

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

LORENA GUSMÃO ALVARENGA DE ANDRADE

**Avaliação bioquímica e estrutural de enzimas recombinantes envolvidas na
degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos**

BELO HORIZONTE

2019

LORENA GUSMÃO ALVARENGA DE ANDRADE

**Avaliação bioquímica e estrutural de enzimas recombinantes envolvidas na
degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos**

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais,
como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica e Imunologia para obtenção do título de
Doutora em Ciências: Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr Ronaldo Alves Pinto Nagem

BELO HORIZONTE

2019



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE LORENA GUSMÃO ALVARENGA DE ANDRADE. Aos dezoito dias do mês de fevereiro de 2019 às 13:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado ""Avaliação bioquímica e estrutural de enzimas recombinantes envolvidas na degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos"", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Ronaldo Alves Pinto Nagem, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Rafael Victório Carvalho Guido (Universidade de São Paulo), aprovada; Dra. Juliana Barbosa Coitinho Gonçalves (Universidade Federal do Espírito Santo), aprovada; Dr. Lucas Bleicher (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Mariana Torquato Quezado de Magalhães (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

- APROVADA
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 18 de fevereiro de 2019.

Dr. Rafael Victório Carvalho Guido (Universidade de São Paulo)

Dra. Juliana Barbosa Coitinho Gonçalves (Universidade Federal do Espírito Santo)

Dr. Lucas Bleicher (UFMG)

Dra. Mariana Torquato Quezado de Magalhães (UFMG)

Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem - Orientador (UFMG)

Prof. Jader dos Santos Cruz
 Sub Coordenador de Curso de Pós Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, cuidado constante e por ter me abençoado para chegar até aqui;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ronaldo A. P. Nagem, pela amizade, entusiasmo, paciência e por ter caminhado comigo no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pelo empenho em me auxiliar e motivar a participar de cursos e eventos;

Ao Prof. Guillermo V. Calero pela colaboração e oportunidade de utilizar a estrutura dos laboratórios do Departamento de Biologia Estrutural da Universidade de Pittsburgh;

Ao Prof. Tiago A. da Silva Brandão e amigos do Laboratório de Estudos em Catálise e Mecanismos de Reação, do Dep. de Química (UFMG), especialmente Stefanya, Mozart e Raquel, pela disponibilidade para as discussões e ensinamentos acerca de reações cinéticas;

Aos amigos do Bioest: Mariana, Fernandes, Marininha, Brisa, Ludmila, Arthur, Débora, Simara, Marina, Samuel, Karen, Tarcísio, Renato, Aline e aos agregados Elany, Kamila, Luís, Andrea e Déia, pelas trocas de conhecimentos, experiências, convivência diária e por tornarem o trabalho mais descontraído;

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Imunologia pelos ensinamentos;

Aos funcionários do departamento, em especial Jamil, Orlando e Alexandre pelo apoio e auxílio aos longo dos anos;

Ao LNLS (CNPq Campinas) e ao SSRL (Universidade de Stanford) pela utilização da estrutura para a condução dos experimentos;

Ao CNPq pela concessão da bolsa;

Aos meus familiares, minha mãe Acyr, irmão André e cunhada Isabela, que mesmo distante sei que torceram por mim;

Aos meus sogros Emiliane e Angelo, minha cunhada Martinha e Gui, pelo apoio e amizade;

Ao meu esposo, Mateus pelo suporte, amizade e por compartilhar comigo as dificuldades da caminhada científica;

A minha querida filha Rebeca, que nesse último ano mudou completamente a minha vida e me mostrou o que é um amor incondicional.

*“Porque Dele, e por Ele, e para Ele, são todas as coisas;
glória, pois, a Ele eternamente. Amém.”*

Romanos 11:36

RESUMO

ANDRADE; L.G.A. **Avaliação bioquímica e estrutural de enzimas recombinantes envolvidas na degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.** Tese (Doutorado). Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2019.

Os Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAPs), compostos orgânicos formados por anéis benzênicos fusionados, são contaminantes ambientais que ocorrem naturalmente durante a combustão de matéria orgânica como também pelo derramamento de petróleo e outros processos industriais. Existe uma grande diversidade de bactérias capazes de degradar os HAPs e as enzimas presentes na vias metabólicas podem ser utilizadas para remediar esses poluentes. O naftaleno é um dos HAPs mais tóxicos sendo utilizado como modelo no estudo de degradação desses compostos e, em *P. putida* G7 o metabolismo do naftaleno é um processo bem estudado. O complexo enzimático da naftaleno dioxigenase (NahA) atua na primeira reação da via de degradação desse contaminante e a NahA pertence a uma grande família de Rieske oxigenases que iniciam a degradação de diversos compostos aromáticos. Todavia, a busca por potenciais enzimas envolvidas na degradação de HAPs não está limitada à *P. putida* G7, sendo que diferentes fontes validadas podem ser incluídas para enriquecer os bancos de dados. Neste trabalho foi realizada a busca por proteínas homólogas a NahA com o intuito de se obter um complexo dioxigenase que atue sobre vários substratos aromáticos. As sequências gênicas das proteínas de *Achromobacter xylosoxidans* A8, denominadas de Aa, Ab, Ac e Ad foram selecionadas a partir de bases genômicas e metagenômicas de diferentes organismos. As proteínas recombinantes foram expressas separadamente em três componentes (Aa, Ab e AcAd) bem como co-expressas em conjunto e após a expressão, as células foram submetidas a lise celular para a liberação das proteínas e o extrato resultante foi imediatamente utilizado para a purificação por cromatografias de afinidade e de exclusão molecular. O processo de purificação com o sistema contendo o complexo dioxigenase (AaAbAcAd) foi o mais

satisfatório e por isso, decidiu-se dar prosseguimento com essa amostra. As proteínas recombinantes foram identificadas por *western blotting* e por espectrometria de massa. Através dos ensaios de ensaios de espalhamento dinâmico de luz (DLS) as proteínas apresentaram-se, em solução, como monodispersas sendo Aa em forma dimérica e AcAd como hexamérica. A atividade enzimática do complexo dioxigenase foi demonstrada pelo consumo de NADH. A estrutura cristalográfica contendo as proteínas AcAd, foi resolvida a 1,35 Å e o modelo cristalográfico apresentou enovelamento α/β típico das Rieske oxigenases, com os domínios Rieske [2Fe-2S] e catalítico na subunidade alfa bem definidos, com exceção da presença do átomo de manganês mononuclear no sítio ativo, ao invés do ferro, metal conservado para as dioxigenases. Na unidade assimétrica, a molécula foi encontrada na forma de heterodímero $\alpha\beta$ e através de operações de simetria cristalográfica observou-se a unidade biológica, na forma de heterohexâmero ($\alpha_3\beta_3$). Os resíduos Cys-104, His-106, Cys-124 e His-127 no domínio Rieske e os resíduos His-232, His-237 e Asp-379 no domínio catalítico são conservados para todas as Rieske oxigenases sendo importantes para a catálise. Os resíduos não conservados presentes no sítio catalítico Leu-325, His-323, Val-375 e Ile-369 se mostraram importantes, podendo contribuir para a especificidade e acomodação de substratos. No modelo cristalográfico contendo o catecol, este apresentou-se ligado ao sítio ativo, interagindo com a Asn-226. Os resultados deste trabalho apresentam pela primeira vez estudos sobre as características estruturais em relação ao componente catalítico do complexo dioxigenase de *Achromobacter xylosoxidans* A8, os quais contribuem para estudos futuros sobre a identificação de resíduos-chave para catálise sobre diversos substratos.

Palavras-chave: dioxigenase, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, *Achromobacter xylosoxidans* A8, estrutura cristalográfica e cinética enzimática.

ABSTRACT

ANDRADE; L.G.A. **Biochemical and structural evaluation of recombinant enzymes involved in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons.** Tese (Doutorado). Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2019.

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), organic compounds formed by fused benzene rings, are environmental contaminants that occur naturally during the combustion of organic matter as well as by oils spills and other industrial processes. There is a great diversity of bacteria capable of degrading the PAHs and the enzymes present in the metabolic pathways can be used for the bioremediation of these pollutants. Naphthalene is one of the most toxic HAPs being used as a model in the degradation study of these compounds and in *P. putida* G7 the metabolism of naphthalene is a well-studied process. The enzymatic complex of naphthalene dioxygenase (NahA) acts in the first reaction of the degradation pathway of this contaminant and NahA is a member of a large family of Rieske oxygenases which initiates the degradation of various aromatic compounds. However, the search for potential enzymes involved in the degradation of PAHs is not limited to *P. putida* G7, and different validated sources can be included to enrich the databases. In this work the search for proteins homologous to NahA was carried out in order to obtain a dioxygenase complex that could act on several aromatic substrates. The gene sequences of the dioxygenase complex proteins Aa, Ab, Ac and Ad from *Achromobacter xylosoxidans* A8 were selected from genomic and metagenomics databases of different organisms.

Recombinant proteins were expressed separately in three components (Aa, Ab and AcAd) as well as co-expressed together and after the expression, cells were lysed for protein release and the resulting extract was immediately subjected to purification by affinity chromatography followed by a size exclusion chromatography. The purification process with the system containing the dioxygenase complex (AaAbAcAd) was the most satisfactory and therefore it

was decided to proceed with this sample. Recombinant proteins were identified by western blotting and mass spectrometry. Dynamic light scattering (DLS) assays with the samples showed the proteins presented in solution as monodisperse, with Aa as monomeric and AcAd as hexameric forms. The enzymatic activity of the complex was measured by the NADH consumption. Crystallographic structure of the AcAd proteins was solved at 1.35 Å and the crystallographic model presented an α/β folding typical of the Rieske oxygenases, with the well-defined Rieske [2Fe-2S] and catalytic domains in the alpha subunit, except for the presence of the mononuclear manganese in the active site, rather than iron, a conserved metal of the dioxygenases. In the asymmetric unit, the molecule was found in the form of $\alpha\beta$ heterodimer and with crystallographic symmetry operations the biological unit was observed, in the form of heterohexamer ($\alpha_3\beta_3$). Cys-104, His-106, Cys-124 and His-127 residues in the Rieske domain and His-232, His-237 and Asp-379 in the catalytic domain are conserved residues for all Rieske oxygenases being important for catalysis. The non-conserved residues present in the catalytic site Leu-325, His-323, Val-375 and Ile-369 proved to be important and could contribute to the specificity and accommodation of substrates. In the crystallographic model containing catechol, it was bound to the active site, interacting with Asn-226. The results of this work present, for the first time, studies of structural characteristics concerning the catalytic component of the dioxygenase complex from *Achromobacter xylosoxidans* A8, which can contribute for future studies on the identification of key residues for catalysis on several substrates.

Keywords: dioxygenase, polycyclic aromatic hydrocarbons, *Achromobacter xylosoxidans* A8, crystal structure and enzymatic kinetics.

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura química dos 16 HAPs listados pela EPA como prioritários para monitoramento no meio ambiente.....	24
Figura 2: Vias superior e inferior de degradação do naftaleno em <i>Pseudomonas putida</i> G7.....	32
Figura 3: Catálise enzimática pelo complexo da naftaleno dioxigenase (NahA) de <i>Pseudomonas sp.</i>.....	34
Figura 4: Comparação da frequência de uso de códons para a <i>Escherichia coli</i> K12 com a sequência do gene de Aa (redutase) de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8 otimizado.....	55
Figura 5: Otimização da sequência nucleotídica para o gene codificador da proteína Aa (redutase) de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8.....	56
Figura 6: Comparação entre as sequências da proteína Aa (redutase) de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8.....	57
Figura 7: Comparação entre as sequências da proteína Ab (ferredoxina) de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8.....	58
Figura 8: Comparação entre as sequências da proteína Ac (subunidade alfa) de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8.....	58
Figura 9: Comparação entre as sequências da proteína Ad (subunidade beta) de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8.....	58
Figura 10: Diagrama da construção do vetor AaAb-pACYCDuet-1.....	60
Figura 11: Diagrama da construção do vetor AcAd-pETDuet-1.....	61
Figura 12: Expressão das proteínas recombinantes do complexo dioxigenase de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8 em <i>E. coli</i> BL21 Arctic Express a 12 °C.....	63
Figura 13: Purificação da proteína recombinante Aa (redutase) de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8.....	64

Figura 14: Purificação das proteínas recombinantes AaAb (redutase/ferredoxina) de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8.	65
Figura 15: Purificação das proteínas recombinantes AcAd (subunidades alfa e beta) de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8.	66
Figura 16: Purificação das proteínas recombinantes AaAbAcAd de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8.	68
Figura 17: Análises das proteínas Aa, Ab, Ac recombinantes de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8 por western blotting.	70
Figura 18: Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) para as proteínas recombinantes Aa, Ac e Ad de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8.	76
Figura 19: Crescimento e purificação das proteínas recombinantes de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8 cultivadas em meio LB suplementado com Fe.	78
Figura 20: Ensaio de atividade enzimática do complexo dioxigenase (AaAbAcAd) de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8.	80
Figura 21: Avaliação do efeito da temperatura na atividade enzimática do complexo dioxigenase de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8.	82
Figura 22: Cristal obtido para as proteínas recombinantes do terminal oxigenase (AcAd) do complexo dioxigenase de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8.	86
Figura 23: Estrutura cristalográfica do terminal oxigenase (AcAd) do complexo da dioxigenase de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8, resolvida por difração de raios-x a 1,35 Å de resolução.	88
Figura 24: Estrutura cristalográfica da unidade biológica do terminal oxigenase (AcAd) do complexo dioxigenase de <i>Achromobacter xilosoxidans</i> A8.	90
Figura 25: Estrutura cristalográfica do hexâmero $\alpha_3\beta_3$ do terminal oxigenase (AcAd) do complexo dioxigenase de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8.	91

Figura 26: Estrutura cristalográfica da subunidade alfa do terminal oxigenase do complexo dioxigenase de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8.....	92
Figura 27: Representação das interações entre os resíduos nos domínios Rieske e catalítico da subunidade alfa do terminal oxigenase de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8.....	94
Figura 28: Estrutura cristalográfica do trímêro α_3 do terminal oxigenase de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8.	95
Figura 29: Estrutura cristalográfica da subunidade beta do terminal oxigenase de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8.	96
Figura 30: Alinhamento das sequências de aminoácidos da subunidade alfa do terminal oxigenase de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8 com outras Rieske oxigenases.....	100
Figura 31: Alinhamento estrutural da subunidade alfa do terminal oxigenase de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8 com outras Rieske oxigenases.....	101
Figura 32: Comparação estrutural dos resíduos conservados no domínio Rieske e catalítico da subunidade alfa do terminal oxigenase de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8 com outras dioxigenases.....	102
Figura 33: Comparação dos resíduos dos domínios Rieske e catalítico de subunidade alfa do terminal oxigenase de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8 com outras dioxigenases.....	105
Figura 34: Interação entre o domínio Rieske e o catalítico na interface das subunidades alfa do terminal oxigenase de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8 através de um Aspartato (D229).....	107
Figura 35: Alinhamento das sequências de aminoácidos da subunidades beta do terminal oxigenase de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8 com outras proteínas.....	109
Figura 36: Alinhamento estrutural da subunidade beta do terminal oxigenase de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8 com outras proteínas.	110

Figura 37: Estrutura tridimensional do complexo oxigenase-ferredoxina da carbazol 1,9a-dioxigenase.	113
Figura 38: Alinhamento estrutural do terminal oxigenase de <i>Achromobacter xylooxidans</i> A8 com o complexo binário oxigenase-ferredoxina da carbazol 1,9a-dioxigenase.....	115
Figura 39: Resíduos que estão na interface das subunidades alfa do terminal oxigenase de <i>Achromobacter xylooxidans</i> A8 com a Ferredoxina da carbazol 1,9a-dioxigenase.	117
Figura 40: Sítio ativo da estrutura da subunidade alfa do terminal oxigenase de <i>Achromobacter xylooxidans</i> A8 mostrando a ligação do catecol.....	119
Figura 41: Degradação de um amplo espectro de compostos aromáticos que resulta nos intermediários centrais catecol e protocatecoato.....	120

Lista de Tabelas

Tabela 1: Classificação das Rieske oxigenases baseada no número de componentes	28
Tabela 2: Classificação das Rieske oxigenases de acordo com a similaridade das subunidades alfa do terminal oxigenase	29
Tabela 3: Análises com as proteínas Aa, Ab, Ac e Ad utilizando o servidor ExPASy	59
Tabela 4: Identificação das proteínas recombinantes de <i>Achromobacter xylooxidans</i> A8 por espectrometria de massa.	73
Tabela 5: Sumário das análises com os dados obtidos nos ensaios de DLS com as proteínas recombinantes de <i>Achromobacter xylooxidans</i> A8.	76
Tabela 6: Estatísticas dos dados de difração dos cristais do terminal oxigenase de <i>Achromobacter xylooxidans</i> A8	87
Tabela 7: Comparação dos resíduos de aminoácidos próximos ao centro Rieske e ao sítio ativo da proteína Ac (subunidade alfa do terminal oxigenase de <i>Achromobacter xylooxidans</i> A8) e seus análogos estruturais nas RHDs estudadas	103

Lista de Abreviaturas e siglas

1EG9	naftaleno dioxygenase de <i>P. putida</i> NCBI 9816-4
2B1X	naftaleno dioxygenase de <i>Rhodococcus</i> sp
2GBW	bifenil dioxygenase de <i>Sphingomonas yanoikuyae</i> B1
3E99	benzoato dioxygenase de <i>Burkholderia Mallei</i> ATCC 23344)
3EF8	“ <i>Scytalone</i> ” dihidratase putativa de <i>Novosphingobium Aromaticivorans</i> DSM 12444
3GZX	bifenil dioxygenase de <i>Comamonas testosteroni</i> B-356
5XBP	3-nitrotolueno dioxygenase de <i>Diaphorobacter</i> sp. DS2
Å	angstrom
C-terminal	carboxi-terminal
Da	dalton
D_h	diâmetro hidrodinâmico
DLS	“ <i>Dynamic Light Scattering</i> ”
DO	densidade óptica
g	força gravitacional
g	gramas
HAP	hidrocarboneto aromático policíclico
IPTG	isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
kDa	quilodalton (10^3 Da)
kV	kilovolts
KEGG	“ <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i> ”
L	litro
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
M	molar (concentração)
mg	miligramas (10^{-3} g)
mM	milimolar (10^{-3} M)
μ M	micromolar (10^{-6} M)
mL	mililitro (10^{-3} L)
MM	massa molecular
MWCO	“ <i>Molecular Weight Cut Off</i> ”
m/v	massa por volume
NAD	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo oxidado

NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzido
NCBI	<i>“National Center for Biotechnology Information”</i>
N-terminal	amino-terminal
P1	modelo estrutural da proteína do terminal oxigenase recombinante de <i>A.xylooxidans</i> A8
PDB	<i>“Protein Data Bank”</i>
Pd	polidispersividade
p/v	peso por volume
RHD	<i>“Ring-Hydroxylating Dioxygenase”</i>
rmsd	<i>“root-mean-square deviation”</i>
rpm	rotações por minuto
SAD	<i>“Single-wavelength Anomalous Dispersion”</i>
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
SSRL	<i>“Stanford Synchrotron Radiation Lightsource”</i>
TEV	<i>“Tobacco Etch Virus”</i>
v/v	volume por volume

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

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

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
1.1. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.....	23
1.2. Rieske oxigenases: visão geral	25
1.3. Degradação de HAPs e o complexo da naftaleno dioxigenase	30
2. JUSTIFICATIVA	35
3. OBJETIVOS.....	38
2.1. Geral	38
2.2. Específicos.....	38
4. METODOLOGIA.....	38
3.1. Seleção das enzimas do complexo da dioxigenase.....	38
3.2. Otimização, síntese e clonagem dos genes nos vetores pETDuet-1 e pACYCDuet-1..	39
3.3. Transformação dos vetores pETDuet-1 e pACYCDuet-1 recombinantes em bactérias <i>Escherichia coli</i> BL21	41
3.4. Expressão das proteínas recombinantes do complexo dioxigenase	42
3.5. Purificação das proteínas recombinantes do complexo dioxigenase.....	43
3.6. Determinação da concentração de proteínas	44
3.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE).....	44
3.7.1. Coloração dos géis de poliacrilamida.....	45
3.8. <i>Western Blotting</i>	46
3.9. Espectrometria de massa	47
3.10. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	49
3.11. Ensaio de atividade enzimática	49

3.12. Ensaio de cristalização das proteínas recombinantes e difração de raios-X.....	49
3.13. Resolução da estrutura cristalográfica.....	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1. Seleção das proteínas do complexo dioxigenase.....	51
4.2. Otimização das sequências gênicas de Aa, Ab, Ac e Ad	54
4.3. Expressão das proteínas recombinantes do complexo dioxigenase de <i>Achromobacter xylooxidans</i> A8.....	62
4.4. Purificação das proteínas recombinantes do complexo dioxigenase de <i>Achromobacter xylooxidans</i> A8.....	64
4.5. Identificação das proteínas recombinantes de <i>Achromobacter xylooxidans</i> A8 por <i>Western blotting</i>	69
4.6. Identificação das proteínas recombinantes de <i>Achromobacter xylooxidans</i> A8 por espectrometria de massa	71
4.7. Avaliação do estado oligomérico das proteínas recombinantes de <i>Achromobacter xylooxidans</i> A8 utilizando o Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS – <i>dynamic light scattering</i>).....	74
4.8. Produção das proteínas recombinantes de <i>Achromobacter xylooxidans</i> A8 em outro meio de cultivo	77
4.9. Ensaio de atividade enzimática do complexo dioxigenase de <i>Achromobacter xylooxidans</i> A8.....	79
4.10. Cristalização das proteínas do complexo dioxigenase de <i>Achromobacter xylooxidans</i> A8 e difração de raios-X.....	84
4.11. Resolução da estrutura cristalográfica do terminal oxigenase (AcAd) recombinante do complexo dioxigenase de <i>Achromobacter xylooxidans</i> A8.....	86

4.11.1. Subunidade alfa (Ac) do terminal oxigenase do complexo dioxigenase de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8.....	91
4.11.2. Subunidade beta (Ad) do terminal oxigenase do complexo dioxigenase de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8.....	96
4.12. Comparação da estrutura da subunidade alfa do terminal oxigenase de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8 com outras Rieske oxigenases	97
4.13. Comparação da estrutura da subunidade beta do terminal oxigenase de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8 com outras proteínas	108
4.14. Estudo da interação do terminal oxigenase de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8 com a ferredoxina.....	112
4.15. Sítio de ligação ao substrato do terminal oxigenase de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8	118
6. CONCLUSÕES	121
7. REFERÊNCIAS	123
ANEXO: Figuras otimização gênica item 4.2.	128
Apêndice A: Manuscrito em redação - Requisito obrigatório para a defesa de tese	133
Apêndice B: Avaliação cinética e estrutural dos mutantes G150 da enzima salicilaldeído desidrogenase (NahF) de <i>Pseudomonas putida</i> G7.....	154
1. Introdução.....	154
2. Metodologia.....	156
2.1. Mutagênese sítio-dirigida	156
2.2. Expressão dos mutantes de NahF	156
2.3. Purificação dos mutantes de NahF	157
2.4. Atividade biológica dos mutantes de NahF.....	157
2.5. Testes de cristalização	158

3. Resultados e Discussão.....	159
3.1. Expressão e purificação das proteínas mutantes de NahF.....	159
3.2. Ensaio de cinética enzimática com os mutantes de NahF.....	162
3.3. Ensaio preliminares de difração de raios-X.....	166
4. Perspectivas	167
5. Referências	167

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) são uma classe de compostos orgânicos hidrofóbicos constituídos de dois ou mais anéis benzênicos fundidos e são amplamente distribuídos no ambiente (HABE; OMORI, 2003). A formação dos HAPs ocorre naturalmente durante a combustão incompleta de matéria orgânica, tais como carvão, diesel, madeira e vegetação. Outras fontes de contaminação são o derramamento de petróleo, diesel e outros processos industriais como liquefação do carvão (BAMFORTH; SINGLETON, 2005; PENG *et al.*, 2008). Estes compostos são de difícil remoção e podem persistir no ambiente por longos períodos em razão da alta hidrofobicidade e baixa solubilidade em água. O tempo de permanência no ambiente depende de vários fatores, como a estrutura química do HAP, concentração e a biodisponibilidade do contaminante (CERNIGLIA, 1992; HARITASH; KAUSHIK, 2009).

Um dos grandes interesses nos estudos com HAPs deve-se à alta toxicidade para a saúde humana e animal, que resulta em propriedades mutagênicas e carcinogênicas, além da alta recalcitrância no ambiente. Existe mais de 100 compostos HAPs descritos e, com base em sua abundância e toxicidade, 16 HAPs (Figura 1) foram identificados pela EPA (*U.S. Environmental Protection Agency*) como poluentes prioritários nos programas de descontaminação ambiental (BALACHANDRAN *et al.*, 2012; HARITASH; KAUSHIK, 2009; KEITH; TELLIARD, 1979). Considerando que diversos microrganismos possuem os genes para a degradação dos HAPs, eles podem ser direcionados para a remoção desses compostos tóxicos do meio ambiente. Assim, microrganismos ou enzimas, que sejam capazes de converter os HAPs em compostos menos tóxicos ou inertes, podem ser utilizados no tratamento de solos e água contaminados com estes compostos. Desse modo, esse processo para a descontaminação ambiental é conhecido como biorremediação, que de maneira geral, pode ser descrita como o

processo pelo qual microrganismos são utilizados para reduzir a concentração e toxicidade de poluentes, como os HAPs (FERNÁNDEZ *et al.*, 2012). Além disso, a aplicação de enzimas no processo de bioremediação requer o conhecimento das comunidades microbianas presentes nos locais de contaminação, bem como das vias metabólicas e enzimas envolvidas, que estes microrganismos apresentam.

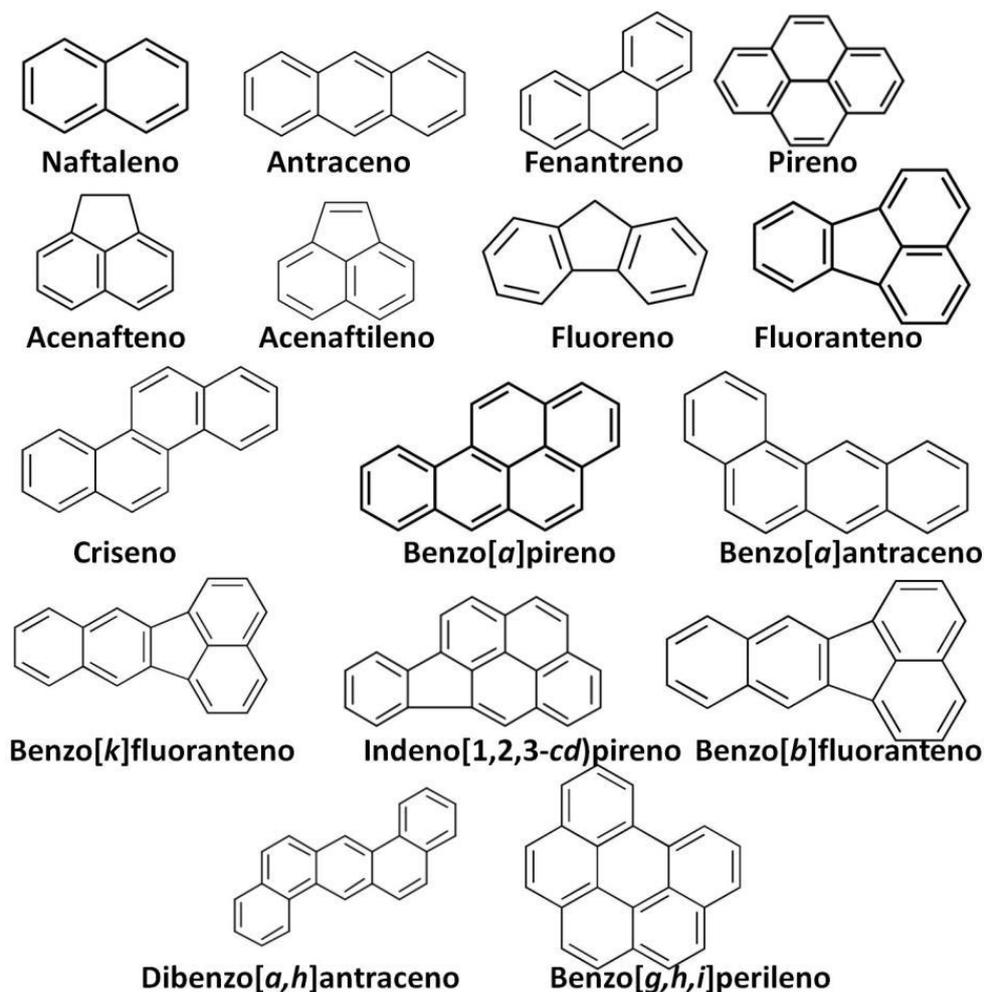


Figura 1: Estrutura química dos 16 HAPs listados pela EPA como prioritários para monitoramento no meio ambiente.
Adaptado de (HABE; OMORI, 2003).

Devido à presença natural de HAPs no ambiente, diversos microrganismos adquiriram a capacidade de utilizá-los como fonte de carbono e energia, entretanto, há poucos microrganismos da biota local que são capazes de degradar completamente os poluentes. Tais

microrganismos consistem em bactérias, fungos lignofílicos, fungos não lignofílicos, algas e cianobactérias (BAMFORTH; SINGLETON, 2005; CERNIGLIA, 1992).

A degradação dos HAPs pelos microrganismos ocorre por diversas vias metabólicas contendo várias reações catalisadas por múltiplas enzimas. Dessa maneira, uma aplicação para o processo de biorremediação é a utilização das enzimas das próprias vias de degradação dos HAPs, uma vez que enzimas são específicas, catalisando reações bem definidas sem gerar subprodutos indesejáveis; não permanecem no ambiente após o tratamento, pois são degradadas por microrganismos nativos e através da tecnologia do DNA recombinante é possível produzir enzimas em grande escala com atividade e estabilidade aumentadas.

Em razão das características e a possibilidade dos HAPs causarem problemas não só ambientais como também à saúde humana e animal, torna-se necessária a eliminação destes contaminantes. Em razão da maioria dos microrganismos do solo não possuir a capacidade de degradar estes compostos, torna-se necessário isolar e selecionar os microrganismos degradadores, bem como conhecer quais são as principais vias metabólicas que eles compartilham.

1.2. Rieske oxigenases: visão geral

Dioxigenases são metaloenzimas que podem ser divididas em duas categorias: as RHDs (do inglês: *ring-hydroxylating dioxygenases*), as quais catalisam a dupla hidroxilação em dois átomos de carbono adjacentes do substrato e, as RCDs (do inglês: *ring-cleaving dioxygenases*), que promovem a clivagem e abertura do anel aromático em substratos catecólicos (HARAYAMA; KOK; NEIDLE, 1992).

As RHDs são enzimas multicomponentes (EC 1.14.12.) conhecidas também como Rieske não-heme ferro oxigenases (ROs) e foram descritas pela primeira vez em 1968 (GIBSON; KOCH; KALLIO, 1968). Em geral, são enzimas que atuam na primeira reação da degradação bacteriana de muitos compostos aromáticos e são responsáveis pela formação de

metabólitos dihidroxilados, utilizando o oxigênio molecular e NADH como fontes de grupos hidroxil e elétrons, respectivamente. E ainda, contêm o centro Rieske [2Fe-2S] que está envolvido no armazenamento de elétrons e os metais são coordenados com dois resíduos de cisteína e dois de histidina na proteína.

Segundo Parales *et al.*, (2003), o estudo das Rieske oxigenases é importante por duas razões. Primeiro este sistema de enzimas catalisa reações essenciais em vias metabólicas bacterianas no catabolismo de compostos aromáticos que são descritos como potentes contaminantes do meio ambiente, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Outra razão é devido à capacidade de muitas enzimas em utilizar uma extensa variedade de substratos.

As Rieske oxigenases geralmente consistem em um componente catalítico, o terminal oxigenase que está associado com uma ou duas proteínas carreadoras de elétrons. Na maioria dos casos, o componente oxigenase é formado por uma subunidade alfa de cerca de 50 kDa e uma subunidade beta em torno de 20 kDa e essas proteínas se organizam em um heterohexâmero $\alpha_3\beta_3$.

Em relação ao terminal oxigenase, cada subunidade alfa consiste em dois domínios, o Rieske e o catalítico (RIESKE; HANSEN; ZAUGG, 1964). O domínio Rieske fica na porção N-terminal e contêm um centro Rieske [2Fe-2S] coordenado com resíduos de cisteínas e histidinas. Já o domínio catalítico está na porção C-terminal, contendo um átomo de ferro mononuclear próximo ao sítio de ligação ao substrato e está coordenado com duas histidinas e um aspartato. Esse domínio requer a transferência de elétrons para promover a ativação do oxigênio a cada ciclo de hidroxilação do substrato. Para isso, duas proteínas auxiliares, a Ferredoxina e a Redutase são responsáveis pelo suprimento de elétrons advindos da oxidação do NADH. Em alguns casos, essas proteínas estão em uma única cadeia polipeptídica, como é o caso da benzoato dioxigenase (KARLSSON *et al.*, 2002) e da antranilato dioxigenase (EBY *et al.*, 2001).

De acordo com Ferraro *et al.*, (2005) as enzimas Redutases são classificadas em duas famílias: a NADH-redutase (FMN) e a glutaciona redutase. As proteínas da família FMN-redutase apresentam similaridades estruturais com outras redutases encontradas em plantas, e são formadas por três domínios: o de ligação ao FAD ou FMN, o de ligação ao NADH e um domínio característico de plantas que contém o centro [2Fe-2S]. As estruturas de algumas proteínas dessa família tem sido determinadas, como as enzimas redutase da fitalato dioxigenase de *Pseudomonas cepacia* PHK, (CORRELL *et al.*, 1992) e a redutase da benzoato dioxigenase de *Acinetobacter baylyi* ADP1 (KARLSSON *et al.*, 2002). Já as proteínas da família glutaciona redutase são estruturalmente similares as dihidrogenases e tioredoxina redutases (FERRARO; GAKHAR; RAMASWAMY, 2005). As enzimas dessa família também contêm três domínios: o domínio de ligação ao FAD, o de ligação ao NADH e o domínio C-terminal. Estudos anteriores relataram a estrutura da redutase da tolueno dioxigenase de *P. putida* F1 (LEE *et al.*, 2005) e da redutase da bifenil dioxigenase de *Pseudomonas* sp. KKS102 (SENDA *et al.*, 2000), ambas pertencentes a família da glutaciona redutase.

Já a Ferredoxina somente está presente nos complexos dioxigenase que apresentam três componentes e é descrita como uma proteína que transporta os elétrons adivindos da Redutase para o terminal oxigenase (FERRARO; GAKHAR; RAMASWAMY, 2005). A Ferredoxina é uma proteína pequena (em torno de 13 kDa) que pode conter o domínio com o centro [2Fe-2S], típico de plantas, ou o centro Rieske [2Fe-2S], presente também na subunidade alfa do terminal oxigenase. As estruturas das cinco proteínas seguintes contendo o centro Rieske foram determinadas: ferredoxina da naftaleno dioxigenase de *P. putida* NCIB9816-4 (KARLSSON *et al.*, 2002), ferredoxina da bifenil dioxigenase de *Sphingomonas yanoikuyae* B1 (FERRARO; GAKHAR; RAMASWAMY, 2005), ferredoxina da carbazol dioxigenase de *P. resinovorans* CA10 (NAM *et al.*, 2005), ferredoxina da tolueno dioxigenase de *P. putida* F1 (LEE *et al.*,

2005) e ferredoxina da bifenil dioxigenase de *Burkholderia xenovorans* LB400 (COUTURE *et al.*, 2001).

As RHDs compartilham características estruturais comuns como a estrutura quaternária e resíduos de aminoácidos conservados nos domínios Rieske e catalítico da subunidade alfa do terminal oxigenase. Porém, as proteínas diferem significativamente tanto em relação aos carreadores de elétrons quanto na sequência de aminoácidos. Dessa forma, o sistema de classificação das dioxigenases da família RHDs não é totalmente estabelecido.

Uma classificação proposta se baseia no número de carreadores de elétrons associados e a natureza dos seus centros redox (BATIE, 1992). Nesse método (Tabela 1) as proteínas são agrupadas de acordo com o centro ferro-enxofre da Redutase e da Ferredoxina, bem como a presença de FMN ou FAD. Nas proteínas pertencentes à Classe I as enzimas consistem em dois componentes, como a fitalato dioxigenase (CORRELL *et al.*, 1992) e, com três componentes estão as proteínas da Classe II, contendo uma FAD-redutase e uma ferredoxina com o centro [2Fe-2S], como a bifenil dioxigenase (FURUSAWA *et al.*, 2004). E ainda, na Classe III estão as enzimas com três componentes, no qual a redutase contém tanto o FAD quanto o centro [2Fe-2S], representado pela naftaleno dioxigenase (KAUPPI *et al.*, 1998).

Tabela 1: Classificação das Rieske oxigenases baseada no número de componentes.

Sistema de classificação considerando os tipos de carreadores de elétrons (BATIE, 1992). Adaptado de (FERRARO; GAKHAR; RAMASWAMY, 2005).

Sistema	Classe	Redutase	Ferredoxina	Oxigenase	Exemplo
Dois componentes	IA	FMN [2Fe-2S] _P		[2Fe-2S] _R	Fitalato dioxigenase
	IB	FAD [2Fe-2S] _P		[2Fe-2S] _R	Benzoato dioxigenase, 2-oxoquinolina-monooxigenase
Três componentes	IIA	FAD	[2Fe-2S] _P	[2Fe-2S] _R	Dibenzofurano dioxigenase
	IIB	FAD	[2Fe-2S] _R	[2Fe-2S] _R	Tolueno dioxigenase, bifenil dioxigenase e cumeno dioxigenase

III	FAD [2Fe-2S] _R	[2Fe-2S] _R	[2Fe-2S] _R	Naftaleno carbazol nitrobenzeno	dioxigenase, dioxigenase e dioxigenase
-----	---------------------------	-----------------------	-----------------------	---------------------------------------	---

[2Fe-2S]_P, centro ferro-enxofre análogo ao de plantas
[2Fe-2S]_R, centro ferro-enxofre Rieske

Contudo, ao longo dos anos novas RHDs foram identificadas e caracterizadas de modo que algumas proteínas não se encaixaram nessa classificação. Assim, um sistema alternativo classifica as enzimas de acordo com a similaridade das sequências de aminoácidos entre as subunidades alfa do terminal oxigenase (NAM *et al.*, 2001). As RHDs foram organizadas em quatro famílias de acordo com análises filogenéticas, e ainda as proteínas foram agrupadas considerando a similaridade na especificidade de substrato (Tabela 2). Nessa classificação proposta as enzimas do tipo II são representadas por benzoato e toluato dioxigenases, enzimas do tipo III pela naftaleno e outras PAH-dioxigenases e as do tipo IV por bifenil e tolueno dioxigenases. Enquanto que as enzimas do tipo I, como a fitalato dioxigenase e a 2-oxoquinolina-8-monooxigenase, compartilham somente a presença de alfa subunidades no terminal oxigenase, pois diferem consideravelmente das outras famílias tanto em relação a sequência de aminoácidos como na especificidade de substrato.

Tabela 2: Classificação das Rieske oxigenases de acordo com a similaridade das subunidades alfa do terminal oxigenase.

Essa classificação em famílias considera a similaridade da especificidade de substratos (NAM *et al.*, 2001). Adaptado de (FERRARO; GAKHAR; RAMASWAMY, 2005).

Família ROs	Exemplo de substratos	Exemplo de membros
I- Fitalato	Fitalato	Fitalato dioxigenase, 2-oxoquinolina-monooxigenase
II- Benzoato	Benzoato, toluato	Benzoato dioxigenase
III- Naftaleno	Naftaleno, indol, fenantreno, nitrobenzeno	Naftaleno dioxigenase, nitrobenzeno dioxigenase
IV- Tolueno/Bifenil	Tolueno, cumeno, bifenil, PCBs, benzeno	Tolueno dioxigenase, cumeno dioxigenase, bifenil dioxigenase, benzeno dioxigenase

ROs, do inglês *Rieske non-heme oxygenase*
PCBs, do inglês para-chlorobenzoate

Segundo as análises de Jouanneau *et al.*, (2011), esse sistema possibilita classificar qualquer nova RHDs mesmo que os carreadores de elétrons não sejam conhecidos. Isso ocorre principalmente em bactérias que apresentam os genes catabólicos dispersos para os HAPs, especialmente quando os genes codificadores para as proteínas do terminal oxigenase não estão próximos aos genes codificadores das proteínas transportadoras de elétrons.

Por fim, um sistema de classificação mais robusto foi proposto (KWEON *et al.*, 2008), que leva em consideração as sequências dos carreadores de elétrons somado com as análises filogenéticas das RHDs. Em adição as quatro classe descritas por Nam *et al.*, um quinto grupo é composto por enzimas que contêm o centro [3Fe-4S] na ferredoxina (KIM *et al.*, 2006).

1.3. Degradação de HAPs e o complexo da naftaleno dioxigenase

O naftaleno é o HAP mais simples, formado por dois anéis benzênicos fundidos. Possui baixa solubilidade em água (30 mg/L - a maior dentre os HAPs), tende a ser fortemente absorvido pelo solo e é um dos primeiros HAPs a atingir lençóis freáticos em casos de contaminação do solo. É atualmente utilizado como modelo no estudo de degradação destes poluentes e compõe a lista dos 16 HAPs que têm seus níveis monitorados no ambiente (BAMFORTH; SINGLETON, 2005; KEITH; TELLIARD, 1979).

Diversos microrganismos, como espécies dos gêneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Mycobacterium* e *Rhodococcus* têm sido relatados como capazes de biodegradar o naftaleno, utilizando enzimas dioxigenases, por diversas vias metabólicas (BAMFORTH; SINGLETON, 2005; LIN; GAN; CHEN, 2010). O metabolismo do naftaleno (Figura 2) é um processo bem estudado e caracterizado na bactéria do solo *Pseudomonas putida* G7, que possui o plasmídeo NAH7 de 83 kb, o qual codifica as enzimas capazes de degradar completamente esse contaminante (DUNN; GUNSALUS, 1973). A sequência nucleotídica completa e os genes contidos no plasmídeo NAH7 de *P. putida* G7 estão depositados no banco de dados de nucleotídeos do *National Center for Biotechnology Information* - NCBI (SOTA *et al.*, 2006).

Em *Pseudomonas putida* G7 a via de degradação do naftaleno compreende 13 enzimas que são responsáveis pela conversão do naftaleno em piruvato e acetaldeído, sendo este convertido pela acetaldeído desidrogenase em acetil-CoA, o qual é direcionado ao ciclo do ácido tricarboxílico (Ciclo de Krebs). As enzimas envolvidas no catabolismo do naftaleno estão divididas em duas vias, superior e inferior. A via superior é composta por seis enzimas (NahAaAbAcAdBCEDF) envolvidas na conversão do naftaleno em salicilato. Esta via também é estabelecida como periférica ou captadora, uma vez que as enzimas reconhecem e convertem diferentes HAPs em vários metabólitos centrais, sendo caracterizada como uma via ampla presente na degradação de diversos compostos aromáticos (CAO; NAGARAJAN; LOH, 2009). As enzimas NahGHIJKLMN pertencem a via inferior e catalisam a conversão do salicilato em piruvato e acetil-CoA (YEN; GUNSALUS, 1982, 1985). Já a via inferior pode ser identificada como a via da “clivagem do anel”, nela as enzimas são mais específicas e canalizam os intermediários, provenientes da via superior, para o metabolismo central, como a Ciclo de Krebs.

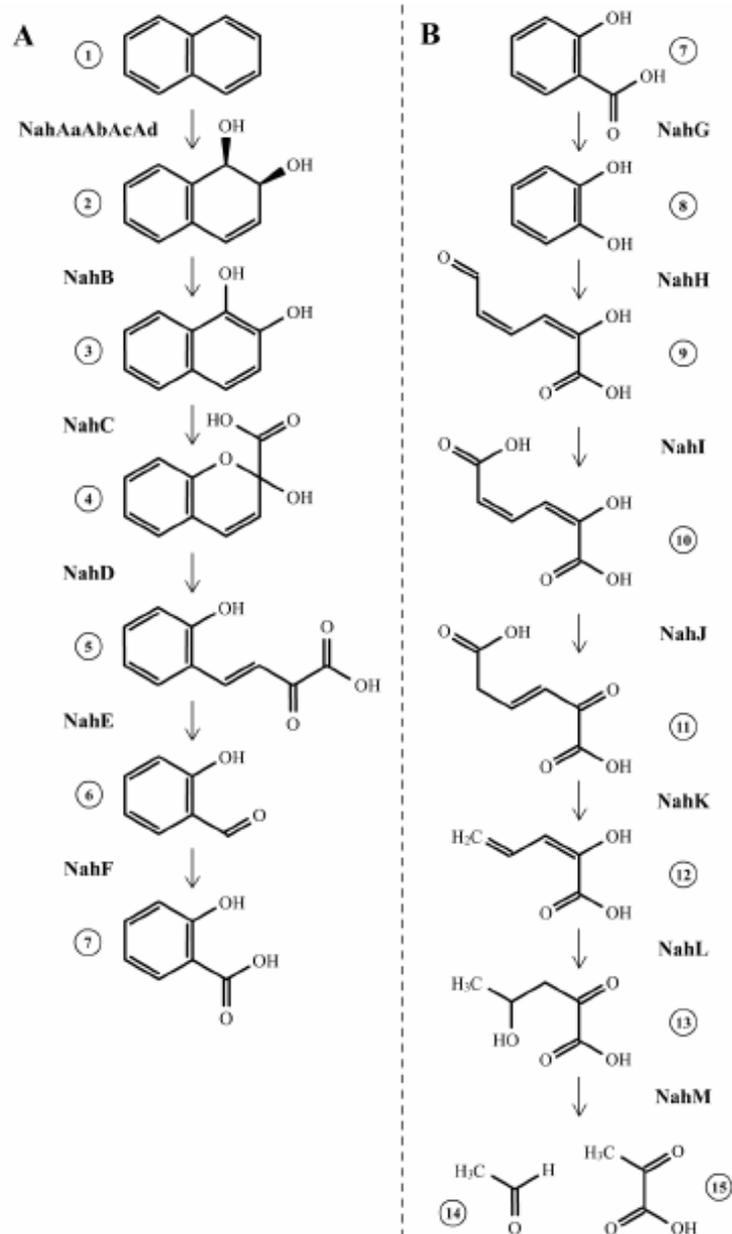


Figura 2: Vias superior e inferior de degradação do naftaleno em *Pseudomonas putida* G7.

A - Via superior: NahAaAbAcAd (complexo da naftaleno dioxigenase); NahB (*cis*-dihidrodiol naftaleno desidrogenase); NahC (1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase); NahD (2-hidroxicromeno-2-carboxilato isomerase); NahE (2-hidroxi-benzilideno-piruvato aldolase); NahF (salicilaldeído desidrogenase). B - via inferior: NahG (salicilato hidroxilase); NahH (catecol 2,3-dioxigenase); NahI (2-hidroxi-muconato-semialdeído desidrogenase); NahJ (4-oxalocrotonato tautomerase); NahK (4-oxalocrotonato decarboxilase); NahL (2-oxo-4-pentenoato hidratase); NahM (2-oxo-4-hidroxipentanoato aldolase). (1) naftaleno; (2) *cis*-1,2-dihidronaftaleno-1,2-diol; (3) 1,2-dihidroxi-naftaleno; (4) ácido 2-hidroxicromeno-2-carboxílico; (5) ácido *trans*-o-hidroxi-benzilideno-piruvato; (6) salicilaldeído; (7) ácido salicílico; (8) catecol; (9) 2-hidroxi-muconato semialdeído; (10) 2-hidroxi-muconato; (11) 4-oxalocrotonato; (12) 2-oxo-4-pentenoato; (13) 4-hidroxi-2-oxopentanoato; (14) acetaldeído; (15) piruvato. (Adaptado do banco de dados KEGG (<http://www.genome.jp/kegg>) e (PENG *et al.*, 2008)).

Como estas enzimas são requeridas para a degradação completa do naftaleno, a elucidação das estruturas tridimensionais dessas proteínas permite o estudo mais aprofundado das reações catalizadas nesta via bem como os mecanismos de ação das enzimas. Apesar dessa via ser bem descrita em *Pseudomonas putida*, poucas proteínas apresentam estudos que descrevem a relação estrutura-função das enzimas. Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa do Laboratório de Biologia Estrutural, localizado no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, foi capaz de produzir, caracterizar cineticamente e determinar as estruturas de algumas dessas proteínas de *P. putida* G7, como a NahB, NahF, NahG, NahK e NahL.

Considerando o catabolismo do naftaleno, a enzima naftaleno dioxigenase atua na primeira reação da via superior de degradação do naftaleno e em *Pseudomonas putida* G7, os quatro genes que codificam as proteínas deste complexo estão arrançados em uma ordem semelhante à de outras bactérias: *nahAa* (flavoproteína redutase), *nahAb* (ferredoxina), *nahAc/nahAd* (subunidades α e β da oxigenase) (PARALES, 2003; PENG *et al.*, 2008). A NahA é membro de uma grande família de enzimas dioxigenases (RHDs – *Ring-Hydroxylating Dioxygenases*) que iniciam a degradação de uma variedade de compostos aromáticos por organismos procarióticos (FERRARO *et al.*, 2006; KWEON *et al.*, 2008).

Em *P. putida* G7 as enzimas flavoproteína redutase (NahAa – EC 1.18.1.7) e ferredoxina (NahAb – EC 1.18.1.3), consistem em proteínas transportadoras de elétrons, que atuam em reações de oxido-redução em proteínas ferro-enxofre e promovem a transferência de elétrons do NADH (dinucleotídeo de nicotinamina adenina reduzido) para o terminal oxigenase. Nesse último componente, é onde está localizado o sítio ativo do complexo enzimático, sendo formado pelas proteínas NahAc/NahAd (EC 1.14.12.12), que atuam na incorporação de oxigênio (O₂) ao substrato (Figura 3). (KWEON *et al.*, 2008; PARALES, 2003).

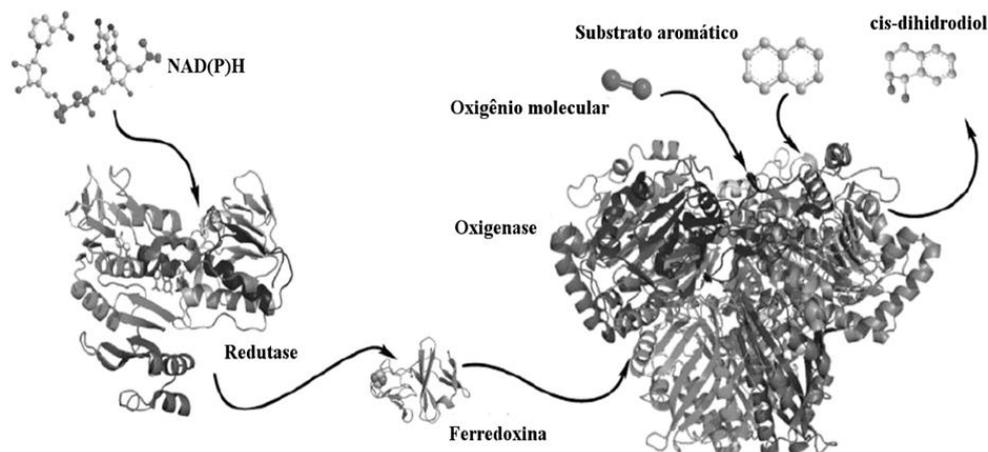


Figura 3: Catálise enzimática pelo complexo da naftaleno dioxigenase (NahA) de *Pseudomonas sp.* Adaptado de (FERRARO *et al.*, 2007; KAUPPI *et al.*, 1998).

A partir das análises com os três componentes da naftaleno dioxigenase de *P. putida sp.* (NCBI 9816-4), observou-se que tanto a flavoproteína redutase (NahAa) quanto a ferredoxina (NahAb) contêm um centro redox [2Fe-2S], e ambos estão envolvidos na transferência de elétrons do NADH para o terminal oxigenase. Este último componente contém um domínio Rieske, com centros redox [2Fe-2S], e um átomo de ferro mononuclear no sítio ativo, o qual está localizado na subunidade α do terminal oxigenase. A reação requer oxigênio molecular sendo que ambos os átomos de oxigênio são inseridos no anel aromático para a formação do produto naftaleno dihidrodiol ((+)-cis-(1R,2S)-dihidroxi-1,2-dihidronaftaleno) (ENSLEY; GIBSON, 1983).

A primeira estrutura tridimensional do terminal oxigenase do complexo da naftaleno dioxigenase de *Pseudomonas sp.* foi determinada com 2,25 Å de resolução (Código de acesso no PDB 1NDO). A estrutura foi descrita como um hexâmetro $\alpha_3\beta_3$ com 210 kDa, formado pela subunidade alfa (NahAc) e pela subunidade beta (NahAd). O papel da proteína NahAd na catálise ainda não é conhecido, sendo relacionada com função provavelmente estrutural, podendo contribuir com a especificidade de substrato (KAUPPI *et al.*, 1998).

2. JUSTIFICATIVA

Considerando que as RHDs são encontradas em uma ampla gama de diferentes linhagens bacterianas, estas enzimas apresentam muitas similaridades, principalmente em termos dos componentes oxigenases. E ainda, as dioxigenases são descritas por serem capazes de degradar vários substratos diferentes, apresentando alta promiscuidade. Dito isso, apesar da sessão de introdução e revisão bibliográfica não ser comum inserir o objetivo do projeto, é de suma importância relatar que o foco inicial deste trabalho é avaliar e selecionar dentre as diversas sequências de dioxigenases disponíveis em bancos genéticos e enzimáticos, um complexo proteico que seja potencialmente capaz de atuar na degradação de diversos compostos aromáticos. Portanto, o alvo principal deste projeto consiste nos estudos das proteínas de um complexo dioxigenase e não reside em um microrganismo específico.

Dessa forma, a busca por enzimas envolvidas na degradação do naftaleno bem com outros HAPs não se restringe à bactéria *P. putida* G7. Os genes contidos no plasmídeo NAH7 podem ser usados como modelo para a seleção de outras sequências que podem codificar proteínas com maior potencial de catálise dos contaminantes. Dados da literatura mostram que os genes de *P. putida* sp. têm sido utilizados em análises comparativas para descrever vias metabólicas em diferentes microrganismos, incluindo bactérias capazes de degradar outros compostos aromáticos, porém poucas naftaleno dioxigenases tem sido purificadas e caracterizadas (BAMFORTH; SINGLETON, 2005; PENG *et al.*, 2008).

Assim, com os estudos da via de degradação do naftaleno em *P. putida* G7 foi possível a descoberta de enzimas análogas capazes de metabolizar outros hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em diferentes microrganismos. Análises realizadas com os componentes de oxigenases em bactérias envolvidas degradação de HAPs, demonstraram que as subunidades alfa são muito similares em bactérias dos gêneros *Nocardioides*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes* (*Achromobacter*), *Terrabacter*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium* e *Pseudomonas*. E ainda, os

genes codificadores das subunidades redutase e ferredoxina não estão necessariamente dispostos na mesma ordem que os genes dos componentes do terminal oxigenase. Com isso, um número limitado dos componentes transportadores de elétrons, redutase e ferredoxina, são compartilhados por múltiplas oxigenases (KWEON *et al.*, 2008).

Dados da literatura revelam que a bactéria *Achromobacter xylosoxidans* A8 possui cerca de 70 genes codificadores para dioxigenases, e estes podem estar associados com a habilidade de bioremediação desta linhagem de bactéria (STRNAD *et al.*, 2011). *Achromobacter xylosoxidans* (*Alcaligenes xylosoxidans* subespécie *xylosoxidans*) é uma bactéria gram-negativa que originalmente foi descrita em pacientes acometidos com pneumonia, meningite, otite, dentre outras infecções (SPEAR; FUHRER; KIRBY, 1988) e, posteriormente foi isolada de solos contaminados com compostos orgânicos, como o petróleo e seus derivados (KANG *et al.*, 1998; MA *et al.*, 2015).

Kang e colaboradores, caracterizaram os genes codificadores para as dioxigenases em *A. xylosoxidans* (KF701), bactéria do solo envolvida na degradação do fenilbenzeno (bifenil), um composto muito parecido com naftaleno. A bifenil dioxigenase é uma enzima similar ao complexo da naftaleno dioxigenase em *P. putida* G7, principalmente nos componentes proteicos (KANG *et al.*, 1998). E ainda, um estudo com a *A. xylosoxidans* (DN002), isolada de solo contaminado com petróleo, mostrou que essa linhagem foi capaz de degradar vários HAPs, como naftaleno, fenantreno, pireno, dentre outros. No mesmo trabalho, foi demonstrado que as linhagens de *A. xylosoxidans* A8 e DN002 apresentam mais de 90% de identidade de sequência (MA *et al.*, 2015).

Dessa forma, as proteínas do complexo da dioxigenase de *Achromobacter xylosoxidans* A8 podem ser utilizadas para o desenvolvimento de tecnologias de biorremediação, com a remoção dos contaminantes do ambiente através da caracterização de um complexo dioxigenase que atue na degradação de vários hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Além disso, as

proteínas de *Achromobacter xylosoxidans* A8 que são homólogas às NahAaAbAcAd não apresentam análises estruturais anteriores e ainda, as proteínas similares com estruturas resolvidas, depositadas em bancos de dados, apresentam baixa identidade de sequência, cerca de 26 a 41%. Nessa diferença na sequência de aminoácidos reside a possibilidade em se obter um complexo dioxigenase que possa apresentar alta promiscuidade enzimática frente aos HAPs. Logo, a resolução das estruturas tridimensionais dessas proteínas torna-se muito interessante por apresentar um maior potencial para a descoberta de um complexo dioxigenase capaz de degradar uma extensa variedade de substratos. A avaliação da promiscuidade e especificidade das enzimas do complexo da dioxigenase frente a diversos substratos aromáticos é relevante do ponto de vista biotecnológico, uma vez que possibilita a utilização de um único complexo enzimático para degradar vários substratos poluentes.

Além disso, com o estudo bioquímico e cinético bem como a caracterização estrutural das proteínas do complexo dioxigenase de *Achromobacter xylosoxidans* A8, será possível através da comparação não somente com a estrutura de NahA de *Pseudomonas putida* G7, bem como com outras dioxigenases que apresentam estruturas resolvidas, verificar diferenças significativas que podem determinar alterações funcionais, como a avaliação da especificidade de substrato e o mecanismo de ação do complexo da dioxigenase na degradação dos HAPs.

Portanto, a resolução da estrutura tridimensional das proteínas do complexo dioxigenase é significativa, pois a partir do entendimento de sua estrutura-função é possível utilizar técnicas bioquímicas, como mutações sítio-dirigidas, para estudar a seletividade da enzima para diferentes substratos e elucidar os mecanismos de catálise.

3. OBJETIVOS

2.1. Geral

Identificar proteínas de um potencial complexo dioxigenase e estudar a relação estrutura-função sobre substratos aromáticos.

2.2. Específicos

- Selecionar proteínas similares às do complexo da naftaleno dioxigenase de *Pseudomonas putida* G7;
- Otimizar, sintetizar e clonar os genes das proteínas recombinantes do complexo dioxigenase (AaAbAcAd);
- Expressar e purificar as proteínas AaAbAcAd para realização dos ensaios caracterização estrutural;
- Caracterizar bioquímica e cineticamente o complexo AaAbAcAd sobre substratos aromáticos;
- Realizar ensaios de cristalização e coletar dados de difração de raios-X dos cristais obtidos;
- Determinar as estruturas cristalográficas das proteínas do complexo dioxigenase.

4. METODOLOGIA

3.1. Seleção das enzimas do complexo da dioxigenase

A escolha das enzimas similares à NahAa, NahAb, NahAc e NahAd, proteínas do complexo da naftaleno dioxigenase, NahA, foi realizada pela busca por sequências depositadas nos bancos de dados NCBI e KEGG (disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> e <http://www.genome.jp/kegg>). A busca se deu por proteínas que apresentavam sequências de aminoácidos similares às enzimas que compõem o complexo da naftaleno dioxigenase em *Pseudomonas putida* G7 e que apresentariam uma função correspondente. Durante a seleção, as proteínas alvos foram avaliadas quanto à solubilidade e predição de cristalização. A ferramenta de predição de solubilidade foi utilizada para avaliar proteínas superexpressas em

Escherichia coli, disponível em: <http://www.biotech.ou.edu/> (DIAZ *et al.*, 2010). Esse modelo para predição de proteínas recombinantes solúveis utiliza parâmetros como a massa molecular, ponto isoelétrico (pI), número total de resíduos hidrofóbicos, dentre outros.

O servidor XtalPred foi utilizado para a análise de predição de cristalização (disponível em <http://ffas.burnham.org/XtalPred-cgi/xtal.pI>), o qual avalia a massa molecular, índice de instabilidade, coeficiente de extinção molar, pI, estrutura secundária, presença de regiões desordenadas, peptídeo sinal, presença de hélices transmembranas, dentre outros (SLABINSKI *et al.*, 2007).

Além da similaridade de sequência, outros fatores contribuíram para a escolha das proteínas, como as sequências dos quatro genes advindos do mesmo microrganismo e evidências experimentais da bactéria relacionadas a utilização da mesma em solos contaminados com HAPs e outros poluentes.

Assim, de acordo com todos os critérios utilizados e os melhores índices obtidos com as análises, as enzimas Aa, Ab, Ac e Ad de *Achromobacter xylosoxidans* A8 foram escolhidas, e os quatro genes otimizados para posterior síntese e clonagem.

Em razão dos genes selecionados serem provenientes de *A. xylosoxidans* A8, a partir desse momento, para evitar qualquer equívoco, renomeamos as abreviaturas das enzimas NahAa, NahAb, NahAc e NahAd para Aa (redutase), Ab (ferredoxina), Ac (subunidade alfa ou maior da oxigenase) e Ad (subunidade beta ou menor da oxigenase), respectivamente.

3.2. Otimização, síntese e clonagem dos genes nos vetores pETDuet-1 e pACYCDuet-1

Os genes codificadores das proteínas Aa, Ab, Ac e Ad de *Achromobacter xylosoxidans* A8 foram otimizados para a expressão heteróloga em *Escherichia coli*. Em razão da variação na frequência de uso de códons específicos para diferentes organismos, torna-se importante realizar a otimização *in silico* com o intuito de aumentar a eficiência na expressão das proteínas

recombinantes e, para isso, alguns parâmetros são avaliados para modificar as sequências de códons do gene em questão.

Em um primeiro passo, é feita a análise da frequência de códons utilizada pelo hospedeiro para realizar a troca de tais códons sem alterar a sequência de aminoácidos da proteína a ser codificada. Os códons raros identificados também são eliminados, a fim de se evitar baixos níveis de expressão. Em seguida, é realizada a troca de códons desfavoráveis, que possuem sequências adjacentes ricas em GC (pareamentos guanina e citosina) ou que possuem sequências repetitivas, as quais são responsáveis por diminuir a eficiência da transcrição genica. Além disso, é possível adicionar sítios de restrição à sequência otimizada para posterior manipulação do gene (GUSTAFSSON; GOVINDARAJAN; MINSHULL, 2004; PUIGBÒ *et al.*, 2007; VILLALOBOS *et al.*, 2006).

As sequências gênicas codificadoras para as proteínas Aa, Ab, Ac e Ad de *A. xylosoxidans* A8 foram otimizadas *in silico* pelo servidor Optimizer (disponível em: <http://genomes.urv.es/OPTIMIZER>) (PUIGBÒ *et al.*, 2007) e em seguida foram analisadas mais uma vez, manualmente, para a troca dos códons ricos em conteúdo GC e de códons repetitivos adjacentes. Nesta nova análise, foi utilizado o servidor Graphical Codon Usage Analyser (disponível em: <http://gcua.schoedl.de/>) e o programa Gene Designer 2.0 (disponível em: <http://www.dna20.com/genedesigner>) (VILLALOBOS *et al.*, 2006).

Além disso, foram adicionadas às sequências finais os sítios de restrição para posterior clonagem. As sequências dos genes codificadores para as proteínas Aa e Ab foram clonadas no vetor pACYCDuet-1[®] enquanto, os genes codificadores para Ac e Ad no vetor pETDuet-1[®], sendo que estes vetores permitem a co-expressão dos quatro genes envolvidos. Para as sequências gênicas das proteínas Aa e Ac, foram adicionados os sítios de restrição para as enzimas BamHI e HindIII, e para Ab e Ad, os sítios de restrição para NdeI e XhoI.

Por fim, na construção de cada inserto, com exceção da proteína Ad, foi adicionada à porção N-terminal das proteínas a sequência do sítio de clivagem para a protease TEV (*Tobacco etch* vírus), uma enzima que cliva a cauda de histidina N-terminal (CARNEIRO *et al.*, 2006). Como a proteína Ad é conhecida como parte de um complexo com a proteína Ac para formar o terminal oxigenase, tanto a cauda de histidina quanto o sítio de clivagem da protease TEV não foram adicionados via sequência nucleotídica. A síntese e clonagem dos quatro genes foi realizada pela empresa GenScript (disponível em: <http://www.genscript.com/>).

3.3. Transformação dos vetores pETDuet-1 e pACYCDuet-1 recombinantes em bactérias *Escherichia coli* BL21

Os genes recombinantes contendo a sequência das proteínas Aa e Ab, clonados no vetor pACYCDuet-1, e Ac e Ad clonados no vetor pETDuet-1, foram ressuspensos em água Mili-Q conforme instruções do fabricante. As transformações foram realizadas com bactérias *E. coli* BL21 Arctic Express eletrocompetentes com os seguintes vetores recombinantes: Aa-pACYCDuet, AaAb-pACYCDuet, AcAd-pETDuet e, por último a co-transformação contendo as sequências gênicas das quatro proteínas Aa, Ab, Ac e Ad, sendo este denominado AaAbAcAd-pACYCDuet-pETDuet.

A cepa bacteriana *E. coli* BL21 Arctic Express (DE3) expressa constitutivamente duas chaperonas, Cnp10 e Cnp60 com cerca de 10kDa e 60kDa, respectivamente, que auxiliam no enovelamento das proteínas. E ainda, a expressão proteica realizada a 12 °C contribui para o correto enovelamento e favorece a expressão de proteínas solúveis (CARNEIRO *et al.*, 2006).

A transformação foi realizada separadamente com cada vetor de modo que 1 µL do vetor recombinante na concentração de 100 ng/µL e 50 µL de células *E. coli* BL21 Arctic Express eletrocompetentes foram adicionados a uma cubeta específica para a eletroporação a 2,5 kV. Contudo, para a co-transformação dos quatro genes (contendo dois vetores) foram utilizados 0,5 µL de cada vetor recombinante.

Após a eletroporação, as bactérias foram ressuspensas com meio de cultura Luria Bertani (LB) líquido (peptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L e NaCl 5 g/L pH 7,4) e aquecidas a 37 °C por 1 hora sob agitação de 200 rpm. Este período é necessário para a expressão do gene de resistência ao antibiótico gentamicina, presente na bactéria *E. coli* BL21 Arctic Express, o que confere apenas o crescimento dos transformantes que contêm os genes de interesse.

Em seguida, as bactérias foram plaqueadas em meio LB/ágar 1,5 %, acrescido de cloranfenicol (34 µg/ml) e gentamicina (20 µg/ml), para as bactérias contendo Aa-pACYCDuet e AaAb-pACYCDuet; ampicilina (100 µg/ml) e gentamicina (20 µg/ml) para as bactérias contendo AcAd-pETDuet; cloranfenicol (34 µg/ml), ampicilina (100 µg/ml) e gentamicina (20 µg/ml) para as bactérias contendo AaAbAcAd-pACYC-pETDuet. As placas foram mantidas a 37 °C por 16 horas em estufa de crescimento.

3.4. Expressão das proteínas recombinantes do complexo dioxigenase

Os vetores recombinantes pACYCDuet, pETDuet e pACYCDuet-pETDuet contendo os genes de interesse foram transformados em bactérias *E. coli* BL21 Arctic Express e 20 µL das bactérias foram inoculados em 20 mL de meio LB líquido, suplementado com os respectivos antibióticos para cada transformante, utilizados no plaqueamento conforme citado. Este inóculo permaneceu por 16 horas a 37 °C sob agitação de 200 rpm e em seguida a cultura foi transferida para 1 L de meio líquido LB, sem antibiótico, e cultivada a 30 °C, 200 rpm por 3 horas. Posteriormente foi feita a indução da expressão proteica por meio da adição de IPTG 0,5 mM e a cultura foi mantida por 72 horas a 12 °C e 200 rpm. Após o período de expressão o meio de cultivo foi centrifugado a 10.000 g por 5 min e 4 °C.

As células obtidas após a centrifugação foram ressuspensas em 15 mL de tampão de lise (sacarose 1 % (v/v); glicerol 1 % (v/v); lisozima 0,25 % (p/v) e Tween 20 em Tris-Cl 50 mM pH 7,4). Em seguida, as células foram submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento seguidos por sonicação três vezes repetidas em pulsos de 30 segundos com

intervalos de descanso de 30 segundos a 30 % de amplitude em banho de gelo; para a lise celular e liberação das proteínas. Após a lise a amostra foi centrifugada a 10.000 g por 30 min e 4 °C para separar o material solúvel dos debrís celulares.

A avaliação da expressão e verificação da presença das proteínas nas frações solúvel ou insolúvel após a lise foi realizada por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15%.

3.5. Purificação das proteínas recombinantes do complexo dioxigenase

3.5.1. Cromatografia de afinidade ao níquel

O sobrenadante ou fração solúvel, obtido após a lise e remoção dos debrís celulares, acrescido de 30 mM de imidazol, foi purificado por afinidade ao níquel em coluna HisTrap Hp Ni²⁺ (GE Healthcare Biosciences) de 5 mL, conectada ao cromatógrafo ÄKTA pure 25 M (GE Healthcare Biosciences). Para a purificação foi utilizado tampão de ligação (tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4; NaCl 500 mM e imidazol 10 mM) e a proteína recombinante foi eluída com gradiente linear crescente de tampão de eluição (tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4; NaCl 500 mM e imidazol 500 mM). A amostra foi carregada na coluna com fluxo de 1 mL/min e um fluxo de 5 mL/min foi utilizado durante as lavagens do sistema.

As amostras obtidas após a cromatografia de afinidade foram analisadas por SDS-PAGE 15% e as proteínas recombinantes foram purificadas separadamente conforme a mesma metodologia.

3.5.2. Cromatografia de exclusão molecular

A amostra proveniente da cromatografia de afinidade foi concentrada em Vivaspín 6 – 10.000 MWCO (GE Healthcare Biosciences) até o volume de 5 mL e aplicada em coluna de gel filtração Superdex 200 prep grade (Hiload 16/60) previamente equilibrada com tampão

fosfato de sódio, 20 mM pH 7,4 e NaCl 50 mM, conectada ao sistema ÄKTA pure 25 M (GE Healthcare). As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão a um fluxo de 1 mL/min.

As amostras foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamina 15 % e as proteínas recombinantes foram purificadas separadamente de acordo com a mesma metodologia.

3.6. Determinação da concentração de proteínas

A concentração das proteínas em solução foi determinada através da medida da absorbância a 280 nm. As sequências das proteínas foram analisadas na base de ferramentas do ExPASy Proteomics server - ProtParam (disponível em: <http://www.expasy.org>) para o cálculo teórico do coeficiente de extinção molar (ARTIMO *et al.*, 2012). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro e a medida da concentração molar de cada proteína foi estimada pela Lei de Lambert-Beer, que relaciona a intensidade da luz absorvida em um meio transparente de espessura b , com o uso da seguinte fórmula:

$$A = \epsilon \times c \times b$$

onde A é a absorbância a 280 nm; ϵ é o coeficiente de extinção molar ($M^{-1}.cm^{-1}$); c é a concentração molar da proteína, e b é o caminho óptico do equipamento em cm. O caminho óptico do espectrofotômetro corresponde a 1 cm.

3.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS e β -mercaptoetanol foi realizada conforme descrito por Laemmli (LAEMMLI, 1970). Os mini-géis foram preparados a partir de soluções estoque de acrilamida/N,N-metileno bisacrilamida (bis) 30 % (p/v), tampão Tris/HCl 1,5 M, pH 8,8, para o gel separador (15%) e tampão Tris/HCl 0,5 M, pH 6,8, para o gel empilhador (4%), persulfato de amônio 10 % (p/v), dodecil sulfato de sódio (SDS) 10 % (p/v) e N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamino de sódio (TEMED - 1:2000, v/v). As amostras submetidas

à eletroforese foram adicionadas ao tampão de amostra (SDS 2 % (p/v); glicerol 10 % (v/v); β -mercaptoetanol 5 % (v/v); azul de bromofenol 0,002 % (p/v) em Tris/HCl 0,065 M, pH 6,8), aquecidas a 100 °C durante 5 minutos e aplicadas no gel. As corridas eletroforéticas foram realizadas à temperatura ambiente, a 120 V, em placas do Sistema Mini-Protean® Tetra Cell (Bio-Rad). Como marcadores moleculares foram utilizados o *Pierce™ Unstained Protein Molecular Weight Marker* (ThermoFisher Scientific) e o marcador pré-corado *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (BioRad).

3.7.1. Coloração dos géis de poliacrilamida

A visualização do material proteico presente nos géis de poliacrilamida foi realizada pela coloração com *Coomassie Blue*. Após a eletroforese o gel foi incubado na solução corante (etanol 15% (v/v); ácido acético 7% (v/v); *Coomassie Brilliant Blue R-250*) por 16 horas. Em seguida, a solução descorante (etanol 10% (v/v); ácido acético 5% (v/v)) foi utilizada para a remoção do excesso de corante e a visualização das bandas de proteínas.

Alternativamente, para as análises por western blotting os géis foram submetidos à coloração por prata. As proteínas presentes no gel foram reveladas com nitrato de prata, conforme procedimento descrito por Blum et al.(1987). Após a corrida eletroforética, os géis foram colocados em solução fixadora (metanol 50% (v/v), ácido acético 12% (v/v)), por 1h, seguido de três lavagens de 10 minutos com solução de etanol 50% (v/v). Posteriormente, os géis foram lavados por 1 minuto em solução de tiosulfato de sódio 0,02 % (p/v). Em seguida, os géis foram lavados com água por 20 segundos sob agitação e incubados por 20 minutos em solução de nitrato de prata 0,2% (p/v), contendo 37 μ L de formaldeído 38% (v/v) e após isto foram lavados por três vezes com água, por 20 segundos sob agitação. Para a revelação os géis foram incubados com solução reveladora (carbonato de sódio 4% (m/v), contendo 2 mL de solução de tiosulfato de sódio 0,02% (p/v) e 50 μ L de formaldeído 38% (v/v)), até a

visualização das bandas proteicas. A reação foi interrompida pela adição de ácido acético 5% (v/v).

Já para as análises de espectrometria de massa, a coloração foi realizada com solução de Coomassie coloidal G-250. Após a eletroforese, o gel foi lavado três vezes com água Mili-Q, incubado por 2 horas em solução de fixação (etanol 40% (v/v); ácido acético 10% (v/v)), a temperatura ambiente sob agitação, seguido de três lavagens com água Mili-Q. Em seguida, o gel foi incubado em solução de coloração coomassie G-250 (sulfato de amônio 8% (p/v); ácido fosfórico 0,8 % (v/v); Coomassie Blue G-250 0,08% (p/v); metanol 20 % (v/v)), sob agitação, a temperatura ambiente por 3 dias. Após a coloração, o gel foi lavado com água Mili-Q por três vezes de 30 minutos cada até a visualização das bandas de proteínas.

3.8. Western Blotting

Para identificação das proteínas recombinantes Aa, Ab e Ac as amostras provenientes das etapas de purificação após a eletroforese foram submetidas à técnica de *western blotting* (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979), utilizando anticorpo anti-His, uma vez que as proteínas contêm cauda de histidinas presentes no N-terminal. O sistema de transferência das bandas do SDS-PAGE para uma membrana de nitrocelulose (0,45 µM, Millipore), consistiu no posicionamento do gel sobre a membrana e ambos foram acondicionados entre folhas de papel de filtro e espuma, sendo que todo o sistema estava umedecido em tampão de transferência (Tris 0,025 M; glicina 0,187 M; metanol 20% (v/v)).

A transferência foi realizada sob banho de gelo por 1 hora a 100 V e 400 mAmp. Após a transferência, a membrana foi corada em solução de Ponceu (0,1% (p/v) em ácido acético 5% (v/v)) por 5 minutos sob agitação para verificar se houve a transferência correta das bandas. Em seguida, a membrana foi descorada e lavada com TBS-T (0,05% (v/v) de Tween 20 em TBS (Tris 0,020 M; NaCl 0,15 M) por 5 minutos. Em sequência, a membrana foi bloqueada em TBS-LT (leite em pó 5% (p/v) em TBS-T) em temperatura ambiente sob agitação.

Após 1 hora, foram realizadas três lavagens de 10 minutos cada com TBS-T e em seguida a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-His na diluição 1:1000 (em TBS-LT) à temperatura ambiente por 16 horas sob agitação. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes por 5 minutos em TBS-T e incubada com o anticorpo secundário anti-imunoglobulina conjugado com peroxidase (Anti-mouse IgG – *whole molecule* – *peroxidase conjugate*, Sigma, St. Louis, USA), na diluição 1:2000 (em TBS-LT), por 1 hora à temperatura ambiente e protegido da luz. A membrana foi lavada novamente três vezes por 5 minutos em TBS-T. As bandas foram reveladas por reação de quimioluminescência com ECL Plus (GE Healthcare Biosciences).

3.9. Espectrometria de massa

Para a identificação das proteínas recombinantes por espectrometria de massa as análises foram realizadas, em colaboração com o Dr. Edvaldo Barros, no Núcleo de Análises de Biomoléculas – NuBioMol/UFV, utilizando o espectrômetro MALDI-TOF/TOF, modelo Ultraflex III (Bruker Daltonics).

As bandas correspondentes as amostras após a purificação por cromatografia de gel filtração foram excisadas dos géis corados por Coomassie G-250 e acondicionadas em solução de ácido acético 5% (v/v).

A digestão enzimática foi realizada com tripsina de pâncreas suíno, indicada para a utilização em proteômica (referência T-6567; Sigma Aldrich, USA) e conduzida conforme descrito anteriormente, (SHEVCHENKO *et al.*, 2006), utilizando uma solução de tripsina na concentração de 25 ng/μL. Após a digestão, os peptídeos trípticos foram secos em *Speed Vac* (modelo AG-22331; Eppendorf, Alemanha), ressuspensos em solução de ácido trifluoracético 0,1 % (v/v) e dessalinizados em ponteira do tipo ZIPTIP (Millipore, USA), os quais foram eluídos em solução acetonitrila 50 % (v/v) com ácido trifluoracético 0,1 % (v/v). Para as análises da amostra por espectrometria de massa foram aplicados 1 μL da solução de

peptídeo do eluato com 1 μ L da matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico – HCCA (Brucker Daltonics, Alemanha), a qual foi solubilizada na mesma solução de eluição dos peptídeos, na concentração de 10 mg/mL.

Para a calibração do método de análise MS1 foram utilizados peptídeos padrões (Peptide Calibration Standard II; Bruker Daltonics, Alemanha), aplicados junto com a matriz nas mesmas condições. A aquisição dos espectros de MS1 e MS2 por MALDI TOF/TOF foram feitas após a secagem das amostras proteicas bem como o padrão de peptídeos por 12 horas à temperatura ambiente. Para a obtenção dos dados de MS1 foi utilizado o modo refletivo e positivo, com uma faixa de detecção de 500-3400 Da e, para o MS2, usando o método LIFT no modo positivo, foram selecionados os íons com maior intensidade em relação à razão massa carga (m/z). Os dados obtidos foram analisados utilizando o software Flexcontrol, versão 3.3 (Brucker Daltonics, Alemanha) e os espectros resultantes do MS1 e MS2 processados com o auxílio do aplicativo flexAnalysis, versão 3.3 (Brucker Daltonics, Alemanha). As listas de picos de MS2 foram geradas pelo aplicativo BioTools, versão 3.2 (Brucker Daltonics, Alemanha), no formato *mascot generic format* (mgf).

Para a identificação das proteínas, as listas de massas foram submetidas a análises em bancos de dados de proteínas do táxon bactéria depositadas no UNIPROT e SwissProt, usando o aplicativo MASCOT, versão 2.4.0 (Matrix Science, London, UK). Os parâmetros definidos para a pesquisa foram: digestão enzimática pela tripsina com uma clivagem perdida; permitindo a tolerância de erro para o íon parental de 0,2 Da e para os fragmentos de 0,5 Da; carbamidometilação da cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável. A validação do resultado obtido pelo MASCOT foi feita pelo aplicativo SCAFFOLD, versão 3.6.4 (Proteome Software Inc., Portland, OR). Os peptídeos identificados foram validados pela aplicação do algoritmo Peptide Prophet (KELLER *et al.*, 2002) e para as proteínas o algoritmo Protein Prophet (NESVIZHSHKII *et al.*, 2003). Como critério de

aceitação foram adotados os parâmetros com o mínimo de 95% de probabilidade para a identificação das proteínas e 90% para os peptídeos, com a presença de pelo menos um peptídeo único para cada proteína identificada. As informações sobre o processo biológico das proteínas identificadas foram obtidas pela busca no banco de dados UNIPROT (<http://www.uniprot.org>).

3.10. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Os ensaios de espalhamento dinâmico de luz (DLS – *Dynamic Light Scattering*) foram realizados com as proteínas recombinantes provenientes da cromatografia de gel filtração. As amostras proteicas foram centrifugadas a 10.000 g, por 10 min a 4 °C para a retirada de qualquer impureza ou material presente em suspensão. As amostras foram acondicionadas em cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico e leituras foram realizadas no aparelho Zetasizer Nano (Malvern). Os dados foram coletados e analisados através do software Zetasizer versão 6.01 (Malvern), o qual fornece as estimativas de tamanho e massa molecular de acordo com o raio hidrodinâmico (Rh) da partícula em solução.

3.11. Ensaios de atividade enzimática

Os ensaios de atividade biológica com as proteínas recombinantes AaAbAcAd foram determinados espectrofotometricamente a 30 °C por 25 minutos. A mistura de reação (volume total de 1 mL) continha tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 e 50 mM NaCl, NADH 200µM, FAD 6,3 µM, substrato 0,25 µM solubilizado em acetonitrila e as enzimas nas respectivas concentrações: Aa (0,40 uM), Ab (1,57 uM) and AcAd (0,13 uM). A atividade da dioxigenase foi avaliada acompanhando a oxidação do NADH a 340 nm, conforme descrito anteriormente (JOUANNEAU *et al.*, 2006), com modificações.

3.12. Ensaios de cristalização das proteínas recombinantes e difração de raios-X

Os testes de cristalização foram realizados utilizando a técnica de difusão de vapor da gota suspensa. Nessa técnica, a solução da proteína é adicionada à uma solução precipitante em

uma lamínula, a gota formada posteriormente é invertida sobre um recipiente contendo 1 mL da mesma solução precipitante e o sistema é vedado com graxa. Através da difusão do vapor do solvente, a gota na lamínula se torna supersaturada à medida que o sistema entra em equilíbrio, possibilitando a formação dos cristais (RHODES, 2006).

Os testes iniciais foram realizados com soluções de cristalização dos Kits Crystal Screen e Crystal Screen 2 (Hampton Research, Aliso Viejo, EUA). As gotas foram aplicadas na proporção de 1:1 (1 µl de solução de proteína e 1 µl de solução de precipitante) com as proteínas Aa e AcAd nas concentrações de 5 mg/mL e 10 mg/mL e as placas foram mantidas a 18 °C no Laboratório de Biologia Estrutural (Bioest), na UFMG. Porém, das 96 condições de cristalização testadas para cada amostra, não foi observado a formação dos cristais das proteínas em nenhuma gota de cristalização.

Concomitantemente, as proteínas AcAd foram enviadas para testes realizados pelo robô de cristalização, com soluções disponíveis no RoboLab - Laboratório Automatizado de Cristalização de Macromoléculas, localizado no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), em Campinas, SP. Ao todo, foram testadas 480 condições em um screening inicial, com a amostra de AcAd na concentração de 5 mg/mL e as gotas na proporção de 1:1 (0,3 µl de solução de proteína e 0,3 µl de solução de precipitante). Entretanto, as tentativas de cristalização realizadas não foram bem sucedidas, de modo que não foi observada a formação de cristais nas gotas de cristalização.

Dessa forma, testes de cristalização com as proteínas foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Guillermo V. Calero, do Departamento de Biologia Estrutural da Universidade de Pittsburgh (PA, EUA). Para a realização dos testes iniciais de cristalização as amostras das proteínas foram avaliadas primeiramente nas seguintes concentrações de Aa (9 e 15 mg/mL), Ab (5 e 10 mg/mL) e AcAd (6 e 12 mg/mL). Os cristais obtidos foram submetidos à difração

de raios-X no *Stanford Synchrotron Radiation Lightsource* (SSRL), localizado no SLAC *National Accelerator Laboratory*, na Universidade de Stanford, CA, Estados Unidos.

3.13. Resolução da estrutura cristalográfica

A determinação da estrutura cristalográfica do terminal oxigenase (AcAd) foi realizada em colaboração com o Prof. Guillermo Calero, utilizando a técnica de SAD (*Single-wavelength Anomalous Dispersion*) *phasing*. A condução dos experimentos de difração de raios-X se baseou na utilização do sinal anômalo do átomo de ferro presente na subunidade alfa (Ac) e para a resolução da estrutura, esta técnica requer a coleta de um único conjunto de dados de um cristal, considerando uma otimização do sinal anômalo.

O processamento dos dados de difração coletados foram realizados utilizando o XDS (<http://xds.mpimf-heidelberg.mpg.de>). O ciclos de refinamento iniciais foram realizados utilizando o programa Refmac (MURSHUDOV *et al.*, 2011), e os ciclos finais conduzidos pelo programa Phenix (ADAMS *et al.*, 2010), para uma adequação mais precisa dos parâmetros como os comprimentos das ligações e ângulos. Posteriormente, no programa Coot (EMSLEY *et al.*, 2010) foram feitas as análises manuais no modelo considerando os mapas de densidade eletrônica $2F_o - F_c$ e $F_o - F_c$.

As imagens obtidas para os modelos estruturais foram feitas utilizando o programa Pymol (*The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC*).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seleção das proteínas do complexo dioxigenase

Inicialmente, a seleção das proteínas-alvo deste trabalho foi realizada através da busca nos bancos de dados do NCBI e KEGG por enzimas similares àquelas do complexo da naftaleno dioxigenase de *Pseudomonas putida* G7, conforme descrito no item 3.1.

Como o propósito do presente trabalho foi o de obter um complexo dioxigenase similar ao da naftaleno dioxigenase mas que fosse capaz de degradar vários substratos aromáticos além do naftaleno, foi feita uma lista de filtros para selecionar as sequências de acordo com alguns critérios. Ficou estabelecido que: (a) a sequência de nucleotídeos de todos os componentes da naftaleno dioxigenase devem ser avaliadas; (b) os valores preditos para estabilidade proteica e solubilidade devem ser favoráveis para todos os membros do complexo e (c) proteínas com predição de ausência de regiões desordenadas, peptídeo sinal e hélice transmembranas, dentre outros critérios, devem ser melhor classificadas. Durante esta fase, diferentes ferramentas computacionais foram utilizadas, uma de cada vez.

Após esse processo, as enzimas homólogas (com os respectivos códigos de acesso no NCBI) denominadas de Aa (ADP19870), Ab (ADP19865), Ac (ADP19875) e Ad (ADP19874) de *Achromobacter xylosoxidans* A8 foram selecionadas e, a similitude de sequência de aminoácidos é de 59%, 58%, 27% e 86% com as proteínas NahAa, NahAb, NahAc e NahAd de *P. putida*, respectivamente.

De acordo com dados da literatura *Achromobacter xylosoxidans* A8 foi isolada do solo contaminado com compostos orgânicos derivados do petróleo. A bactéria *A. xylosoxidans* contém o plasmídeo pA81 (98,2 kbp; código de acesso no *European Bioinformatics Institute* - EMBL: AJ515144). Neste plasmídeo estão contidos os genes que codificam, dentre outras enzimas, a redutase, a ferredoxina e o terminal dioxigenase composto pela subunidade menor ou beta e subunidade maior ou alfa do complexo dioxigenase (JENCOVA *et al.*, 2008; STRNAD *et al.*, 2011).

Para a avaliação da predição da solubilidade e cristalização, com cada sequência analisada, foi atribuída uma porcentagem correspondente à predição de solubilidade para superexpressão em *Escherichia coli*. Para a proteína Aa (redutase) de *Achromobacter xylosoxidans* A8, a chance de solubilidade quando superexpressa em *E. coli* foi de 21,9%. Em

relação às proteínas Ab (ferredoxina), Ac (subunidade alfa) e Ad (subunidade beta), nenhuma das sequências apresentou-se como solúvel após estimativa realizada pelo modelo de predição de Diaz e colaboradores (DIAZ *et al.*, 2010). Os valores atribuídos para estas sequências referem-se apenas à predição de insolubilidade.

Apesar da impossibilidade atribuída pelo modelo em se obter todas as proteínas recombinantes potencialmente solúveis, estas sequências foram selecionadas para superexpressão em *E. coli*. Isso porque uma vez que as quatro proteínas formariam um complexo *in vivo* em *Achromobacter xylosoxidans* A8, é possível que a superexpressão do complexo seria suficiente para tornar as proteínas solúveis em comparação com a expressão individualizada de cada proteína.

Após a determinação dos respectivos alvos, foi realizada uma busca utilizando a sequência proteica de Aa, Ab, Ac e Ad, por modelos estruturais no *Protein Data Bank* (PDB) e não foi encontrado qualquer depósito das respectivas proteínas de *Achromobacter xylosoxidans* A8, bem como nenhum estudo sobre a relação estrutura-função dessas proteínas.

Por fim, foi realizada a análise de probabilidade de cristalização utilizando o servidor XtalPred onde vários parâmetros são avaliados, conforme descrito no item 3.1. Este programa fornece uma classificação para a sequência de aminoácidos em questão, através da comparação de características bioquímicas e biofísicas da proteína alvo com uma distribuição de probabilidades presentes em proteínas contidas em seu banco de dados, de forma que a predição de cristalização é classificada em ótima, sub-ótima, média, difícil e muito difícil. A proteína Aa foi classificada como pertencente a classe ótima, enquanto que as proteínas Ab e Ac à classe difícil e Ad classificada como média. Estes resultados, mesmo com classes diferentes de sucesso de cristalização para as quatro proteínas, fazem delas potenciais candidatas para estudos estruturais. Isto se deve já que algumas características que favorecem a formação de cristais,

como a ausência de: hélices transmembranares, regiões desordenadas e peptídeo sinal, dentre outras que são compartilhadas pelas quatro proteínas.

4.2. Otimização das sequências gênicas de Aa, Ab, Ac e Ad

Considerando que as sequências de todo modo seriam sintetizadas, em razão da dificuldade em se obter a cepa de *Achromobacter xylosoxidans* A8, considerou-se oportuno realizar a otimização gênica (item 3.2.) das sequências codificadoras para as proteínas Aa, Ab, Ac e Ad, com o intuito de se obter uma melhor eficiência na expressão das enzimas recombinantes, para posterior síntese e clonagem. Os alinhamentos com as sequências durante o processo de otimização foram realizados no servidor Multalin (CORPET, 1988) e visualizados no programa ESPript 3.0 (ROBERT; GOUET, 2014).

Para início da otimização foi utilizado o servidor Optimizer, que realiza a otimização automática da sequência, modificando os códons presentes nas sequências alvo por aqueles códons mais frequentemente utilizados pelo microrganismo hospedeiro para a expressão heteróloga. A otimização foi conduzida baseada na frequência de uso dos códons para *Escherichia coli* K12. Porém, esta sequência poderia levar a uma sobrecarga para a maquinaria de tradução celular, assim, as sequências nucleotídicas foram analisadas manualmente no programa GeneDesigner 2.0.

Na edição manual a sequência gênica foi verificada e os códons alterados tendo como objetivo evitar regiões com sequências de códons repetitivos em conteúdo GC ou AT, assim como minimizar a utilização de códons seguidos que tivessem frequência de uso igual a 100%. O processo de otimização foi realizado da mesma maneira para todas as sequências gênicas codificadoras para as proteínas Aa, Ab, Ac e Ad.

Para a sequência gênica da proteína Aa, a comparação das frequências de uso dos códons no gene otimizado e pela *E. coli* K12 está representada na figura 4. Pode-se verificar que para todos os resíduos de aminoácidos codificados pela sequência otimizada foi utilizado apenas um

dos códons possíveis para cada resíduo. Como demonstrado na figura 5, o alinhamento das sequências nucleotídicas de Aa nativa, otimizada automaticamente (OPTIMIZER) e manualmente (GeneDesigner) apresentaram alta similaridade.

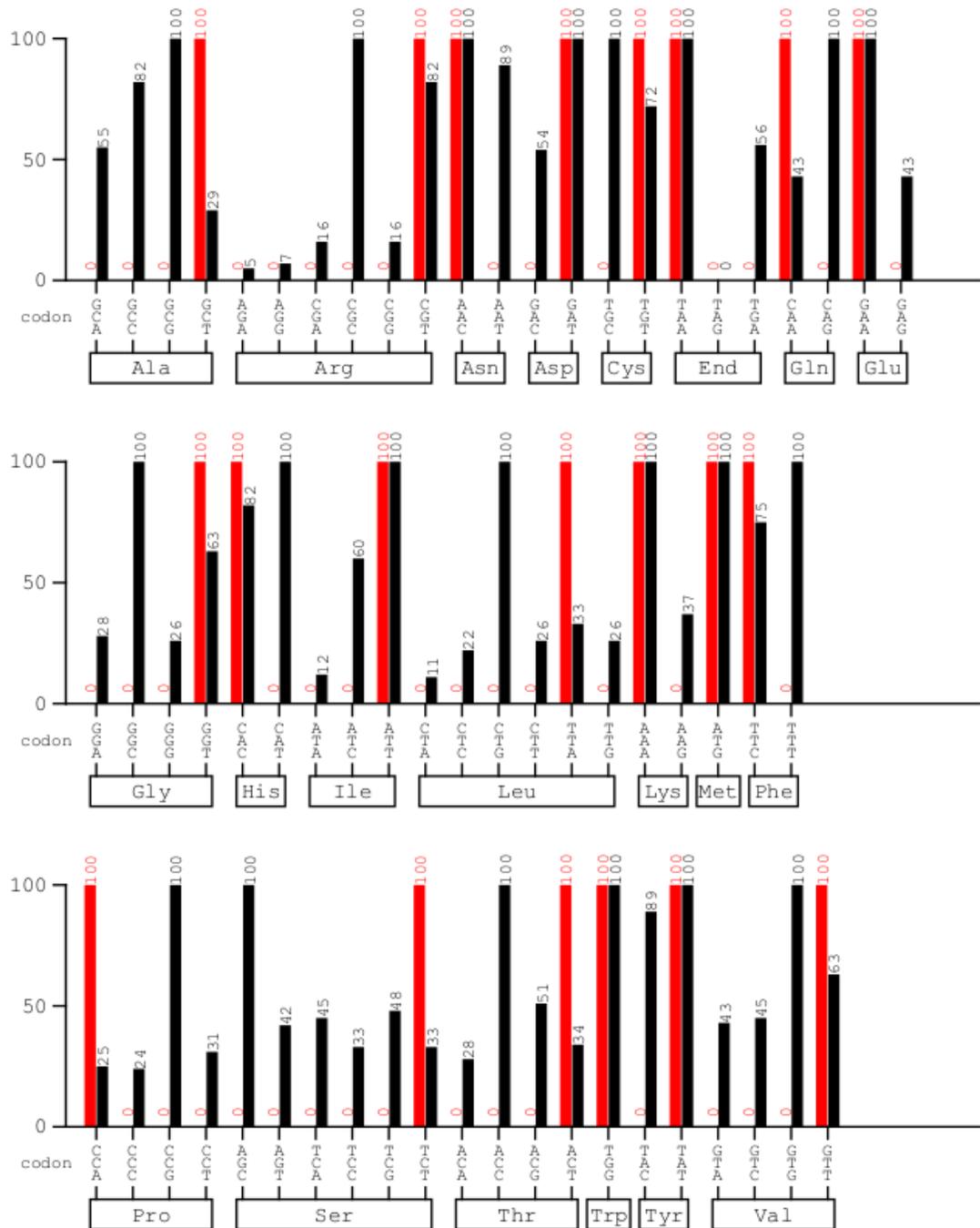


Figura 4: Comparação da frequência de uso de códons para a *Escherichia coli* K12 com a sequência do gene de Aa (redutase) de *Achromobacter xylosoxidans* A8 otimizado.

Eixo x: representação das frequências de uso de códons utilizada pela *Escherichia coli* K12 (em preto) e na sequência de Aa otimizada (em vermelho). Eixo y: representação da adaptação relativa do uso de códons. Em comparação com a frequência de uso de códons de *E. coli* K12, a sequência otimizada

apresentou uma diferença média de 44%. O gráfico foi gerado pelo servidor GCUA (<http://gcu.schoedl.de>).



Figura 5: Otimização da sequência nucleotídica para o gene codificador da proteína Aa (redutase) de *Achromobacter xylosoxidans* A8.

Aa: sequência não otimizada; Aa_OPTIMIZER: sequência otimizada pelo servidor OPTIMIZER; Aa_GeneDesigner: sequência otimizada manualmente utilizando o programa Gene Designer 2.0. A coloração vermelha é baseada na similaridade entre as sequências no alinhamento.

O mesmo processo de otimização foi realizado com as demais proteínas Ab, Ac e Ad. Para evitar repetições e que o texto fosse cansativo, as figuras com a comparação entre as frequências de uso de códons pela *E. coli* K12 com os genes otimizados, bem como a comparação das sequências gênicas das proteínas nativa, otimizada automaticamente (OPTIMIZER) e manualmente (GeneDesigner) para as outras proteínas foram inseridas em anexo ao final da tese.

Assim, após a modificação das sequências nucleotídicas, foram adicionados os sítios de restrição correspondentes as enzimas BamHI e HindIII para a clonagem da sequência gênica codificadora das proteínas Aa e Ac, no sítio de clonagem múltiplo 1 (MCS-1), dos vetores pACYCDuet-1 e pETDuet-1, respectivamente. Para a clonagem dos genes codificadores das proteínas Ab e Ad, foram adicionados os sítios de restrição correspondentes as enzimas NdeI e XhoI, no sítio de clonagem múltiplo 2 (MCS-2), dos vetores pACYCDuet-1 e pETDuet-1, respectivamente.

Estes vetores utilizados contêm no MCS-1 a sequência codificadora para a cauda de histidinas (6xHis) que é expressa juntamente à porção N-terminal da proteína traduzida. No MCS-2 do vetor pACYCDuet-1 a sequência gênica codificadora para a cauda de histidinas (6xHis) foi adicionada ao inserto contendo o gene codificador da proteína Ab.

Além disso, na construção de cada inserto, foi adicionada na região 5'- a sequência gênica que traduzida corresponde ao sítio de reconhecimento e clivagem para a protease TEV, permitindo assim a remoção da cauda de histidinas N-terminal, caso seja desejável. A sequência final de cada enzima foi traduzida *in silico* pelo servidor ExPASy e comparada com a sequência inicial, presente no banco de dados do NCBI. Os resultados para as proteínas Aa, Ab, Ac e Ad estão apresentados nas figuras 6, 7, 8 e 9, respectivamente.

		1	10	20	30	40	50	60	
Aa	MELHIQPLGQTLSDSGANLLEALRAAEVPI SYSCMAGRCGTCRCKVLRGQVLES GREATLT							
Aa_pACYCDuet	MGSSHHHHHSQDPENLYFQG	MELHIQPLGQTLSDSGANLLEALRAAEVPI SYSCMAGRCGTCRCKVLRGQVLES GREATLT							
	70	80	90	100	110	120	130	140	
Aa	NPHADDYVLACMSAITESCTIEIPEPDEVVNHPARIIKATVVAIEKATHDIRRVVLKPAKPLAYSPGOYVSLQFTPDHIRPYS								
Aa_pACYCDuet	NPHADDYVLACMSAITESCTIEIPEPDEVVNHPARIIKATVVAIEKATHDIRRVVLKPAKPLAYSPGOYVSLQFTPDHIRPYS								
	150	160	170	180	190	200	210	220	
Aa	MAGLHTDDHLEFHV RVVPDGRVSGYVDQTLKIGDAVRVTGPLGTAYLRRKHEGPMLCIAGGTGLAPVLSIVRGALES GMTNPI								
Aa_pACYCDuet	MAGLHTDDHLEFHV RVVPDGRVSGYVDQTLKIGDAVRVTGPLGTAYLRRKHEGPMLCIAGGTGLAPVLSIVRGALES GMTNPI								
	230	240	250	260	270	280	290	300	310
Aa	HVFYFVRSQTDVYCTDVL AQLQARYANLKVSVVAVGAAADGQRTGLVTD AVEADWPSLECFRVYLCGSPPMVDAATLLVTRK								
Aa_pACYCDuet	HVFYFVRSQTDVYCTDVL AQLQARYANLKVSVVAVGAAADGQRTGLVTD AVEADWPSLECFRVYLCGSPPMVDAATLLVTRK								
		320							
Aa	GVAPEHVYADAFYASAS								
Aa_pACYCDuet	GVAPEHVYADAFYASAS								

Figura 6: Comparação entre as sequências da proteína Aa (redutase) de *Achromobacter xylosoxidans* A8.

Aa: sequência não otimizada; Aa_pACYCDuet: sequência final após a otimização das sequências nucleotídicas. A cauda de histidinas e a região correspondente ao sítio de clivagem da protease TEV

estão no início da sequência otimizada, na porção N-terminal. A coloração vermelha é baseada na similaridade entre as sequências no alinhamento.

```

                1      10     20     30     40     50     60
Ab      .....MTQWIDVLAADAVPEDD VVGVDAGGREITAIYGVGAVYATDNICSHGHARLCDGFLEDFEIECPLHQGR
Ab_pACYCDuet MHHHHHHENLYFQGM.TQWIDVLAADAVPEDD VVGVDAGGREITAIYGVGAVYATDNICSHGHARLCDGFLEDFEIECPLHQGR
                70     80     90     100
Ab      F.DVRNGKAMCEPLTEDIRSYPVKIENGRVVVELAD
Ab_pACYCDuet F.DVRNGKAMCEPLTEDIRSYPVKIENGRVVVELAD
  
```

Figura 7: Comparação entre as sequências da proteína Ab (ferredoxina) de *Achromobacter xylosoxidans* A8.

Ab: sequência não otimizada; Ab_pACYCDuet: sequência final após a otimização das sequências nucleotídicas. A cauda de histidinas e a região correspondente ao sítio de clivagem da protease TEV estão no início da sequência otimizada, na porção N-terminal. A coloração vermelha é baseada na similaridade entre as sequências no alinhamento.

```

                1      10     20     30     40     50     60
Ac      .....MTNVSPQPATAEQALRVYKVF.TDKAYLELENERIFRCKVWAYVALEAEIPEPGDYKATHIGLS
Ac_pETDuet MGSSHHHHHSQDPENLYFQGM.MTNVSPQPATAEQALRVYKVF.TDKAYLELENERIFRCKVWAYVALEAEIPEPGDYKATHIGLS
                70     80     90     100     110     120     130     140
Ac      P.VIVTRAEDGSIHV MENRCAHRGALVCEQRYGNASSLQCVYHQWDYNLKGELNGVFFLRGVRGKGGMCKPFDKSRHGLTKLRVAT
Ac_pETDuet P.VIVTRAEDGSIHV MENRCAHRGALVCEQRYGNASSLQCVYHQWDYNLKGELNGVFFLRGVRGKGGMCKPFDKSRHGLTKLRVAT
                150     160     170     180     190     200     210     220     230
Ac      L.NGIVFASFSDVEVEPLEEYLGPVAVE.IIKRNCKRPLRLLGFQRQRTIHSNWKLAENSRDPYHAGLLHLFLNTPGLWRNTSESASI
Ac_pETDuet L.NGIVFASFSDVEVEPLEEYLGPVAVE.IIKRNCKRPLRLLGFQRQRTIHSNWKLAENSRDPYHAGLLHLFLNTPGLWRNTSESASI
                240     250     260     270     280     290     300     310
Ac      Q.LDRTGRHCLLATELHTDEEAAEHASQAQHAYNPEFTLRDSSVVQSOREFDDNINLVVLSIFPNLVVHQLGNALSTRHVIPIGED
Ac_pETDuet Q.LDRTGRHCLLATELHTDEEAAEHASQAQHAYNPEFTLRDSSVVQSOREFDDNINLVVLSIFPNLVVHQLGNALSTRHVIPIGED
                320     330     340     350     360     370     380     390     400
Ac      E.FEMVWVTFQGFVDDDEELEQLRITHGNLIGPSGYVSLLEDGDAMERVQRSVSHDKDSTSFMGMVVDQNTSRMSDYFATENPIKGFWQY
Ac_pETDuet E.FEMVWVTFQGFVDDDEELEQLRITHGNLIGPSGYVSLLEDGDAMERVQRSVSHDKDSTSFMGMVVDQNTSRMSDYFATENPIKGFWQY
                410     420
Ac      Y.QQTLGLDADFHIPEPSQAASSGA
Ac_pETDuet Y.QQTLGLDADFHIPEPSQAASSGA
  
```

Figura 8: Comparação entre as sequências da proteína Ac (subunidade alfa) de *Achromobacter xylosoxidans* A8.

Ac: sequência não otimizada; Ac_pETDuet: sequência final após otimização das sequências nucleotídicas. A cauda de histidinas e a região correspondente ao sítio de clivagem da protease TEV estão no início da sequência otimizada, na porção N-terminal. A coloração vermelha é baseada na similaridade entre as sequências no alinhamento.

```

                1      10     20     30     40     50     60     70     80
Ad      M.NTDSPLKAIQPPADEQAWAVRARRQFEAEQLLYAYVEYIDDDRLEELPELFTEDGSYQIISRENVERGLPAPTMGCSNRNMLID
Ad_pETDuet M.NTDSPLKAIQPPADEQAWAVRARRQFEAEQLLYAYVEYIDDDRLEELPELFTEDGSYQIISRENVERGLPAPTMGCSNRNMLID
                90     100     110     120     130     140     150     160     170
Ad      R.IVSLRHANIYSQHAYRHVLSNVRVKAMEGDEALVQSNYVVMATRGDGIARVYSTGKYVDRLVFEEDGPKFKQKRVIQFDQLIDT
Ad_pETDuet R.IVSLRHANIYSQHAYRHVLSNVRVKAMEGDEALVQSNYVVMATRGDGIARVYSTGKYVDRLVFEEDGPKFKQKRVIQFDQLIDT
                180
Ad      L.LVVRPL
Ad_pETDuet L.LVVRPL
  
```

Figura 9: Comparação entre as sequências da proteína Ad (subunidade beta) de *Achromobacter xylosoxidans* A8.

Ad: sequência não otimizada; Ad_pETD: sequência final após a otimização das sequências nucleotídicas. A coloração vermelha é baseada na similaridade entre as sequências no alinhamento.

De acordo com as análises realizadas pela ferramenta ProtParam, no servidor ExPASy (GASTEIGER *et al.*, 2005), as proteínas Aa, Ab e Ac com a cauda de histidinas e o sítio de

clivagem para TEV possuem massas moleculares de cerca de 37, 13 e 48 kDa, respectivamente (Tabela 3).

Para a proteína Ad com massa em torno de 20 kDa, é importante destacar que essa construção não possui cauda de histidinas e nem o sítio de clivagem para a protease TEV, uma vez que todos os estudos, até então, envolvendo os componentes do terminal oxigenase demonstram que as subunidades alfa (Ac) e beta (Ad) interagem *in vivo*. Portanto, espera-se que a proteína Ad seja co-purificada junto com a Ac, quando ambas forem co-expressas.

Tabela 3: Análises com as proteínas Aa, Ab, Ac e Ad utilizando o servidor ExPASy (GASTEIGER *et al.*, 2005).

Proteína	nº de aminoácidos	Massa molecular (Da)	Ponto isoelétrico	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)
Aa	349	37.599,9	6,12	26860
Ab	118	13.271,7	4,29	17210
Ac	428	48.268,1	5,46	54235
Ad	176	20.251,9	5,28	18910

ϵ - coeficiente de extinção molar

Além disso, as construções dos vetores foram elucidadas no programa SnapGene[®], um software de biologia molecular que permite a construção e o design dos mapas de vetores. No programa, as construções finais foram denominadas Aa-pACYCDuet, AaAb-pACYCDuet e AcAd-pETDuet e os mapas dos vetores bem como o histórico das inserções estão apresentados nas figuras 10 e 11. Como pode ser observado, os vetores pACYCDuet e pETDuet contêm 4008bp e 5420bp, respectivamente. Após a inserção das construções finais com as sequências gênicas codificadoras para as proteínas alvo, esses vetores passam a ter 5288bp e 7174 bp, respectivamente. É importante ressaltar que para a co-expressão das quatro proteínas, na transformação bacteriana por eletroporação é necessário que esses dois vetores, totalizando uma carga de 12462 bp (AaAb-pACYCDuet e AcAd-pETDuet), sejam incorporados na célula hospedeira.

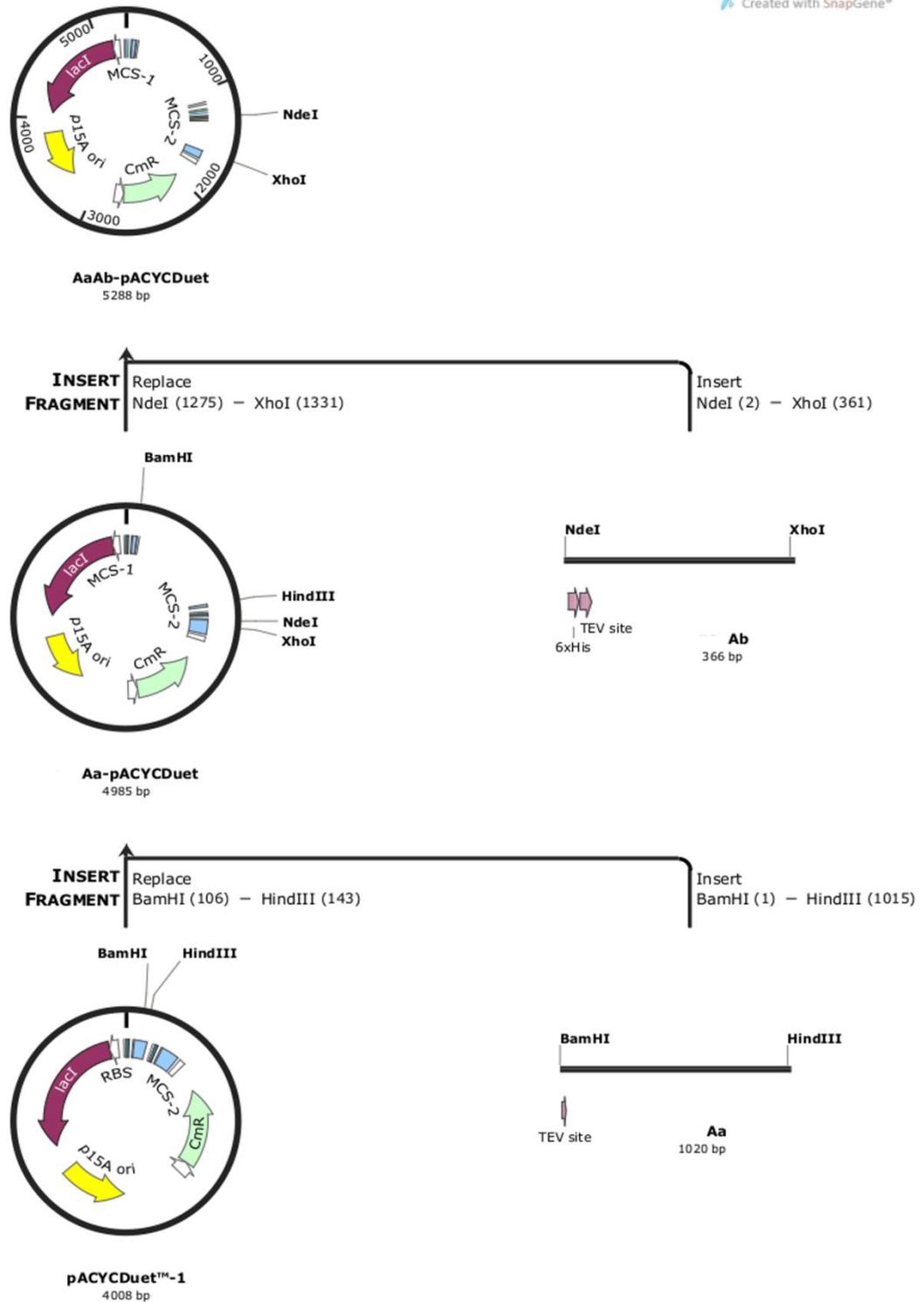


Figura 10: Diagrama da construção do vetor AaAb-pACYCDuet-1.

Histórico da clonagem da sequência gênica correspondente à proteína Aa, contendo o sítio de clivagem para a protease TEV. O fragmento foi inserido no vetor pACYCDuet-1, entre os sítios de restrição BamHI e HindIII, no MCS-1. A sequência gênica codificadora para a proteína Ab, contendo a cauda de histidina (6xHis) e o sítio de clivagem para a TEV, foi clonada no vetor Aa-pACYCDuet, entre os sítios de restrição NdeI e XhoI, no MCS-2.

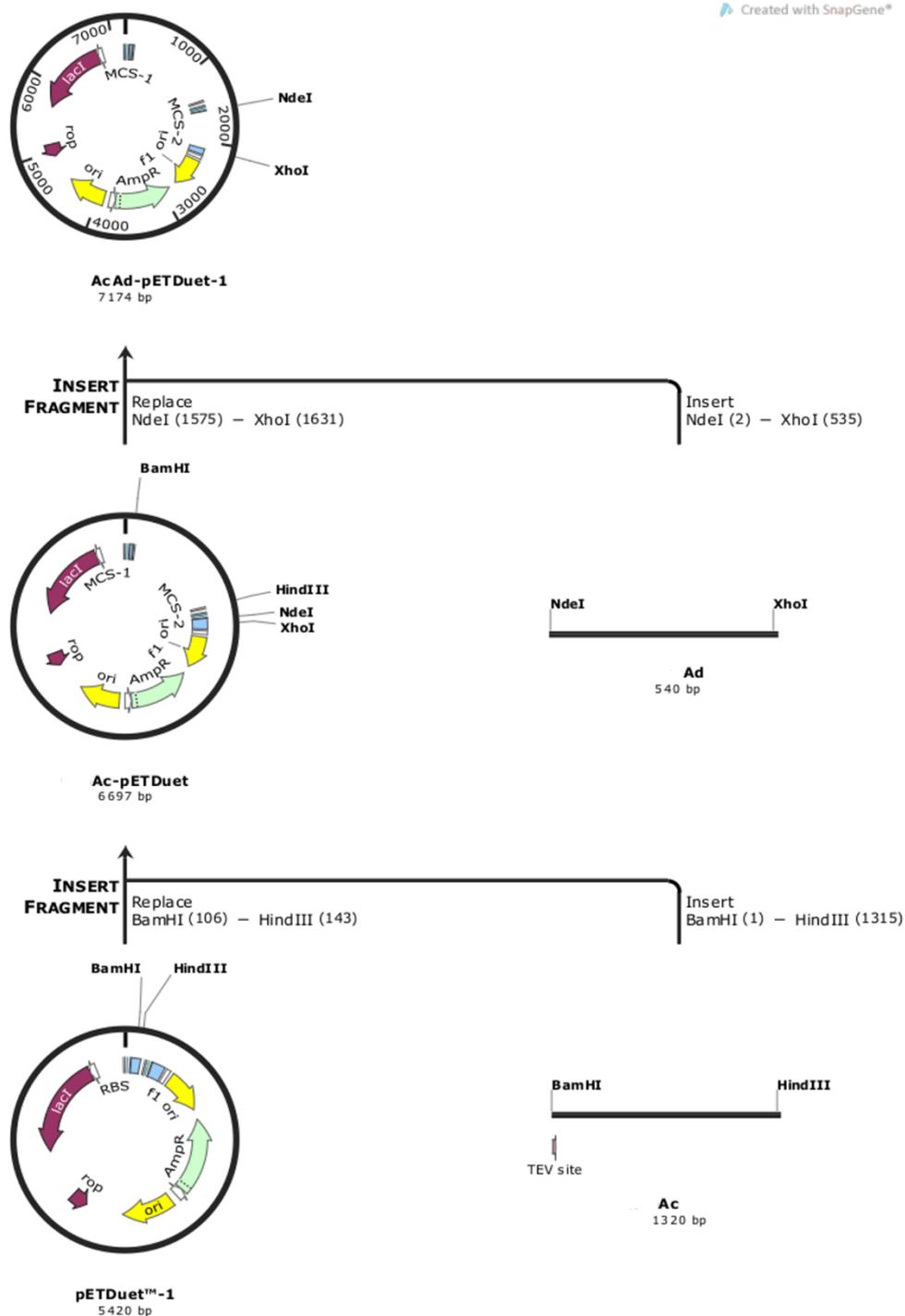


Figura 11: Diagrama da construção do vetor AcAd-pETDuet-1.

Histórico da clonagem da sequência gênica correspondente à proteína Ac, contendo o sítio de clivagem para a protease TEV. O fragmento foi inserido no vetor pETDuet-1, entre os sítios de restrição BamHI e HindIII, no MCS-1. A sequência codificadora para a proteína Ad foi clonada no vetor Ac-pETDuet-1, entre os sítios de restrição NdeI e XhoI, no MCS-2.

4.3. Expressão das proteínas recombinantes do complexo dioxigenase de *Achromobacter xylooxidans* A8

As proteínas recombinantes Aa, AaAb, AcAd bem como o complexo dioxigenase (AaAbAcAd) foram expressas em *E. coli* BL21 *Arctic Express* a 12 °C, conforme descrito anteriormente (item 3.4.), e as bandas proteicas, em gel de poliacrilamida, podem ser observadas na figura 12.

Para a proteína Aa é possível verificar a presença da banda de expressão em torno de 35 kDa após 24 h de indução (canaleta 4, figura 12A). O mesmo é observado para a construção com as proteínas AaAb, pela presença da banda proteica entre 35 kDa após 24 h de indução (canaleta 4, figura 12B). Neste caso, porém a banda correspondente à proteína Ab não foi visualizada, possivelmente em razão do tempo total de corrida ter feito com que a proteína, de pequeno tamanho, saísse do gel antes do término do experimento. A proteína Aa possui 37,5 kDa e Ab 13,2 kDa, considerando a presença da cauda de histidinas.

As análises para a construção AcAd evidenciaram após 24h de indução, a presença de duas bandas em torno dos padrões moleculares de 45 kDa e 25 kDa, as quais estão mais intensas após 48h de indução (canaletas 4 e 5, respectivamente, figura 12C). A proteína Ac possui 48,2 kDa, com a presença da cauda de histidinas, e Ad 20,2 kDa, a qual não teve adição de cauda de histidinas.

Para a expressão das quatro proteínas em uma mesma construção (AaAbAcAd), após 48h de indução (canaleta 2, figura 12D) é possível observar a presença de três bandas mais evidentes, em torno de 45, 35 e 25 kDa correspondentes as proteínas Ac, Aa e Ad respectivamente.

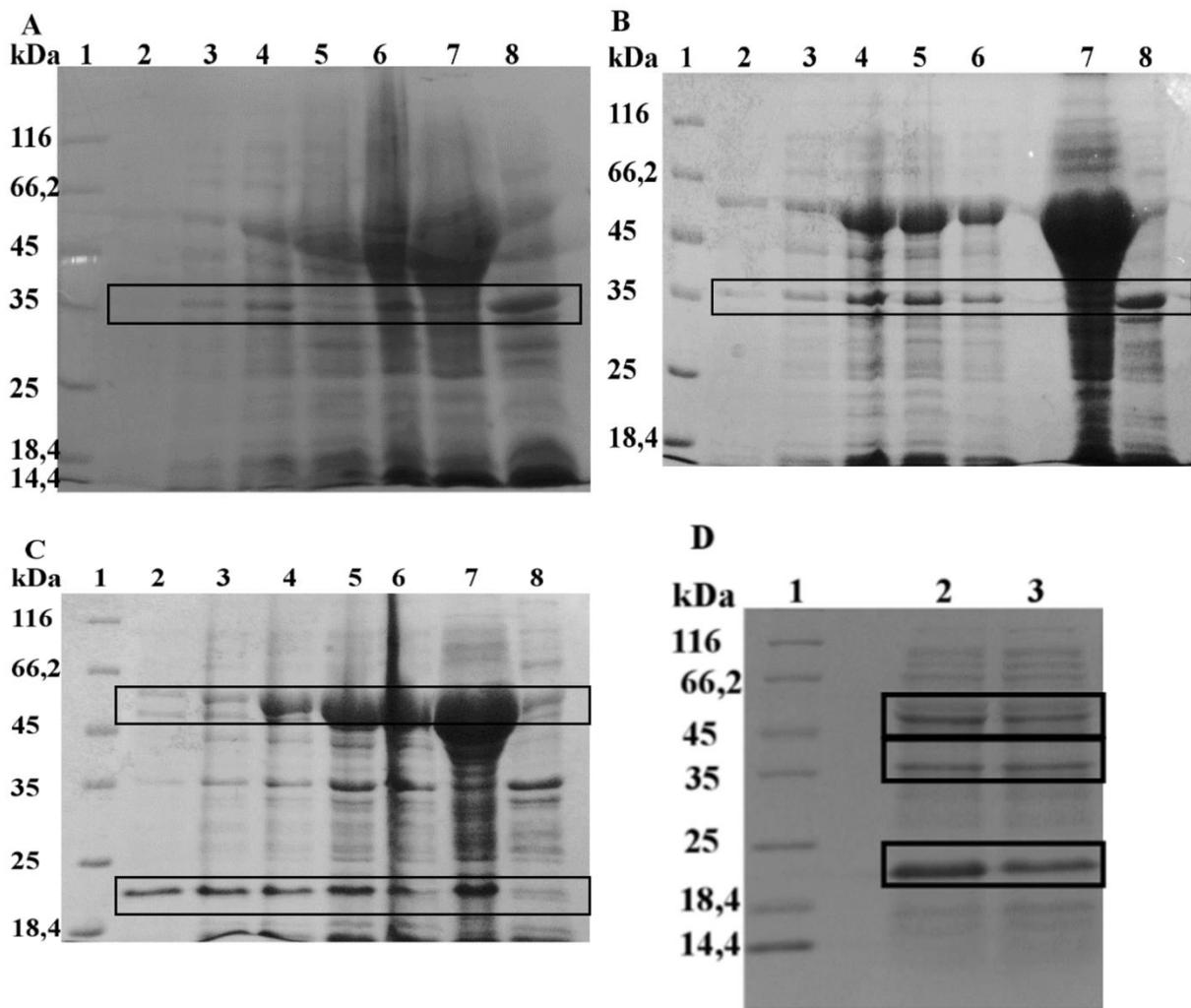


Figura 12: Expressão das proteínas recombinantes do complexo dioxigenase de *Achromobacter xylooxidans* A8 em *E. coli* BL21 Arctic Express a 12 °C.

SDS-PAGE 12%. 1 (Marcador molecular), 2 (tempo 0h sem indução), 3 (tempo 0h de indução), 4 (após 24h de indução), 5 (após 48h de indução), 6 (após 72h de indução), 7 (extrato solúvel após lise), 8 (extrato insolúvel após lise). A - Proteína Aa; B - Proteínas Aa e Ab; C - Proteínas Ac e Ad; D - SDS-PAGE 15 %. Proteínas AaAbAcAd. 1 (Marcador molecular), 2 (após 48h de indução), 3 (após 72h de indução). Massa molecular estimada: Aa ~37,5 kDa; Ab ~13,2 kDa; Ac ~48,2 e Ad ~20,2 kDa. A indução da expressão foi realizada com a adição de IPTG 0,5M.

Contudo, ainda não foi possível verificar a presença da banda de Ab, que seria próximo ao padrão de peso molecular de 14,4 kDa. Após a expressão das proteínas foi feita a lise para rompimento dos conteúdos celulares, conforme descrito no item 3.4. É possível visualizar que a proteína Aa apresentou parcialmente solúvel (canaleta 7, figura 12A e B) sendo mais presente na fração insolúvel (canaleta 8, figuras 12A e B). Já as proteínas AcAd apresentaram-se mais expressas na fração solúvel (canaleta 7, figura 12C).

4.4. Purificação das proteínas recombinantes do complexo dioxigenase de

Achromobacter xylooxidans A8

As proteínas recombinantes Aa, AaAb, AcAd bem como o complexo dioxigenase (AaAbAcAd) foram purificadas conforme descrito no item 3.5.

Em razão da proteína Aa ter sido parcialmente solúvel nos testes iniciais de lise celular, como demonstrado anteriormente (canaleta 8, 13A), o modo de rompimento das células foi adaptado com o intuito de se obter a proteína na fração solúvel. No processo de lise celular, o passo de sonicação foi aumentado de três para cinco vezes em pulsos de 30s com intervalos de descanso de 30s e a 33 % de amplitude em banho de gelo.

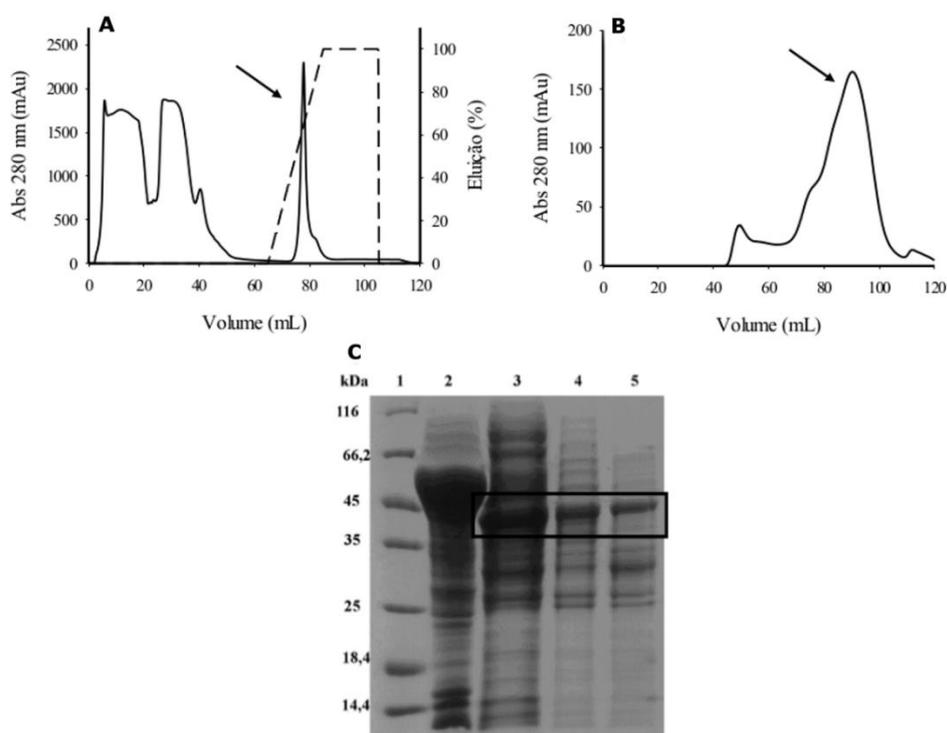


Figura 13: Purificação da proteína recombinante Aa (redutase) de *Achromobacter xylooxidans* A8.

A proteína foi purificada por cromatografias de afinidade e gel filtração. A - perfil após purificação por afinidade. B - perfil após purificação por gel filtração. C - SDS-PAGE 15 % com amostras eluídas das etapas de purificação. 1 (marcador molecular - Fermentas), 2 (extrato insolúvel), 3 (extrato solúvel), 4 (fração eluída da afinidade), 5 (fração eluída da gel filtração). Massa molecular estimada para Aa ~ 37,5 kDa.

Assim, o extrato solúvel contendo a proteína Aa foi purificado por cromatografia de afinidade ao níquel (Figura 13A) e amostra eluída do pico central submetida à cromatografia

de gel filtração Superdex S-200 (Figura 13B), no entanto, nessa etapa a proteína Aa foi obtida em um pico longo de eluição (entre 65 a 100 mL). A figura 13C evidencia a presença de uma banda principal no extrato solúvel (canaleta 3) e nas frações das cromatografia de afinidade e gel filtração (canaletas 4 e 5, respectivamente), próxima aos marcadores moleculares de 45 e 35 kDa, nota-se a presença de bandas de menor intensidade em todas as frações eluídas.

O extrato solúvel contendo as proteínas AaAb foi submetido a cromatografia de afinidade ao níquel e a amostra foi eluída com cerca de 55 mL com o rendimento de 1,8 mg por litro de cultivo (Figura 14). É possível observar uma banda mais intensa abaixo de 14,4 kDa, evidenciando a presença de Ab no extrato solúvel e na fração do *flow through* da afinidade (canaletas 2 e 3, figura 14B). Já nas frações eluídas da afinidade pode ser vista a banda correspondente à Aa em torno do padrão molecular de 35 kDa, (canaleta 6, figura 14B).

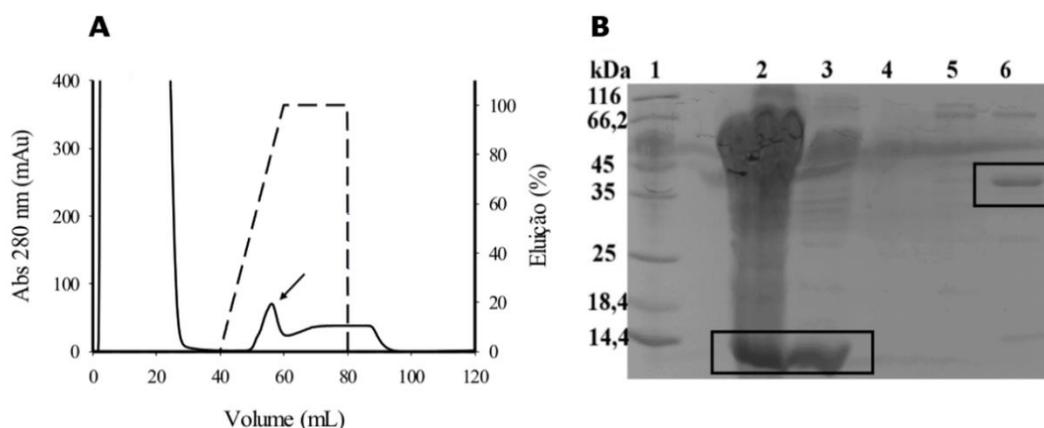


Figura 14: Purificação das proteínas recombinantes AaAb (redutase/ferredoxina) de *Achromobacter xylooxidans* A8.

A - perfil após purificação por afinidade. B - SDS-PAGE 15 % com amostras eluídas após a purificação. 1 (marcador molecular - Fermentas), 2 (fração solúvel), 3 (flow through da afinidade), 4, 5 e 6 (frações eluídas da afinidade). Massas moleculares estimadas para Aa~ 37,5 kDa e Ab~13,2 kDa.

Uma alternativa a ser testada para melhorar a etapa inicial de purificação das proteínas AaAb seria remover o imidazol presente no tampão de ligação da cromatografia de afinidade. Isso se justifica pois a presença de 30 mM deste reagente foi suficiente para as proteínas serem eluídas logo no início da corrida cromatográfica, junto com outras proteínas indesejáveis, e não após o gradiente com o tampão de eluição.

Considerando as proteínas AcAd, a fração solúvel foi submetida à cromatografia de afinidade ao níquel (Figura 15A) e as frações eluídas foram aplicadas na cromatografia de gel filtração em coluna Superdex S200. As proteínas recombinantes Ac e Ad foram eluídas em dois picos (Figura 15B), com rendimento de 3,5 mg de proteína por litro de cultivo. Após a purificação, as análises por SDS-PAGE (Figura 15C) evidenciaram um bom grau de pureza, com a presença de duas bandas próximas aos tamanhos de 45 e 20 kDa, e a presença de bandas de menor intensidade em todas as frações eluídas.

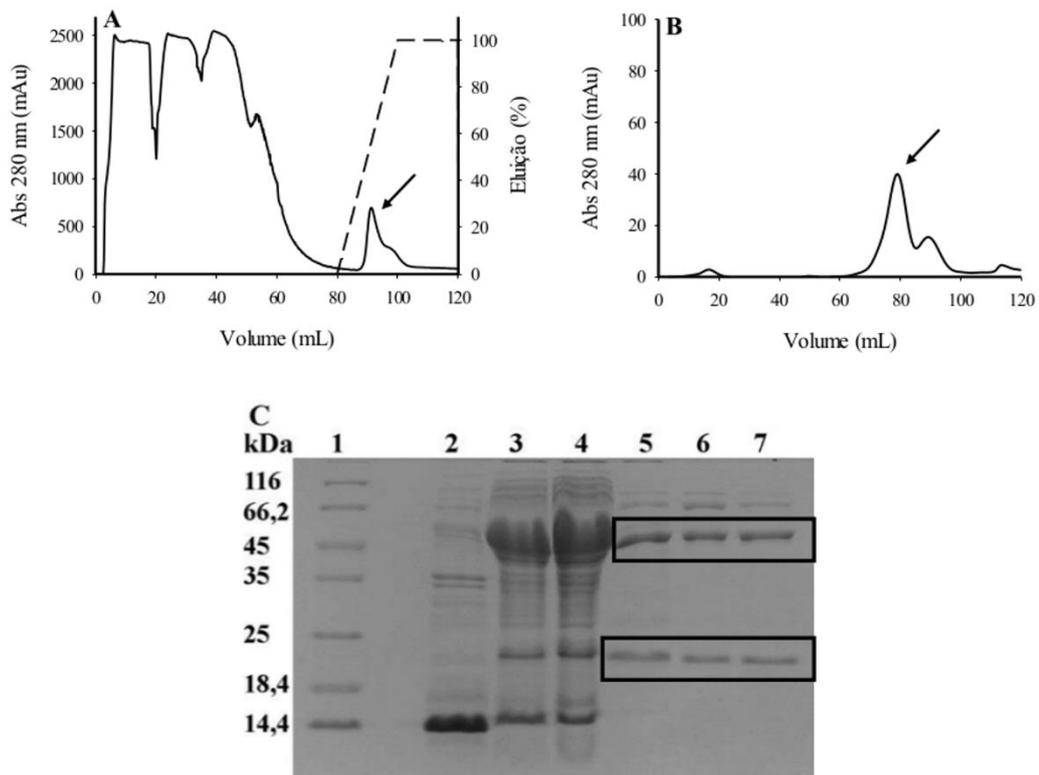


Figura 15: Purificação das proteínas recombinantes AcAd (subunidades alfa e beta) de *Achromobacter xylosoxidans* A8.

As proteínas Ac e Ad foram purificadas por cromatografias de afinidade e gel filtração. A - perfil após purificação por afinidade. B - perfil após purificação por gel filtração. C - SDS-PAGE 15% com as amostras eluídas após a purificação. 1 (marcador molecular - Fermentas), 2 (extrato insolúvel), 3 (extrato solúvel), 4 (flow through da afinidade), 5 (fração eluída da afinidade), 6 e 7 (frações eluídas da gel filtração). Massas moleculares estimadas para Ac ~48 kDa e Ad~20kDa.

Além disso, o extrato solúvel contendo as proteínas AaAbAcAd foi submetido à cromatografia de afinidade ao níquel e o perfil pode ser observado na figura 16A. A amostra foi eluída ao longo do gradiente, as frações centrais do pico foram aplicadas na cromatografia

de gel filtração (Figura 16B) e as proteínas recombinantes foram eluídas em dois picos, P1 e P2. As análises por SDS-PAGE (Figura 16D), evidenciam que em P1 estão as proteínas Ac e Ad (Figura 16D, canaletas 2 a 6), enquanto que nas frações correspondentes ao P2, estão as proteínas Aa (Figura 16D, canaletas 7 a 9) e, com menor intensidade, uma banda correspondente a massa molecular de Ab (canaleta 8, Figura 16D).

Além disso, o perfil da cromatografia de afinidade evidenciou um pico, em torno de 60 mL, o qual está indicado por uma seta na figura 16A. As frações desse pico foram submetidas à cromatografia de gel filtração e o cromatograma apresentou dois picos. Nas análises por SDS-PAGE com as frações do P2 observa-se a presença de bandas intensas em torno de 15 kDa, sendo estas possivelmente correspondente a proteína Ab (Figura 16E, canaletas 4 a 8). Na figura 16F foi observado que as proteínas purificadas apresentaram um bom grau de pureza, com as bandas bem evidentes e intensas, correspondentes a Aa, Ab, Ac e Ad (Figura 16F, canaletas 2, 3 e 4, respectivamente).

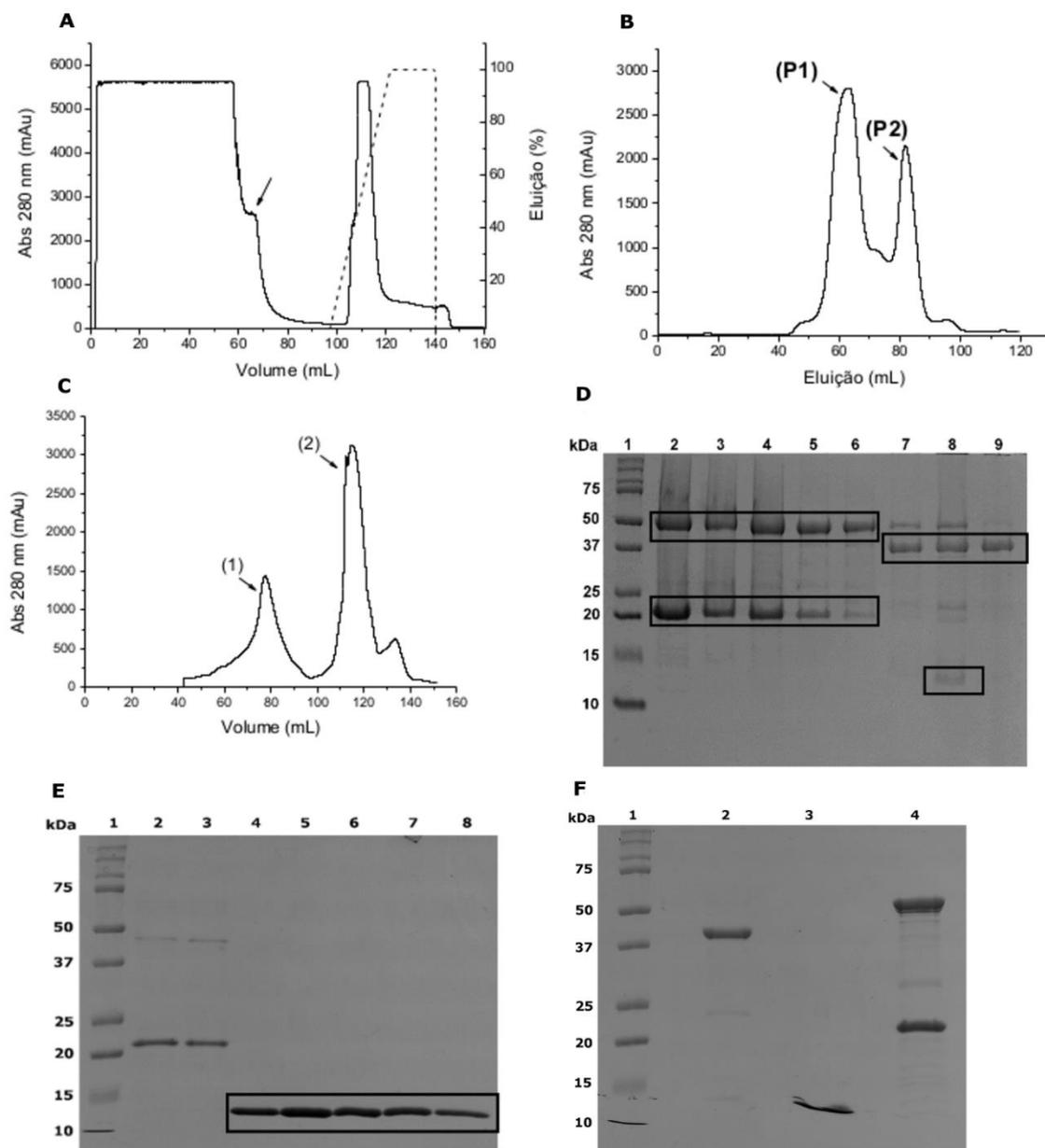


Figura 16: Purificação das proteínas recombinantes AaAbAcAd de *Achromobacter xylosoxidans* A8.

As proteínas Aa, Ab, Ac e Ad foram purificadas por cromatografias de afinidade e gel filtração. A - perfil após purificação por afinidade. B - perfil após purificação por gel filtração das frações eluídas da cromatografia de afinidade. C - perfil após purificação por gel filtração das frações indicadas por uma seta na cromatografia de afinidade na figura A. D-F - SDS-PAGE 15%. D - amostras eluídas após a purificação por gel filtração da figura B: 1 (marcador molecular - Biorad), 2 a 6 (frações eluídas no P1) e 7 a 9 (frações eluídas no P2). E - amostras eluídas após a purificação por gel filtração da figura C: 1 (marcador molecular), 2 e 3 (frações eluídas no pico 1), 4 a 8 (frações eluídas no pico 2). F - amostras das proteínas puras: 1 (marcador molecular - Biorad), 2 (proteína Aa), 3 (proteína Ab) e 4 (proteínas Ac e Ad). Massas moleculares estimadas, em kDa, para Aa (37,5), Ab (13,2), Ac (48) e Ad (20).

Conforme observado, no processo de purificação das proteínas nos casos das construções contendo somente a proteína Aa (Aa-pACYCDuet) bem como AaAb (AaAb-

pACYCDuet), não foi possível obter as proteínas totalmente solúveis e puras o suficiente para prosseguir com as análises propostas neste trabalho. Apesar das etapas de purificação da construção contendo AcAd (AcAd-pETDuet) as proteínas foram obtidas puras, observou-se que no sistema contendo a co-expressão das quatro proteínas (AaAbAcAd), a purificação final bem como o rendimento foi mais satisfatório.

Além disso, vale ressaltar que a expressão bem como a purificação de todos os componentes do complexo dioxigenase (redutase, ferredoxina e terminal oxigenase) não é algo trivial, pelo contrário, em estudos anteriores, observa-se que o processo de expressão e purificação das proteínas é realizado em separado. Em um trabalho com o complexo dioxigenase de *Sphingomonas* CHY-1 (JOUANNEAU *et al.*, 2006), os componentes foram expressos e purificados separadamente. Inicialmente todas as proteínas estavam insolúveis e presentes em corpos de inclusão, e após várias alterações como a linhagem bacteriana hospedeira, temperatura, dentre outros fatores, foi possível obter a ferredoxina e as proteínas do terminal oxigenase, mas não a redutase. Com isso, para os ensaios enzimáticos, os autores substituíram a redutase de CHY-1 pela redutase (RedB356) da bifenil dioxigenase de *Comamonas testosteroni* B356 (HURTUBISE *et al.*, 1995). Isso se dá em razão da dificuldade de obter as proteínas solúveis e/ou puras o suficiente para as análises posteriores, mesmo considerando vários passos de purificação.

Portanto, com base nos resultados obtidos, optou-se por prosseguir com este trabalho considerando as amostras contendo as quatro proteínas AaAbAcAd, oriundas do processo de co-expressão (AaAb-pACYCDuet e AcAd-pETDuet), conforme descrito no item 3.4.

4.5. Identificação das proteínas recombinantes de *Achromobacter xylosoxidans* A8 por *Western blotting*

A técnica de *Western blotting* foi utilizada com o intuito de identificar as proteínas recombinantes Aa, Ab e AcAd, provenientes da cromatografia de gel filtração, conforme

descrito no item 3.8. Para isto, foi utilizado o anticorpo contra a cauda de histidinas presentes no N-terminal das proteínas Aa, Ab e Ac e para as análises as amostras foram reunidas em uma só fração. Na figura 17A, o gel representa o “espelho” do western blotting e evidencia as bandas correspondentes às proteínas Ac, Aa e Ad e ainda uma banda de intensidade bem baixa, em torno de 15 kDa, possivelmente referente à proteína Ab. Como demonstrado na figura 17B, os anticorpos contra a cauda de histidinas reconheceram as bandas referentes às proteínas Ac (48 kDa) e Aa (37 kDa), mas não Ab. Entretanto, o não reconhecimento da banda correspondente a proteína Ab pode ser em razão da pequena quantidade dessa proteína na amostra em relação à outras ou que esse efeito seja em decorrência de que a cauda de histidinas esteja inacessível.

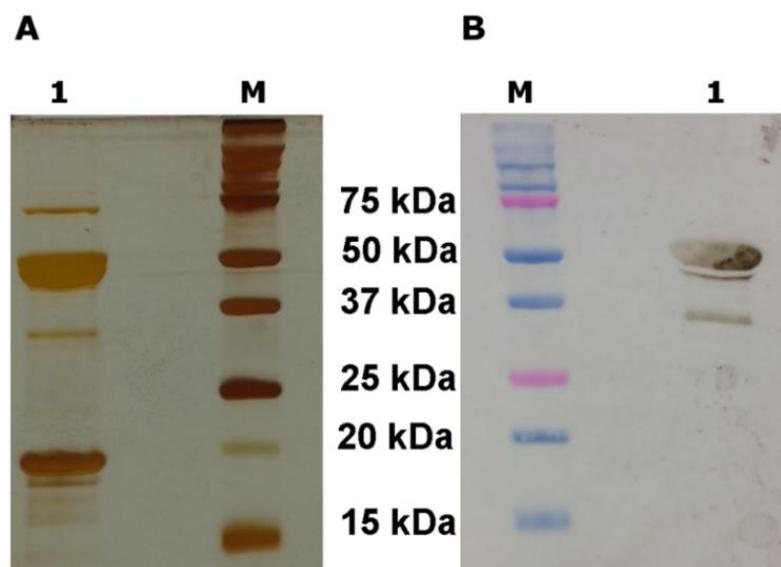


Figura 17: Análises das proteínas Aa, Ab, Ac recombinantes de *Achromobacter xylosoxidans* A8 por western blotting.

A: SDS-PAGE (15%) corado com prata: M (marcador molecular), 1- Amostra contendo frações dos picos P1, P2 e P3 após cromatografia de gel filtração. B: *Western blotting* realizado com o anticorpo primário contra a cauda de histidinas (1:1000) revelado em membrana de nitrocelulose: M (marcador molecular), 1 – Amostra contendo frações dos picos P1 e P2 após cromatografia de gel filtração.

4.6. Identificação das proteínas recombinantes de *Achromobacter xylosoxidans* A8 por espectrometria de massa

Para identificação e confirmação da identidade das proteínas, as análises por espectrometria de massa com as proteínas recombinantes foram realizadas conforme descrito no item 3.9. As bandas correspondentes às proteínas Aa, Ab, Ac e Ad foram excisadas do gel de poliacrilamida corado conforme descrito no item 3.7.1. e as amostras foram referidas como 01, 02, 03 e 04, respectivamente.

As bandas excisadas foram submetidas a digestão enzimática e os espectros de massa no modo MS1 de todas as amostras foram adquiridos. Após o sequenciamento dos íons mais intensos observados nos perfis no modo MS das amostras, as listas foram confrontadas contra os bancos de dados e as proteínas identificadas a partir do bactéria/UNIPROT estão listadas na tabela 4.

Considerando as amostras 01, 02, 03 e 04, três proteínas foram identificadas como esperado. A partir de várias tentativas de sequenciamento das amostras 03 e sua réplica, obteve-se o resultado de identificação como a proteína com o número de acesso E3HXS1 (tabela 4). De acordo com a busca de informações sobre o processo biológico das amostras identificadas no UNIPROT, as proteínas E3HXS1 (amostra 03) e E3HXS0 (amostra 04) atuam no processo catabólico de compostos aromáticos. Tendo em vista a nomenclatura da proteína E3HXR6 (amostra 01), há indícios que a mesma também atue na degradação desses compostos aromáticos, porém, esse processo biológico não está descrito no UNIPROT.

Entretanto, a amostra 02 e sua réplica foram identificadas como *Lysozyme C* (organismo: *Gallus gallus*), e quando confrontadas contra os bancos de dados SwissProt/UNIPROT e Bacteria/UNIPROT não apresentou nenhum resultado. Para a identificação no banco de dados SwissProt, o score de MS/MS do Mascot foi de 277, apresentando massa molecular estimada de 16.741 Da e ponto isoelétrico teórico de 9.3. Após

a validação realizada pelo Scaffold, a probabilidade de identificação da proteína foi de 100%, validando os respectivos peptídeos: FESNFNTQATNR (100%), NTDGSTDYGILQINSR (99%) e WWCNDGR (92%), perfazendo uma cobertura de 24% da sequência da referida proteína.

Tabela 4: Identificação das proteínas recombinantes de *Achromobacter xylosoxidans* A8 por espectrometria de massa.
As análises foram realizadas utilizando o MALDI TOF/TOF, algoritmo MASCOT e software SCAFFOLD.

Amostra	Proteína	Organismo	Banco de dados	Número de acesso	Score de identificação (1)	Prob. (2)	Cobertura da sequência	Teórico		NPIV (3)	Sequência dos peptídeos	Prob. (4)
								Massa molecular (Da)	Ponto isoeletrico			
01	<i>Naphthalene 1,2-dioxygenase NAD(+) reductase</i>	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> (strain A8)	Bacteria / UNIPROT	E3HXR6	372	100%	19%	35.626	6,12	4	AAEVPISYSCMAGR	98%
											VTGPLGTAYLR	98%
											TGLVTDAVEADWPSLEGFR	98%
											GALESGMTNPIHVYFGVR	92%
03	<i>Ring hydroxylating alpha subunit</i>	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> (strain A8)	Bacteria / UNIPROT	E3HXS1	129	95%	4%	48.580	5,46	1	DPYHAGLLHLFLNTFGLWR	100%
04	<i>Ring hydroxylating beta subunit</i>	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> (strain A8)	Bacteria / UNIPROT	E3HXS0	444	100%	24%	20.296	5,28	3	AIQPPADEQAWAVR	99%
											RVIFDTQLIDTLLVRPL	99%
											HANIYSQHAYR	98%

Legenda:

- (1) Score de identificação total de MS/MS (MASCOT)
- (2) Probabilidade de identificação para proteína (Scaffold)
- (3) NPIV – Número de peptídeos identificados e validados (Scaffold)
- (4) Probabilidade de identificação para peptídeo (Scaffold)

Dessa forma, das quatro amostras e suas respectivas réplicas, três (01, 03 e 04) foram identificadas como enzimas que atuam em vias de degradação de compostos aromáticos. Por outro lado, a amostra 02 e sua réplica foram identificadas como lisozima, uma enzima que provavelmente é resquício do processo de lise celular, conforme descrito no item 3.4. Como a lisozima se mostrou mais abundante do que qualquer outra proteína presente na fração eluída após a cromatografia de gel filtração, após estes resultados, o processo de lise celular foi modificado. Contudo, até o momento não foi possível obter a proteína Ab com grau de pureza para as análises seguintes e, portanto, diante disso, optou-se por prosseguir com as duas amostras AcAd e Aa, provenientes dos picos P1 e P2 da cromatografia de gel filtração, respectivamente.

4.7. Avaliação do estado oligomérico das proteínas recombinantes de *Achromobacter xylosoxidans* A8 utilizando o Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS – *dynamic light scattering*)

A técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) permite analisar o estado de oligomerização das amostras por meio da estimativa do tamanho médio das partículas em solução, através da inferência do raio hidrodinâmico das macromoléculas. Para amostras polidispersas, observa-se vários raios nas diferentes medidas que representam partículas de diferentes tamanhos. Já amostras monodispersas apresentam partículas de tamanho mais semelhante e praticamente o mesmo raio é observado nas várias repetições de medidas. Com isso, a análise da polidispersidade de uma amostra pode sugerir se uma determinada proteína é mais propensa a formar cristais em determinadas condições de precipitantes e temperatura. Isso porque a polidispersidade, de maneira geral, é proveniente de interações não específicas entre as partículas em solução que, em concentrações muito elevadas, podem resultar em agregação randômica ao invés da cristalização, que é uma estrutura ordenada. Assim, macromoléculas monodispersas são

mais promissoras a formarem cristais em comparação com as polidispersas (RHODES 2006).

Os ensaios de DLS foram realizados com as proteínas AcAd e Aa, provenientes da cromatografia de gel filtração, conforme descrito no item 3.10. Na figura 18 estão os resultados e na tabela 5 um sumário com as análises dos dados obtidos pelo experimento. Os gráficos relacionam a intensidade de espalhamento e volume de amostra, ambos em função do diâmetro hidrodinâmico (D_h) da partícula, sendo este duas vezes o raio hidrodinâmico (R_h). Como as partículas espalham a luz em função do quadrado do seu tamanho, deve-se considerar os picos que possuam ao mesmo tempo valores de percentual de intensidade e de volume. Isto porque as partículas maiores espalham a luz com maior intensidade, mas podem não ser a partícula mais abundante em solução.

Para a amostra contendo as proteínas AcAd, provenientes do P1 da gel filtração, observa-se que 100% da massa das partículas em solução apresenta um raio de cerca de 5,8 nm e a partícula está monodispersa, com percentual de polidispersividade menor que 20%. A massa molecular estimada de 209,8 kDa sugere que os monômeros correspondentes as subunidades α e β podem estar organizados em trimeros ($\alpha_3\beta_3$) em solução, uma vez que as massas moleculares são de 48 e 20 kDa, respectivamente. Esse resultado corrobora com as outras proteínas do terminal oxigenase descritas para a grande maioria das RHDs conhecidas (FERRARO *et al.*, 2007; JOUANNEAU *et al.*, 2011).

Já para a amostra contendo a proteína Aa, proveniente do P2 da gel filtração, foi possível observar a presença de três populações de partículas em solução. A população presente no pico 1, com raio de cerca de 3,8 nm, possui 100 % de volume e maior intensidade de espalhamento de luz em relação ao total de partículas presentes na amostra. O índice de polidispersividade de 10%, corresponde ao de uma amostra monodispersa e

os monômeros da Aa (redutase) podem estar organizados em dímeros em solução, considerando o tamanho da proteína (37,5 kDa) e seu tamanho estimado (74,9 kDa).

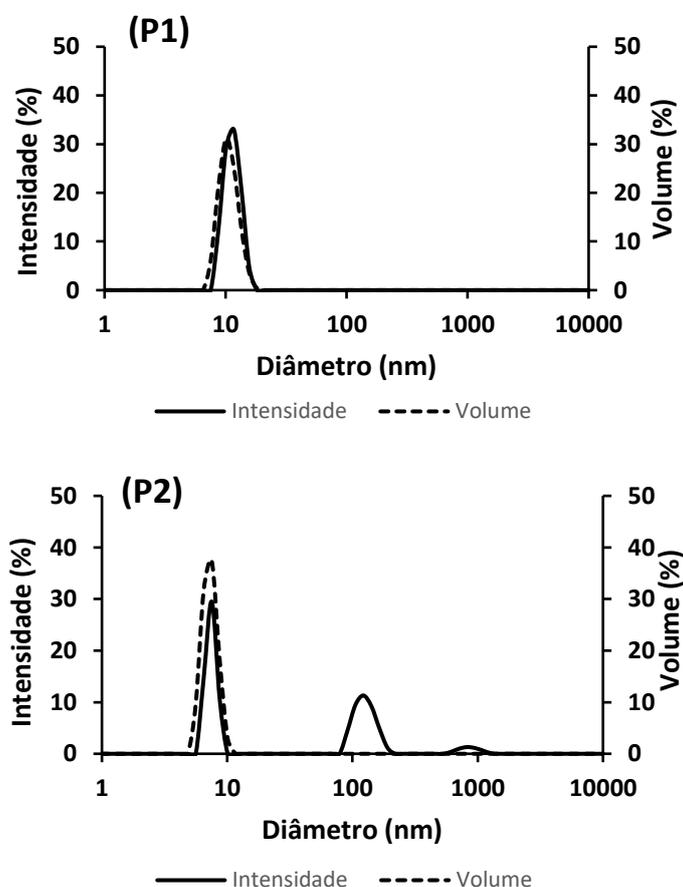


Figura 18: Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) para as proteínas recombinantes Aa, Ac e Ad de *Achromobacter xylosoxidans* A8.

Ensaio de DLS com as amostras AcAd e Aa advindas dos picos P1 e P2, respectivamente, da cromatografia de gel filtração. Gráficos de intensidade de espalhamento e volume da amostra (eixos y) em função do diâmetro da partícula (eixo x) em solução.

Tabela 5: Sumário das análises com os dados obtidos nos ensaios de DLS com as proteínas recombinantes de *Achromobacter xylosoxidans* A8.

Pd – polidispersividade; MM – massa molecular; M – monodispersa; P – polidispersa; DP – desvio padrão.

Amostra	Diâmetro (nm) \pm DP	Pd (%)	MM médio (kDa) \pm DP	Intensidade (%)	Massa (%)	Situação
P1						
Pico 1	11,70 \pm 2,1	18.6	209,8 \pm 35,7	97.5	100	M
Pico 2	1484 \pm 41	27.6	1,7 \times 10 ⁷ \pm 4,9 \times 10 ⁴	2.5	0	P
P2						
Pico 1	7,53 \pm 0,7	10.0	74,9 \pm 7,3	54.8	100	M
Pico 2	122,4 \pm 24,3	19.2	5,1 \times 10 ⁴ \pm 1,1 \times 10 ⁴	40.6	0	M
Pico 3	825,0 \pm 99,7	18.4	4,4 \times 10 ⁶ \pm 9,1 \times 10 ⁵	4.5	0	M

4.8. Produção das proteínas recombinantes de *Achromobacter xylosoxidans* A8 em outro meio de cultivo

Como até o momento a produção da proteína Ab apresentou baixo rendimento, foi necessário o desenvolvimento de uma nova abordagem para expressão dessa proteína em conjunto com as outras proteínas do complexo dioxigenase de *A. xylosoxidans* A8. Tendo em vista esta problemática, foi realizado a expressão proteica utilizando o meio LB, conforme descrito anteriormente (item 4.4.), porém suplementado com citrato de amônio de ferro III 0,2 g/L e sulfato ferroso 0,2 g/L. A ideia de adicionar fontes de FeII e FeIII ao meio se baseia no fato de que a adição de fontes de ferro podem propiciar uma maior produção de biomassa celular na expressão e melhorar a produtividade de proteínas que contêm o centro Rieske [2Fe-2S]. Este efeito está descrito em um estudo anterior realizado com o complexo da fitalato desidrogenase (JAGANAMAN *et al.*, 2007), e nele foi demonstrado que a adição desses compostos ao meio de cultivo promoveu maior rendimento de expressão das proteínas do complexo.

A curva de crescimento está apresentada na figura 19 e pode ser observado que após 72h de expressão, o crescimento celular foi praticamente o mesmo no meio LB suplementado com Fe (LB+Fe) quando comparado com o meio LB. Além disso, o processo de purificação para as proteínas Ac e Ad (canaletas 2 a 9, figura 19B) e Aa (canaletas 3 a 9, figura 19C), obtido apresentou o mesmo perfil de purificação e das bandas referentes às proteínas nas análises por SDS-PAGE. Por outro lado, a adição de ferro ao meio possibilitou a visualização de uma banda proteica possivelmente correspondente à proteína Ab (canaletas 6 a 10, figura 19C), como pode ser visto nas análises por SDS-PAGE após purificação por cromatografias de afinidade e gel filtração. Além disso, na fração eluída após a cromatografia de afinidade (canaleta 1, figura 19C), que foi submetida à cromatografia de gel filtração, observa-se a presença de quatro bandas

bem evidentes que correspondem as proteínas Aa, Ab, Ac e Ad (destaque com setas na canaleta1, figura 26C). Vale ressaltar que para promover o rompimento celular (item 3.4.), a lisozima presente no tampão de lise foi removida e foi adicionado ao tampão NaCl 500 mM, além de um ciclo a mais no processo de sonicação.

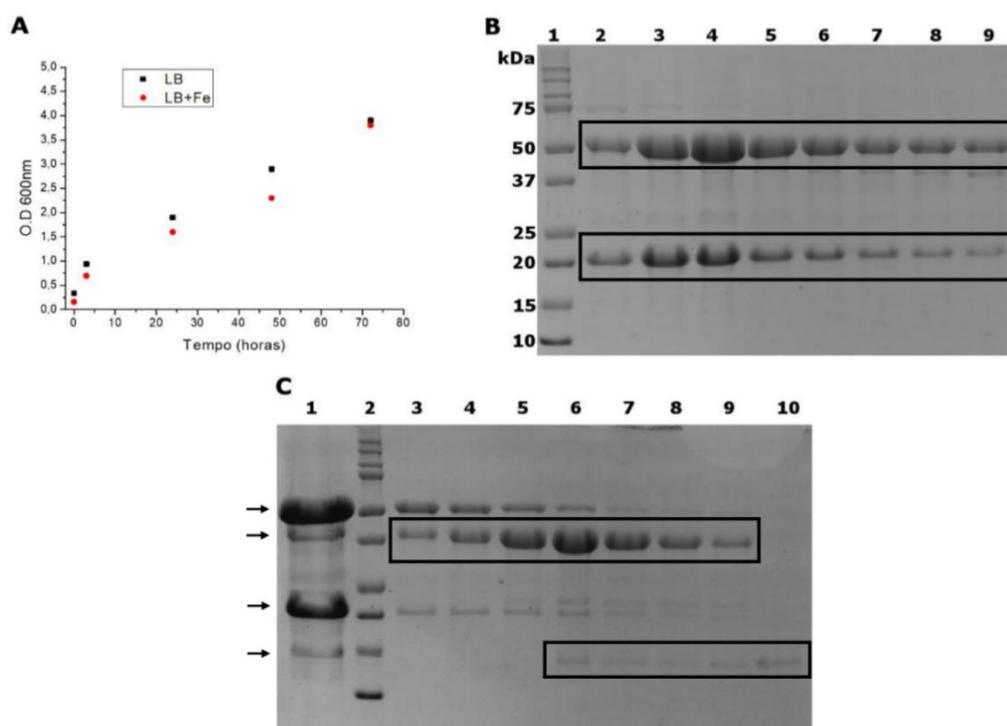


Figura 19: Crescimento e purificação das proteínas recombinantes de *Achromobacter xylosoxidans* A8 cultivadas em meio LB suplementado com Fe.

A - Curva de crescimento em meio LB e meio LB suplementado com ferro (LB+Fe). B - C: SDS-PAGE 15% com amostras após purificação. B - 1 (marcador molecular - Biorad), 2 a 9 (frações eluídas do pico P1 da gel filtração). C - 1 (fração eluída após da afinidade), 2 (marcador molecular - Biorad), 3 a 10 (frações eluídas do pico P2 da gel filtração). Massas moleculares estimadas, em kDa, para Aa (37,5), Ab (13,2), Ac (48) e Ad (20).

A co-purificação das quatro proteínas do complexo Aa, Ab, Ac e Ad é um fator limitante para os estudos estruturais, considerando o alto grau de pureza necessário e em especial, com a proteína Ab, devido a sua baixa produtividade em relação às outras do complexo da dioxigenase. Porém, um ponto a ser destacado é que essa alteração na composição do meio permitiu a visualização desta proteína que antes não era possível. Assim, o rendimento obtido da proteína Ab permitiu as análises posteriores de ensaios de atividade biológica, no qual requer a atuação das quatro proteínas do complexo. Dito isso,

as análises subsequentes com as proteínas recombinantes foram realizadas utilizando o meio suplementado com ferro.

4.9. Ensaios de atividade enzimática do complexo dioxigenase de *Achromobacter xylooxidans* A8

Os ensaios de atividade enzimática com complexo da dioxigenase foram realizados em pH 7,5 a 30 C° por 25 min, conforme descrito no item 3.11., utilizando os substratos naftaleno, ácido 2-aminobenzóico (antranilato) e catecol, os quais foram acessíveis para os ensaios. Por se tratar de um complexo formado por quatro proteínas, procedeu-se com a análise de cada componente do complexo separadamente. Isso foi feito para avaliar a influência de cada proteína na mistura reacional e as mudanças no perfil de oxidação do NADH, sendo que a cada etapa foi adicionada à mistura de reação uma proteína do complexo. Em um primeiro ensaio, a reação continha a proteína Aa e NADH, sendo que após 8 minutos de reação foi adicionado o FAD. Esse processo foi realizado para avaliar se a proteína Aa estaria ativa, uma vez que, por se tratar de uma flavina redutase, utiliza o NADH como substrato e o FAD como cofator (JOUANNEAU *et al.*, 2006). Em sequência, o ensaio foi realizado com as proteínas Aa, Ab e NADH, com adição de FAD após 8 minutos de reação. Esse ensaio foi feito para avaliar o efeito na reação proporcionado pelas proteínas Aa e Ab. E no último ensaio, a mistura de reação consistiu na adição de NADH, FAD e substrato, sendo que a cada intervalo de 1 minuto foi feita a adição dos componentes do complexo, as proteínas AcAd (componente que contém o sítio catalítico), em sequência Ab e Aa. Esse ensaio foi realizado com as mesmas condições para os três substratos avaliados, porém o curso da reação observado foi idêntico com todos os compostos e os resultados estão apresentados na figura 20.

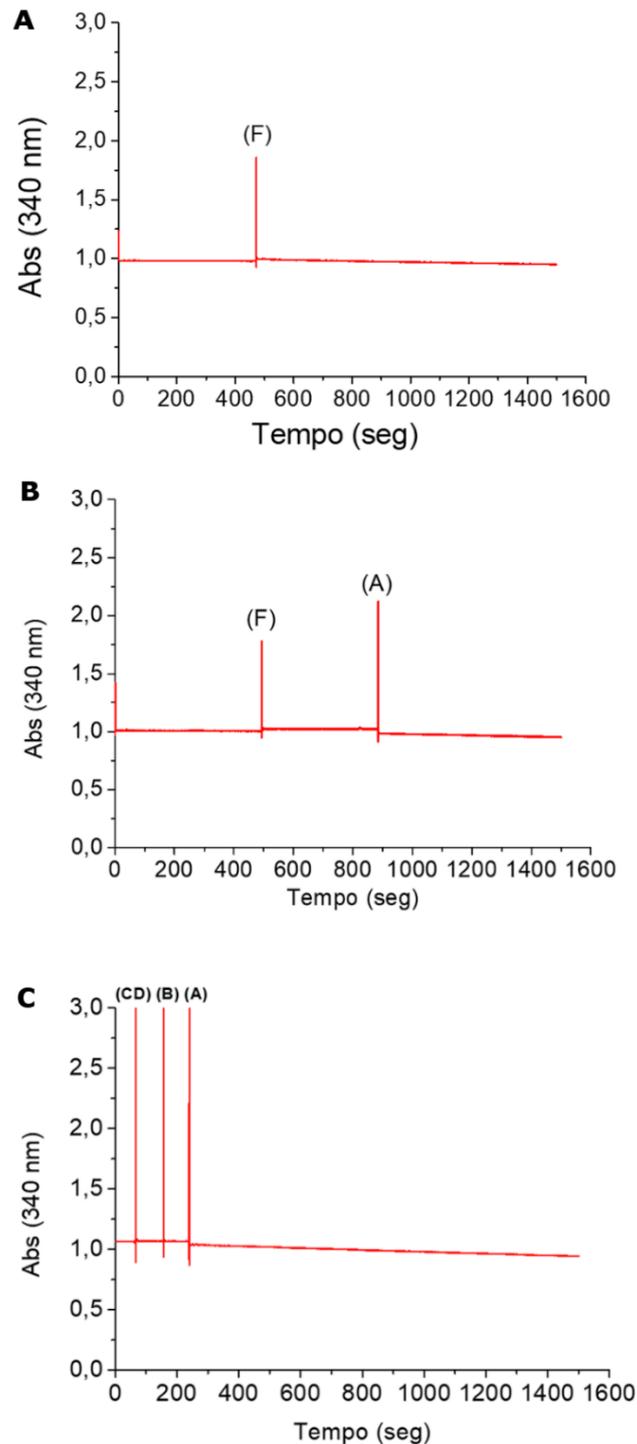


Figura 20: Ensaio de atividade enzimática do complexo dioxigenase (AaAbAcAd) de *Achromobacter xylooxidans* A8.

A mistura de reação continha tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 e 50 mM NaCl, NADH 200 μ M, FAD 6,3 μ M, substrato 0,25 μ M em acetonitrila e as enzimas Aa (0,40 μ M), Ab (1,57 μ M) e AcAd (0,13 μ M). Os ensaios foram realizados a 30 °C por 25 minutos e a atividade monitorada pela oxidação do NADH a 340 nm. A – proteína Aa. B – proteínas Aa e Ab. C – complexo da dioxigenase AaAbAcAd e substrato. (F) – FAD, (A) – Aa, (CD) – AcAd e (B) – Ab.

Como pode ser observado, o perfil de oxidação do NADH a 340 nm contendo somente a proteína Aa (Figura 20A) foi acentuada após a adição do FAD, indicando que Aa está ativa. E ainda, na reação contendo inicialmente a proteína Ab (Figura 20B), pode-se perceber que após a adição de Aa que ocorreu o consumo efetivo do NADH. Isso indica que Ab somente não utiliza o NADH e na presença de Aa a reação é mais efetiva. Na figura 20C, a reação contendo todos os componentes do complexo da dioxigenase, evidencia, novamente, que após a adição de Aa é que ocorre o consumo efetivo de NADH. Entretanto, o perfil com os compostos naftaleno, ácido 2-aminobenzóico (antranilato) e catecol observado foi praticamente o mesmo, indicando que muito provavelmente não houve consumo do substrato. Esse resultado levanta o questionamento acerca da escolha dos substratos avaliados ou ainda se o componente catalítico está ativo. Vale ressaltar que a escolha dos três substratos foi feita com base nos dados da literatura (JOUANNEAU *et al.*, 2006) e, principalmente, na acessibilidade aos reagentes disponíveis para a realização dos testes.

A atividade enzimática do complexo também foi avaliada em temperaturas entre 15 e 50 °C, utilizando o naftaleno como substrato e as mesmas condições dos ensaios anteriores. De acordo com o gráfico apresentado na figura 21, pode-se observar um decaimento da curva, sugerindo que a oxidação do NADH foi mais acentuada com o aumento da temperatura em torno de 35 e 40 °C.

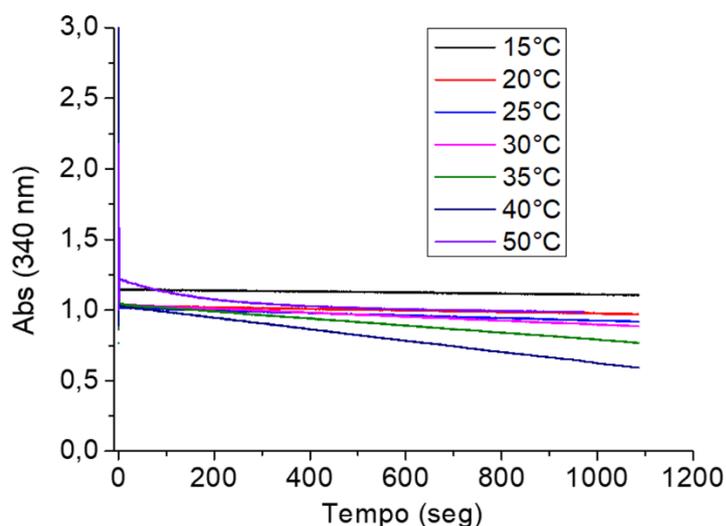


Figura 21: Avaliação do efeito da temperatura na atividade enzimática do complexo dioxigenase de *Achromobacter xylosoxidans* A8.

Ensaio de atividade enzimática do complexo da dioxigenase sobre o naftaleno 0,25 μM em temperaturas variando de 15 a 50 $^{\circ}\text{C}$.

Entretanto, na temperatura de 50 $^{\circ}\text{C}$, o consumo do NADH foi muito rápido, sendo que provavelmente a dioxigenase tenha perdido sua atividade.

Outros ensaios foram realizados (dados não mostrados) e uma alternativa foi alterar o tempo de reação de 25 minutos para 100 min e a concentração de NADH de 200 μM para 0,25 μM , a mesma do substrato, assim o cofator seria consumido na mesma proporção que o substrato. Porém a curva de oxidação do NADH foi declinando muito lentamente, indicando que o NADH presente não havia sido totalmente consumido. Uma hipótese para tal observação seria de que esteja ocorrendo a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Como a reação ocorre na presença de oxigênio (O_2), advindo do ar atmosférico, os elétrons provenientes do NADH estariam sendo direcionados para a formação de peróxido. Desse modo, após a finalização do ensaio, a solução com o produto de reação contido na cubeta foi submetida à avaliação de formação de peróxido com o método do reagente de FOX (GAY; COLLINS; GEBICKI, 1999), com algumas

alterações. Esse método de determinação de H₂O₂ foi utilizado pois o peróxido presente no meio reacional pode atuar sobre o ferro contido nas enzimas. Com a adição do reagente de FOX, após 30 minutos a temperatura ambiente, é possível monitorar, a 560nm, a formação de um complexo alaranjado e, o valor de absorbância medido é correlacionado através de uma curva de calibração em diferentes concentrações de H₂O₂. As análises demonstraram que houve formação de peróxido, entretanto os valores de leitura obtidos foram muito baixo, não sendo satisfatórios para determinar a concentração de H₂O₂.

Em se tratando de avaliar a atividade enzimática do complexo da dioxigenase, nos deparamos com muitas dificuldades em realizar os ensaios, principalmente pois trabalhos relatando esse processo são escassos. Acredita-se que por se tratar de um complexo multi-enzimático, a padronização de um ensaio, considerando a contribuição de cada componente e as medições não são suficientes para determinar o consumo de substrato avaliando somente a taxa de oxidação do NADH. De acordo com trabalhos anteriores, apenas algumas RHDs tem sido purificadas e extensivamente caracterizadas, incluindo a fitalato dioxigenase, naftaleno dioxigenase e bifenil dioxigenase (JOUANNEAU *et al.*, 2011). Entretanto, nos estudos com estas enzimas não foi possível determinar o mecanismo cinético e eficiência de oxidação dos HAPs através do monitoramento de NADH. Em contrapartida, as análises de atividade biológica tem sido realizadas com o extrato bruto, e não com as enzimas purificadas, e os produtos de reação identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (GC-MS).

Diante dos resultados obtidos com os ensaios de cinética com o complexo da dioxigenase, foi possível observar o consumo de NADH, porém os dados não foram suficientes, com a técnica utilizada, para avaliar o consumo de substrato. Assim, até o presente momento, o foco tem sido estudar qual seria a melhor técnica, disponível em nosso departamento e bem como com colaboradores, para que seja possível determinar a

atividade enzimática do complexo. Enquanto isso, como alternativa foi realizado um teste para identificação dos produtos de reação por GC-MS, disponível no Departamento de Microbiologia da UFMG, porém não obtivemos resultados satisfatórios.

4.10. Cristalização das proteínas do complexo dioxigenase de *Achromobacter xylosoxidans* A8 e difração de raios-X

Os testes de cristalização com as proteínas do complexo da dioxigenase foram realizados no Laboratório de Biologia Estrutural, sob a supervisão do professor Dr. Guillermo Calero Velazquez, da Universidade de Pittsburgh (PA, EUA). De muitas condições de cristalização avaliadas com as proteínas em diversas concentrações, conforme descrito anteriormente (item 3.12.), observou-se a formação de microcristais das proteínas Ac e Ad, provenientes da amostra do pico P1, sendo que para a amostra do pico P2, contendo a proteína Aa não foi observado nenhum cristal em todas as condições testadas. Para a proteína proveniente do pico P3, foi possível visualizar o crescimento de cristais bem definidos crescidos em diversas condições. Alguns cristais foram submetidos a difração de raios-X e resultaram em conjuntos de dados com até 0.8 Å de resolução. Entretanto, após as análises por espectrometria de massa (item 5.6.), que foram realizadas em paralelo com os testes de cristalização, ficou constatado que a amostra proveniente do pico P3 não era correspondente à proteína Ab (ferredoxina) do complexo da dioxigenase.

Após a alteração da composição do meio de cultivo (item 4.8.), novos testes de cristalização foram realizados com as proteínas nas concentrações de 8 e 19 mg/mL para as proteínas Ac e Ad e de 11 e 19 mg/mL para a proteína Aa. Contudo, até o momento o processo de purificação da proteína Ab (item 4.8.) não apresentou o rendimento suficiente necessário para conduzir os testes de cristalização.

Considerando as muitas condições de cristalização testadas para a amostra contendo a proteína Aa ainda não foi possível visualizar a formação de nenhum cristal. A

proteína Aa (redutase) de *A. xylosoxidans* A8 apresenta 59% de identidade de sequência de aminoácidos com a NahAa de *P. putida* e para esta última, até o momento não existe nenhum estudo estrutural. Isso se deve, possivelmente, em razão da dificuldade em se obter não somente a redutase pura o suficiente para realizar os testes de cristalização, bem como para observar a formação de cristais dessa proteína em inúmeras condições testadas. Além disso, os trabalhos anteriores realizados com a NDO compreendem a resolução das estruturas tridimensionais das subunidades ferredoxina e do terminal oxigenase (KAUPPI *et al.*, 1998; PARALES, 2003) e, até o momento nenhum relacionado a estrutura da redutase.

Por outro lado, felizmente, após várias tentativas de cristalização para a amostra contendo as prote as subunidades alfa (Ac) e beta (Ad) do terminal oxigenase, foi possível observar a formação de cristais em algumas condições testadas, utilizando o kit PEGs II SUITE TABLE (QIAGEN®). Após a otimização das condições de cristalização, como a variação da concentração de solução precipitante e pH, os cristais obtidos foram submetidos a difração de raios-X, utilizando etilenoglicol 35% como agente crioprotetor. Os dados de difração, com até 1.35 Å de resolução, foram coletados no *Stanford Synchrotron Radiation Lightsource* (SSRL). Na figura 22, observa-se o cristal do terminal oxigenase (AcAd) (crescido na condição de cristalização contendo AcAd 10 mg/mL, MgCl₂ 0,2M, Tris 50 mM pH 8,5, e PEG 400 11%).



Figura 22: Cristal obtido para as proteínas recombinantes do terminal oxigenase (AcAd) do complexo dioxigenase de *Achromobacter xylosoxidans* A8.

Cristal do terminal oxigenase (AcAd) (10 mg/mL) crescido em $MgCl_2$ 0,2M, PEG 400 11% e Tris 50 mM, pH 8,5, submetido a difração de raios-x e a estrutura resolvida a 1,35 Å de resolução. Os dados foram coletados no *Stanford Synchrotron Radiation Lightsource* (SSRL), Stanford University, CA, EUA.

4.11. Resolução da estrutura cristalográfica do terminal oxigenase (AcAd) recombinante do complexo dioxigenase de *Achromobacter xylosoxidans* A8

Os dados de difração de raios-X foram coletados na linha de luz SSRL 12-2 (temperatura de 100 K), no *Stanford Synchrotron Radiation Lightsource* (SSRL), localizado no *SLAC National Accelerator Laboratory*, na Universidade de Stanford, CA, Estados Unidos. Para a coleta dos dados os cristais da amostra do terminal oxigenase contendo as proteínas AcAd (crescidos nas condições anteriormente descritas no item 5.10.), foram imersos em solução crioprotetora contendo etilenoglicol 35% (v/v), seguido por congelamento com nitrogênio líquido.

Os cristais do terminal oxigenase (AcAd) pertencem ao grupo espacial $P6_3$ com parâmetros de célula unitária $a = b = 103,78$ e $c = 105,05$ em Å. As estatísticas com alguns dos dados de difração e refinamento são apresentadas na tabela 6.

Tabela 6: Estatísticas dos dados de difração dos cristais do terminal oxigenase de *Achromobacter xylosoxidans* A8.

Comprimento de onda (Å)	0.88557
Temperatura (K)	100
Detector	Dectris Pilatus 6M
Distância cristal-detector (mm)	188
Rotação por imagem (°)	0.5
Variação total de rotação (°)	180
Tempo de exposição por imagem (s)	0.2
Grupo espacial	P6 ₃
Parâmetros da célula unitária	
a = b, c (Å)	103.78, 105.049
Faixa de resolução (Å)	34.0 - 1.35
Total observations	136417
Completeza(%)	98.30
$R_{\text{factor}}^{\text{a}}$ (%)	16.8
$R_{\text{free}}^{\text{b}}$ (%)	18.2

O modelo estrutural cristalográfico do terminal oxigenase (AcAd) apresenta similaridades e algumas diferenças significativas quando comparado às outras RHDs conhecidas (FERRARO *et al.*, 2007; JOUANNEAU *et al.*, 2011; KAUPPI *et al.*, 1998). Na unidade assimétrica, foi encontrado o heterodímero $\alpha\beta$ (Figura 23), com apenas uma cópia de cada cadeia polipeptídica. Os terminais (amino e carboxi) da subunidade α (Ac) estão voltados para a parte externa da proteína e o mesmo é observado para o N-terminal da subunidade β (Ad). Porém esta proteína apresenta o C-terminal localizado na região interna, voltada para a interação com a subunidade α . Além disso, na subunidade α foi observada a presença do domínio Rieske [2Fe-2S], região conservada para a maioria das dioxigenases. Contudo, diferente da grande maioria de outras dioxigenases, no domínio catalítico de Ac encontra-se o átomo de manganês (Mn) que está ocupando a mesma posição que o ferro mononuclear, o qual é característico da grande maioria das RHDs, conforme abordado anteriormente. A identidade do Mn foi aferida por ensaios de fluorescência de raios-X utilizando o próprio cristal do experimento de difração raios-X.

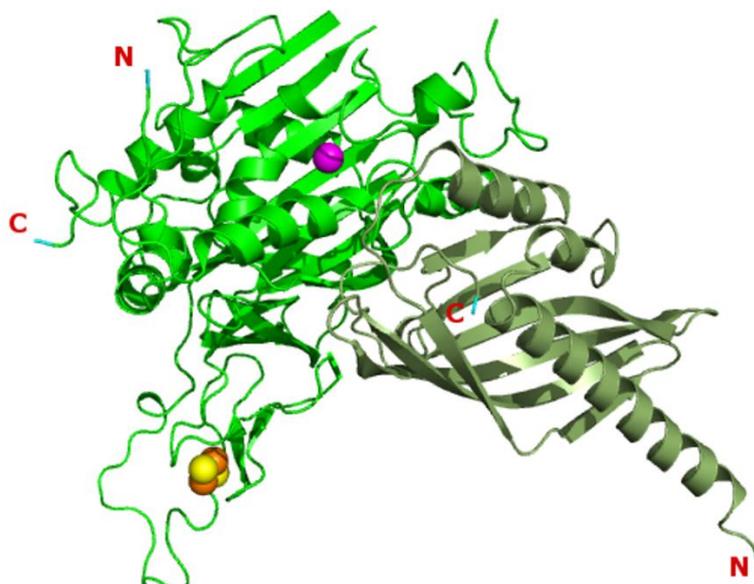


Figura 23: Estrutura cristalográfica do terminal oxigenase (AcAd) do complexo da dioxigenase de *Achromobacter xylosoxidans* A8, resolvida por difração de raios-x a 1,35 Å de resolução.

Representação do heterodímero $\alpha\beta$ do complexo da dioxigenase evidenciando o enovelamento característico das proteínas da família das *ring-hydroxylating dioxigenases* (RHDs). Subunidade alfa - Ac (verde); subunidade beta - Ad (verde musgo); Fe (laranja); S (amarelo); Mn (magenta); N - porção aminoterminal e C - porção carboxiterminal.

A presença de manganês (Mn II) como o metal no sítio ativo foi descrita em uma catecol dioxigenase (MndD) de *Arthrobacter globiformis* CM-2 (WHITING *et al.*, 1996). Outra exceção inclui uma dioxigenase dependente de magnésio (MgII) (GIBELLO *et al.*, 1994). Nos trabalhos anteriores com as dioxigenases dependentes de Mn e Mg, embora não tenham apresentado um estudo cristalográfico, os resultados demonstraram que os resíduos de aminoácidos coordenados com o metal bem como os resíduos no sítio ativo são conservados para a maioria das RHDs.

Com isso, a existência dessas proteínas dependentes de outro metal que não seja o ferro, levanta o questionamento acerca de quais diferenças permeiam em termos de função enzimática e mecanismo de reação entre as enzimas dependentes de ferro ou de manganês. Considerando, principalmente, quais seriam as características estruturais da proteína que determinam a preferência por um metal ou outro.

Segundo Whiting e colaboradores (1996), a proteína MndD é um homotetrâmero (α_4) e através de análises quantitativas o conteúdo de Mn determinado foi cerca da metade do encontrado para as dioxigenases dependentes de Fe, sendo a ocupância de dois átomos de manganês por homotetrâmero. Essa observação para a MndD sugere uma possível diferença estrutural de como ocorre a ligação ao metal entre as enzimas dependentes de Fe e Mn, bem como o número de interações necessárias durante a catálise. E ainda, os estudos cristalográficos com as enzimas superóxido dismutases dependentes de Mn (II) e outras dependentes de Fe (II), contribuíram para o entendimento da região ao redor do metal, embora as dúvidas acerca do mecanismo enzimático ainda permanecem.

Dessa forma, o estudo dos resíduos de aminoácidos do terminal oxigenase (AcAd) que interagem com o Mn e a comparação com outras dioxigenase podem auxiliar no entendimento sobre a especificidade de substrato e estabilidade de cada enzima, principalmente considerando os locais onde reside a diferença.

Além disso, através de operações de simetria em torno dos eixos cristalográficos, observa-se que os heterodímeros $\alpha\beta$ estão organizados em trímêros e na figura 24, pode ser visto o modelo estrutural do hexâmero do terminal oxigenase (AcAd). O complexo hexamérico é descrito como sendo a unidade biológica do terminal oxigenase do complexo da dioxigenase, e apresenta o formato do tipo cogumelo (*mushroom-like shape*) (figura 24A), no qual as subunidades beta (Ad) formam a haste ou base enquanto as alfa (Ac) conferem o formato do chapéu (FERRARO; GAKHAR; RAMASWAMY, 2005; JOUANNEAU *et al.*, 2011; KARLSSON *et al.*, 2003; KAUPPI *et al.*, 1998; PARALES, 2003). Além das cadeias polipeptídicas do hexâmero $\alpha_3\beta_3$, o modelo do terminal oxigenase (AcAd) contém três átomos mononucleares de manganês e três grupos Rieske [2Fe-2S] (indicados por setas na figura 24B).

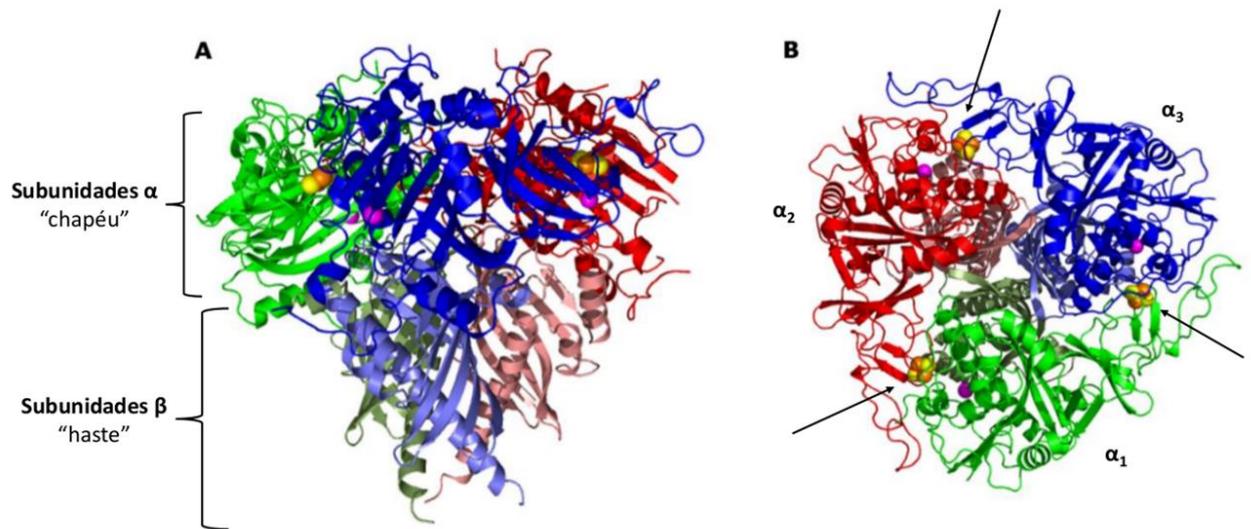


Figura 24: Estrutura cristalográfica da unidade biológica do terminal oxigenase (AcAd) do complexo dioxigenase de *Achromobacter xiloxidans* A8.

(A) Vista lateral do hexâmero $\alpha_3\beta_3$ apresentando formato do tipo cogumelo, onde as subunidades alfa seriam o chapéu e as subunidades beta a haste. (B) Vista de cima do hexâmero evidenciando a região de interação entre átomo de manganês mononuclear de uma subunidade alfa e o cluster [2Fe-2S] de outra subunidade alfa. Os trímêros com os heterodímeros $\alpha\beta$ estão em tons de verde, azul e vermelho. Átomos de manganês, ferro e enxofre estão em magenta, laranja e amarelo, respectivamente.

De acordo com análises realizadas por gel filtração (dados não mostrados) e por DLS (item 4.7.), o terminal oxigenase (AcAd) pode ser descrito como um hexâmero ($\alpha_3\beta_3$) com massa molecular estimada de 209 kDa. Conforme pode ser visto na figura 25, na qual as proteínas estão em preenchimento de superfície, o hexâmero forma uma estrutura quaternária muito compacta e, observa-se que os trímêros de heterodímeros ($\alpha\beta$) estão organizados em um eixo de simetria de ordem três. E ainda, na estrutura é possível observar algumas regiões de depressão e cavidades (indicadas por setas), que poderiam ser os locais de entrada do substrato e co-fatores, bem como a região de interação com as outras subunidades do complexo da dioxigenase.

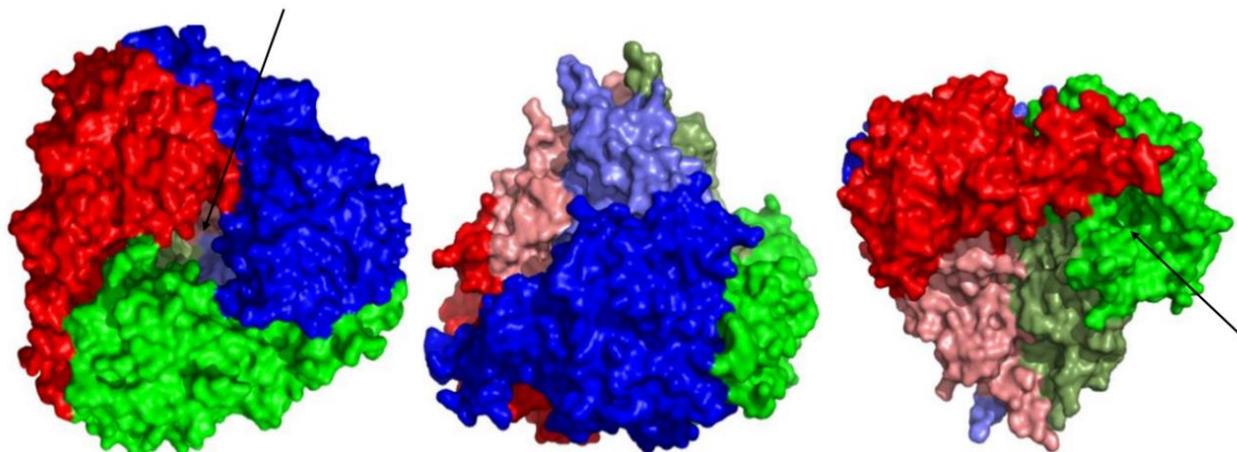


Figura 25: Estrutura cristalográfica do hexâmero $\alpha_3\beta_3$ do terminal oxigenase (AcAd) do complexo dioxigenase de *Achromobacter xylosoxidans* A8.

Representação de superfície do hexâmero. Da esquerda para a direita: vista de cima do hexâmero evidenciando a cavidade interna central ao longo da estrutura; vista com subunidades beta no topo e alfa na porção inferior, com destaque para as depressões entre as subunidades beta e; vista com as subunidades beta na base e alfa no topo, com enfoque para a cavidade presente na interação entre as subunidades alfa (verde) e outra (vermelho), possivelmente o sítio de entrada do substrato.

A partir da primeira enzima caracterizada estruturalmente, o componente catalítico da naftaleno dioxigenase de *P. putida* NCIB981-4 (NDO) (KAUPPI *et al.*, 1998), outras estruturas cristalográficas de complexos dioxigenases que degradam PAHs tem sido relatadas (FERRARO; GAKHAR; RAMASWAMY, 2005). Dentre elas, oxigenases de *Rhodococcus* NCIMBI12038 (GAKHAR *et al.*, 2005), *Sphingomonas* CHY-1 (JAKONCIC *et al.*, 2007a, b) e *Sphingobium yanoikuyae* B1 (FERRARO *et al.*, 2007), apresentam na estrutura quaternária o heterohexâmero, em formato de cogumelo, e a estrutura de modo geral é similar à descrita para a NDO (JOUANNEAU *et al.*, 2011).

4.11.1. Subunidade alfa (Ac) do terminal oxigenase do complexo dioxigenase de *Achromobacter xylosoxidans* A8

O modelo final da subunidade alfa (Ac) contém os resíduos 35 – 439 da proteína nativa (Figura 26). Considerando a adição de 21 resíduos ao N-terminal pelo vetor de expressão, que compreendem a cauda de histidinas (6xHis) e o sítio de clivagem para a

TEV protease, a construção gênica para a expressão da proteína Ac consistiu em 449 resíduos de aminoácidos. No modelo cristalográfico obtido, a densidade eletrônica para a 6xHis e TEV não foi observada bem como para os 13 resíduos iniciais e os 10 resíduos finais da sequência polipeptídica, possivelmente por se tratarem de regiões mais flexíveis.

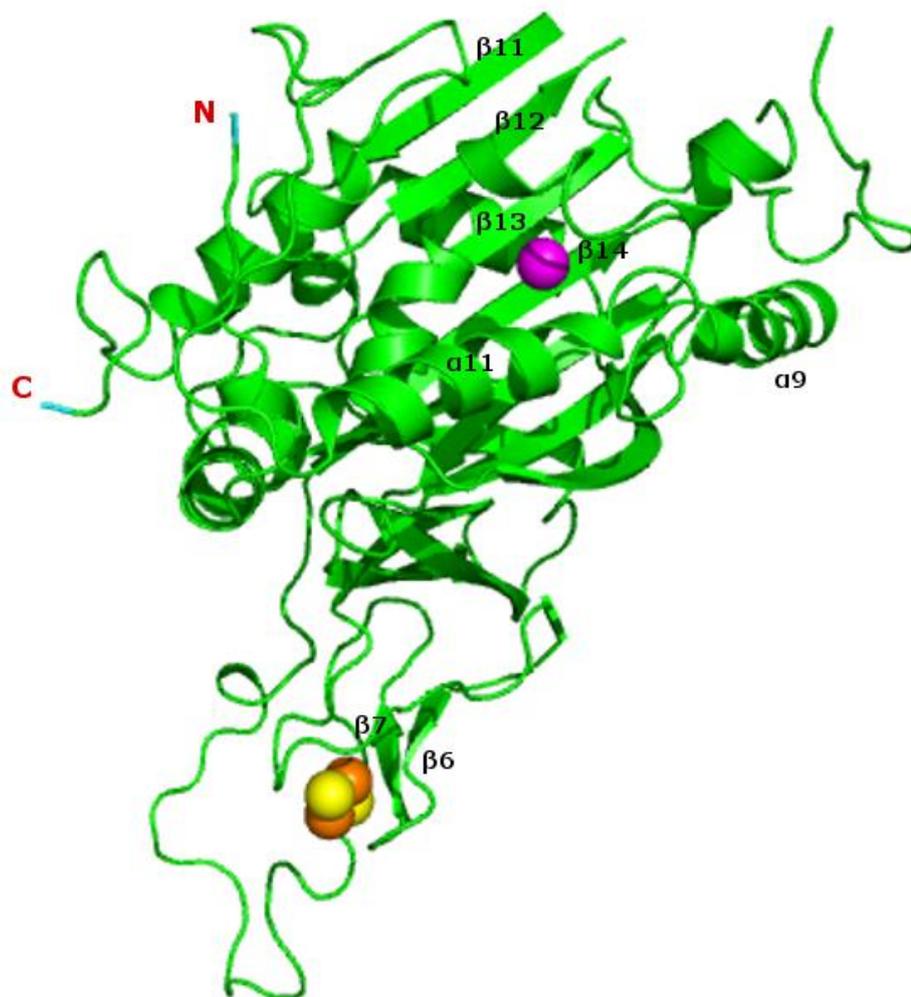


Figura 26: Estrutura cristalográfica da subunidade alfa do terminal oxigenase do complexo dioxigenase de *Achromobacter xylooxidans* A8.

Representação da cadeia polipeptídica com enovelamento com α -hélices e fitas- β característico das subunidades alfa da família das RHDs. Algumas fitas- β e α -hélices próximas ao centro Rieske e o átomo de Mn estão identificadas. N – porção aminoterminal e C – porção carboxiterminal.

Conforme já mencionado, a estrutura da subunidade alfa, como a de outras RHDs, pode ser dividida no domínio Rieske, contendo o cluster [2Fe-2S] e no domínio catalítico, no caso do terminal oxigenase, com a presença do manganês mononuclear localizado próximo ao sítio de ligação do substrato, no lugar do ferro.

Na porção N-terminal, o domínio Rieske é formado por longas regiões de loops e por fitas- β menores, como a $\beta 6$ e $\beta 7$ em destaque na figura 26. No domínio catalítico, o manganês está em uma região contendo uma mistura de α -hélices e fitas- β antiparalelas ($\alpha 8$ - $\alpha 9$ - $\beta 11$ - $\beta 12$ - $\beta 13$ - $\beta 14$ - $\beta 15$ - $\beta 16$ - $\alpha 10$ - $\alpha 11$), formando um arranjo do tipo α/β -*helix-grip*, o qual é característico da superfamília Bet-vI (MURZIN *et al.*, 1995). O enovelamento típico das proteínas Bet-vI é composto, em geral, por seis fitas- β antiparalelas e três α -hélices. Esta família contém o maior número de estruturas similares, em relação ao arranjo de estruturas secundárias, que não apresentam sequência ou função correlacionadas. De acordo com análises anteriores (RADAUER; LACKNER; BREITENEDER, 2008), em nove estruturas de RHDs depositadas no PDB, incluindo proteínas nativas e mutantes, a região C-terminal da subunidade alfa apresenta enovelamento do tipo Bet-vI.

Além disso, no domínio Rieske os resíduos conservados His-106 e His-127 interagem com um átomo de ferro, enquanto que Cis-104 e Cis-124 estão coordenando com o segundo átomo de ferro (Figura 27A). Já no domínio catalítico, His-232, His-237 e Asp-379 (Figura 27B) estão coordenando com o átomo de manganês e ainda, Ans-226 (em outras RHDs a posição ocupada é Ans-229) é descrito como um resíduo relevante e conservado, no qual o oxigênio da cadeia lateral possivelmente está envolvido na incorporação do oxigênio durante a catálise (JOUANNEAU *et al.*, 2011).

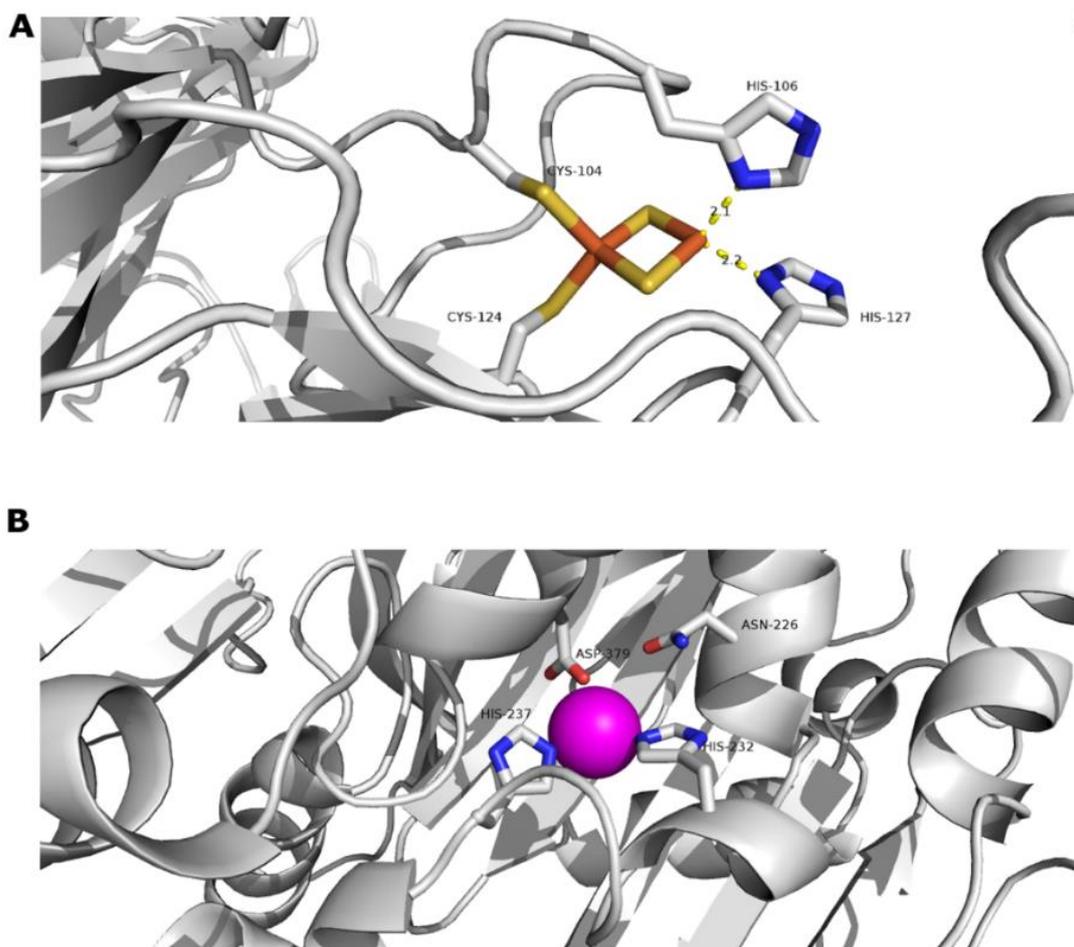


Figura 27: Representação das interações entre os resíduos nos domínios Rieske e catalítico da subunidade alfa do terminal oxigenase de *Achromobacter xylosoxidans* A8.

A – No domínio Rieske os resíduos conservados C104 e C124 interagem com um ferro e H106 e H127 com o outro ferro, e as distâncias das duas histidinas para o ferro em Å. B – No domínio catalítico os resíduos conservados H232, H237 e D379 estabelecem interações com o átomo de Mn. N226 é um resíduo conservado entre as RHDs e possivelmente está envolvido na catálise.

Embora as sequências das RHDs variem consideravelmente, as estruturas das subunidades alfa são muito conservadas. Oito estruturas originais correspondentes ao terminal oxigenase foram depositadas no PDB. Estas incluem naftaleno dioxigenase (NDO-O₉₆₁₆₋₄) de *P. putida* NCIB 9816-4 (CARREDANO *et al.*, 2000; KARLSSON *et al.*, 2003, 2005; KAUPPI *et al.*, 1998) e naftaleno dioxigenase (NDO-O₁₂₀₃₈) de *Rhodococcus* NCIMB12038 (GAKHAR *et al.*, 2005); bifenil dioxigenase (BPDO-O_{RHA-1}) de *Rhodococcus* RHA-1 (FURUSAWA *et al.*, 2004) e bifenil dioxigenase (BPDO-O_{B-1}) de *Sphingobium yanoikuyae* B1 (FERRARO *et al.*, 2007); cumeno dioxigenase (CDO-

O_{IP01}) de *P. fluorescens* IP01 (DONG *et al.*, 2005); carbazol-1,9-dioxigenase (CARDO-O_{CA10}) de *P. resinovorans* CA10 (NOJIRI *et al.*, 2005); nitrobenzeno dioxigenase (NBDO-O_{JS765}) de *Comamonas* sp. JS765 (FRIEMANN *et al.*, 2005) e 2-oxoquinolina monooxigenase (OMO-O₈₆) de *P. putida* (MARTINS; SVETLITCHNAIA; DOBBEK, 2005).

Sobre o mecanismo de catálise enzimática, o modelo proposto se baseia na interação entre as subunidades alfa. Considerando as enzimas RHDs descritas (JOUANNEAU *et al.*, 2011) a distância, em torno de 44 Å, entre o centro Rieske e o manganês mononuclear de uma mesma subunidade alfa impossibilita a catálise enzimática. Por outro lado, os 12 Å que separam o centro [2Fe-2S] de uma subunidade alfa e o átomo de Mn de outra subunidade alfa indica que a transferência de elétrons entre os centros de metais ocorre na região de interface entre essas duas subunidades (Figura 28).

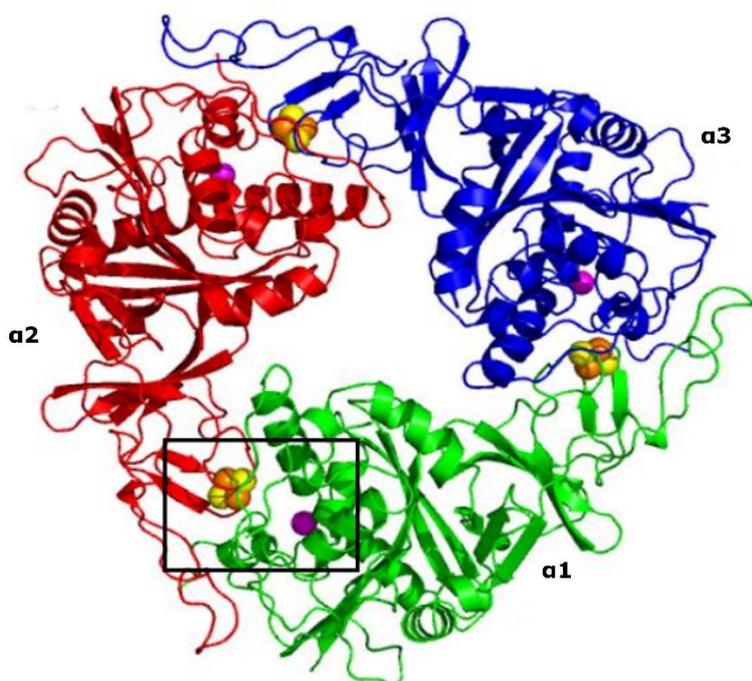


Figura 28: Estrutura cristalográfica do trímere α_3 do terminal oxigenase de *Achromobacter xylosoxidans* A8.

Representação das subunidades alfa (verde, vermelho e azul) mostrando as regiões de interface entre o centro Rieske [2Fe-2S] de uma subunidade e o Mn da subunidade adjacente; indicando onde ocorre a transferência de elétrons durante a catálise enzimática.

4.11.2. Subunidade beta (Ad) do terminal oxigenase do complexo dioxigenase de *Achromobacter xylosoxidans* A8

O modelo cristalográfico final (Figura 29) obtido para a subunidade beta (Ad) contém os resíduos 13 – 176 da proteína nativa. A densidade eletrônica não foi observada para os 12 resíduos iniciais da sequência polipeptídica, possivelmente por se tratarem de regiões mais flexíveis.

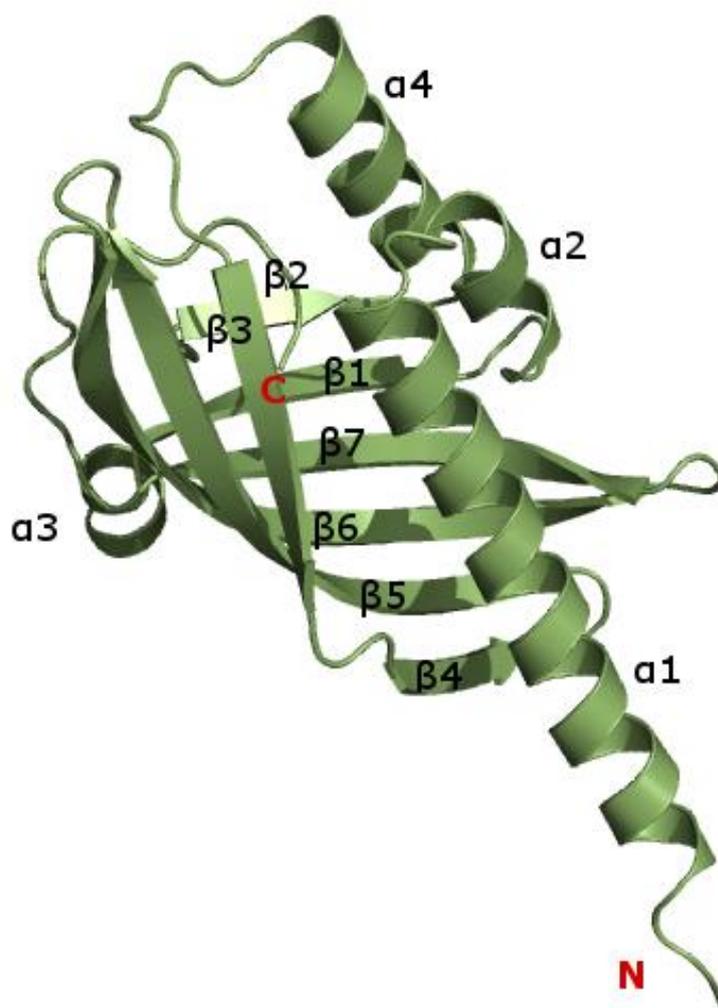


Figura 29: Estrutura cristalográfica da subunidade beta do terminal oxigenase de *Achromobacter xylosoxidans* A8.

Representação do esqueleto polipeptídico com enovelamento com α -hélices e fitas- β característico das subunidades beta da família das RHDs. As fitas- β e α -hélices estão identificadas. N – porção aminoterminal e C – porção carboxiterminal.

Os resíduos N-terminais formam uma longa α -hélice (α_1) e o enovelamento prossegue pela mistura de hélices menores e fitas- β (α_2 - β_1 - α_3 - β_2 - α_4), seguindo para cinco fitas- β (β_3 - β_7) chegando ao C-terminal da cadeia polipeptídica. Esse enovelamento é característico das proteínas que pertencem à superfamília das proteínas NTF2-like (do inglês *Nuclear Transport Factor-2*) (MURZIN *et al.*, 1995). Essas proteínas contêm um domínio formado por cinco fitas- β antiparalelas seguido de uma α -hélice principal. O domínio típico da NTF-2 é compartilhado por outras proteínas como as quinases, fosfatases, subunidades beta de complexos dioxigenase bacterianos, bem como muitas outras proteínas que ainda não foram caracterizadas (FERRARO *et al.*, 2007).

Como a função da subunidade beta ainda não é muito bem conhecida, acredita-se que ela desempenhe um papel estrutural, auxiliando na estabilização da subunidade alfa, conforme descrito no caso das enzimas NDO-O₉₆₁₆₋₄ (KAUPPI *et al.*, 1998) e NDO-O₁₂₀₃₈ (FRIEMANN *et al.*, 2005).

Considerando o heterohexâmero ($\alpha_3\beta_3$) do terminal oxigenase (AcAd), a subunidade beta (Ad), não está diretamente envolvida na estrutura ao entorno do sítio ativo na subunidade alfa, embora o átomo de Mn, na subunidade alfa, está a cerca de 11 Å de distância da interface entre as subunidades α/β do heterodímero. Essa proximidade poderia permitir a interação de cadeias laterais dos resíduos da subunidade beta que indiretamente auxiliassem na topologia do sítio ativo durante a catálise.

4.12. Comparação da estrutura da subunidade alfa do terminal oxigenase de *Achromobacter xylosoxidans* A8 com outras Rieske oxigenases

A análise comparativa da estrutura da subunidade alfa (Ac) foi feita com cinco outras RHDs. Os códigos de acesso do PDB seguido pela identificação das enzimas, são respectivamente: **3GZX-A** (bifenil dioxigenase de *Comamonas testosteroni* B-356; cadeia A), **2BIX-A** (naftaleno dioxigenase de *Rhodococcus* sp; cadeia A), **5XBP-A** (3-

nitrotolueno dioxigenase de *Diaphorobacter* sp. DS2; cadeia A), **1EG9-A** (naftaleno dioxigenase de *P. putida* NCBI 9816-4; cadeia A) e **2GBW** (bifenil dioxigenase de *Sphingomonas yanoikuyae* B1; cadeia A). Estas proteínas foram selecionadas após uma busca por similaridade estrutural no PDB utilizando o programa DALI - *Protein Structure Comparison Server* (HOLM; LAAKSO, 2016) e, na figura 30 está o alinhamento das sequências de aminoácidos dessas enzimas.

α1 α2
 llll llllllllllll

P1	1MTNVSPQ P A T A E Q A L R V P Y K V F T D K A Y L E L E N E R T F R G K V W
3GZX	1	MSSTMKDTQEAPVWRWSRNWTPDAIRA L V D .QDNGKLDAR I Y A D Q D L Y Q L E L E R V F .G R S W
2B1X	1MLSNELRQTLQK L H D V N S D W T V P A A I I N D P E V H D V E R E R I F L G H A W
5XBP	1MSYQN.. L V S .E A G L T Q K H L I H G D K E L F Q H E M K T I F . A R N W
1EG9	1MNYNNK I L V S .E S G L S Q K H L I H G D E L E L F Q H E L K T I F . A R N W
2GBW	1MSSDAT L V D .T V N A S Q S R Q V F W D E D V Y A L E I E R T F . S R A W

β1 β2 β3 β4 β5 β6

P1	42	A Y V A L E A E T P E P G D Y K A T H I G L S P V I V T R A E D G S I H V M E N R C A H R G A L V C E Q R Y G N A S S L
3GZX	59	L M L G H E T H I P K I G D Y L T T Y M G E D P V I M V R Q K D Q S I K V F L N Q C R H R G M R I V R S D G N A K A F
2B1X	47	V F L A H E S E I P E R G D Y V V R Y I S E D Q F I V C R D E G E I R G H L N A C R H R G M Q V C R A E M G N T S H F
5XBP	38	L F L T H D S L I P S P G D Y V T A K M G L D E V I V S R Q N D G S V R A F L N V C R H R G K T I V H A E A G N A K G F
1EG9	40	L F L T H D S L I P A P G D Y V T A K M G I D E V I V S R Q N D G S I R A F L N V C R H R G K T L V S V E A G N A K G F
2GBW	39	L M L G H E S L V P K P G D F I T T Y M A E D K V I L S H Q S D G T F R A F I N S C S H R G N Q I C H A D S G N A K A F

β7 α4 β8 β9

P1	102	Q C V Y H O W D Y N L K G E L N G V P F L R G V R G K G M C K P .F D K S R H G L T K L R V A T L N G I V F A S F S D
3GZX	119	T C T Y H G W A Y D I A G N L V N V P F E K E A F C D K K E G D C G F D K A D W G P L Q A R V E T Y K G L V F A N W D P
2B1X	107	R C P Y H G W T Y S N T G S L V G V P A G K D A Y G N Q L K K S D W N L R PM P N L A S Y K C L I F G S L D P
5XBP	98	V C N Y H G W G Y G T N G E L Q S V P F E K E L Y G D A I K K C L G L K EV P R I E S F H G F I Y G C F D A
1EG9	100	V C S Y H G W G F G S N G E L Q S V P F E K D L Y G E S L N K K C L G L K E.....V A R V E S F H G F I Y G C F D Q
2GBW	99	V C N Y H G W V F G Q D G S L V D V P L E S R C Y H N S L D K Q K L A A K S.....V . R V E T Y K G F I F G C H D P

α5 α6 β10 α7 α8

P1	161	E V E P L E F Y L G P V A .. V E I I K R N C K R P L R L L G .F O R Q R I H S N W K L A A E N . S R D P Y H A G L L H
3GZX	179	E A P D L K T Y L S D A M P Y M D V M L D R T E A G T E A I G G I Q K W V I P C N W K F A A E Q F C S D M Y H A G ..
2B1X	162	H A D S L E D Y L G D L K F Y L D I V L D R S D A G L Q V V G A P Q R W V I D A N W K L G A D N F V G D A Y H T M M T H
5XBP	153	E A P P L I D Y L G D A A W Y M E P T F K H S G G . L E L V G P P G K V V K A N W K T F A E N F V G D I Y H V G W T H
1EG9	155	E A P P L M D Y L G D A A W Y L E P M F K H S G G . L E L V G P P G K V V I K A N W K A P A E N F V G D A Y H V G W T H
2GBW	153	E A P S L E D Y L G E F R Y Y L D T I W E G A G G G M E L L I G P P M K S L L Q C N W K V P A E N F I G D G Y H V G W T H

α9 β11 β12

P1	217	L F L N I F G L W R N T S E SA S I Q L D R T G R H C L L A T E L H T D E E A A E H A S Q A Q H A Y N P E F T
3GZX	236	.. T M S H L S G V L A G L P P E M D L T Q I Q L S K N C N Q F R S A W G G H G A G W F I N D S S I L L S V V G P K I T
2B1X	222	R S M V E L G L A P P D P Q F A L Y G E H I H T G H G H G L G I G I G P P P G M P L P E F M G L P E N I V E E L E R R L T
5XBP	212	A S I L R V G Q S V F T P L A G.....N . A M L P P E G S C L Q M T S K Y G . S G M S L M W D Y Y A G N H S A D L V P D L
1EG9	214	A S S L R S G E S I F S S L A G.....N . A A L P P E G A G L Q M T S K Y G . S G M G V L W D G Y S G V H S A D L V P E L
2GBW	213	A A A L S Q I G G E L A G L A G.....N R A D I P F D D L G L Q F T T R H G . H G F G V I D N A A A G L H I K R .. E G W

β13 β14 β15 β16

P1	272	L R D S S V V Q S Q R E F D D N I N L V V L S I F P .N L V V H Q L G N A L I S T R H V I . . P I G E D E F E M V W T
3GZX	294	Q Y W T Q G P A A E K A A R R V P Q L P I L D M F G Q H M T V F P T C S F L P G I N T I R T W H P R G P N E V E W A F
2B1X	282	P E Q V E I F R . P T A F I H G T V F P N L S I G N F L M G K . D H L S A P T A F L T L R L W H P L G P D K M E V M S F
5XBP	268	M A F G G A K Q E K L A K E I G D V R A R I Y R S H L N G T I F P N N S F L T G S A A F K V W N P I D E N T T E V W T Y
1EG9	270	M A F G G A K Q E R L N K E I G D V R A R I Y R S H L N C T V F P N N S M L T C S G V F K V W N P I D A N T T E V W T Y
2GBW	268	T K F L E D T R G E V R R K F G P E R E R L Y L G H W N C S I F P N C S F L Y G T N T F K I W H P R G P H E I E V W T Y

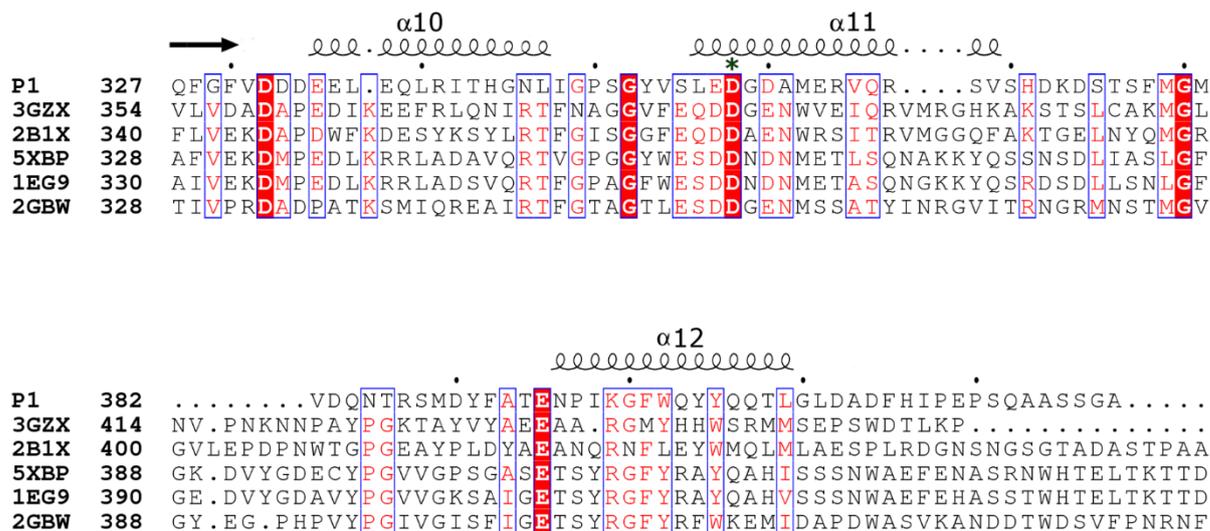


Figura 30: Alinhamento das sequências de aminoácidos da subunidade alfa do terminal oxigenase de *Achromobacter xylosoxidans* A8 com outras Rieske oxigenases.

P1, subunidade alfa do terminal oxigenase de *Achromobacter xylosoxidans* A8; **3GZX**, bifenil dioxigenase de *Comamonas testosteroni* B-356; **2B1X**, naftaleno dioxigenase de *Rhodococcus sp*; **5XBP**, 3-nitrotolueno dioxigenase de *Diaphorobacter sp.* DS2; **1EG9**, naftaleno dioxygenase de *P. putida* NCBI 9816-4 e **2GBW**, bifenil dioxigenase de *Sphingomonas yanoikuyae* B1. As setas correspondem à fitas- β e os espirais, α -hélices. Os resíduos idênticos estão na cor branca marcados em vermelhos e os similares na cor vermelha destacados em azul. Os resíduos discutidos ao longo do texto estão marcados com asterisco. O alinhamento foi realizado no servidor Multalin (CORPET, 1988) e visualizado utilizando o programa EsPript 3.0 (ROBERT, X. and GOUET, P. 2014).

Comparando a sequência de aminoácidos da subunidade alfa do terminal oxigenase com as RHDs, observa-se que são bem diferentes, porém apresentam algumas regiões com alta similaridade. Em relação ao alinhamento estrutural, as proteínas apresentam baixa identidade de sequência com Ac variando de 25 a 28%, com rmsd ($C\alpha$) entre 2.1 e 2.4 Å. Em Ac, na região de fitas- β ($\beta 4$ a $\beta 7$) nota-se a presença de alguns resíduos conservados que constituem o domínio Rieske, dentre eles as duas cisteínas (C104 e C124) e as duas histidinas (H106 e H127) (destacados com asterisco na figura 30). O mesmo ocorre no domínio catalítico na região de α -hélices ($\alpha 7$ a $\alpha 11$), na qual os resíduos de ligação ao metal asparagina (N226), as duas histidinas (H232 e H237) e o aspartato (D379) são comuns em todas as proteínas analisadas. Além disso, na figura 31 pode-se observar que o padrão de enovelamento das proteínas de maneira geral é similar, como o arranjo de fitas- β e α -hélices ao entorno do metal, Mn ou Fe.

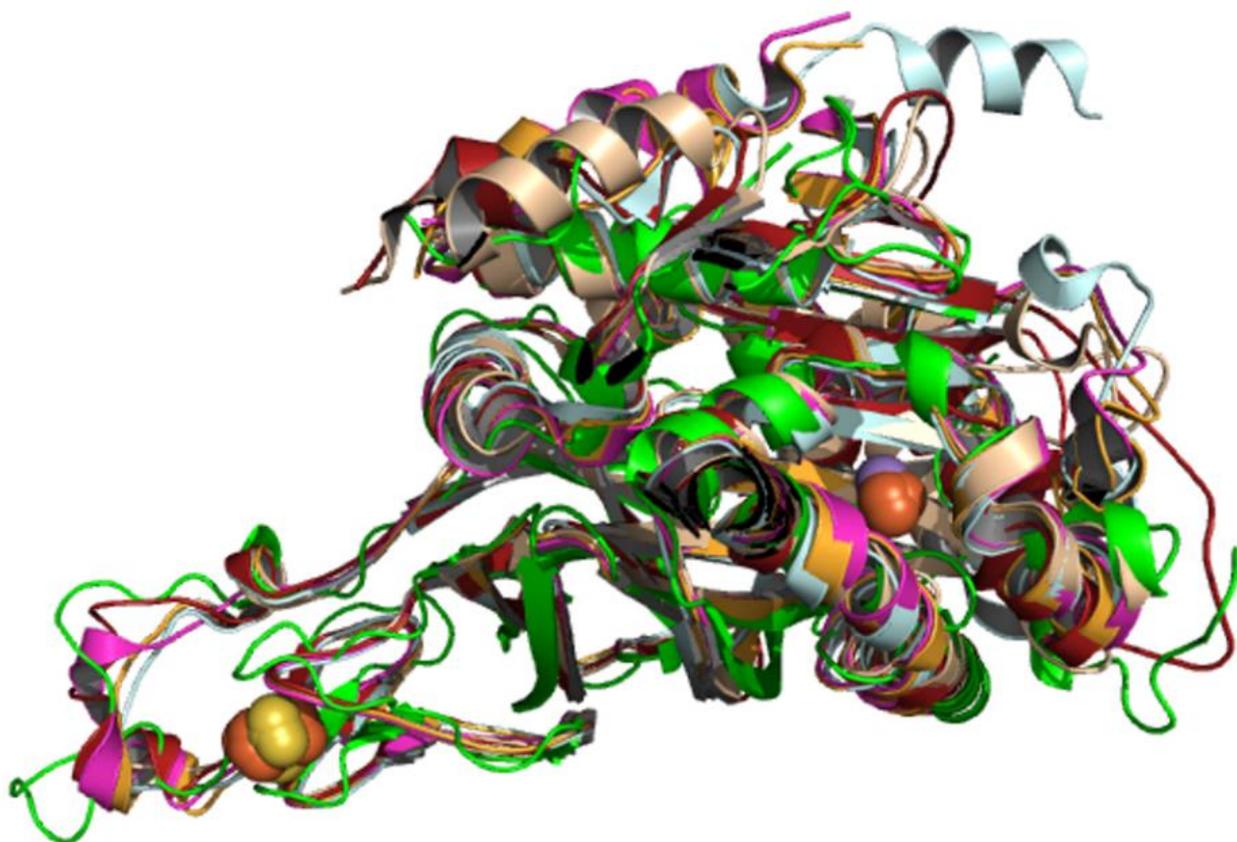


Figura 31: Alinhamento estrutural da subunidade alfa do terminal oxigenase de *Achromobacter xylosoxidans* A8 com outras Rieske oxigenases.

Sobreposição das estruturas da subunidade alfa (Ac) do terminal oxigenase (AcAd) com outras dioxigenases selecionadas através da busca por homologia estrutural utilizando o programa DALI Server (HOLM; LAAKSO, 2016). **P1** (verde), **3GZX** (amarelo), **2BX1** (vermelho), **5XBP** (rosa), **1EG9** (alaranjado) e **2GBW** (ciano). Átomos de ferro, enxofre e de manganês estão em laranja, amarelo e roxo, respectivamente.

Dentre as proteínas contidas nos alinhamentos, 3GZX e 1EG9 foram cristalizadas com os respectivos substratos bifênol e indol. Uma comparação da subunidade alfa do terminal oxigenase de *Achromobacter xylosoxidans* A8 com essas proteínas de modo mais detalhado foi realizada e na figura 32 estão as sobreposições com destaque para as regiões do domínio Rieske e do domínio catalítico.

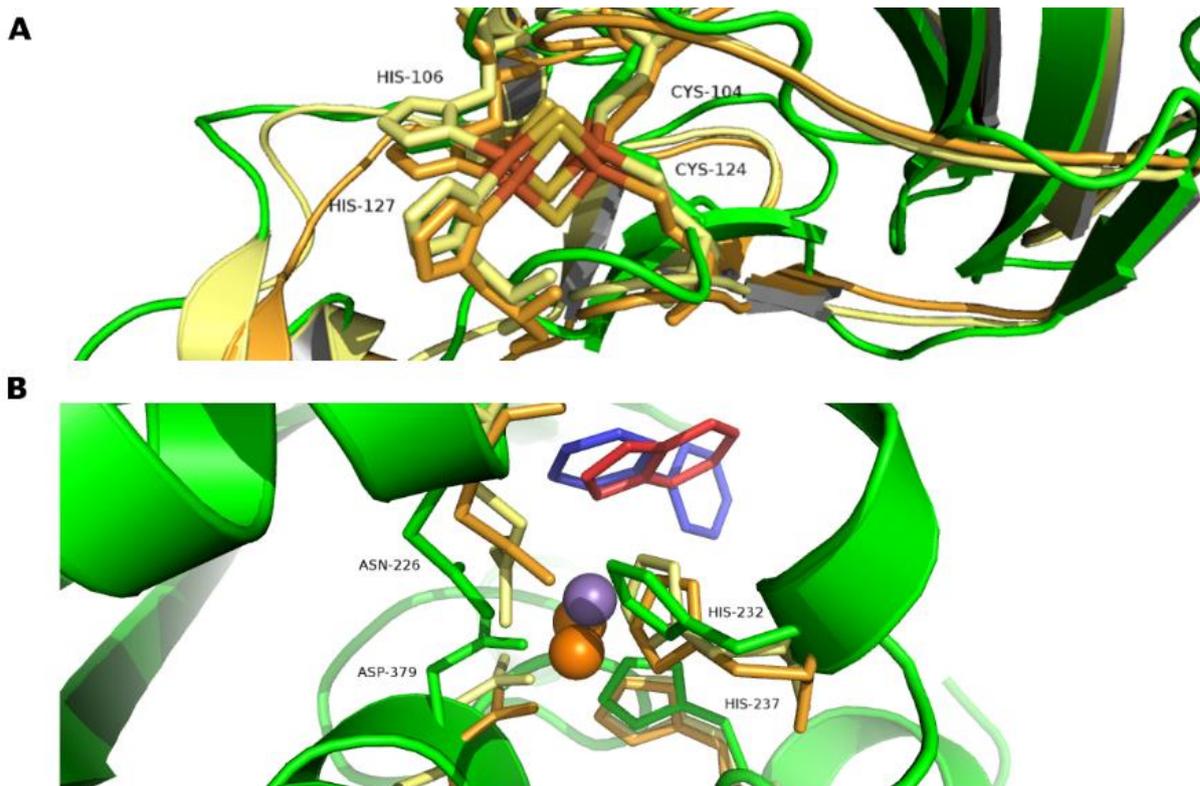


Figura 32: Comparação estrutural dos resíduos conservados no domínio Rieske e catalítico da subunidade alfa do terminal oxigenase de *Achromobacter xylosoxidans* A8 com outras dioxigenases.

A- Sobreposição na região do domínio Rieske evidenciado os resíduos C104, H106, C124 e H127 que interagem com o centro [2Fe-2S]. B – Sobreposição na região do domínio catalítico com destaque para os resíduos N226, H232, H237 e D379. **Ac** (verde), **3GZX** (amarelo) e **1EG9** (alaranjado). Átomos de ferro, enxofre e de manganês estão em laranja, amarelo e roxo, respectivamente. Substratos Bifenil (3GZX) está em azul e indol (da 1EG9) em vermelho. Os resíduos foram identificados utilizando a numeração de Ac.

De acordo com o alinhamento estrutural realizado com as três dioxigenases, Ac, bifenil (3ZGX) e a naftaleno (1EG9), observa-se que os resíduos são conservados tanto do domínio Rieske quanto no catalítico. Os resíduos Cys-104, His-106, Cys-124 e His-127 presentes no domínio Rieske de Ac ocupam as mesmas posições no modelo estrutural das outras duas RHDs. Porém para a bifenil dioxigenase (3GZX), estrutura resolvida contém o substrato bifenil, nota-se que no domínio catalítico, o resíduo Asn-226 em Ac é ocupado pela Gln-226 em 3GZX. Por se tratarem de resíduos polares, essa diferença não é tão acentuada para conferir características significativas, uma vez que pelos

modelos estruturais descritos, esse resíduo não atua diretamente na interação com o substrato.

Além dos aminoácidos conservados, uma análise com outros resíduos que interagem com o centro [2Fe-2S] do domínio Rieske e com o metal no sítio ativo nas enzimas Ac, 3GZX e 1EG9, demonstrou que estes apresentam alta similaridade (Tabela 7).

Tabela 7: Comparação dos resíduos de aminoácidos próximos ao centro Rieske e ao sítio ativo da proteína Ac (subunidade alfa do terminal oxigenase de *Achromobacter xylosoxidans* A8) e seus análogos estruturais nas RHDs estudadas.

Ac	3GZX	1EG9
<i>Resíduos no domínio Rieske [2Fe-2S]</i>		
C104	C100	C81
H106	H102	H83
C124	C120	C101
H127	H123	H104
R107	R103	R84
G108	G104	G85
A109	M105	K86
Y126	Y122	Y103
Q128	G124	G105
W129	W125	W106
<i>Resíduos no sítio ativo</i>		
N226	Q226	N201
D229	D230	D205
H232	H233	H208
H237	H239	H213
F239	V243	L217
L311	G320	H295
V313	H321	N297
H323	L331	L307
L325	I334	S310
I369	F376	F352
V375	F382	W358
D379	D386	D362

Dos doze resíduos de aminoácidos que compõem o sítio catalítico de Ac, oito não encontram correspondentes idênticos em 3GZX e 1EG9 (Asn-226, Phe-239, Leu-311, Val-313, His-323, Leu-325, Ile-369 e Val-375), enquanto que no domínio Rieske, essa diferença ocorre somente em dois (A109 e Q128) dos dez resíduos listados. Na figura 33 pode-se observar a posição espacial destes resíduos em comparação com as outras duas dioxigenases.

No domínio catalítico de Ac, a presença da His-323 (Leu-331 em 3GZX e Leu-307 em 1EG9) sugere que seja um aminoácido importante para catálise na dioxigenase de *Achromobacter xylosoxidans* A8, devido a sua polaridade,. Visto que, essa posição é ocupada por uma leucina na maioria das RHDs, com exceções de Phe-307 (NDO-O12038), Gln-314 (OMO-O86) e Val-272 (CARDO-OCA10).

Outro resíduo distinto é a Leu-325 (Ile-334 em 3GZX e Ser-310 em 1EG9), que na naftaleno dioxigenase de *P. putida* situa-se na entrada do sítio ativo (FERRARO *et al.*, 2007). E ainda, um contraste mais acentuado é a presença da Ile-369, que dá lugar a Phe-376 (3ZGX) e Phe-352 (1EG9), posição que é ocupada por uma fenilalanina conservada nas demais RHDs (JOUANNEAU *et al.*, 2011). Isso sugere que a isoleucina, por ser um resíduo com cadeia lateral menos volumosa e mais flexível do que o anel da fenilalanina, nessa posição possa permitir a formação de uma cavidade maior no sítio ativo, a qual possivelmente acomoda substratos mais volumosos.

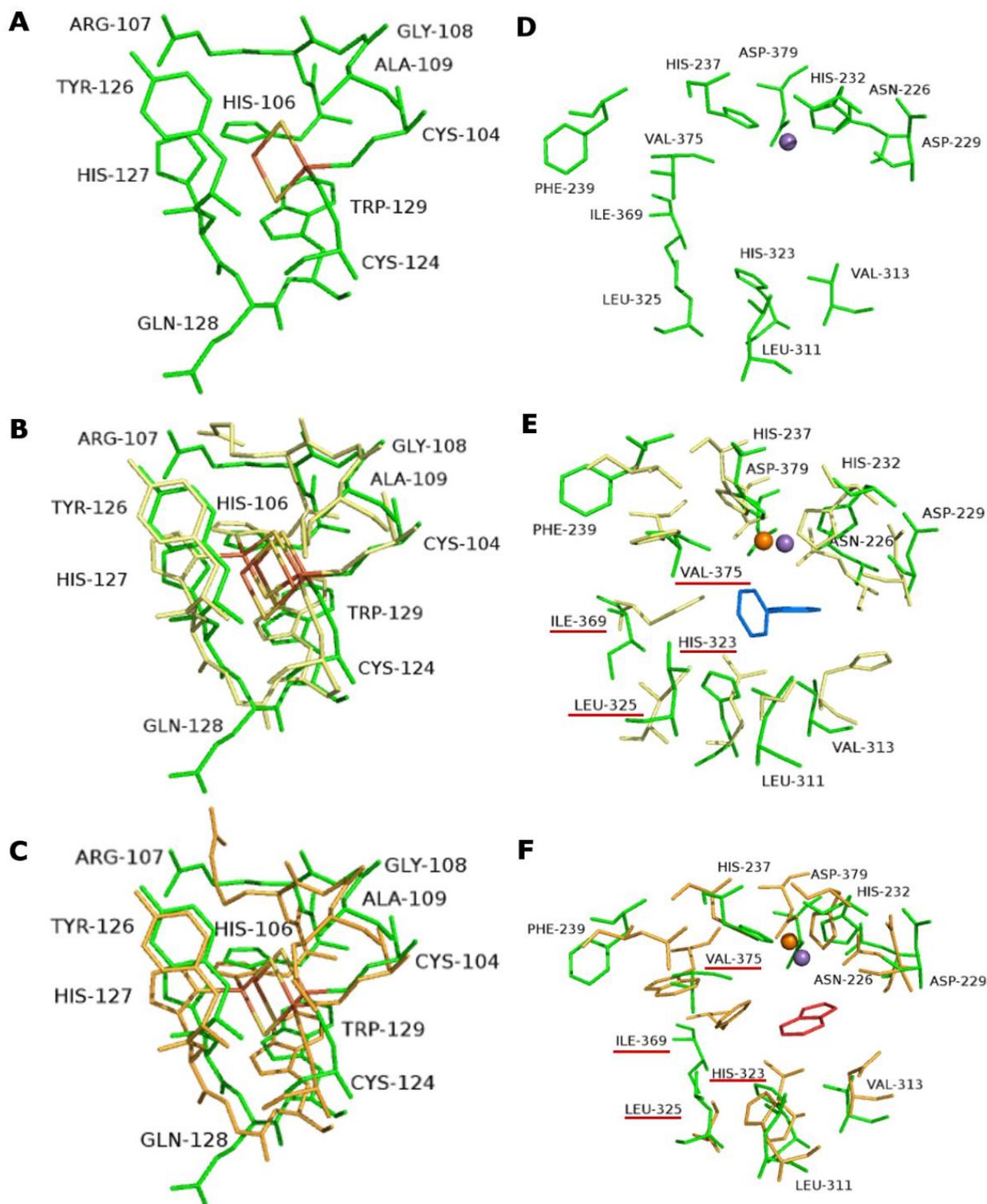


Figura 33: Comparação dos resíduos dos domínios Rieske e catalítico de subunidade alfa do terminal oxigenase de *Achromobacter xylosoxidans* A8 com outras dioxigenases.

Resíduos do domínio Rieske (A – C) e do sítio ativo (D – F) de Ac, Ac com 3GZX e Ac com 1EG9, respectivamente. Ac (verde), 3GZX (amarelo) e 1EG9 (alaranjado). Átomos de ferro e enxofre estão em laranja e amarelo, respectivamente e de manganês em roxo. Substratos Bifenil (3GZX) está em azul e indol (da 1EG9) em vermelho. Os resíduos foram identificados utilizando a numeração de Ac.

O mesmo perfil de alteração é observado para a Val-375, posição ocupada pela Phe-382 em 3ZGX e pelo Trp-358 em 1EG9. É interessante notar que todas as RHDs conhecidas apresentam um resíduo aromático (Phe, Trp e Tyr), nessa posição, salvo a exceção de Phn-I, uma dioxigenase de *Sphingomonas* CHY-1 (JAKONCIC *et al.*, 2007), na qual tem uma Leu-356 na posição correspondente.

De acordo com Jakoncic *et al.*, (2007), resíduos volumosos como fenilalanina e triptofano presentes na região central das dioxigenases podem alterar a topologia do sítio catalítico e conseqüentemente determinar a especificidade de substrato. A substituição da Phe-352 em 1EG9 por resíduos de aminoácidos menores, como valina e leucina alterou a regio-especificidade das enzimas pela mudança na topologia do sítio ativo. O mesmo foi observado na substituição do Trp-358 (1EG9) por uma alanina, que inativou a enzima para a conversão do naftaleno, demonstrando como este resíduo é crucial para a manutenção do naftaleno na posição correta para que a reação ocorra. Por outro lado, a presença de resíduos menores podem contribuir para o aumento do sítio catalítico, com regiões mais flexíveis, o que pode exercer grande influência na seleção de substratos aromáticos mais volumosos.

O papel da Phe-352 na naftaleno dioxigenase foi avaliado pela elucidação da estrutura do mutante F352V somente e complexado com substrato (FERRARO *et al.*, 2006). Os resultados demonstraram que a orientação da ligação do substrato ao sítio ativo é determinante para a regio- e estereoseletividade das reações catalisadas pelas RHDs. Isso porque, na enzima contendo a F352V o substrato fenantreno se ligou em uma posição diferente no sítio ativo, em comparação com a enzima nativa, o que alterou a formação do produto.

Com isso, essa face presente no sítio catalítico de Ac, consistindo nos quatro resíduos Leu-325, His-323, Val-375 e Ile-369 (destacados em vermelho na figura 33D e

F), sugere que essa região possa conferir um acesso ou melhor acomodação para substratos aromáticos maiores, como pode ser visto pelo posicionamento dos substratos bifenil e indol, na sobreposição com as outras RHDs.

Além disso, vale ressaltar que estudos anteriores com o Asp-205 da naftaleno dioxigenase (1EG9), que ocupa a posição equivalente Asp-229 em Ac, demonstraram que esse resíduo pode atuar como uma ponte ou via de transferência de elétrons entre os domínios Rieske e catalítico (FERRARO; GAKHAR; RAMASWAMY, 2005), uma vez que a transferência de elétrons durante a catálise enzimática se dá na interface entre duas subunidades alfa. Para isso, o aspartato faria uma ponte, através de interações eletrostáticas, do tipo ligações de hidrogênio, tanto com a His-232 (His-208 em 1EG9), que se liga no manganês mononuclear, quanto com a His-127 (His-104 em 1EG9), que se liga ao centro Rieske [2Fe-2S], conforme demonstrado na figura 34.

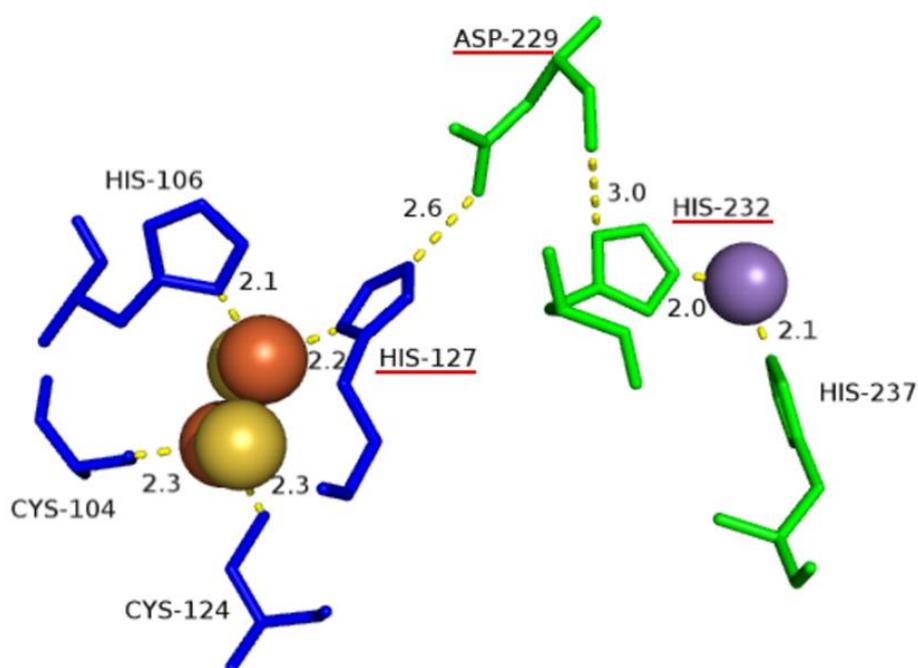


Figura 34: Interação entre o domínio Rieske e o catalítico na interface das subunidades alfa do terminal oxigenase de *Achromobacter xylosoxidans* A8 através de um Aspartato (D229). Interações eletrostáticas entre H232, D229, presentes no domínio catalítico de uma subunidade alfa ($\alpha 1$), e uma H127 no domínio Rieske de outra subunidade alfa ($\alpha 2$). A interface de duas subunidades alfa com os resíduos conservados C104, H106, C124 e H237 evidencia o papel do D229 de formar uma “ponte” que possivelmente auxilia na transferência de elétrons durante a catálise enzimática.

E ainda, o fato desse resíduo ser conservado nas estruturas das demais RHDs endossa o papel do aspartato na formação das ligações de hidrogênio entre os resíduos na interface das subunidades alfa favorecendo a transferência de elétrons.

Já no domínio Rieske, as diferenças não foram tão acentuadas quanto no domínio catalítico. Em Ac a presença da Ala-109 próxima a Cys-104 e His-106, pode sugerir um papel importante para esse aminoácido na transferência de elétrons que ocorre durante a catálise. Esta mesma posição em 3GZX é ocupada pela Met-105 e em 1EG9 pela Lis-86, sendo que resíduos com cadeia lateral mais volumosos podem conferir impedimento estérico (Figura 33 D, E e F). Condição semelhante ocorre com a Gln-128 próxima Cys-124 e His-127, que é ocupada por uma Gly-124 (3GZX) e Gly-105 (1EG9) nas outras RHDs (Figura 33 D, E e F).

Dessa forma, estudos posteriores envolvendo a substituição de resíduos específicos tanto no sítio catalítico quanto nos resíduos ao entorno do centro Rieske por mutagênese dirigida podem esclarecer e direcionar o papel de cada um desses resíduos na atividade catalítica da enzima.

4.13. Comparação da estrutura da subunidade beta do terminal oxigenase de *Achromobacter xylooxidans* A8 com outras proteínas

A análise comparativa da estrutura da subunidade beta (Ad) foi feita com quatro proteínas. O código de acesso e a identificação das proteínas são respectivamente: **2B1X-B** (subunidade beta da naftaleno dioxigenase de *Rhodococcus* sp; cadeia B), **3E99-A** (subunidade beta da benzoato dioxigenase de *Burkholderia Mallei* ATCC 23344); **3GZX-B** (subunidade beta da bifenil dioxigenase de *Comamonas testosteroni* B-356; cadeia B) e **3EF8** (*Scytalone* dihidratase putativa de *Novosphingobium Aromaticivorans* DSM 12444). Estas proteínas foram selecionadas após uma busca por similaridade estrutural

utilizando o programa DALI e na figura 35 está o alinhamento das sequências de aminoácidos dessas enzimas.

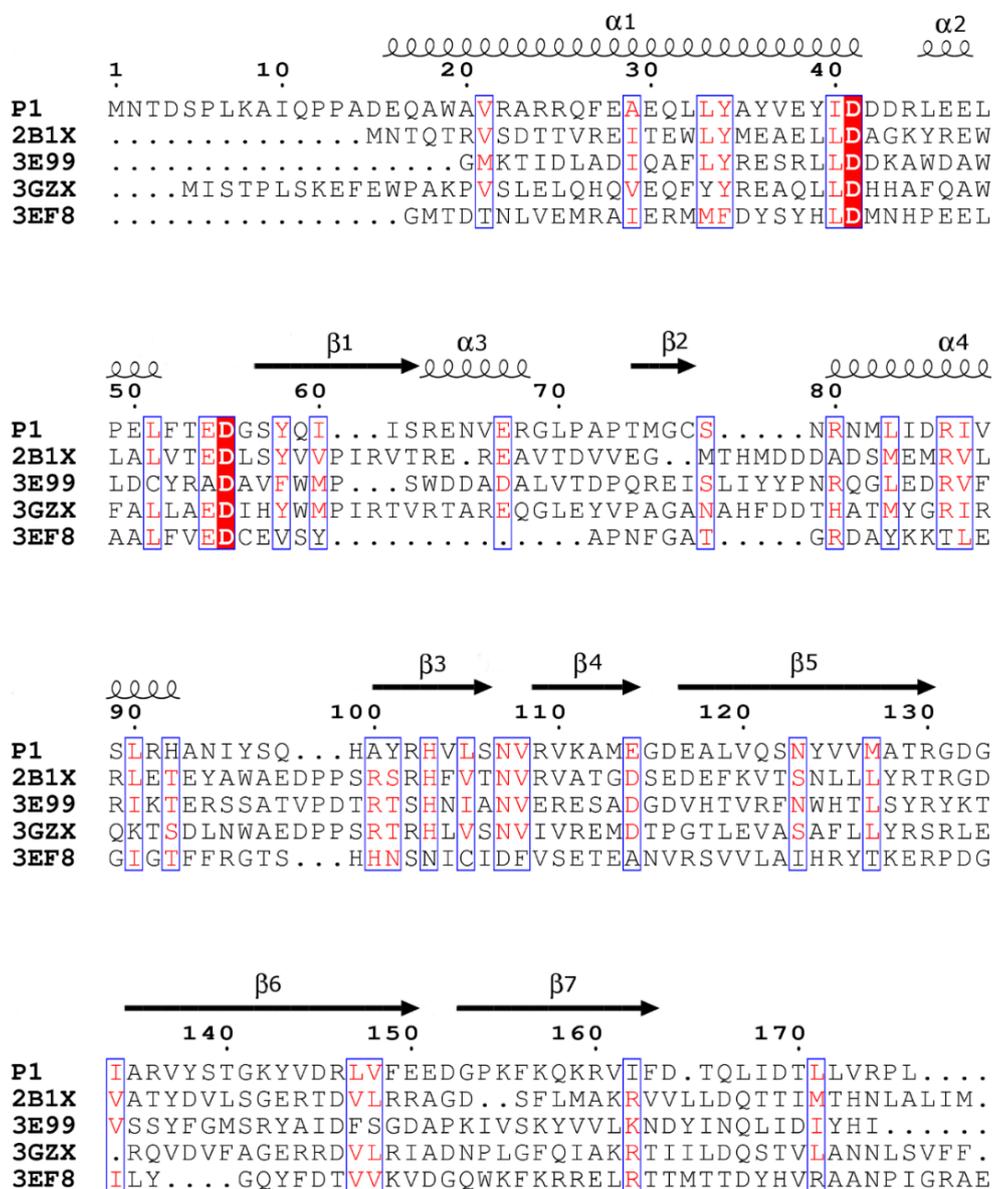


Figura 35: Alinhamento das sequências de aminoácidos da subunidades beta do terminal oxigenase de *Achromobacter xylosoxidans* A8 com outras proteínas.

P1, subunidade beta do terminal oxigenase de *Achromobacter xylosoxidans* A8; **2B1X**, subunidade beta da naftaleno dioxigenase de *Rhodococcus* sp; **3E99**, subunidade beta da benzoato dioxigenase de *Burkholderia Mallei* ATCC 23344; **3GZX**, subunidade beta da bifênil dioxigenase de *Comamonas testosteroni* B-356 e **3EF8-A**, proteína putativa *Scytalone* Dihidratase de *Novosphingobium Aromaticivorans* DSM 12444. As setas correspondem à fitas- β e os espirais, α -hélices. Os resíduos idênticos estão na cor branca marcados em vermelhos e os similares na cor vermelha destacados em azul. O alinhamento foi realizado no servidor Multalin (CORPET, 1988) e visualizado utilizando o programa EsPrint 3.0 (ROBERT, X. and GOUET, P. 2014).

A partir da comparação das sequências de aminoácidos, pode-se observar que as proteínas são muito diferentes, embora apresentem algumas regiões com resíduos de aminoácidos similares. Considerando o alinhamento estrutural, observa-se que as subunidades beta apresentam o mesmo padrão de enovelamento, com identidade de sequência variando de 25 a 28%, e com rmsd (C α) entre 2.1 e 2.4 Å, em relação a estrutura de Ad.

Comparando as estruturas das cinco proteínas (Figura 36), observou-se que somente quatro resíduos de aminoácidos são os mesmos em todas as cinco proteínas.

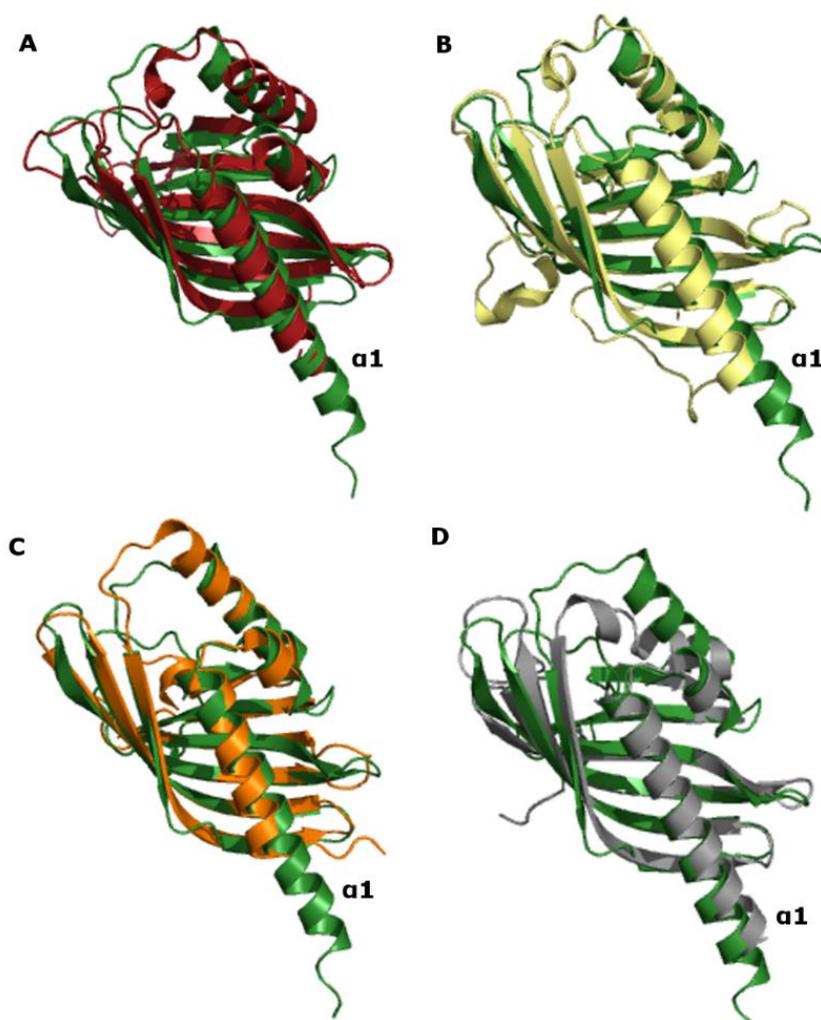


Figura 36: Alinhamento estrutural da subunidade beta do terminal oxigenase de *Achromobacter xylooxidans* A8 com outras proteínas.

Sobreposição das estruturas da subunidade beta (Ad) do terminal oxigenase com outras proteínas selecionadas através da busca por homologia estrutural utilizando o programa DALI Server

(HOLM; LAAKSO, 2016). A- Ad com 2B1X; B- Ad com 3GZX; C- Ad com 3E99; D- Ad com 3EF8.

Ad (verde), **2BX1** (vermelho), **3GZX** (amarelo), **3E99** (laranjado) e **3EF8** (cinza). A hélice $\alpha 1$ está identificada para evidenciar a região que apresentam maior diferença entre as estruturas das outras proteínas de Ad.

Os resíduos de aminoácidos de Ad com a numeração correspondente nas outras proteínas 2B1X, 3E99, 3GZX e 3EF8, respectivamente, são: Asp-41 (D27, D22, D37 e D24), Glu-47 (E33, A28, A43 e E30), Glu-54 (E40, A35, E50 e E37) e Asp-55 (D41, D36, D51 e D38). Contudo, observa-se a diferença no Glu-47 e Glu-54 em Ad, posições ocupadas por Ala-28 e Ala-35, respectivamente, na subunidade beta da benzoato dioxigenase (3E99).

De acordo com Kauppi *et al.*, (1998), o Asp-46 (Asp-47 em Ad) na subunidade beta da naftaleno dioxigenase (NDO) é equivalente ao Asp-31 da Scytalone dihidratase (ScDH), o qual é um resíduo que interage com uma histidina no sítio ativo dessa enzima. Em NDO a Arg-118 corresponde a aquela histidina de ScDH e forma ligações de hidrogênio com outros resíduos na porção C-terminal. Porém, diferente da ScDH, tanto a subunidade beta da NDO quanto a de Ad, até o momento, não apresentam função enzimática conhecida.

É interessante notar que das quatro proteínas selecionadas, a proteína putativa Scytalona (3EF8) é a única que não está descrita como sendo uma subunidade beta de complexos dioxigenases. A ScDH é descrita como membro de um grupo de enzimas que estão envolvidas na biossíntese de melanina em fungos (LUNDQVIST *et al.*, 1994). Assim, a 3EF8, mesmo apresentando somente 21% de identidade de sequência com Ad, é a proteína que apresentou maior similaridade estrutural, como pode ser observado no enovelamento da hélice $\alpha 1$ (Figura 36D). E ainda, curiosamente, uma reação catalisada pela ScDH, utiliza o substrato *scytalone* formando o produto 3,8-tri-hidroxi-naftaleno. Porém, de acordo com os estudos anteriores realizados com a estrutura da subunidade beta da naftaleno dioxigenase (KAUPPI *et al.*, 1998), essa observação acerca dos resíduos

similares com a ScDH parece ser uma feliz coincidência, visto que esses resíduos não são conservados nas beta subunidades de todas as $\alpha\beta$ dioxigenases.

4.14. Estudo da interação do terminal oxigenase de *Achromobacter xylosoxidans* A8 com a ferredoxina

Nos estudos acerca do mecanismo de catálise das enzimas dioxigenases, o componente ferredoxina atua na transferência de elétrons, advindos da oxidação do NADH, realizada pela redutase, até o terminal oxigenase, onde ocorre a conversão do substrato. O local de interação da ferredoxina tem sido descrito como uma depressão na superfície entre as subunidades alfa e beta da naftaleno dioxigenase (NDO), sugerindo que essa região possa ser o sítio de ligação para a ferredoxina na oxigenase hexamérica ($\alpha_3\beta_3$) (ASHIKAWA *et al.*, 2006). Como até o presente momento, não foi possível cristalizar a proteína ferredoxina, pode-se estimar a região da subunidade alfa (Ac) do terminal oxigenase que esteja envolvida na interação com a proteína carreadora de elétrons através de uma análise comparativa com outra estrutura de ferredoxina, por modo análogo.

A carbazol 1,9a-dioxigenase (CARDO) é uma proteína da família das RHDs e o seu componente oxigenase é formado somente por subunidades alfa. A estrutura cristalográfica da proteína homotrimérica revela que o enovelamento é similar ao heterohexâmero $\alpha_3\beta_3$ compartilhada pela maioria das Rieske dioxigenases, embora apresente somente cerca de 17% de identidade de sequência (NOJIRI *et al.*, 2005). Até o momento, é a única estrutura resolvida que contém o complexo com os componentes oxigenase (CARDO-O) e ferredoxina (CARDO-F). Vale ressaltar que estas proteínas são oriundas de microrganismos diferentes e isso pode ser atribuído a dificuldade de produção e obtenção das proteínas de uma mesma fonte. Com isso, originalmente o componente oxigenase de *Janthinobacterium* sp. J3 (CARDO-OJ3) e a ferredoxina de *Pseudomonas*

resinovorans CA10 (CARDO-FCA10), foram expressos e purificados separadamente (ASHIKAWA *et al.*, 2006). Na figura 37 está a representação do modelo cristalográfico obtido para o complexo binário Oxi-Fd (ASHIKAWA *et al.*, 2012).

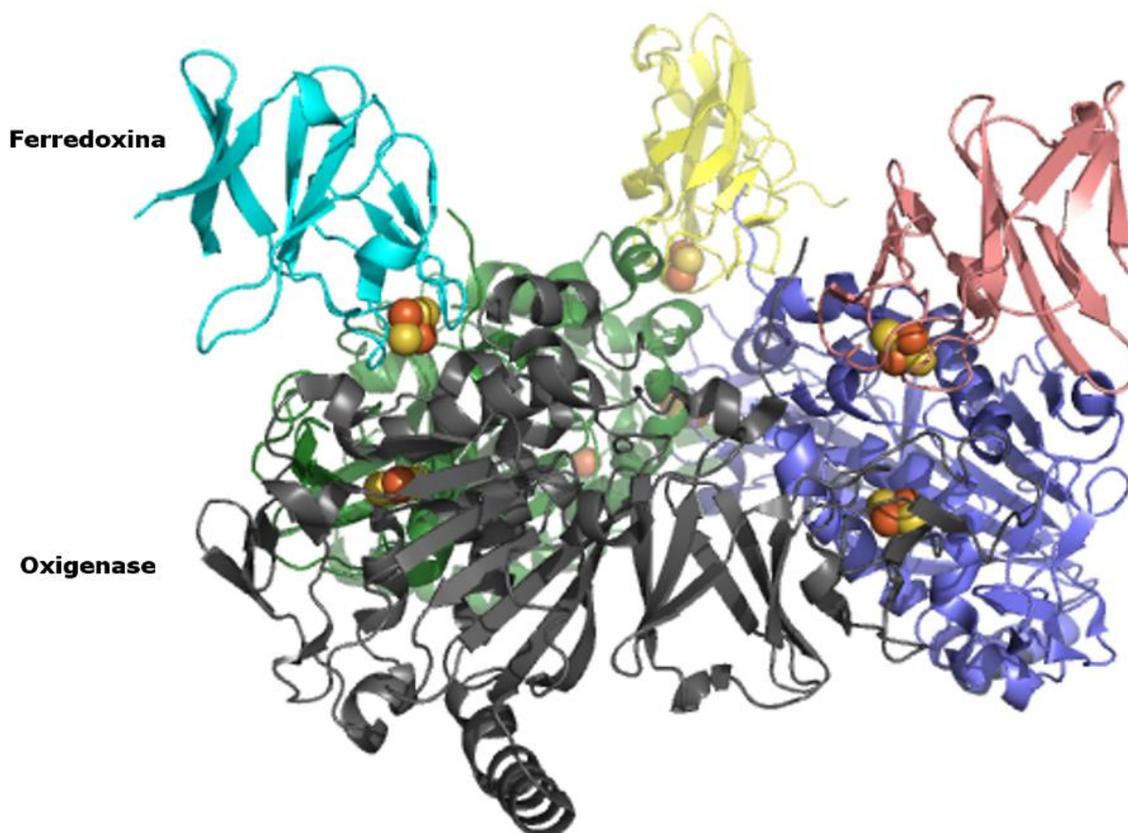


Figura 37: Estrutura tridimensional do complexo oxigenase-ferredoxina da carbazol 1,9a-dioxigenase.

Trímêro de subunidades do terminal oxigenase (cinza, verde e roxo) e dos componentes ferredoxina (ciano, amarelo e rosa). Adaptado de (ASHIKAWA *et al.*, 2012).

O sítio de ligação da ferredoxina tem sido descrito como uma depressão na superfície do trímêro de oxigenases na interface adjacente das subunidades alfa (ASHIKAWA *et al.*, 2006) o que corrobora com os estudos sobre uma depressão similar observada nas oxigenases hexaméricas (KAUPPI *et al.*, 1998). No complexo, três moléculas de ferredoxina estão ligadas na oxigenase trimérica e cada interação proteína-proteína envolve a combinação de interações eletrostáticas, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio entre resíduos específicos de cada proteína. Considerando a superfície do

complexo binário Oxi-Fd, as interações ocorreram entre a Fd e as quatro seguintes regiões da Oxi: resíduos R11-W15 (região 1), Q115-Q119 (região 2), R210 (região 3) e W350-V363 (região 4) (ASHIKAWA *et al.*, 2012).

Além disso, segundo Ashikawa *et al.*, (2006), a distância de cerca de 22 Å entre o centro Rieske da ferredoxina e o ferro mononuclear da oxigenase é muito extensa para que ocorra a transferência direta de elétrons sem a participação de um centro Rieske adicional. Por outro lado, a distância média entre o centro Rieske de outra oxigenase vizinha e o Rieske da ferredoxina é de aproximadamente 12 Å, sendo propícia para a transferência de elétrons entre os centros [2Fe-2S]. Com isso, a interação entre as superfícies moleculares de cada componente provavelmente é o processo mais importante.

Uma comparação estrutural da subunidade alfa (Ac) do terminal oxigenase de *Achromobacter xylosoxidans* A8 com a CARDO demonstrou que apesar das proteínas compartilharem somente 17% de identidade de sequência, o modelo conformacional apresenta muitas similaridades, como pode ser visto na figura 38.

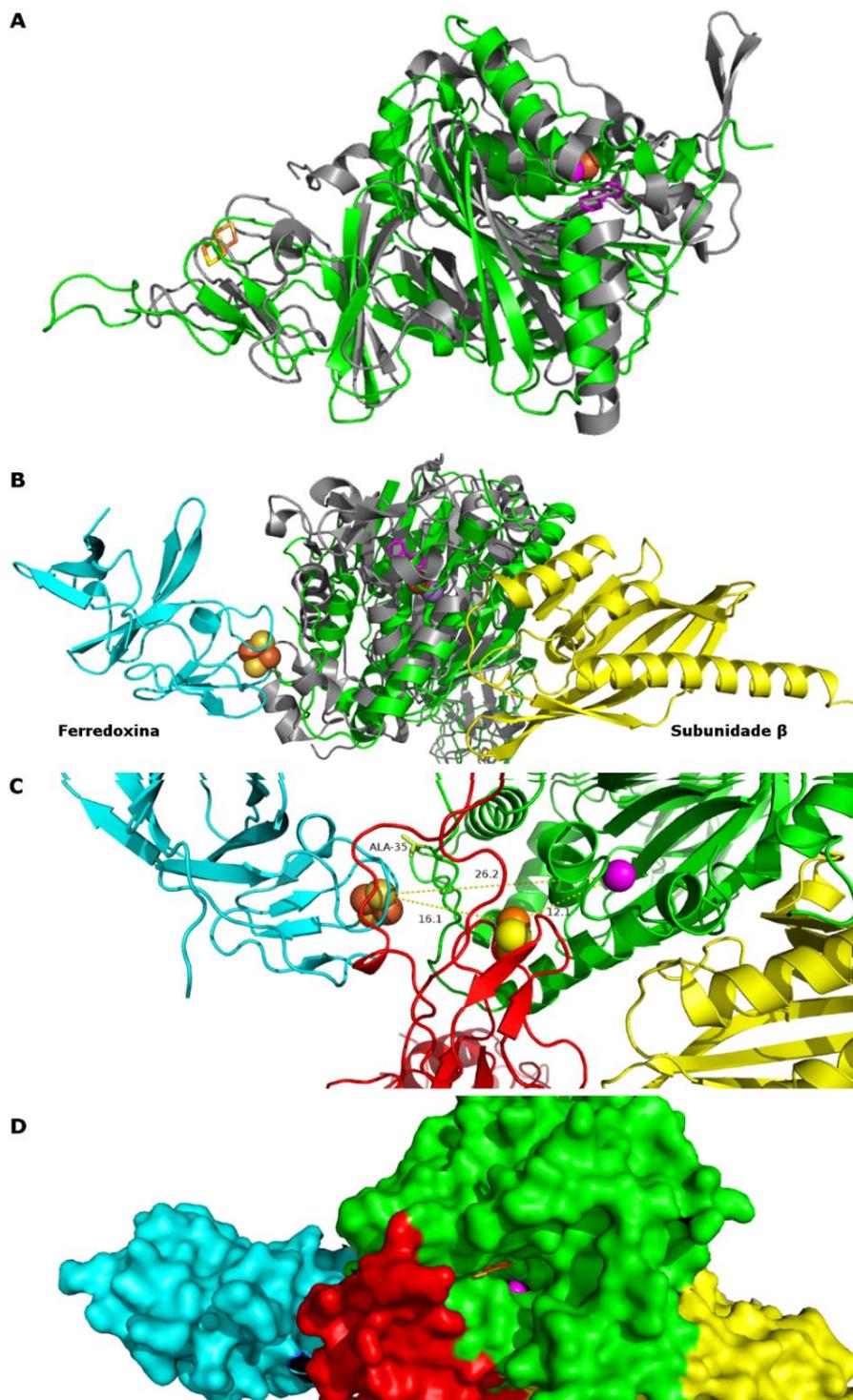


Figura 38: Alinhamento estrutural do terminal oxigenase de *Achromobacter xylosoxidans* A8 com o complexo binário oxigenase-ferredoxina da carbazol 1,9a-dioxigenase.

A-Sobreposição da subunidade alfa do terminal oxigenase (verde) com a subunidade alfa (cinza) da carbazol 1,9a-dioxigenase complexada com o substrato carbazol (rosa). B- Presença adicional da Ferredoxina (ciano) e da subunidade beta do terminal oxigenase (amarelo). C-Representação da transferência de elétrons entre os centros redox com a presença de outra subunidade alfa (vermelho) do terminal oxigenase. Evidenciando as distâncias entre os centros Rieske e o Mn; e em destaque a A35, o N-terminal do modelo cristalográfico presente na interface com a Ferredoxina. D – Representação em superfície do complexo ferredoxina e terminal oxigenase. Átomos de ferro, enxofre e manganês estão em laranja, amarelo e magenta, respectivamente.

A sobreposição das estruturas da subunidade alfa (Ac) com a Oxi da CARDO (Figura 38A) evidencia que na região do domínio catalítico, as α -hélices e fitas- β , ocupam praticamente a mesma posição espacial ao entorno dos átomos de Fe, para a CARDO e de Mn para a estrutura de Ac.

Considerando a estrutura do terminal oxigenase (AcAd), com o heterodímero $\alpha\beta$, e a estrutura da CARDO, com o complexo oxigenase-ferredoxina (CARDO-O e CARDO-F), pode-se perceber que a subunidade beta (Ad) e a ferredoxina estão interagindo com a subunidade alfa (Ac) em direções opostas (Figura 38B). E ainda, ao “esconder” a molécula da CARDO-O e adicionando outra subunidade alfa do terminal oxigenase (em vermelho na Figura 38C), nota-se como que as quatro proteínas estão interagindo. Os elétrons advindos do centro Rieske [2Fe-2S] da ferredoxina, provavelmente se movem para o centro Rieske da subunidade alfa (em vermelho) e seguem para o Mn, na subunidade alfa adjacente. Vale ressaltar que o átomo de ferro da CARDO-O permaneceu na figura para indicar a localização do Fe próxima ao substrato carbazol (em laranja). Mais ainda, na representação em superfície é possível visualizar como seria a estrutura do complexo ferredoxina-terminal oxigenase com destaque para a cavidade presente na subunidade alfa (em verde), com o substrato localizado próximo ao Mn (Figura 38D).

Com base nesse estudo comparativo prévio foi possível avaliar as regiões possíveis de interações entre o componente ferredoxina com as subunidades alfa adjacentes do terminal oxigenase, bem como evidenciar os resíduos que estão na interface entre as proteínas, destacados na figura 39.

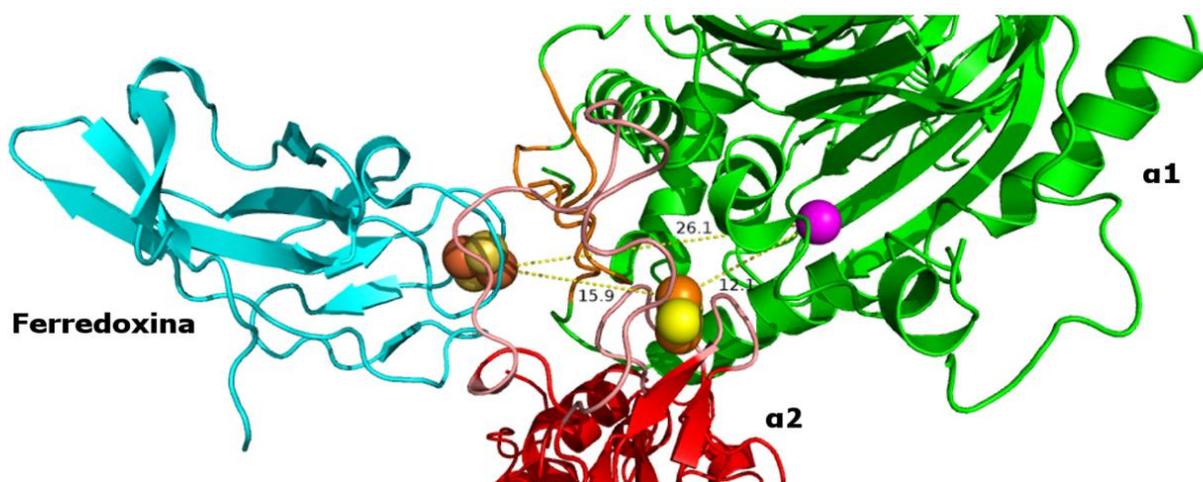


Figura 39: Resíduos que estão na interface das subunidades alfa do terminal oxigenase de *Achromobacter xylosoxidans* A8 com a Ferredoxina da carbazol 1,9a-dioxigenase.

A Ferredoxina e as duas subunidades alfa do terminal oxigenase apresentam resíduos na superfície de contato das proteínas que interagem com os centros Rieske e o domínio catalítico, onde está o Mn. Os resíduos A35-Y40; T397-D404; D433-H437 da subunidade $\alpha 1$ (alaranjado) e R103-A109; V125-Q128 e L137-D157 da subunidade $\alpha 2$ (rosa claro). $\alpha 1$ (verde), $\alpha 2$ (vermelho) e Ferredoxina (ciano). As distâncias entre os centros Rieske da Ferredoxina e da subunidade $\alpha 2$ bem como o Mn mononuclear estão evidenciadas.

Os resíduos A35-Y40; T397-D404; D433-H437 da subunidade $\alpha 1$ (em alaranjado) e R103-A109; V125-Q128 e L137-D157 da subunidade $\alpha 2$ (em rosa claro) presentes na superfície de contato das proteínas evidencia que a interação ocorre de fato entre as três proteínas envolvidas, corroborando para via de transferência de elétrons proposta considerando os centros Rieskes. As distâncias de cerca de 15 Å entre os centros Rieske da Ferredoxina e da subunidade $\alpha 2$ do terminal oxigenase, e de 12 Å entre este último e o Mn mononuclear da subunidade $\alpha 1$ do terminal oxigenase, favorecem a transferência de elétrons durante a catálise, em contraposição a aproximadamente 26 Å que separam o centro Rieske da Ferredoxina e o Mn mononuclear presente na $\alpha 1$ (Figura 39).

Além disso, através da comparação do modelo cristalográfico da subunidade alfa (Ac) com a estrutura da CARDO, foi possível visualizar que a porção N-terminal de Ac, consistindo na Ala-35, encontra-se na interface com a ferredoxina. Esse resultado preliminar é muito importante, pois a cauda de histidinas (conforme descrito no item 3.2.)

presente na proteína Ac possivelmente confere impedimento na interação da ferredoxina com o terminal oxigenase. Isso pode ter culminado na dificuldade em realizar os testes de atividade enzimática bem como dificultar ou mesmo impedir a co-cristalização das proteínas do complexo. Assim, estudos posteriores, com a remoção da cauda de histidinas da subunidade alfa bem como considerando os principais resíduos que estejam possivelmente envolvidos na interface com a Ferredoxina, podem auxiliar na elucidação de como ocorre a transferência de elétrons entre os centros ferro-enxofre presentes no complexo da dioxigenase.

4.15. Sítio de ligação ao substrato do terminal oxigenase de *Achromobacter xylooxidans* A8

Conjuntos de dados de difração foram coletados com os cristais de AcAd previamente imersos em soluções com diversos substratos e possíveis ligantes da proteína de acordo com trabalhos anteriores ((FERRARO; GAKHAR; RAMASWAMY, 2005; JOUANNEAU *et al.*, 2011), porém não foram observadas densidades eletrônicas correspondentes a esses compostos.

No entanto, dentre os inúmeros testes, conjuntos de dados coletados contendo o catecol evidenciaram a presença deste ligante na região do domínio catalítico, como pode ser visto na figura 40. Porém a posição ocupada pelo catecol no sítio ativo difere da descrita para os substratos aromáticos de outras dioxigenases, bem como os resíduos que interagem com o ligante (FERRARO; GAKHAR; RAMASWAMY, 2005).

Assim, de acordo com análises preliminares, foi possível observar que o catecol localiza-se no sítio ativo da subunidade alfa (Ac) de modo similar a posição ocupada pelo 1,2-dihidroxi-naftaleno-1,2-diol, presente na estrutura da naftaleno dioxigenase (Código PDB 1O7P) (figura 40B). De modo análogo ao observado para produto da reação do naftaleno, o catecol interage com o manganês mononuclear e com os resíduos Asn-226,

His-237 e Asp-379. E ainda, na ilustração em superfície (figura 40C), é possível visualizar o catecol localizado na cavidade de Ac que dá acesso ao Mn no sítio catalítico.

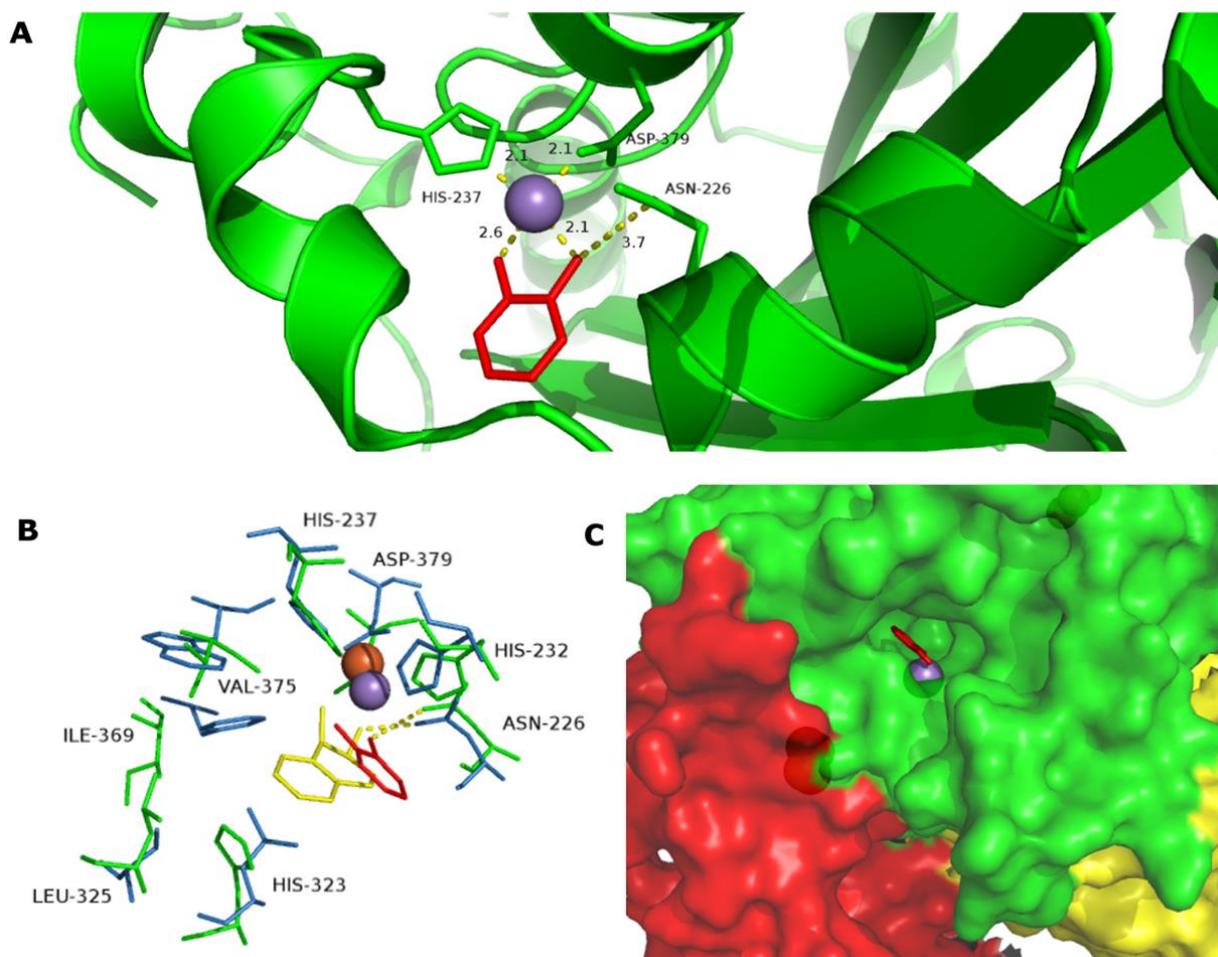


Figura 40: Sítio ativo da estrutura da subunidade alfa do terminal oxigenase de *Achromobacter xylosoxidans* A8 mostrando a ligação do catecol.

A- visualização do catecol no sítio ativo de Ac próximo ao Mn e aos resíduos N226, H237 e D379, com as distâncias das interações em Å. B – Sobreposição dos resíduos do sítio ativo de Ac contendo o catecol e da naftaleno dioxigenase complexada com o produto 1,2-dihidroxi-naftaleno-1,2-diol (PDB 1O7G). Em destaque em linhas tracejadas em amarelo, as interações entre os ligantes e a N226 de Ac (N201 para 1O7G). C – Representação em superfície das subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$ e $\alpha 2$ com destaque para a cavidade em $\alpha 1$, evidenciando a localização do catecol. Ac: subunidades $\alpha 1$ (verde), $\beta 1$ (amarelo) e $\alpha 2$ (vermelho); Catecol (vermelho), 1,2-dihidroxi-naftaleno-1,2-diol (amarelo), resíduos da naftaleno dioxigenase 1O7G (azul); Mn (roxo) e ferro (laranja).

Conforme abordado anteriormente, em geral, o benzeno e compostos aromáticos relacionados são caracterizados pela alta estabilidade termodinâmica, e a primeira etapa da oxidação desses compostos é a hidroxilação catalizada por uma dioxigenase. O

produto, um diol, é então convertido a catecol por uma dihidrogenase. Essas reações iniciais, hidroxilação e dihidrogenação são comuns em vias de degradação de outros hidrocarbonetos aromáticos. De acordo com os estudos sobre a degradação aeróbica por microrganismos (FRITSCHÉ; HOFRICHTER, 2000), apesar da grande diversidade dos compostos aromáticos bem como os HAPs, as vias de degradação desses compostos culminam nos intermediários centrais, catecol e protocatecoato. No entanto, a relação entre a grande diversidade das vias de degradação e os intermediários centrais ainda está em discussão. Na figura 41 estão representados alguns compostos que apresentam vias de degradação que convergem nesses intermediários centrais.

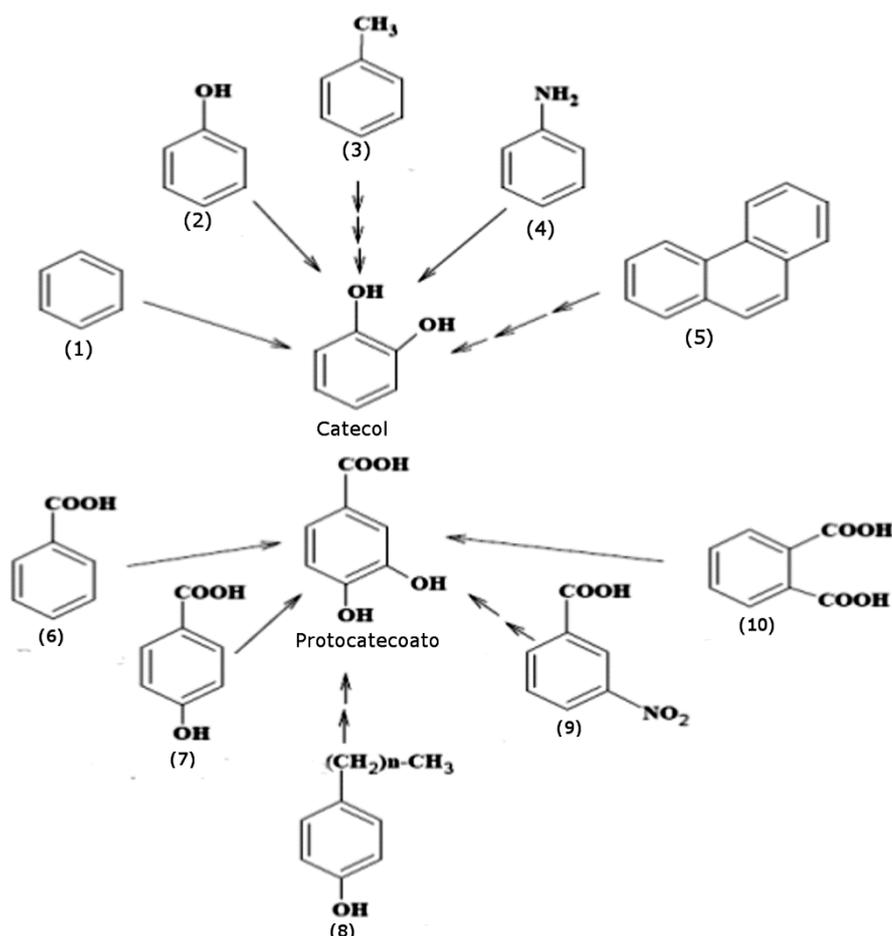


Figura 41: Degradação de um amplo espectro de compostos aromáticos que resulta nos intermediários centrais catecol e protocatecoato.

(1) Benzeno; (2) Fenol; (3) Tolueno; (4) Anilina; (5) Fenantreno; (6) Benzoato; (7) *p*-Hidroxibenzoato; (8) Alquilfenol; (9) *m*-Nitrobenzoato; (10) Fitalato.

Considerando estes resultados prévios com a presença do catecol no sítio ativo da subunidade alfa (Ac), faz-se necessário um estudo comparativo com outros ligantes, como substratos e produtos, bem como a substituição de resíduos. Com isso, será possível uma discussão mais detalhada acerca da promiscuidade do complexo dioxigenase frente a diversos compostos aromáticos, e assim, elucidar determinantes estruturais que estejam envolvidos na seletividade da enzima.

6. CONCLUSÕES

- As proteínas do complexo dioxigenase de *Achromobacter xylooxidans* A8 denominadas Aa, Ab, Ac e Ad foram selecionadas através de bancos de dados considerando as proteínas da naftaleno dioxigenase de *P. putida* G7 e apresentam respectivamente 59%, 58%, 27% e 86% de similaridade de sequência com as proteínas NahAa, NahAb, NahAc e NahAd utilizadas como modelo.
- As sequências gênicas das proteínas foram otimizadas para favorecer a expressão heteróloga em *E. coli* e a clonagem das proteínas realizada nos vetores de expressão pACYCDuet-1 e pETDuet-1, permitiu a co-expressão das quatro proteínas em um único sistema de expressão.
- As proteínas redutase, ferredoxina, subunidade alfa e beta do terminal oxigenase foram purificadas por cromatografias de afinidade ao níquel e de exclusão molecular, sendo que Aa, Ac e Ad apresentaram grau de pureza e quantidade suficientes para a realização dos testes de cristalização.
- As análises por espectrometria de massa permitiram a identificação das proteínas Aa, Ac e Ad, como redutase, subunidade alfa e beta do terminal oxigenase como proteínas pertencentes a *Achromobacter xylooxidans* A8, contudo a amostra contendo possivelmente a proteína Ab foi identificada como lisozima, presente no tampão de lise celular.

- A avaliação do estado oligomérico dos componentes Aa e AcAd pode ser definida pelo DLS, no qual as proteínas encontraram-se em solução como monodispersas sendo Aa possivelmente adota a forma dimérica e AcAd apresentam-se em solução na forma hexamérica.
- A alteração do meio de cultivo com a suplementação com o ferro, permitiu a co-expressão e purificação das quatro proteínas do complexo, Aa, Ab, Ac e Ad. A quantidade obtida para Ab permitiu a realização dos ensaios enzimáticos, porém até o momento concentração não foi suficiente para a realização dos testes de cristalização.
- A atividade enzimática do complexo dioxigenase foi medida pela oxidação de NADH, porém não foi possível determinar o consumo de substrato com os compostos avaliados.
- O componente AcAd, o terminal oxigenase do complexo dioxigenase foi cristalizado em algumas condições pela técnica da gota suspensa. A estrutura contendo as proteínas AcAd foi resolvida com resolução de 1,35 Å pela técnica de SAD *phasing*.
- A estrutura tridimensional do terminal oxigenase (AcAd), na unidade assimétrica apresentou-se como heterodímero $\alpha\beta$, composto pela subunidade α que contém os domínios Rieske [2Fe-2S] e catalítico com o Mn localizado no sítio ativo; e pela subunidade β , que apresenta função ainda desconhecida.
- A subunidade α (Ac) apresenta enovelamento α/β característico das Rieske dioxigenases, e os resíduos C104, H106, C124, H127, N226, H232, H237 e D379 são conservados em todas as dioxigenases.

- Os resíduos L325, H323, V375 e I369 parecem ser importantes para a catálise, uma vez que não são conservados e apresentam-se na região da entrada do sítio catalítico.
- O catecol foi localizado na região do sítio ativo de Ac, interagindo com o N226 e o Mn, de modo análogo ao observado para o produto reacional 1,2-dihidroxi-naftaleno-1,2-diol, presente na estrutura da naftaleno dioxigenase (Código PDB 1O7P).

7. REFERÊNCIAS

- ADAMS, P. D. *et al.* PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, v. 66, n. 2, p. 213–221, 2010.
- ARTIMO, P. *et al.* ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic acids research*, p. gks400, 2012.
- ASHIKAWA, Y. *et al.* Electron transfer complex formation between oxygenase and ferredoxin components in Rieske nonheme iron oxygenase system. *Structure*, v. 14, n. 12, p. 1779–1789, 2006.
- ASHIKAWA, Y. *et al.* Structural insight into the substrate-and dioxygen-binding manner in the catalytic cycle of Rieske nonheme iron oxygenase system, carbazole 1, 9a-dioxygenase. *BMC structural biology*, v. 12, n. 1, p. 15, 2012.
- BALACHANDRAN, C. *et al.* Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in *Streptomyces* sp.(ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil. *Bioresource technology*, v. 112, p. 83–90, 2012.
- BAMFORTH, S. M.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 80, n. 7, p. 723–736, 2005.
- BATIE, C. J. Phthalate dioxygenase reductase and related flavin-iron-sulfur-containing electron transferase. *Chemistry and biochemistry of flavoenzymes*, p. 543–566, 1992.
- CAO, B.; NAGARAJAN, K.; LOH, K.-C. Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 85, n. 2, p. 207–228, 2009.
- CARNEIRO, F. R. *et al.* Spectroscopic characterization of the tumor antigen NY-REN-21 and identification of heterodimer formation with SCAND1. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 343, n. 1, p. 260–268, 2006.
- CARREDANO, E. *et al.* Substrate binding site of naphthalene 1, 2-dioxygenase: functional implications of indole binding. *Journal of molecular biology*, v. 296, n. 2, p. 701–712, 2000.
- CERNIGLIA, C. E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, v. 3, n. 2–3, p. 351–368, 1992.
- COITINHO, J. B. *et al.* Expression, purification and preliminary crystallographic studies of NahF, a salicylaldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida* G7 involved in naphthalene degradation. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and*

Crystallization Communications, PMID: 22232182 PMCID: PMC3253845, v. 68, n. Pt 1, p. 93–97, 1 jan. 2012.

CORNISH-BOWDEN, A.; CORNISH-BOWDEN, A. Fundamentals of enzyme kinetics. 2012.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic acids research*, v. 16, n. 22, p. 10881–10890, 1988.

CORRELL, C. C. *et al.* Phthalate dioxygenase reductase: a modular structure for electron transfer from pyridine nucleotides to [2Fe-2S]. *Science*, v. 258, n. 5088, p. 1604–1610, 1992.

COSTA, M. A. F. *Caracterização estrutural da Proteína Sm21.7 recombinante de Schistosoma mansoni*. 2014. Tese – Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.

COUTURE, M. M.-J. *et al.* Characterization of BphF, a Rieske-type ferredoxin with a low reduction potential. *Biochemistry*, v. 40, n. 1, p. 84–92, 2001.

DIAZ, A. A. *et al.* Prediction of protein solubility in Escherichia coli using logistic regression. *Biotechnology and bioengineering*, v. 105, n. 2, p. 374–383, 2010.

DONG, X. *et al.* Crystal structure of the terminal oxygenase component of cumene dioxygenase from Pseudomonas fluorescens IP01. *Journal of bacteriology*, v. 187, n. 7, p. 2483–2490, 2005.

DUNN, N.; GUNSALUS, I. Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in Pseudomonas putida. *Journal of bacteriology*, v. 114, n. 3, p. 974–979, 1973.

EBY, D. M. *et al.* Characterization and evolution of anthranilate 1, 2-dioxygenase from Acinetobacter sp. strain ADP1. *Journal of bacteriology*, v. 183, n. 1, p. 109–118, 2001.

ENSLEY, B.; GIBSON, D. Naphthalene dioxygenase: purification and properties of a terminal oxygenase component. *Journal of bacteriology*, v. 155, n. 2, p. 505–511, 1983.

FERNÁNDEZ, M. *et al.* Enhanced tolerance to naphthalene and enhanced rhizoremediation performance for Pseudomonas putida KT2440 via the NAH7 catabolic plasmid. *Applied and environmental microbiology*, v. 78, n. 15, p. 5104–5110, 2012.

FERRARO, D. J. *et al.* Structural basis for regioselectivity and stereoselectivity of product formation by naphthalene 1, 2-dioxygenase. *Journal of bacteriology*, v. 188, n. 19, p. 6986–6994, 2006.

FERRARO, D. J. *et al.* Structural investigations of the ferredoxin and terminal oxygenase components of the biphenyl 2, 3-dioxygenase from Sphingobium yanoikuyae B1. *BMC structural biology*, v. 7, n. 1, p. 10, 2007.

FERRARO, D. J.; GAKHAR, L.; RAMASWAMY, S. Rieske business: structure–function of Rieske non-heme oxygenases. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 338, n. 1, p. 175–190, 2005.

FRIEMANN, R. *et al.* Structural insight into the dioxygenation of nitroarene compounds: the crystal structure of nitrobenzene dioxygenase. *Journal of molecular biology*, v. 348, n. 5, p. 1139–1151, 2005.

FRITSCH, W.; HOFRIECHTER, M. Aerobic degradation by microorganisms. *Biotechnology*, v. 11, p. 146–164, 2000.

FURUSAWA, Y. *et al.* Crystal structure of the terminal oxygenase component of biphenyl dioxygenase derived from Rhodococcus sp. strain RHA1. *Journal of molecular biology*, v. 342, n. 3, p. 1041–1052, 2004.

GAKHAR, L. *et al.* Structure and increased thermostability of Rhodococcus sp. naphthalene 1, 2-dioxygenase. *Journal of bacteriology*, v. 187, n. 21, p. 7222–7231, 2005.

GASTEIGER, E. *et al.* Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *The proteomics protocols handbook*. [S.l.]: Springer, 2005. p. 571–607.

GAY, C.; COLLINS, J.; GEBICKI, J. M. Hydroperoxide assay with the ferric–xylenol orange complex. *Analytical biochemistry*, v. 273, n. 2, p. 149–155, 1999.

GIBELLO, A. *et al.* 3, 4-Dihydroxyphenylacetate 2, 3-dioxygenase from *Klebsiella pneumoniae*, a Mg²⁺-containing dioxygenase involved in aromatic catabolism. *Biochemical Journal*, v. 301, n. 1, p. 145–150, 1994.

GIBSON, D. T.; KOCH, J. R.; KALLIO, R. E. Oxidative degradation of aromatic hydrocarbons by microorganisms. I. Enzymic formation of catechol from benzene. *Biochemistry*, v. 7, n. 7, p. 2653–2662, 1968.

GUIMARAES, B. G. *et al.* The MX2 macromolecular crystallography beamline: a wiggler X-ray source at the LCLS. *Journal of synchrotron radiation*, v. 16, n. 1, p. 69–75, 2009.

GUSTAFSSON, C.; GOVINDARAJAN, S.; MINSHULL, J. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in biotechnology*, v. 22, n. 7, p. 346–353, 2004.

HABE, H.; OMORI, T. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, v. 67, n. 2, p. 225–243, 2003.

HARAYAMA, S.; KOK, M.; NEIDLE, E. L. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annual Reviews in Microbiology*, v. 46, n. 1, p. 565–601, 1992.

HARITASH, A.; KAUSHIK, C. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of hazardous materials*, v. 169, n. 1, p. 1–15, 2009.

HOLM, L.; LAAKSO, L. M. Dali server update. *Nucleic acids research*, v. 44, n. W1, p. W351–W355, 2016.

HURTUBISE, Y. *et al.* Purification and characterization of the *Comamonas testosteroni* B-356 biphenyl dioxygenase components. *Journal of bacteriology*, v. 177, n. 22, p. 6610–6618, 1995.

JAGANAMAN, S. *et al.* High levels of expression of the iron–sulfur proteins phthalate dioxygenase and phthalate dioxygenase reductase in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*, v. 52, n. 2, p. 273–279, 2007.

JAKONCIC, J. *et al.* The catalytic pocket of the ring-hydroxylating dioxygenase from *Sphingomonas* CHY-1. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 352, n. 4, p. 861–866, 2007.

JENCOVA, V. *et al.* Nucleotide sequence, organization and characterization of the (halo) aromatic acid catabolic plasmid pA81 from *Achromobacter xylosoxidans* A8. *Research in microbiology*, v. 159, n. 2, p. 118–127, 2008.

JOUANNEAU, Y. *et al.* Characterization of a naphthalene dioxygenase endowed with an exceptionally broad substrate specificity toward polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biochemistry*, v. 45, n. 40, p. 12380–12391, 2006.

JOUANNEAU, Y. *et al.* Ringhydroxylating dioxygenases involved in PAH biodegradation: structure, function and biodiversity. *Microbial bioremediation of non metals: current research*. Caister Academic Press, Norfolk, UK, p. 149–175, 2011.

KANG, E. *et al.* Genetic Structure of the *bphG* Gene Encoding 2-Hydroxymuconic Semialdehyde Dehydrogenase of *Achromobacter xylosoxidans* KF701. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 246, n. 1, p. 20–25, 1998.

KARLSSON, A. *et al.* Crystal Structure of Naphthalene Dioxygenase: Side-on Binding of Dioxygen to Iron. *Science*, v. 299, n. 5609, p. 1039, 14 fev. 2003.

KARLSSON, A. *et al.* NO binding to naphthalene dioxygenase. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, v. 10, n. 5, p. 483–489, 2005.

KARLSSON, A. *et al.* X-ray crystal structure of benzoate 1, 2-dioxygenase reductase from *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *Journal of molecular biology*, v. 318, n. 2, p. 261–272, 2002.

KAUPPI, B. *et al.* Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase–naphthalene 1, 2-dioxygenase. *Structure*, v. 6, n. 5, p. 571–586, 1998.

KEITH, L.; TELLIARD, W. ES&T special report: priority pollutants: Ia perspective view. *Environmental Science & Technology*, v. 13, n. 4, p. 416–423, 1979.

KELLER, A. *et al.* Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Analytical chemistry*, v. 74, n. 20, p. 5383–5392, 2002.

KIM, S.-J. *et al.* Molecular cloning and expression of genes encoding a novel dioxygenase involved in low- and high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Applied and environmental microbiology*, v. 72, n. 2, p. 1045–1054, 2006.

KWEON, O. *et al.* A new classification system for bacterial Rieske non-heme iron aromatic ring-hydroxylating oxygenases. *BMC biochemistry*, v. 9, n. 1, p. 1, 2008.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, v. 227, p. 680–685, 1970.

LEE, K. *et al.* Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the three components of the toluene 2, 3-dioxygenase enzyme system. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, v. 61, n. 7, p. 669–672, 2005.

LIN, C.; GAN, L.; CHEN, Z.-L. Biodegradation of naphthalene by strain *Bacillus fusiformis* (BFN). *Journal of hazardous materials*, v. 182, n. 1, p. 771–777, 2010.

LUNDQVIST, T. *et al.* Crystal structure of scytalone dehydratase—a disease determinant of the rice pathogen, *Magnaporthe grisea*. *Structure*, v. 2, n. 10, p. 937–944, 1994.

MA, Y.-L. *et al.* Elucidation of Fluoranthene Degradative Characteristics in a Newly Isolated *Achromobacter xylosoxidans* DN002. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 175, n. 3, p. 1294–1305, 2015.

MARTINS, B. M.; SVETLITCHNAIA, T.; DOBBEK, H. 2-Oxoquinoline 8-monooxygenase oxygenase component: active site modulation by Rieske-[2Fe-2S] center oxidation/reduction. *Structure*, v. 13, n. 5, p. 817–824, 2005.

MURZIN, A. G. *et al.* SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *Journal of molecular biology*, v. 247, n. 4, p. 536–540, 1995.

NAM, J.-W. *et al.* Crystal structure of the ferredoxin component of carbazole 1, 9a-dioxygenase of *Pseudomonas resinovorans* strain CA10, a novel Rieske non-heme iron oxygenase system. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 58, n. 4, p. 779–789, 2005.

NAM, J.-W. *et al.* New classification system for oxygenase components involved in ring-hydroxylating oxygenations. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, v. 65, n. 2, p. 254–263, 2001.

NESVIZHSHKII, A. I. *et al.* A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Analytical chemistry*, v. 75, n. 17, p. 4646–4658, 2003.

NOJIRI, H. *et al.* Structure of the terminal oxygenase component of angular dioxygenase, carbazole 1, 9a-dioxygenase. *Journal of molecular biology*, v. 351, n. 2, p. 355–370, 2005.

PARALES, R. E. The role of active-site residues in naphthalene dioxygenase. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 30, n. 5, p. 271–278, 2003.

PENG, R.-H. *et al.* Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 32, n. 6, p. 927–955, 2008.

PEROZICH, J.; NICHOLAS, H.; WANG, B.; *et al.* Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family. *Protein Science*, v. 8, n. 1, p. 137–146, 1999.

PEROZICH, J.; NICHOLAS, H.; LINDAHL, R.; *et al.* The big book of aldehyde dehydrogenase sequences. *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism* 7. [S.l.]: Springer, 1999. p. 1–7.

PUIGBO, P. *et al.* OPTIMIZER: a web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. *Nucleic acids research*, v. 35, n. suppl 2, p. W126–W131, 2007.

RADAUER, C.; LACKNER, P.; BREITENEDER, H. The Bet v 1 fold: an ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands. *BMC evolutionary biology*, v. 8, n. 1, p. 286, 2008.

RHODES, G. Crystallography Made Crystal Clear: A Guide for Users of Macromolecular Models (Complementary Science). 2006.

RIESKE, J. S.; HANSEN, R. E.; ZAUGG, W. S. Studies on the Electron Transfer System LVIII. PROPERTIES OF A NEW OXIDATION-REDUCTION COMPONENT OF THE RESPIRATORY CHAIN AS STUDIED BY ELECTRON PARAMAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY. *Journal of Biological Chemistry*, v. 239, n. 9, p. 3017–3022, 1964.

ROBERT, X.; GOUET, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic acids research*, v. 42, n. W1, p. W320–W324, 2014.

SENDA, T. *et al.* Crystal structure of NADH-dependent ferredoxin reductase component in biphenyl dioxygenase1. *Journal of molecular biology*, v. 304, n. 3, p. 397–410, 2000.

SHEVCHENKO, A. *et al.* In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature protocols*, v. 1, n. 6, p. 2856, 2006.

SLABINSKI, L. *et al.* XtalPred: a web server for prediction of protein crystallizability. *Bioinformatics*, v. 23, n. 24, p. 3403–3405, 2007.

SOTA, M. *et al.* 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*, v. 188, n. 11, p. 4057–4067, 2006.

SPEAR, J. B.; FUHRER, J.; KIRBY, B. D. *Achromobacter xylosoxidans* (*Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans*) bacteremia associated with a well-water source: case report and review of the literature. *Journal of clinical microbiology*, v. 26, n. 3, p. 598–599, 1988.

STRNAD, H. *et al.* Complete genome sequence of the haloaromatic acid-degrading bacterium *Achromobacter xylosoxidans* A8. *Journal of bacteriology*, v. 193, n. 3, p. 791–792, 2011.

TOWBIN, M.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Western blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate--polyacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibodies and radio-iodinated protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 76, p. 43–50, 1979.

VILLALOBOS, A. *et al.* Gene Designer: a synthetic biology tool for constructing artificial DNA segments. *BMC bioinformatics*, v. 7, n. 1, p. 285, 2006.

WHITING, A. K. *et al.* Manganese (II)-dependent extradiol-cleaving catechol dioxygenase from *Arthrobacter globiformis* CM-2. *Biochemistry*, v. 35, n. 1, p. 160–170, 1996.

YEN, K.; GUNSALUS, I. Plasmid gene organization: naphthalene/salicylate oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 79, n. 3, p. 874–878, 1982.

YEN, K.; GUNSALUS, I. C. Regulation of naphthalene catabolic genes of plasmid NAH7. *Journal of bacteriology*, v. 162, n. 3, p. 1008–1013, 1985.

ANEXO: Figuras otimização gênica item 4.2.

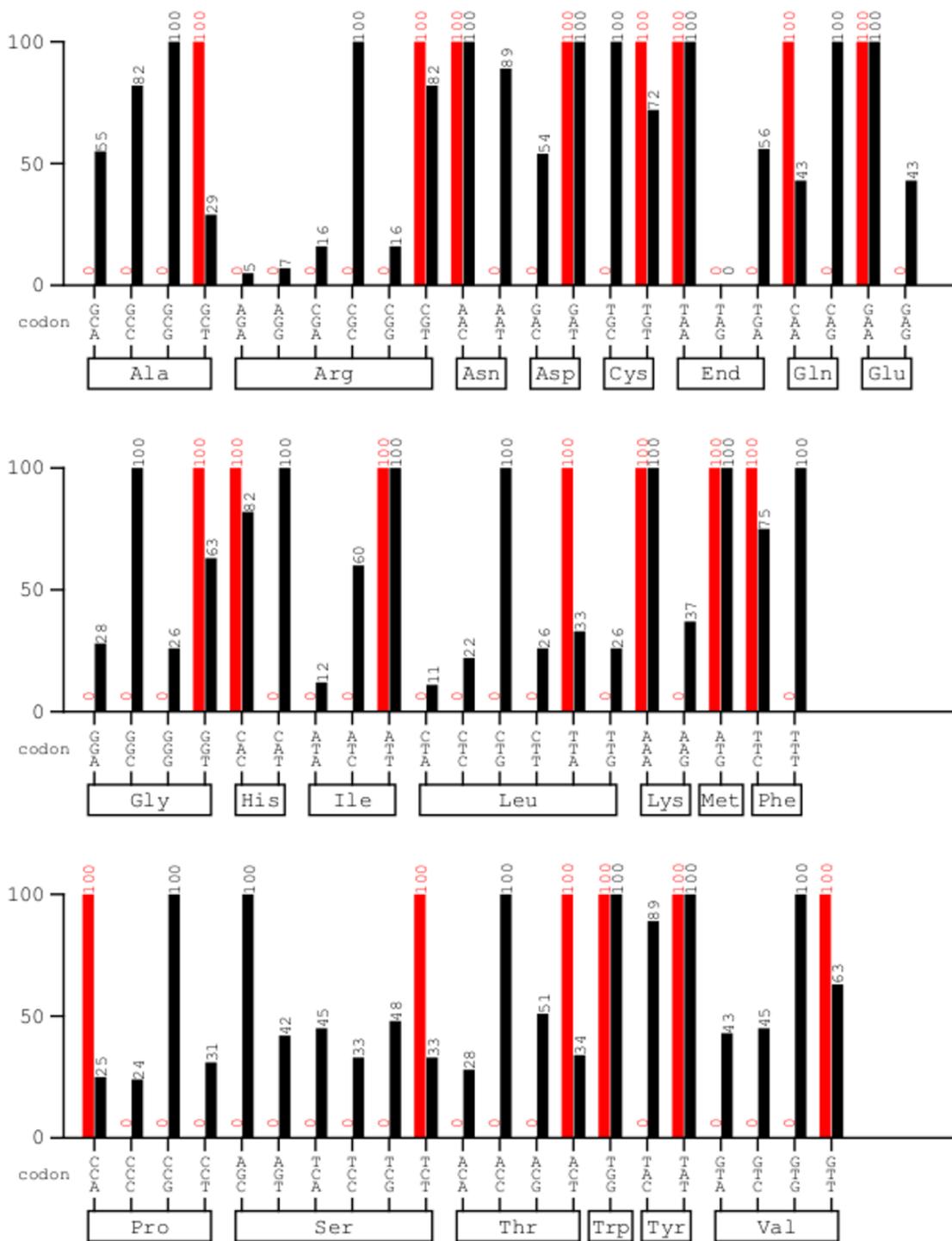


Figura 1: Comparação da frequência de uso de códon em *Escherichia coli* K12 e na sequência do gene de Ab (ferredoxina) otimizado.

Eixo x: representação das frequências de uso de códons utilizada pela *Escherichia coli* K12 (em preto) e na sequência de Ab otimizada (em vermelho). Eixo y: representação da adaptação relativa do uso de códons. Em comparação com a frequência de uso de códons de *E. coli* K12, a sequência otimizada apresentou uma diferença média de 44%. O gráfico foi gerado pelo servidor GCUA (<http://gcu.schoedl.de>).

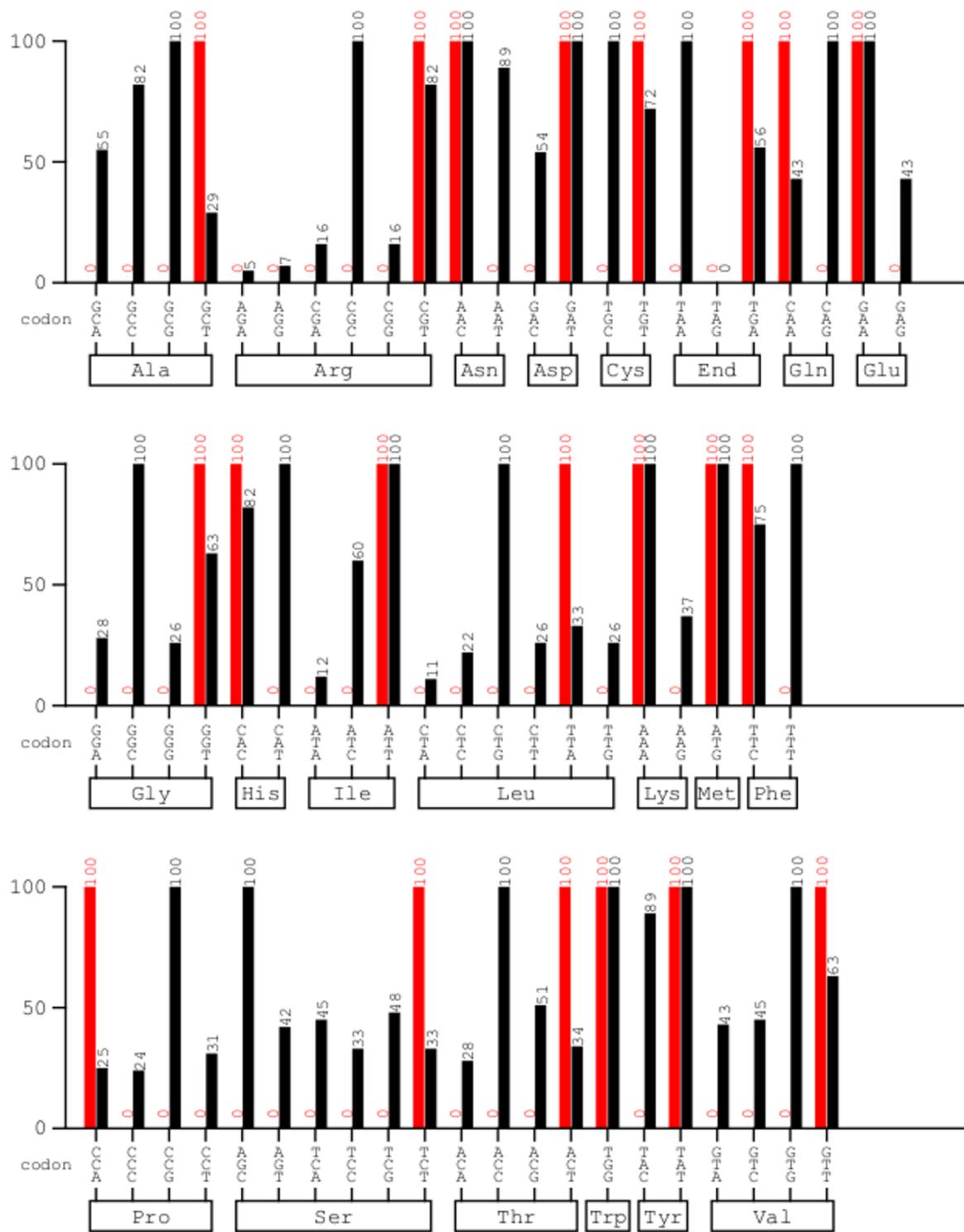


Figura 2: Comparação da frequência de uso de códons em *Escherichia coli* K12 e na sequência do gene de Ad (subunidade beta) otimizado.

Eixo x: representação das frequências de uso de códons utilizada pela *Escherichia coli* K12 (em preto) e na sequência de Ad otimizada (em vermelho). Eixo y: representação da adaptação relativa do uso de códons. Em comparação com a frequência de uso de códons de *E. coli* K12, a sequência otimizada apresentou uma diferença média de 45,38%. O gráfico foi gerado pelo servidor GCUA (<http://gcu.schoedl.de>).

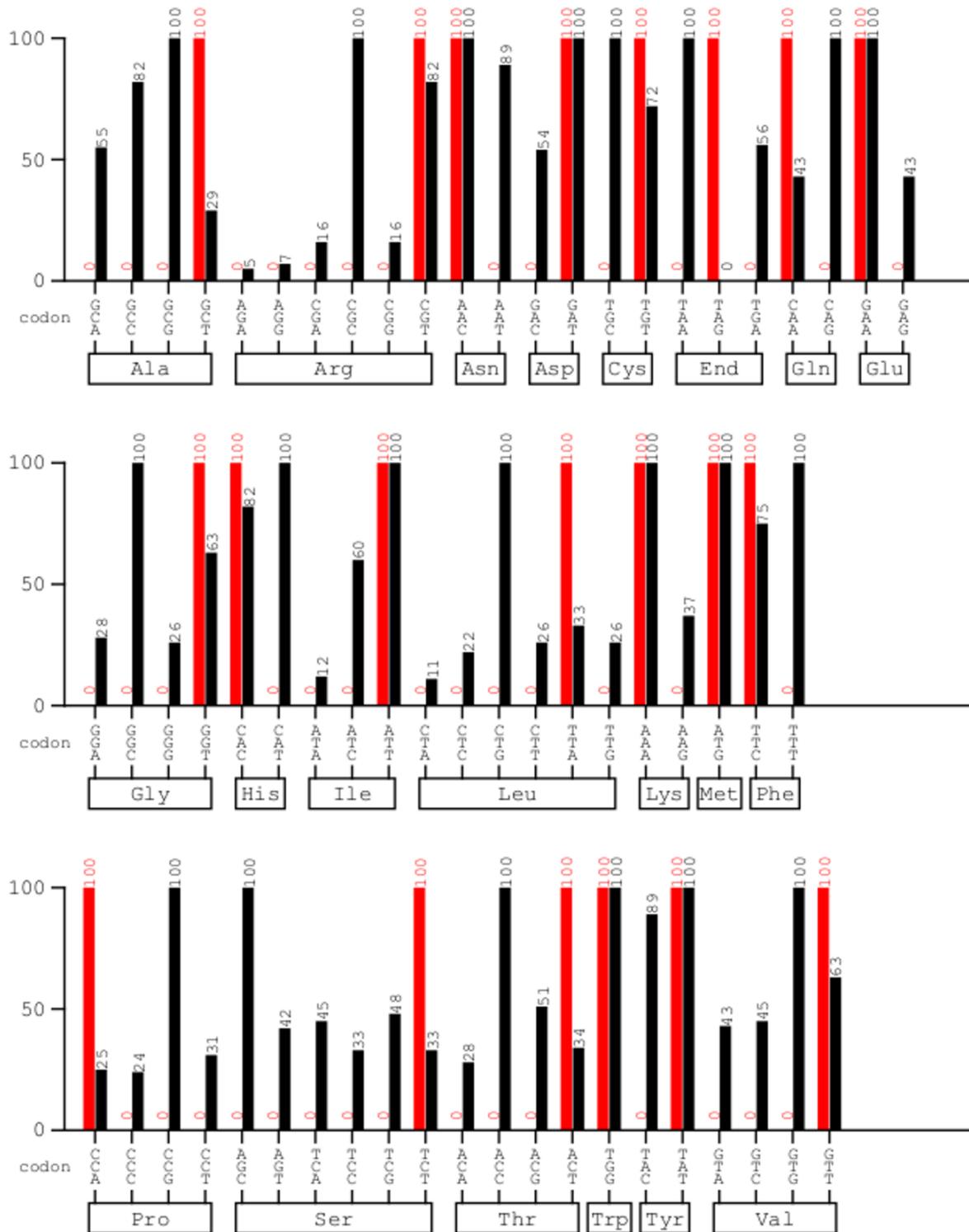


Figura 3: Comparação da frequência de uso de códons em *Escherichia coli* K12 e na sequência do gene de Ac (subunidade alfa) otimizado.

Eixo x: representação das frequências de uso de códons utilizada pela *Escherichia coli* K12 (em preto) e na sequência de Ac otimizada (em vermelho). Eixo y: representação da adaptação relativa do uso de códons. Em comparação com a frequência de uso de códons de *E. coli* K12, a sequência otimizada apresentou uma diferença média de 47,13%. O gráfico foi gerado pelo servidor GCUA (<http://gcu.schoedl.de>).

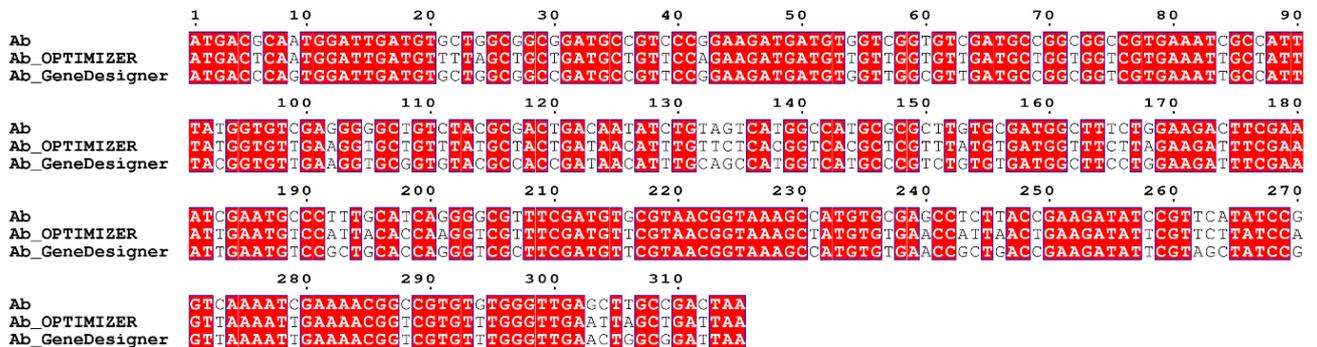


Figura 4: Otimização da sequência nucleotídica para o gene codificador das proteínas Ab (ferredoxina), de *Achromobacter xylosoxidans* A8.

Ab: sequência não otimizada; Ab_OPTIMIZER: sequência otimizada pelo OPTIMIZER; Ab_GeneDesigner: sequência otimizada pelo programa Gene Designer 2.0. A coloração vermelha é baseada na similaridade entre as sequências no alinhamento.



Figura 5: Otimização da sequência nucleotídica para o gene codificador da proteína Ad (subunidade beta) de *Achromobacter xylosoxidans* A8.

Ad: sequência não otimizada; Ad_OPTIMIZER: sequência otimizada pelo OPTIMIZER; Ad_GeneDesigner: sequência otimizada pelo programa Gene Designer 2.0. A coloração vermelha é baseada na similaridade entre as sequências no alinhamento.

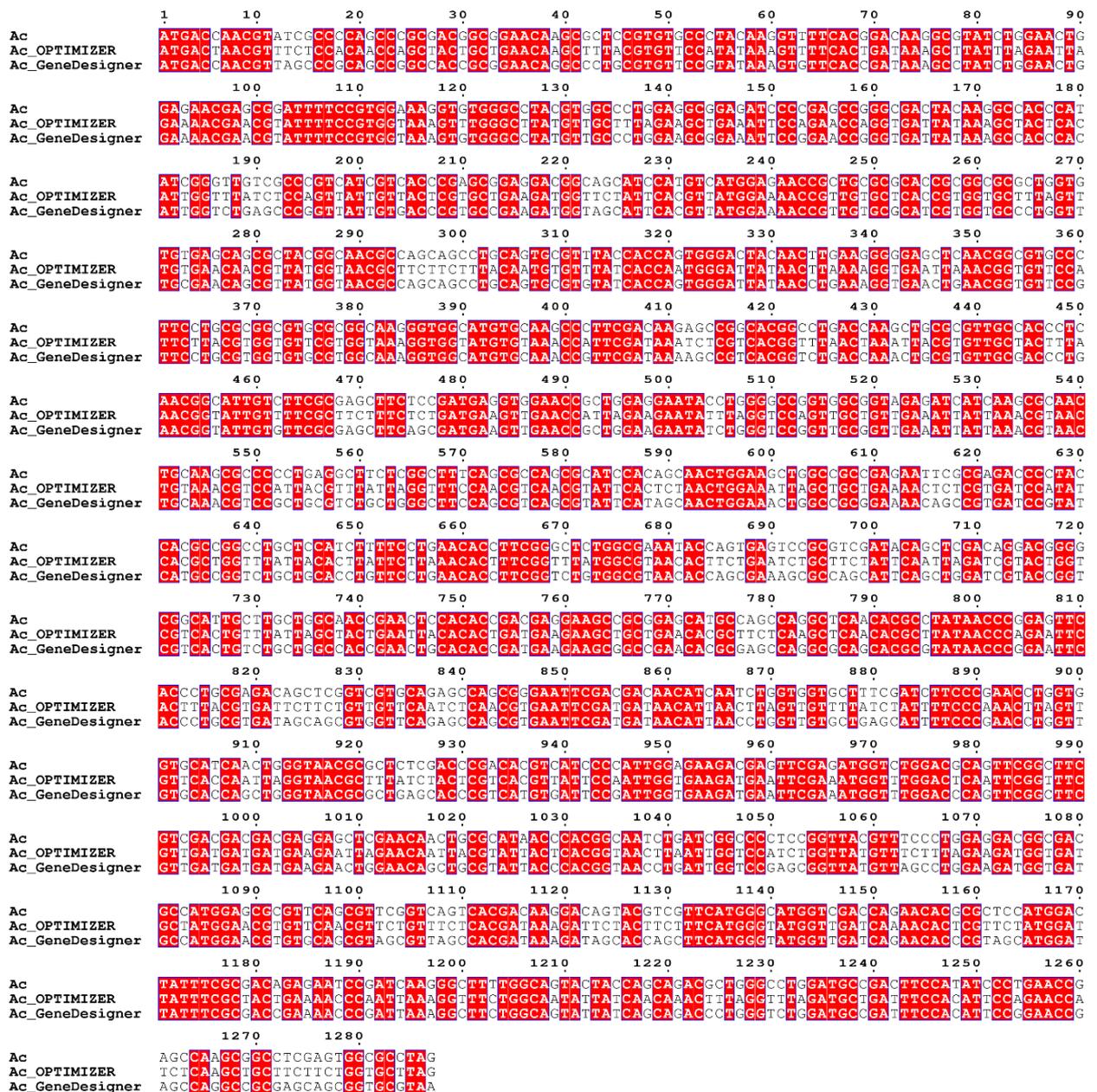


Figura 6: Otimização da sequência nucleotídica para o gene codificador da proteína Ac (subunidade alfa) de *Achromobacter xylosoxidans* A8.

Ac: sequência não otimizada; Ac_OPTIMIZER: sequência otimizada pelo OPTIMIZER; Ac_GeneDesigner: sequência otimizada pelo programa Gene Designer 2.0. A coloração vermelha é baseada na similaridade entre as sequências no alinhamento.

APÊNDICE A: MANUSCRITO EM REDAÇÃO - Requisito obrigatório para a defesa de tese

Expression and structure-function studies of a novel ring-hydroxylating dioxygenase from *Achromobacter xylooxidans* A8

Lorena G. A. de Andrade¹; Guowu Lin²; Weiss Simon²; Guillermo Calero²; Ronaldo A. P. Nagem^{1*}

¹Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

²Department of Structural Biology, University of Pittsburgh School of Medicine, 3501 Fifth Avenue, Pittsburgh, PA 15260, USA.

*Corresponding author. Mailing address: ¹Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos 6627, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil. E-mail: nagem@icb.ufmg.br

Abstract

Ring-hydroxylating dioxygenases (RHDs) are bacterial enzymes that usually acts in the first reaction in the biodegradation of a large range of aromatic compounds, including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), organic compounds formed by fused benzene rings. Herein, the components of the dioxygenase complex from *Achromobacter xylooxidans* A8 was co-expressed and purified. The oxygenase component (P1) of the complex was crystallized. Although the alfa subunit of P1 protein exhibits limited sequence similarity (27%), with other well characterized dioxygenases, the crystal structure solved to 1.35 Å showed the enzyme P1 share the same global $\alpha_3\beta_3$ structural pattern. The structure of P1 shows similarity compared to others oxygenase structures

that have been previously determined and important differences that could play a role in substrate specificity. The catalytic domain distinguishes itself from other RHDs by the presence of the mononuclear manganese atom, ever reported for this type of enzyme. The manganese atom is coordinated by a conserved two His residues and is located close to the [2Fe-2S] Rieske cluster of the adjacent α subunit.

Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a class of hydrophobic organic compounds widespread in the environment. Due to their low solubility in water and high chemical stability they persist in the environment for long periods. In this way, microbial degradation to reduce the concentration and toxicity of these pollutants is exploited as a potential strategy of bioremediation process (BAMFORTH; SINGLETON, 2005; FERNÁNDEZ *et al.*, 2012).

Degradation of PAHs by microorganisms occurs through various metabolic pathways containing several enzyme catalyzed reactions. The initial oxidation step in the biodegradation of PAHs by bacteria is catalyzed by specific metalloenzymes named as ring-hydroxylating dioxygenases (RHDs), also called Rieske non-heme iron oxygenases (EC 1.14.12.). RHDs are multicomponent enzymes, most often consisting of an oxygenase component that contains the active site, associated with one or two subunits that are electron carriers. They utilize NAD(P)H to transfer electrons to the active site to promote the hydroxylation of two adjacent carbon atoms of the aromatic ring to give a *cis*-dihydrodiol compound (KARLSSON *et al.*, 2003; PARALES, 2003).

The RHDs share common structural features, however, they differ considerably in terms of amino acid sequence and with respect to the structure of the associated electron carriers. In most cases, the oxygenase component consisting of two subunits, an alpha

subunit of about 50 kDa and a beta subunit of around 20 kDa, which assemble in a $\alpha_3\beta_3$ heterohexamer. Each alpha subunit consists of two domains, the N-terminal Rieske domain, which contains a [2Fe–2S] cluster, and the C-terminal catalytic domain, which contains a mononuclear ferrous ion close to the substrate-binding site, where the dioxygenation reaction takes place (JOUANNEAU *et al.*, 2011).

Different microorganisms have already been isolated, identified and characterized as capable of biodegrading several PAHs through various metabolic pathways (BAMFORTH; SINGLETON, 2005; CERNIGLIA, 1992; PENG *et al.*, 2008). Some, on the other hand, have never been isolated, tested or identified as a PAH degrading organism. *Achromobacter xylosoxidans* strain A8 was isolated from soil contaminated with polychlorinated biphenyls and chlorobenzoates (CBs) and is able to use 2- and 2,5-(di)chlorobenzoic acid (2-CB; 2,5-DCB) as sole carbon and energy source (JENCOVA *et al.*, 2004; PAVLŮ *et al.*, 1999). *A. xylosoxidans* A8 harbors the plasmid pA81 (98.2 kbp; accession number in EMBL: AJ515144) which have, among other features, a dioxygenase gene for chlorobenzoate degradation and *hyb* operon for salicylate 5-hydroxylate degradation. Furthermore, about 70 dioxygenase genes were found, some of which may be associated with bioremediation ability of this bacterial strain (JENCOVA *et al.*, 2008; STRNAD *et al.*, 2011).

The chlorobenzoate degradation is initiated by a dioxygenase complex, that transforms *o*-CB and polychlorinated CB into cathecol and chorocatechols, respectively (HICKEY *et al.*, 2001). In *A. xylosoxidans* A8, the oxygenase component consists of a large subunit iron sulfur protein (ISP α) and a small subunit iron sulfur protein (ISP β) that are encoded by *ohbA* and *ohbB*, respectively. However, in the plasmid pA81, the genes encoding the ferredoxin reductase and ferredoxin components, which are required for the electron transfer and enzyme activity, are not clustered with the oxygenase one. So,

according to Jencova (2008), *hybD* and *hybA*, encoding ferredoxin reductase and a ferredoxin component, respectively, of salicylate 5-hydroxylase, could fill this role, since they are located close from *ohbAB*.

In this work we expressed and purified the four proteins above-stated of the dioxygenase complex from recombinant *E. coli* strains expressing the genes from *A. xylosoxidans* A8. Herein we report the first structure of the oxygenase component, encoded by *ohbAB* genes and the X-ray crystal structure revealed a mushroom-shaped $\alpha_3\beta_3$ hexamer with a three-fold rotational symmetry.

Materials and methods

Expression of recombinant proteins and preparation of cell-free extracts

The dioxygenase complex genes from *Achromobacter xylosoxidans* A8, named as Aa, Ab, Ac and Ad, were optimized for heterologous expression in *Escherichia coli*, through the use of different software such as OPTIMIZER (available: <http://genomes.urv.es/OPTIMIZER>), Graphical Codon Usage Analyser (available: <http://gcu.schoedl.de>) and Gene Designer 2.0. (<http://www.dna20.com/genedesigner>) (PUIGBÒ *et al.*, 2007; VILLALOBOS *et al.*, 2006), besides manual inspection/intervention.

The synthetic genes were purchased from GenScript and cloned into *E. coli* expressing vectors pACYCDuet[®] and pETDuet[®], which allowed the expression of the entire dioxygenase complex or individual subunits. The reductase (Aa) and ferredoxin (Ab) genes were cloned into pACYCDuet[®] and the alpha (Ac) and beta (Ad) oxygenase subunits were inserted into pETDuet[®]. In the sites for restriction enzymes BamHI and HindIII were inserted the reductase and alpha subunits constructions, while ferredoxin and beta subunits were inserted in NdeI and XhoI sites. Furthermore, except of the beta

subunit gene, for the construction of the expression vectors all the inserts contained a 6xHis tag followed by a tobacco etch virus (TEV) protease-cleavage site at N-terminus of the target protein (MGHHHHHHENLYFQGH–target protein). (CARNEIRO *et al.*, 2006).

Electrocompetent *E. coli* BL21 Arctic Express (DE3) cells (Agilent Technologies) were transformed by electroporation using a MicroPulser Electroporation Apparatus (Bio-Rad Laboratories) with the recombinant plasmids pACYCDuet-AB and pETDuet-CD. Co-Transformed cells, containing ABCD-pACYCDuet-pETDuet, were inoculated in LB broth supplemented with 34 µg/ml chloramphenicol, 100 µg/ml ampicillin and 20 µg/ml gentamicin. Overnight cultures were grown at 37°C and transferred to 1L of LB broth for 3 h at 28°C, at which time isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to the medium (0.5 mM final concentration) and the culture were incubated at 12°C for 48 h. Then the cells were harvested by centrifugation (10,000 g for 40 min at 4°C and cell pellets were resuspended in lysis buffer [50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% (v/v) Tween 20, 1 % (v/v) glycerol and 1% (w/v) sucrose].

Cell extract was prepared by allowing three cycles frozen cell suspensions to thaw on ice followed by three cycles of 30s on/off sonication in an ice-water bath at 30% amplitude. Subsequently, cell debris and membranes were removed by centrifugation at 10,000 g for 30 min at 4°C. The resulting cell extract was used immediately for enzyme purification.

Purification of recombinant proteins

The purification procedures were performed using an ÄKTApure chromatography system (GE Healthcare Life Sciences). The cell extract added by imidazole (10 mM final concentration) was immediately applied to a 5 mL HisTrap HP (Ni²⁺) column (GE Healthcare Biosciences), pre-equilibrated with five column volumes of binding buffer

(20 mM sodium phosphate, pH 7.4, 0.5 M NaCl, 10 mM imidazole). Unbound proteins were eluted with two column volumes of binding buffer at a flow rate of 1.0 mL/min. Subsequently, a linear gradient solution with elution buffer (20 mM sodium phosphate, pH 7.4, containing 0.5 M NaCl, 0.5 M imidazole), at a flow rate of 5.0 mL/min was used to elute the bound proteins.

The eluted fractions containing the recombinant proteins of the dioxygenase complex from the affinity chromatography were pooled and further loaded onto a Superdex S200 prep grad (Hiload 16/60) column (GE Healthcare), previously equilibrated with the elution buffer (20 mM sodium phosphate, pH 7.4, 50 mM NaCl) and the main peak fractions containing purified proteins were pooled. The protein solutions were submitted in a buffer exchange with a Vivaspin 20, MWCO 5 kDa using 56 mM HEPES buffer pH 7.4. After this, the proteins were concentrated and immediately used for crystallization trials.

Protein crystallization

The dioxygenase complex was crystallized in a solution containing 20 mM Tris-HCl, pH 7.8, 200 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.02% azide and 2 mM DTT, 3% Glycerol, 0.1X TEZ (40 mM Tris, 1 mM EDTA, 10 mM ZnCl₂) buffer and incubated at 4°C for 30 min before crystallization. Crystals were grown at 16°C with the hanging drop vapor diffusion method by mixture of 0.3 µL protein (10 mg/ml) with 0.4 µL crystallization buffer (50 mM Tris/HCl pH 8.5, 11% PEG 4000, 100 mM MgCl₂) and were improved by one round of microseeding. Seeds were prepared by collecting protein crystals from 2 drops of the unseeded crystallization experiments followed by 1 min vortexing in an Eppendorf tube with 0.5 mm glass beads.

Data collection and processing

Crystals for data collection were cryoprotected by transfer to crystallization buffer containing 15% (v/v) EG and after about 30 s to crystallization buffer containing 35% (v/v) EG before flash freezing in liquid nitrogen. Diffraction data were collected at different wavelengths at SSRL beamline 12-2 (temperature 100 K). The data statistics are summarized in Table 1. Diffraction data were processed, integrated and scaled using XDS (<http://xds.mpimf-heidelberg.mpg.de>).

Results and Discussion

Purification of the dioxygenase complex components

The recombinant dioxygenase complex proteins from *Achromobacter xylosoxidans* A8 were overproduced in *E. coli* BL21 Arctic Express (DE3) cells in a soluble form and the His-tagged components was purified in two steps as described under Materials and Methods. According to the order of the purification process (Figure 1), the dioxygenase components were named as P1 (AcAd), P2 (Aa) and P3 (Ab) proteins. Although the purification of P3 (Ab) resulted in a lower yield, the purification procedure described herein yielded approximately 30 mg and 17 mg of purified protein per liter of culture for P1 and P2, respectively. SDS-PAGE analysis with fractions eluted from Superdex S200 column, revealed two majority bands with apparent M_r of 48.000 and 20.000 from peak 1 (Figure 1C) corresponding to Ac and Ad proteins, respectively. The analysis with the fractions from peak 2 (Figure 1D) showed two subunits from dioxygenase complex with apparent M_r of 37.000 (lanes 2 to 8) and M_r of 13.000 (lanes 5 to 9), corresponding to Aa and Ab proteins, respectively. The molecular mass by gel filtration chromatography (data not shown) of the oxygenase component was approximately 200 kDa, demonstrating that it is an $\alpha_3\beta_3$ hexamer; while the reductase and ferredoxin components were monomers with molecular mass apparent of 40 kDa and 14 kDa, respectively. These results were

consistent with the molecular masses reported from previous observations with others ring-hydroxylating dioxygenases (BEHARRY *et al.*, 2003; JOUANNEAU *et al.*, 2006).

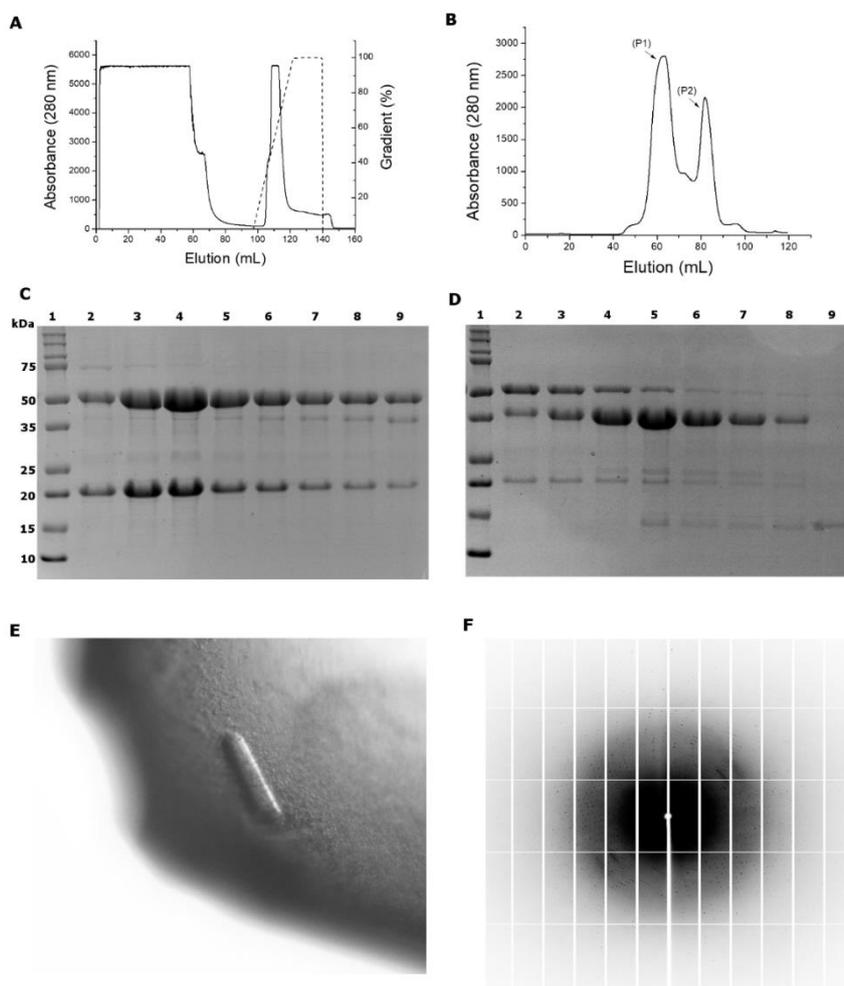


Figure 1

Purification analysis of dioxygenase complex proteins AaAbAcAd from *Achromobacter xylosoxidans* A8.

A - IMAC chromatography profile. B - Size-exclusion chromatography profile. C and D - Denaturing electrophoresis (15% SDS-PAGE) of the purified components of the dioxygenase complex. C - Lane 1: molecular weight marker. Lanes 2 to 9: fractions eluted from peak 1 of size exclusion chromatography. D - Lane 1: molecular weight marker. Lanes 2 to 9: fractions eluted from peak 2 of size exclusion chromatography

P1 structure determination

The crystallographic model of P1 has been refined to a resolution of 1.35 Å with a final R_{factor} of 0.1676 and an R_{free} of 0.1820. Crystallographic statistics are reported in Table 1.

Table 1

Summary of crystallographic data and refinement statistics.

Crystal data	P1 (oxygenase component)
Beamline	SSRL 12-2
Wavelength (Å)	0.88557
Temperature (K)	100
Detector	Dectris Pilatus 6M
Crystal-detector distance (mm)	188
Rotation range per image (°)	0.5
Total rotation range (°)	180
Exposure time per image (s)	0.2
Space group	P6 ₃
Unit cell parameters	
a = b, c (Å)	103.78, 105.049
Resolution range (Å)	34.0 - 1.35
Total observations	136417
Completeness (%)	98.30
$R_{\text{factor}}^{\text{a}}$ (%)	16.8
$R_{\text{free}}^{\text{b}}$ (%)	18.2
Non-hydrogen protein atoms	4807
Number of waters	431
Ramachandran plot	
Allowed regions (%)	2.80
Most favored (%)	96.83

^a $R_{\text{factor}} = \sum_{\text{hkl}} ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|| / \sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}|$.

^b R_{free} is the R_{factor} value calculated for 5% of the data not included on refinement.

The P1 structure shows similarities and substantial differences compared to other known RHDs (FERRARO *et al.*, 2007; JOUANNEAU *et al.*, 2011; KAUPPI *et al.*, 1998). On the basis of gel-filtration analysis (data not shown) and from the crystal structure, P1 can be described as an $\alpha_3\beta_3$ hexamer with a molecular weight of 205 kDa and each $\alpha\beta$ heterodimer is related to the other by a three-fold rotational symmetry. The overall shape of the hexameric complex, like all $\alpha_3\beta_3$ oxygenases, exhibit a mushroom-like shape, illustrated in figure 2A, where the three β subunits form the stem and the three α subunits are forming the cap. The three copies of the α and β subunits are folded in a very compact quaternary structure (figure 2) and the final model contains residues 35 - 439 of the subunit and residues 13 - 176 of the β subunits

Like other members of the RHDs family the hexamer structure is believed to be the active biological unit and in addition to the $\alpha_3\beta_3$ polypeptide chains, the model contained three [2Fe-2S] Rieske clusters and three mononuclear manganese atoms. The presence of manganese as the metal in the active site was described in a catechol dioxygenase Mn(II)-dependent enzyme (MndD) of *Arthrobacter globiformis* CM-2 (WHITING *et al.*, 1996). Another exception includes a dioxygenase which depend on Mg(II) (GIBELLO *et al.*, 1994). The studies with the Mn and Mg-dependent dioxygenases demonstrated that the metal-coordinated amino acid residues as well as residues in the active site are conserved for most of the RHDs, although they did not present a crystallographic study.

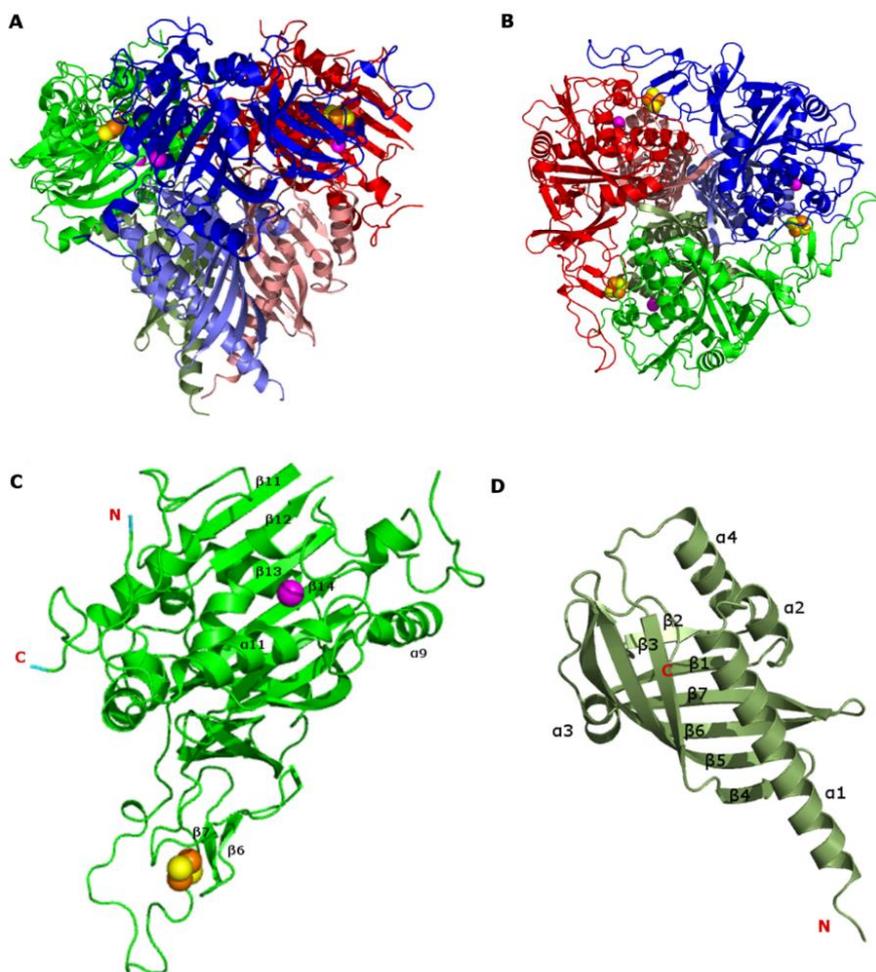


Figure 2

Overall structure of the P1. (A) Side view shows that P1 has a mushroom-like shaped $\alpha_3\beta_3$ hexamer with the α subunits as the cap and the β subunits as the stem. (B) View along the molecular three fold-symmetry emphasizes the interface between the mononuclear manganese atom from one α subunit and the [2Fe-2S] cluster from a neighboring subunit. The three $\alpha\beta$ subunits are colored in green, blue and red. Representation of the polypeptide backbone with α -helices and β -strands characteristic of the RHD family. (C) α subunit with identification of some β -strands and α -helices near to the Rieske centre and the Mn atom. (D) β subunit with identification of some β -strands and α -helices. Manganese atoms are shown in magenta, while iron and sulfur atoms are shown in orange and yellow, respectively. N: aminoterminal moiety and C: carboxy-terminal moiety.

Concerning the P1 structure, each alpha subunit can be divided into the N-terminal Rieske domain, containing the cluster [2Fe-2S] and the C-terminal catalytic domain, in the case of P1, which contains a mononuclear manganese ion located near to the substrate binding-site. The Rieske domain is formed by long regions of loops and by smaller β -strands, such as β_6 and β_7 (Figure 2C). The catalytic domain, the manganese

atom is located in a region containing a mix of helices and strands, forming a α/β -helix-grip fold, which is characteristic of the Bet vI-like superfamily (MURZIN *et al.*, 1995). In addition, in the Rieske domain the conserved residues His-106 and His-127 coordinate one iron, while Cys-104 and Cys-124 are coordinating with the second iron atom (Figure 3A) present in the Rieske non-heme iron cluster [2Fe-2S].

In the catalytic domain, the mononuclear manganese is coordinated by two histidines, His-232, His-237, and one aspartate, Asp-379 (Figure 3B) at the active site. Asn-229 (Asn-226 in P1) is described as a residue in which the oxygen of the side chain is possibly involved in the incorporation of oxygen during the catalysis (JOUANNEAU *et al.*, 2011).

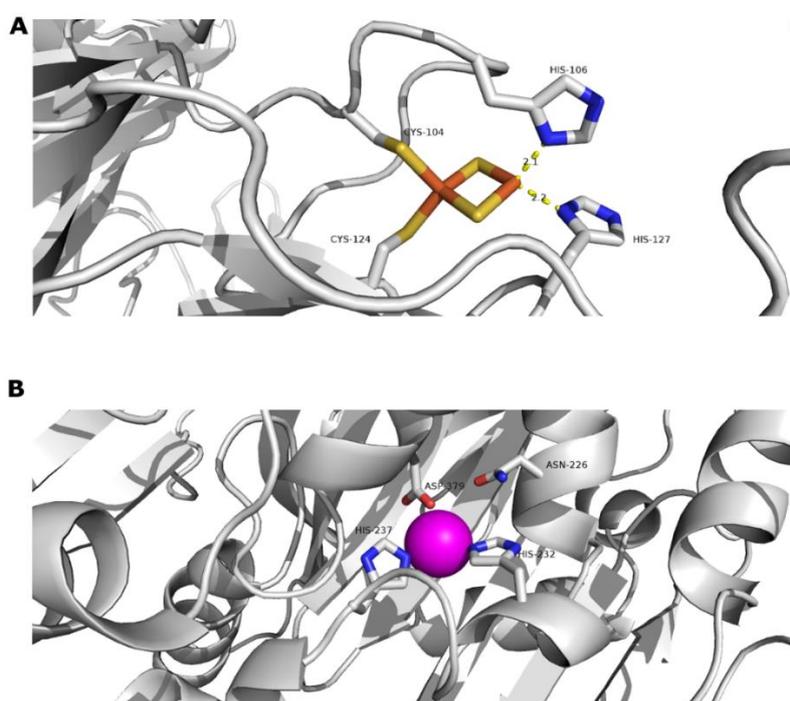


Figure 3

Representation of the interactions between residues in the Rieske and catalytic domains of the alpha subunit of the P1.

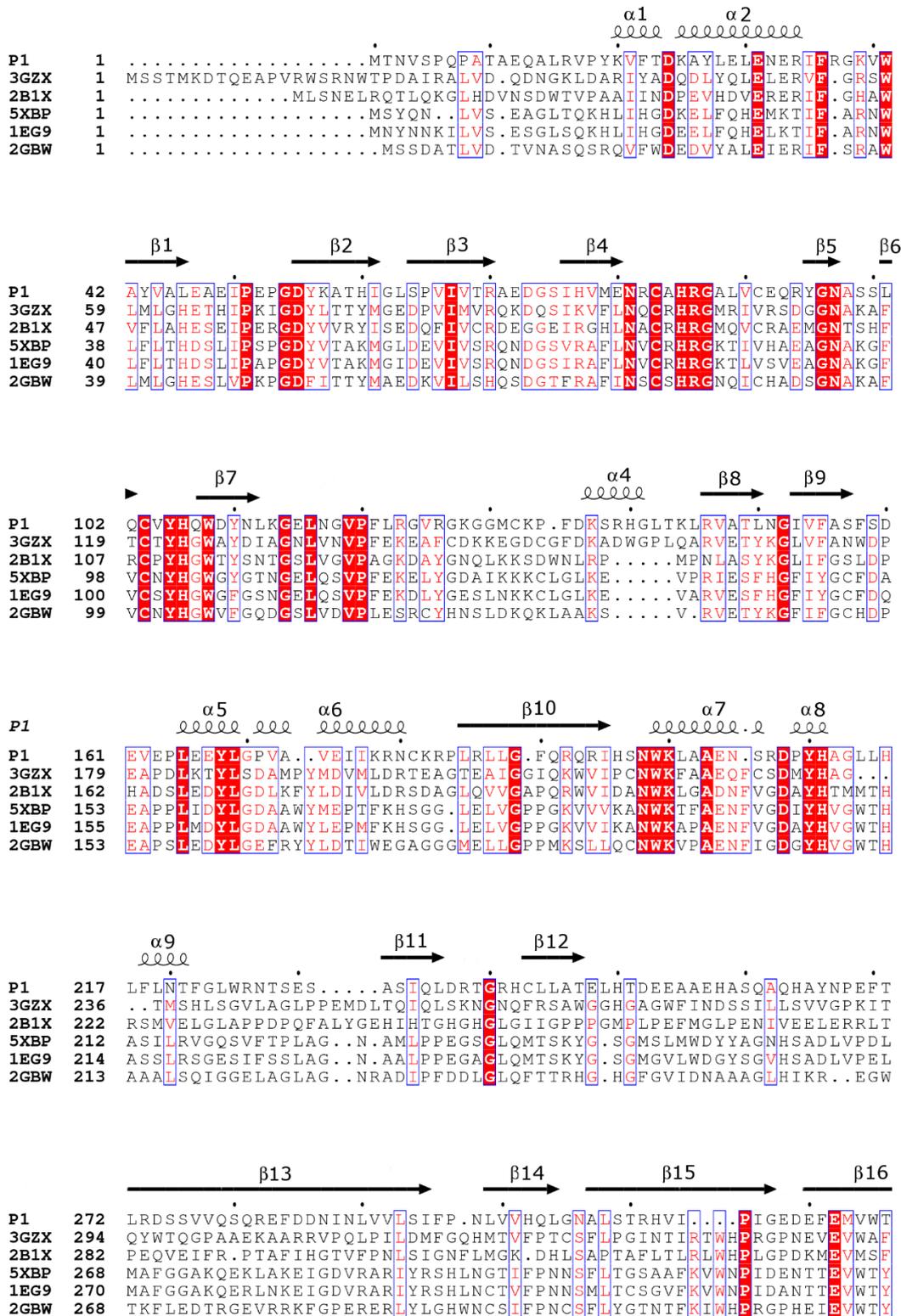
A - In the Rieske domain the conserved residues Cys-104 and Cys-124 interact with one iron and His-106 and His-127 with the other, and the distances of the two histidines to the iron is about 2.1 Å. B - In the catalytic domain the conserved residues His-232, His-237 and Asp-379 establish interactions with the mononuclear manganese; Asn-226 is a conserved residue among others RHDs and is possibly involved in catalysis.

Considering the mechanism of enzymatic catalysis, the proposed model is based on the interaction between alpha subunits. As described by RHDs enzymes the distance, around 44 Å, between the mononuclear manganese and the Rieske centre of the same alpha subunit possible blocks the enzymatic catalysis. However, the distance of 12 Å that separate the Rieske [2Fe-2S] centre of the mononuclear manganese of the neighbouring alpha subunit indicates the electron transfer between the centres of metals occurs at the interface of two adjacent alpha subunits.

The beta subunit of P1 has in the N-terminal residues that form a long α -helix (α 1) and the folding proceeds by the mix of smaller helices and strands (α 2- β 1- α 3- β 2- α 4), followed by five β -strands (β 3- β 7) reaching the C-terminal of the polypeptide chain. This folding is characteristic of proteins belonging to the superfamily of NTF2-like proteins (MURZIN *et al.*, 1995). These proteins have a domain consisting of five antiparallel β -strands followed by a major α -helix. The typical domain of NTF-2 is shared by other proteins such as kinases, phosphatases and beta subunits of bacterial dioxygenase complexes, as well as many other proteins that have not yet been characterized (FERRARO *et al.*, 2007). As the β -subunit function is not well understood, it is believed that this protein play a structural role, assisting in the stabilization of the alpha subunit, as reported by NDO-O9616-4 (KAUPPI *et al.*, 1998) and NDO-O12038 (FRIEMANN *et al.*, 2005).

Comparative analysis of the alpha subunit structure was performed with the following RHDs proteins: 3GZX (biphenyl dioxygenase from *Comamonas testosteroni* B-356), 2B1X (naphthalene dioxygenase from *Rhodococcus* sp.), 5XBP (3-nitrotoluene dioxygenase from *Diaphorobacter* sp. DS2), 1EG9 (naphthalene dioxygenase from *P. putida* NCBI 9816-4) and 2GBW (biphenyl dioxygenase from *Sphingomonas yanoikuyae* B1). These proteins were selected according to a structural homology search in the PDB

using the DALI program - Protein Structure Comparison Server (HOLM; LAAKSO, 2016) and, in figure 4 is the alignment of the amino acid sequences of these enzymes.



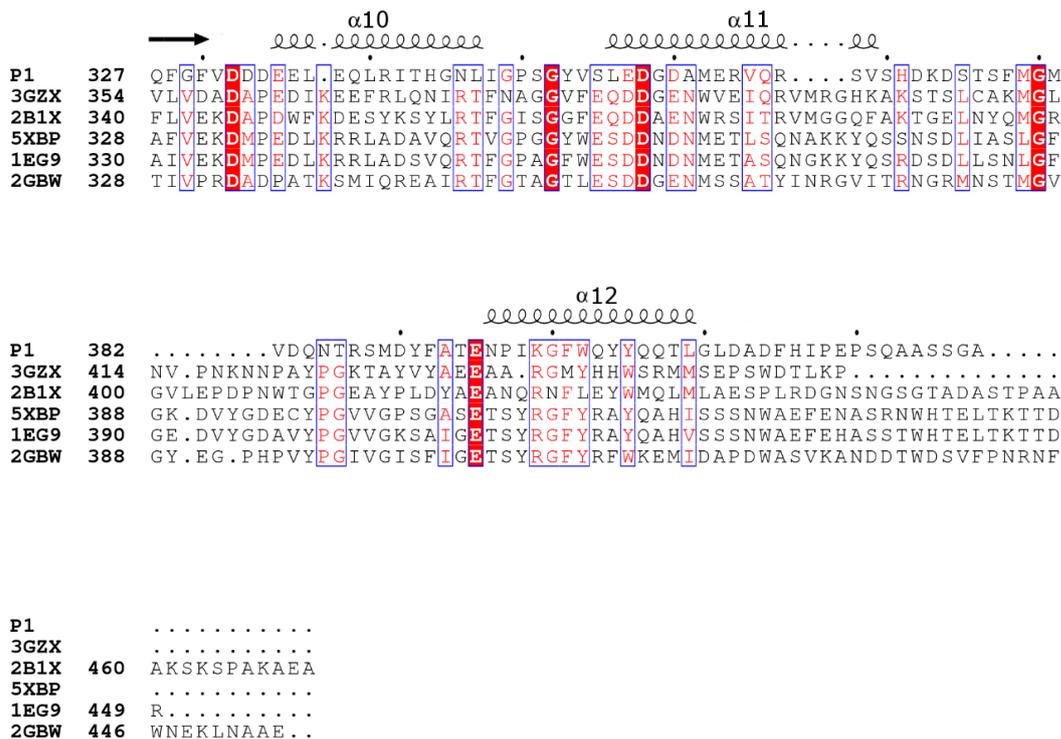


Figure 4

Alignment of the alpha subunit amino acid sequences of the *Achromobacter xylosoxidans* A8 P1 protein with other Rieske oxygenases.

P1, P1 alpha subunit of *Achromobacter xylosoxidans* A8; 3GZX, biphenyl dioxygenase from *Comamonas testosteroni* B-356; 2B1X, naphthalene dioxygenase from *Rhodococcus* sp; 5XBP, 3-nitrotoluene dioxygenase from *Diaphorobacter* sp. DS2; 1EG9, naphthalene dioxygenase from *P. putida* NCBI 9816-4 and 2GBW, biphenyl dioxygenase from *Sphingomonas yanoikuyae* B1. The arrows correspond to the β -ribbons and the spirals, α -helices. The identical residues are in white color marked in red and the similar in red color highlighted in blue. The alignment was performed on the Multalin server (CORPET, 1988) and visualized using the program EsPrint 3.0 (ROBERT; GOUET, 2014).

Regarding to the structural alignment, the proteins have low P1 sequence identity, ranging from 25 to 28%, with RMSD ($C\alpha$) between 2.1 and 2.4 Å. In P1, the presence of some conserved residues in the Rieske domain, among them the two cysteines (C104 and C127) and the two histidines (H106 and 127) are noted in the region of β -strands (β 4 to β 7). The same occurs in the catalytic domain with some α -helices (α 7 to α 11), in which the asparagine (N226) metal binding residues, the two histidines (H232 and H237) and aspartate (D379) are shared by all proteins analyzed.

The crystal structure of 3GZX and 1EG9 proteins were solved with the respective substrates biphenyl and indole. A comparison of P1 with these proteins was performed and in figure 5 are the superimpositions of the residues from the Rieske domain and the catalytic domain.

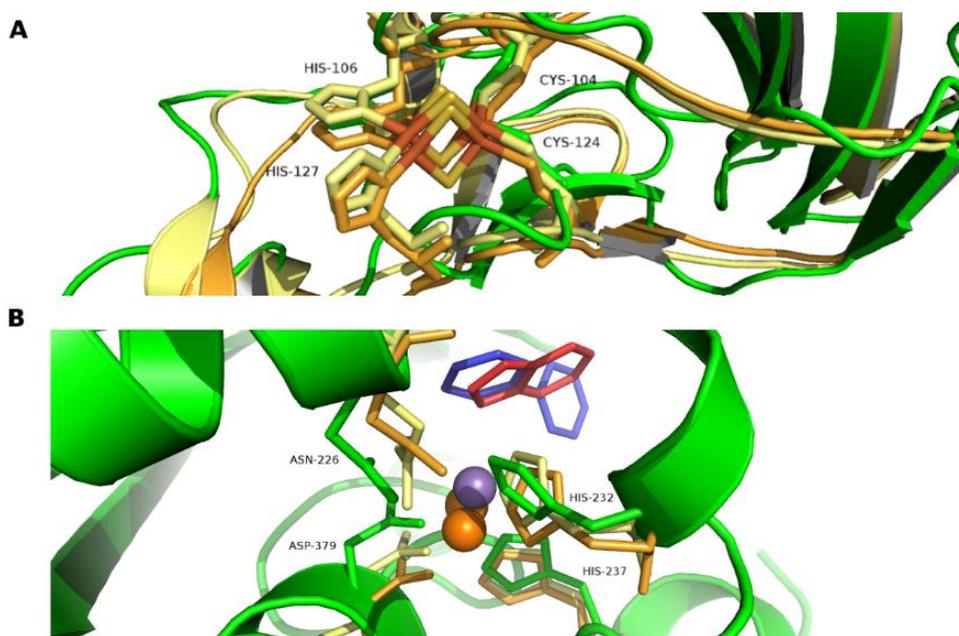


Figure 5

Structural comparison of conserved residues in the Rieske and catalytic domain of P1 with other dioxygenases.

A – Comparison of the Rieske domain shows the conserved residues Cys-104, His-106, Cys-124 and His-127 interacting with the [2Fe-2S] centre. B – Superposition of the catalytic domain conserved residues His-232, His-237, Asp-379 and Asn-226. P1 (green), 3GZX (pale yellow) and 1EG9 (bright orange). Atoms of iron and sulfur are in orange and yellow, respectively and mononuclear manganese is shown in purple. Biphenyl (substrate of 3GZX) is in blue and indole (1EG9 substrate) is shown in red. Residues are labeled using the P1 numbering.

According to the structural alignment performed with the alpha-subunits of P1, biphenyl (3ZGX) and naphthalene (1EG9), it is observed that the residues are conserved from both the Rieske and the catalytic domain. Cys-104, His-106, Cys-124 and His-127 of P1 occupied the same positions in the structural model of the others two RHDs.

In addition to the conserved amino acids, residues that interact with the Rieske domain [2Fe-2S] and with the metal in the active site on the enzymes P1, 3GZX and 1EG9, present high similarity (Table 2).

Table 2

Structurally analogous residues in the Rieske centre and the active site for P1 and others RHDs studied.

P1	3GZX	1EG9
Rieske [2Fe-2S]centre coordinating residues		
C104	C100	C81
H106	H102	H83
C124	C120	C101
H127	H123	H104
R107	R103	R84
G108	G104	G85
A109	M105	K86
Y126	Y122	Y103
Q128	G124	G105
W129	W125	W106
Active site coordinating residues		
N226	Q226	N201
D229	D230	D205
H232	H233	H208
H237	H239	H213
F239	V243	L217
L311	G320	H295
V313	H321	N297
H323	L331	L307
L325	I334	S310
I369	F376	F352
V375	F382	W358
D379	D386	D362

Concerning the 12 residues identified that contribute to the active site of the RHDs, most of them is not present in P1, such as the analogous residues (Asn-226, Phe-

239, Leu-311, Val-313, His-323, Leu-325, Ile-369 and Val-375) in 3GZX and 1EG9. The structural comparison of these residues is illustrated in Figure 6.

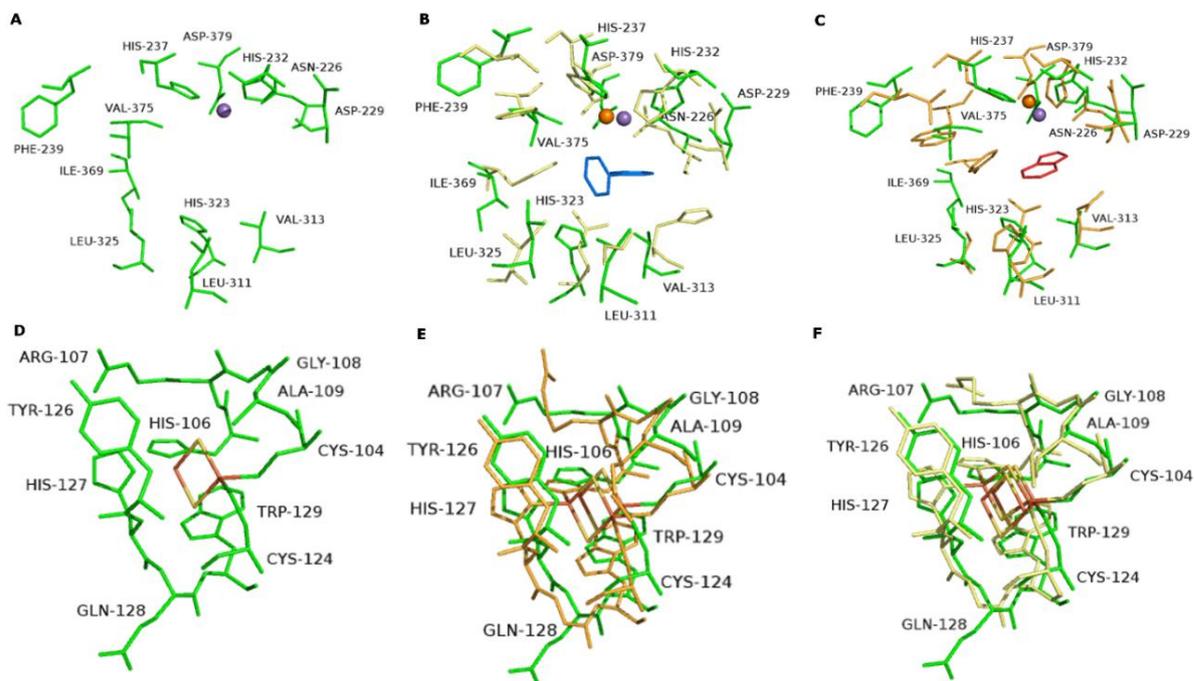


Figure 6

Comparison of active site and Rieske domain residues of P1 with other dioxygenases.

Comparison of active site (A - C) and Rieske domain (D - F) residues of P1, P1 with 3GZX and P1 with 1EG9, respectively. P1 (green), 3GZX (pale yellow) and 1EG9 (bright orange). Iron and sulfur are in orange and yellow, respectively and mononuclear manganese are shown in purple. Biphenyl (substrate of 3GZX) is in blue and indole (1EG9 substrate) in red. Residues are labeled using numbering from P1.

In the catalytic domain of P1, the presence of His-323 (Leu-331 in 3GZX and Leu-307 in 1EG9) suggests that it is an important amino acid, due to its polarity, which can contribute for the catalysis. Since this position is occupied by a leucine in most of the RHDs, with the exception of Phe-307 (NDO-O12038), Gln-314 (OMO-O86) and Val-272 (CARDO-OCA10). Also, the presence of Ile-369 in a position that is occupied by Phe-376 (in 3ZGX) and Phe-352 (in 1EG9), a conserved phenylalanine residue in the other RHDs, suggests that isoleucine, because it has a smaller side chain residue and more flexible than the aromatic ring, at that position may allow the formation of a larger cavity at the active site, which could accommodate bulkier substrates. The same is noted for

Val-375, position occupied by Phe-382 in 3ZGX and Trp-358 in 1EG9. It is interesting that all known RHDs have an aromatic residue at this position, but the exception include the Leu-356 in Phn-I, a dioxygenase of *Sphingomonas* CHY-1 (Jakoncic 2007).

According to previous work (JAKONCIC *et al.*, 2007), bulkier residues such as phenylalanine and tryptophan present in the central region of the dioxygenases can alter the topology of the catalytic site and consequently determine the substrate specificity. Replacement of Phe-352 in 1EG9 for smaller residues, such as valine and leucine, altered the regio-specificity of the enzymes by the change in topology of the active site. The same was observed in the substitution of Trp-358 (in 1EG9) for an alanine, which inactivated the enzyme for the conversion of naphthalene, demonstrating how this residue is crucial for the maintenance of the naphthalene in the correct position for the catalysis.

In contrast, the presence of smaller residues may contribute to the increase of the catalytic site, with more flexible regions, which may presents a great influence on the selection of larger aromatic substrates. The role of Phe-352 in naphthalene dioxygenase was evaluated by elucidation of the F352V mutant structure only and complexed with substrate (FERRARO *et al.*, 2006). The enzyme containing F352V the phenanthrene substrate bound in a different position in the active site, compared to the wild-type enzyme, which altered the formation of the product. Thus the results revealed the orientation of the substrate binding at the active site is determinant for the regio- and stereoselectivity of the reactions catalyzed by the RHDs.

Thereby, the position of the catalytic domain residues of P1, consisting of the four residues Leu-325, His-323, Val-375 and Ile-369, suggests that this region may confer access or better accommodation for larger aromatic substrates, as may to be seen by the positioning of the biphenyl and indole substrates, overlapping with the other RHDs

(Figure 6, B and C). In the Rieske domain, the differences were not as pronounced as in the catalytic domain.

Thus, these results will enable further studies involving the substitution of specific residues at both the catalytic site and the Rieske domain to investigate the role of each of these residues in the catalytic activity of the enzyme, mainly concerning the substrate acceptance and selectivity.

Conclusions

A new dioxygenase complex was identified and the structure of the terminal oxygenase component (P1) was solved at 1.35 Å resolution. Crystallographic data showed differences on the catalytic site residues comparing with others RHDs enzymes. These results here reinforce that this dioxygenase complex can be used for further studies with aromatics substrates which can contribute for understanding of the molecular mechanism.

References

- BAMFORTH, S. M.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 80, n. 7, p. 723–736, 2005.
- CARNEIRO, F. R. *et al.* Spectroscopic characterization of the tumor antigen NY-REN-21 and identification of heterodimer formation with SCAND1. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 343, n. 1, p. 260–268, 2006.
- CERNIGLIA, C. E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, v. 3, n. 2–3, p. 351–368, 1992.
- CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic acids research*, v. 16, n. 22, p. 10881–10890, 1988.
- FERNÁNDEZ, M. *et al.* Enhanced tolerance to naphthalene and enhanced rhizoremediation performance for *Pseudomonas putida* KT2440 via the NAH7 catabolic plasmid. *Applied and environmental microbiology*, v. 78, n. 15, p. 5104–5110, 2012.
- FERRARO, D. J. *et al.* Structural basis for regioselectivity and stereoselectivity of product formation by naphthalene 1, 2-dioxygenase. *Journal of bacteriology*, v. 188, n. 19, p. 6986–6994, 2006.
- FERRARO, D. J. *et al.* Structural investigations of the ferredoxin and terminal oxygenase components of the biphenyl 2, 3-dioxygenase from *Sphingobium yanoikuyae* B1. *BMC structural biology*, v. 7, n. 1, p. 10, 2007.
- FRIEMANN, R. *et al.* Structural insight into the dioxygenation of nitroarene compounds: the crystal structure of nitrobenzene dioxygenase. *Journal of molecular biology*, v. 348, n. 5, p. 1139–1151, 2005.

- GIBELLO, A. *et al.* 3, 4-Dihydroxyphenylacetate 2, 3-dioxygenase from *Klebsiella pneumoniae*, a Mg²⁺-containing dioxygenase involved in aromatic catabolism. *Biochemical Journal*, v. 301, n. 1, p. 145–150, 1994.
- HICKEY, W. *et al.* Cloning, Nucleotide Sequencing, and Functional Analysis of a Novel, Mobile Cluster of Biodegradation Genes from *Pseudomonas aeruginosa* Strain JB2. *Applied and environmental microbiology*, v. 67, n. 10, p. 4603–4609, 2001.
- JAKONCIC, J. *et al.* The catalytic pocket of the ring-hydroxylating dioxygenase from *Sphingomonas* CHY-1. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 352, n. 4, p. 861–866, 2007.
- JENCOVA, V. *et al.* Chlorocatechol catabolic enzymes from *Achromobacter xylosoxidans* A8. *International biodeterioration & biodegradation*, v. 54, n. 2–3, p. 175–181, 2004.
- JENCOVA, V. *et al.* Nucleotide sequence, organization and characterization of the (halo) aromatic acid catabolic plasmid pA81 from *Achromobacter xylosoxidans* A8. *Research in microbiology*, v. 159, n. 2, p. 118–127, 2008.
- JOUANNEAU, Y. *et al.* Ringhydroxylating dioxygenases involved in PAH biodegradation: structure, function and biodiversity. *Microbial bioremediation of non metals: current research*. Caister Academic Press, Norfolk, UK, p. 149–175, 2011.
- KARLSSON, A. *et al.* Crystal Structure of Naphthalene Dioxygenase: Side-on Binding of Dioxygen to Iron. *Science*, v. 299, n. 5609, p. 1039, 14 fev. 2003.
- KAUPPI, B. *et al.* Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase–naphthalene 1, 2-dioxygenase. *Structure*, v. 6, n. 5, p. 571–586, 1998.
- MURZIN, A. G. *et al.* SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *Journal of molecular biology*, v. 247, n. 4, p. 536–540, 1995.
- PARALES, R. E. The role of active-site residues in naphthalene dioxygenase. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 30, n. 5, p. 271–278, 2003.
- PAVLŮ, L. *et al.* Characterization of chlorobenzoate degraders isolated from polychlorinated biphenyl-contaminated soil and sediment in the Czech Republic. *Journal of applied microbiology*, v. 87, n. 3, p. 381–386, 1999.
- PENG, R.-H. *et al.* Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 32, n. 6, p. 927–955, 2008.
- PUIGBÒ, P. *et al.* OPTIMIZER: a web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. *Nucleic acids research*, v. 35, n. suppl 2, p. W126–W131, 2007.
- ROBERT, X.; GOUET, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic acids research*, v. 42, n. W1, p. W320–W324, 2014.
- STRNAD, H. *et al.* Complete genome sequence of the haloaromatic acid-degrading bacterium *Achromobacter xylosoxidans* A8. *Journal of bacteriology*, v. 193, n. 3, p. 791–792, 2011.
- VILLALOBOS, A. *et al.* Gene Designer: a synthetic biology tool for constructing artificial DNA segments. *BMC bioinformatics*, v. 7, n. 1, p. 285, 2006.

APÊNDICE B: AVALIAÇÃO CINÉTICA E ESTRUTURAL DOS MUTANTES G150 DA ENZIMA SALICILALDEÍDO DESIDROGENASE (NAHF) DE *PSEUDOMONAS PUTIDA G7*

Para a execução deste trabalho, a síntese e clonagem das proteínas do complexo dioxigenase (AaAbAcAd) de *Achromobacter xylosoxidans* A8 foram realizadas pela empresa GenScript® (Piscataway, NJ, USA). Durante o período de espera do envio das amostras, foi iniciado o projeto com mutantes da enzima salicilaldeído desidrogenase, com o intuito de avaliar a importância cinética e estrutural destas mutações na enzima. A condução deste projeto paralelo foi significativa, pois demandou a utilização de técnicas que serão fundamentais para a realização do projeto principal, como expressão, purificação, ensaios de cinética enzimática e testes de cristalização.

1. Introdução

A salicilaldeído desidrogenase (NahF) é uma enzima da superfamília das aldeído desidrogenases (ALDH), que convertem aldeídos em seus respectivos ácidos carboxílicos, utilizando o NAD(P)⁺ como cofator (PEROZICH; NICHOLAS; LINDAHL; *et al.*, 1999; PEROZICH; NICHOLAS; WANG; *et al.*, 1999). A maioria das famílias de enzimas pertencentes à superfamília ALDH é específica para o NAD⁺, enquanto que algumas das famílias utilizam o NADP⁺ e para as demais a utilização do cofator ainda precisa ser elucidada. Em *Pseudomonas putida G7* a NahF atua na última reação da via superior de degradação do naftaleno e catalisa a oxidação do salicilaldeído em salicilato na presença de NAD⁺.

A enzima NahF recombinante foi cristalizada na presença do substrato salicilaldeído e a estrutura tridimensional foi obtida a 2,4Å (PDB 4JZ6) (COITINHO *et al.*, 2012). De acordo com os dados estruturais, o sítio catalítico é formado por resíduos

de cisteína, glutamato e asparagina e além desses aminoácidos verificou-se que outros resíduos podem estar envolvidos na interação com o salicilaldeído.

A glicina 150 (G150) é um resíduo não catalítico que aparentemente pode auxiliar o acesso de substratos aromáticos ao sítio ativo. Esta suposição foi baseada tanto na estrutura tridimensional quanto na avaliação da atividade enzimática de NahF com diversos substratos que demonstraram que a enzima catalisa substratos aromáticos com maior eficiência. Outro resíduo não catalítico é a arginina 157 (R157), carregado positivamente, que pode estar envolvido na catálise enzimática em razão de sua posição no sítio ativo (COSTA, M. A. F., 2014).

Para avaliação através de mutagênese sítio dirigida foram selecionados os resíduos catalíticos C284, E250 e N149, bem como os resíduos não catalíticos R157 e G150. No total 11 mutantes da enzima NahF foram sintetizados (N149A, E250A, E250Q, C284A, C284S, R157A, R157K, G150A, G150V, G150L e G150F), contudo, até o presente momento, foi realizada a caracterização estrutural e funcional somente das proteínas NahF-R157A e NahF-R157K (COSTA, M. A. F., 2014).

Além disso, uma comparação estrutural da NahF com NahI, outra aldeído desidrogenase presente na via de degradação do naftaleno, indicou a presença de uma leucina em NahI na posição correspondente à glicina 150 em NahF. Como nos ensaios de catálise com diversos substratos a enzima NahI não apresentou atividade enzimática para os substratos aromáticos, foi sugerido que a presença da glicina possibilita a formação de um bolsão catalítico maior em NahF, o que permite a entrada e catálise de substratos maiores.

Desse modo, as mutações G150A, G150V, G150L e G150F foram realizadas com o intuito de verificar se o aumento do resíduo nessa posição tornaria o bolsão inacessível aos substratos aromáticos. Assim, as mutações na G150 podem contribuir para o

entendimento do mecanismo de ação da NahF e a propensão da enzima por substratos aromáticos, em oposição à enzima NahI. Neste trabalho foi realizada a expressão, purificação das proteínas mutantes G150A, G150F, G150L e G150V de NahF de *Pseudomonas putida* G7 para avaliação da atividade biológica e ensaios de cristalização.

2. Metodologia

2.1. Mutagênese sítio-dirigida

O gene correspondente à proteína NahF foi previamente clonado no vetor pET28a(TEV) (COITINHO *et al.*, 2012), de forma a possuir uma sequência codificadora para uma cauda de histidina clivável na porção N-terminal. As inserções das mutações foram feitas com o DNA plasmidial nativo utilizando o kit *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene) por Costa (COSTA, M. A. F., 2014), em um projeto anterior desenvolvido no nosso grupo de pesquisa. A síntese dos amplificadores (primers) contendo as mutações foi realizada segundo o protocolo do fabricante.

2.2. Expressão dos mutantes de NahF

Os plasmídeos contendo os genes referente às proteínas mutantes NahF-G150A, NahF-G150F, NahF-G150L, NahF-G150V foram purificados (COSTA, M. A. F., 2014) e transformados em bactérias *E. coli* BL21 Arctic Express (DE3), conforme descrito no item 3.3. Para a expressão das proteínas mutantes de NahF as células transformantes foram inoculadas em meio LB acrescido dos antibióticos kanamicina (50 µg/ml) e gentamicina (20 µg/ml). Após incubação a 37 °C, 200 rpm por 16 horas a cultura foi transferida para o meio LB na proporção de 1:50, sem antibióticos, e cultivada a 30 °C por 3 horas. A expressão foi induzida pela adição de IPTG 0,5 mM e a cultura foi incubada a 12 °C por 24 horas.

A expressão das proteínas mutantes recombinantes nas frações solúvel ou insolúvel após a lise foram analisadas por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12%, conforme descrito no item 3.7.

2.3. Purificação dos mutantes de NahF

Após a expressão e lise celular, o sobrenadante foi purificado em coluna de afinidade HisTrap HP como descrito no item I.1.5.1. Assim, a amostra contendo a proteína mutante de NahF, com cauda de histidina, foi concentrada em sistema Vivaspín 6 – 10.000 MWCO (GE Healthcare) até 5 mL e então aplicada na coluna de gel filtração Superdex 200 (GE Healthcare), conforme descrito no item I.1.5.2.

Posteriormente, as proteínas eluídas da cromatografia de gel filtração foram concentradas novamente em sistema Vivaspín 6 – 10.000 MWCO (GE Healthcare) para 5 mg/mL para a realização dos testes de cinética enzimática e, posteriormente, congeladas a -80°C com 30% (v/v) de glicerol.

A concentração das proteínas foi realizada conforme descrito no item I.1.6. As sequências das proteínas mutantes foram analisadas no programa Protparam (ARTIMO *et al.*, 2012). O coeficiente de extinção molar médio calculado foi de 40.910 M⁻¹cm⁻¹ e a estimativa da massa molecular foi de 54,2 kDa para os mutantes NahF-G150A, NahF-G150F, NahF-G150L, NahF-G150V, com caudas de histidina.

As frações das etapas de purificação das proteínas mutantes foram analisadas por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% (item I.1.7.)

2.4. Atividade biológica dos mutantes de NahF

Os testes de cinética enzimática com os mutantes da enzima NahF foram realizados em espectrofotômetro Cary 50 Bio a 25 °C utilizando os substratos aromáticos apresentados na figura 1.

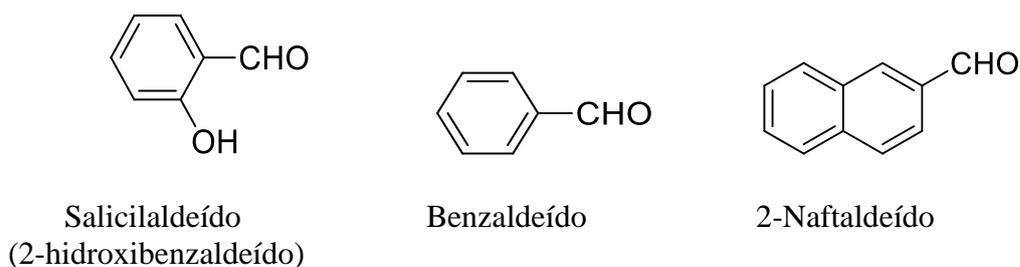


Figura 1: Substratos aromáticos utilizados nos testes de cinética enzimática com os mutantes da enzima NahF.

A mistura da reação continha tampão Hepes (50 mM pH 8,5, 1mM EDTA e força iônica de 0,2M NaCl), substrato, cofator e enzima. Os substratos foram dissolvidos em acetonitrila antes da adição à mistura da reação em uma cubeta de quartzo. Em seguida, o cofator NAD^+ foi adicionado em uma concentração final de $200\mu\text{M}$. A reação foi iniciada pela adição da enzima em uma concentração previamente estabelecida. As medidas de velocidade inicial para a reação enzimática foram monitoradas por espectrofotometria a 340nm.

Em um gráfico de absorvância em função do tempo pode-se obter a inclinação da curva, que corresponde à velocidade inicial da reação. Com os dados desse procedimento foi obtido um gráfico de Michaelis-Menten, o qual relaciona a velocidade inicial (v) *versus* a concentração de substrato [S] e, a partir de regressão não linear, foram determinados os parâmetros do estado estacionário.

2.5. Testes de cristalização

Os testes de cristalização com os mutantes de NahF foram realizados pela técnica da gota suspensa (item 3.12.) e as condições de cristalização foram estabelecidas anteriormente (COSTA, M. A. F., 2014). Os cristais dos mutantes de NahF foram submetidos a experimentos de difração de raios-X na linha W01B-MX2 (GUIMARAES *et al.*, 2009) no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).

3. Resultados e Discussão

3.1. Expressão e purificação das proteínas mutantes de NahF

As proteínas NahF-G150A, NahF-G150F, NahF-G150L e NahF-G150V foram expressas em *E. coli* BL21 *Arctic Express* (DE3), após 24h de indução, obtidas no extrato solúvel após a lise celular (item 3.4.) e, por fim, purificadas a partir desta fração (item II.1.3.).

As proteínas mutantes foram purificadas por cromatografias de afinidade ao níquel e de gel filtração, e os cromatogramas estão apresentados na figura 2.

O perfil de purificação da proteína NahF-G150A após a afinidade (Figura 2A) e gel filtração (Figura 2B) apresentou um pico único de eluição entre 80 e 90 mL. O rendimento foi de 19,6 mg e 12,5 mg de proteína por litro de cultivo, obtido após as respectivas etapas.

O mesmo comportamento foi observado para a proteína NahF-G150F que foi eluída da afinidade (Figura 2C) e da gel filtração (Figura 2D), em um pico único em torno de 90 mL e com o rendimento de 8,7 mg e 5,76 mg de proteína por litro de cultivo, respectivamente.

O extrato solúvel contendo a NahF-G150L após as cromatografias de afinidade (Figura 2E) e de gel filtração (Figura 2F), resultou em eluição da proteína com 85 mL.

O rendimento obtido foi de 5,64 mg de proteína por litro de cultivo após a afinidade e de 3,36 mg de proteína utilizando a gel filtração.

Por fim, a purificação do mutante NahF-G150V através da afinidade (Figura 2G) e da gel filtração (Figura 2H), com eluição da proteína em torno de 85 mL conferiu o rendimento de 14,3 mg e 10,2 mg de proteína por litro de cultivo, após a afinidade e gel filtração, respectivamente.

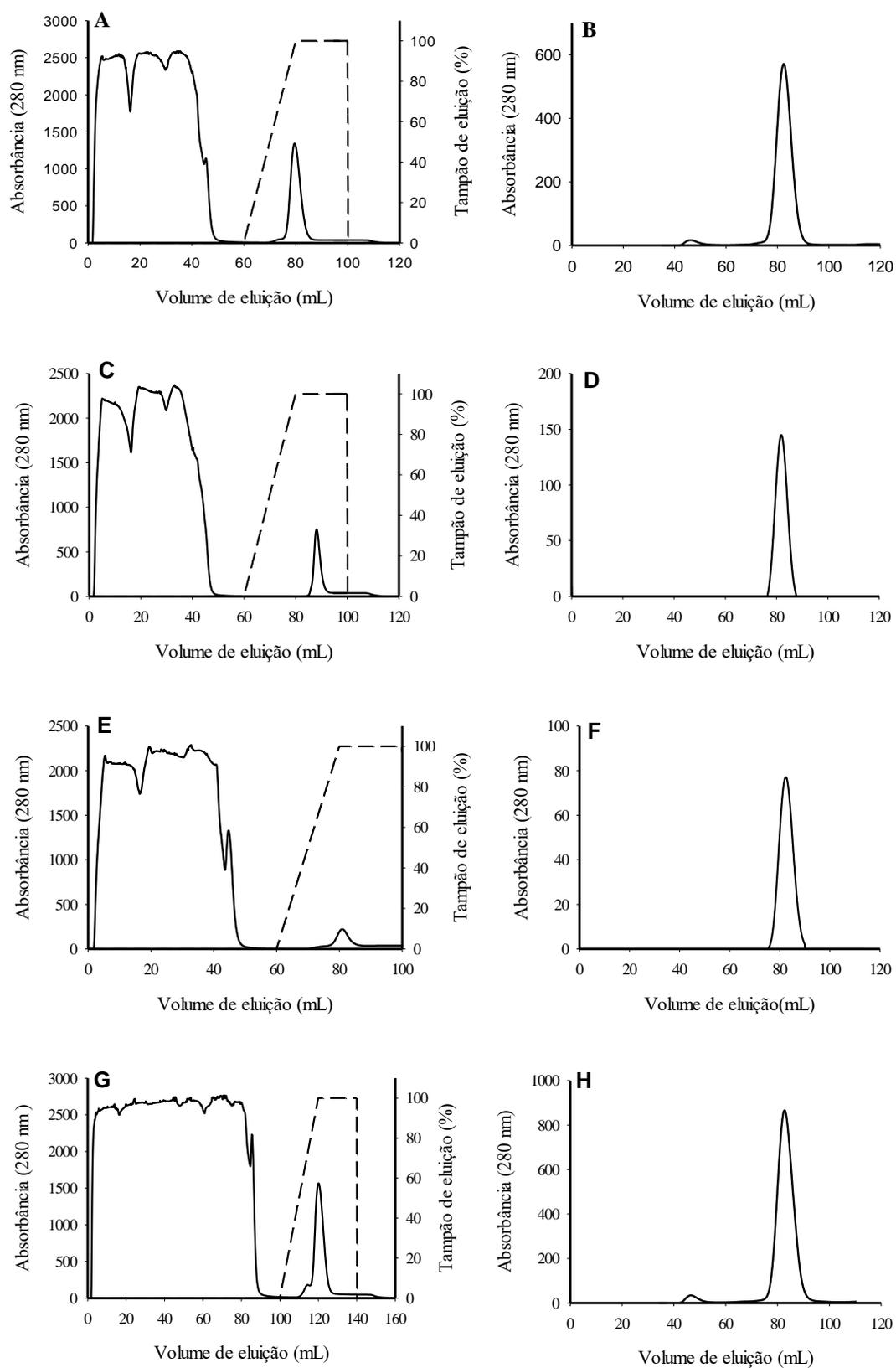


Figura 2: Purificação das proteínas mutantes de NahF-G150.

As proteínas foram purificadas por cromatografias de afinidade e gel filtração, e o respectivo perfil após cada etapa de purificação está apresentado nos cromatogramas: A e B - NahF-G150A; C e D - NahF-G150F; E e F - NahF-G150L; G e H - NahF-G150V.

As análises por SDS-PAGE mostraram que as proteínas mutantes NahF-G150A, NahF-G150F, NahF-G150L e NahF-G150V (Figura 3 A, B, C e D, respectivamente) foram obtidas predominantemente na fração solúvel após a lise celular (canaletas 2 da figura 3). Após as etapas de purificação, é possível verificar, a presença da banda proteica única em torno de 54 kDa (canaletas 7, figura 3), correspondente às proteínas de interesse.

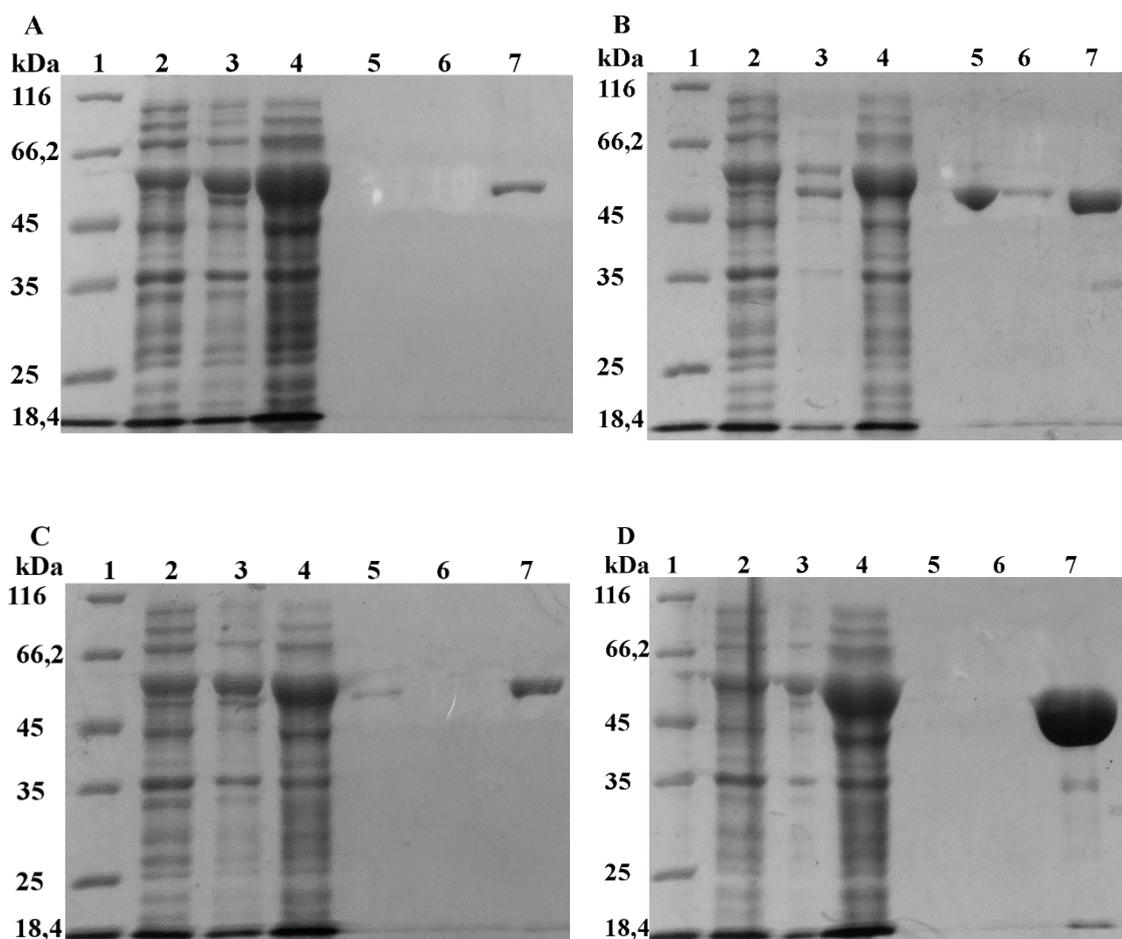


Figura 3: Análise por SDS-PAGE 12 % com amostras das proteínas mutantes de NahF-G150 eluídas após as etapas de purificação.

1 (Marcador molecular), 2 (extrato solúvel), 3 (extrato insolúvel), 4 (fração do flow through da afinidade), 5 e 6 (frações eluídas da afinidade), 7 (fração eluída da gel filtração). A – NahF-G150A; B – NahF-G150F; C – NahF-G150L; D – NahF-G150V. Massa molecular estimada para as proteínas mutantes NahF-G150 ~ 54,2 kDa.

Posteriormente, as proteínas mutantes G150A, G150F, G150L e G150V eluídas da cromatografia de gel filtração foram concentradas para 5 mg/mL e congeladas a -80°C com 30% (v/v) de glicerol para a realização dos testes de cinética enzimática. Entretanto,

nos testes de cinética, o mutante G150V não apresentou atividade enzimática significativa que pode ser mensurada frente os substratos analisados. Assim, os ensaios de atividade biológica foram conduzidos com os mutantes G150A, G150F e G150L.

3.2. Ensaios de cinética enzimática com os mutantes de NahF

Os testes de cinética demonstraram que os mutantes G150A, G150F e G150L foram capazes de oxidar os substratos salicilaldeído, 2-naftaldeído, benzaldeído, na presença de NAD^+ e os resultados estão apresentando na figura 4.

A atividade biológica das proteínas mutantes G150 de NahF foi avaliada utilizando os substratos aromáticos similares ao salicilaldeído, com o intuito de verificar se o aumento do volume ocupado pelo resíduo de aminoácido nesta posição tornaria o bolsão inacessível aos substratos aromáticos.

De acordo com os gráficos da cinética enzimática (Figura 4), pode-se perceber que a catálise com o salicilaldeído apresenta o comportamento da cinética do estado estacionário. Por outro lado, a cinética com os substratos benzaldeído e 2-naftaldeído não apresentaram o mesmo perfil. Esse comportamento evidenciado pelo declínio ao final da curva é característico de inibição pelo substrato, o que confere uma diminuição na velocidade de catálise em concentrações maiores do substrato.

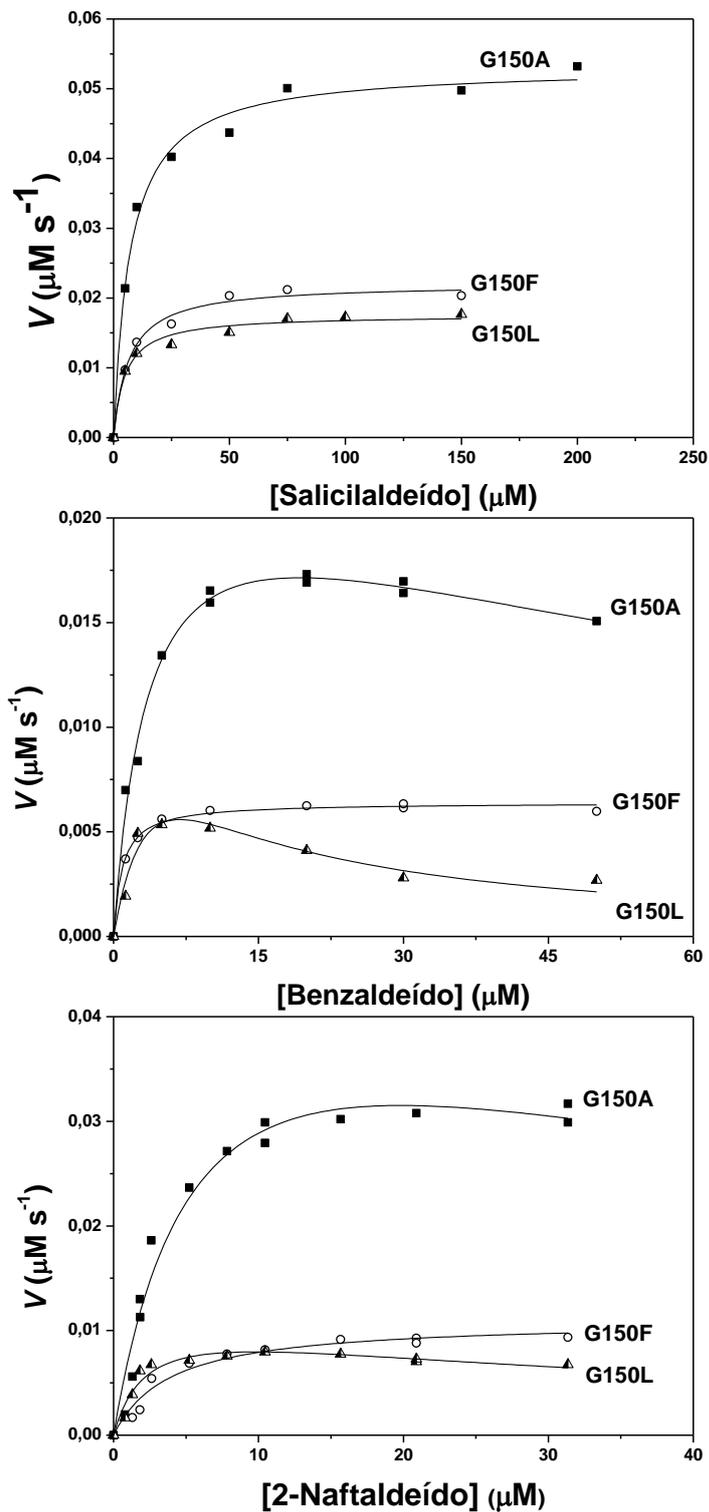


Figura 4: Gráficos de cinética enzimática para os mutantes NahF-G150A, NahF-G150F e NahF-G150L.

Os testes de cinética foram conduzidos com os substratos salicilaldeído, benzaldeído e 2-naftaldeído. A catálise foi realizada a 25 °C com tampão Hepes (50 mM pH 8,5, 1mM EDTA e força iônica de 0,2M NaCl), na presença de 200 μM de NAD^+ , como cofator.

As mutações foram inseridas na glicina na posição 150 em razão desse resíduo permitir a formação de um bolsão catalítico maior em NahF, o que permitiria a entrada de substratos maiores para a catálise. Assim, era esperado que o aumento do impedimento estérico exercido pelos grupos da cadeia lateral dos resíduos de aminoácidos fosse acompanhado da diminuição da catálise enzimática. E ainda, como o volume preenchido pelo salicilaldeído é menor do que o do benzaldeído e do 2-naftaldeído, respectivamente, era esperado que a catálise enzimática fosse mais ineficiente com o aumento do volume do substrato.

Dessa forma, é possível observar que o mutante NahF-G150A foi o que teve melhor desempenho na catálise com os substratos utilizados, seguido por G150F e G150L, respectivamente. Isso pode ser explicado pelo fato da alteração do resíduo de glicina por alanina não ser sido tão acentuado, por se tratarem de aminoácidos muito similares, o que não acontece com a fenilalanina e leucina, os quais são resíduos mais volumosos.

Os valores de k_{cat} , k_m e k_i , obtidos pelos ensaios cinéticos foram comparados com os parâmetros determinados anteriormente para a NahF *wild type* (COITINHO *et al.*, 2012) e podem ser vistos na tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros cinéticos da oxidação dos aldeídos aromáticos catalisados pelos mutantes G150A, G150F e G150L de NahF.

Os parâmetros cinéticos foram calculados através de regressão não linear dos dados de cinética enzimática com os substratos salicilaldeído, benzaldeído e 2-naftaldeído. Os valores obtidos foram comparados à enzima NahF wild type, anteriormente determinados (COITINHO *et al.*, 2012).

NahF	K_m μM	V_{max} nM s^{-1}	$[\text{E}]_0$ μM	k_{cat}^{ap} s^{-1}	K_i^a μM
Salicilaldeído					
<i>wild type</i>	2.48±0.30	194±4	15.3	12.7±0.3	NOB ^a
G150A	7.11±0.55	53.1±0.8	0.30	0.177±0.003	NOB ^a
G150F	6.47±0.58	22.0±0.4	0.35	0.063±0.001	NOB ^a
G150L	4.84±0.57	17.6±0.3	0.30	0.059±0.001	NOB ^a
Benzaldeído					
<i>wild type</i>	0.89±0.22	36±2	20.4	1.79±0.10	0.13±0.04
G150A	3.70±0.16	23.7±0.3	0.03	0.790±0.010	100±7
G150F	0.86±0.06	6.40±0.06	0.32	0.020±0.001	NOB ^a
G150L	5.08±0.58	13.9±0.6	0.32	0.043±0.002	9.28±0.95
2-Naftaldeído					
<i>wild type</i>	1.55±0.42	191±24	20.4	9.37±1.16	0.017±0.005
G150A	6.01±0.38	50.6±1.1	0.03	1.687±0.037	65±8
G150F	3.86±0.38	11.0±0.3	0.32	0.034±0.009	NOB ^a
G150L	2.27±0.22	11.6±0.3	0.32	0.036±0.009	42±5

^a Não foi observado inibição.

De acordo com o resultados da tabela 1, foi observado que com o salicilaldeído, a eficiência catalítica (k_{cat}) do mutante NahF-G150A foi reduzida cerca de 70 vezes, enquanto que para os mutantes NahF-G150F e NahF-G150L foi 200 vezes menor que a enzima NahF *wild type*. Considerando a catálise com o benzaldeído, pode-se perceber que o valor de k_{cat} para a enzima NahF-G150A foi reduzido em 2 vezes, para NahF-G150F cerca de 80 vezes e para NahF-G150L em torno de 40 vezes menor, em comparação com a NahF *wild type*. E ainda, a eficiência catalítica do mutante NahF-

G150A com o 2-naftaldeído foi reduzida em 5 vezes e para os mutantes NahF-G150F e NahF-G150L, foi 200 vezes menor que a enzima *wild type*.

Além disso, foi observado o comportamento de inibição pelo substrato. Este tipo de inibição ocorre quando em altas concentrações do substrato, uma segunda molécula do mesmo pode ser capaz de ligar ao complexo enzima-substrato, impedindo assim a formação e liberação do produto. O mecanismo é análogo para a inibição não-competitiva (CORNISH-BOWDEN; CORNISH-BOWDEN, 2012).

Para o benzaldeído, a constante de inibição (k_i) para o mutante NahF-G150A foi aumentada cerca de 700 vezes, enquanto que para o mutante NahF-G150L foi 70 vezes maior e o mutante NahF-G150F não apresentou inibição. Considerando o efeito inibitório para o 2-naftaldeído, o mutante NahF-G150L apresentou alto valor de inibição, porém menor do que o observado para o mutante NahF-G150A, o qual teve o maior valor de k_i em relação aos demais mutantes e à enzima *wild type* e o mutante NahF-G150F não foi observado inibição.

Desse modo, esses dados de cinética demonstram a importância da glicina na posição 150 na catálise de substratos aromáticos maiores, pois a alteração da glicina, na proteína NahF, por resíduos com maior impedimento estérico conferiu uma diminuição na eficiência catalítica dos mutantes com substratos mais volumosos.

3.3. Ensaios preliminares de difração de raios-X

Os mutantes foram cristalizados em condições similares aos descritos anteriormente (COITINHO *et al.*, 2012; COSTA, M. A. F., 2014) e os cristais de NahF-G150A, NahF-G150F, NahF-G150L e NahF-G150V apresentaram a mesma morfologia dos cristais da NahF nativa.

Contudo, quando os cristais foram colocados no feixe de raios-X não apresentaram padrão de difração e ao mesmo tempo perderam a característica cristalina

durante o tempo de exposição no feixe. Isso pode ser devido os cristais serem mais frágeis e não terem resistido ao transporte até o Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, em Campinas, e ao processo de congelamento.

Tendo em vista esta problemática, os ensaios de cristalização foram realizados *in locu* com o intuito de evitar os possíveis danos causados pelo transporte de Belo Horizonte a Campinas. Além disso, é importante ressaltar que é pouco provável que as mutações inseridas tenham sido responsáveis pela fragilidade *per si* dos cristais, uma vez que dados de difração de raios-X de cristais de proteínas mutantes são recorrentes em nosso grupo de pesquisa e também na literatura.

4. Perspectivas

- Avaliar a atividade enzimática dos mutantes com substratos aromáticos.
- Realizar testes de cristalização com os mutantes e proceder com a difração de raios-X para determinação da estrutura tridimensional dessas proteínas.

5. Referências

- ARTIMO, P. *et al.* ExpPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic acids research*, p. gks400, 2012.
- COITINHO, J. B. *et al.* Expression, purification and preliminary crystallographic studies of NahF, a salicylaldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida* G7 involved in naphthalene degradation. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, PMID: 22232182 PMCID: PMC3253845, v. 68, n. Pt 1, p. 93–97, 1 jan. 2012.
- CORNISH-BOWDEN, A. Fundamentals of enzyme kinetics. 2012.
- COSTA, M. A. F. *Caracterização estrutural da Proteína Sm21.7 recombinante de Schistosoma mansoni*. 2014. Tese – Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.
- GUIMARAES, B. G. *et al.* The MX2 macromolecular crystallography beamline: a wiggler X-ray source at the LNLS. *Journal of synchrotron radiation*, v. 16, n. 1, p. 69–75, 2009.
- PEROZICH, J.; NICHOLAS, H.; WANG, B.; *et al.* Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family. *Protein Science*, v. 8, n. 1, p. 137–146, 1999.
- PEROZICH, J.; NICHOLAS, H.; LINDAHL, R.; *et al.* The big book of aldehyde dehydrogenase sequences. *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism 7*. [S.l.]: Springer, 1999. p. 1–7.