflexões idênticas ou simetricamente equivalentes. Também, é usado para definir a resolução máxima de um conjunto de dados.

Com relação à etapa de refinamento, a idéia básica consiste em ajustar os parâmetros dos átomos que descrevem o modelo tridimensional da proteína alvo de modo que ele reflita os dados experimentais. Neste processo, os seguintes parâmetros são importantes para indicar o quão bem o modelo ajusta os dados experimentais:

- $R_{\text{factor}}$  ou  $R_{\text{work}}$  :  $R$  é uma medida da concordância entre as amplitudes dos fatores de estrutura medidos experimentalmente e os fatores de estrutura calculados a partir da estrutura parcial que está sendo refinada.
- $R_{\text{free}}$ : é o valor de  $R_{\text{factor}}$  calculado para 5% do conjunto de dados não inclusos no refinamento. Em outras palavras, indica o quão bem o modelo explica os dados experimentais que não foram utilizados durante o ajuste (refinamento).

#### 1.3.3.4 Substituição Molecular

O método de Substituição Molecular implica em utilizar as fases dos fatores de estrutura de uma proteína conhecida como uma estimativa inicial para as fases da nova proteína. As fases iniciais são calculadas posicionando-se corretamente o modelo da proteína conhecida (modelo de fase) na célula unitária do cristal da nova proteína. Esse método requer a disponibilidade da estrutura de uma proteína que seja similar à nova proteína.

Quando o modelo de fase e a nova proteína são isomórficos, como é o caso quando pequenos ligantes interagem com a proteína por cocrystalização ou por *soaking*, as fases do modelo podem ser usadas diretamente para calcular a densidade eletrônica a partir

das intensidades nativas da nova proteína. Quando os cristais não são isomórficos é necessário sobrepor a estrutura do modelo de fase com a estrutura da nova proteína dentro da célula unitária da última. Funções de translação e rotação são aplicadas até que a posição e a orientação do modelo de fase na nova célula unitária sobreponha, da melhor forma possível, a estrutura da nova proteína. Em seguida, são calculados os fatores de estrutura do modelo corretamente posicionado e as fases destes fatores de estrutura são usadas como estimativas iniciais de fases para a nova proteína. Durante o processo de refinamento da estrutura o modelo da estrutura é otimizado para que as intensidades e as fases das reflexões calculadas e observadas estejam de acordo.

Na técnica de Substituição Molecular dois parâmetros são analisados para se avaliar a qualidade da solução obtida: a função de translação (*Translational Function Z* – TFZ) e o *log-likelihood gain* (LLG). O TFZ indica a relação sinal-ruído da solução obtida. Normalmente, quando valores acima de oito são obtidos para TFZ, a solução encontrada é verdadeira. Já o valor de *log-likelihood gain* (LLG) indica o quão melhor é a solução encontrada comparada a um modelo aleatório de átomos, cujo valor para soluções bem sucedidas é positivo e deve ser o mais alto possível.

#### 1.3.3.5 Substituição Isomórfica

Cada átomo na célula unitária contribui para todas as reflexões no padrão de difração. A maior contribuição de um átomo é para aquelas reflexões cujos índices correspondem ao conjunto de planos que interceptam aquele átomo. Portanto, um átomo contribui fortemente para algumas reflexões, fracamente ou nada para outras. Se átomos fossem adicionados a sítios específicos em todas as células unitárias de um cristal, modificações no padrão de difração ocorreriam devido à inserção daqueles átomos. Essa perturbação causada no padrão de difração pode ser utilizada para obter as fases. Para que essa alteração seja grande o suficiente para que possa ser medida, o átomo adicionado deve difratar fortemente os raios-X, logo deve ser um átomo de número atômico maior que a maioria dos átomos presentes na molécula, sendo chamado de átomo pesado. Para proteínas, normalmente são adicionados átomos pesados como mercúrio, iodo, chumbo, etc.

Para que o processo de determinação de fases a partir da inserção de um átomo pesado seja efetivo, o cristal derivado deve ser isomórfico com o cristal nativo, ou seja, a

inserção do átomo pesado não deve perturbar o empacotamento do cristal ou a conformação da proteína. Quando os cristais nativos e derivados são isomórficos eles mantêm praticamente os mesmos parâmetros de célula unitária. Além disso, deve haver mudanças nas intensidades de um determinado número de reflexões medidas, que sejam grandes o suficiente para serem precisamente medidas.

Considerando uma reflexão única de amplitude  $|\mathbf{F}_P|$  para o cristal da proteína nativa e a correspondente reflexão com amplitude  $|\mathbf{F}_{PH}|$  para o cristal da proteína derivada, a diferença das amplitudes ( $|\mathbf{F}_{PH}| - |\mathbf{F}_P|$ ) é aproximadamente igual à amplitude para o átomo pesado sozinho, uma vez que a contribuição de todos os átomos para a intensidade de uma dada reflexão é aditiva.

Um padrão de difração no qual cada reflexão tem a amplitude ( $|\mathbf{F}_{PH}| - |\mathbf{F}_P|$ ) representaria (ainda que não fielmente) o padrão de difração do átomo pesado (ou de um pequeno número de átomos pesados) sozinho na célula unitária da proteína. Esse padrão é muito mais simples do que o de uma proteína e seria possível determinar a posição dos átomos pesados nesta célula unitária. Localizando-se os átomos pesados na célula unitária, é possível calcular seus fatores de estrutura e assim obter os fatores de estrutura completos, ou seja, é possível obter os valores não só da amplitude, mas também da fase para os demais fatores de estrutura. Logo  $\mathbf{F}_{PH} = \mathbf{F}_H + \mathbf{F}_P$ , ou seja, o fator de estrutura para o derivado ( $\mathbf{F}_{PH}$ ) é a soma dos fatores de estrutura da proteína nativa ( $\mathbf{F}_P$ ) e dos átomos pesados sozinhos ( $\mathbf{F}_H$ ).

Os valores dos fatores de estrutura da proteína nativa podem ser obtidos resolvendo-se a equação  $\mathbf{F}_P = \mathbf{F}_{PH} - \mathbf{F}_H$  utilizando-se um diagrama de Harker, o qual representa a soma dos fatores de estrutura em um plano complexo. São necessárias as intensidades das reflexões da proteína nativa e do derivado e as intensidades e fases das reflexões dos átomos pesados. A partir desse cálculo são obtidos dois valores possíveis de fases para cada ponto de reflexão. Esse método é chamado de Substituição Isomórfica Simples (SIR – *single isomorphous replacement*).

Para resolver o problema de ambiguidade de fases gerada no método SIR pode-se utilizar outro derivado, no qual os átomos pesados devem estar em locais diferentes do primeiro derivado. Se forem utilizados mais de um cristal derivado para calcular as fases, o

método é chamado de substituição isomórfica múltipla (MIR – *multiple isomorphous replacement*).

#### 1.3.3.6 Difração Anômala

Quando o comprimento de onda do raio-X é próximo ao comprimento de onda em que o átomo pesado absorve radiação, uma fração desta é absorvida e reemitida com fase alterada. Os fatores de estrutura passam a ter mais um componente relacionado com espalhamento anômalo, que leva à quebra da Lei de Friedel, ou seja, reflexões com  $F(\mathbf{h})$  e  $F(-\mathbf{h})$  passam a ter intensidades diferentes. O comprimento de onda em que ocorre absorção para os átomos comumente presentes em cristais de proteína, como carbono, oxigênio, hidrogênio e nitrogênio, está longe do comprimento de onda dos raios-X utilizados em cristalografia, logo não há efeito anômalo para eles. Já no caso dos átomos pesados, o comprimento de onda de absorção é próximo do comprimento dos raios utilizados e pode ocorrer espalhamento anômalo.

Como os fatores de estrutura dos pares de Friedel são diferentes quando há espalhamento anômalo, é possível extrair informação sobre as fases. Esse método é chamado de Difração Anômala Simples (SAD – *single anomalous diffraction*). Na técnica de SAD programas com métodos diretos especiais podem resolver a ambiguidade de fase. Quando são utilizados diferentes comprimentos de onda para difração anômala a técnica é chamada de Difração Anômala com Múltiplos Comprimentos de Onda (MAD - *multiwavelength anomalous diffraction*). Neste método não há ambiguidade de fases.

Uma ferramenta bastante utilizada para resolver o problema da ambiguidade de fases é utilizar conjuntamente efeitos de dispersão anômala e substituição isomórfica. Esse método é chamado de Substituição Isomórfica Simples com Espalhamento Anômalo (SIRAS - *single isomorphous replacement with anomalous scattering*).

## 1.4 CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA

A determinação da velocidade da reação e como ela se modifica em resposta a mudanças nos parâmetros experimentais é uma abordagem importante para entender o mecanismo de ação das enzimas. A associação desta metodologia com a determinação da estrutura tridimensional e métodos de mutagênese sítio-dirigida (mudança na sequência de

aminoácidos de uma proteína por engenharia genética) fornecem informações importantes sobre o papel de cada aminoácido na estrutura e atividade de uma enzima.

Para a elaboração dos tópicos deste item foram utilizados os livros *Fundamentals of Enzyme Kinetics* (Cornish-Bowden, 2012) e *Principles of Biochemistry* (Cox, 2011).

A concentração do substrato [S] afeta a velocidade das reações catalizadas por enzimas. Entretanto, o estudo dos efeitos da sua concentração é complicado pelo fato de [S] modificar-se durante o curso de uma reação *in vitro* à medida que o substrato é convertido em produto. Uma abordagem que simplifica os experimentos de cinética enzimática é medir a velocidade inicial,  $V_0$ . Se apenas o início da reação for monitorado, a mudança em [S] pode ser insignificante e [S] pode ser considerada constante. Em concentrações relativamente baixas de substrato,  $V_0$  aumenta quase linearmente com o aumento de [S] e, em altas concentrações de substrato,  $V_0$  aumenta em pequenas quantidades em resposta ao aumento de [S]. Finalmente, é atingido um ponto além do qual um aumento em  $V_0$  é insignificamente pequeno com o aumento de [S]. Esta região de  $V_0$  tipo platô está próxima à velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) da reação (dado que a quantidade de enzima seja constante).

Em um determinado instante de uma reação catalizada por enzima, esta existe em duas formas: a forma livre ou não combinada E e a forma combinada ES. Em baixa [S], a maior parte da enzima está na forma não combinada E. Assim, a velocidade é proporcional à [S] porque o equilíbrio é impelido na direção da formação de ES à medida que [S] aumenta.

A velocidade inicial máxima de uma reação catalisada ( $V_{m\acute{a}x}$ ) ocorre quando quase toda a enzima estiver presente como complexo ES e [E] é desprezível. Nessas condições, a enzima está saturada com o substrato, logo o incremento de [S] não provoca efeito na velocidade. Esta condição ocorre quando [S] for alta o suficiente para que essencialmente toda a enzima livre se converta na forma ES. Após o rompimento do complexo ES originando produto, a enzima fica livre para catalisar a reação de mais uma molécula do substrato.

O estado pré-estacionário, o qual ocorre logo que a enzima é misturada com grande excesso de substrato, é caracterizado pelo aumento da concentração de ES. A reação rapidamente atinge o estágio estacionário no qual [ES] permanece constante ao longo do tempo. Esse conceito de estado estacionário foi introduzido por G. E. Briggs e Haldane em

1925. A determinação da  $V_0$  geralmente reflete o estado estacionário, assim,  $V_0$  limita-se à parte inicial da reação, e a análise da velocidade inicial é denominada cinética do estado estacionário.

A curva que expressa a relação entre  $[S]$  e  $V_0$  tem a mesma forma geral para a maioria das enzimas (hipérbole retangular), que pode ser expressa algebricamente pela equação de Michaelis-Menten. Michaelis e Menten deduziram esta equação partindo da sua hipótese básica de que a etapa limitante da velocidade em uma reação enzimática é a quebra do complexo ES em produto e enzima livre. A equação está representada abaixo, em que  $K_M$  é a constante de Michaelis-Menten.

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

Para a determinação das constantes de Michaelis-Menten e velocidade máxima, o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) do produto NADH ( $6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) foi considerado. Os parâmetros cinéticos  $K_M$  e  $V_{\max}$  podem ser obtidos pela regressão não-linear da velocidade inicial ( $V_0$ ) versus  $[S]$  seguindo a equação de Michaelis-Menten representada acima.

A  $V_{\max}$  é equivalente à etapa limitante da velocidade da reação enzimática. Entretanto, muitas vezes é difícil determinar essa etapa limitante e se utiliza a constante  $k_{\text{cat}}$  que é equivalente ao número de moléculas do substrato convertidas em produto por uma única molécula de enzima em uma dada unidade de tempo, quando a enzima está saturada pelo substrato. Assim, pode-se calcular  $k_{\text{cat}} = V_{\max}/[E_{\text{total}}]$  onde,  $V_{\max}$  é a velocidade máxima calculada para a reação enzimática e  $E_{\text{total}}$  é a concentração total de enzima utilizada no ensaio. Porém, a melhor maneira de se comparar a eficiência catalítica de diferentes enzimas, ou o número de vezes que diferentes substratos são catalisados por uma mesma enzima, é analisar a relação  $k_{\text{cat}}/K_M$  para as duas reações, muitas vezes denominada constante de especificidade. Essa constante indica (quanto maior seu valor) qual é o substrato “natural” ou preferido pela enzima.

## **2 JUSTIFICATIVA**

A caracterização estrutural das enzimas da via de degradação de compostos tóxicos é essencial. Conhecendo-se a estrutura tridimensional dessas proteínas, seria possível entender seus mecanismos de ação; atuar de forma orientada na estrutura destas moléculas e, eventualmente, alterar propriedades físico-químicas objetivando alguma aplicação biotecnológica específica; avaliar a interação e sinergismo entre as enzimas da via, além de contribuir para o conhecimento básico da relação estrutura-função de proteínas.

O petróleo é um dos recursos naturais dos quais a sociedade é bastante dependente. A grande utilização de combustíveis fósseis e a quantidade de resíduos gerados pelas indústrias petroquímicas, seus processos e produtos, tem atingido níveis críticos que torna impossível a armazenagem inócua dos compostos gerados. Entre os componentes tóxicos do petróleo destacam-se os HAPs, que constituem uma classe de compostos orgânicos hidrofóbicos que estão disseminados como poluentes no meio ambiente. A persistência desses compostos tem causado grande preocupação devido ao potencial tóxico, mutagênico e carcinogênico dos HAPs. A necessidade de remediar os danos causados por estes compostos fica evidente.

Uma das técnicas mais seguras e eficientes para a descontaminação desses ambientes é a biorremediação. Com o tratamento biológico, esses compostos, muitas vezes perigosos para os seres humanos e animais, são transformados em substâncias com pouca ou nenhuma toxicidade. Considerando-se a importância das atuais descobertas dos genes de enzimas de vias de degradação de HAPs e os problemas ambientais causados por esses compostos, torna-se fundamental o estudo aprofundado das enzimas que compõem essas vias de degradação. A caracterização estrutural é essencial para o desenvolvimento de macromoléculas com estabilidade química e térmica que possam ser utilizadas em processos biotecnológicos. O conhecimento detalhado da estrutura e do mecanismo de ação dessas enzimas permite a construção de compostos biotecnológicos que podem ser mais eficientes e seguros para a remediação de solos contaminados com petróleo ou seus derivados.

Assim, neste projeto de Doutorado, foi feito o estudo estrutural da enzima NahB e o estudo estrutural e a caracterização cinética da enzima NahG, ambas de *Pseudomonas putida* G7 envolvidas na degradação do naftaleno, um hidrocarboneto aromático policíclico.

## **3 OBJETIVOS**

### 3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterização estrutural da enzima recombinante NahB e caracterizações estrutural e cinética da enzima recombinante NahG, ambas de *Pseudomonas putida* G7.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter as proteínas NahB e NahG recombinantes puras, estáveis e em quantidades suficientes para ensaios de cristalização.
- Caracterizar a estrutura secundária das proteínas recombinantes e determinar o estado oligomérico das enzimas em solução.
- Caracterizar cineticamente a enzima recombinante NahG.
- Determinar a estrutura tridimensional das enzimas recombinantes por difração de raios-X.
- Produzir mutantes da enzima NahG por mutagênese sítio-dirigida.
- Analisar as estruturas das enzimas e comparar com dados de enzimas da mesma família disponíveis na literatura e nos bancos de dados.

## **4 METODOLOGIA**

#### 4.1 CULTIVO DE *Pseudomonas putida* G7

A cepa bacteriana *Pseudomonas putida* G7 foi gentilmente cedida pelo Dr. Masataka Tsuda do Departamento de Ciências da Vida Ambiental da Faculdade de Ciências da Vida da Universidade de Tohoku, Japão. Tsuda e colaboradores depositaram a sequência completa do plasmídeo NAH7 com 82.232 pb no banco de dados de nucleotídeos do NCBI, cujo número de acesso é AB237655.1 (Sota, et al., 2006; Tsuda & Iino, 1990).

A bactéria *Pseudomonas putida* G7 foi cultivada em meio mineral M9 com 1% (p/v) de naftaleno. O meio mineral contém por litro:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 = 6,0\text{g}$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 3,0\text{g}$ ;  $\text{NaCl} = 0,5\text{g}$ ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1M = 10 mL;  $\text{CaCl}_2$  1M = 10 mL. Foi feita uma solução estoque do naftaleno, na qual este foi diluído em DMF (N-N dimetilformamida), na concentração de 300 mg/mL. O inóculo foi incubado a 25°C por aproximadamente 48 h sob agitação de 150 rpm. Após a incubação, o inóculo ficou em repouso por alguns minutos para a decantação de cristais de naftaleno que estavam presentes. A cultura do sobrenadante foi coletada, centrifugada e lavada três vezes com meio LB líquido (Luria-Bertani) (1% NaCl; 0,5% extrato de levedura; 1 % peptona; pH 7,0) para retirar todo o naftaleno. A centrífuga utilizada neste e nos outros experimentos em que foram utilizados microtubos de 0,5, 1,5 ou 2,0 mL foi do modelo HERAEUS FRESCO™ 17 da Thermo Scientific.

#### 4.2 EXTRAÇÃO DE DNA DE *Pseudomonas putida* G7

A extração do DNA plasmidial (plasmídeo NAH7 com 82232 bp) foi feita baseada em protocolo para extração de DNA genômico (Orkin, 1990) com algumas modificações. Como o número de pares de bases do plasmídeo NAH7 é muito grande, o protocolo para extração de DNA plasmidial não foi eficiente.

Após o cultivo e a lavagem com meio LB, 1 mL de cultura foi transferido para um microtubo e centrifugado a 9.600 g por 2 min. Em seguida, o *pellet* foi lavado com 1 mL de tampão TE e centrifugado a 9.600 g por 2 min. Na próxima etapa, adicionou-se 230 µL de TE, 15 µL de SDS 10% e homogeneizou-se lentamente. Foram adicionados 245 µL de fenol/clorofórmio 1:1 e misturou-se gentilmente. A amostra foi centrifugada a 9.600 g por 10 min. Em seguida, a fase aquosa (fase superior) foi transferida para um novo microtubo e adicionou-se igual volume de clorofórmio. Novamente, centrifugou-se a amostra a 9.600 g

por 10 min e a fase aquosa (fase superior) foi transferida para um novo microtubo. Adicionou-se, então, 25 µL de 2M NaCl e 150 µL de etanol P.A. gelado. O próximo passo foi a incubação por 30 min a -20°C e, após isso, a amostra foi centrifugada a 17.000 g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 250 µL de etanol 70%, sem ressuspender o *pellet*. A amostra foi centrifugada a 17.000 g por 10 min e o sobrenadante foi descartado. Após o etanol evaporar, o *pellet* foi ressuspensionado em 30 µL de tampão TE ou H<sub>2</sub>O MilliQ contendo RNase 10 µg/mL. A amostra foi colocada no banho-maria a 37°C por 1 hora e depois armazenada no freezer a -20°C.

#### 4.3 ANÁLISE DA QUALIDADE E QUANTIDADE DE DNA

A qualidade da amostra de DNA extraído de *Pseudomonas putida* G7, assim como outras amostras de DNA, foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1% e por espectrofotometria utilizando espectrofotômetro modelo UV-160A UV - *visible recording spectrophotometer*, Shimadzu. A concentração do DNA foi determinada, aproximadamente, pela comparação da intensidade das bandas quando expostas a radiação ultravioleta com o padrão  $\lambda$  DNA-*HindIII Digest* (New England Biolabs) ou, mais precisamente pela leitura de D.O. (densidade ótica) a 260 nm, sendo o grau de pureza das amostras determinado pela razão das leituras de D.O a 260 (detecção de DNA) e 280 nm (detecção de proteína). Recomenda-se que essa relação esteja entre 1,8 e 2,0.

#### 4.4 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

O gel de agarose 1% foi preparado com tampão TAE (0,04 M Tris-acetato; 0,001 M EDTA; pH 8,0). Para visualização das bandas de DNA, foi adicionado SYBR<sup>®</sup> Safe (Invitrogen) de acordo com o manual do produto. O tampão utilizado na corrida eletroforética foi o mesmo utilizado na confecção do gel. A eletroforese foi executada a 80 V utilizando a fonte FB300 (Fisher Scientific) por cerca de 1 hora. Para visualização do resultado, o gel foi exposto à luz ultravioleta no transiluminador UV 302 nm T26M (Bio Agency). O SYBR<sup>®</sup> Safe liga-se ao DNA e forma um complexo que fluoresce com coloração verde quando excitado por radiação ultravioleta. Os géis foram fotodocumentados utilizando câmera CCD-IRIS (BIOTEC-FISCHER).

Em todas as amostras de DNA aplicadas em gel de agarose foi primeiramente adicionado tampão de amostra para DNA 6X preparado com 0,3% p/v azul de bromofenol; 0,3% p/v xileno cianol; 50% v/v glicerol e 1,0 mM EDTA pH 8,0. O azul de bromofenol migra na mesma taxa que um fragmento de DNA de aproximadamente 500 pares de bases e o xileno cianol na mesma taxa de um fragmento de 4.000 pares de bases. Nas eletroforeses foram incluídos os padrões O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas), que possui fragmentos de DNA entre 250 e 10.000 pb, *1Kb plus DNA Ladder* (Gibco BRL), que possui fragmentos de DNA entre 100 e 12.000 pb ou  $\lambda$  *DNA-HindIII Digest* (New England Biolabs), o qual possui fragmentos de DNA entre 2.027 e 23.130 pb.

#### 4.5 DESENHO DOS INICIADORES

O desenho dos iniciadores, a clonagem em vetor de clonagem e o sequenciamento dos clones positivos do gene *nahB* de *Pseudomonas putida* G7 foram feitos durante o mestrado da autora desta tese (Costa, 2010). Os iniciadores para clonagem do gene *nahG* foram construídos conforme sua seqüência nucleotídica depositada no banco de dados de nucleotídeos do NCBI (número de acesso: AB237655) e de acordo com o sítio múltiplo de clonagem do vetor de expressão em procaríotos, pET-28a-TEV (Figura 7) (Carneiro, et al., 2006). Os iniciadores estão representados na Tabela 1. Para a construção desses, as temperaturas de anelamento ( $T_{\text{anelamento}}$ ) foram calculadas pelo programa *Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator*<sup>10</sup> (Kibbe, 2007).

---

<sup>10</sup> <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>

pET28a (+) TEV

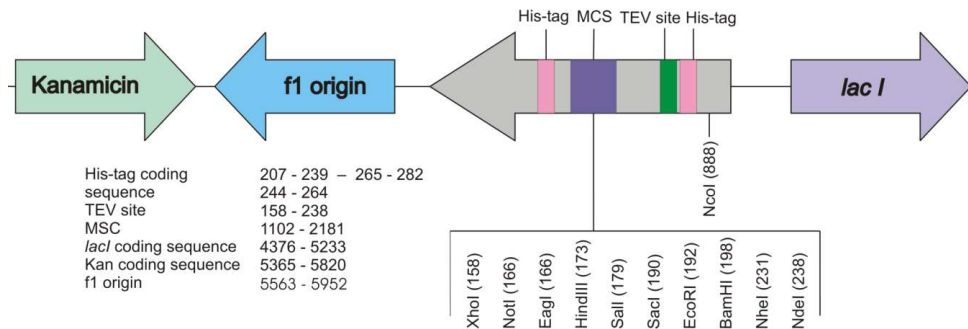


Figura 7 - Mapa do vetor pET-28a-TEV. Vetor originado do vetor pET-28a da Novagen, no qual o sítio de reconhecimento da trombina foi substituído pelo sítio de reconhecimento da protease TEV (Carneiro, et al., 2006).

Tabela 1 - Iniciadores utilizados na amplificação do gene *nahG* de *Pseudomonas putida* G7 e respectivas temperaturas de anelamentos. Os sítios da enzimas de restrição utilizadas estão em negrito.

Iniciador	Seqüência nucleotídica	Tanelamento (°C)
<b>Direto</b> <i>nahGF</i>	5' <b>CAT ATG</b> AAA AAC AAT AAA CTT GGC TTG CG 3'	65
<b>Reverso</b> <i>nahGR</i>	5' <b>GAA TTC</b> TCA CCC TTG ACG TAG CG 3'	65

As enzimas de restrição estão representadas na Tabela 2 com os respectivos sítios e locais de clivagem; estes estão indicados pelas setas.

Tabela 2 – Sequência dos sítios das enzimas de restrição utilizadas para subclonagem no vetor de expressão.

Enzima	Sítio de restrição
<i>EcoRI</i>	5'G↓AATTC3'
<i>NdeI</i>	5'CA↓T ATG3'

#### 4.6 AMPLIFICAÇÃO DO GENE *nahG*

As ampliações foram feitas pela reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) em MJ Mini Personal Thermal Cycler (Biorad) e o resultado verificado através de eletroforese em gel de agarose. Para a amplificação dos fragmentos do

gene *nahG* foi utilizada a temperatura de anelamento de 65°C. Os reagentes e as respectivas concentrações que foram utilizados nas amplificações estão representados na Tabela 3. O programa para a amplificação está na Tabela 4.

Tabela 3 - Protocolo da reação de PCR utilizada na amplificação do gene *nahG*.

Reagente/Concentração	Volume	Concentração final
Plasmídeo NAH7 de <i>Pseudomonas putida</i> G7 3 ng/μL a 300 ng/μL	1,0 μL	0,06 ng/μL a 6,0 ng/μL
Tampão 10 X	5 μL	1 X
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1,5 μL	1,5 mM
dNTPs 10 mM	1 μL	0,2 mM
Iniciador direto 10 μM	1 μL	0,2 μM
Iniciador reverso 10 μM	1 μL	0,2 μM
Platinum Taq DNA polimerase High Fidelity 5U/μL (Invitrogen)	0,2 μL	20 U/mL
H <sub>2</sub> O ultrapura autoclavada	qsp. 50 μL	----

Tabela 4 - Programa para amplificação do gene *nahG* por PCR.

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo
1. Aquecimento inicial	94	2 min
2. Desnaturação	94	45 s
3. Anelamento	65	1 min
4. Extensão	68	1 min e 30 s
5. Repetição (30X das etapas 2 a 4))	---	---
6. Extensão final	68	10 min

#### 4.7 CLONAGEM E SUBCLONAGEM

O gene *nahB* foi clonado em vetor de clonagem pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO (Invitrogen) (Figura 8) durante o mestrado da autora desta tese, o qual foi denominado pCR-2.1-TOPO-*nahB*. Alguns dos clones positivos foram sequenciados (Costa, 2010).

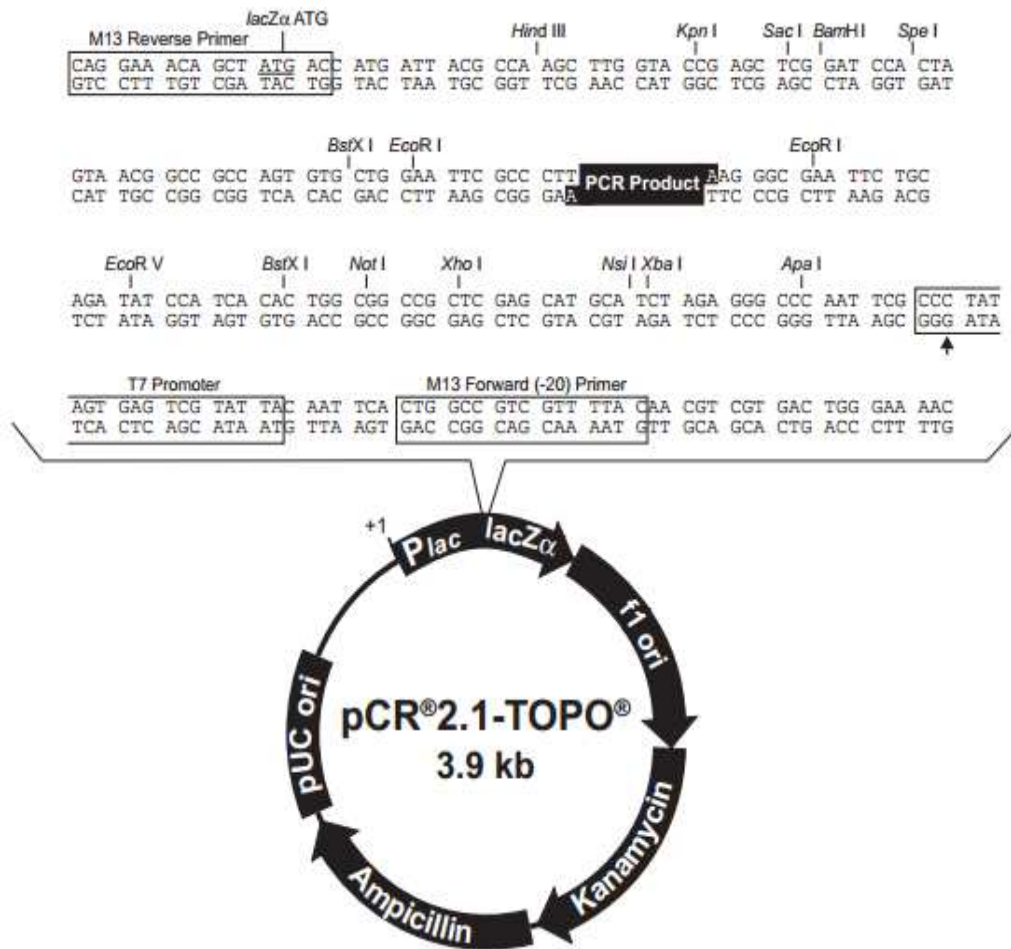


Figura 8 – Mapa do vetor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO (Invitrogen). Adaptado do manual do pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO.

A clonagem do gene *nahG* foi feita em vetor pGEM<sup>®</sup>-T (Promega) (Figura 9), o qual apresenta gene de resistência à ampicilina. Os clones foram analisados por PCR de colônia e confirmados pela digestão das possíveis construções plasmidiais. Alguns dos clones positivos foram seqüenciados. Os vetores recombinantes com o gene *nahG* foram denominados pGEM-T-*nahG*.

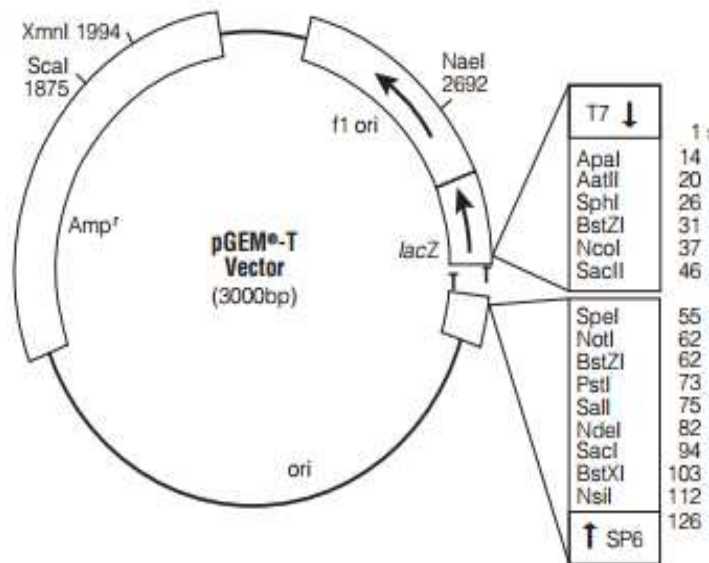


Figura 9 – Mapa do vetor pGEM<sup>®</sup>-T (Promega). Adaptado do manual do pGEM<sup>®</sup>-T.

A partir dos clones com seqüências corretas, foram feitas as subclonagens dos genes *nahB* e *nahG* em vetor de expressão em procarioto. Clones das construções plasmídias pCR-2.1-TOPO-*nahB* e pGEM-T-*nahG* foram digeridos com as enzimas de restrição *NdeI* e *EcoRI* e os insertos liberados ligados no vetor pET-28a-TEV, os quais foram denominados, pET-28a-TEV-NahB e pET-28a-TEV-NahG, respectivamente. Os clones, também, foram analisados por PCR de colônia e confirmados pela digestão das possíveis construções plasmidiais. Alguns dos clones positivos foram seqüenciados.

Os sequenciamentos foram realizados no Laboratório do prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis do Departamento de Biologia Geral e no Núcleo de Análise de Genoma (NAGE) do Departamento de Bioquímica e Imunologia, ambos no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. No primeiro, o seqüenciador utilizado foi o ABI 3130 da Applied Biosystems e no segundo o seqüenciador MegaBace 1000 da Amersham. Para o sequenciamento dos vetores recombinantes do vetor pGEM<sup>®</sup>-T foram utilizados os iniciadores M13 direto e M13 reverso (Invitrogen). Para o sequenciamento dos plasmídeos recombinantes do vetor pET-28a-TEV foram utilizados os iniciadores T7 direto e T7 reverso (Invitrogen). O mapa do vetor original pET-28a (Novagen) está representado na Figura 10. Os iniciadores estão representados na Tabela 5.

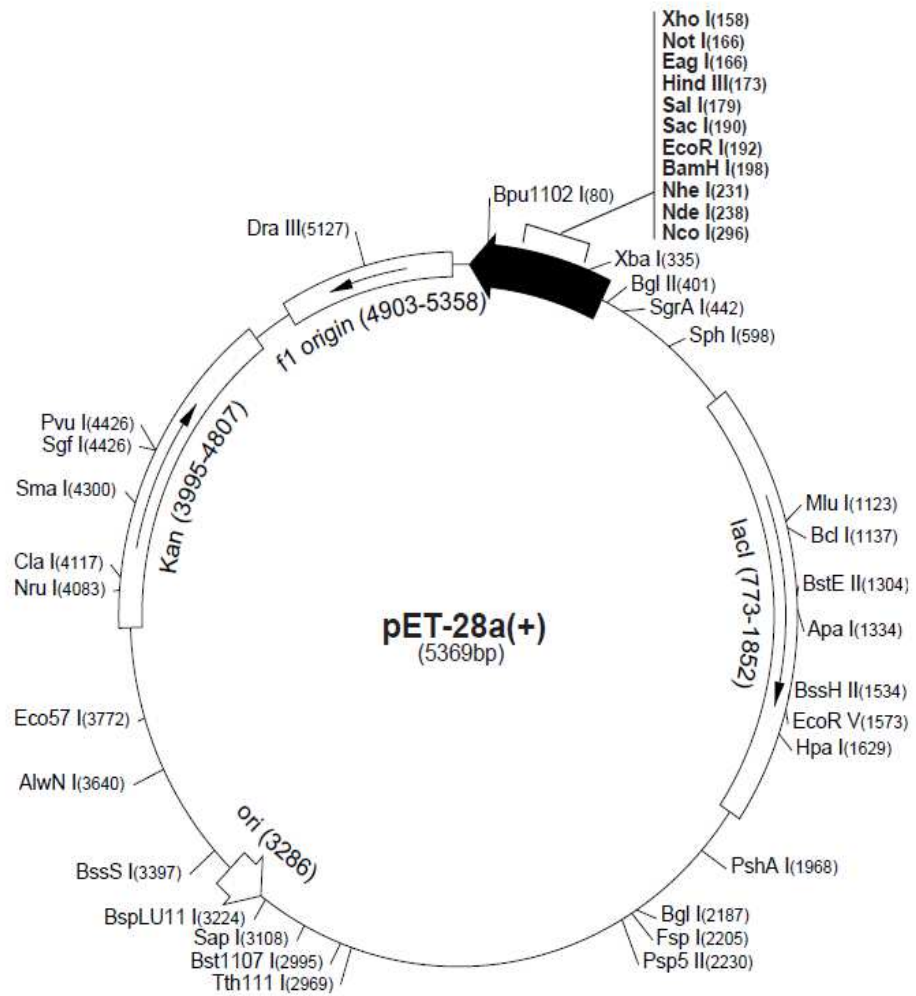


Figura 10 - Mapa do vetor pET-28a original (Novagen). Adaptado do manual dos vetores pET-28a-c(+).

Tabela 5 - Sequência nucleotídica dos iniciadores utilizados para sequenciamento dos plasmídeos recombinantes.

Iniciador	Sequência	Tanelamento (°C)
<b>M13 direto</b>	5'GTAAAACGACGGCCAG3'	46
<b>M13 reverso</b>	5'CAGGAAACAGCTATGAC3'	45
<b>T7 direto</b>	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'	48
<b>T7 reverso</b>	5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3'	51

O vetor de expressão utilizado foi o pET-28a-TEV (Figura 7), cujo peptídeo de fusão é 6xHis N-teminal. Esse vetor de expressão foi utilizado para permitir a purificação da proteína por cromatografia de afinidade utilizando coluna de níquel (HisTrap<sup>TM</sup> HP - GE Healthcare), uma vez que a cauda de histidinas interage com o níquel. A proteína recombinante expressa pelo vetor pET-28a-TEV-NahB foi denominada 6xHis-NahB e apresenta 274 resíduos de aminoácidos e PM de 29.520,8 Da. A proteína recombinante expressa pela construção plasmidial pET-28a-TEV-NahG foi denominada 6xHis-NahG e possui 450 resíduos de aminoácidos e PM de 48.964,0 Da.

O vetor de expressão utilizado foi modificado no Centro de Biologia Molecular e Estrutural (CeBiME) pelo grupo do Prof. Dr. Nilson Zanchin do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) Campinas, SP (Carneiro, et al., 2006). No vetor foi trocado o sítio de clivagem da trombina pelo da protease do vírus etch do tabaco (tobacco etch vírus – TEV). Esses vetores foram utilizados, pois nosso grupo produz a protease TEV a partir do vetor pMHT238Δ (Blommel & Fox, 2007). As proteínas 6xHis-NahB e 6xHis-NahG, se forem clivadas com a protease TEV, passam a apresentarem somente dois resíduos de aminoácidos além da sequência nativa; que são glicina, proveniente do sítio de clivagem da protease, e histidina, proveniente do sítio da enzima de restrição *NdeI* adicionado ao iniciador direto.

Bactérias *Escherichia coli* da linhagem TOP 10 da Invitrogen e DH5α<sup>TM</sup> da Life Technologies foram utilizadas para replicação das construções plasmidiais. Essas cepas de *E. coli* possuem uma mutação no gene *endA*, representada no genótipo por *endA1*. O gene *endA* selvagem codifica a Endonuclease I, que é uma proteína periplasmática de 12kDa capaz de

degradar DNA de fita dupla. Cepas de *E. coli* com essa mutação produzem uma forma inativa da nuclease e são referidas como *EndA*-.

#### 4.8 PREPARO DE CÉLULAS COMPETENTES

As células utilizadas para transformação foram eletrocompetentes, as quais foram preparadas de acordo com o protocolo presente no manual do eletroporador MicroPulser™ da BIORAD, o qual está descrito a seguir.

Inicialmente, foi feito um pré-inóculo das bactérias em meio LB líquido que foi incubado por 16 h a 37°C, sob agitação de 150 rpm. Após o crescimento, o pré-inóculo foi utilizado na confecção de um inóculo de 500mL na proporção de 1:100 de cultura:meio em meio LB líquido. As células do inóculo cresceram a 37°C, sob agitação de 200 rpm, sendo o crescimento monitorado em espectrofotômetro até a cultura alcançar uma leitura de D.O. de 0,5 a 0,7 em comprimento de onda de 600 nm. Alcançada a leitura, a cultura foi mantida no gelo por 20 min. Em todos os passos subseqüentes, as células, sempre que possível, foram mantidas a 0°C e todos os recipientes foram mantidos em gelo antes do uso. As células foram centrifugadas a 4.000 g por 15 min a 4°C e o sobrenadante foi cuidadosamente descartado. O *pellet* foi ressuscitado em 500 mL de glicerol 10% gelado. A suspensão foi novamente centrifugada a 4.000 g por 15 min a 4°C e o sobrenadante foi cuidadosamente descartado. Em seguida, o *pellet* foi ressuscitado em 250 mL de glicerol 10% gelado e novamente centrifugado a 4.000 g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado. O *pellet* foi ressuscitado em 20 mL de glicerol 10% gelado. Novamente, a suspensão foi centrifugada a 4.000 g por 15 min a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi, então, ressuscitado em 2 mL de glicerol 10% gelado e as células foram imediatamente aliqüotadas (50 ul por microtubo) e incubadas em gelo seco/etanol ou nitrogênio líquido até serem transportadas para o freezer a – 80 °C.

#### 4.9 TRANSFORMAÇÃO DE *Escherichia coli*

As transformações por eletroporação foram realizadas utilizando manual do eletroporador MicroPulser™ da BIORAD como é descrito em seguida.

As células eletrocompetentes e a cubeta para eletroporação de 0,2 cm foram mantidas no gelo por cerca de 5 minutos. Produtos de ligação ou plasmídeo purificado foram

acrescentados à cultura de bactérias. O material foi incubado em gelo por mais 1 min e, em seguida, a cultura foi transferida para a cubeta. A eletroporação foi realizada no equipamento MicroPulser™ *Electroporation Apparatus* Bio-Rad. Imediatamente após a eletroporação, foram acrescentados 800 µL de meio LB líquido a temperatura ambiente. A cultura foi incubada a 37°C durante 1 hora, sob agitação de 200 rpm. Finalizada a incubação, o material foi centrifugado a 1500 g por 5 min em temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* de bactérias foi ressuscitado em 100 µL de meio LB líquido e plaqueado em LB ágar contendo o antibiótico para o qual o vetor apresenta resistência. As placas foram incubadas a 37°C durante 16 h. Os antibióticos utilizados e as respectivas concentrações das soluções estoques e as concentrações no meio de cultura estão representados na Tabela 6.

Tabela 6- Antibióticos utilizados e suas respectivas concentrações.

<b>Antibiótico</b>	<b>Concentração do estoque</b>	<b>Concentração no meio de cultura</b>
<b>Ampicilina</b>	50 mg/mL em água	50 µg/mL
<b>Canamicina</b>	50 mg/mL em água	50 µg/mL
<b>Cloranfenicol</b>	50 mg/mL em etanol	34 µg/mL

#### 4.10 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

A extração de DNA plasmidial foi feita com Kit de purificação de DNA plasmídico Axy Prep™ da Axygen Biosciences, seguindo o protocolo do fabricante, ou baseado em um protocolo de lise alcalina (Orkin, 1990) como descrito em seguida.

Um volume de 3,0 mL de uma cultura que cresceu a 37°C, a 180 rpm, por 16h, foi centrifugado por 2 min a 17.000 g. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 200 µL de solução de ressuspensão (10 mM EDTA; 50 mM glicose; 25 mM Tris – HCl; pH 8,0). Em seguida, foram acrescentados 400 µL de solução de lise (200 mM NaOH; 1% SDS). Os volumes foram misturados por inversão e incubados no gelo por 5 min. Adicionou-se então, 300 µL de solução de neutralização (3,0 M acetato de potássio pH 5,0). A mistura foi agitada por inversão e incubada no gelo por mais 5 min. O lisado neutralizado foi centrifugado a 17.000 g por 2 min e o sobrenadante foi transferido para um microtubo de 1,5 mL. Acrescentou-se 560 µL de isopropanol e a mistura foi agitada por inversão. Em seguida,

centrifugou-se por 20 min a 17.000 *g* e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* de DNA foi lavado com 1 mL de etanol 70% v/v, e centrifugado novamente a 17.000 *g* durante 5 min. O sobrenadante foi descartado e colocou-se o *pellet* para secar a temperatura ambiente. Depois de seco, o *pellet* foi ressuspenso em 30 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl; 1mM EDTA; pH8,0) ou H<sub>2</sub>O ultrapura tipo I contendo RNase 10 µg/mL. A amostra foi colocada no banho-maria a 37°C por 1 hora e depois armazenada no freezer -20°C. A água ultrapura tipo I utilizada neste e nos outros experimentos foi H<sub>2</sub>O MilliQ obtida com o equipamento Millipore Q Gard<sup>®</sup>1.

#### 4.11 PCR DE COLÔNIA

A PCR de colônia foi feita utilizando os protocolos para amplificação do gene *nahB* (Costa, 2010) e *nahG* (Tabela 3, Tabela 4). Na PCR de colônia, no lugar da amostra de DNA é colocada uma pequena amostra da colônia de bactérias que se deseja analisar.

#### 4.12 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

A linhagem Rosetta<sup>™</sup> (DE3) [BL21 (DE3) pRARE] foi utilizada para expressão das proteínas recombinantes. A Rosetta<sup>™</sup> (DE3) carrega o plasmídeo pRARE que fornece os RNAs transportadores para os códons AUA, AGG, AGA, CUA, CCC e GGA, os quais são códons raros em *E. coli*. O plasmídeo pRARE apresenta um gene de resistência ao cloranfenicol. A cepa Rosetta<sup>™</sup> (DE3) foi utilizada, pois verificou-se, com o programa *Rare Codon Calculator*<sup>11</sup> (*RaCC*), que a proteína NahB apresenta 13 códons raros e a proteína NahG apresenta 9 códons raros em *E. coli*. A utilização desta cepa poderia facilitar a síntese das proteínas alvos em *E. coli*.

Para a expressão das proteínas recombinantes 6xHis-NahB e 6xHis-NahG foi feito um pré-inóculo das bactérias em meio LB líquido contendo canamicina e cloranfenicol. O pré-inóculo foi incubado em shaker MA 832 (Marconi) por 16 h a 37°C, sob agitação de 200 rpm e, em seguida, foi realizado um inóculo de 1:50 de cultura:meio em meio LB líquido com canamicina e cloranfenicol. As células do inóculo cresceram a 37°C, sob agitação de 200 rpm, sendo o crescimento monitorado em espectrofotômetro até a cultura alcançar uma leitura

---

<sup>11</sup> <http://nihserver.mbi.ucla.edu/RACC/>

de densidade óptica de 0,6 a 0,8 a 600 nm. Alcançada a leitura, a temperatura do shaker foi diminuída para 18°C. Quando essa temperatura foi atingida, a cultura permaneceu por mais 20 minutos, sob rotação a 200 rpm. Em seguida, foi adicionado o indutor IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo) para uma concentração final de 0,5 mM. A indução foi feita por 16 horas a 18°C, com rotação de 200 rpm. Após a expressão das proteínas, a cultura foi centrifugada a 5.000 g por 5 min a 4°C em centrífuga Multifuge X3R (Thermo Scientific). Essa centrífuga foi utilizada em todos os ensaios em que se centrifugou volumes superiores a 5 mL.

#### 4.13 LISE BACTERIANA

Após a centrifugação da cultura expressa, as células foram congeladas a -20°C para lise posterior ou diretamente ressuspensas em tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 7,4, sacarose 1% p/v, Tween 20 1% v/v, glicerol 1% v/v). O volume de tampão de lise utilizado foi na proporção de 3 para 100 v/v de meio de cultura centrifugado. Após ressuspender, foi adicionado lisozima na concentração final de 100 µg/ mL e a suspensão foi mantida no gelo por 30 min. Em seguida, o material passou por um choque térmico, sendo congelado a -20°C e descongelado a 37°C em banho-maria. Esse ciclo foi repetido três vezes. Após este processo, o material foi sonicado com amplitude de 30%, com 6 pulsos de 15 seg ligado e intervalos de 1 min desligado, em sonicador Fisher Scientific Sonic Dismembrator modelo 500. Após a lise, o extrato celular foi centrifugado a 10.000 g por 30 minutos duas vezes.

#### 4.14 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

As purificações foram feitas em ÄKTApriime plus (GE Healthcare). As proteínas 6xHis-NahB e 6xHis-NahG foram purificadas, inicialmente, por cromatografia de afinidade, utilizando coluna HisTrap™ HP 5 mL (GE Healthcare). As colunas de afinidade foram pré-equilibradas com tampão de lavagem (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 500 mM NaCl, 30 mM imidazol). As proteínas foram eluídas com gradiente linear de imidazol de 30 a 500 mM em tampão de eluição (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 500 mM NaCl, 500 mM imidazol). Foi realizado um segundo passo cromatográfico, de exclusão molecular, utilizando coluna Hiload™ 16/60 Superdex 200 (GE Healthcare), a qual foi pré-equilibrada com tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 50 mM NaCl.

Após a cromatografia de afinidade foi feita diálise para dessalinização da amostra contra tampão 50 mM Tris-HCl pH 7.4, com concentrações decrescentes de NaCl, as quais foram de 300 mM para 150 mM e para 50 mM no final. A membrana de diálise utilizada apresenta *cut-off* de 12 kDa (Sigma-Aldrich). Após a diálise, as amostras foram concentradas para 5 mL, volume máximo suportado pela coluna de exclusão molecular. A concentração das proteínas foi feita em membrana de diálise com *cut-off* de 12 kDa (Sigma-Aldrich) contra PEG 10.000.

#### 4.15 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTEICA

A concentração das proteínas em solução foi determinada a partir da medida da absorvância a 280 nm e seguindo a lei de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon * l * C$$

onde  $A$  é a absorvância a 280 nm;  $\epsilon$ , o coeficiente de extinção molar ( $M^{-1}cm^{-1}$ );  $l$ , o caminho óptico da cubeta em cm, e  $C$ , a concentração molar da proteína. A absorvância foi medida em espectrofotômetro modelo UV-160A UV - *visible recording spectrophotometer*, Shimadzu. Os coeficientes de extinção molar ( $\epsilon$ ) das proteínas recombinantes foram obtidos pelo programa ProtParam presente no servidor ExPASy Bioinformatics Resource Portal<sup>12</sup> e estão apresentados na Tabela 7. O ProtParam também fornece o valor de absorvância a 280 nm para uma solução da proteína em água com concentração de 1mg/mL (Abs 0.1%), assim como outros parâmetros que estão na Tabela 7. Neste programa, o coeficiente de extinção molar da proteína em água a 280nm é predito a partir da composição de resíduos de aminoácidos da proteína, de acordo com a equação:  $\epsilon$  (proteína) ( $M^{-1}cm^{-1}$ ) = Num(Trp)\* $\epsilon$ (Trp) + Num(Tyr)\* $\epsilon$ (Tyr) + Num(Cystine)\* $\epsilon$  (Cystine); onde  $\epsilon$  (Trp) = 5.500,  $\epsilon$  (Tyr) = 1.490 e  $\epsilon$  (Cystine) = 125 (Gill & Vonhippel, 1989; Pace, et al., 1995).

---

<sup>12</sup> <http://web.expasy.org/protparam/>

Tabela 7 - Características das proteínas recombinantes determinadas no ExPASy Bioinformatics Resource Portal .

Proteína	# aminoácidos	Peso Molecular (Da)	$\epsilon$ (M-1cm-1)	Abs 0.1%
6xHis-NahB	275	29.520,8	21.430	0,726
6xHis-NahG	450	48.964,0	78.380	1,601

#### 4.16 DIFERENTES PROTOCOLOS PARA PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Para a produção das proteínas recombinantes foram adotadas outras estratégias além das especificadas nos itens 4.13 e 4.14, como adição de ligantes, diferentes métodos para lise, dessalinização, concentração e purificação, que fossem menos agressivas às proteínas.

A primeira estratégia adotada para a 6xHis-NahB foi a adição de ligantes que pudessem contribuir para aumentar a estabilidade da proteína. Todos os outros parâmetros de produção foram mantidos como citados nos itens anteriores. Um composto parecido estruturalmente com o ligante natural da enzima foi utilizado, uma vez que o substrato da NahB, cis-naftaleno dihidrodiol, não estava disponível comercialmente no período desta tese. Optou-se em usar o catecol, que é um composto similar (Figura 11). O catecol (VETEC) foi adicionado ao sobrenadante proveniente da centrifugação do lisado celular, na proporção de 60:1 em molaridade, de catecol para a enzima.

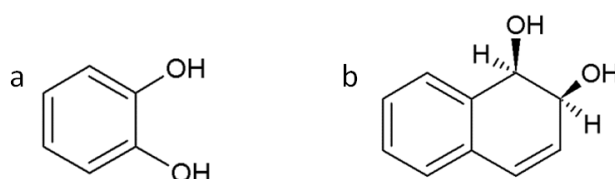


Figura 11 – Fórmula estrutural de composto similar ao substrato da enzima NahB adicionado no lisado celular para aumentar a estabilidade da proteína. (a) Catecol. (b) Substrato natural da enzima NahB.

Também foi testada outra substância, a carboxolona (SIGMA) (Figura 12), que é considerada um ligante universal das enzimas da família SRD (*short-chain dehydrogenase/reductase*), a qual pertence a NahB. A carboxolona foi adicionada na

cultura celular durante a expressão para uma concentração final de 100  $\mu\text{M}$  ao mesmo tempo em que o IPTG (Hozjan *et al.*, 2008).

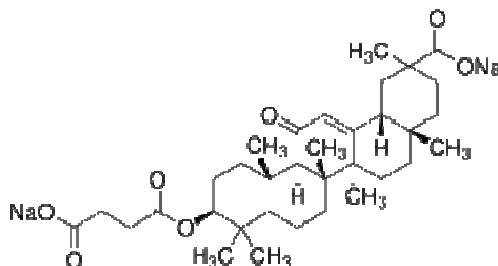


Figura 12- Fórmula estrutural da carbenoxolona, composto adicionado durante a expressão para aumentar a estabilidade da enzima 6xHis-NahB.

As outras estratégias utilizadas para ambas as enzimas, como diferentes métodos para lise, dessalinização, concentração e purificação, foram realizadas na presença e ausência de ligantes. Para romper as células utilizou-se o homogeneizador EmulsiFlex-C3 (Avestin), ao invés da utilização de lizosima, de choque térmico e de sonicação. Optou-se em utilizar, ao invés da diálise, uma coluna de dessalinização – HiPrep 26/10 (GE Healthcare). As frações obtidas da afinidade que continham as proteínas recombinantes foram imediatamente eluídas em tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 50 mM NaCl. As frações obtidas na dessalinização foram concentradas utilizando-se um concentrador para centrífuga Vivaspin (faixa de corte de peso molecular de 10.000 Da, 6 e 20 mL de capacidade, GE Healthcare), ao invés de se utilizar PEG 10.000, antes da purificação por exclusão molecular. Para a concentração das proteínas para cristalização, também, utilizou-se Vivaspin, ao invés de PEG 10.000.

#### 4.17 CLIVAGEM COM A PROTEASE TEV

A protease TEV foi produzida no Laboratório de Biologia Estrutural do ICB/UFMG a partir do vetor pMHT238 $\Delta$  (Blommel & Fox, 2007). Essa protease é sítio-específica e reconhece a sequência de resíduos de aminoácidos ENLYFQG, sendo que o último resíduo pode ser substituído por outros, com pouco impacto na eficiência do processo. A clivagem ocorre entre a Glutamina e a Glicina, resultando em uma Glicina na porção amino terminal da proteína de interesse (Fang, *et al.*, 2007). Após a primeira purificação de afinidade foi feita a clivagem a 30°C por 16 h e o tampão utilizado foi 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8,0. A proporção de TEV: proteína alvo utilizada foi de 1:5 em mg. A clivagem

com a proteína TEV foi feita somente para os testes cinéticos realizados com a proteína NahG recombinante, a qual, após a clivagem, foi denominada GH-NahG. O G é referente à glicina, proveniente do sítio da protease, e o H à histidina, proveniente do sítio da enzima de restrição *NdeI* adicionado ao iniciador direto.

#### 4.18 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE PROTÉICA E ESTADO DE OLIGOMERIZAÇÃO

A determinação do estado oligomérico das proteínas 6xHis-NahB e 6xHis-NahG em 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaCl foi feita por ensaios de Espalhamento Dinâmico da Luz (*Dynamic Light Scattering* – DLS). Os experimentos de DLS foram realizados no Laboratório do prof. Dr. Frédéric Jean Georges Frézard do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, utilizando o equipamento Zetasizer Nano Series Nano - ZS90. Logo antes da análise, as amostras proteicas foram centrifugadas a 17.000 g por 10 min a 4°C, para retirar qualquer material suspenso. Os ensaios foram realizados com temperatura constante de 25°C, cubeta de vidro com caminho óptico de 1,0 cm e 1,5 mL de amostra na concentração aproximada de 1,5 mg/mL.

Para avaliação da estabilidade da enzima 6xHis-NahB utilizando diferentes estratégias de produção foram realizados ensaios de Espalhamento Dinâmico da Luz em função do tempo. Os ensaios foram realizados imediatamente após a proteína ser obtida por diálise ou por cromatografia utilizando coluna de dessalinização, na presença ou ausência de catecol ou carbenoxolona. Em todos os ensaios, o tampão da solução proteica era 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 50 mM NaCl. Cada amostra foi medida 600 vezes, com três acumulações de 10 segundos cada. Todos os outros parâmetros foram idênticos às medidas feitas quando se determinou somente o estado monomérico ou oligomérico. Os dados coletados foram analisados utilizando o programa Malvern Zetasizer v. 6.01, o qual permitiu a avaliação da estabilidade e estado de oligomerização da 6xHis-NahB e determinação do estado oligomérico da 6xHis-NahG.

#### 4.19 DETERMINAÇÃO DO ESTADO DE OLIGOMERIZAÇÃO

Os estados de oligomerização das enzimas recombinantes também foram avaliados por cromatografia de exclusão molecular utilizando coluna Hiload™ 16/60

Superdex 200, a qual foi pré-equilibrada com tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 50 mM NaCl. Os perfis cromatográficos das enzimas 6xHis-NahB e 6xHis-NahG foram analisados utilizando-se uma curva de calibração da coluna, que foi construída com citocromo C (12 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), albumina (66 kDa), álcool desidrogenase (150 kDa) e  $\beta$ -amilase (200 kDa).

#### 4.20 DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA

Para caracterização da estrutura secundária da proteína 6xHis-NahB foram realizados experimentos de Dicroísmo Circular (*Circular Dichroism* – CD) . Os experimentos de CD foram realizados no Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria do CNPEM (Campinas, SP) utilizando o espectropolarímetro Jasco J-810 (Jasco corporation, Tóquio, Japão). Não foram realizados experimentos de dicroísmo circular para a 6xHis-NahG, uma vez que, no momento em que obteve-se a proteína estável, o equipamento não estava disponível para uso. Optou-se por continuar o trabalho sem a realização deste experimento.

As concentrações proteicas utilizadas nos ensaios foram entre 0,10 e 0,25 mg/mL. As proteínas foram mantidas a 4°C até o momento do ensaio e logo antes da análise as amostras foram centrifugadas a 17.000 g por 10 minutos a 4°C para retirar qualquer material suspenso. Foi utilizada cubeta de quartzo com 0,1 cm de caminho óptico e 150 $\mu$ L de amostra. Para a coleta de dados, foram utilizadas as temperaturas de 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C. As medidas foram feitas de 0,5 em 0,5 nm, com 20 acumulações para cada medida. A faixa de comprimento de onda utilizada foi de 198 a 260 nm.

Antes dos experimentos com as amostras proteicas, foram feitas medidas com a cubeta vazia para verificar a integridade e limpeza desta. Também foram feitas 10 acumulações com o solvente no qual as proteínas estavam dissolvidas, entre os comprimentos de onda de 198 a 260 nm, as quais foram utilizadas como leitura de branco. Os espectros gerados correspondem à diferença entre a média das 20 acumulações realizadas para a proteína e as 10 acumulações realizadas para o solvente em que elas estavam diluídas.

Os espectros obtidos nos experimentos de CD foram plotados como elipicidade molar em mdeg.cm<sup>2</sup>.dmol<sup>-1</sup> em função do comprimento de onda em nm. O Cr, que é o fator de conversão utilizado para o cálculo da elipicidade molar a partir da elipicidade em mdeg, foi

calculado a partir da fórmula a seguir, onde,  $n$  é o número de ligações peptídicas da proteína;  $c$  é a concentração em g/mL da proteína e  $M_r$  é a massa molecular da proteína em Da.

$$Cr = \frac{(n * 1000 * c)}{M_r}$$

Com o valor de  $Cr$  foi calculado a elipicidade molar, utilizando-se a próxima expressão, onde,  $[\theta]$  é a elipicidade molar em mdeg.cm<sup>2</sup>.dmol<sup>-1</sup>;  $\theta$  é a elipicidade obtida pelo espectropolarímetro em mdeg;  $Cr$  é o fator de correção;  $l$  é o caminho ótico da cubeta em cm (Sreerama and Woody, 2004).

$$[\theta] = \frac{\theta}{(10 * Cr * l)}$$

A porcentagem de estrutura secundária da proteína 6xHis-NahB foi determinada a partir da deconvolução dos dados dos experimentos de CD utilizando-se o programa CDNN 2.1. Foi feito um gráfico de porcentagem de estrutura secundária em função das diferentes temperaturas analisadas.

#### 4.21 ENSAIOS DE CRISTALIZAÇÃO

As proteínas recombinantes 6xHis-NahB e 6xHis-NahG eluídas na exclusão molecular foram concentradas utilizando-se uma membrana de diálise com *cut-off* de 12 kDa (Sigma-Aldrich) contra PEG 10.000 ou utilizando-se um concentrador para centrífuga Vivaspin (faixa de corte de peso molecular de 10.000 Da, 6 e 20 mL de capacidade, GE Healthcare). A proteína 6xHis-NahB foi concentrada aproximadamente para 7, 10, 20, 30 e 40 mg/mL e a 6xHis-NahG, para 5, 10, 20, 40 e 90 mg/mL. Os ensaios de cristalização das proteínas recombinantes foram realizados manualmente por meio da técnica de difusão de vapor em gota suspensa.

Esses ensaios foram feitos utilizando-se os Kits *Crystal Screen* e *Crystal Screen 2* (Hampton Research) com 96 soluções no total. Foram utilizadas placas com 24 poços e em cada lamínula foram adicionados 1,0 µL da proteína e 1,0 µL da solução precipitante. Em cada lamínula foram colocadas de uma a cinco preparações proteicas diferentes, dependendo

do número de concentrações diferentes das enzimas e das coenzimas utilizadas. Os ensaios foram realizados a 18° C. As condições em que se obteve cristais foram refinadas, variando-se, em pequena escala, o pH, a concentração do precipitante e a concentração do sal.

Além dos ensaios manuais, amostras das proteínas 6xHis-NahB e 6xHis-NahG, também foram enviadas para o Laboratório Automatizado de Cristalização de Macromoléculas (ROBOLAB) do CNPEM (Campinas, SP) para ensaios de cristalização utilizando-se um robô de cristalização. Foi utilizada a metodologia de difusão de vapor em gota depositada em placas de 96 poços. Os ensaios foram realizados a 18°C e cada gota foi formada pela adição de 0,5 a 1,0 µL da proteína e quantidade idêntica da solução precipitante. Nos experimentos foram testados os Kits: *Crystal Screen*, *Crystal Screen 2* e *SaltRx* da Hampton Research, *JCSG+ Suite* e *PACT Suite* da Quiagen, *Precipitant Synergy*, *Wizard I random* e *Wizard II random* da Emerald, sendo, no total, 480 soluções diferentes. A partir das condições em que se obteve cristais, foi feito um refinamento, variando-se pH, concentração do precipitante e concentração do sal. Estas soluções foram preparadas no ROBOLAB e, no caso do refinamento, as placas (24 poços) foram feitas manualmente no LNLS com gota suspensa. O ROBOLAB tem um sistema de captura de imagens automática com acesso remoto, armazenamento de dados e sistema de luz ultravioleta (UV) para diferenciação de cristais de sais e proteínas. Dessa forma, era possível visualizar periodicamente a formação dos cristais.

Na etapa de refinamento a partir das condições estabelecidas no ROBOLAB, testou-se obter cristais das proteínas 6xHis-NahB e 6xHis-NahG em que elas estivessem ligadas com as coenzimas NAD<sup>+</sup> e NADH, respectivamente. Foi feita cocristalização, sendo a coenzima adequada para cada enzima adicionada na solução proteica antes da cristalização, com os tempos de 24 h antes e 30 min antes do preparo das placas para cristalização utilizados. O NAD<sup>+</sup> foi adicionado na proporção de 5:1 em molaridade de coenzima para a 6xHis-NahB e o NADH, na proporção de 10:1 em molaridade de coenzima para a 6xHis-NahG. Outra estratégia foi adicionar as coenzimas nas soluções proteicas antes da purificação por exclusão molecular, na proporção de 1,5:1 em molaridade de coenzima para a proteína. Além disso, foi feito *soaking*, adicionando-se as coenzimas na solução crioprotetora, na qual o cristal é mergulhado antes de ser submetido ao feixe de raios-X. O cristal ficou na solução crioprotetora com a coenzima cuja concentração foi 10 mM por 5 a 20 minutos.

Para a enzima 6xHis-NahB, também foram realizados testes de cocristalização e de *soaking* com compostos análogos ao substrato natural da enzima e com seu produto. Estes foram utilizados em diferentes concentrações entre 5 mM e 20 mM para cocristalização ou *soaking*. Essas são as concentrações finais dos compostos na gota de cristalização ou na gota crioprotetora em que o cristal foi imerso. Os compostos utilizados estão na Figura 13. Além disso, tanto na cocristalização como no *soaking*, foram utilizados somente os compostos representados na Figura 13 ou esses compostos associados com  $\text{NAD}^+$ .

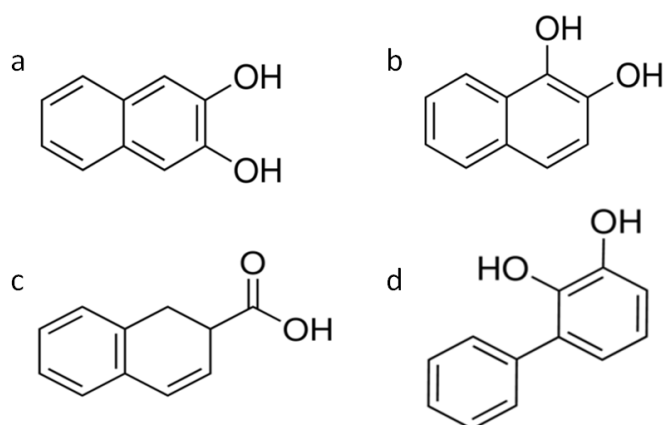


Figura 13 – Estruturas químicas dos compostos utilizados para cocristalização ou *soaking* com a enzima 6xHis-NahB. (a) 2,3-dihidroxinaftaleno. (b) 1,2-dihidroxinaftaleno (produto da reação catalizada por NahB). (c) 1,2-dihidro-2-ácido carboxílico nafataleno. (d) 2,3-dihidroxi-bifenil.

Uma estratégia utilizada para obtenção de cristais da 6xHis-NahG foi adicionar seu substrato natural, ácido salicílico, no tampão de lise. A adição foi na proporção de aproximadamente 180:1 de substrato para enzima. Após a adição do composto no tampão de lise, o pH foi ajustado para 7,4. Os testes manuais iniciais e os testes no ROBOLAB foram realizados com a enzima na presença e ausência de ácido salicílico. Os refinamentos feitos após o experimento no ROBOLAB foram realizados apenas com a proteína lisada na presença de ácido salicílico.

Para resolver o problema das fases para a 6xHis-NahG foram utilizados cristais derivados. Para a derivatização foi utilizada a técnica de *soaking* com solução de iodeto de sódio, a qual foi acrescentada na solução crioprotetora. A concentração da solução de iodo na gota em que o cristal foi imerso variou entre 62,5 mM e 1,0 M. O tempo em que o cristal ficou imerso na solução crioprotetora com iodo variou entre 30 seg e 5 min.

## 4.22 COLETA E ANÁLISE DOS DADOS DE DIFRAÇÃO

Os cristais formados foram submetidos à difração de raios-X para coleta dos dados e determinação da estrutura tridimensional. Os dados de difração da 6xHis-NahB e 6xHis-NahG foram coletados na linha DO3B-MX1 (Polikarpov, et al., 1998), a qual opera em uma energia fixa de 7,709 keV (1.608 Å), e W01B-MX2 (Guimaraes, et al., 2009), a qual opera em uma faixa de energia de 5 a 15 keV, ambas do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) (Campinas, São Paulo). As imagens de difração foram gravadas em um detector MAR CCD 165 na linha DO3B-MX1 e Rayonix MarMosaic 225 CCD na linha W01B-MX2. Antes da coleta dos dados, os cristais foram transferidos por alguns segundos para uma solução crioprotetora, formada pela adição de 1,0 µl de etilenoglicol a 9,0 µl da solução precipitante ou 1,5 µl de etilenoglicol a 8,5 µl da solução precipitante. Os cristais foram coletados da gota utilizando-se uma alça de nylon (Hampton Research) e, durante a coleta, o cristal foi resfriado a -173°C com nitrogênio gasoso.

O cálculo do coeficiente de Matthews ( $V_m$ ) foi feito utilizando-se o programa `matthews_coef` (Kantardjieff & Rupp, 2003) distribuído pelo pacote de programas CCP4 (Winn, et al., 2011). Este coeficiente permite fazer a análise do conteúdo da célula unitária do cristal, determinando o número de subunidades e porcentagem de solvente na unidade assimétrica. Matthews verificou que, na maioria dos casos de cristais de proteína,  $V_m$ , que indica a razão entre o volume da célula unitária e o peso molecular das amostras cristalizadas, varia entre 1,7 e 3,5 Å<sup>3</sup>/Da. Frequentemente,  $V_m$  assume valores em torno de 2,15 Å<sup>3</sup>/Da com unidades assimétricas de cristais proteicos contendo por volta de 40% a 60% de solvente. Dessa forma, pela comparação de valores obtidos nos experimentos de difração de raios-X com os valores previstos por Matthews, pode-se estimar o número de moléculas na unidade assimétrica.

O problema das fases para a 6xHis-NahB foi resolvido por substituição molecular pelo AutoMR implementado no programa *PHENIX* (Adams, et al., 2010; McCoy, et al., 2007). A estrutura cristalográfica da bifênol desidrogenase de *Pandoraea pnomenusa* Strain B-356 (BphB<sub>B-356</sub>) (PDB ID 2Y93) (Dhindwal, et al., 2011), que apresenta 37,0% de identidade com a sequência da NahB foi usada como modelo de fase para a 6xHis-NahB. Para resolver a estrutura da 6xHis-NahG, foi tentado inicialmente o método de substituição

molecular com a monoxigenase PhzS de *Pseudomonas aeruginosa* (PDB ID 2RGJ) (Greenhagen, et al., 2008) como modelo de fase, a qual apresenta 26% de identidade com a NahG em 364 resíduos de aminoácidos que foram alinhados no Blast<sup>13</sup> do PDB. Além disso, foi utilizado o método dos átomos pesados com iodo para resolução da estrutura da 6xHis-NahG. O programa SHELXC foi utilizado para determinação do sinal anômalo e o SHELXD para determinar as coordenadas dos átomos pesados no cristal. Foram utilizados os métodos SAD e SIRAS como implementados no programa *PHENIX AutoSol* (Adams, et al., 2010; Terwilliger, et al., 2009). A construção automática dos modelos de ambas as proteínas foi feita utilizando-se o programa *PHENIX AutoBuild* (Adams, et al., 2010; Terwilliger, et al., 2008) e para a construção manual foi utilizado o programa Coot (Emsley, et al., 2010). O refinamento de ambas as estruturas foi realizado com os programas phenix.refine (Adams, et al., 2010; Afonine, 2005) e Coot (Emsley, et al., 2010). A validação das estruturas foi feita utilizando-se o programa MolProbity (Davis, et al., 2007) implementado no *PHENIX*.

#### 4.23 CINÉTICA DO ESTADO ESTACIONÁRIO

A caracterização cinética da enzima NahB recombinante foi inviável devido ao substrato da enzima não ser disponível comercialmente. A cinética da NahG foi caracterizada, uma vez que o substrato da enzima, o ácido salicílico, é disponível comercialmente.

Os ensaios cinéticos com a proteína 6xHis-NahG sem cauda de histidinas (GH-NahG) foram realizados no laboratório de Espectroscopia UV-Vi do Departamento de Química, ICEX, UFMG em colaboração com o Prof. Dr. Tiago Antônio da Silvia Brandão. Para esses ensaios foi utilizado o espectrofotômetro Cary50 (Agilent Technologies) Os experimentos com as proteínas mutantes da 6xHis-NahG (item 4.24) foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Alvan C. Hengge da *Utah State University*, durante o Doutorado Sanduíche da autora dessa tese. Nesses ensaios foram utilizados leitores de placas H4 Synergy (BioTek) e Versa Max (Molecular Devices), além do espectrofotômetro Cary50.

A redução do NADH foi monitorada a 340 nm para a determinação dos efeitos das concentrações do substrato ácido salicílico e das coenzimas NADH e FAD na atividade da enzima NahG recombinante com e sem cauda de histidinas. Os ensaios foram realizados a 25

---

<sup>13</sup> <http://www.rcsb.org/pdb/search/advSearch.do>

°C em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico de 1,0 ou 3,0 mL, nas quais foram utilizados 1,0 ou 1,5 mL, respectivamente. A solução tampão utilizada nos ensaios foi HEPES 50 mM pH 8,5, NaCl 0,20 M, EDTA 1,00 mM. O substrato, as coenzimas e a enzima foram diluídos nesse tampão para os ensaios cinéticos. Para garantir o estado estacionário, a concentração da enzima NahG foi mantida cerca de 30 vezes abaixo dos valores de  $K_M$  e as concentrações do substrato, ácido salicílico, e das coenzimas, NADH e FAD, pelo menos 10 vezes acima dos seus valores de  $K_M$ .

Para a determinação dos efeitos das concentrações do substrato ácido salicílico e das coenzimas NADH e FAD na atividade dos mutantes da NahG foram seguidas as mesmas condições dos ensaios para a proteína nativa, exceto que os ensaios foram realizados com os leitores de placas H4 Synergy (BioTek) e Versa Max (Molecular Devices), além do espectrofotômetro Cary50. Estes leitores de placas foram utilizados com o objetivo de fazer mais reações em um tempo menor e consumir menos reagentes. Além disso, os valores de  $K_M$  para os mutantes testados até o momento aumentaram bastante com relação ao valor da proteína nativa, fazendo com que se tornasse inviável dosar no Cary 50 (caminho ótico de 1,0 ou 0,5 cm) uma solução com 10 vezes o valor do  $K_M$  do NADH. Dessa forma, a utilização de leitores de placas, nos quais se pode utilizar pequenos volumes, como 100  $\mu$ L, foi uma alternativa para a caracterização cinética dos mutantes. No H4 Synergy e no Versa Max foram utilizadas placas de 96 poços com 100 a 330  $\mu$ L. Para garantir o estado estacionário, a concentração da enzima foi mantida cerca de 30 vezes abaixo dos valores de  $K_M$  e as concentrações do substrato e das coenzimas pelo menos 10 vezes acima dos seus valores de  $K_M$ .

#### 4.24 MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA

A mutagênese sítio dirigida de alguns resíduos de aminoácidos da proteína NahG recombinante foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Alvan C. Hengge da *Utah State University*, durante o Doutorado Sanduíche da autora dessa tese. Essas mutações foram propostas para avaliar a participação desses resíduos na atividade catalítica da enzima e, assim, contribuir para o entendimento do mecanismo de ação da proteína. A escolha dos resíduos para mutação foi feita a partir da comparação da estrutura primária da salicilato hidroxilase de *P. putida* G7 com enzimas similares depositadas no PDB. O alinhamento das

sequências foi feito no programa ClustalW<sup>14</sup>. As enzimas similares utilizadas, com os respectivos números de acesso no UniProtKB<sup>15</sup> e as identidades com a NahG de *P. putida* G7, foram a urato oxidase HpxO (A6T923, 28%), 3-hidroxibenzoato-6-hidroxilase (Q0SFK6, 27%), 2,6-dihidroxipiridina-3-hidroxilase (Q93NG3, 26%), monoxigenase PhsZ (Q9HWG9, 26%) e 2-metil-3-hidroxipiridina-5-ácido carboxílico oxigenase (Q988D3, 22%). Os valores de identidade foram obtidos com a ferramenta *Blast* do PDB<sup>16</sup>.

Além disso, para a escolha das mutações foi feita a comparação da estrutura tridimensional da 6x-HisNahG com as estruturas das enzimas 3-hidroxibenzoato-6-hidroxilase (PDB 4BK2) (MonTERSINO, et al., 2013) e urato hidroxilase (PDB 3RP7) (Hicks, et al., 2013), ambas com FAD e substrato ligados. Essas proteínas foram escolhidas com base na análise feita pelo programa Dali Server<sup>17</sup>, o qual faz uma busca no PDB por proteínas estruturalmente similares, comparando suas estruturas tridimensionais.

As mutações sítio dirigidas foram inseridas no DNA nativo utilizando os kits *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis* (Agilent Technologies) (Figura 14) e Q5<sup>®</sup> *Site-Directed Mutagenesis* (NEW ENGLAND BioLabs). Basicamente, o procedimento utiliza o vetor recombinante pET28a-TEV-NahG e iniciadores contendo cada mutação desejada. A extensão dos iniciadores com *QuikChange Lightning Enzyme* ou *Q5 Hot Start High-Fidelity* gera o plasmídeo mutado. Posteriormente, a enzima *DpnI* (primeiro kit) ou KDL (segundo kit) é usada para digerir o DNA molde e o plasmídeo contendo a mutação é transformado em bactérias competentes.

---

<sup>14</sup> <http://www.clustal.org/clustal2/>

<sup>15</sup> <http://www.uniprot.org/help/uniprotkb>

<sup>16</sup> <http://www.rcsb.org/pdb/search/advSearch.do>

<sup>17</sup> [http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali\\_server/](http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali_server/)

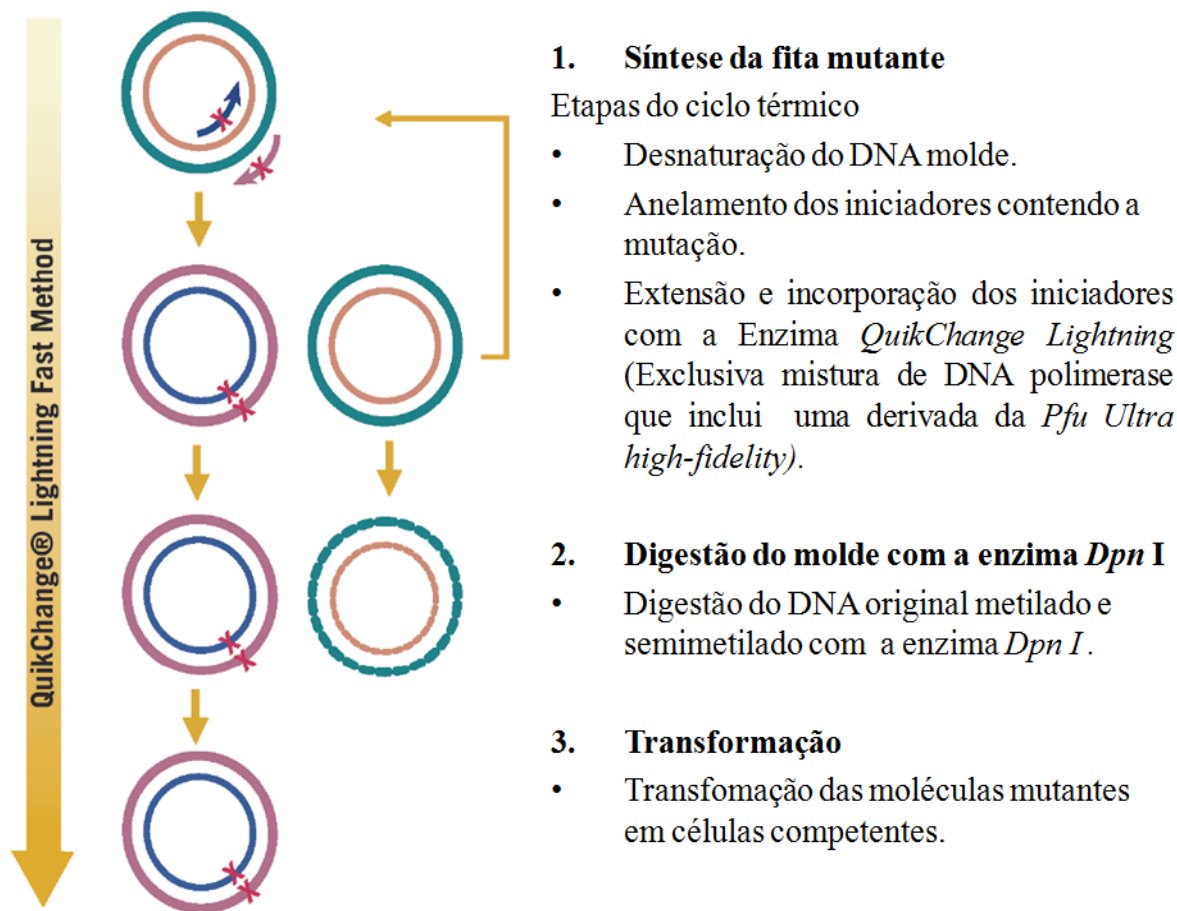


Figura 14 – Resumo do método de mutagênese sítio-dirigida QuikChange Lightning (Agilent Technologies). Adaptado do manual de instruções *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit*.

Os iniciadores utilizados para mutagênese com o primeiro kit estão representados na Tabela 8 e com o segundo kit, na Tabela 9. As mutações estão representadas por uma letra seguida de um número e mais uma letra, os quais correspondem, respectivamente, ao resíduo de aminoácido da sequência nativa, a posição deste na sequência de resíduos de aminoácidos e ao resíduo de aminoácido mutante. Os plasmídeos obtidos por esse procedimento foram sequenciados com os iniciadores T7 direto ou reverso para verificar a presença das mutações. Os mutantes foram denominados 6xHis-NahG seguidos pelo nome da mutação.

Tabela 8 – Iniciadores utilizados para mutagênese sítio-dirigida da 6xHis-NahG utilizando o kit *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis*.

Mutação	Iniciador		Sequência
<b>E38A</b>	E38Af	direto	5'GTACAGCTGTTCGCGGCTGCGCCGG3'
	E38Ar	reverso	5'CCGGCGCAGCCGCGAACAGCTGTAC3'
<b>D314A</b>	D314Af	direto	5'GTCCTGATCGGGCGCCGAGCTCACGC3'
	D314Ar	reverso	5'GCGTGAGCTGCGGCGCCGATCAGGAC3'
<b>H226A</b>	H226Af	direto	5'GGCTCGACGGCGCTATCCTCACCTTTC3'
	H226Ar	reverso	5'GAAAGGTGAGGATAGCGCCGTCGAGCC3'
<b>R192A</b>	R192Af	direto	5'CCTGTGCCTATGCGGGGATGGTCGAC3'
	R192Ar	reverso	5'GTCGACCATCCCCGCATAGGCACAGG3'
<b>K165A</b>	K165Af	direto	5'CCGACGGAATCGCGTCAGCGCTCCG3'
	K165Ar	reverso	5'CGGAGCGCTGACGCGATTCCGTCGG3'

Tabela 9 - Iniciadores utilizados para mutagênese sítio-dirigida da 6xHis-NahG utilizando o kit Q5® *Site-Directed Mutagenesis*.

Mutação	Iniciador		Sequência
<b>L36A</b>	L36AF	direto	5'CCAGGTACAGGCGTTCGAGGCTG3'
	L36AR	reverso	5'ATATGGGAGTAGCGGCAG3'
<b>F37A</b>	F37AF	direto	5'GGTACAGCTGGCCGAGGCTGCGC3'
	F37AR	reverso	5'TGGATATGGGAGTAGCGGC3'
<b>H110N</b>	H110NF	direto	5'GTCCTCGGTAAACCGGGCGGATTTTCATCG3'
	H110NR	reverso	5'TGGCCCACGCCCCGGAGCG3'
<b>R111Q</b>	R111QF	direto	5'CTCGGTACACCAGGCGGATTTTCATCGAC3'
	R111QR	reverso	5'GACTGGCCCACGCCCCGGA3'
<b>H322Y</b>	H322YF	direto	5'CATGCTGCCGTACCAAGGTGCCG3'
	H322YR	reverso	5'GCGTGAGCTGCGTCGCCG3'
<b>A167R</b>	A167RF	direto	5'AATCAAGTCACGGCTCCGTAGCCATGTGCTGG3'
	A167RR	reverso	5'CCGTCGGCACCGATCAGA3'
<b>R169A</b>	R169AF	direto	5'GTCAGCGCTCGCTAGCCATGTGCTGGAAG3'
	R169AR	reverso	5'TTGATTCCGTCGGCACCG3'
<b>V141N</b>	V141NF	direto	5'GACCGCTTCGAACTCGTCCCATGC3'
	V141NR	reverso	5'ATCACCCTGATCCGTTAG3'

Para a realização das mutações com o kit *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis* foram seguidos a reação e o programa para amplificação representados na

Tabela 10 e na Tabela 11, e para o kit *Q5 Site-Directed Mutagenesis* aqueles presentes na Tabela 12 e na Tabela 13.

Tabela 10 - Reação para mutagênese sítio dirigida utilizando o kit *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis*

<b>Reagente/Concentração</b>	<b>Quantidade</b>
<b>Plasmídeo pET28a-TEV-6xHis-NahG</b>	100 ng
<b>Tampão 10 X</b>	5 µL
<b>Iniciador direto</b>	125 ng
<b>Iniciador reverso</b>	125 ng
<b>dNTPs 10 mM</b>	1 µL
<b>Reagente <i>QuikSolution</i></b>	1,5 µL
<b>Enzima <i>QuikChange Lightning</i></b>	1,0 µL
<b>H<sub>2</sub>O ultrapura autoclavada</b>	qsp. 50 µL

Tabela 11- Programa para mutagênese sítio dirigida utilizando o kit *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis*.

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo</b>
<b>1. Aquecimento inicial</b>	95	2 min
<b>2. Desnaturação</b>	94	20 s
<b>3. Anelamento</b>	60	10 s
<b>4. Extensão</b>	68	3 min e 30 s
<b>5. Repetição (18X das etapas 2 a 4))</b>	---	---
<b>6. Extensão final</b>	68	5 min

Tabela 12- Reação para mutagênese sítio dirigida utilizando o kit *Q5 Site-Directed Mutagenesis*.

Reagente/Concentração	Qunatidade
Plasmídeo pET28a-TEV-6xHis-NahG	25 ng
<i>Q5 Hot Start-Fidelity Master Mix</i>	12,5 µL
Iniciador direto	1,25 µL (0,5 µM)
Iniciador reverso	1,25 µL (0,5 µM)
H <sub>2</sub> O ultrapura autoclavada	qsp. 25 µL

Tabela 13- Programa para mutagênese sítio dirigida utilizando o kit *Q5 Site-Directed Mutagenesis*.

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo
<b>1. Aquecimento inicial</b>	98	30 s
<b>2. Desnaturação</b>	98	10 s
<b>3. Anelamento</b>	50-72*	30 s
<b>4. Extensão</b>	72	4 min e 30 s
<b>5. Repetição (25X das etapas 2 a 4))</b>	---	---
<b>6. Extensão final</b>	72	2 min

\*Foi utilizada a temperatura de anelamento de cada par de iniciadores calculada pelo programa NEBaseChanger<sup>18</sup>.

<sup>18</sup> <http://nebasechanger.neb.com/>

## **5 RESULTADOS**

## 5.1 *cis*-NAFTALENO DIHIDRODIOL DESIDROGENASE

### 5.1.1 Amplificação e clonagem

A amplificação do gene *nahB*, sua clonagem em vetor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO e o sequenciamento dos clones positivos foram descritos previamente na dissertação da autora desta tese. Um dos clones pCR-2.1-TOPO-*nahB* que apresentou sequência correta foi denominado pCR 2.1-TOPO-*nahB*-C3-2F2R (Costa, 2010).

### 5.1.2 Subclonagem em vetor de expressão

A construção plasmidial pCR-2.1-TOPO-*nahB*-C3-2F2R, que já havia sido sequenciada, foi digerida com as enzimas de restrição *NdeI* e *EcoRI*. O inserto liberado foi subclonado no vetor de expressão pET-28a-TEV. Todos os clones analisados dos vetores recombinantes pET28a-TEV-NahB foram positivos, havendo a amplificação de fragmentos próximos ao tamanho do gene de 792 pb. O gel com os produtos da PCR de colônia para verificação da subclonagem não foi registrado, pois o equipamento estava indisponível. O clone utilizado para expressão da proteína recombinante foi o denominado pET28a-TEV-NahB-2A, o qual foi sequenciado e apresentou total correspondência com o gene *nahB*.

### 5.1.3 Expressão e purificação

A proteína recombinante 6xHis-NahB foi expressa em células de *Escherichia coli* Rosetta<sup>™</sup> (DE3) [BL21 (DE3) pRARE] a 18°C por 16 horas com 0,05 mM de IPTG. A expressão foi feita a 18°C, pois a 37°C a proteína foi insolúvel. Dessa forma, reduziu-se a temperatura com o objetivo de evitar a agregação proteica. Esta estratégia já se mostrou eficiente para diferentes proteínas recombinantes. Na Figura 15, a seta indica uma banda com massa molecular aparente de 26 kDa correspondente à proteína 6xHis-NahB, cuja massa molecular teórica é 27,5 kDa mais 2 kDa adicionados pelo vetor (cauda de seis histidinas e sítio de clivagem da TEV), resultando em uma proteína de 29,5 kDa. Pode-se verificar a presença de uma banda referente à 6xHis-NahB após 16 horas de expressão e a presença dessa banda nas frações solúvel e insolúvel do lisado celular, sendo que a maior parte da proteína ficou presente na fração solúvel (Figura 15).

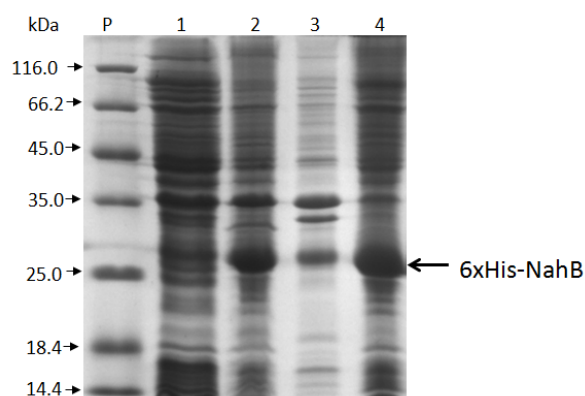


Figura 15 - Análise em gel SDS-PAGE 12%, após coloração com Comassie Blue, da indução da expressão da proteína 6xHis-NahB nas frações solúvel e insolúvel. P – Marcador de peso molecular de proteína Fermentas; 1 – fração não induzida; 2 – 16 h após a indução com IPTG; 3 – fração insolúvel obtida pelo protocolo inicial; 4 – fração solúvel obtida pelo protocolo inicial.

A fração solúvel da proteína 6xHis-NahB proveniente da lise com protocolo inicial, o qual continha uso de sonicador, foi purificada por cromatografia de afinidade utilizando coluna HisTrap<sup>TM</sup> HP 5 mL. Foram aplicados 30 mL do sobrenadante do lisado celular provenientes de um litro de cultura. O perfil cromatográfico está representado na Figura 16.

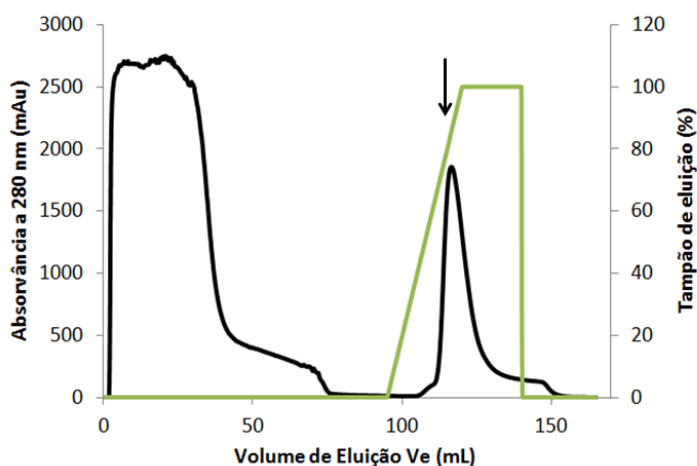


Figura 16 - Perfil cromatográfico de eluição da 6xHis-NahB em coluna de afinidade HisTrap<sup>TM</sup> HP 5 mL. Foi aplicado fração obtida de um litro de cultura da 6xHis-NahB produzida pelo protocolo inicial. A seta indica o pico correspondente à proteína 6xHis-NahB.

As frações correspondentes ao pico da proteína 6xHis-NahB, indicado pela seta na Figura 16, foram agrupadas e dialisadas contra tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,4 em

concentrações decrescentes de NaCl, de 300 até 50 mM. A amostra proteica precipitou e, com a proteína que permaneceu no sobrenadante após a diálise, foi realizado um segundo passo cromatográfico de exclusão molecular utilizando coluna Hiloal<sup>TM</sup> 16/60 Superdex 200 (GE Healthcare) (Figura 17). Antes da amostra ser aplicada na coluna de exclusão molecular, ela foi concentrada contra PEG 10.000 até 5 mL (volume máximo possível de ser aplicado na coluna). Durante esse procedimento a proteína também precipitou, e, antes de aplicá-la na coluna, a amostra foi centrifugada a 17.000 g por 20 min.

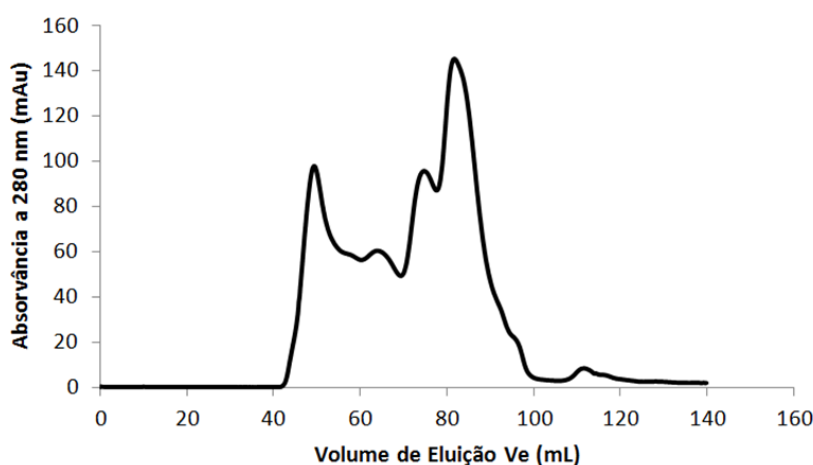


Figura 17 - Perfil cromatográfico de eluição da 6xHis-NahB em coluna de exclusão molecular Hiloal<sup>TM</sup> 16/60 Superdex 200. A proteína foi obtida pelo protocolo inicial na ausência de ligantes.

Na purificação por exclusão molecular, pode-se verificar a presença de vários picos, indicando que a amostra está polidispersa, com vários estados de agregação. Além disso, após a exclusão molecular, a proteína também precipitou. Dessa forma, a proteína 6xHis-NahB obtida a partir do primeiro protocolo utilizado, o qual foi denominado protocolo inicial, na ausência de ligantes, não é adequada para ensaios estruturais.

#### 5.1.4 Diferentes protocolos para produção das proteínas recombinantes

Para contornar a instabilidade da enzima 6xHis-NahB, testou-se a utilização de algum composto comercialmente disponível que fosse semelhante ao substrato natural da enzima. Para isso, foi utilizado o catecol. Este foi acrescentado no sobrenadante proveniente da lise celular. Todos os outros parâmetros foram mantidos iguais ao do protocolo inicial. O

perfil cromatográfico obtido na afinidade permaneceu similar. Na purificação por exclusão molecular na presença de catecol, observou-se que o perfil cromatográfico ficou mais homogêneo, com um pico principal. O perfil representado na Figura 18 foi proveniente de um litro de cultura.

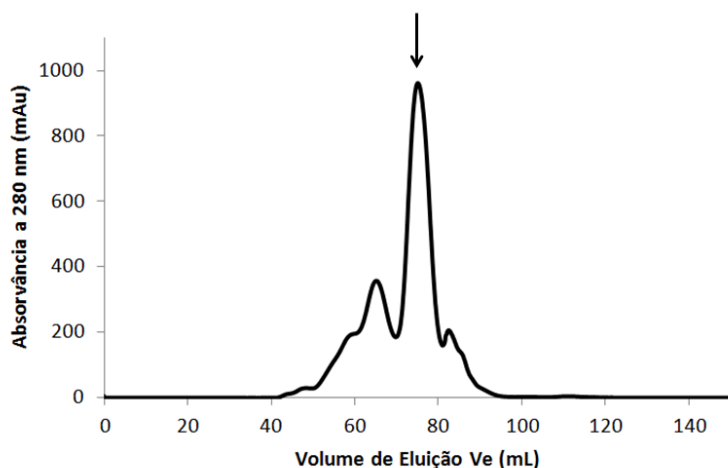


Figura 18 - Perfil cromatográfico de eluição da 6xHis-NahB em coluna de exclusão molecular Hiload™ 16/60 Superdex 200. A proteína foi obtida pelo protocolo inicial na presença de catecol. A seta indica o pico correspondente à proteína 6xHis-NahB.

A adição do catecol ajudou muito na estabilização da proteína, como pode ser verificado pela melhora do perfil da exclusão molecular (Figura 18) quando comparado com a proteína sem o composto (Figura 17). Pela curva de calibração da coluna de exclusão molecular, determinou-se que o pico principal (indicado pela seta na Figura 18) representa uma proteína de 133,8 kDa, que corresponde ao tetrâmero da enzima, cuja massa teórica é 118,0 kDa. Esse estado oligomérico é confirmado por dados da literatura, em que os autores (Patel & Gibson, 1974) mostraram, através de purificação por exclusão molecular com coluna Sephadex G200, que a proteína nativa apresenta estrutura tetramérica. Para avaliar a melhoria da estabilidade da enzima produzida com catecol foram realizados experimentos de espalhamento dinâmico da luz em função do tempo e dicroísmo circular (item 5.1.5 e item 5.1.6, respectivamente).

Foram realizados testes de clivagem com a protease TEV, entretanto a proteína 6xHis-NahB não foi clivada nas condições testadas.

Com a proteína 6xHis-NahB obtida pelo protocolo inicial na presença de catecol foram realizados testes iniciais de cristalização. Entretanto, apesar do aumento da estabilidade da 6xHis-NahB com a presença de catecol, não houve a formação de cristais. Logo, foram utilizadas outras estratégias para aumentar a estabilidade da proteína 6xHis-NahB, que consistiram na utilização de protocolos de lise, de dessalinização e de concentração que poderiam ser menos agressivos à proteína. Foi utilizado homogeneizador ao invés de lisozima, choque térmico e sonicador, coluna de dessalinização e Vivaspin ao invés de diálise para substituir a concentração por PEG 10.000. Além disso, como o catecol ajudou na estabilização da enzima, ele foi mantido ou substituído por outro ligante, a carbenoxolona, que foi adicionada durante a expressão. Portanto, todas as purificações realizadas com esse novo protocolo, o qual foi denominado protocolo otimizado, ocorreram, inicialmente, na presença de catecol ou carbenoxolona. Para ambos os ligantes, os perfis obtidos nas cromatografias e a quantidade de proteína obtida foram similares, por isso os resultados serão apresentados somente para um deles.

A fração solúvel da proteína 6xHis-NahB, na qual foi adicionado catecol, obtida a partir da lise com homogeneizador foi purificada por cromatografia de afinidade utilizando coluna HisTrap<sup>TM</sup> HP 5 mL. Foram aplicados 30 mL de lisado provenientes de um litro de cultura. O perfil cromatográfico está representado na Figura 19. Observa-se que não houve diferença significativa nos perfis dos picos obtidos na purificação por afinidade da proteína 6xHis-NahB produzida a partir do protocolo otimizado ou do protocolo inicial (Figura 19 e Figura 16, respectivamente).

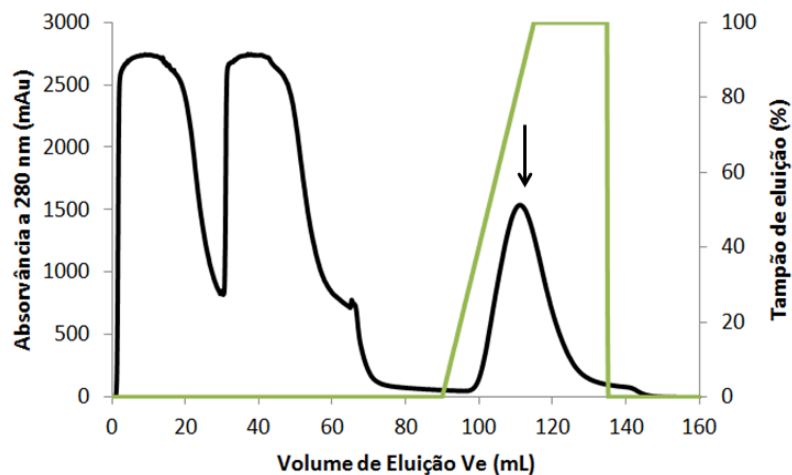


Figura 19 - Perfil cromatográfico de eluição da 6xHis-NahB em coluna de afinidade HisTrap™ HP 5 mL . Foi aplicado a fração proveniente de um litro de cultura da 6xHis-NahB obtida pelo protocolo otimizado na presença de catecol. A seta indica o pico correspondente à proteína 6xHis-NahB.

A proteína obtida na purificação por afinidade foi dosada a 280 nm em espectrofotômetro. A quantidade obtida de 6xHis-NahB foi de aproximadamente 45 mg, na concentração aproximada de 3 mg/mL, provenientes de um litro de cultura. A proteína obtida por cromatografia de afinidade foi analisada por SDS-PAGE. Na Figura 20 a seta indica uma banda com massa molecular aparente de 26 kDa correspondente à 6xHis-NahB, cuja massa molecular teórica é 29,5 kDa.

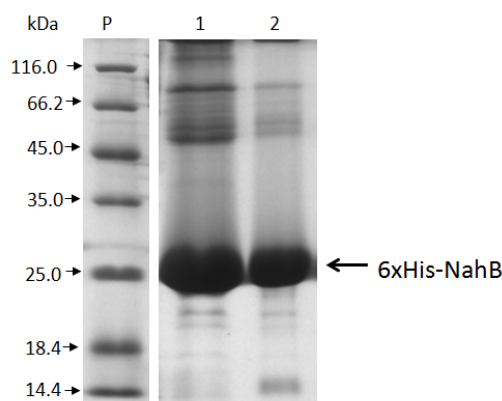


Figura 20 – Perfil eletroforético da purificação da proteína 6xHis-NahB. SDS\_PAGE 12% após coloração com Comassie Blue das frações eluídas pelas colunas de purificação. P – Marcador de peso molecular de proteína Fermentas; 1 – proteína após cromatografia por afinidade produzida pelo protocolo otimizado; 2 – proteína após cromatografia por exclusão molecular produzida pelo protocolo otimizado.

Após a purificação por afinidade da proteína 6xHis-NahB, foi feita uma purificação com coluna de dessalinização, HiPrep 26/10, ao invés da diálise. Cerca de 15 mL da proteína obtida na purificação por afinidade, correspondente ao pico indicado pela seta na Figura 19, foram imediatamente eluídos na coluna de dessalinização com tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 50 mM NaCl. As frações proteicas eluídas da coluna HiPrep 26/10 correspondiam a cerca de 15 mL. Como o volume máximo que pode ser aplicado na coluna de exclusão molecular Hiloal 16/60 Superdex 200 é 5,0 mL, as amostras dessalinizadas foram concentradas para este volume. Para tanto, foram utilizados concentradores Vivaspin ao invés de PEG 10.000, antes de serem aplicadas na coluna de exclusão molecular. O perfil cromatográfico obtido na exclusão molecular da proteína 6xHis-NahB está representado na Figura 21.

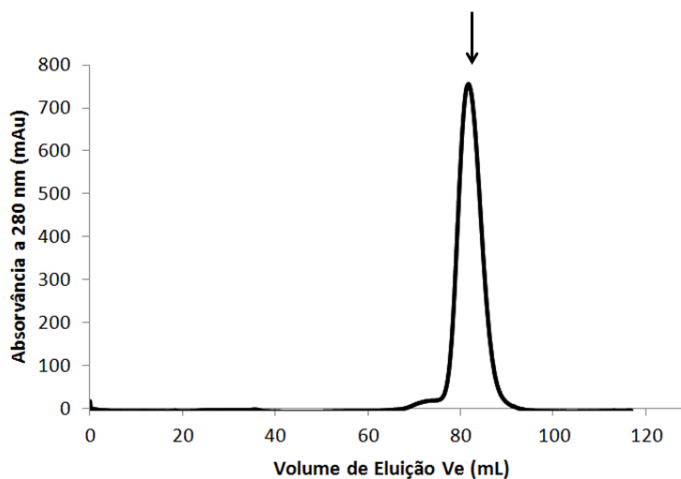


Figura 21 - Perfil cromatográfico de eluição da 6xHis-NahB em coluna de exclusão molecular Hiloal™ 16/60 Superdex 200. A proteína foi obtida pelo protocolo otimizado na presença de catecol. A seta indica o pico correspondente à proteína 6xHis-NahB.

Verifica-se que, com o protocolo otimizado de produção da enzima 6xHis-NahB na presença de catecol, o perfil cromatográfico ficou homogêneo, com 1 pico apenas, o qual corresponde a uma proteína de aproximadamente 120,8 kDa, indicando que a 6xHis-NahB apresenta-se na forma tetramérica em solução (valor teórico: 118 kDa). A quantidade de proteína obtida foi de 25 mg, na concentração aproximada de 3,0 mg/mL.

Portanto, a produção da enzima 6xHis-NahB pelo protocolo inicial na ausência de ligantes levou à produção de uma amostra proteica com vários estados de oligomerização,

consequentemente inviável para estudos estruturais. A adição do catecol, mantendo todos os outros parâmetros do protocolo inicial, promoveu aumento da estabilidade proteica, como é evidenciado pela comparação dos perfis cromatográficos obtidos na exclusão molecular na ausência e presença do ligante (Figura 17 e Figura 18) e pelos experimentos de DLS em função do tempo (item 5.1.5) e de CD (item 5.1.6). Apesar do aumento da estabilidade, a adição de catecol não foi suficiente para obtenção de cristais.

Entretanto, a utilização do protocolo otimizado na presença de ligante contribuiu ainda mais para a estabilização da proteína e, assim, foi possível cristalizá-la. Para avaliar a contribuição do protocolo otimizado para a estabilização proteica, a enzima foi produzida pelo protocolo otimizado na ausência de ligantes. Pelo perfil obtido na purificação por exclusão molecular pelo protocolo otimizado na ausência de ligantes (linha contínua na Figura 22) e por análise de DLS em função do tempo (item 5.1.5), observa-se que a proteína ficou estável, homogênea e no estado tetramérico. Com esta amostra, também foi possível a cristalização da enzima. Dessa forma, as alterações nos procedimentos de produção da proteína contribuíram para a estabilização da proteína e obtenção de cristais.

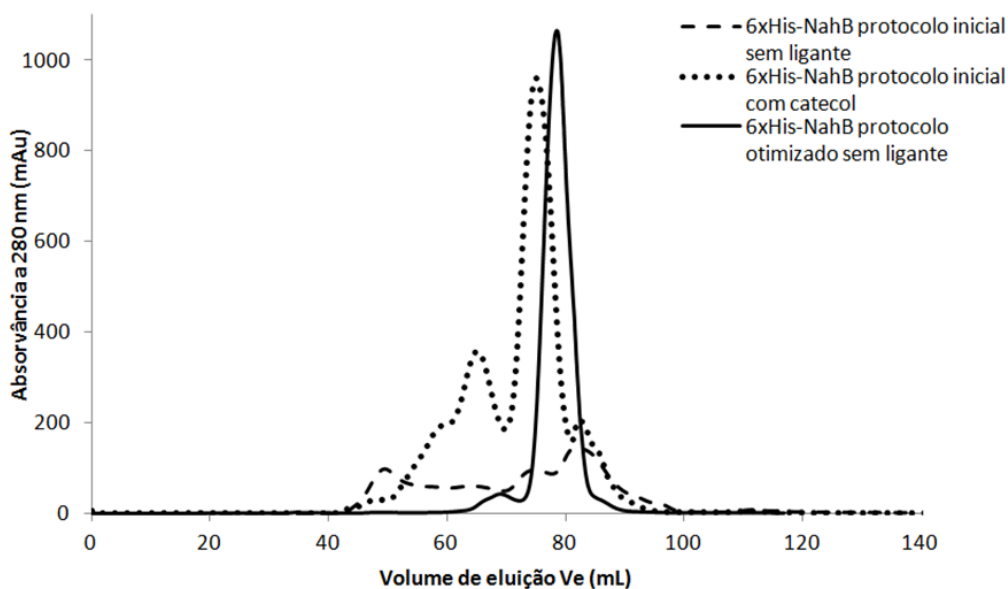


Figura 22 - Comparação dos perfis cromatográficos de exclusão molecular obtidos para a 6xHis-NahB pelos protocolos inicial e otimizado.

### 5.1.5 Caracterização do estado oligomérico e análise da estabilidade proteica

Como forma de analisar a contribuição do catecol ou carbenoxolona e dos diferentes protocolos utilizados para lise e expressão para a estabilização da proteína 6xHis-NahB foram conduzidos ensaios de espalhamento dinâmico da luz em função do tempo. Os ensaios foram realizados logo após a obtenção da enzima por diálise ou por cromatografia com coluna de dessalinização.

A proteína produzida pelo protocolo inicial sem adição de ligantes apresentou-se em estado monodisperso somente até duas horas após o início do experimento. Após esse período, foi observado um aumento no raio hidrodinâmico das partículas, indicando agregação proteica (Figura 23). Além disso, foi observada visualmente precipitação proteica na amostra.

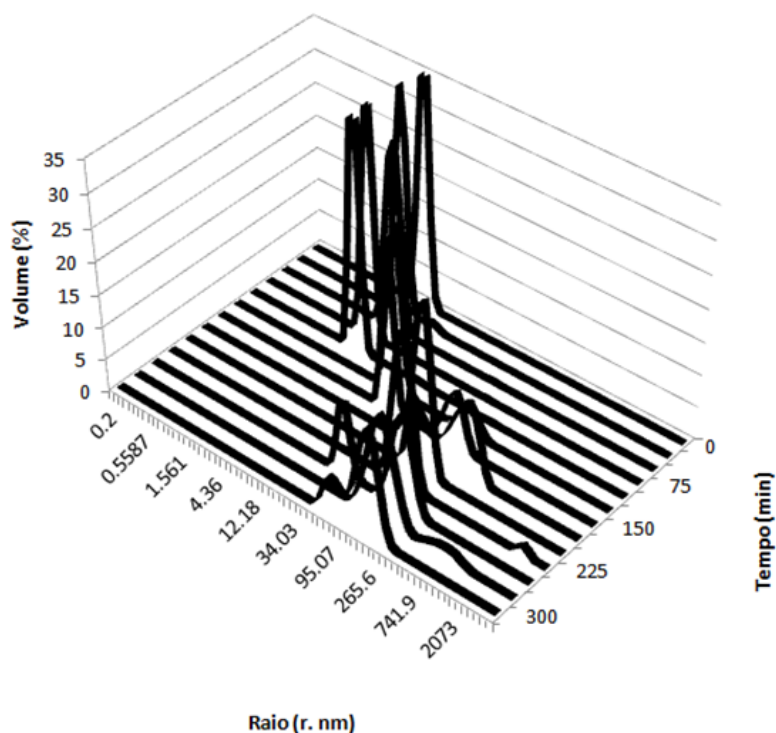


Figura 23 - Distribuição de tamanho por massa em função do tempo para a proteína 6xHis-NahB produzida pelo protocolo inicial sem ligantes.

Com a adição de um ligante, catecol ou carbenoxolona, a enzima permaneceu no estado monodisperso durante todo o período do experimento (5 horas). Os resultados são similares para ambos os ligantes, logo foram mostrados somente para um deles (Figura 24). Além disso, não ocorreu precipitação na amostra. Análise feita pelo programa Malvern Zetasizer v. 6.01 indicou que 99,9% da massa da amostra era formada por moléculas com raio hidrodinâmico médio de  $4,8 \pm 0,8$  nm, massa molecular média de  $(1,3 \pm 0,2) \times 10^2$  kDa (tetrâmero) e índice de polidispersividade de 17,2 %. Valores de polidispersividade inferiores a 20% indicam proteínas favoráveis à cristalização. O estado tetramérico da 6xHis NahB foi confirmado, corroborando os dados de cromatografia de exclusão molecular (item 5.1.4, Figura 21) e dados da literatura (Patel & Gibson, 1974).

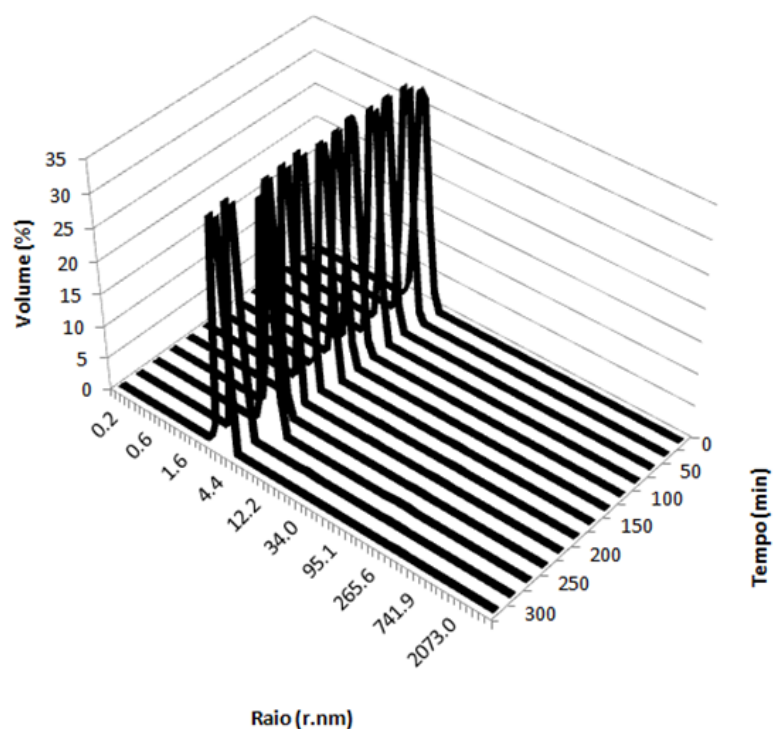


Figura 24 - Distribuição de tamanho por massa em função do tempo para a proteína 6xHis-NahB produzida pelo protocolo inicial na presença de catecol.

Apesar do aumento da estabilidade da proteína com a adição de ligante, não houve formação de cristais. Dessa forma, diferentes protocolos de lise e purificação foram utilizados. Análise da amostra obtida pelo protocolo otimizado na presença de catecol ou carbenoxolona indicou que a proteína ficou monodispersa por todo o período do ensaio (5 horas). Os gráficos

obtidos foram similares ao da Figura 24. Análise feita pelo programa Malvern Zetasizer v. 6.01 indicou que 100% da massa era formada por moléculas com raio médio de  $4,9 \pm 0,5$  nm, massa molecular média de  $(1,4 \pm 0,1) \times 10^2$  kDa (tetrâmero) e índice de polidispersividade de 10,1%. O mesmo foi observado para a amostra proteica obtida pelo protocolo otimizado na ausência de ligantes. Portanto, a alteração dos protocolos de lise e purificação contribuiu para o aumento da estabilidade proteica e para a obtenção de cristais.

### **5.1.6 Caracterização da estrutura secundária**

As estruturas secundárias da proteína 6xHis-NahB obtida pelo protocolo inicial de produção da enzima, na ausência e na presença de catecol, foram caracterizadas através de Dicroísmo Circular. O espectro desnaturante, em que aumentou-se a temperatura de 20 até 80°C, está representado na Figura 25 para a proteína 6xHis-NahB sem catecol. A amostra analisada foi proveniente da exclusão molecular, a qual foi diluída em H<sub>2</sub>O para uma concentração final de 0,15 mg/ml de proteína em 5 mM Tris-HCl pH 7,4, 5 mM NaCl. O gráfico foi plotado com a elipicidade molar ( $\text{mdeg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ ) em função do comprimento de onda (nm). Não é possível verificar a presença de elementos característicos de  $\alpha$ -hélice, como pico próximo do comprimento de onda de 192 nm e vales próximos de 208 nm e 222 nm. Além disso, o aumento da temperatura não promoveu diferença significativa no espectro, indicando que a proteína já estava significativamente desenovelada antes do aumento da temperatura.

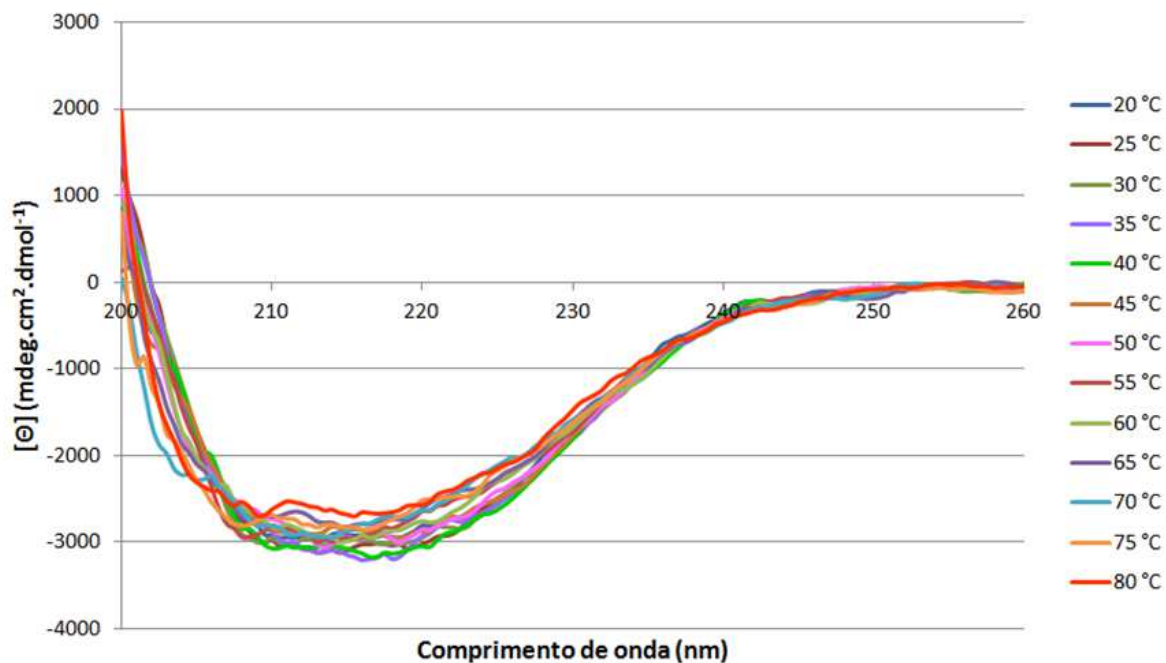


Figura 25 - Análise da proteína 6xHis-NahB por dicroísmo circular em diferentes temperaturas. A proteína foi obtida pelo protocolo inicial na ausência de catecol.

Após a adição do catecol, ainda com o protocolo inicial, o espectro obtido no CD ficou mais característico de uma proteína com estrutura secundária definida, como pode ser observado na Figura 26. A amostra analisada foi proveniente da exclusão molecular, a qual foi diluída em H<sub>2</sub>O para uma concentração final de 0,25 mg/mL de proteína em 5 mM Tris-HCl pH 7,4, 5 mM NaCl.

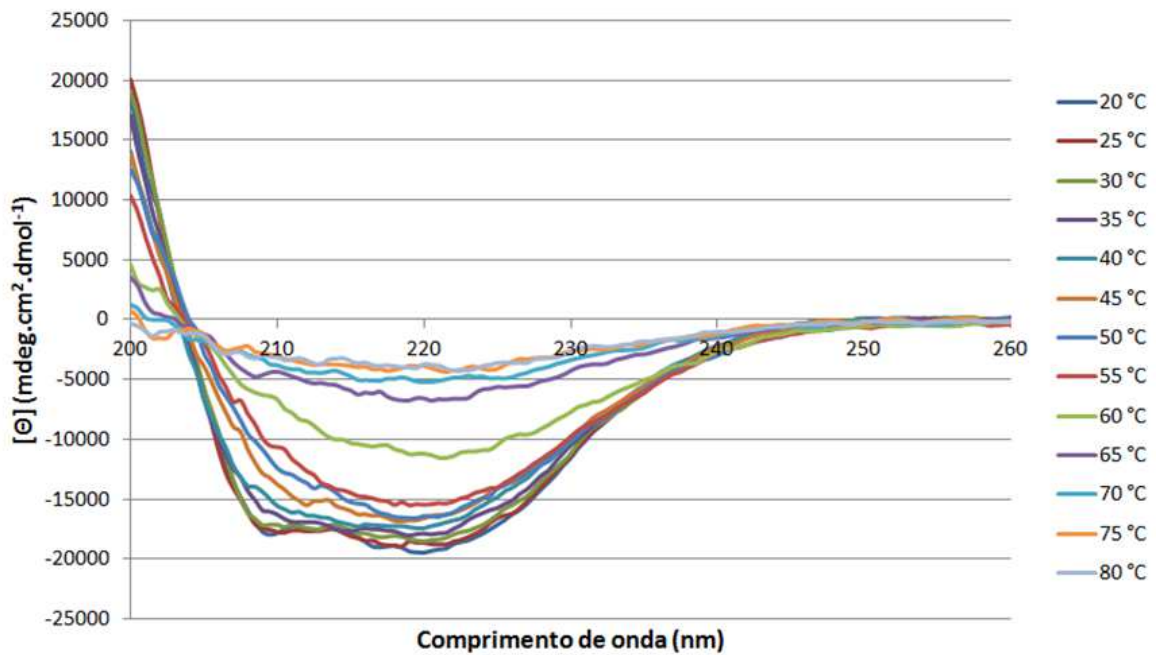


Figura 26 - Análise da proteína 6xHis-NahB por dicroísmo circular em diferentes temperaturas. A proteína foi obtida pelo protocolo inicial na presença de catecol.

Pelo espectro desnaturante da Figura 26, verificou-se dois vales próximos de 208 nm e 222 nm, os quais são característicos de  $\alpha$ -hélice.

Pela deconvolução dos dados, pode-se considerar que a proteína 6xHis-NahB na presença de catecol apresenta cerca de 60% de  $\alpha$ -hélice, 10% de folha  $\beta$ , 10% de volta  $\beta$  e 20% de estrutura desordenada (Figura 27). Dessa forma, verifica-se que adição do catecol foi essencial para a proteína 6xHis-NahB manter sua estrutura.

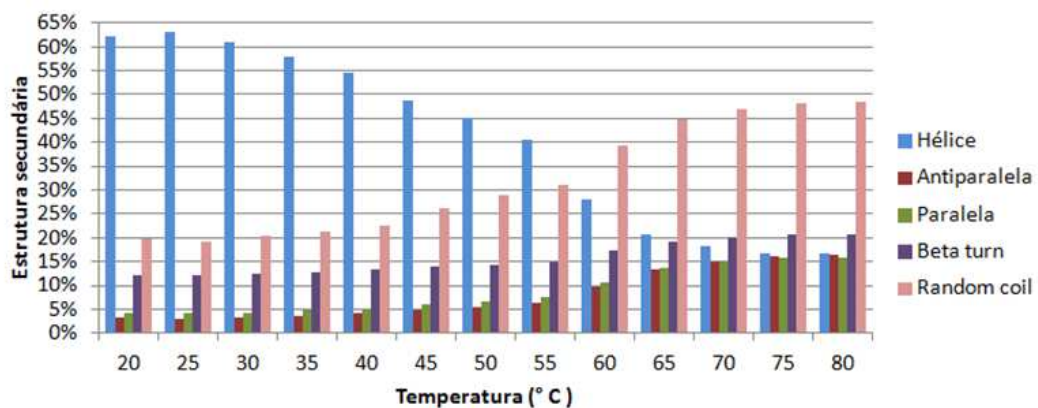


Figura 27 - Deconvolução dos dados do espectro da Figura 26 feito pelo programa CDNN2.1 para a proteína 6xHis-NahB obtida pelo protocolo inicial na presença de catecol.

Na Figura 28, pode-se comparar os espectros obtidos utilizando-se o protocolo inicial na presença e ausência de ligante.

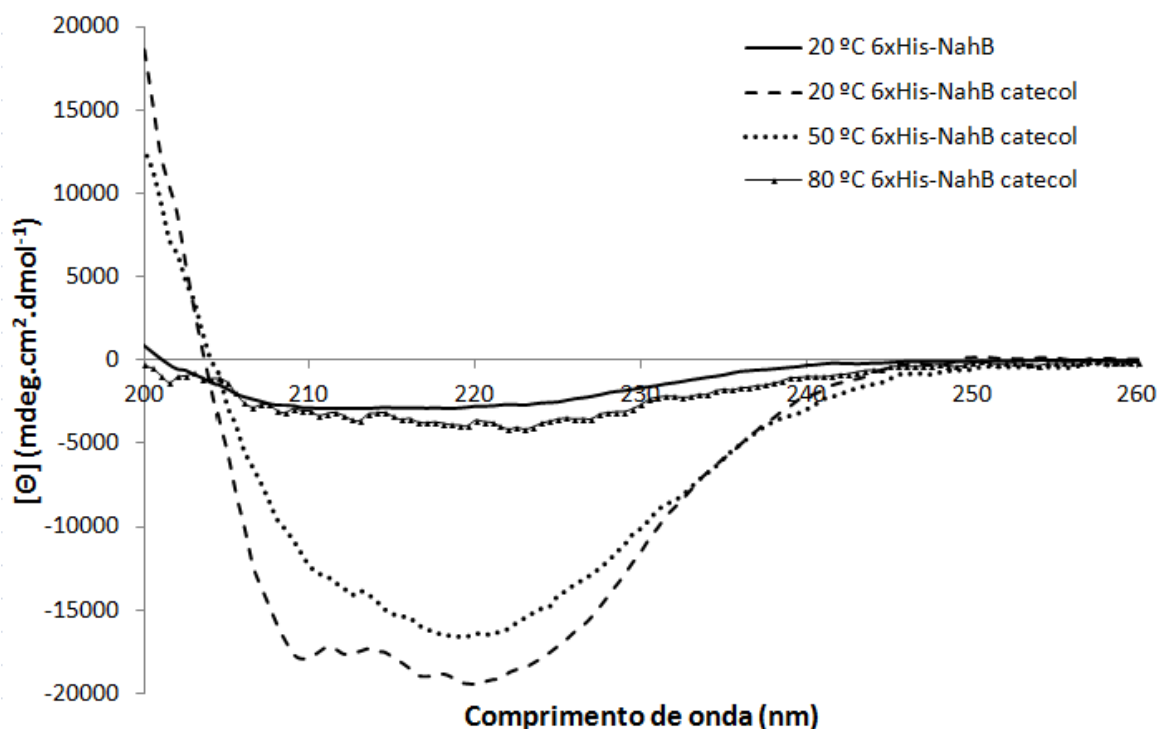


Figura 28 - Análise da proteína 6xHis-NahB por dicroísmo circular em diferentes temperaturas. A proteína foi obtida pelo protocolo inicial na ausência e presença de catecol.

### 5.1.7 Ensaios de cristalização

Os ensaios de cristalização manuais utilizando os kits *Crystal Screen* e *Crystal Screen 2* com a proteína 6xHis-NahB obtida pelo protocolo inicial, o qual continha uso de sonicador, diálise e PEG 10.000 para concentração da proteína, na presença ou ausência de catecol não levaram à formação de cristais de proteína. Alguns cristais obtidos foram difratados, entretanto eram saís utilizados nas condições de cristalização.

Nos ensaios de cristalização utilizando o robô do ROBOLAB (Laboratório Automatizado de Cristalização de Macromoléculas, CNPEM, Campinas, SP) com amostra da proteína obtida a partir do protocolo otimizado, no qual utilizou-se homogeneizador, coluna de dessalinização e Vivaspin, e na presença de catecol ou de carbenoxolona, foram obtidos

cristais da 6xHis-NaB em 14 condições das 480 testadas. Alguns desses cristais são mostrados na Figura 29. Os ensaios foram feitos com a proteína 6xHis-NahB na presença de catecol nas concentrações de 10, 20 e 30 mg/mL e na presença de carbenoxolona, nas concentrações de 10, 20 e 24 mg/mL. O catecol foi adicionado ao sobrenadante proveniente da centrifugação do lisado celular, na proporção de 60:1 em molaridade, de catecol para a enzima. A carbenoxolona foi adicionada na cultura celular durante a expressão para uma concentração final de 100  $\mu$ M ao mesmo tempo em que o IPTG. Os cristais foram obtidos nas duas concentrações mais altas, para a proteína com catecol ou carbenoxolona.

Após os ensaios com o robô, foi feito um ensaio manual utilizando placas de 24 poços com algumas das condições em que se obtiveram cristais no ROBOLAB. Os melhores cristais foram obtidos nas condições 14 do kit *Crystal Screen* (0.2 M cloreto de cálcio dihidratado, 0.1 M HEPES sódio pH 7.5, 28% v/v polietilenoglicol 400) e na condição 41 do kit *Crystal Screen* (0.1 M HEPES sódio pH 7.5, 10% v/v isopropanol, 20% p/v polietilenoglicol 4.000). Esses cristais obtidos manualmente, mostrados na Figura 29, foram submetidos à difração de raios-X.

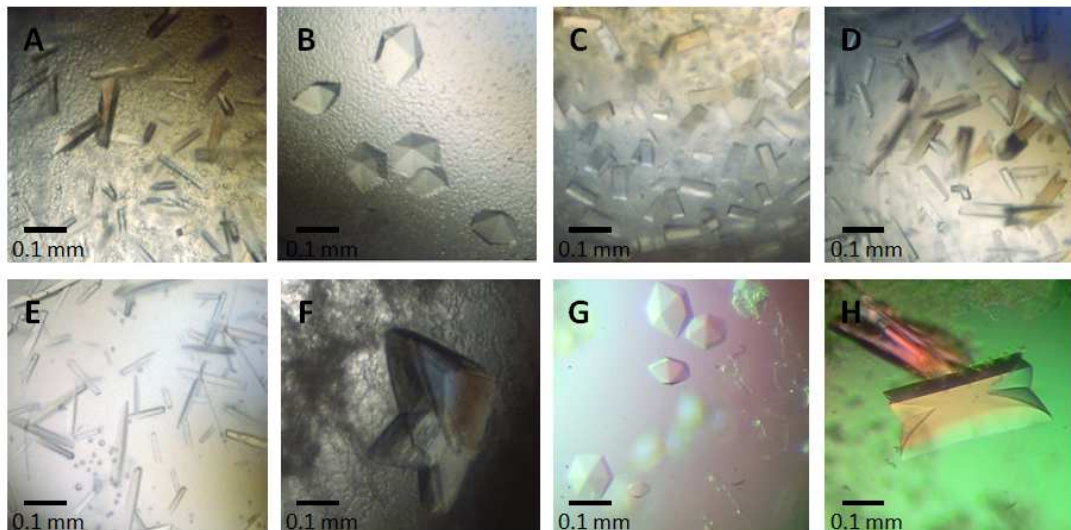


Figura 29 - Cristais da 6xHis-NahB obtidos nos ensaios iniciais utilizando robô de cristalização (A - F) e manuais (G e H). Condição A: 0,2 M tartarato de sódio/potássio, 20% (p/v) PEG 3350; Condição B: 0,2 M acetato de sódio, 0,1 M bis tris propano pH 8,5, 20% (p/v) PEG 3350; Condição C: 0,18 M citrato tri-amônio, 20% (p/v) PEG 3350; Condição D: 0,24 M malonato di-sódico pH 7,00, 20% (p/v) PEG 3350; Condição E: 0,15 M DL-malonato di-sódico pH 7,00, 20% (p/v) PEG 3350; Condição F: 2,0 M sulfato de lítio, 8% 2-metil-2,4-pentanediol, 0,10 M imidazol pH 6,50; Condição G: 0,1 M HEPES sódio pH 7,5, 10% v/v isopropanol, 20% p/v polietilenoglicol 4.000; Condição H: 0,2 M cloreto de cálcio dihidratado, 0,1 M HEPES sódio pH 7,5, 28% v/v polietilenoglicol 400.

A partir das 14 condições que geraram cristais no ROBOLAB foi feito um refinamento, variando-se, em pequena escala, o pH, a concentração do precipitante e a concentração do sal. Foram definidas 168 novas soluções (ANEXO III - Tabela 26), as quais foram preparadas no ROBOLAB. Placas com 24 poços para cristalização foram preparadas manualmente no LNLS. O refinamento utilizando-se das 168 soluções foi feito com a proteína nas concentrações de 10, 20 e 30 mg/mL, na presença de catecol ou carbenoxolona. Para cada concentração da enzima foram feitas preparações com e sem a coenzima, NAD<sup>+</sup>. Esta foi adicionada 24 horas antes de preparar as placas na proporção de 5:1 em molaridade de coenzima para enzima. Os melhores cristais foram submetidos aos experimentos de difração de raios-X.

A partir do refinamento em que foram preparadas as 168 soluções, observou-se que os melhores cristais foram aqueles que cresceram nas condições amplificadas da solução 14 do kit *Crystal Screen*, as quais constituem 24 soluções (ANEXO III), com pequenas diferenças na concentração do precipitante, na concentração do sal e no pH do tampão. Alguns dos cristais que cresceram nessas condições estão na Figura 30. Todos os ensaios seguintes foram feitos com essas 24 soluções preparadas pelo robô de cristalização do LNLS e as placas com 24 poços preparadas manualmente no LNLS ou no Laboratório de Biologia Estrutural do ICB/UFMG.

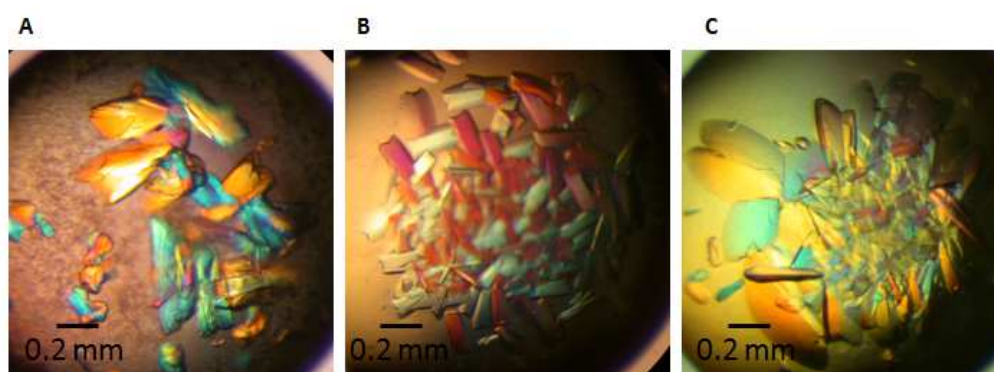


Figura 30 - Cristais da 6xHis-NahB com carbenoxolona ou catecol obtidos no refinamento. Condição A: 0.1 M HEPES sódio pH 7.5, 24% v/v Polietilenoglicol 400, 0.2 M cloreto de cálcio dihidratado; Condição B: 0.1 M HEPES sódio pH 7.2, 26% v/v Polietilenoglicol 400, 0.2 M cloreto de cálcio dihidratado; Condição C: 0.1 M HEPES sódio pH 7.5, 28% v/v Polietilenoglicol 400, 0.3 M cloreto de cálcio dihidratado.

Os ensaios de cristalização que foram realizados após a determinação das melhores condições para o crescimento de cristais da 6xHis-NahB tinham o objetivo de obter um conjunto de dados com resolução maior e obter a enzima ligada com  $\text{NAD}^+$  e com compostos similares ao seu substrato ou ao seu produto. Um dos conjuntos de dados com a mais alta resolução foi obtido a partir da difração do cristal mostrado na Figura 31.

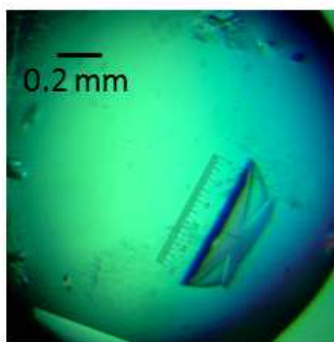


Figura 31 – Cristal da 6xHis-NahB com o qual foi feito *soaking* em solução crioprotetora com  $\text{NAD}^+$  10 mM por 1 min. Condição: 0.1 M HEPES sódio pH 7.8, 26% v/v Polietilenoglicol 400, 0.2 M cloreto de cálcio dihidratado.

Na tentativa de se obter um cristal da 6xHis-NahB complexada com  $\text{NAD}^+$ , a coenzima foi adicionada no momento de preparar a placa de 24 poços, ou 24 horas antes do preparo ou antes da purificação por exclusão molecular. Para o preparo das placas, o  $\text{NAD}^+$  foi adicionado na proporção de 5:1 em molaridade deste para enzima e na cromatografia a proporção foi de 1,5:1,0 em molaridade de coenzima para proteína. Também, foi feito *soaking* em uma solução crioprotetora com 10 mM  $\text{NAD}^+$  por 1 a 30 min.

Além disso, foram realizados testes de cocrystalização e de *soaking* com compostos análogos ao substrato natural da enzima e com seu produto: 2,3-dihidroxi-naftaleno; 1,2-dihidro-2-ácido carboxílico naftaleno; 2,3-dihidroxi-bifenil e 1,2-dihidroxi-naftaleno (produto da NahB). Estes foram utilizados em diferentes concentrações entre 5 mM e 20 mM para cocrystalização ou *soaking*. Essas são as concentrações finais dos compostos na gota de cristalização ou na gota crioprotetora em que o cristal foi imerso. Tanto na cocrystalização como no *soaking*, foram utilizados somente os compostos citados acima ou esses compostos associados com  $\text{NAD}^+$ .

Em todas as tentativas de cocristalização ou *soaking* com os diversos compostos utilizados foram obtidos cristais e os melhores foram utilizados em experimentos de difração de raios-X.

### 5.1.8 Coleta, análise de dados de difração e resolução da estrutura

Os cristais da proteína 6xHis-NahB obtidos nos ensaios de cristalização foram submetidos à difração de raios-X nas linhas D03B-MX1 e W01B-MX2 do LNLS para coleta dos dados e determinação da estrutura tridimensional.

Os cristais obtidos nos primeiros testes manuais feitos com algumas das condições em que se obtiveram cristais no ROBOLAB foram difratados na linha D03B-MX1. Os cristais obtidos na condição 41 do kit *Crystal Screen* (painel G, Figura 29) com carbenoxolona ou catecol não difrataram. Já os cristais obtidos na condição 14 do kit *Crystal Screen* na presença de carbenoxolona ou catecol difrataram até 2,21 Å. Em Cristalografia, o termo “resolução” pode ser definido objetivamente em termos da mais alta frequência espacial incluída no cálculo da série de Fourier que representa a densidade eletrônica e que equivale ao fator de estrutura ou à intensidade que tem os maiores índices (hkl). A resolução dos dados é dada pela distância mínima (em Å) correspondente ao conjunto (hkl) máximo. Não é possível calcular a partir de qual (hkl) se deve desprezar as reflexões, este ponto é determinado com base em critérios estatísticos. Entre os conjuntos de dados coletados, o melhor foi aquele obtido do cristal presente no painel H, Figura 29, o qual foi produzido na presença de carbenoxolona e difratou até 2,21 Å de resolução. Os dados estatísticos da difração estão presentes na Tabela 14.

O cálculo do coeficiente de Matthews para a proteína 6xHis-NahB sugere a presença de uma molécula de proteína na unidade assimétrica ( $V_m = 2.20 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ ) com 44,2% do conteúdo de solvente. A Substituição Molecular foi feita utilizando-se o programa AutoMR presente no pacote *PHENIX* usando a estrutura da BphB<sub>B-356</sub> (PDB ID 2Y93) como modelo de fase. Foi obtida uma única solução, cuja medida da função de translação (*Translational Function Z* – TFZ) foi 17,3. O TFZ indica a relação sinal-ruído da solução obtida, cujos valores são acima de oito quando soluções são encontradas. O valor de *log-likelihood gain* (LLG), que indica o quão melhor é a solução encontrada comparada a um modelo aleatório de átomos, foi de 240. O valor de LLG para soluções bem sucedidas é

positivo e deve ser o mais alto possível. O modelo foi construído automaticamente utilizando-se esta solução e a sequência correta da proteína recombinante 6xHis-NahB com o programa AutoBuild do *PHENIX*. Após a construção do modelo os valores de  $R_{\text{work}}$  e  $R_{\text{free}}$  foram 20,5% e 23,4%, respectivamente, e o coeficiente de correlação foi de 84%. O modelo obtido foi refinado manualmente utilizando o programa Coot e automaticamente com o programa phenix\_refine. No refinamento da estrutura, as posições dos átomos são modificadas para que o modelo atômico inicial se pareça mais e mais com a nova proteína, até que ele reflita o melhor possível os dados experimentais que foram medidos. Após vários ciclos de refinamento os valores finais de  $R_{\text{work}}$  e  $R_{\text{free}}$  foram 18,7% e 22,9%. Os valores do refinamento estão presentes na Tabela 14.

Tabela 14 - Estatísticas dos dados de difração e de refinamento dos cristais de 6xHis-NahB obtido nos ensaios iniciais. Os valores estatísticos para as faixas de mais baixa e mais alta resolução estão entre parênteses.

<b>6xHis-NahB a 2,21 Å</b>	
<b>Comprimento de onda (Å)</b>	1,608
<b>Temperatura (K)</b>	100
<b>Distância cristal-detector (mm)</b>	90
<b>Rotação por imagem (°)</b>	1,0
<b>Rotação Total (°)</b>	200
<b>Grupo espacial</b>	I222
<b>Parâmetros da célula unitária (Å)</b>	a = 63,7; b = 69,5; c = 117,5
<b>Faixa de resolução (Å)</b>	50,00 – 2,21 (50,00 – 4,76/2,29 – 2,21)
<b>No. de observações</b>	101.800 (10.352/6.907)
<b>No. de reflexões únicas</b>	13.162 (1.399/1.114)
<b>Completeza dos dados (%)</b>	98.3 (97,4/85.2)
<b><math>\langle I/\sigma(I) \rangle</math></b>	19,1 (34,0/3,3)
<b>Multiplicidade</b>	7,7 (17,4/6,2)
<b>Rmerge*</b>	0,090 (0.046/0.418)
<b>Mosaicidade média</b>	0,92
<b>R<sub>work</sub><sup>#</sup></b>	18,7
<b>R<sub>free</sub><sup>#</sup></b>	22,9
<b>Gráfico de Ramachandran Favoráveis (%)</b>	95,9
<b>Gráfico de Ramachandran Outliers</b>	1,4

\*  $R_{merge} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$ , onde  $I_i(hkl)$  é a  $i^{th}$  intensidade medida da reflexão  $hkl$  e  $\langle I(hkl) \rangle$  é a sua média. <sup>#</sup>  $R_{work} = \sum_{hkl} |F_{obs}| - |F_{calc}| / \sum_{hkl} |F_{obs}|$ ;  $R_{free}$  é o valor de  $R_{work}$  calculado para 5% do conjunto de dados não inclusos no refinamento.

Após o estabelecimento das melhores condições para a cristalização da 6xHis-NahB, vários ensaios de cristalização e coleta de dados nas linhas D03B-MX1 e W01B-MX2 foram realizados para tentar se obter um conjunto de dados com maior resolução e para obter a proteína complexada com NAD<sup>+</sup> ou análogos do seu substrato ou seu produto. Todos os

conjuntos de dados obtidos foram processados e as estruturas resolvidas por Substituição Molecular. Os dados estatísticos de todos os conjuntos processados estão no Anexo I, Tabela 24.

Um dos conjuntos de dados com a mais alta resolução (1,64 Å) foi proveniente da difração de raios-X de um cristal que se formou na condição 0.1 M HEPES sódio pH 7,8, 26% v/v polietilenoglicol 400, 0,2 M cloreto de cálcio dihidratado e com o qual foi feito *soaking* em solução crioprotetora com NAD<sup>+</sup> 10 mM por 1 min (Figura 31). Os dados estatísticos para este conjunto estão na Tabela 15 e uma imagem de difração na Figura 32. Na Substituição Molecular utilizando a estrutura da BphB<sub>B-356</sub> (PDB ID 2Y93) como modelo de fase foi obtida uma solução com TFZ de 17,2 e LLG de 242. Após a construção do modelo os valores de R<sub>work</sub> e R<sub>free</sub> foram 20,5 % e 22,7 %, respectivamente, e o coeficiente de correlação foi 82%. Após vários ciclos de refinamento os valores finais de R<sub>work</sub> e R<sub>free</sub> foram 17,9% e 22,1%. Os valores do refinamento estão presentes na Tabela 15.

Tabela 15 - Estatísticas dos dados de difração e de refinamento dos cristais de 6xHis-NahB obtido após refinamento. Os valores estatísticos para as faixas de mais baixa e mais alta resolução estão entre parênteses.

<b>6xHis-NahB a 1,64 Å</b>	
<b>Comprimento de onda (Å)</b>	1,459
<b>Temperatura (K)</b>	100
<b>Distância cristal-detector (mm)</b>	85
<b>Rotação por imagem (°)</b>	0,5
<b>Rotação Total (°)</b>	270
<b>Grupo espacial</b>	I222
<b>Parâmetros da célula unitária (Å)</b>	a = 63,0, b = 69,3, c = 117,6
<b>Faixa de resolução (Å)</b>	50,00 – 1,64 (50,00 – 4,04/1,68 – 1,64)
<b>No. de observações</b>	305.079 (22.371/6.881)
<b>No. de reflexões únicas</b>	31.120 (2.215/1.464)
<b>Completeza dos dados (%)</b>	97,2 (97,2/69,9)
<b><math>\langle I/\sigma(I) \rangle</math></b>	24,2 (27,9/3,0)
<b>Multiplicidade</b>	9,8 (10,1/4,7)
<b>Rmerge*</b>	0,088 (0,066/0,345)
<b>Mosaicidade média</b>	0,93
<b>R<sub>work</sub><sup>#</sup></b>	17,9
<b>R<sub>free</sub><sup>#</sup></b>	22,1
<b>Gráfico de Ramachandran Favoráveis (%)</b>	96,9
<b>Gráfico de Ramachandran Outliers</b>	0,0

\*  $R_{merge} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$ , onde  $I_i(hkl)$  é a  $i^{th}$  intensidade medida da reflexão  $hkl$  e  $\langle I(hkl) \rangle$  é a sua média. <sup>#</sup>  $R_{work} = \sum_{hkl} |F_{obs} - F_{calc}| / \sum_{hkl} |F_{obs}|$ ;  $R_{free}$  é o valor de  $R_{work}$  calculado para 5% do conjunto de dados não incluídos no refinamento.

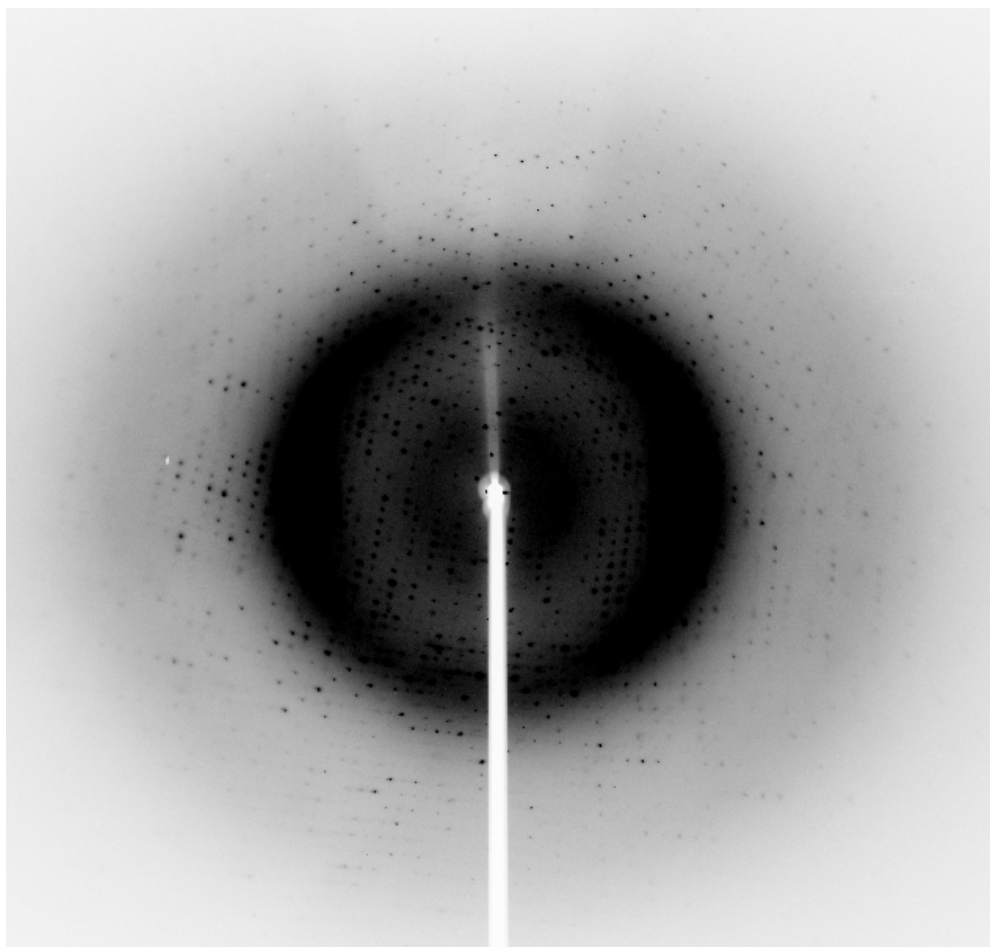


Figura 32 - Imagem de difração de um cristal da proteína 6xHis-NahB. Os dados de difração foram coletados a 1,64 Å.

Após a obtenção e refinamento da estrutura a 1,64 Å, esta foi utilizada como modelo de fase para a Substituição Molecular dos outros conjuntos. Para alguns conjuntos de dados, como para os citados na Tabela 14 e na Tabela 15 e para outro obtido até 1,59 Å de resolução foram conduzidos vários ciclos de refinamento, enquanto para outros, foram realizados apenas um.

Os conjuntos de dados obtidos a partir de cocristalização ou *soaking* com NAD<sup>+</sup>, similares do substrato da enzima ou seu produto, não apresentaram densidades eletrônicas que fossem características dessas substâncias. Além disso, não foram observadas densidades eletrônicas características do catecol ou carbenoxolona.

### 5.1.9 Análise da estrutura tridimensional

Na estrutura da 6xHis-NahB a 2,21 Å foram identificados 226 resíduos de aminoácidos, começando no quarto resíduo de aminoácido da sequência nativa da enzima e indo até o 258º. Não foi visualizada densidade eletrônica da cauda de seis histidinas. Além disso, há uma região no meio da estrutura em que não se observa densidade eletrônica – do resíduo de aminoácido 187 ao 215. Dessa forma, não há densidade eletrônica para 33 resíduos de aminoácidos na estrutura.

Na estrutura da 6xHis-NahB a 1,64 Å foram identificados 231 resíduos de aminoácidos. Esta começa no terceiro resíduo de aminoácido da sequência nativa da enzima e vai até o 259º. Também, não estava presente a densidade eletrônica da cauda de seis histidinas e nem na região entre os resíduos de aminoácidos 187 a 214. Logo, não foram identificados 28 resíduos de aminoácidos na estrutura. Foi identificada densidade eletrônica correspondente a um átomo de cálcio, um polietilenoglicol e seis etilenoglicóis. Foi feito *soaking* com o cristal em solução com NAD<sup>+</sup> 10 mM por 1 min, entretanto não foi visualizada densidade eletrônica correspondente à coenzima. A análise da estrutura será apresentada com base na estrutura obtida a 1,64 Å.

A enzima 6xHis-NahB apresentou características mais conservadas entre as enzimas da família SDRs (*short-chain dehydrogenases/reductases*): entre elas o enovelamento formado por uma folha-β central flanqueada por 2 a 3 α-hélices de cada lado, o qual é conhecido como o clássico motivo de Rossmann de ligação de nucleotídeo. A 6xHis-NahB é formada por uma folha beta central constituída por sete fitas-β e por nove α-hélices, sendo que são 3 hélices de cada lado flanqueando a folha beta (Figura 33). O motivo Rossmann de ligação de nucleotídeos, de acordo com análise feita no servidor Superfamily 1.75<sup>19</sup>, o qual faz a classificação da família de acordo com a sequência de resíduos de aminoácidos, é constituído pelos resíduos de aminoácidos numerados de 5 a 256.

---

<sup>19</sup> <http://supfam.org/SUPERFAMILY/>

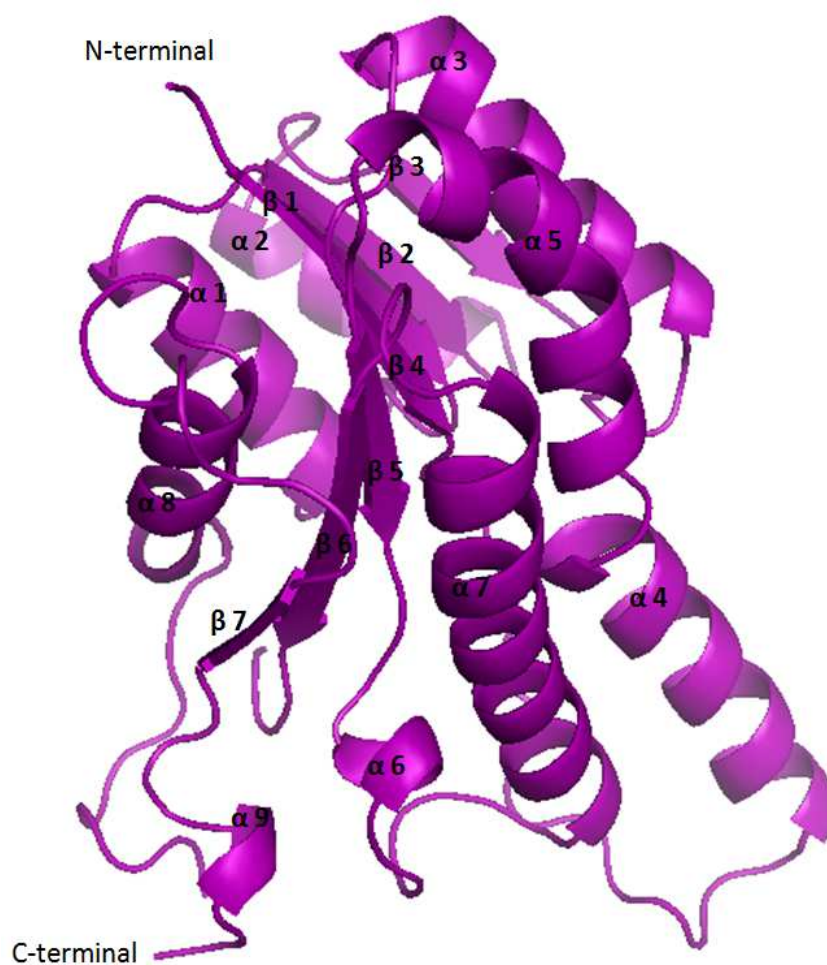


Figura 33 - Estrutura tridimensional da enzima 6xHis-NahB em que se observa o clássico motivo Rossman de ligação de nucleotídeo, caracterizado por uma folha beta central flanqueada por 3 hélices de ambos os lados. As estruturas secundárias e a região N-terminal e C-terminal estão caracterizadas.

Na região entre os resíduos de aminoácidos 186 e 215 verificou-se que não há densidade eletrônica. Dessa forma, para análise e comparação dessa região proteica com outras enzimas da mesma família que possuem a estrutura tridimensional resolvida, foi utilizada a enzima bifênol desidrogenase (BphB<sub>B-356</sub>) de *Pandoraea pnomenusa* (Dhindwal, et al., 2011). Antes da análise das estruturas tridimensionais, foi feito um alinhamento das estruturas primárias para verificação dos resíduos de aminoácidos conservados (Figura 34).

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

6xHis-NahB>          MGHHHHHHENLYFQGHMGNQQVVSITGAGSGIGLELVRSFKLAGYCVSALVRNEEQEALL
BphB>                -----MKLTGEVALITGGASGLGRALVDRFVAEGARVAVLDKSAERLREL
3ZV4: B | PDBID | CHAIN | SEQUENCE  -----MKLTGEVALITGGASGLGRALVDRFVAEGARVAVLDKSAERLREL
                                     . :*. **..**:* ** * * * :*. * . : * : *

6xHis-NahB>          CNEFKDALEIVVGDVRDHATNEKLIKQTIDRFGLDCFIANAGIWDYMLNIE-EPWEKIS
BphB>                EVAHGNAVGVVGDVRSLQDQKRAAERCLAAF GKIDTLIPNAGIWDYSTALADLPEDKID
3ZV4: B | PDBID | CHAIN | SEQUENCE  EVAHGNAVGVVGDVRSLQDQKRAAERCLAAF GKIDTLIPNAGIWDYSTALADLPEDKID
                                     .          *****.   :: : : *:::* * * *****   : * :*.

6xHis-NahB>          SSFDEIFDINVKSYFSGISAALPELKKTNQSVVMTASVSSHAVGGGGSCYIASKHAVLGM
BphB>                AAFDDIFHVNKGYIHAVKACLPAVSSRGSVFTISNAGFYPNGGGPLYTATKHAVVGL
3ZV4: B | PDBID | CHAIN | SEQUENCE  AAFDDIFHVNKGYIHAVKACLPAVSSRGSVFTISNAGFYPNGGGPLYTATKHAVVGL
                                     ::**:* : **.* : . :*.** * . :.***:* * * . . .   *** * * :****:* :

6xHis-NahB>          VKALAYELAPEIRVNAVSPGGTVTSLCGPASAGFDKMHMKDMPGIDDMIKGLTPLGFAAK
BphB>                VRQMAFELAPHVRVNGVAPGGMNTDLRGPSSGLSEQSISSVP-LADMLKSVLPIGRMPA
3ZV4: B | PDBID | CHAIN | SEQUENCE  VRQMAFELAPHVRVNGVAPGGMNTDLRGPSSGLSEQSISSVP-LADMLKSVLPIGRMPA
                                     * : :*.*** . : **.* ** * * * * * * * * * : : : * : * : * : * : *

6xHis-NahB>          PEDVVAPYLLLASRKQGFITGTVISIDGGMALGRK-----
BphB>                LEEYTGAYVFFATRGDSL PATGALLNYDGGMGVRGFLTAAGGADLPEKLNINREGQE
3ZV4: B | PDBID | CHAIN | SEQUENCE  LEEYTGAYVFFATRGDSL PATGALLNYDGGMGVRGFLTAAGGADLPEKLNINREGQE
                                     * : . . * : : * : * : . .   * : : : .   * : : : .
    
```

Figura 34 - Alinhamento feito pelo programa ClustalOmega da NahB de *P. putida* G7 (P23262) com a enzima bifênol desidrogenase (BphB<sub>B-356</sub>) de *Pandoraea pnomenus*. Representação dos aminoácidos conservados: \* resíduos idênticos; : substituições conservadas; . substituições semi-conservadas.

Pela sobreposição da estrutura tridimensional da 6His-NahB com a da BphB<sub>B-356</sub> (PDB 3ZV4) verifica-se que esta também não apresenta densidade eletrônica entre os resíduos de aminoácidos 186 e 215 (Figura 35). Esta região poderia ser formada por um *loop* flexível que se ajustaria para interação com o substrato.

A presença desse *loop* flexível poderia contribuir para explicar a presença de 20% de estrutura desordenada que foi identificada nos experimentos de Dicroísmo Circular para a proteína 6xHis-NahB (item 5.1.6).

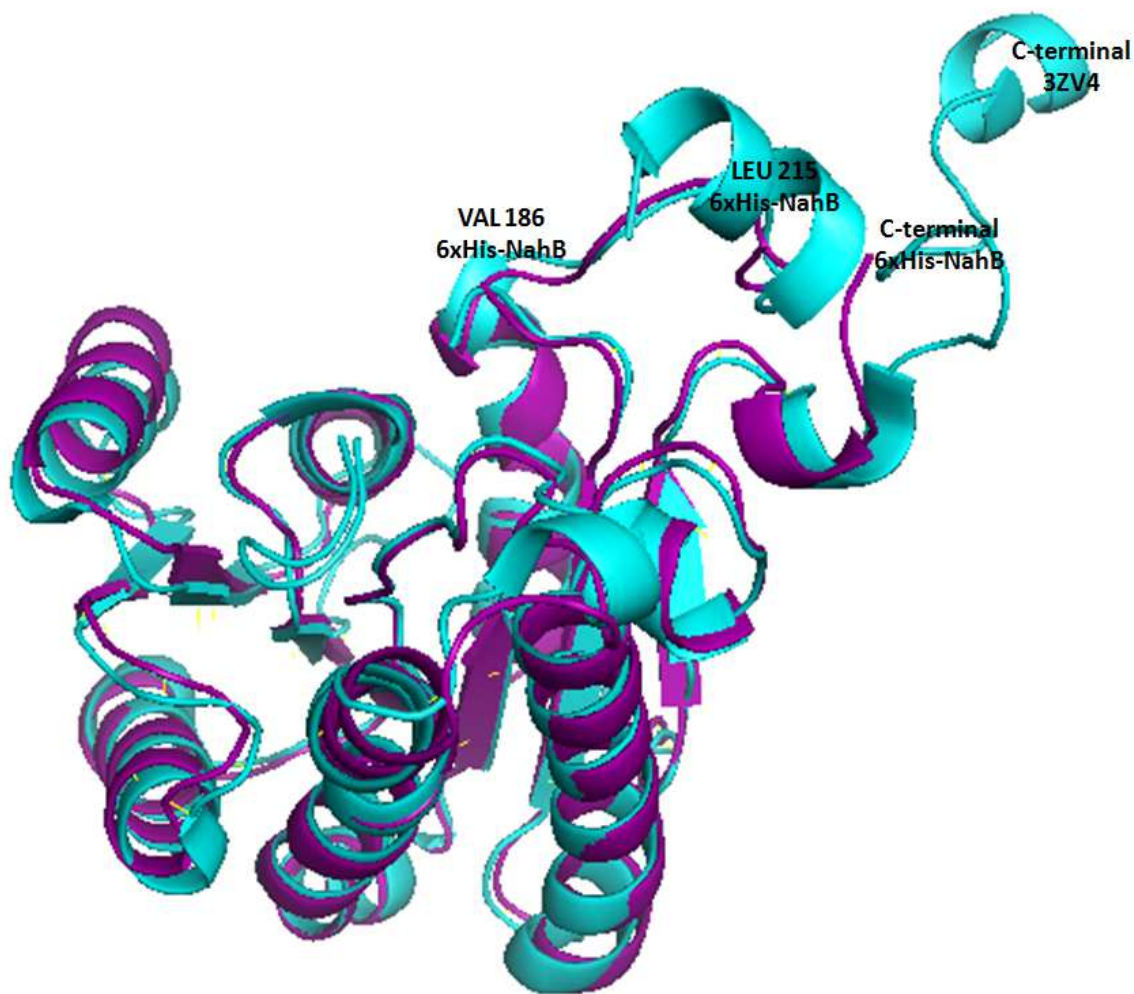


Figura 35 – Estrutura da 6xHis-NahB (roxo) sobreposta à apoenzima da BphB<sub>B-356</sub> (ciano) (PDB 3ZV4). No modelo 3D da 6xHis-NahB não foi observada densidade eletrônica do resíduo de aminoácido Val186 até o Leu215, que estão representados. Na apoenzima da BphB<sub>B-356</sub>, também não foi observada densidade eletrônica na região correspondente.

A enzima BphB<sub>B-356</sub> teve sua estrutura resolvida tanto na forma apo quanto na forma complexada com ligantes. Assim, também foram feitas as sobreposições da estrutura da 6xHis-NahB com as estruturas da BphB<sub>B-356</sub> complexada. Com a sobreposição da 6xHis-NahB com a BphB<sub>B-356</sub> complexada com NAD<sup>+</sup> (PDB 2Y99), observa-se a presença de um *loop* em parte da região em que não se observava densidade eletrônica (Figura 36).

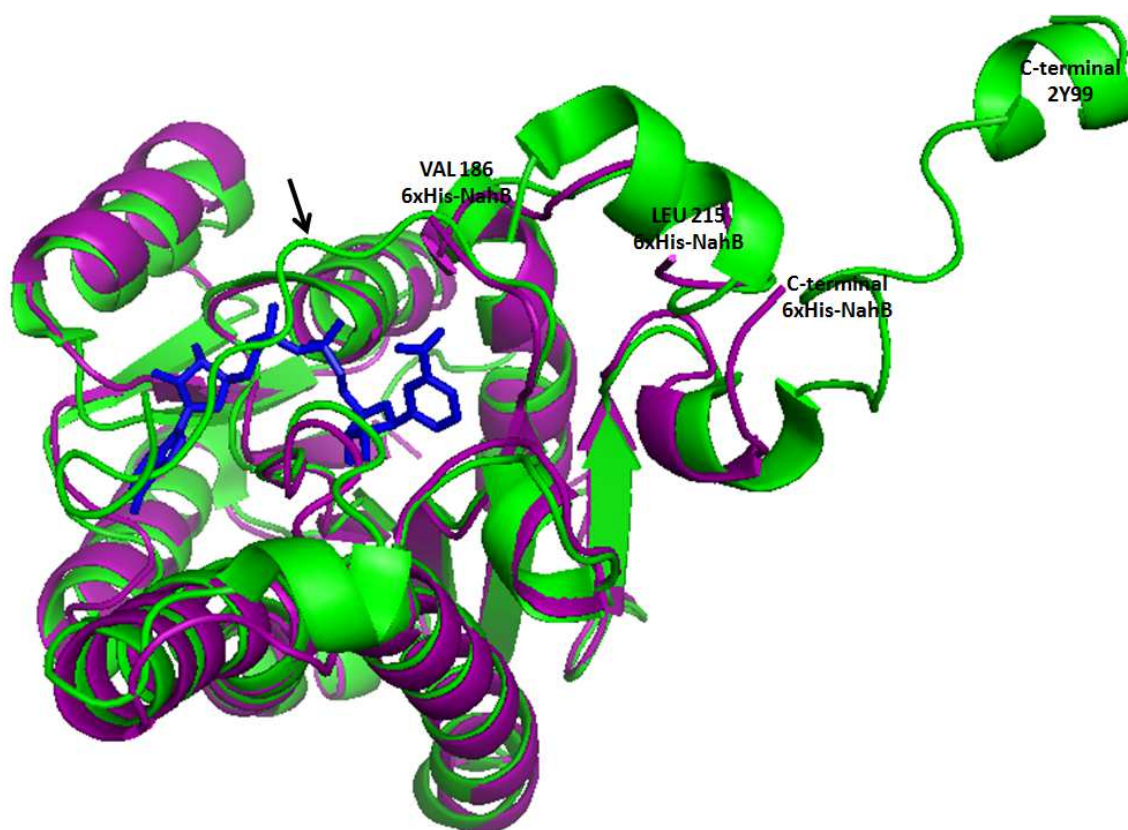


Figura 36 – Estrutura da 6xHis-NahB (roxo) sobresposta à BphB<sub>B-356</sub> complexada com NAD<sup>+</sup> (verde) (PDB 2Y99). No modelo 3D da 6xHis-NahB não foi observada densidade eletrônica do resíduo de aminoácido Val186 até o Leu215, que estão representados. Na BphB<sub>B-356</sub> complexada com NAD<sup>+</sup> foi observada densidade eletrônica na região correspondente. A seta indica parte do loop da BphB<sub>B-356</sub> que se estabilizou devido à interação com o NAD<sup>+</sup>, o qual está representado em azul .

Além disso, quando há a ligação do NAD<sup>+</sup> e do produto da enzima, no caso da BphB<sub>B-356</sub>, o 2,3-dihidroxi-bifenil, observam-se todos os aminoácidos da região que não são vistos na apoenzima (Figura 37).

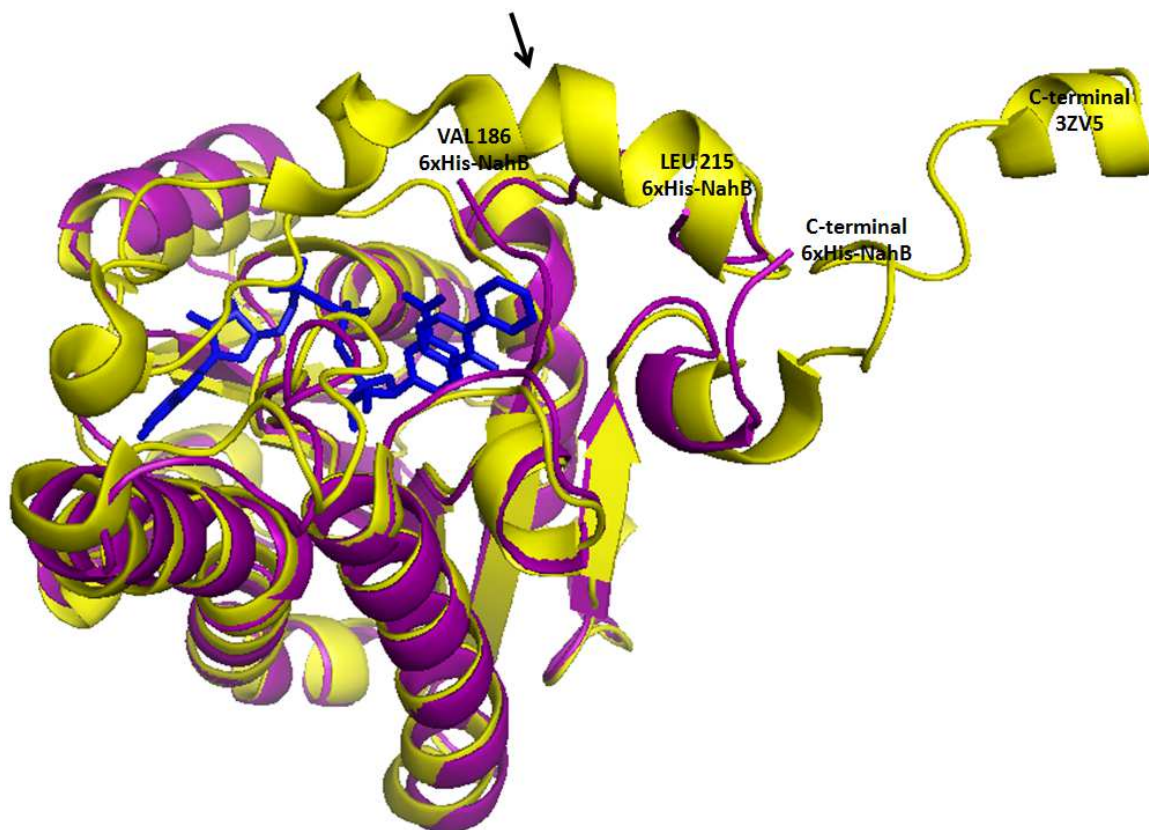


Figura 37 - Estrutura da 6xHis-NahB (roxo) sobreposta à BphB<sub>B-356</sub> (amarelo) complexada com NAD<sup>+</sup> (azul) e 2,3-dihidroxibifenil (azul) (PDB 3ZV5). No modelo 3D da 6xHis-NahB não foi observada densidade eletrônica do resíduo de aminoácido Val186 até o Leu215. O NAD<sup>+</sup> e o produto da enzima BphB<sub>B-356</sub> estão em azul. A seta indica o loop da BphB<sub>B-356</sub> que ficou estável devido à interação com NAD<sup>+</sup> e o 2,3-dihidroxibifenil.

Portanto, a região entre os aminoácidos 186 e 215 da 6xHis-NahB provavelmente corresponde a um *loop* flexível que, se ajustaria para a ligação da coenzima e do substrato. A sobreposição da 6xHis-NahB com as três formas da BphB<sub>B-356</sub> está representada na Figura 38.

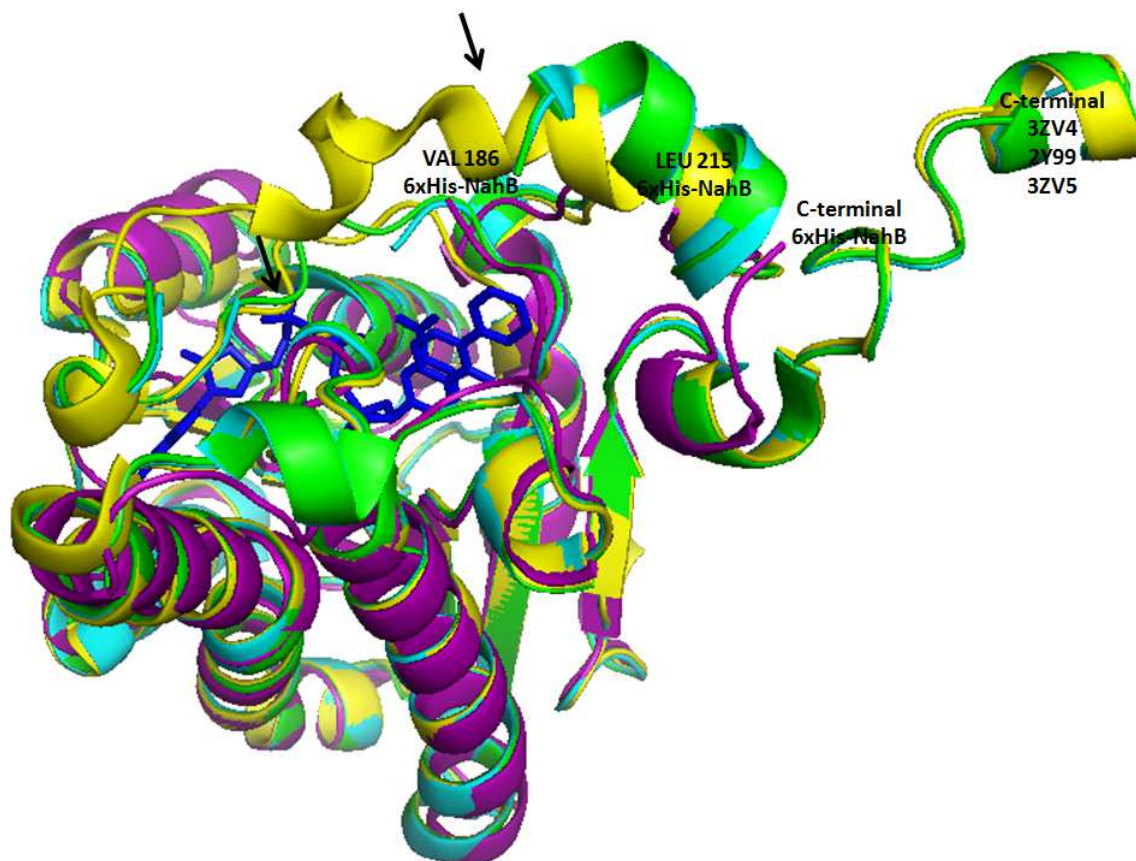


Figura 38 - Estrutura da 6xHis-NahB (roxo) sobrespota à apoenzima da BphB<sub>B-356</sub> (ciano) (PDB 3ZV4); à BphB<sub>B-356</sub> complexada com NAD<sup>+</sup> (azul) (PDB 2Y99) e à BphB<sub>B-356</sub> complexada com NAD<sup>+</sup> e 2,3-dihidroxibifenil (amarelo) (PDB 3ZV5). A seta indica o loop flexível da BphB<sub>B-356</sub>.

Dessa forma, foram feitos vários testes de cocristalização e *soaking* utilizando NAD<sup>+</sup> com substratos análogos, NAD<sup>+</sup> com o produto da enzima, NAD<sup>+</sup> sozinho, substratos análogos sozinhos e produto sozinho, em diferentes concentrações e tempo. Entretanto, em todas as 15 estruturas analisadas não foi verificada densidade eletrônica correspondente ao NAD<sup>+</sup>, nem aos análogos do substrato, nem ao produto e nem ao loop flexível. A busca por essas densidades foi feita inspecionando individualmente cada um dos conjuntos de dados por sobreposição da 6xHis-NahB com a BphB<sub>B-356</sub> complexada. A ausência de densidade eletrônica na região correspondente ao loop flexível ou aos diferentes ligantes utilizados indica que, provavelmente, estes não interagiram com alta afinidade com a enzima e, conseqüentemente o loop permaneceu flexível.

## 5.2 SALICILATO HIDROXILASE

### 5.2.1 Amplificação e clonagem

Os iniciadores para clonagem do gene *nahG* foram construídos conforme sua seqüência nucleotídica depositada no banco de dados de nucleotídeos do NCBI (número de acesso: AB237655) e de acordo com o sítio múltiplo de clonagem do vetor de expressão em procariotos, pET-28a-TEV (Carneiro, et al., 2006). Os fragmentos amplificados do gene *nahG*, que possui 1.305 nucleotídeos, foram analisados em gel de agarose (Figura 39). As bandas obtidas dos amplicons estão próximas da banda padrão de 1.500 pb, portanto dentro do valor esperado.

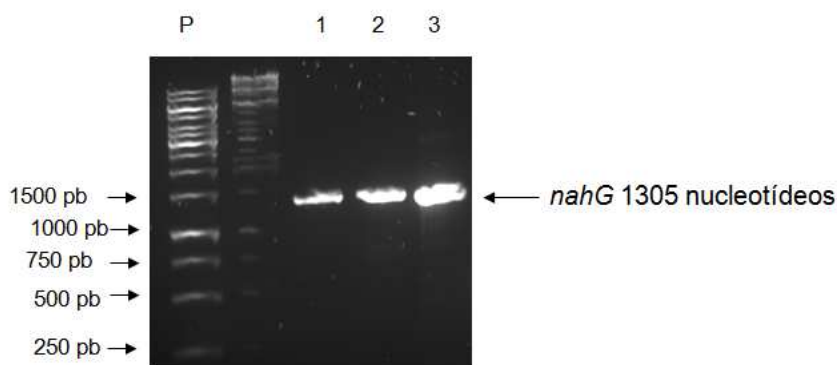


Figura 39 - Amplificação do gene *nahG*. Gel de agarose 1% corado com SYBER® Safe. P - Padrão O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder; 1 a 3 - inserto *nahG* purificado.

A análise em gel de agarose da PCR de colônia de alguns dos clones obtidos na ligação do gene *nahG* com pGEM®-T está na Figura 40. Todos os clones pGEM®-T-*nahG* analisados foram positivos pois houve amplificação de fragmentos próximos a 1.300 pb. Quando digeridos com *NdeI* e *EcoRI*, liberaram inserto de aproximadamente 1.300 pb.

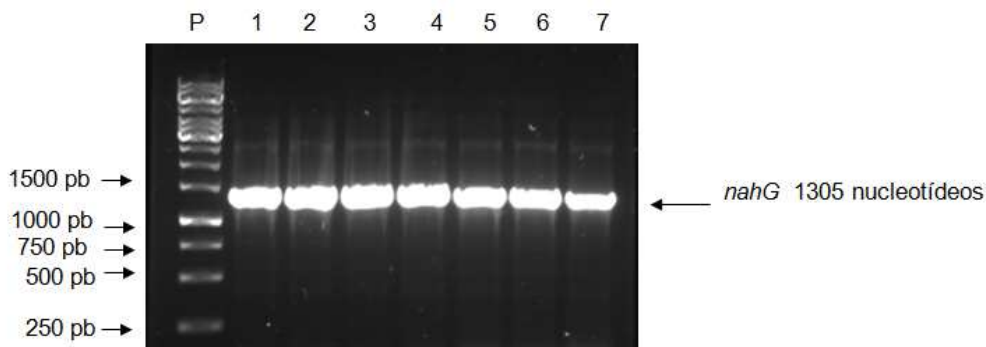


Figura 40 - PCR de colônia pGEM-T-*nahG*. Gel de agarose 1% corado com SYBER® Safe. P- Padrão O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder; 1 a 7- Clones positivos do pGEM-T-*nahG*

### 5.2.2 Subclonagem em vetor de expressão

Uma construção plasmidial do pGEM-T-*nahG*, que foi denominada pGEM-T-*nahG*-A1, foi digerida com as enzimas de restrição *NdeI* e *EcoRI*. O inserto liberado foi subclonado no vetor de expressão pET-28a-TEV. As PCRs de colônia para verificação da subclonagem foram analisadas em gel de agarose. Os vetores recombinantes pET28a-TEV-NahG analisados foram positivos. Para cada clone pode-se visualizar uma única banda de amplificação próxima ao tamanho do gene, 1.305 pb (Figura 41).

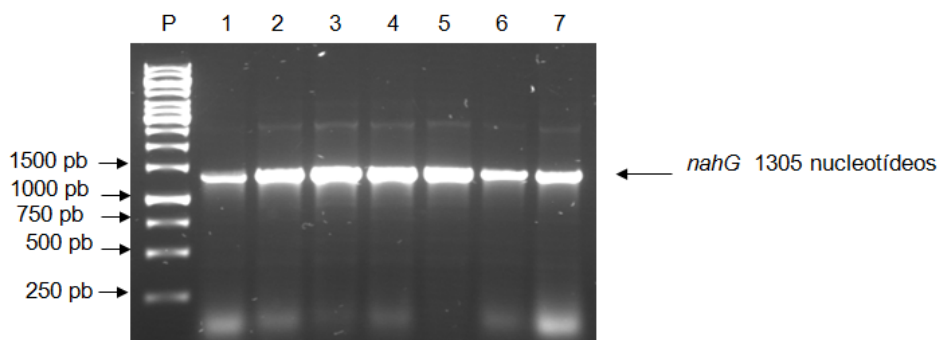


Figura 41 - PCR de colônia pET28a-TEV-NahG. Gel de agarose 1% corado com SYBER® Safe. P- Padrão O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder; 1 a 7- Clones positivos do pET28a-TEV-NahG.

O clone denominado pET28a-TEV-NahG-A1, cujo inserto foi proveniente do pGEM-T-*nahG*-A1, foi sequenciado e apresentou uma mutação confirmada por três sequenciamentos, a qual levou à mudança de aminoácido, aspartato para glicina. Logo, outros clones do pGEM-T-*nahG* foram sequenciados. O clone pGEM-T-*nahG*-A2 apresentou uma

mutação, a qual não causou a mudança de aminoácido. Outro clone, pGEM-T-*nahG*-B2, também foi sequenciado e não apresentou mutação. Dessa forma, o clone pGEM-T-*nahG*-B2 foi utilizado para subclonagem no vetor de expressão. O clone utilizado para expressão da proteína recombinante foi o pET28a-TEV-NahG-A1, cujo inserto foi proveniente do pGEM-T-*nahG*-B2. O vetor de expressão foi sequenciado na região do gene NahG e a sequência deste está correta.

### 5.2.3 Expressão e purificação

A proteína recombinante 6xHis-NahG foi expressa em células de *Escherichia coli* Rosetta™ (DE3) a 18°C por 16 horas com 0,05 mM de IPTG. Como resultados anteriores sugeriam a utilização de um protocolo otimizado para a expressão da enzima 6xHis-NahB, o mesmo foi utilizado para a 6xHis-NahG. Na Figura 42 observa-se o perfil cromatográfico de uma purificação por afinidade com coluna HisTrap™ HP 5 mL, na qual foram aplicados 30 mLs do sobrenadante do lisado celular, provenientes de um litro de cultura.

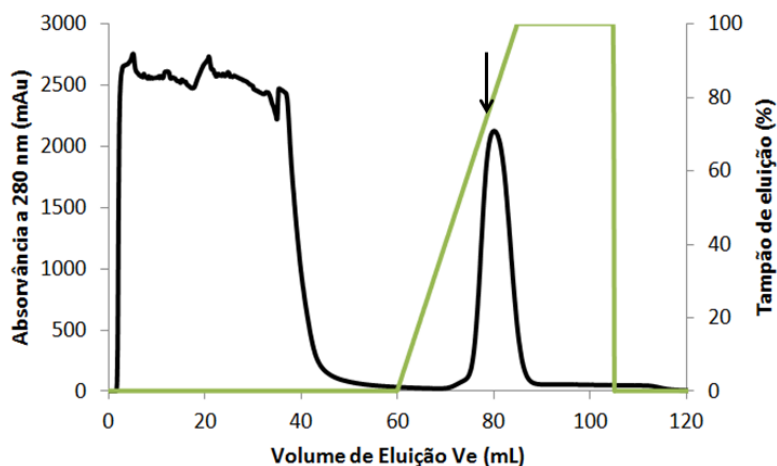


Figura 42 - Perfil cromatográfico de eluição da 6xHis-NahG em coluna de afinidade HisTrap™ HP 5 mL. Foi aplicado fração proveniente de um litro de cultura da proteína. A seta indica o pico correspondente a proteína 6xHis-NahG.

Amostras da proteína purificada foram analisadas por SDS-PAGE. Na Figura 43, a seta indica uma banda próximo a 45 kDa correspondente à 6xHis-NahG, cuja massa

molecular teórica é 46,9 kDa mais 2 kDa adicionados pelo vetor (cauda de seis histidinas e sítio de clivagem da TEV), resultando em uma proteína de 48,9 kDa.

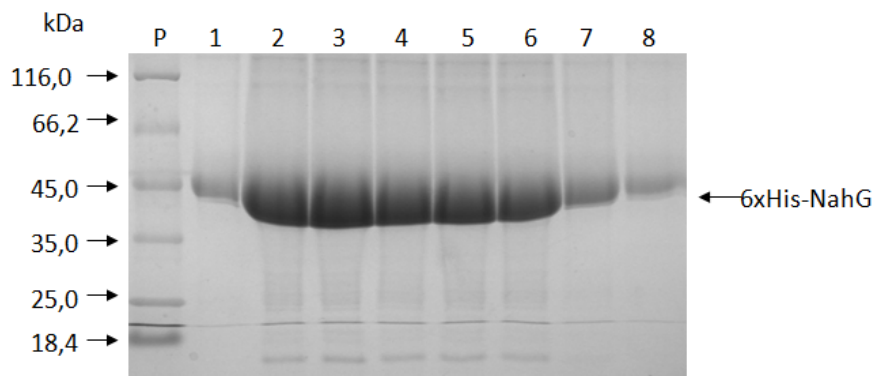


Figura 43 - Análise em gel SDS-PAGE 12% da proteína 6xHis-NahG purificada por cromatografia de afinidade. P – Marcador de peso molecular de proteína Fermentas; 1 a 8 – Frações da purificação por afinidade da 6xHis-NahG.

A partir de um litro de cultura, obteve-se 40 mg de proteína, na concentração aproximada de 3,0 mg/mL. Após a purificação por afinidade, foi feita uma purificação com coluna de dessalinização, HiPrep 26/10 equilibrada com tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 50 mM NaCl. As frações proteicas eluídas da coluna HiPrep 26/10 correspondiam a aproximadamente 15 mL, as quais foram concentradas utilizando-se Vivaspín, antes de serem aplicadas na coluna de exclusão molecular. O perfil cromatográfico obtido na exclusão molecular da proteína 6xHis-NahG está representado na Figura 44 e a análise por SDS-PAGE das frações proteicas na Figura 45. Nesta última, a seta indica uma banda de aproximadamente 45 kDa correspondente à 6xHis-NahG.

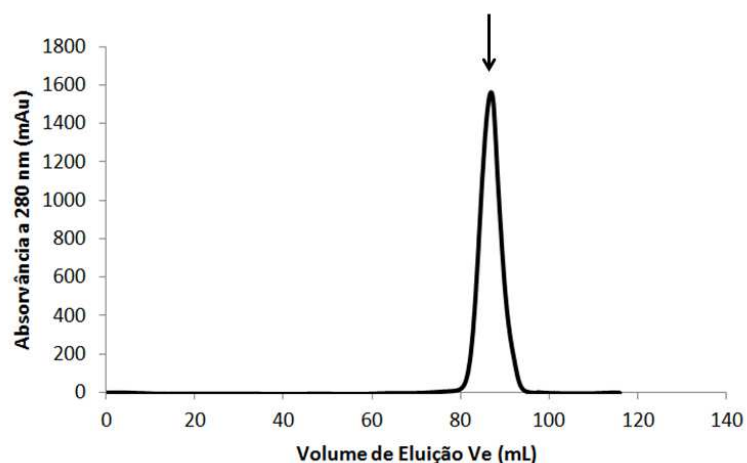


Figura 44 - Perfil cromatográfico de eluição da 6xHis-NahG em coluna de exclusão molecular Hiload™ 16/60 Superdex 200. A seta indica o pico correspondente à proteína 6xHis-NahG.

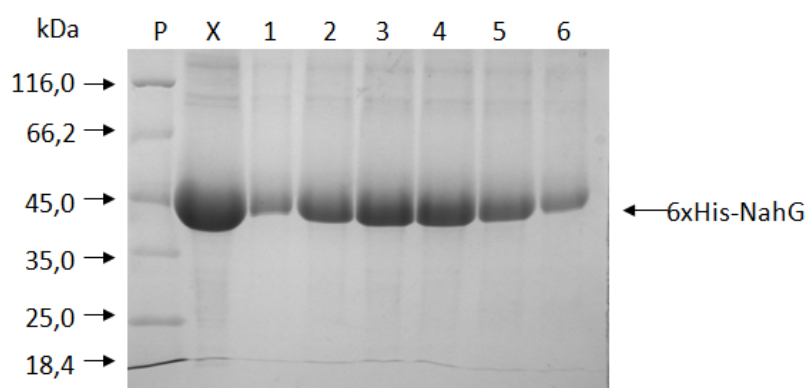


Figura 45 - Análise em gel SDS-PAGE 12% da proteína 6xHis-NahG purificada por cromatografia de exclusão molecular. P – Marcador de peso molecular de proteína Fermentas; X – Amostra proveniente da cromatografia com coluna de dessalinização. 1 a 6 – Diferentes frações obtidas na purificação por exclusão molecular.

Observa-se que o perfil obtido na exclusão molecular para a 6xHis-NahG foi homogêneo. A enzima foi eluída aos 90 mLs de corrida, correspondendo a uma proteína de aproximadamente 49 kDa. Logo, a 6xHis-NahG apresentou-se monomérica em solução. Esse estado monomérico da proteína está de acordo com dados de purificação por exclusão molecular presentes na literatura (You *et al.*, 1990b). Após purificação por exclusão molecular obteve-se 20 mg de proteína na concentração de aproximadamente 3,0 mg/mL.

A proteína 6xHis-NahG foi purificada inicialmente na ausência de ácido salicílico. Não se obteve cristais com a proteína purificada sem ligantes. Logo, o substrato da enzima foi adicionado no tampão de lise, na proporção de aproximadamente 180:1 de substrato para enzima. Após a adição do composto no tampão de lise, o pH foi reajustado para 7,4. Os perfis observados nas cromatografias de afinidade e exclusão molecular foram similares ao da enzima sem ácido salicílico.

A proteína 6xHis-NahG obtida após a cromatografia com coluna de dessalinização foi clivada com a protease TEV. Após a remoção da cauda de histidinas, foi feita outra cromatografia de afinidade para retirar a protease recombinante da solução, a qual apresenta cauda de seis histidinas. Os primeiros protocolos testados para clivagem da cauda de histidinas com a protease TEV não foram eficazes, dessa forma optou-se em realizar os ensaios de cristalização com a NahG com cauda de histidinas. Após a utilização de outros protocolos, nos quais se variou o tempo de incubação, a temperatura de clivagem e a concentração de TEV, conseguiu-se estabelecer um protocolo eficiente para a clivagem da cauda de histidinas da enzima NahG. Como a estrutura da enzima 6xHis-NahG já estava sendo resolvida, a GH-NahG só foi utilizada para testes de cinética.

#### **5.2.4 Caracterização do estado monomérico**

A proteína 6xHis-NahG obtida pelo protocolo otimizado foi caracterizada por ensaios de DLS. A amostra utilizada foi proveniente da purificação por afinidade, a qual foi diluída em H<sub>2</sub>O para uma concentração entre 1,0 e 1,5 mg/mL. Os dados foram representados em um gráfico de distribuição de tamanho por massa (Figura 46).

A análise feita com a ajuda do programa Malvern Zetasizer v. 6.01 indicou que 100,0% da massa da amostra corresponde a uma proteína com raio hidrodinâmico médio de  $3,1 \pm 0,3$  e massa molecular de  $49 \pm 5$  kDa. Portanto, a proteína está no estado monomérico em solução, como verificado na cromatografia de exclusão molecular (item 5.2.1, Figura 44) e na literatura (You, et al., 1990). A polidispersividade da solução proteica foi de 10,3%, o que caracteriza uma amostra monodispersa e adequada para ensaios estruturais.

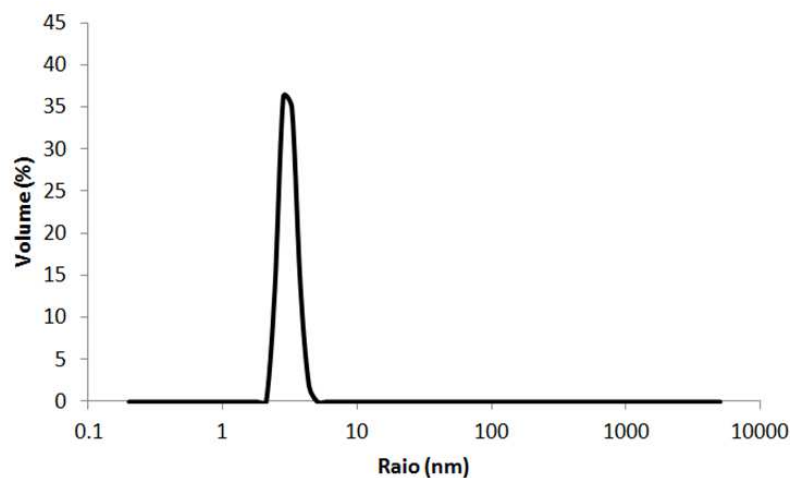


Figura 46 - Distribuição de tamanho por massa para a proteína 6xHis-NahG.

### 5.2.5 Ensaios de cristalização

Nos ensaios de cristalização manuais da proteína 6xHis-NahG, obtida a partir do protocolo otimizado, utilizando os kits *Crystal Screen* e *Crystal Screen 2* com e sem ácido salicílico não foram obtidos cristais. O ácido salicílico foi adicionado no tampão de lise na proporção de aproximadamente 180:1 de substrato para enzima. Foram testadas as concentrações proteicas de 5, 10 e 30 mg/mL.

Nos ensaios realizados no ROBOLAB, foram testadas 480 soluções diferentes com a proteína sem substrato nas concentrações de 10, 20 e 40 mg/mL, mas também, não foram obtidos cristais. Cristais da 6xHis-NahG foram obtidos somente na presença do seu substrato natural, o ácido salicílico, quando as concentrações de 9, 23 e 34 mg/mL de proteína foram utilizadas. Das 480 soluções testadas, obtiveram-se cristais em apenas duas: 1,5 M sulfato de amônio, 0,1 M Tris pH 8,5, 12% v/v Glicerol do kit *Crystal Screen* e 1,8 M fosfato de sódio monobásico monohidratado, fosfato de potássio dibásico pH 6,9 do kit SaltRx (Figura 47). Na primeira condição foram obtidos cristais com a proteína nas concentrações de 23 e 34 mg/mL e na segunda somente com a proteína na concentração de 34 mg/mL.

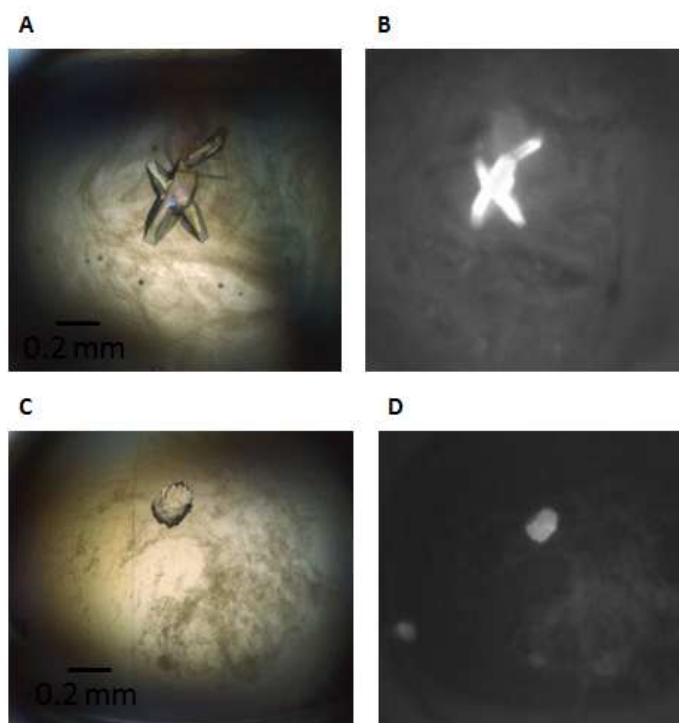


Figura 47 - Cristais da 6x-His NahG na presença de ácido salicílico obtidos no ROBOLAB. A e C: exposição à luz visível; B e D: exposição à luz ultravioleta. Condição A/B: 1,8 M fosfato de sódio monobásico monohidratado, fosfato de potássio dibásico pH 6,9; Condição C/D: 1,5 M sulfato de amônio, 0,1 M Tris pH 8.5, 12% v/v glicerol.

Os cristais obtidos ainda não estavam adequados à difração, pois eram irregulares ou policristais. A partir dessas duas soluções foi feito um refinamento com 72 soluções (ANEXO IV - Tabela 27), as quais foram preparadas no ROBOLAB e as placas com 24 poços feitas manualmente no LNLS. Como os cristais da 6xHis-NahG só foram obtidos após a adição do ácido salicílico durante a lise, os ensaios de refinamento das condições de difração foram feitos somente com a proteína na presença do seu substrato. Foram utilizadas as concentrações de 45 e 90 mg/mL, na presença e ausência do cofator da enzima, NADH. Este foi acrescentado 24 h antes da realização do experimento, a uma proporção de 10:1 em molaridade de NADH para 6xHis-NahG. Obtiveram-se cristais somente na maior concentração da proteína e na presença de NADH. Os melhores cristais foram obtidos das condições amplificadas da condição 1,5 M sulfato de amônio, 0,1 M Tris pH 8.5, 12% v/v glicerol do kit *Crystal Screen*. Alguns dos cristais obtidos estão na Figura 48. Os melhores cristais foram utilizados em experimentos de difração de raios-X. Como não foi possível resolver a estrutura por Substituição Molecular, foi utilizado o Método dos Átomos Pesados.

Para a derivatização foi utilizada a técnica de *soaking* com solução de iodeto de sódio, a qual foi acrescentada na solução crioprotetora para uma concentração final de 1,0 M. O tempo em que o cristal ficou imerso na solução crioprotetora com iodo foi de 30 seg. Foram coletados conjuntos de dados para a proteína nativa e derivada. O conjunto de dados para a proteína derivada apresentou resolução muito baixa, provavelmente devido ao acréscimo da solução de iodeto de sódio a 1,0 M que poderia ter alterado a estrutura do cristal.

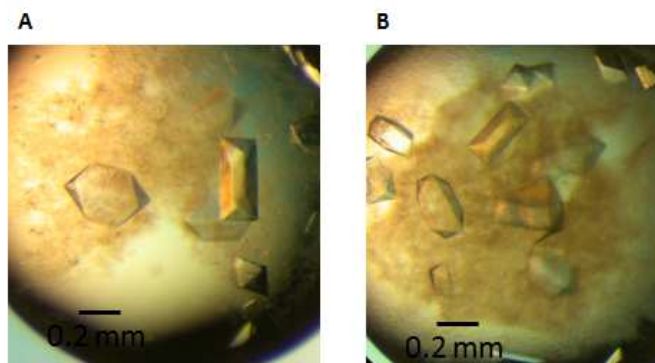


Figura 48 - Cristais da 6x-His NahG na presença de ácido salicílico e NADH obtidos no refinamento. Condição A: 0.1 M Tris pH 9.0, 1.26 M sulfato de amônio, 20% v/v glicerol; Condição B: 0.1 M Tris pH 8,5; 1,26 M sulfato de amônio, 20% v/v glicerol.

Após o estabelecimento das melhores condições para cristalização da 6xHis-NahG, as quais foram 24 soluções (ANEXO IV) derivadas da condição 1,5 M sulfato de amônio, 0,1 M Tris pH 8,5, 12% v/v glicerol, todos os ensaios seguintes foram feitos com essas condições e com a proteína na concentração de 90 mg/mL. O principal objetivo dos ensaios seguintes era o de obter um cristal no qual houvesse a inserção de átomos pesados. Além disso, visava-se o crescimento de cristais da proteína complexada com NADH ou FAD e a obtenção de conjuntos de dados com maior resolução.

Com o objetivo de se obter cristais da proteína com NADH ou FAD, estes foram adicionados na amostra proteica antes da purificação por exclusão molecular, na proporção de 1,5:1,0 em molaridade de coenzima para enzima, e na solução, 24 horas antes ou no momento de preparar as placas, na proporção de 10:1 em molaridade de coenzima para proteína. Para a obtenção do derivado, os cristais foram imersos em solução crioprotetora com solução de iodeto de sódio na concentração final entre 1,0 M a 62,5 mM por 30 seg a 5 min. Os melhores cristais foram submetidos à difração de raios-X.

### 5.2.6 Coleta, análise de dados de difração e resolução da estrutura

Os cristais da proteína 6xHis-NahG obtidos após refinamento foram submetidos à difração de raios-X na linha D03B-MX1 e W01B-MX2 do LNLS para coleta dos dados e determinação da estrutura tridimensional. Todos os cristais submetidos à difração foram obtidos com a proteína na presença de ácido salicílico no tampão de lise.

Os primeiros conjuntos de dados coletados para a 6xHis-NahG foram de cristais nativos. Os dados estatísticos da difração para um desses conjuntos, cujo cristal foi cocrystalizado com NADH a uma proporção de 10:1 em molaridade do cofator para a proteína (o cofator foi adicionado no momento da preparação das placas de 24 poços), está na Tabela 16. O cristal cresceu na condição 0,1 M Tris pH 9,0, 1,26 M sulfato de amônio, 20% v/v glicerol e seu formato era similar aos da Figura 48. Esses dados foram processados e tentou-se resolver a estrutura pelo método de Substituição Molecular. Entretanto, não se obteve sucesso, uma vez que a melhor solução encontrada apresentou TFZ de 5,6. O TFZ indica a relação sinal-ruído da solução obtida, cujos valores são acima de oito quando soluções são encontradas.

Tabela 16 - Estatísticas dos dados de difração de um cristal nativo da 6xHis-NahG utilizado na tentativa de resolução da estrutura por Substituição Molecular. Os valores estatísticos para as faixas de mais baixa e mais alta resolução estão entre parênteses.

<b>6xHis-NahG a 2.28 Å</b>	
<b>Comprimento de onda (Å)</b>	1,608
<b>Temperatura (K)</b>	100
<b>Distância cristal-detector (mm)</b>	87
<b>Rotação por imagem (o)</b>	1,0
<b>Rotação Total (o)</b>	360
<b>Grupo espacial</b>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
<b>Parâmetros da célula unitária (Å)</b>	a = 81,9; b = 98,7; c = 131,2
<b>Faixa de resolução (Å)</b>	50,00 – 2,28 (50,00 – 5,22/2,35 – 2,28)
<b>No. de observações</b>	352.313 (28.397/27.814)
<b>No. de reflexões únicas</b>	48.782 (4.176/4.031)
<b>Completeza dos dados (%)</b>	99,7 (96,1/100,0)
<b>⟨I/σ(I)⟩</b>	43,2 (60,5/3,8)
<b>Multiplicidade</b>	7,2 (6,8/6,9)
<b>Rmerge†</b>	0,042 (0,023/0,495)
<b>Mosaicidade média</b>	0,44

\*  $R_{merge} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$ , onde  $I_i(hkl)$  é a  $i^{th}$  intensidade medida da reflexão  $hkl$  e  $\langle I(hkl) \rangle$  é a sua média.

Foram coletados conjuntos de dados de difração de cristais derivados obtidos a partir de *soaking* com solução de iodeto de sódio. Os ensaios foram feitos com solução de NaI nas concentrações entre 1,0 M e 62,5 mM, nas quais os cristais permaneceram por 30 seg a 5 min. Houve inserção de átomos pesados no cristal que foi imerso por 30 seg em solução com 62,5 mM de iodo. Os dados estatísticos de difração para este cristal (painel A, Figura 48) estão na Tabela 17 e uma imagem de difração na Figura 49. O cálculo do coeficiente de Matthews para a proteína 6xHis-NahG sugere a presença de duas moléculas de proteína na unidade assimétrica ( $V_m = 2.70 \text{ Å}^3/\text{Da}$ ) com 54,5% do conteúdo de solvente.

Tabela 17 - Estatísticas dos dados de difração de um cristal derivado da 6xHis-NahG utilizado para resolução da estrutura por SAD e SIRAS. Os valores estatísticos para as faixas de mais baixa e mais alta resolução estão entre parênteses.

<b>Derivado da 6xHis-NahG a 2.00 Å</b>	
<b>Comprimento de onda (Å)</b>	1,459
<b>Temperatura (K)</b>	100
<b>Distância cristal-detector (mm)</b>	110
<b>Rotação por imagem (o)</b>	0,5
<b>Rotação Total (o)</b>	360
<b>Grupo espacial</b>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
<b>Parâmetros da célula unitária (Å)</b>	a = 81,6; b = 98,1; c = 130,1
<b>Faixa de resolução (Å)</b>	50,00 – 2,00 (50,00 – 5,43/2,03 – 2,00)
<b>No. de observações</b>	951.839 (49.993/33.675)
<b>No. de reflexões únicas</b>	133.525 (6.578/6.476)
<b>Completeza dos dados (%)</b>	99,0 (97,5/95,6)
<b><math>\langle I/\sigma(I) \rangle</math></b>	25,4 (35,8/2,9)
<b>Multiplicidade</b>	7,1 (7,6/5,2)
<b>Rmerge*</b>	0,064 (0,041/0,526)
<b>Mosaicidade média</b>	0,65

\*  $R_{merge} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$ , onde  $I_i(hkl)$  é a  $i^{th}$  intensidade medida da reflexão  $hkl$  e  $\langle I(hkl) \rangle$  é a sua média.

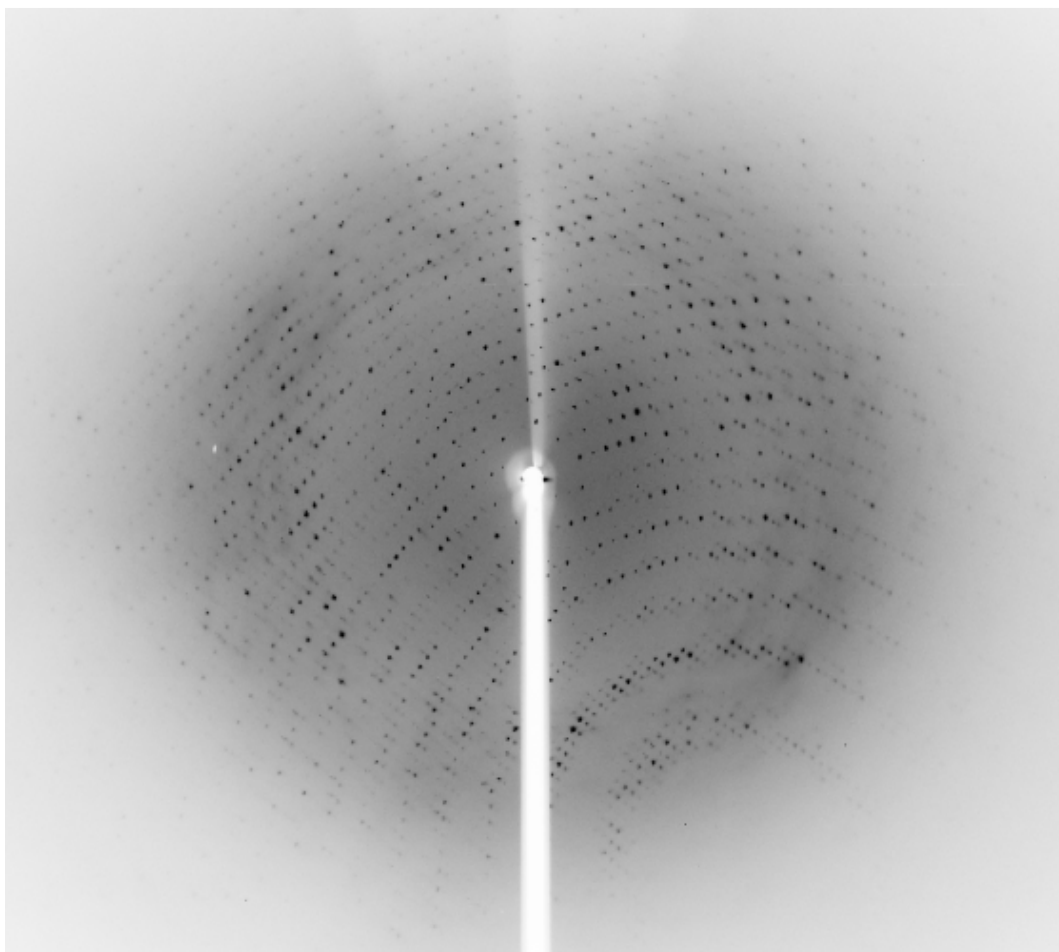


Figura 49 - Imagem de difração de um cristal da proteína 6xHis-NahG. Os dados de difração foram coletados a 2,00 Å.

A determinação do sinal anômalo foi feita com o programa SHELXC. O valor desse sinal deve ser acima de 1,3 para ser eficiente na resolução do problema das fases. Os valores encontrados estão na Tabela 18. As coordenadas e ocupâncias dos átomos de iodo encontrados foram determinadas pelo programa SHELXD (Tabela 19).

Tabela 18 – Sinal anômalo para um cristal derivado da 6xHis-NahG que difratou até 2,0 Å. O sinal anômalo está representado por  $\langle d''/\sigma \rangle$  por faixa de resolução e a completude por %Comp.

<b>Resl. Inf</b>	<b>8,0</b>	<b>6,0</b>	<b>5,0</b>	<b>4,0</b>	<b>3,5</b>	<b>3,0</b>	<b>2,8</b>	<b>2,6</b>	<b>2,4</b>	<b>2,2</b>	<b>2,0</b>
<b>N(data)</b>	1150	1617	1981	4430	4409	7836	4824	6396	8657	12039	16366
<b><math>\langle I/\sigma \rangle</math></b>	48,0	50,4	47,0	42,2	33,8	25,4	22,4	19,1	14,7	9,8	5,4
<b>%Comp</b>	90,8	99,6	99,7	99,7	99,7	99,8	99,6	99,4	99,2	98,7	96,9
<b><math>\langle d''/\sigma \rangle</math></b>	2,19	2,40	2,01	1,40	1,10	1,01	1,06	1,02	0,94	0,82	0,76

Tabela 19 – Coordenadas fracionárias dos íons de iodo, presentes na estrutura cristalográfica da 6xHis-NahG, utilizados para resolver o problema das fases.

<b>Iodo</b>	<b>x</b>	<b>y</b>	<b>z</b>	<b>Ocupação</b>
<b>1</b>	0,880554	0,244133	0,014123	1,0000
<b>2</b>	1,056.076	-0,0633	-0,1629	0,5647
<b>3</b>	1,206.490	0,08519	-0,12291	0,4274
<b>4</b>	1,209.274	-0,13347	-0,27003	0,4048
<b>5</b>	1,056.763	-0,13046	-0,35677	0,3693
<b>6</b>	0,96431	0,061615	-0,07854	0,3472
<b>7</b>	1,191.582	0,108665	-0,12035	0,3224
<b>8</b>	1,230.759	0,249962	-0,13235	0,2504

Além disso, foram coletados outros conjuntos da proteína nativa, para resolução da estrutura por SIRAS. Os dados do melhor conjunto coletado, cujo cristal cresceu na condição 0.1 M Tris pH 8.0, 1.26 M sulfato de amônio, 20% v/v glicerol, são apresentados na

Tabela 20. Todos os demais conjuntos coletados foram processados e estão representados no Anexo II, Tabela 25.

Tabela 20 - Estatísticas dos dados de difração de um cristal nativo da 6xHis-NahG utilizado para resolução da estrutura por SIRAS. Os valores estatísticos para as faixas de mais baixa e mais alta resolução estão entre parênteses.

<b>6xHis-NahG a 2,20 Å</b>	
<b>Comprimento de onda (Å)</b>	1,459
<b>Temperatura (K)</b>	100
<b>Distância cristal-detector (mm)</b>	140
<b>Rotação por imagem (o)</b>	0.5
<b>Rotação Total (o)</b>	164.5
<b>Grupo espacial</b>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
<b>Parâmetros da célula unitária (Å)</b>	a = 81,3; b = 97.7; c = 129,9
<b>Faixa de resolução (Å)</b>	50,00 – 2,20 (50,00 – 5,42/2,25 – 2,20)
<b>No. de observações</b>	348.923 (23.027/20.935)
<b>No. de reflexões únicas</b>	52.942 (3.714/3.432)
<b>Completeza dos dados (%)</b>	99,7 (98,3/98,3)
<b>⟨I/σ(I)⟩</b>	19,5 (28,7/5,1)
<b>Multiplicidade</b>	6,6 (6,2/6,1)
<b>Rmerge*</b>	0,086 (0,046/0,333)
<b>Mosaicidade média</b>	0,68

\*  $R_{merge} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$ , onde  $I_i(hkl)$  é a  $i^{th}$  intensidade medida da reflexão  $hkl$  e  $\langle I(hkl) \rangle$  é a sua média.

A estrutura da 6xHis-NahG foi resolvida por SAD e por SIRAS pelo programa AutoSol do pacote PHENIX (Tabela 21). Após o refinamento, a estrutura resolvida por SAD apresentou menores valores de  $R_{work}$  e  $R_{free}$ . Dessa forma, esta foi utilizada para análise da estrutura – até porque este conjunto de dados (mesmo contendo íons de iodo) foi o de mais alta resolução obtido.

Tabela 21 – Dados da resolução da estrutura e do refinamento da 6xHis-NAHG por SAD e SIRAS.

Parâmetros	SAD	SIRAS
$R_{work}^{\#}$ inicial (%)	26,54	27,70
$R_{work}^{\#}$ após refinamento (%)	22,34	23,67
$R_{free}^{\#}$ inicial (%)	29,16	30,42
$R_{free}^{\#}$ após refinamento (%)	24,72	27,80
Gráfico de Ramachandran Favoráveis (%)	97,1	97,5
Gráfico de Ramachandran Outliers	0,2	0,0

$^{\#} R_{work} = \frac{\sum_{hkl} |F_{obs}| - |F_{calc}|}{\sum_{hkl} |F_{obs}|}$ ;  $R_{free}$  é o valor de  $R_{work}$  calculado para 5% do conjunto de dados não inclusos no refinamento.

### 5.2.7 Análise da estrutura tridimensional

A estrutura da 6xHis-NahG a 2,00 Å resolvida por SAD possui 416 resíduos de aminoácidos, começando no sétimo resíduo de aminoácido da sequência nativa da enzima e terminando no 424<sup>o</sup>. Não foi visualizada densidade eletrônica da cauda de seis histidinas e nem entre os resíduos de aminoácidos 248 e 251. Dessa forma, 18 resíduos de aminoácidos não foram definidos no modelo 3D desta proteína.

A 6xHis-NahG de *Pseudomonas putida* G7 pertence à família de proteínas com domínio de ligação ao FAD e é estruturalmente similar a outras hidroxilases dependentes de FAD (como será evidenciado abaixo), sendo formada por três folhas beta constituídas por oito, quatro e três fitas-β e por quatorze α-hélices (Figura 50).

A 6xHis-NahG, de acordo com análise feita no servidor Superfamily 1.75<sup>20</sup>, é constituída de dois domínios. Um é o domínio de ligação de FAD/NAD(P), constituído pelos resíduos de aminoácidos 9 a 175 e 293 a 389, e o outro é domínio de redutases que interagem com FAD ou domínio C terminal, caracterizado pelos resíduos de aminoácidos 184 a 298 (Figura 51).

<sup>20</sup> <http://supfam.org/SUPERFAMILY/>

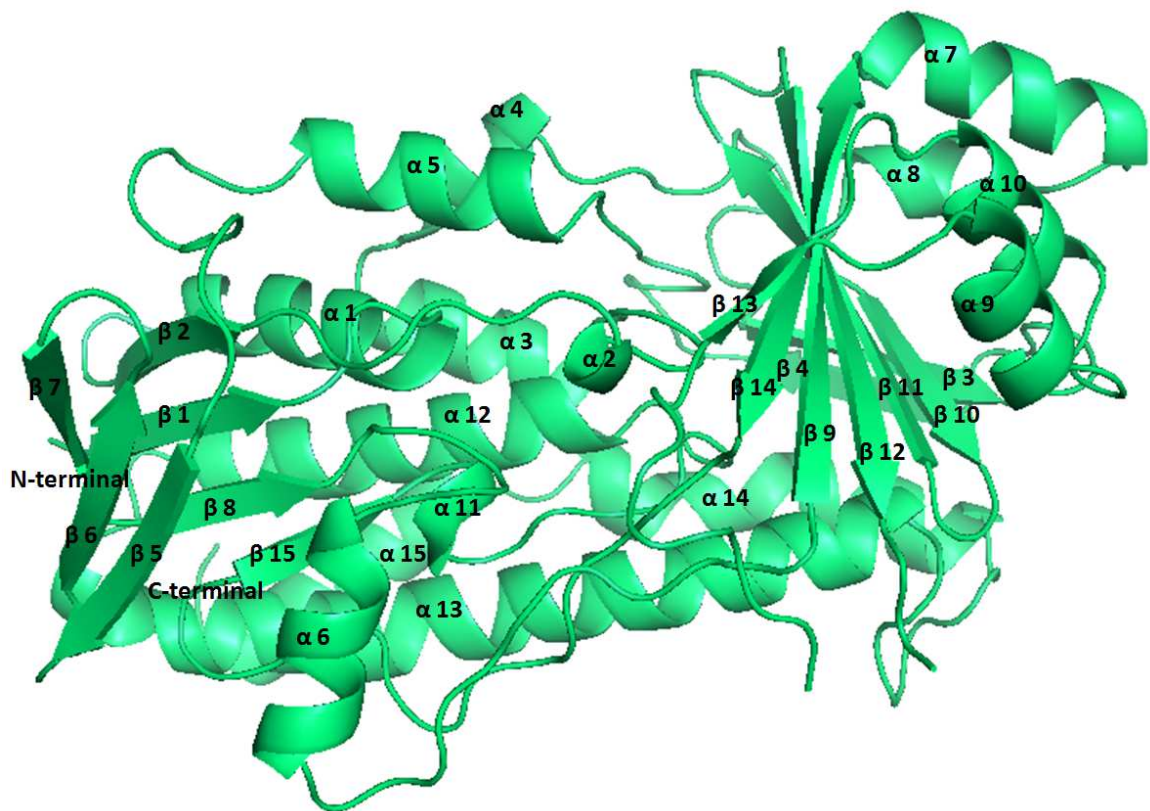


Figura 50 - Estrutura tridimensional da enzima 6xHis-NahG, com a representação das fitas- $\beta$  e  $\alpha$ -hélices e as regiões N- e C-terminais.

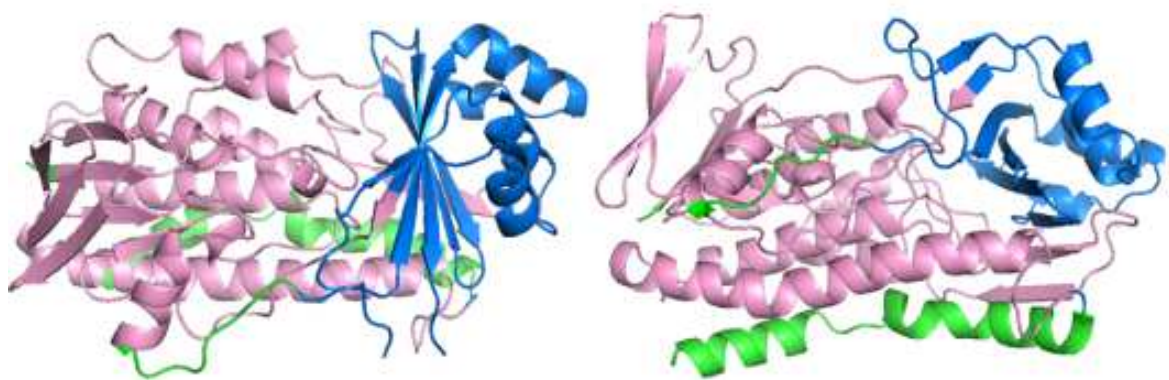


Figura 51 - Estrutura tridimensional da enzima 6xHis-NahG, evidenciando o domínio de ligação do FAD/NAD(P) em rosa e o domínio C-terminal em azul.

O átomo pesado utilizado para resolver o problema das fases foi o iodo, cujas posições na estrutura cristalográfica da enzima podem ser visualizadas na Figura 52. Na figura são mostradas as duas moléculas de 6xHis-NahG encontradas na unidade assimétrica do cristal, conforme previamente sugerido pelo coeficiente de Matthews ( $V_m = 2.70 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ ).

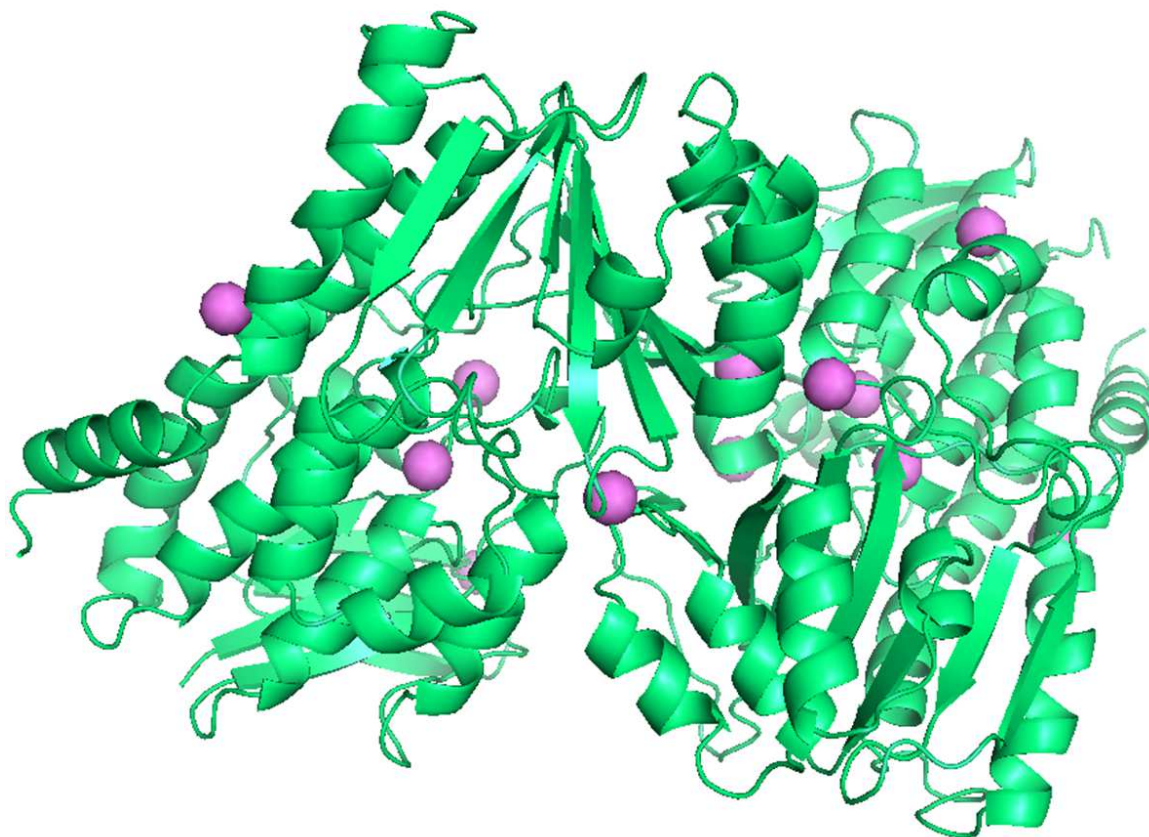


Figura 52 - Estrutura tridimensional da enzima 6xHis-NahG com as localizações dos átomos de iodo (roxo) utilizados para resolução do problema das fases.

Uma análise dos dados gerados pelo servidor Dali, o qual permite a comparação da estrutura tridimensional de uma proteína alvo com estruturas depositadas no PDB, indicou que as proteínas com maiores similaridades estruturais com a NahG de *P. putida* G7 são a urato oxidase HpxO de *Klebsiella pneumoniae* e a 3-hidroxibenzoato-6-hidroxilase de *Rhodococcus jostii* (Tabela 22). As duas últimas foram obtidas complexadas com FAD e substrato ou somente com FAD. A 6xHis-NahG foi cristalizada na ausência de FAD e as tentativas para cristalizar a 6xHis-NahG com este cofator não foram bem sucedidas. Dessa

forma, a comparação entre as estruturas da 6xHis-NahG com outras flavoproteínas hidroxilases pode indicar regiões de ligação do FAD e do ácido salicílico na NahG de *P. putida* G7, assim como evidenciar as modificações estruturais que ocorrem devido às interações com o FAD e substrato.

Tabela 22 – Enzimas identificadas como estruturalmente similares à NahG pelo servidor Dali.

<b>Proteína</b>	<b>Código PDB</b>	<b>Z score</b>	<b>rmsd</b>	<b>% identidade</b>
<b>Urato oxidase HpxO complexada com FAD</b>	3RP8	38,8	2,8	24
<b>Urato oxidase HpxO complexada com FAD e ácido úrico</b>	3RP7	38,5	2,8	24
<b>3-hidroxibenzoato-6-hidroxilase complexada com FAD e fosfatidilglicerol</b>	4BK2	37,9	2,8	29
<b>2,6-dihidroxipiridina-3-hidroxilase complexada com FAD</b>	2VOU	34,6	3,1	22
<b>Monoxigenase PhzS</b>	2RGJ	32,5	2,9	26

A sobreposição das estruturas da 3-hidroxibenzoato-6-hidroxilase, a qual apresenta FAD e fosfatidilglicerol ligados, e a NahG apoenzima evidencia a presença de um *loop* móvel, o qual está relacionado à interação com o FAD. Este *loop* corresponde à região formada pelos resíduos de aminoácidos 36 a 52 na NahG (Figura 53). Apesar da urato oxidase HpxO apresentar maior similaridade estrutural com a NahG do que a 3-hidroxibenzoato-6-hidroxilase, a sobreposição para análise desse *loop* móvel foi feita com a segunda, pois na estrutura da urato oxidase HpxO complexada com FAD (PDB 3RP8) ou com FAD e ácido úrico (PDB 3RP7), o *loop* móvel que participa na interação com o FAD não está presente no modelo.

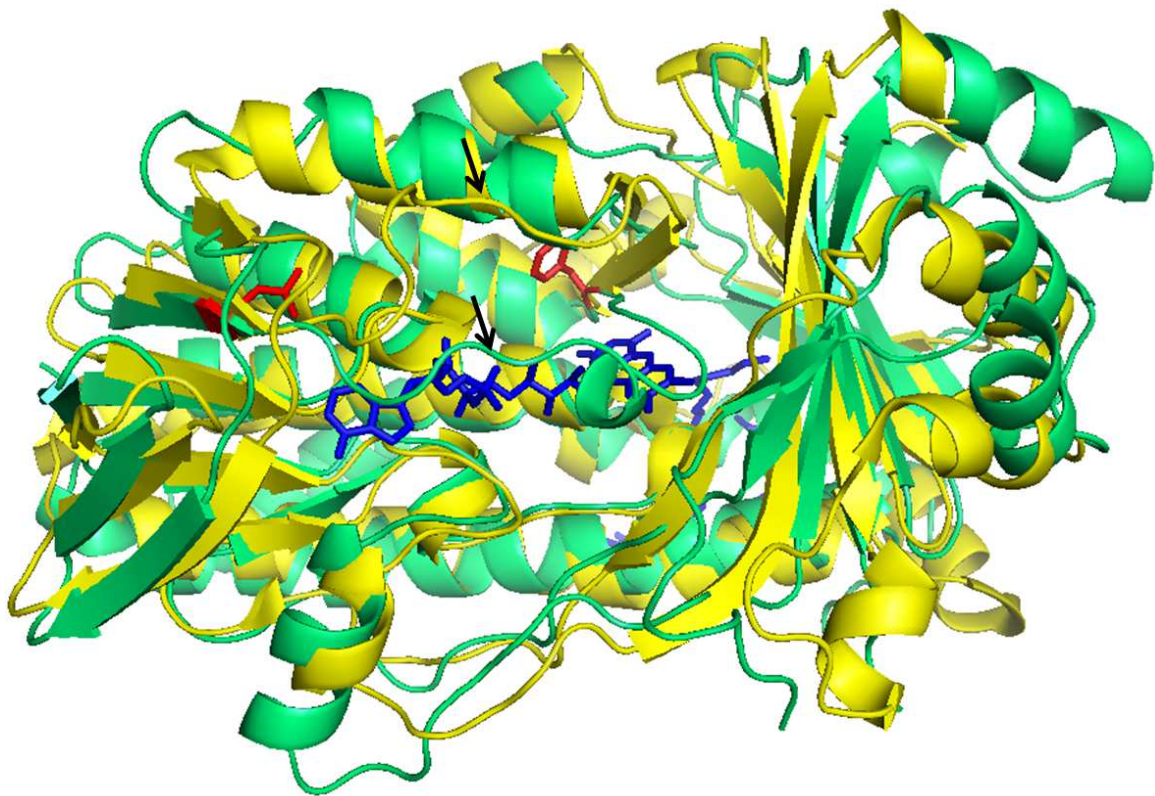


Figura 53 - Sobreposição da 6xHis-NahG (verde) com a 3-hidroxibenzoato-6-hidroxilase (PBB 4BK2) (amarelo) complexada com FAD e fosfatidilglicerol (ambos em azul). Em vermelho os resíduos 36 e 52 da 6xHis-NahG. As setas indicam as posições do *loop* na apoenzima (amarelo) e na enzima complexada com FAD e substrato (verde).

### 5.2.8 Mutagênese sítio-dirigida

As mutações sítio dirigidas de alguns resíduos de aminoácidos da proteína NahG recombinante foram propostas para avaliar a participação desses resíduos na atividade catalítica da enzima. A escolha dos resíduos para mutação foi feita a partir da comparação da estrutura primária da salicilato hidroxilase de *P. putida* G7 com enzimas similares depositadas no PDB. As proteínas mais similares (identidade entre 22 e 28%) com os respectivos números das sequências protéicas do UniProtKB e código PDB são urato oxidase HpxO (A6T923, 3RP7); 3-hidroxibenzoato-6-hidroxilase (Q0SFK6, 4BK2); monoxigenase PhzS (Q9HWG9, 3C96); 2-metil-3-hidroxipiridina-5-ácido carboxílico oxigenase (Q988D3, 3ALH) e 2,6-dihidroxipiridina-3-hidroxilase (Q93NG3, 2VOU).

O alinhamento dessas sequências com a NahG de *P. putida* G7 (UniProtKB P23262) feito pelo programa ClustalW2 está apresentado na Figura 54. A enzima NahG de

*Pseudomonas putida* G7 pertence à família de proteínas com domínio de ligação ao FAD. No PDB verifica-se que algumas regiões (resíduos de aminoácidos evidenciados com asterisco, dois pontos ou ponto) são bem conservadas entre as enzimas, as quais são hidroxilases aromáticas com domínio de ligação ao FAD. As regiões conservadas estão relacionadas com a ligação do FAD, NADH ou substrato. Por exemplo, a região entre os resíduos de aminoácidos 36 a 52 (sequência da NahG de *P. putida* G7) está relacionada com a interação com FAD, os resíduos entre 154 e 169 estão relacionados com a interação com NADH (Suzuki, et al., 2000) e o resíduo 226 com a interação com o substrato (Hicks, et al., 2013; Montersino, et al., 2013).

sp	P23262	NHG1_PSEPU	-----MKNNKLGRLRIGIVGGGISGVALALELCRYSHIQVQLFEAAPA-FGE	45
tr	Q0SFK6	Q0SFK6_RHOSR	-----MSNLQDARI I IAGGGIGGAANALALAQKG-ANVTLFRASE-FGE	43
sp	A6T923	HPXO_KLEP7	-----MKAIVIGAGIGGLSAAVALKQSG-IDCDVYEAVKE-IKP	37
tr	Q9HWG9	Q9HWG9_PSEAE	-----MSEPIDILIAGAGIGGLSCALALHQAGIGKVTLLESSE-IRP	42
tr	Q988D3	Q988D3_RHILO	MANVNKTPGKTRRAEVAGGGFAGLTAALALKQNG-WDVRLEHKSSE-LRA	48
tr	Q93NG3	Q93NG3_ARTNI	-----MSPTTDRIAVVGGISGLTAALMLRDAG-VDVDVYERSPQPLSG	43
			: * . . . * : * : * . . . : *	
sp	P23262	NHG1_PSEPU	VGAGVSFGPNAVRAIVGLGLGEAYLQVADR-TSEPVEDVWFWRGSDAS	94
tr	Q0SFK6	Q0SFK6_RHOSR	VGAGLQVGPHGARI L DSWGLDDVLSRAFLPKNIVFRDAITAEVLT KIDL	93
sp	A6T923	HPXO_KLEP7	VGAAISVWPNGVKCMAHLGMDIMETFGGPLRRMAYRDFRSGENMTQFSL	87
tr	Q9HWG9	Q9HWG9_PSEAE	LGVGINIQPAAVEALAEGLGPPALAAATAIPTHELRYIDQSGATVWSE---	89
tr	Q988D3	Q988D3_RHILO	FGAGIYLWHNGLRVLEGLGALDDV LQGSHT--PPTYETWMHNKSVSK---	93
tr	Q93NG3	Q93NG3_ARTNI	FGTGIVVQPELVHYLLEQGVLELDSISVPSS--SMEYVDALTGERVGS---	88
			. * . . . . : *	
sp	P23262	NHG1_PSEPU	YLGATIAPGVGQSSVHRADFIDALVTHLPEG----IAQFGKRATQVEQQG	140
tr	Q0SFK6	Q0SFK6_RHOSR	GSEFRGRYGGPYFVTHRSDLHATLVDAARAAG--AELHTGVTVDVITEG	141
sp	A6T923	HPXO_KLEP7	AP-LIERTGSRPCPVSRALQREMLDYWGRD----SVQFGKRVTRCEEDA	132
tr	Q9HWG9	Q9HWG9_PSEAE	PRGVEAGNAYPQYSIHRGELQMILLAAVRERLGGQAVRTGLGVERIEERD	139
tr	Q988D3	Q988D3_RHILO	----ETFNGLPWRIMTRSHLHDALVNRRALG----VDISVNSEAVAADP	135
tr	Q93NG3	Q93NG3_ARTNI	-----VPADWRFTSYDSIYGGLYELFGER----YHTSKCLVGLSQDS	127
			: :	
sp	P23262	NHG1_PSEPU	GEVQVLFDTGT----EYRCDLLIGADGIKSALRSHVLEGQGLAPQVPRFS	186
tr	Q0SFK6	Q0SFK6_RHOSR	DKAIVSTDDGR----THEADIALGMDGLKSRLREKISGDE-----PVSS	181
sp	A6T923	HPXO_KLEP7	DGVTVWFTDGS----SASGDL LIAADGSHSALRPWVLGFTTPQ----RRYA	174
tr	Q9HWG9	Q9HWG9_PSEAE	GRVLIGARDGHGKPKQALGADV L VGADGIHSAVRAHLHPDQRP----LSHG	185
tr	Q988D3	Q988D3_RHILO	VGRLTLQTGEV----LEADLIVGADGVGSKVRDSIGFKQDR-----WVS	175
tr	Q93NG3	Q93NG3_ARTNI	ETVQMRFS DGT----KAEANWVIGADGGASVVRKRLLGIEPT-----YA	167
			. : . : * * * : * :	
sp	P23262	NHG1_PSEPU	GTCAYRGMVDSLHLREAYRAHGIDEHLVDVPQMYLGLDGHILTFPVRNG-	235
tr	Q0SFK6	Q0SFK6_RHOSR	GYAAYRGTTT-----YRDVELDEDIEDVVG-YIGPRCHFIQYPLRGG-	222
sp	A6T923	HPXO_KLEP7	GYVNWNLVE-----IDEALAPGDQWTTTFVGEKRVSLMPVSAG-	213
tr	Q9HWG9	Q9HWG9_PSEAE	GITMWRGVTEFDR----FLDGKTMIVANDEHWSRLVAYPISARHAAEGK-	230
tr	Q988D3	Q988D3_RHILO	KDGLIRLIVPRMK----KELGHGEWDNTIDMWNFWPRVQRILYSPCNE-	219
tr	Q93NG3	Q93NG3_ARTNI	GYVTWRGVLQPGE----VADDVWNYFNDKFTYGLLDDGHLIAYPIPGRE	212
			. . . . .	
sp	P23262	NHG1_PSEPU	-----GIINVVAFISDRSEPKPTPAD-----APWVREASQREMLDAF	273
tr	Q0SFK6	Q0SFK6_RHOSR	-----EMLNQVAVFESPG-----FK-----NGIENWGGPEELEQAY	253
sp	A6T923	HPXO_KLEP7	-----RFYFFFDVPLPAG-----LAEDRDTLRADLSRYF	242
tr	Q9HWG9	Q9HWG9_PSEAE	-----SLVNWVCMVPSAAVG--QLDNE-----ADWNRDGRLEDVLPFF	266
tr	Q988D3	Q988D3_RHILO	-----NELYLGLMAPAAD-----PRGSSVPIDLEVWV	246
tr	Q93NG3	Q93NG3_ARTNI	NAESPLRFNQWYWNVAEGPDLDELMTDVRGIRLPTSVHNNLSLPHNLRQF	262
			. . . . .	

sp	P23262	NHG1_PSEPU	AGWGDAARALLECIPAPT---LWALHDLAELPGYVHGRVVLIGDAAHAML	320
tr	Q0SFK6	Q0SFK6_RHOSR	AHCHENVRRGIDYLWKDR---WWPMYDREPIENWVDGRMILLGDAHPPL	300
sp	A6T923	HPXO_KLEP7	AGWAPPVQKLI AALDPQTTN-RIEIHDI EPFSRLVGRVALLGDAGHSTT	291
tr	Q9HWG9	Q9HWG9_PSEAE	ADWDLGWFDIRDLLTRNQLILQYPMVDRDPLPHWGRGRITLLGDAHLMY	316
tr	Q988D3	Q988D3_RHILO	EMFPFLEPCLIEAAKLKTAR--YDKYETTKLDSWTRGKVALVGDAAHAMC	294
tr	Q93NG3	Q93NG3_ARTNI	HSKGESLFPFRDLVLNASSPFVTVVADATVDRMVHGRVLLIGDAAVTPR	312
			. *: : * : * * .	
sp	P23262	NHG1_PSEPU	PHQGAGAGQGLEDAYFLARLLGDTQADAGN--LAELLEAYDDLRPRACR	368
tr	Q0SFK6	Q0SFK6_RHOSR	QYLASGAVMAIEDAKCLADYAAEDFSTGGNSAWPQILKEVNTERAPRCNR	350
sp	A6T923	HPXO_KLEP7	PDIGQGGCAAMEDAVVLGAVFRQTRDIAAA-----LREYEAQRCDRVRD	335
tr	Q9HWG9	Q9HWG9_PSEAE	PMGANGASQAILDGIELAAALARNADVAAA-----LREYEEARRPTANK	360
tr	Q988D3	Q988D3_RHILO	PALAQQGAGCAMVNAFSLSQDLEEGSSVEDA-----LVAWETRIRPITDR	338
tr	Q93NG3	Q93NG3_ARTNI	PHAAAGGAKACDDARTLAEVFTKNHDLRGS-----LQSWETRQLQQGHA	356
			. * . . : . * .	
			. * . . : . * .	
sp	P23262	NHG1_PSEPU	VQQTSWETGELYELRDPVVGANEQLLGENLATRF---DWLWNHDLDTDLA	415
tr	Q0SFK6	Q0SFK6_RHOSR	ILTTGRMWGELWHLDTGARIARNELFRTRDTSSYKYTDWLWGYSSTRAS-	399
sp	A6T923	HPXO_KLEP7	LVLKARKRCDITHGKD-MQLTEAWYQELREETGERIINGMCDTILSGPLG	384
tr	Q9HWG9	Q9HWG9_PSEAE	IILANRER-----EKEEWAASRPKTEKSAALEAITGSYRNQVERPR-	402
tr	Q988D3	Q988D3_RHILO	CQALSGDYAANRSLSKGNMFTPAALEAARYDPLRRVYSWPQ-----	379
tr	Q93NG3	Q93NG3_ARTNI	YLNKVKKMASRLQHGGSFEPGNPAFAFGLPKVDEPSVVTNS-----	397
sp	P23262	NHG1_PSEPU	EARARLGWEHGGGGALRQG	434
tr	Q0SFK6	Q0SFK6_RHOSR	-----	
sp	A6T923	HPXO_KLEP7	-----	
tr	Q9HWG9	Q9HWG9_PSEAE	-----	
tr	Q988D3	Q988D3_RHILO	-----	
tr	Q93NG3	Q93NG3_ARTNI	-----	

Figura 54 - Alinhamento feito pelo programa ClustalW2 da NahG de *P. putida* G7 (P23262) com as enzimas 3-hidroxibenzoato-6-hidroxilase (Q0SFK6); urato oxidase (A6T923); monooxigenase PhzS (Q9HWG9); 2-metil-3-hidroxipiridina-5-ácido carboxílico oxigenase (Q988D3) e 2,6-dihidroxipiridina-3-hidroxilase (Q93NG3). Representação dos aminoácidos conservados: \* resíduos idênticos; : substituições conservadas; . substituições semi-conservadas.

Além disso, para a escolha das mutações foi feita a comparação da estrutura tridimensional da 6x-HisNahG com a estrutura das enzimas 3-hidroxibenzoato-6-hidroxilase (PDB 4BK2) (Montersino, et al., 2013) e urato hidroxilase (PDB 3RP7) (Hicks, et al., 2013) ambas com FAD e substratos ligados. Essas proteínas foram escolhidas com base na análise feita no servidor Dali. Esta análise, uma comparação da estrutura tridimensional da NahG de *P. putida* G7 com estruturas depositadas no PDB, indicou que as proteínas 3-hidroxibenzoato-6-hidroxilase e urato hidroxilase apresentam as maiores similaridades estruturais com a NahG (Tabela 22).

A proteína NahG apresenta um *loop* móvel relacionado com a ligação do FAD, como pode ser observado pela sobreposição das estruturas tridimensionais de uma proteína similar (PDB 4KB2) ligada com FAD e da 6xHis-NahG sem FAD (Figura 53). Esse *loop* é formado pela sequência de aminoácidos entre os resíduos 36 e 55 da NahG. Foram propostas

as mutações dos resíduos Leu36, Phe37 e Glu38 para alanina, os quais são conservados entre as enzimas da família da NahG, para avaliar a importância desses resíduos na interação da enzima com o FAD. Outro resíduo de aminoácido que foi mutado para alanina foi a arginina 192, que fica posicionada no centro ativo da enzima e interage diretamente com FAD. Além disso, outros resíduos de aminoácidos conservados que provavelmente interagem com o FAD são: Asp314, His110, His322 e Arg111. Esses foram mutados para alanina, asparagina, tirosina e glutamina, respectivamente. Os resíduos que provavelmente interagem com o FAD e que foram mutados estão evidenciados na Figura 55.

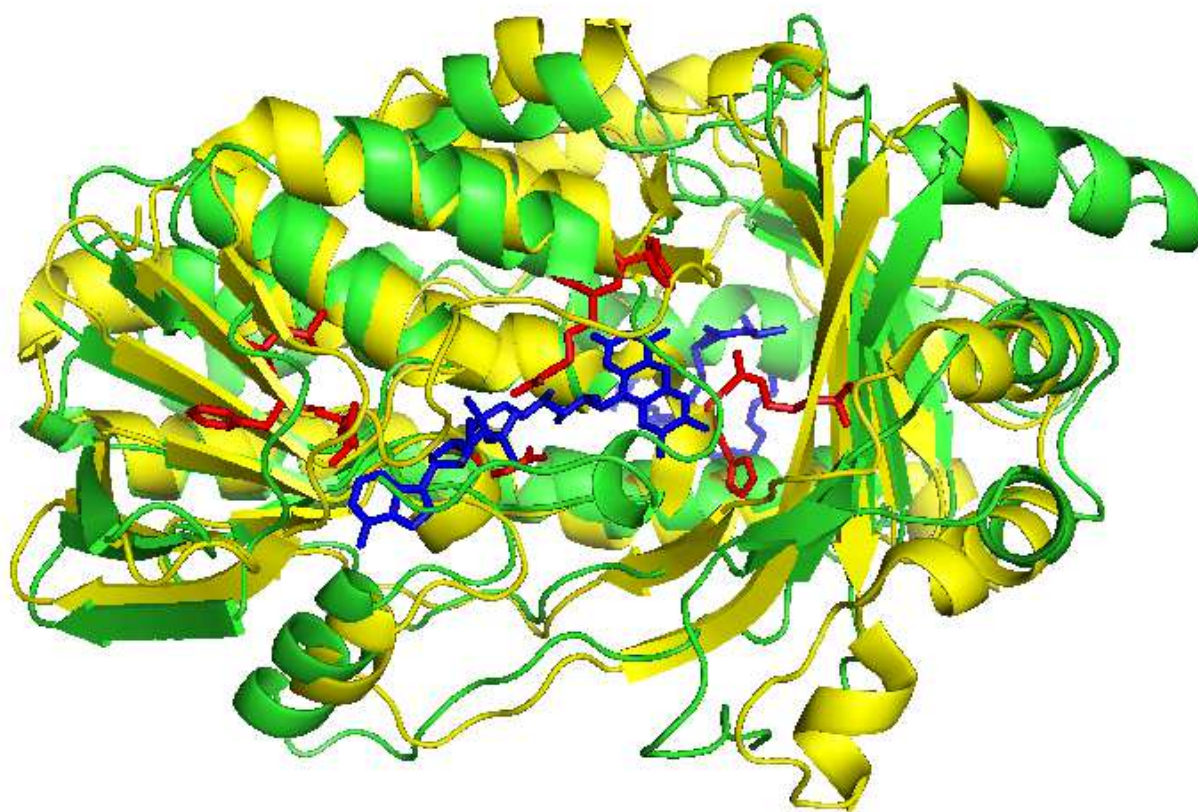


Figura 55 - Estrutura cristalográfica da 6xHis-NahG (verde) sobreposta com a 3-hidroxibenzoato-6-hidroxilase (PBB 4BK2) (amarelo) complexada com FAD e fosfatidilglicerol (ambos em azul). Em vermelho os resíduos de aminoácidos Leu36, Phe37, Glu38, Arg192, Asp314, His110, His322 e Arg111 da 6xHis-NahG que provavelmente interagem com o FAD.

Entre as enzimas da família a qual pertence a NahG há a presença de um loop relacionado com a interação com o NADH. Na NahG de *Pseudomonas putida* G7 este loop compreende os resíduos de aminoácidos 155 a 169. Logo, foram mutados os resíduos 165, 167 e 169, os quais são os mais conservados entre as enzimas da mesma família (Figura 56).

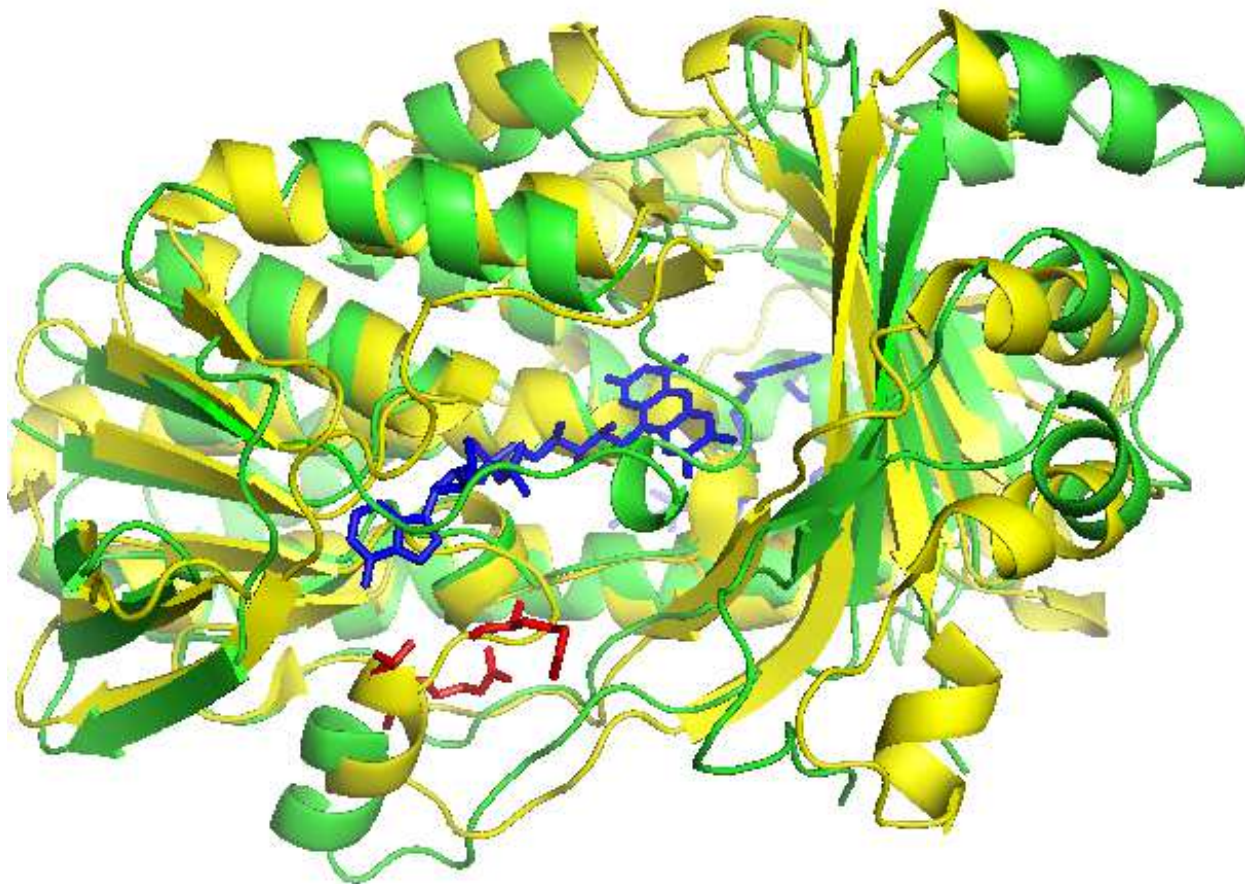


Figura 56 - Estrutura cristalográfica da 6xHis-NahG (verde) sobreposta com a 3-hidroxibenzoato-6-hidroxilase (PBB 4BK2) (amarelo) complexada com FAD e fosfatidilglicerol (ambos em azul). Em vermelho os resíduos de aminoácido Lys165, Ala167 e Arg169 da 6xHis-NahG.

A histidina 226 da NahG corresponde à histidina 213 da 3-hidroxibenzoato-6-hidroxilase e à arginina 204 da urato oxidase HpxO. A importância da H213 e R204 citadas na interação com o substrato já foram demonstradas pela análise dos mutantes H213S (Montersino, et al., 2013) e R204Q (Hicks, et al., 2013). Produzimos o mutante H226A

(Figura 57), para confirmar o papel da histidina 226 na interação da enzima com o ácido salicílico.

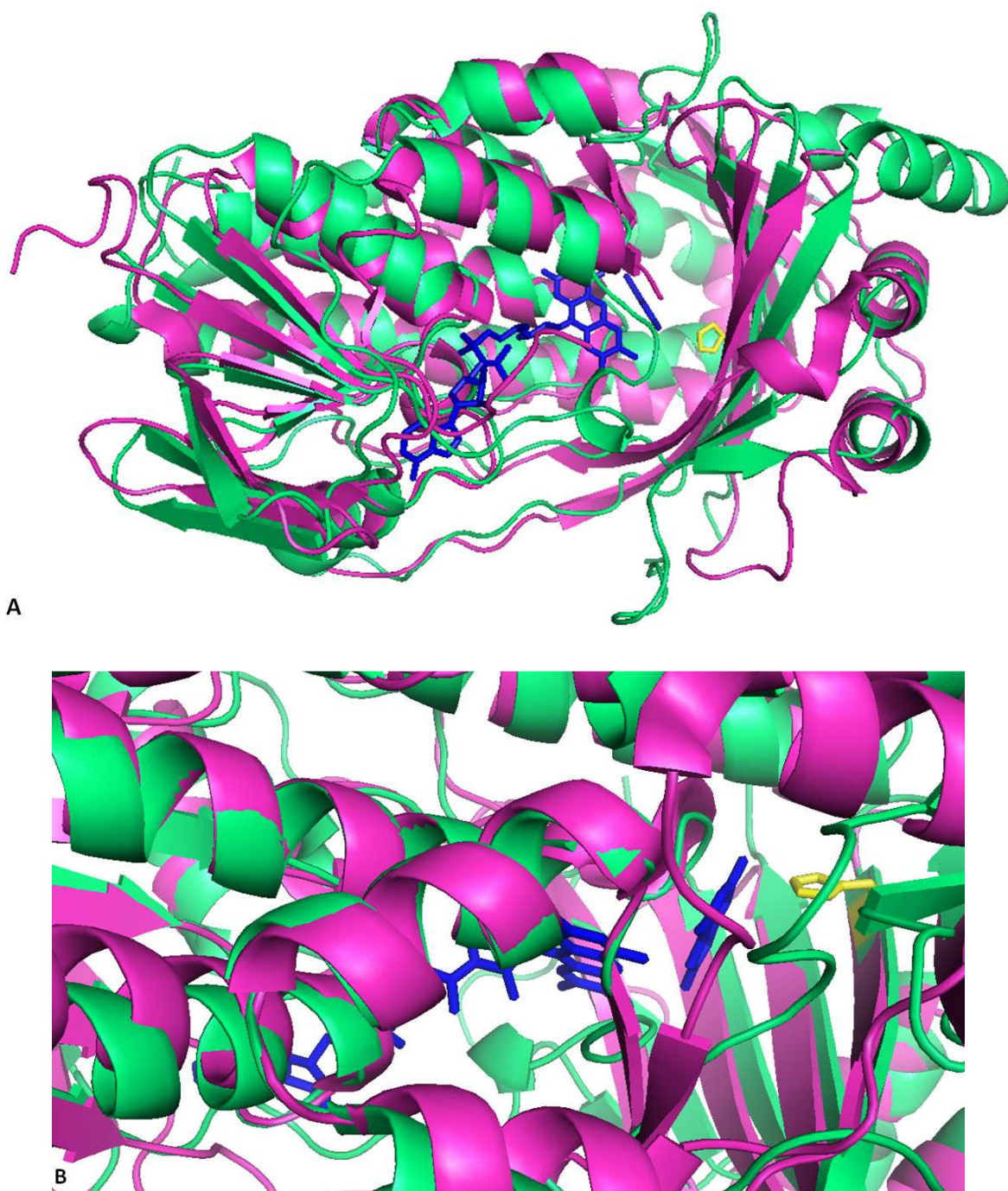


Figura 57- Estrutura cristalográfica da 6xHis-NahG (verde) sobreposta com a urato hidroxilase (magenta) complexada com FAD e ácido úrico (ambos em azul) (PBB 3RP7). Em amarelo o resíduo de aminoácido 226 da 6xHis-NahG.A, visualização de toda a estrutura. B, visualização de detalhes.

Os doze mutantes produzidos foram sequenciados e apenas o 6xHis-NahG-H322Y não apresentou a mutação no sequenciamento. As mutações visam avaliar resíduos de aminoácidos importantes para interação com o FAD, NADH e AS, contribuindo para o entendimento do mecanismo catalítico da NahG. O primeiro passo para esse entendimento é a caracterização cinética dos mesmos. Apesar de todos os mutantes terem sido produzidos (exceção de um que não incorporou a mutação), nem todos foram avaliados cineticamente até o momento de término dessa tese.

### 5.2.9 Cinética do estado estacionário

Os efeitos das concentrações do substrato ácido salicílico e das coenzimas FAD e NADH na velocidade das reações catalisadas pela 6xHis-NahG, GH-NahG e para os mutantes 6xHis-NahG-E38A e 6xHis-NahG-R192A foram determinados seguindo a cinética de Michaelis-Menten. Os valores das constantes cinéticas  $K_M$ ,  $k_{cat}$  e  $k_{cat}/K_M$  para o ácido salicílico, o FAD e o NADH são apresentados na Tabela 23 e os gráficos de Michaelis-Menten para o substrato ácido salicílico e as coenzimas FAD e NADH na Figura 58.

Tabela 23 – Atividade das enzimas 6xHis-NahG, GH-NahG, 6xHis-NahG-E38A e 6xHis-NahG-R192A sobre o ácido salicílico, FAD e NADH.

Enzima	Ligante	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_M$ ( $\times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )
<b>6xHis-NahG</b>	AS	157,14	5,97	34
	FAD	0,13	2,70	20770
	NADH	37,08	4,67	126
<b>GH-NahG</b>	AS	27,30	4,36	160
	FAD	1,26	2,4	1900
	NADH	22,74	6,16	271
<b>6xHis-NahG-E38A</b>	AS	47,97	1,43	29
	FAD	11,43	1,41	123
	NADH	234,07	2,07	8
<b>6xHis-NahG-R192A</b>	AS	6666,49	3,19	5
	FAD	94,09	1,04	110
	NADH	1796,98	2,03	1

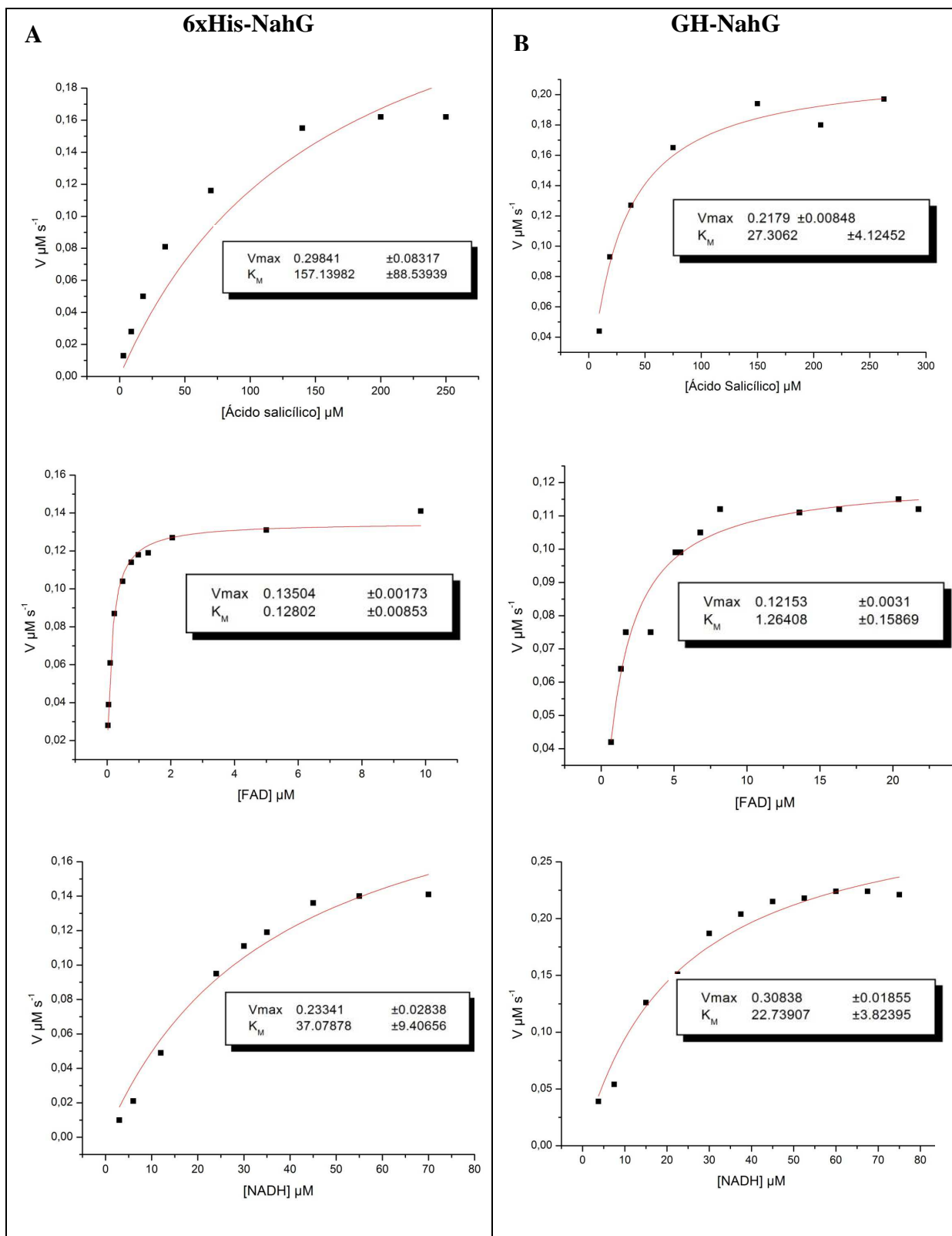


Figura 58 - Efeito do substrato ácido salicílico e das coenzimas FAD e NADH nas atividades das enzimas 6xHis-NahG (A), GH-NahG (B). Continua.

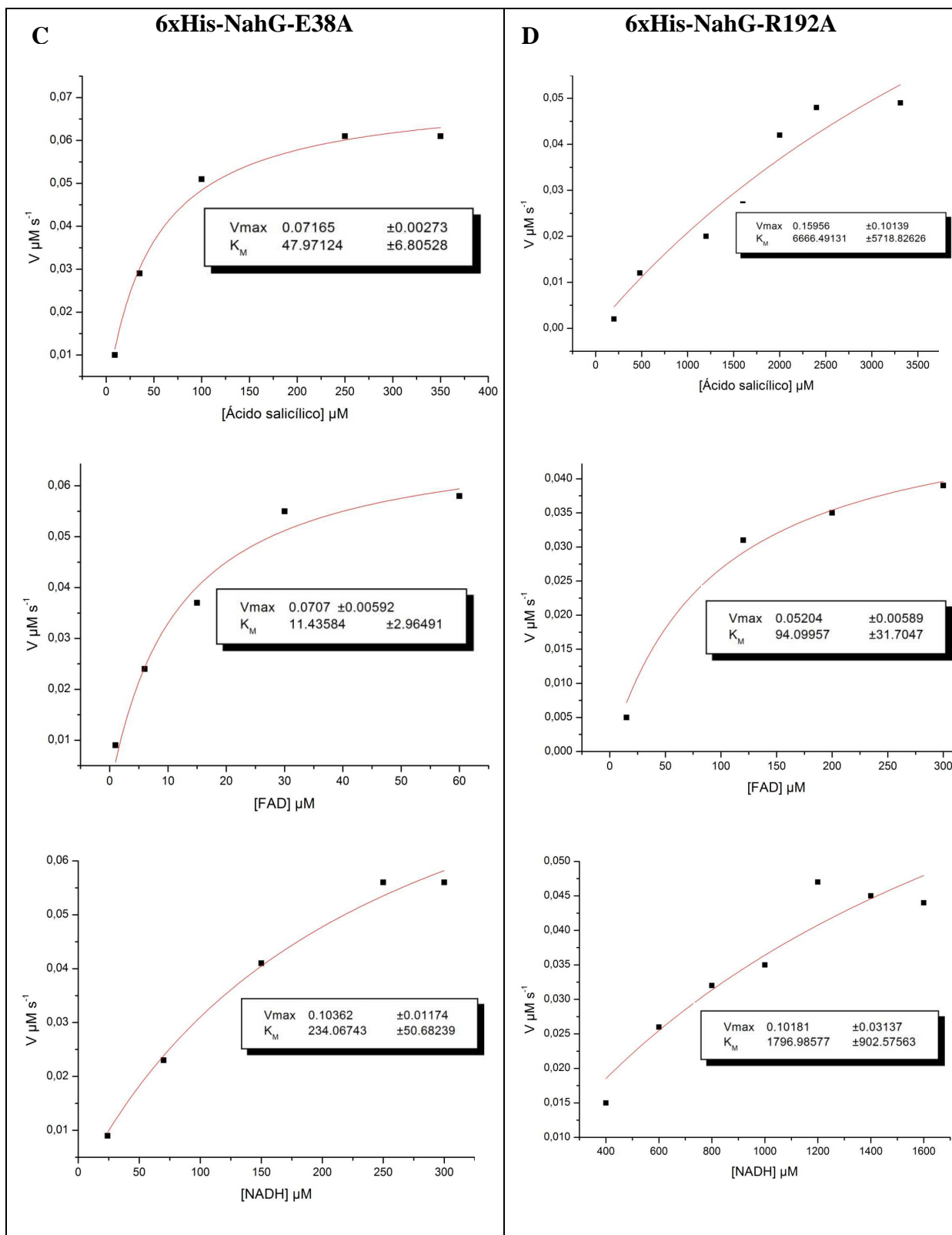


Figura 58 - Continuação. Efeito do substrato ácido salicílico e das coenzimas FAD e NADH nas atividades das enzimas mutantes 6xHis-NahG-E38A (C) e 6xHis-NahG-R192A (D).

As diferenças observadas nos valores de  $K_M$  para as enzimas NahG com cauda de seis histidinas (6xHis-NahG) e sem cauda de histidinas (GH-NahG) para o AS, o FAD e o NADH foram bastante significativas. Essas diferenças podem ser devido à cauda de histidinas ou ao fato dos experimentos terem sido realizados em equipamentos diferentes. Os ensaios cinéticos com a proteína GH-NahG foram realizados no Laboratório de Espectroscopia UV-Vi do Departamento de Química, ICEX, UFMG em colaboração com o Prof. Tiago Antônio da Silvia Brandão. Para esses ensaios foi utilizado o espectrofotômetro Cary50. Os experimentos com a proteína 6xHis-NahG e seus mutantes foram realizados no Laboratório do Prof. Dr. Alvan C. Hengge da *Utah State University*, durante o Doutorado Sanduíche da autora dessa tese. Os ensaios foram realizados com os leitores de placas H4 Synergy (BioTek) e Versa Max (Molecular Devices), além do espectrofotômetro Cary50. Estes leitores de placas foram utilizados com o objetivo de fazer mais reações em um tempo menor e consumir menos reagentes. Além disso, os valores de  $K_M$  para os mutantes testados aumentaram bastante com relação ao valor da proteína nativa, fazendo com que se tornasse inviável dosar no Cary 50 (caminho ótico de 1,0 ou 0,5 cm) uma solução com 10 vezes o valor do  $K_M$  do NADH. Dessa forma, a utilização de leitores de placas, nos quais se pode utilizar pequenos volumes, como 100  $\mu$ L, foi uma alternativa para a caracterização cinética dos mutantes.

Foram realizados ensaios com a proteína NahG com cauda de histidinas na *Utah State University*, mesmo após a realização dos ensaios com a proteína GH-NahG no Brasil, pois os ensaios com os mutantes foram feitos sem a clivagem da cauda de histidinas. Dessa forma, para efeito de comparação, os testes foram feitos. Além disso, ensaios com a proteína 6xHis-NahG não foram realizados no Laboratório do Departamento de Química devido à ausência de amostra nos períodos dos experimentos.

A enzima 6xHis-NahG-E38A apresenta mutação no glutamato 38, que é um resíduo conservado entre as enzimas da família da NahG, e faz parte de um *loop* móvel que interage com o FAD (*FAD binding domain*). A mutação para alanina foi feita para avaliar a importância desse resíduo na interação da enzima com o FAD. Pode-se perceber que houve um aumento significativo no valor do  $K_m$  para o FAD. Além disso, a velocidade máxima da reação caiu de 0,15  $\mu$ M por segundo para cerca de 0,060  $\mu$ M por segundo, evidenciando a participação do resíduo 38 na interação da enzima com o FAD.

No mutante 6xHis-NahG-R192A o resíduo de aminoácido que foi mutado, a arginina 192, fica posicionado no centro ativo da enzima e está envolvido com interação com FAD. Observou-se um grande aumento no valor de  $K_m$  para o FAD, além da diminuição na velocidade máxima da reação. A velocidade máxima da reação catalisada pelo mutante 6xHis-NahG-R192A foi similar à observada para 6xHis-NahG-D38A. Evidencia-se, assim, a importância deste resíduo para a interação com o cofator.

Diante da dificuldade para estabelecer os parâmetros para os ensaios cinéticos dos mutantes usando um espectrofotômetro convencional, uma vez que os valores de  $K_M$  para estes aumentaram bastante com relação ao valor da proteína nativa, optou-se pelo uso dos leitores de placas. Contudo, por várias vezes, amostras idênticas apresentaram valores bem diferentes durante a cinética nesta nova abordagem. Dessa forma, os experimentos para os demais mutantes não serão apresentados e serão repetidos futuramente.

## **6 DISCUSSÃO**

Os genes *nahB* e *nahG* de *Pseudomonas putida* G7 foram clonados em vetores pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO e pGEM<sup>®</sup>-T respectivamente, e subclonados em vetor de expressão pET-28a-TEV, o qual expressa a proteína fusionada com uma cauda de seis histidinas na porção N<sup>o</sup> terminal. A proteína recombinante 6xHis-NahB expressa em células de *Escherichia coli* Rosetta<sup>™</sup> (DE3) a 37°C apresentou-se na fração insolúvel. Dessa forma, reduziu-se a temperatura para 18°C com o objetivo de evitar a agregação proteica. Com essa estratégia, a maior parte da proteína ficou presente na fração solúvel. O mesmo protocolo foi utilizado para a expressão da enzima 6xHis-NahG, a qual, também, foi obtida na fração solúvel.

Para a lise da cultura celular da enzima 6xHis-NahB foram utilizados lisozima, choque térmico e sonicador. A purificação da proteína recombinante foi feita por cromatografia de afinidade utilizando coluna HisTrap<sup>™</sup> HP 5 mL e por cromatografia de exclusão molecular utilizando coluna Hiload<sup>™</sup> 16/60 Superdex 200. Após a cromatografia de afinidade, a proteína foi dialisada e concentrada contra PEG 10.000 antes de ser aplicada na coluna de exclusão molecular. A proteína produzida por esse protocolo, o qual foi denominado protocolo inicial, precipitou. Pelo perfil da purificação por exclusão molecular, verificou-se que a amostra apresentou vários estados de agregação, não sendo adequada para ensaios estruturais.

Visando-se contornar a instabilidade da enzima 6xHis-NahB, foram adotadas outras estratégias, como adição de ligantes, diferentes métodos para lise, dessalinização, concentração e purificação, que fossem menos agressivas às proteínas. O catecol, um composto parecido estruturalmente com o ligante natural da enzima, foi adicionado ao sobrenadante proveniente da centrifugação do lisado celular. Na purificação por exclusão molecular na presença de catecol, observou-se que o perfil cromatográfico ficou mais homogêneo, com um pico principal. Ensaios de espalhamento dinâmico da luz em função do tempo evidenciaram que com a adição de um ligante, catecol ou carbenoxolona, a enzima permaneceu no estado monodisperso com índice de polidispersividade de 17,2 %. Além disso, a enzima apresentou-se no estado tetramérico, corroborando os dados de cromatografia de exclusão molecular e dados da literatura (Patel & Gibson, 1974). Apesar do aumento da estabilidade da proteína com a adição de ligante, não houve formação de cristais. Dessa forma, diferentes protocolos de lise e purificação foram utilizados.

Em um protocolo denominado otimizado, utilizou-se o homogeneizador EmulsiFlex-C3 para romper as células, para dessalinização utilizou-se a coluna – HiPrep 26/10 e a concentração da proteína foi feita com um concentrador Vivaspin para centrífuga. Ensaios de espalhamento dinâmico da luz em função do tempo da amostra obtida por este protocolo na presença ou ausência de ligantes indicaram que a proteína ficou monodispersa e com índice de polidispersividade de 10,1%. Com a proteína produzida com o protocolo otimizado foi possível a obtenção de cristais.

O mesmo protocolo otimizado foi utilizado para produção da enzima 6xHis-NahG. A análise da proteína 6xHis-NahG em ensaios de espalhamento dinâmico da luz indicou que a enzima está no estado monomérico em solução, corroborando dados de cromatografia de exclusão molecular e dados da literatura (You, et al., 1990). A polidispersividade da solução proteica foi de 10,3%, o que caracteriza uma amostra monodispersa e adequada para ensaios estruturais. Entretanto, não houve o crescimento de cristais. Estes somente foram obtidos após a adição do substrato natural da enzima, ácido salicílico, no tampão de lise. A interação da enzima com um ligante provavelmente a estabilizou, permitindo a formação de cristais.

Os cristais das proteínas 6xHis-NahB e 6xHis-NahG foram submetidos à difração de raios-X nas linhas D03B-MX1 e W01B-MX2 do LNLS para coleta dos dados e determinação da estrutura tridimensional. Após o estabelecimento das melhores condições para a cristalização da 6xHis-NahB, obtivemos um conjunto de dados com a resolução de 1,64 Å. A estrutura da enzima foi resolvida pelo método de Substituição Molecular utilizando a estrutura da BphB<sub>B-356</sub> (PDB ID 2Y93) (Dhindwal, et al., 2011) como modelo de fase. Foi obtida uma solução com TFZ de 17,2 e LLG de 242. O modelo construído apresentou coeficiente de correlação de 82%. Após vários ciclos de refinamento os valores finais de  $R_{work}$  e  $R_{free}$  foram 17,9% e 22,1%.

Na estrutura da 6xHis-NahB foram identificados 231 resíduos de aminoácidos, não verificando-se densidade eletrônica entre os resíduos de aminoácidos 186 a 215. Pela sobreposição das estruturas tridimensionais da 6His-NahB com a da BphB<sub>B-356</sub> verificou-se que esta também não apresenta densidade eletrônica entre os resíduos de aminoácidos 186 e 215. Dessa forma, esta região poderia ser formada por um *loop* flexível que se ajustaria para interação com o substrato. Com a sobreposição da 6xHis-NahB com a BphB<sub>B-356</sub> complexada com NAD<sup>+</sup> (PDB 2Y99), observa-se a presença de um *loop* em parte da região em que não se

observava densidade eletrônica. Além disso, quando há a ligação do  $\text{NAD}^+$  e do produto da enzima, no caso da BphB<sub>B-356</sub>, o 2,3-dihidroxibifenil, observam-se todos os aminoácidos da região que não se observa densidade eletrônica na apoenzima. Portanto, a região entre os aminoácidos 186 e 215 da 6xHis-NahB provavelmente corresponde a um *loop* flexível que se ajustaria para a ligação da coenzima e do substrato. A presença desse *loop* flexível poderia contribuir para explicar a presença de 20% de estrutura desordenada que foi identificada nos experimentos de Dicroísmo Circular para a proteína 6xHis-NahB.

Foram feitos vários testes de cocristalização e *soaking* para tentar se obter a 6xHis-NahB complexada com  $\text{NAD}^+$  ou com substratos análogos ou com seu produto. Entretanto, em todas as estruturas analisadas não foi verificada densidade eletrônica correspondente ao  $\text{NAD}^+$ , nem aos análogos do substrato, nem ao produto e nem ao *loop* flexível. A ausência de densidade eletrônica na região correspondente ao *loop* flexível ou aos diferentes ligantes utilizados indica que, provavelmente, estes não interagiram com alta afinidade com a enzima e, conseqüentemente o *loop* permaneceu flexível. A análise cinética da enzima ainda não foi realizada devido à indisponibilidade do substrato até o momento de término dessa tese.

Os primeiros conjuntos de dados coletados para a 6xHis-NahG foram de cristais nativos, os quais foram processados, entretanto não se conseguiu resolver a estrutura pelo método de Substituição Molecular. Dessa forma, foram coletados conjuntos de dados de difração de cristais derivados obtidos a partir de *soaking* com solução de iodeto de sódio, para resolução da estrutura por difração anômala simples. Houve inserção de átomos pesados no cristal que foi imerso por 30 seg em solução com 62,5 mM de iodo. Além disso, foram coletados outros conjuntos da proteína nativa, para resolução da estrutura por substituição isomórfica simples com espalhamento anômalo. A estrutura da 6xHis-NahG foi resolvida por SAD e por SIRAS e, após o refinamento, a estrutura resolvida por SAD, cujo conjunto de dados apresentaram uma maior resolução, apresentou menores valores de  $R_{\text{work}}$  e  $R_{\text{free}}$ . Dessa forma, esta foi utilizada para análise da estrutura.

No modelo 3D da 6xHis-NahG a 2,00 Å resolvida por SAD foram definidos 416 resíduos de aminoácidos dos 450 que a enzima possui. Não foi visualizada densidade eletrônica da cauda de seis histidinas e nem entre os resíduos de aminoácidos 248 e 251. A 6xHis-NahG de *Pseudomonas putida* G7 pertence à família de proteínas com domínio de ligação ao FAD e é estruturalmente similar a outras hidroxilases dependentes de FAD, sendo

formada por três folhas beta constituídas por oito, quatro e três fitas- $\beta$  e por quatorze  $\alpha$ -hélices. Ela possui um domínio de ligação de FAD/NAD(P) e um domínio de redutases que interagem com FAD ou domínio C terminal.

As proteínas com maiores similaridades estruturais com a NahG de *P. putida* G7 são a urato oxidase HpxO de *Klebsiella pneumoniae* e a 3-hidroxibenzoato-6-hidroxilase de *Rhodococcus jostii*. As duas últimas foram obtidas complexadas com FAD e substrato ou somente com FAD. A 6xHis-NahG foi cristalizada na ausência de FAD e as tentativas para cristalizar a 6xHis-NahG com este cofator não foram bem sucedidas. Dessa forma, a comparação entre as estruturas da 6xHis-NahG com outras flavoproteínas hidroxilases pode indicar regiões de ligação do FAD e do ácido salicílico na NahG de *P. putida* G7, assim como evidenciar as modificações estruturais que ocorrem devido às interações com o FAD e substrato, uma vez que a 6xHis-NahG é a única da sua família com estrutura resolvida sem substrato e sem FAD.

A sobreposição das estruturas da 3-hidroxibenzoato-6-hidroxilase, a qual apresenta FAD e fosfatidilglicerol ligados, e a NahG apoenzima evidencia a presença de um *loop* móvel, o qual está relacionado à interação com o FAD. Este loop corresponde à região formada pelos resíduos de aminoácidos 36 a 52 na NahG. Os resíduos entre 154 e 169 estão relacionados com a interação com NADH (Suzuki, et al., 2000) e o resíduo 226 com a interação com o substrato (Hicks, et al., 2013; Montersino, et al., 2013). A histidina 226 da NahG corresponde à histidina 213 da 3-hidroxibenzoato-6-hidroxilase e à arginina 204 da urato oxidase HpxO. A importância da H213 e R204 citadas na interação com o substrato já foram demonstradas pela análise dos mutantes H213S (Montersino, et al., 2013) e R204Q (Hicks, et al., 2013).

Foram feitas mutações sítio dirigidas nos resíduos mais conservados para avaliar a participação dos mesmos na atividade catalítica da enzima. Foram produzidos e sequenciados doze mutantes. Os testes cinéticos foram iniciados para as enzimas 6xHis-NahG, GH-NahG e para os mutantes 6xHis-NahG-E38A e 6xHis-NahG-R192A. Entretanto, ainda são necessários mais ensaios para caracterização cinética final dessas enzimas. Os outros mutantes já foram obtidos, porém os testes cinéticos ainda não foram iniciados.

A enzima 6xHis-NahG-E38A apresenta mutação no glutamato 38, que é um resíduo conservado entre as enzimas da família da NahG, e faz parte de um *loop* móvel que interage com o FAD (*FAD binding domain*). A mutação para alanina foi feita para avaliar a importância desse resíduo na interação da enzima com o FAD. Verificou-se que houve um aumento significativo no valor do Km para o FAD. Além disso, a velocidade máxima da reação caiu de 0,15  $\mu\text{M}$  por segundo para cerca de 0,060  $\mu\text{M}$  por segundo, evidenciando a participação do resíduo 38 na interação da enzima com o FAD. No mutante 6xHis-NahG-R192A o resíduo de aminoácido que foi mutado, a arginina 192, fica posicionado no centro ativo da enzima e está envolvido com interação com FAD. Observou-se um grande aumento no valor de Km para o FAD, além da diminuição na velocidade máxima da reação. A velocidade máxima da reação catalisada pelo mutante 6xHis-NahG-R192A foi similar à observada para 6xHis-NahG-D38A. Evidencia-se, assim, a importância deste resíduo para a interação com o cofator.

Entre as enzimas das vias superior e inferior de degradação do naftaleno em *Pseudomonas putida*, as enzimas NahAb, NahAc, NahAd, NahC, NahD, NahH e NahJ tiveram sua estrutura tridimensional resolvida e depositada no PDB por diversos grupos de pesquisa. No grupo de Biologia Estrutural da Universidade Federal de Minas Gerais, onde esta tese foi desenvolvida, as enzimas NahF, NahI, NahK e NahK complexada com NahL são estudadas há algum tempo e também tiveram suas estruturas tridimensionais resolvidas (algumas já depositadas no PDB). Nesta tese de doutorado foram resolvidas ainda as estruturas das enzimas NahB e NahG.

Dessa forma, nesta tese de doutorado foram resolvidas as estruturas das enzimas NahB e NahG. No grupo de Biologia Estrutural da Universidade Federal de Minas Gerais, onde esta tese foi desenvolvida, as enzimas NahF, NahI, NahK e NahK complexada com NahL são estudadas há algum tempo e também tiveram suas estruturas tridimensionais resolvidas (algumas já depositadas no PDB). Outras enzimas das vias superior e inferior de degradação do naftaleno em *Pseudomonas putida*, as enzimas NahAb, NahAc, NahAd, NahC, NahD, NahH e NahJ tiveram sua estrutura tridimensional resolvida e depositada no PDB por diversos grupos de pesquisa.

A determinação da estrutura das enzimas envolvidas na degradação do naftaleno permite entender seus mecanismos de ação; atuar de forma orientada na estrutura destas moléculas e, eventualmente, alterar propriedades físico-químicas objetivando alguma aplicação biotecnológica específica; avaliar a interação e sinergismo entre as enzimas da via, além de contribuir para o conhecimento básico da relação estrutura-função de proteínas, contribuindo para que, futuramente, essas macromoléculas sejam utilizadas como biorremediadoras ou biomarcadoras, através de técnicas moleculares.

## **7 CONCLUSÕES**

## 7.1 *cis*-NAFTALENO DIHIDRODIOL DESIDROGENASE

- A enzima NahB recombinante, produzida por protocolo específico ou na presença de ligantes, foi purificada em larga escala, com alto grau de pureza e apresenta-se monodispersa e no estado tetramérico em solução.
- A 6xHis-NahB produzida na presença de ligantes ou pelo protocolo otimizado é estável e pode ser cristalizada em condições específicas.
- Após refinamento das condições de cristalização, um cristal de 6xHis-NahB, com simetria descrita pelo grupo espacial I222, difratou a 1,64 Å com parâmetros  $a=63,0$ ;  $b=69,3$ ,  $c=117,6$  Å.
- A estrutura tridimensional da 6xHis-NahB de *Pseudomonas putida* G7 apresenta o clássico motivo Rossmann de ligação de nucleotídeo, sendo formada por uma folha beta central constituída por sete fitas- $\beta$  e por nove  $\alpha$ -hélices, sendo que são 3 hélices de cada lado flanqueando a folha beta.
- Após vários ciclos de refinamento os valores finais de  $R_{work}$  e  $R_{free}$  foram 17,9% e 22,1% para a estrutura da NahB recombinante.
- A região entre os resíduos de aminoácidos 186 e 215 constitui um *loop* móvel que parece estar relacionado com as interações do  $NAD^+$  e substrato.

## 7.2 SALICILATO HIDROXILASE

- A enzima NahG recombinante produzida por protocolo específico foi purificada em grande quantidade, com alto grau de pureza e permaneceu estável e no estado monomérico em solução.
- Cristais da enzima recombinante foram obtidos somente após a adição de ácido salicílico no tampão de lise.
- Após refinamento das condições de cristalização, um cristal nativo de 6xHis-NahG, com simetria descrita pelo grupo espacial  $P2_12_12_1$ , difratou a 2.20 Å. Um cristal derivado com iodo, obtido por *soaking*, difratou a 2.00 Å de resolução.
- A estrutura da 6xHis-NahG foi resolvida por SAD e após vários ciclos de refinamento os valores de  $R_{work}$  e  $R_{free}$  foram 22,3 e 24,7, respectivamente.
- A 6xHis-NahG de *Pseudomonas putida* G7 é estruturalmente similar a outras hidroxilases dependentes de FAD, sendo formada por três folhas beta constituídas por oito, quatro e três fitas- $\beta$  e por quatorze  $\alpha$ -hélices.
- Os valores de  $K_m$  para o ácido salicílico, FAD e NADH para a enzima 6xHis-NahG foram 157,14; 0,13 e 37,08  $\mu M$ , respectivamente.

## **8 PERSPECTIVAS**

## 8.1 *cis*-NAFTALENO DIHIDRODIOL DESIDROGENASE

- Estudos cinéticos da enzima recombinante NahB, para determinação das constantes catalíticas, pH e temperatura ótimos, visto que, recentemente, foi encontrado um fornecedor comercial para o substrato natural da enzima.
- Obtenção de cristais da NahB complexada com seu substrato ou compostos análogos; com NAD<sup>+</sup> e com compostos análogos e NAD<sup>+</sup>, para análise das alterações estruturais promovidas pela interação da enzima com ligantes.
- Mutagênese sítio-dirigida de resíduos catalíticos críticos para a atividade da enzima e realização de ensaios cinéticos desses mutantes.
- Determinar a estrutura tridimensional dos mutantes da NahB.
- Ensaios cinéticos com compostos similares ao substrato da NahB, para avaliação da especificidade da enzima.

## 8.2 SALICILATO HIDROXILASE

- Obtenção da estrutura da enzima NahG complexada com FAD; com FAD e ácido salicílico e com NADH, para análise das alterações estruturais devido à interação com as coenzimas e o substrato.
- Ensaio cinético com os mutantes da 6xHis-NahG para avaliação da importância dos resíduos para a atividade enzimática e entendimento do mecanismo de ação da enzima.
- Determinação da estrutura tridimensional dos mutantes.

## **9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abdo, K.M., *et al.* (2001) Toxicity and carcinogenicity study in F344 rats following 2 years of whole-body exposure to naphthalene vapors, *Inhalation toxicology*, **13**, 931-950.
- Abdo, K.M.E., S. L.; McDonald, M.; Joiken, M. P.; Adkins, B.; Haseman, J. K. (1992) Naphthalene: a respiratory tract toxicant and carcinogen for mice, *Inhal. Toxicol*, 393–409.
- Adams, P.D., *et al.* (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*. pp. 213-221.
- Afonine, P.V., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D (2005) The Phenix refinement framework, *CCP4 Newsl*, **42**.
- Ahuja, S.K., Ferreira, G.M. and Moreira, A.R. (2004) Utilization of enzymes for environmental applications, *Critical Reviews in Biotechnology*, **24**, 125-154.
- Alcalde, M., *et al.* (2006) Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes, *Trends in biotechnology*, **24**, 281-287.
- Balaji, V., Arulazhagan, P. and Ebenezer, P. (2014) Enzymatic bioremediation of polyaromatic hydrocarbons by fungal consortia enriched from petroleum contaminated soil and oil seeds, *Journal of environmental biology / Academy of Environmental Biology, India*, **35**, 521-529.
- Bamforth, S.M. and Singleton, I. (2005) Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **80**, 723-736.
- Banachowicz, E. (2006) Light scattering studies of proteins under compression, *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, **1764**, 405-413.
- Barriault, D., *et al.* (1999) cis-2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphenyl dehydrogenase and cis-1, 2-dihydro-1,2-dihydroxynaphthalene dehydrogenase catalyze dehydrogenation of the same range of substrates, *Biochemical and biophysical research communications*, **260**, 181-187.
- Bento, F.M., *et al.* (2003) Bioremediation of Soil Contaminated by Diesel Oil, *Braz J Microbiol*, **34**, 65-68.
- Berman, H.M., *et al.* (2000) The Protein Data Bank, *Nucleic Acids Research*, **28**, 235-242.
- Blommel, P.G. and Fox, B.G. (2007) A combined approach to improving large-scale production of tobacco etch virus protease, *Protein Expression and Purification*, **55**, 53-68.
- Buckpitt, A., *et al.* (2002) Naphthalene-induced respiratory tract toxicity: metabolic mechanisms of toxicity, *Drug metabolism reviews*, **34**, 791-820.
- Caffrey, M. and Cherezov, V. (2009) Crystallizing membrane proteins using lipidic mesophases, *Nat Protoc*, **4**, 706-731.
- Calvo, C., *et al.* (2009) Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects, *Sci Total Environ*, **407**, 3634-3640.
- Carneiro, F.R., *et al.* (2006) Spectroscopic characterization of the tumor antigen NY-REN-21 and identification of heterodimer formation with SCAND1, *Biochemical and biophysical research communications*, **343**, 260-268.
- Carneiro, F.R.G., *et al.* (2006) Spectroscopic characterization of the tumor antigen NY-REN-21 and identification of heterodimer formation with SCAND1, *Biochemical and biophysical research communications*, **343**, 260-268.
- Carvalho, A.L., Trincão, J. and Romão, M.J. (2009) X-ray crystallography in drug discovery, *Methods in molecular biology*, **572**, 31-56.
- Cornish-Bowden, A. (2012) *Fundamentals of Enzyme Kinetics*. Wiley-Blackwell.
- Costa, D.M.A. (2010) Clonagem do gene nahB de *Pseudomonas putida* G7 e expressão da enzima NahB envolvida na degradação de componente do petróleo para estudos estruturais. 2010. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Bioquímica e Imunologia. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.
- Cox, D.L.N.M.M. (2011) *Principles of Biochemistry*.
- Davis, I.W., *et al.* (2007) MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids, *Nucleic Acids Research*, **35**, W375-W383.

- Deng, M.C., *et al.* (2014) Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading bacterium *Achromobacter* sp. HZ01 from the crude oil-contaminated seawater at the Daya Bay, southern China, *Mar Pollut Bull*, **83**, 79-86.
- Dev, S. and Surolia, A. (2006) Dynamic light scattering study of peanut agglutinin: Size, shape and urea denaturation, *Journal of Biosciences*, **31**, 551-556.
- Dhindwal, S., *et al.* (2011) Biochemical studies and ligand-bound structures of biphenyl dehydrogenase from *Pandoraea pnomenus* strain B-356 reveal a basis for broad specificity of the enzyme, *The Journal of biological chemistry*, **286**, 37011-37022.
- Eckert, M. (2012) Max von Laue and the discovery of X-ray diffraction in 1912. *Annalen der physic.* pp. A83-A85.
- Emsley, P., *et al.* (2010) Features and development of Coot, *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, **66**, 486-501.
- EPA (2004) *Environmental Protection Agency. Toxicological review of naphthalene (CAS No. 91-20-3)*.
- Fang, L., *et al.* (2007) An improved strategy for high-level production of TEV protease in *Escherichia coli* and its purification and characterization, *Protein Expression and Purification*, **51**, 102-109.
- Ferredamare, A.R. and Burley, S.K. (1994) Use of Dynamic Light-Scattering to Assess Crystallizability of Macromolecules and Macromolecular Assemblies, *Structure*, **2**, 357-359.
- Ferrero, M., *et al.* (2002) Coexistence of two distinct copies of naphthalene degradation genes in *Pseudomonas* strains isolated from the western Mediterranean region, *Applied and environmental microbiology*, **68**, 957-962.
- Ghazali, F.M., *et al.* (2004) Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium, *Int Biodeter Biodegr*, **54**, 61-67.
- Gill, S.C. and Vonhippel, P.H. (1989) Calculation of Protein Extinction Coefficients from Amino-Acid Sequence Data, *Analytical Biochemistry*, **182**, 319-326.
- Greenhagen, B.T., *et al.* (2008) Crystal structure of the pyocyanin biosynthetic protein PhzS, *Biochemistry-Us*, **47**, 5281-5289.
- Guimaraes, B.G., *et al.* (2009) The MX2 macromolecular crystallography beamline: a wiggler X-ray source at the LNLS, *J Synchrotron Radiat*, **16**, 69-75.
- Habe, H. and Omori, T. (2003) Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **67**, 225-243.
- Haritash, A.K. and Kaushik, C.P. (2009) Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review, *Journal of hazardous materials*, **169**, 1-15.
- Hicks, K.A., *et al.* (2013) Structural and Mechanistic Studies of HpxO, a Novel Flavin Adenine Dinucleotide-Dependent Urate Oxidase from *Klebsiella pneumoniae*, *Biochemistry-Us*, **52**, 477-487.
- Hozjan, V., *et al.* (2008) Ligand supplementation as a method to increase soluble heterologous protein production, *Expert Review of Proteomics*, **5**, 137-143.
- IARC (2002) IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene, Vol. 82. France, Lyon, pp. 367-435.
- Johnsen, A.R., Wick, L.Y. and Harms, H. (2005) Principles of microbial PAH-degradation in soil, *Environmental Pollution*, **133**, 71-84.
- Kallberg, Y., *et al.* (2002) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs) - Coenzyme-based functional assignments in completed genomes, *European Journal of Biochemistry*, **269**, 4409-4417.
- Kantardjieff, K.A. and Rupp, B. (2003) Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals, *Protein Science*, **12**, 1865-1871.
- Kappell, A.D., *et al.* (2014) The polycyclic aromatic hydrocarbon degradation potential of Gulf of Mexico native coastal microbial communities after the Deepwater Horizon oil spill, *Frontiers in microbiology*, **5**, 205.

- Kavanagh, K., *et al.* (2008) The SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes, *Cellular and Molecular Life Sciences*, **65**, 3895-3906.
- Kibbe, W.A. (2007) OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator, *Nucleic Acids Research*, **35**, W43-W46.
- Kulakov, L.A., *et al.* (2000) Cloning and characterization of a novel cis-naphthalene dihydrodiol dehydrogenase gene (narB) from *Rhodococcus* sp NCIMB12038, *Fems Microbiology Letters*, **182**, 327-331.
- Lu, X.Y., Zhang, T. and Fang, H.H.P. (2011) Bacteria-mediated PAH degradation in soil and sediment, *Applied microbiology and biotechnology*, **89**, 1357-1371.
- McCoy, A.J., *et al.* (2007) Phaser crystallographic software, *Journal of applied crystallography*, **40**, 658-674.
- Montersino, S., *et al.* (2013) Crystal Structure of 3-Hydroxybenzoate 6-Hydroxylase Uncovers Lipid-assisted Flavoprotein Strategy for Regioselective Aromatic Hydroxylation, *Journal of Biological Chemistry*, **288**, 26235-26245.
- North, D.W., *et al.* (2008) A review of whole animal bioassays of the carcinogenic potential of naphthalene, *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*, **51**, S6-14.
- NTP (1992) National Toxicology Program. Toxicology and carcinogenesis studies of naphthalene (CAS No. 91-20-3) in B6C3F1 mice (inhalation studies). Technical Report Series No. 410, NIH Publication No. 92-3141; Research Triangle Park, NC.
- NTP (2000) National Toxicology Program. Toxicology and carcinogenesis studies of naphthalene (CAS No. 91-20-3) in F344/N rats (inhalation studies). CNTP Technical Report Series No. 500; NIH publication No. 01-4434, Research Triangle Park, NC.
- Orkin, S. (1990) Molecular-Cloning - a Laboratory Manual, 2nd Edition - Sambrook, J, Fritsch, E, Maniatis, T, *Nature*, **343**, 604-605.
- Pace, C.N., *et al.* (1995) How to Measure and Predict the Molar Absorption-Coefficient of A Protein, *Protein Science*, **4**, 2411-2423.
- Pacwa-Plociniczak, M., *et al.* (2014) Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. P-1 strain as a potential tool for bioremediation of petroleum-contaminated soil, *Environmental science and pollution research international*.
- Patel, T.R. and Gibson, D.T. (1974) Purification and Properties of (+)-Cis-Naphthalene Dihydrodiol Dehydrogenase of *Pseudomonas*-Putida, *Journal of bacteriology*, **119**, 879-888.
- Peng, R.H., *et al.* (2008) Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons, *Fems Microbiology Reviews*, **32**, 927-955.
- Persson, B., *et al.* (2003) Coenzyme-based functional assignments of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs), *Chemico-Biological Interactions*, **143**, 271-278.
- Polikarpov, I., *et al.* (1998) Set-up and experimental parameters of the protein crystallography beamline at the Brazilian National Synchrotron Laboratory, *Journal of Synchrotron Radiation*, **5**, 72-76.
- Ranjbar, B. and Gill, P. (2009) Circular Dichroism Techniques: Biomolecular and Nanostructural Analyses- A Review, *Chemical Biology & Drug Design*, **74**, 101-120.
- Rhodes, G. (2006) *Crystallography Made Crystal Clear - A Guide for Users of Macromolecular Models*
- Rupp, B. (2009) *Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology*. Garland Science.
- Saridakis, E. and Chayen, N.E. (2009) Towards a 'universal' nucleant for protein crystallization, *Trends in biotechnology*, **27**, 99-106.
- Sota, M., *et al.* (2006) Genomic and functional analysis of the IncP-9 naphthalene-catabolic plasmid NAH7 and its transposon Tn4655 suggests catabolic gene spread by a tyrosine recombinase, *Journal of bacteriology*, **188**, 4057-4067.

- Sreerama, N. and Woody, R.W. (2004) Computation and analysis of protein circular dichroism spectra, *Numerical Computer Methods, Pt D*, **383**, 318-351.
- Suzuki, K., *et al.* (2000) Overexpression of salicylate hydroxylase and the crucial role of Lys(163) as its NADH binding site, *Journal of Biochemistry*, **128**, 293-299.
- Terrell, C.R., *et al.* (2013) Structural and kinetic characterization of two 4-oxalocrotonate tautomerase in *Methylobium petroleiphilum* strain PM1, *Archives of biochemistry and biophysics*, **537**, 113-124.
- Terwilliger, T.C., *et al.* (2009) Decision-making in structure solution using Bayesian estimates of map quality: the PHENIX AutoSol wizard, *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, **65**, 582-601.
- Terwilliger, T.C., *et al.* (2008) Iterative model building, structure refinement and density modification with the PHENIX AutoBuild wizard, *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, **64**, 61-69.
- Tsuda, M. and Iino, T. (1990) Naphthalene Degrading Genes on Plasmid Nah7 Are on A Defective Transposon, *Molecular & General Genetics*, **223**, 33-39.
- Van Hamme, J.D., Singh, A. and Ward, O.P. (2003) Recent advances in petroleum microbiology, *Microbiol Mol Biol R*, **67**, 503-+.
- Winn, M.D., *et al.* (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments, *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, **67**, 235-242.
- Wlodawer, A., *et al.* (2013) Protein crystallography for aspiring crystallographers or how to avoid pitfalls and traps in macromolecular structure determination, *The FEBS journal*, **280**, 5705-5736.
- Xu, N., *et al.* (2013) Study on bioadsorption and biodegradation of petroleum hydrocarbons by a microbial consortium, *Bioresour Technol*, **149**, 22-30.
- You, I.S., *et al.* (1990) Purification and Characterization of Salicylate Hydroxylase from *Pseudomonas-Putida Ppg7*, *Biochemical and biophysical research communications*, **169**, 1049-1054.
- Zhao, H.B., *et al.* (2005) Overexpression, purification and characterization of a new salicylate hydroxylase from naphthalene-degrading *Pseudomonas sp* strain ND6, *Microbiological Research*, **160**, 307-313.
- Zoete V, I.M., Ferber M, Cuendet MA, Michielin O (2013) Structure-Based, Rational Design of T Cell Receptors, *Frontiers in Immunology*, **4**, 19.

## **10 ANEXO**

## 10.1 ANEXO I

Tabela 24 - Estatísticas dos dados de difração de raios-X para cristais da 6xHis-NahB.

<b>Parâmetros</b>	<b>Cristal</b>	6xHis-NahB carbenoxolona	6xHis-NahB carbenoxolona	6xHis-NahB catecol	6xHis-NahB catecol NAD
<b>Comprimento de onda (Å)</b>		1.608	1.459	1.459	1.459
<b>Tempo de exposição (s)</b>		X	10	15	20
<b>Distância cristal-detector (mm)</b>		90	105	105	165
<b>Rotação por imagem (°)</b>		1	0.5	0.5	0.5
<b>Número de imagens</b>		200	256	480	260
<b>Número de imagens processadas</b>		200	256	180	210
<b>Grupo de espaço</b>		I222	I222	I222	I222
<b>Mosaicidade média</b>		0.92	1.10	1.06	3.35
<b>Parâmetros da célula unitária (Å)</b>		63.618	62.865	62.755	62.898
		69.505	69.254	69.226	67.321
		117.471	117.439	117.519	117.708
<b>Faixa de resolução (Å) (menor / maior faixa de resolução)</b>		50.00 - 2.21	50.00 - 1.90	50.00 - 2.00	50.00 - 3.10
		50.00 4.76	50.00 4.47	50.00 4.70	50.00 6.20
		2.29 2.21	1.95 1.9	2.05 2.00	3.24 3.10
<b>No. de observações (menor / maior faixa de resolução)</b>		101800	91932	58212	18348
		10352.6	8021	4642	2424
		6907	2908	3080	1753
<b>No. de reflexões únicas (menor / maior faixa de resolução)</b>		13162	19873	14049	3964
		1399	1671	1055	527
		1114	1077	770	381
<b>Completeza dos dados (%) (menor / maior faixa de resolução)</b>		98.3	96.4	79.4	81.7
		97.4	98.3	72.1	80.8
		85.2	69.4	57.5	64.1
<b>&lt;I/σ (I)&gt; (menor / maior faixa de resolução)</b>		19.1	21.3	16.4	15.9
		34.0	32.0	21.0	30.4
		3.3	2.9	4.9	5.3
<b>Redundância (menor / maior faixa de resolução)</b>		7.7	4.6	4.1	4.6
		7.4	4.8	4.4	4.6
		6.2	2.7	4.0	4.6
<b>Rmerge† (menor / maior faixa de resolução)</b>		0.090	0.061	0.063	0.078
		0.046	0.037	0.045	0.042
		0.418	0.285	0.223	0.226

<b>Parâmetros</b>	<b>Cristal</b>	6xHis-NahB catecol NAD+	6xHis-NahB NAD+	6xHis-NahB NAD+	6xHis-NahB NAD+
<b>Comprimento de onda (Å)</b>		1.459	1.459	1.459	1.459
<b>Tempo de exposição (s)</b>		10	10	X	X
<b>Distância cristal-detector (mm)</b>		100	85	X	X
<b>Rotação por imagem (°)</b>		0.5	0.5	X	X
<b>Número de imagens</b>		300	540	120	120
<b>Número de imagens processadas</b>		230	540	120	70
<b>Grupo de espaço</b>		I222	I222	I222	I222
<b>Mosaicidade média</b>		3.06	0.93	1.95	1.01
<b>Parâmetros da célula unitária (Å)</b>		62.544	62.962	62.593	62.595
		67.459	69.331	67.378	67.441
		118.374	117.556	118.182	118.314
<b>Faixa de resolução (Å) (menor / maior faixa de resolução)</b>		50.00 - 2.40	50.00 - 1.64	50.00 - 2.10	50.00 - 2.20
		50.00 5.17	50.00 4.04	50.00 4.81	50.00 4.74
		2.49 2.40	1.68 1.64	2.16 2.10	2.28 2.20
<b>No. de observações (menor / maior faixa de resolução)</b>		33164	305079	51897	29832
		3820	22371	1320	3654
		2215	6881	732	1765
<b>No. de reflexões únicas (menor / maior faixa de resolução)</b>		8778	31120	13007	10284
		955	2215	5940	1218
		633	1464	2049.6	679
<b>Completeza dos dados (%) (menor / maior faixa de resolução)</b>		85.7	97.2	87.0	79.1
		86.3	97.2	98.2	87.2
		62.4	69.9	60.1	54.0
<b>&lt;I/σ (I)&gt; (menor / maior faixa de resolução)</b>		13.1	24.2	14.2	10.5
		20.9	27.9	23.7	17.2
		4.4	3.0	3.3	3.1
<b>Redundância (menor / maior faixa de resolução)</b>		3.8	9.8	4.0	2.9
		4.0	10.1	4.5	3.0
		3.5	4.7	2.8	2.6
<b>Rmerge† (menor / maior faixa de resolução)</b>		0.077	0.088	0.073	0.087
		0.052	0.066	0.042	0.050
		0.225	0.345	0.284	0.328

<b>Parâmetros</b>	<b>Cristal</b>	6xHis-NahB bifenil	6xHis-NahB bifenil	6xHis-NahB bifenil	6xHis-NahB bifenil
<b>Comprimento de onda (Å)</b>		1.459	1.459	1.459	1.459
<b>Tempo de exposição (s)</b>		20	5	20	5
<b>Distância cristal-detector (mm)</b>		140	90	100	90
<b>Rotação por imagem (°)</b>		0.5	0.5	0.5	0.5
<b>Número de imagens</b>		420	480	528	184
<b>Número de imagens processadas</b>		200	355	420	184
<b>Grupo de espaço</b>		I222	I222	I222	I222
<b>Mosaicidade média</b>		1.81	1.30	0.48	0.98
<b>Parâmetros da célula unitária (Å)</b>		62.650	63.009	62.951	63.180
		67.122	69.366	69.422	69.493
		118.882	117.323	117.433	117.555
<b>Faixa de resolução (Å) (menor / maior faixa de resolução)</b>		50.00 - 2.40	50.00 - 1.77	50.00 - 1.78	50.00 - 1.69
		50.00 4.36	50.00 3.54	50.00 4.07	50.00 3.64
		2.55 2.40	1.85 1.77	1.83 1.78	1.75 1.69
<b>No. de observações (menor / maior faixa de resolução)</b>		32392	148174	185738	95700
		6340	22508	2168	10168
		3676	10498	1805	7392
<b>No. de reflexões únicas (menor / maior faixa de resolução)</b>		7683	23317	24577	28523
		1441	3310	16910	2905
		919	1810	9386	2464
<b>Completeza dos dados (%) (menor / maior faixa de resolução)</b>		75.8	91.6	98.5	97.1
		80.5	98.9	97.7	93.7
		55.8	58.0	88.0	84.9
<b>&lt;I/σ (I)&gt; (menor / maior faixa de resolução)</b>		14.3	24.2	27.1	22.4
		22.6	38.0	35.3	34.6
		4.7	4.7	5.4	5.2
<b>Redundância (menor / maior faixa de resolução)</b>		4.2	6.4	7.6	3.4
		4.4	6.8	7.8	3.5
		4.0	5.8	5.2	3.0
<b>Rmerge† (menor / maior faixa de resolução)</b>		0.070	0.061	0.064	0.047
		0.041	0.039	0.040	0.029
		0.235	0.280	0.276	0.193

<b>Parâmetros</b>	<b>Cristal</b>	6xHis-NahB bifenil	6xHis-NahB bifenil	6xHis-NahB bifenil
<b>Comprimento de onda (Å)</b>		1.459	1.459	1.459
<b>Tempo de exposição (s)</b>		7	10	7
<b>Distância cristal-detector (mm)</b>		90	80	90
<b>Rotação por imagem (°)</b>		0.5	0.5	0.5
<b>Número de imagens</b>		260	360	360
<b>Número de imagens processadas</b>		198	360	360
<b>Grupo de espaço</b>		I222	I222	I222
<b>Mosaicidade média</b>		1.22	0.63	1.62
<b>Parâmetros da célula unitária (Å)</b>		62.188	62.617	62.204
		66.978	67.127	67.489
		119.023	119.304	117.633
<b>Faixa de resolução (Å) (menor / maior faixa de resolução)</b>		50.00 - 1.70	50.00 - 1.59	50.00 - 1.88
		50.00 3.66	50.00 3.64	50.00 4.30
		1.76 1.70	1.64 1.59	1.94 1.88
<b>No. de observações (menor / maior faixa de resolução)</b>		82824	191201	105436
		10651	19584	11350
		3276	7034	4204
<b>No. de reflexões únicas (menor / maior faixa de resolução)</b>		25005	32211	17906
		2803	2923	1694
		1489	1901	858
<b>Completeza dos dados (%) (menor / maior faixa de resolução)</b>		90.1	94.4	87.6
		95.4	97.2	92.8
		54.7	67.4	51.8
<b>&lt;I/σ (I)&gt; (menor / maior faixa de resolução)</b>		18.5	30.3	13.6
		29.0	40.3	19.0
		2.7	4.2	5.7
<b>Redundância (menor / maior faixa de resolução)</b>		3.3	5.9	5.9
		3.8	6.7	6.7
		2.2	3.7	4.9
<b>Rmerge† (menor / maior faixa de resolução)</b>		0.056	0.049	0.093
		0.037	0.031	0.077
		0.279	0.255	0.208

## 10.2 ANEXO II

Tabela 25 - Estatísticas dos dados de difração de raios-X para cristais da 6xHis-NahG. Em todos os cristais a proteína foi produzida na presença de ácido salicílico no tampão de lise.

<b>Parâmetros</b>	<b>Cristal</b>	6xHis-NahG NADH	6xHis-NahG NADH	6xHis-NahG NADH NaI	6xHis-NahG NADH NaI
<b>Comprimento de onda (Å)</b>		1.608	1.608	1.608	1.608
<b>Tempo de exposição (s)</b>		45	45	60	60
<b>Distância cristal-detector (mm)</b>		102	87	117	102
<b>Rotação por imagem (°)</b>		1	1	1	1
<b>Número de imagens</b>		180	360	327	360
<b>Número de imagens processadas</b>		180	360	327	290
<b>Grupo de espaço</b>		P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
<b>Mosaicidade média</b>		0.46	0.44	0.23	0.75
<b>Parâmetros da célula unitária (Å)</b>		81.763	81.872	81.141	82.282
		98.441	98.673	100.633	99.375
		131.306	131.166	135.171	130.938
<b>Faixa de resolução (Å) (menor / maior faixa de resolução)</b>		50.00 - 2.55	50.00 - 2.28	50.00 - 3.10	50.00 - 2.71
		50.00 5.49	50.00 5.22	50.00 6.67	50.00 6.53
		2.64 2.55	2.35 2.28	3.21 3.10	2.78 2.71
<b>No. de observações (menor / maior faixa de resolução)</b>		255373	352313	267677	293057
		26208	28397	27257	21734
		24234	27814	22473	18898
<b>No. de reflexões únicas (menor / maior faixa de resolução)</b>		35266	48782	38681	55533
		3744	4176	3839	3813
		3462	4031	3809	3937
<b>Completeza dos dados (%) (menor / maior faixa de resolução)</b>		100.0	99.7	99.6	99.0
		99.8	96.1	98.4	94.9
		100.0	100.0	97.9	98.0
<b>&lt;I/σ (I)&gt; (menor / maior faixa de resolução)</b>		33.1	43.2	14.5	25.5
		59.9	60.5	28.7	53.1
		3.9	3.8	2.9	3
<b>Redundância (menor / maior faixa de resolução)</b>		7.2	7.2	6.9	5.3
		7.0	6.8	7.1	5.7
		7.0	6.9	5.9	4.8
<b>Rmerge† (menor / maior faixa de resolução)</b>		0.061	0.042	0.128	0.059
		0.029	0.023	0.060	0.026
		0.510	0.495	0.508	0.509

<b>Parâmetros</b>	<b>Cristal</b>	6xHis-NahG	6xHis-NahG NaI	6xHis-NahG NaI	6xHis-NahG NADH NaI
<b>Comprimento de onda (Å)</b>		1.459	1.459	1.459	1.459
<b>Tempo de exposição (s)</b>		30	7	12	15
<b>Distância cristal-detector (mm)</b>		140	110	110	180
<b>Rotação por imagem (°)</b>		0.5	0.5	0.5	0.5
<b>Número de imagens</b>		329	720	720	720
<b>Número de imagens processadas</b>		329	720	720	605
<b>Grupo de espaço</b>		P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
<b>Mosaicidade média</b>		0.68	0.65	0.9	1.26
<b>Parâmetros da célula unitária (Å)</b>		81.270	81.615	82.059	81.219
		97.710	98.076	98.241	98.628
		129.899	130.136	129.935	131.853
<b>Faixa de resolução (Å) (menor / maior faixa de resolução)</b>		50.00 - 2.20	50.00 - 2.00	50.00 - 2.42	50.00 - 2.64
		50.00 5.42	50.00 5.43	50.00 6.56	50.00 6.36
		2.25 2.20	2.03 2.00	2.46 2.42	2.71 2.64
<b>No. de observações (menor / maior faixa de resolução)</b>		348923	951839	531469	279097
		23026.8	49992.8	26148.6	22075
		20935.2	33675.2	22356.5	10746
<b>No. de reflexões únicas (menor / maior faixa de resolução)</b>		52942	133525	75367	57212
		3714	6578	3582	4165
		3432	6476	3665	3582
<b>Completeza dos dados (%) (menor / maior faixa de resolução)</b>		99.7	99.0	99.0	97.7
		98.3	97.5	93.8	99.2
		98.3	95.6	96.9	86.4
<b>&lt;I/σ (I)&gt; (menor / maior faixa de resolução)</b>		19.5	25.4	22.3	14.3
		28.7	35.8	35.5	22
		5.1	2.9	3.5	2.2
<b>Redundância (menor / maior faixa de resolução)</b>		6.6	7.1	7.1	4.9
		6.2	7.6	7.3	5.3
		6.1	5.2	6.1	3.0
<b>Rmerge† (menor / maior faixa de resolução)</b>		0.086	0.064	0.070	0.098
		0.046	0.041	0.041	0.061
		0.333	0.526	0.516	0.496

### 10.3 ANEXO III

Tabela 26 - Soluções preparadas no ROBOLAB para o refinamento das condições de cristalização da 6xHis-NahB. Das 168 soluções preparadas, nas soluções numeradas de 49 a 72 obteve-se os melhores cristais.

<b>Solução</b>	<b>Tampão</b>	<b>Precipitante</b>	<b>Sal</b>
1	0,1 M Bis Tris propano pH 9,5	20% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,2 M Acetato de sódio
2	0,1 M Bis Tris propano pH 9,5	28% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,2 M Acetato de sódio
3	0,1 M Bis Tris propano pH 8,5	20% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,1 M Acetato de sódio
4	0,1 M Bis Tris propano pH 8,5	20% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,15 M Acetato de sódio
5	0,1 M Bis Tris propano pH 8,5	20% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,25 M Acetato de sódio
6	0,1 M Bis Tris propano pH 8,5	20% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,3 M Acetato de sódio
7	0,1 M Imidazol pH 6,5	4%(v/v) MPD	2 M Sulfato de lítio
8	0,1 M Imidazol pH 6,5	6%(v/v) MPD	2 M Sulfato de lítio
9	0,1 M Imidazol pH 6,5	8%(v/v) MPD	2 M Sulfato de lítio
10	0,1 M Imidazol pH 6,5	10 %(v/v) MPD	2 M Sulfato de lítio
11	0,1 M Imidazol pH 6,5	12%(v/v) MPD	2 M Sulfato de lítio
12	0,1 M Imidazol pH 6,5	14%(v/v) MPD	2 M Sulfato de lítio
13	0,1 M Imidazol pH 6,7	4%(v/v) MPD	2 M Sulfato de lítio
14	0,1 M Imidazol pH 6,7	6%(v/v) MPD	2 M Sulfato de lítio
15	0,1 M Imidazol pH 6,7	8%(v/v) MPD	2 M Sulfato de lítio
16	0,1 M Imidazol pH 6,7	10 %(v/v) MPD	2 M Sulfato de lítio
17	0,1 M Imidazol pH 6,7	12%(v/v) MPD	2 M Sulfato de lítio
18	0,1 M Imidazol pH 6,7	14%(v/v) MPD	2 M Sulfato de lítio
19	0,1 M Imidazol pH 7,5	4%(v/v) MPD	2 M Sulfato de lítio
20	0,1 M Imidazol pH 7,5	6%(v/v) MPD	2 M Sulfato de lítio
21	0,1 M Imidazol pH 7,5	8%(v/v) MPD	2 M Sulfato de lítio
22	0,1 M Imidazol pH 7,5	10 %(v/v) MPD	2 M Sulfato de lítio
23	0,1 M Imidazol pH 7,5	12%(v/v) MPD	2 M Sulfato de lítio
24	0,1 M Imidazol pH 7,5	14%(v/v) MPD	2 M Sulfato de lítio
25	0,1 M Imidazol pH 7,2	4%(v/v) MPD	2 M Sulfato de lítio
26	0,1 M Imidazol pH 7,2	6%(v/v) MPD	2 M Sulfato de lítio

Solução	Tampão	Precipitante	Sal
27	0,1 M Imidazol pH 7,2	8%(v/v) MPD	2 M Sulfato de lítio
28	0,1 M Imidazol pH 7,2	10 %(v/v) MPD	2 M Sulfato de lítio
29	0,1 M Imidazol pH 7,2	12%(v/v) MPD	2 M Sulfato de lítio
30	0,1 M Imidazol pH 7,2	14%(v/v) MPD	2 M Sulfato de lítio
31	0,1 M Imidazol pH 7,5	4%(v/v) MPD	2 M Sulfato de lítio
32	0,1 M Imidazol pH 7,5	6%(v/v) MPD	2 M Sulfato de lítio
33	0,1 M Imidazol pH 7,5	8%(v/v) MPD	2 M Sulfato de lítio
34	0,1 M Imidazol pH 7,5	10 %(v/v) MPD	2 M Sulfato de lítio
35	0,1 M Imidazol pH 7,5	12%(v/v) MPD	2 M Sulfato de lítio
36	0,1 M Imidazol pH 7,5	14%(v/v) MPD	2 M Sulfato de lítio
37	0,1 M Imidazol pH 6,5	8%(v/v) MPD	1 M Sulfato de lítio
38	0,1 M Imidazol pH 7,5	8%(v/v) MPD	1 M Sulfato de lítio
39	0,1 M Imidazol pH 7,5	8%(v/v) MPD	1 M Sulfato de lítio
40	0,1 M Imidazol pH 6,5	8%(v/v) MPD	1,5 M Sulfato de lítio
41	0,1 M Imidazol pH 7,5	8%(v/v) MPD	1,5 M Sulfato de lítio
42	0,1 M Imidazol pH 7,5	8%(v/v) MPD	1,5 M Sulfato de lítio
43	0,1 M Imidazol pH 6,5	12%(v/v) MPD	1 M Sulfato de lítio
44	0,1 M Imidazol pH 7,5	12%(v/v) MPD	1 M Sulfato de lítio
45	0,1 M Imidazol pH 7,5	12%(v/v) MPD	1 M Sulfato de lítio
46	0,1 M Imidazol pH 6,5	12%(v/v) MPD	1,5 M Sulfato de lítio
47	0,1 M Imidazol pH 7,5	12%(v/v) MPD	1,5 M Sulfato de lítio
48	0,1 M Imidazol pH 7,5	12%(v/v) MPD	1,5 M Sulfato de lítio
49	0,1 M HEPES sódio pH 7,2	20% v/v Polietilenoglicol 400	0,2 M Cloreto de cálcio dihidratado
50	0,1 M HEPES sódio pH 7,2	24% v/v Polietilenoglicol 400	0,2 M Cloreto de cálcio dihidratado
51	0,1 M HEPES sódio pH 7,2	26% v/v Polietilenoglicol 400	0,2 M Cloreto de cálcio dihidratado
52	0,1 M HEPES sódio pH 7,2	28% v/v Polietilenoglicol 400	0,2 M Cloreto de cálcio dihidratado
53	0,1 M HEPES sódio pH 7,2	30% v/v Polietilenoglicol 400	0,2 M Cloreto de cálcio dihidratado
54	0,1 M HEPES sódio pH 7,5	20% v/v Polietilenoglicol 400	0,2 M Cloreto de cálcio dihidratado
55	0,1 M HEPES sódio pH 7,5	24% v/v Polietilenoglicol 400	0,2 M Cloreto de cálcio dihidratado
56	0,1 M HEPES sódio pH 7,5	26% v/v Polietilenoglicol 400	0,2 M Cloreto de cálcio dihidratado
57	0,1 M HEPES sódio pH 7,5	28% v/v Polietilenoglicol 400	0,2 M Cloreto de cálcio dihidratado

Solução	Tampão	Precipitante	Sal
58	0,1 M HEPES sódio pH 7,5	30% v/v Polietilenoglicol 400	0,2 M Cloreto de cálcio dihidratado
59	0,1 M HEPES sódio pH 7.8	20% v/v Polietilenoglicol 400	0,2 M Cloreto de cálcio dihidratado
60	0,1 M HEPES sódio pH 7.8	24% v/v Polietilenoglicol 400	0,2 M Cloreto de cálcio dihidratado
61	0,1 M HEPES sódio pH 7.8	26% v/v Polietilenoglicol 400	0,2 M Cloreto de cálcio dihidratado
62	0,1 M HEPES sódio pH 7.8	28% v/v Polietilenoglicol 400	0,2 M Cloreto de cálcio dihidratado
63	0,1 M HEPES sódio pH 7.8	30% v/v Polietilenoglicol 400	0,2 M Cloreto de cálcio dihidratado
64	0,1 M HEPES sódio pH 8,2	20% v/v Polietilenoglicol 400	0,2 M Cloreto de cálcio dihidratado
65	0,1 M HEPES sódio pH 8,2	24% v/v Polietilenoglicol 400	0,2 M Cloreto de cálcio dihidratado
66	0,1 M HEPES sódio pH 8,2	26% v/v Polietilenoglicol 400	0,2 M Cloreto de cálcio dihidratado
67	0,1 M HEPES sódio pH 8,2	28% v/v Polietilenoglicol 400	0,2 M Cloreto de cálcio dihidratado
68	0,1 M HEPES sódio pH 8,2	30% v/v Polietilenoglicol 400	0,2 M Cloreto de cálcio dihidratado
69	0,1 M HEPES sódio pH 7,5	28% v/v Polietilenoglicol 400	0,1 M Cloreto de cálcio dihidratado
70	0,1 M HEPES sódio pH 7,5	28% v/v Polietilenoglicol 400	0,15 M Cloreto de cálcio dihidratado
71	0,1 M HEPES sódio pH 7,5	28% v/v Polietilenoglicol 400	0,25 M Cloreto de cálcio dihidratado
72	0,1 M HEPES sódio pH 7,5	28% v/v Polietilenoglicol 400	0,3 M Cloreto de cálcio dihidratado
73		15% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,28 M Malonato de dissódio pH 7,0
74		18% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,28 M Malonato de dissódio pH 7,0
75		20% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,28 M Malonato de dissódio pH 7,0
76		22% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,28 M Malonato de dissódio pH 7,0
77		25% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,28 M Malonato de dissódio pH 7,0
78		28% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,28 M Malonato de dissódio pH 7,0
79		20% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,15 M DL- malonato de dissódio pH 7,0
80		20% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,20 M DL- malonato de dissódio pH 7,0
81		28% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,20 M DL- malonato de dissódio pH 7,0
82		20% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,24 M DL- malonato de dissódio pH 7,0
83		20% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,28 M DL- malonato de dissódio pH 7,0
84	0,1 M Bis Tris propano pH 6,5	15% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,2 M Acetato de sódio

Solução	Tampão	Precipitante	Sal
85	0,1 M Bis Tris propano pH 6,5	20% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,2 M Acetato de sódio
86	0,1 M Bis Tris propano pH 6,5	28% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,2 M Acetato de sódio
87	0,1 M Bis Tris propano pH 7,5	15% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,2 M Acetato de sódio
88	0,1 M Bis Tris propano pH 7,5	20% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,2 M Acetato de sódio
89	0,1 M Bis Tris propano pH 7,5	28% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,2 M Acetato de sódio
90	0,1 M Bis Tris propano pH 7,5	15% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,2 M Acetato de sódio
91	0,1 M Bis Tris propano pH 7,5	20% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,2 M Acetato de sódio
92	0,1 M Bis Tris propano pH 7,5	28% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,2 M Acetato de sódio
93	0,1 M Bis Tris propano pH 8,0	15% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,2 M Acetato de sódio
94	0,1 M Bis Tris propano pH 8,0	20% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,2 M Acetato de sódio
95	0,1 M Bis Tris propano pH 8,0	28% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,2 M Acetato de sódio
96	0,1 M Bis Tris propano pH 8,5	15% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,2 M Acetato de sódio
97	0,1 M Bis Tris propano pH 8,5	20% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,2 M Acetato de sódio
98	0,1 M Bis Tris propano pH 8,5	28% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,2 M Acetato de sódio
99	0,1 M Bis Tris propano pH 9,5	15% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,2 M Acetato de sódio
100	0,1 M Bis Tris propano pH 9,5	20% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,2 M Acetato de sódio
101	0,1 M Bis Tris propano pH 9,5	28% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,2 M Acetato de sódio
102	0,1 M Bis Tris propano pH 9,5	15% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,2 M Acetato de sódio
103		15% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,15 M Tartarato de sódio/potássio
104		18% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,15 M Tartarato de sódio/potássio
105		20% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,15 M Tartarato de sódio/potássio
106		22% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,15 M Tartarato de sódio/potássio
107		25% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,15 M Tartarato de sódio/potássio
108		28% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,15 M Tartarato de sódio/potássio
109		15% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,20 M Tartarato de sódio/potássio
110		18% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,20 M Tartarato de sódio/potássio
111		20% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,20 M Tartarato de sódio/potássio

<b>Solução</b>	<b>Tampão</b>	<b>Precipitante</b>	<b>Sal</b>
112		22% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,20 M Tartarato de sódio/potássio
113		25% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,20 M Tartarato de sódio/potássio
114		28% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,20 M Tartarato de sódio/potássio
115		15% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,25 M Tartarato de sódio/potássio
116		18% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,25 M Tartarato de sódio/potássio
117		20% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,25 M Tartarato de sódio/potássio
118		22% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,25 M Tartarato de sódio/potássio
119		25% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,25 M Tartarato de sódio/potássio
120		28% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,25 M Tartarato de sódio/potássio
121		15% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,30 M Tartarato de sódio/potássio
122		18% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,30 M Tartarato de sódio/potássio
123		20% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,30 M Tartarato de sódio/potássio
124		22% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,30 M Tartarato de sódio/potássio
125		25% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,30 M Tartarato de sódio/potássio
126		28% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,30 M Tartarato de sódio/potássio
127		15% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,15 M tri-Ammonium citrate
128		18% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,15 M tri-Ammonium citrate
129		20% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,15 M tri-Ammonium citrate
130		22% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,15 M tri-Ammonium citrate
131		25% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,15 M tri-Ammonium citrate
132		28% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,15 M tri-Ammonium citrate
133		15% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,18 M tri-Ammonium citrate
134		18% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,18 M tri-Ammonium citrate
135		20% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,18 M tri-Ammonium citrate
136		22% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,18 M tri-Ammonium citrate
137		25% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,18 M tri-Ammonium citrate
138		28% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,18 M tri-Ammonium citrate

<b>Solução</b>	<b>Tampão</b>	<b>Precipitante</b>	<b>Sal</b>
139		15% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,24 M tri-Ammonium citrate
140		18% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,24 M tri-Ammonium citrate
141		20% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,24 M tri-Ammonium citrate
142		22% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,24 M tri-Ammonium citrate
143		25% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,24 M tri-Ammonium citrate
144		28% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,24 M tri-Ammonium citrate
145		15% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,30 M tri-Ammonium citrate
146		18% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,30 M tri-Ammonium citrate
147		20% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,30 M tri-Ammonium citrate
148		22% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,30 M tri-Ammonium citrate
149		25% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,30 M tri-Ammonium citrate
150		28% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,30 M tri-Ammonium citrate
151		15% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,20 M Malonato de dissódio pH 7,0
152		18% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,20 M Malonato de dissódio pH 7,0
153		20% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,20 M Malonato de dissódio pH 7,0
154		22% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,20 M Malonato de dissódio pH 7,0
155		25% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,20 M Malonato de dissódio pH 7,0
156		28% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,20 M Malonato de dissódio pH 7,0
157		15% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,22 M Malonato de dissódio pH 7,0
158		18% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,22 M Malonato de dissódio pH 7,0
159		20% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,22 M Malonato de dissódio pH 7,0
160		22% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,22 M Malonato de dissódio pH 7,0
161		25% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,22 M Malonato de dissódio pH 7,0
162		28% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,22 M Malonato de dissódio pH 7,0
163		15% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,24 M Malonato de dissódio pH 7,0
164		18% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,24 M Malonato de dissódio pH 7,0
165		20% p/v Polietilenoglicol 3.350	0,24 M Malonato de dissódio pH 7,0

<b>Solução</b>	<b>Tampão</b>	<b>Precipitante</b>	<b>Sal</b>
<b>166</b>		<b>22% p/v Polietilenoglicol 3.350</b>	<b>0,24 M Malonato de dissódio pH 7,0</b>
<b>167</b>		<b>25% p/v Polietilenoglicol 3.350</b>	<b>0,24 M Malonato de dissódio pH 7,0</b>
<b>168</b>		<b>28% p/v Polietilenoglicol 3.350</b>	<b>0,24 M Malonato de dissódio pH 7,0</b>

#### 10.4 ANEXO IV

Tabela 27 - Soluções preparadas no ROBOLAB para o refinamento das condições de cristalização da 6xHis-NahG. Das 72 soluções preparadas, nas soluções numeradas de 49 a 72 obteve-se os melhores cristais.

Solução	Tampão	Precipitante	Sal
1			0,4 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 6,9
2			0,8 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 6,9
3			1,0 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 6,9
4			1,2 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 6,9
5			1,4 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 6,9
6			1,8 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 6,9
7			2,0 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 6,9
8			2,2 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 6,9
9			2,4 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 6,9
10			0,4 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 7,4
11			0,8 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 7,4
12			1,0 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 7,4
13			1,2 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 7,4
14			1,4 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 7,4
15			1,8 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 7,4
16			2,0 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 7,4
17			2,2 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 7,4
18			2,4 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 7,4
19			0,4 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 8,0
20			0,8 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 8,0
21			1,0 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 8,0
22			1,2 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 8,0

Solução	Tampão	Precipitante	Sal
23			1,4 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 8,0
24			1,8 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 8,0
25			2,0 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 8,0
26			2,2 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 8,0
27			2,4 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 8,0
28			0,4 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 8,2
29			0,8 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 8,2
30			1,0 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 8,2
31			1,2 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 8,2
32			1,4 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 8,2
33			1,8 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 8,2
34			2,0 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 8,2
35			2,2 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 8,2
36			2,4 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 8,2
37		2%(v/v) PEG 400	1,0 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 8,2
38		4%(v/v) PEG 400	1,0 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 8,2
39		6%(v/v) PEG 400	1,0 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 8,2
40		8%(v/v) PEG 400	1,0 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 8,2
41		10%(v/v) PEG 400	1,0 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 8,2
42		12%(v/v) PEG 400	1,0 M Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico / pH 8,2
43	0,1 M Tris pH 7,0	12% v/v Glicerol	1,26 M Sulfato de amônio
44	0,1 M Tris pH 7,0	12% v/v Glicerol	1,5 M Sulfato de amônio
45	0,1 M Tris pH 7,0	12% v/v Glicerol	2,0 M Sulfato de amônio
46	0,1 M Tris pH 7,5	12% v/v Glicerol	1,26 M Sulfato de amônio
47	0,1 M Tris pH 7,5	12% v/v Glicerol	1,5 M Sulfato de amônio
48	0,1 M Tris pH 7,5	12% v/v Glicerol	2,0 M Sulfato de amônio
49	0,1 M Tris pH 8,0	12% v/v Glicerol	1,26 M Sulfato de amônio

Soluçã ão	Tampão	Precipitante	Sal
50	0,1 M Tris pH 8,0	12% v/v Glicerol	1,5 M Sulfato de amônio
51	0,1 M Tris pH 8,0	12% v/v Glicerol	2,0 M Sulfato de amônio
52	0,1 M Tris pH 8,5	12% v/v Glicerol	1,26 M Sulfato de amônio
53	0,1 M Tris pH 8,5	12% v/v Glicerol	1,5 M Sulfato de amônio
54	0,1 M Tris pH 8,5	12% v/v Glicerol	2,0 M Sulfato de amônio
55	0,1 M Tris pH 9,0	12% v/v Glicerol	1,26 M Sulfato de amônio
56	0,1 M Tris pH 9,0	12% v/v Glicerol	1,5 M Sulfato de amônio
57	0,1 M Tris pH 9,0	12% v/v Glicerol	2,0 M Sulfato de amônio
58	0,1 M Tris pH 7,0	20% v/v Glicerol	1,26 M Sulfato de amônio
59	0,1 M Tris pH 7,0	20% v/v Glicerol	1,5 M Sulfato de amônio
60	0,1 M Tris pH 7,0	20% v/v Glicerol	2,0 M Sulfato de amônio
61	0,1 M Tris pH 7,5	20% v/v Glicerol	1,26 M Sulfato de amônio
62	0,1 M Tris pH 7,5	20% v/v Glicerol	1,5 M Sulfato de amônio
63	0,1 M Tris pH 7,5	20% v/v Glicerol	2,0 M Sulfato de amônio
64	0,1 M Tris pH 8,0	20% v/v Glicerol	1,26 M Sulfato de amônio
65	0,1 M Tris pH 8,0	20% v/v Glicerol	1,5 M Sulfato de amônio
66	0,1 M Tris pH 8,0	20% v/v Glicerol	2,0 M Sulfato de amônio
67	0,1 M Tris pH 8,5	20% v/v Glicerol	1,26 M Sulfato de amônio
68	0,1 M Tris pH 8,5	20% v/v Glicerol	1,5 M Sulfato de amônio
69	0,1 M Tris pH 8,5	20% v/v Glicerol	2,0 M Sulfato de amônio
70	0,1 M Tris pH 9,0	20% v/v Glicerol	1,26 M Sulfato de amônio
71	0,1 M Tris pH 9,0	20% v/v Glicerol	1,5 M Sulfato de amônio
72	0,1 M Tris pH 9,0	20% v/v Glicerol	2,0 M Sulfato de amônio