

Universidade Federal De Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Mozart Silvio Pereira

**ESTUDOS SOBRE OS MECANISMO DE CATÁLISE, CONTROLE E
RECONHECIMENTO MOLECULAR DE ENZIMAS DA VIA DE
DEGRADAÇÃO DO NAFTALENO**

**Belo Horizonte
2022**

UFMG/ICEX/DQ. 1480

T. 674

Mozart Silvio Pereira

**Estudo sobre os mecanismos de catálise, controle e
reconhecimento molecular de enzimas da via de degradação do
naftaleno**

Tese apresentada ao Departamento
de Química do Instituto de Ciências
Exatas da Universidade Federal de
Minas Gerais como requisito parcial
para a obtenção do grau de
Doutor em Ciências - Química.
Orientador: Tiago Antônio da Silva
Brandão
Coorientador: Willian Ricardo Rocha

Belo Horizonte

2022

Ficha Catalográfica

P436e
2022
T

Pereira, Mozart Silvio.

Estudos sobre o mecanismo de catálise, controle e reconhecimento molecular de enzimas da via de degradação do naftaleno [manuscrito] / Mozart Silvio Pereira. 2022.

168 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Tiago Antônio da Silva Brandão.

Coorientador: Willian Ricardo Rocha.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Química.

Bibliografia: f. 135-151.

Anexos: f. 152-168.

1. Química orgânica – Teses. 2. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos – Teses. 3. Naftaleno – Teses. 4. Biorremediação – Teses. 5. Pseudomonas – Teses. 6. Enzimas – Teses. 7. Catálise – Teses. 8. Salicilatos – Teses. 9. Inibidores enzimáticos – Teses. 10. Cinética de enzimas – Teses. 11. Cromatografia de afinidade – Teses. I. Brandão, Tiago Antônio da Silva, Orientador. II. Rocha, Willian Ricardo, Coorientador. III. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



"Estudos sobre o Mecanismo de Catálise, Controle e Reconhecimento Molecular de Enzimas da Via de Degradação do Nafaleno"

Mozart Silvío Pereira

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Tiago Antônio da Silva Brandão - Orientador
UFMG

Prof. Willian Ricardo Rocha - Coorientador
UFMG

Prof. Roberto Kopke Salinas
USP

Prof. Teodorico de Castro Ramalho
UFLA

Prof. Adolfo Henrique de Moraes Silva
UFMG

Prof. Jarbas Magalhães Resende
UFMG

Belo Horizonte, 20 de janeiro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Teodorico de Castro Ramalho, Usuário Externo**, em 20/01/2022, às 18:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tiago Antonio da Silva Brandao, Professor do Magistério Superior**, em 20/01/2022, às 18:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adolfo Henrique de Moraes Silva, Professor do Magistério Superior**, em 20/01/2022, às 18:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jarbas Magalhaes Resende, Professor do Magistério Superior**, em 20/01/2022, às 18:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Willian Ricardo Rocha, Professor do Magistério Superior**, em 21/01/2022, às 13:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Roberto Kopke Salinas, Usuário Externo**, em 25/01/2022, às 12:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1199166** e o código CRC **6987715A**.

AGRADECIMENTOS

A Deus, o todo que está em tudo, que me faz sentir a centelha divina todos os dias me lembrando da real natureza que pertenço.

Ao professor Tiago Brandão, pelo entusiasmo em ensinar e pelo grande suporte durante a realização deste trabalho e ao longo de todos os anos que trabalhamos juntos.

Ao Professor Wiliam por toda sua ajuda e empenho nos dados computacionais e orientação.

À minha família pelo seu amor, em especial à minha mãe Néria e minha esposa Gislane pelo seu amor, companhia, paciência e compreensão e ao meu filho João Miguel, o meu professor do significado de amor incondicional. Aos meus mentores espirituais que me inspiram e me aturam ao longo da jornada carnal.

Aos meus amigos Danniell Mendes e Gabriel Franco, Heveline Arruda, Isabel Valero, Karina Fernanda, Welerson de Jesus, pessoas que considero como a família que escolhi no percurso da vida.

Aos meus amigos e colegas do laboratório Macromol pelo companheirismo em especial a Samara Bahia por toda sua sensibilidade e acolhimento, ao Diego Magno por sua paciência e amizade ao longo desses anos me ouvindo falar sobre ciência e espiritualidade.

Ao Dr. Gabriel Libânio por disponibilizar o programa *onion analyzer*, facilitando exponencialmente a análise dos dados ONIOM.

Aos membros da banca examinadora, titulares e suplentes.

Aos professores e funcionários do Departamento de Química.

À Capes, INCT-Catálise/CNPq, FAPEMIG e a UFMG, pelo apoio financeiro.

“A simplicidade é o último degrau da sabedoria.”

Khalil Gibran

Resumo

O naftaleno é um dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos mais comumente encontrado no ambiente. A degradação do naftaleno por *Pseudomonas putida* G7 se deve à presença do plasmídeo NAH7, que codifica as enzimas da *via* superior envolvidas na conversão do naftaleno a salicilato, e às enzimas da *via* inferior envolvidas na conversão do salicilato a piruvato e acetato. Este trabalho buscou o entendimento das características estruturais e reacionais das enzimas NahC, NahF, NahI e NahG desta *via*. Em relação a NahC, este trabalho versou sobre estudos computacionais sobre o sítio ativo da NahC para avaliar a interação do centro metálico de ferro com os substratos 1,2-dihidroxi-naftaleno e dióxigênio. Os estados de *spin* das estruturas que melhor descreveram os sistemas foram os estados singleto e tripleto para o complexo NahC-1,2-dihidroxi-naftaleno e NahC-1,2-dihidroxi-naftaleno-dióxigênio, respectivamente. Cálculos ONIOM mostraram que os resíduos H200, H246 e Y256, presentes na segunda esfera de coordenação do metal, são potencialmente importantes para o mecanismo de catálise da NahC. Estudos de inibição do salicilato nas enzimas NahF e NahI foram realizados para melhor entendimento da participação dessas duas aldeído desidrogenases na *via* metabólica da *Pseudomonas putida* G7. O perfil de inibição mostrou um tipo misto de inibição em que o inibidor se liga tanto ao sítio de ligação do substrato quanto do cofator, sendo que a NahI exibe uma maior sensibilidade a essa inibição em relação a NahF. Em relação a NahG, o trabalho buscou um entendimento da dinâmica da alça proteica que afeta a catálise enzimática. Para isso, foram explorados estudos com cofatores truncados que mostraram mudanças nos valores de K_d e k_{cat} consistentes com alterações na energia de interação do cofator FAD. Experimentos de mutação sítio dirigida na alça de ligação do FAD foram feitos, para avaliar resíduos importantes tanto na ligação do FAD quanto na catálise da enzima NahG.

Palavras-chave: Biorremediação. Enzima. Inibição. Salicilato. Truncagem.

Abstract

Naphthalene is one of the most common polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment. The degradation of naphthalene by *Pseudomonas putida* G7 is due to the presence of the NAH7 plasmid encoding the higher pathway enzymes involved in the conversion of naphthalene to salicylate and the lower pathway enzymes involved in the conversion of salicylate to pyruvate and acetate. This work aimed to understand the structural and reactional characteristics of NahC, NahF, NahI, and NahG of this pathway. In relation to NahC, this work focused on studies on the NahC active site to evaluate the interaction of the iron center with the 1,2-dihydroxynaphthalene and dioxygen substrates. The spin states of the structures that best described the systems were the singlet and triplet state for the NahC-1,2-dihydroxynaphthalene and NahC-1,2-dihydroxynaphthalene-dioxygen complex, respectively. ONIOM calculations showed that residues H200, H246 and Y256 in the second coordination sphere of the metal are potentially important for the catalysis mechanism of NahC. Salicylate inhibition studies on the NahF and NahI enzymes were performed for a better understanding of the role of these two aldehyde dehydrogenases in the metabolic pathway of *Pseudomonas putida* G7. The inhibition profile showed a mixed type of inhibition wherein the inhibitor binds to both the substrate binding site and the cofactor, for which NahI exhibited a greater sensitivity to inhibition regard NahF. In relation to NahG, the work aimed to understand the protein dynamics and interactions with FAD affecting the enzymatic catalysis. The studies with truncated cofactors showed changes in K_d and k_{cat} values consistent with changes in the interaction energy of the FAD cofactor. Site-directed mutation experiments in the FAD binding loop were performed to evaluate the role of important residues in both FAD binding and NahG enzyme catalysis.

Keywords: Bioremediation. Enzyme. Inhibition. Salicylate. Truncation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-1: Estrutura química dos dezesseis principais HAPs monitorados no meio ambiente pela EPA. Fonte: Adaptado de Habe, 2003. ³	23
Figura 1-2: Mecanismo de ativação dos HAP, formação de adutos e danos ao DNA via a formação de diol-epóxidos. Fonte: Adaptado de Jacques, 2007. ⁷	24
Figura 2-1: Reação de conversão do 1,2-dihidroxi-naftaleno em ácido 2-hidroxi-2H-cromeno-2-carboxílico catalisada pela NahC. Fonte: o autor.....	29
Figura 2-2: Estrutura cristalográfica do homodímero da glioxilase (PDB 1BLY) que degrada bleomicina. A estrutura conservada $\beta\alpha\beta\beta$ está destacada em azul (motivos em conformação β) e vermelho (motivo α -helicoidal). Fonte: adaptado de Bergdoll et al, 1998. ¹⁶	30
Figura 2-3: Ambiente de coordenação do Fe^{2+} formado por dois resíduos de histidina e um grupo carboxilato na enzima alfa-cetoglutarato, PDB: 1OS7. Fonte: o autor...	31
Figura 2-4: posição espacial das cadeias laterais dos resíduos altamente conservados Y249, H194 e H240 da BphC, PDB: 1KW6. Fonte: o autor.	32
Figura 2-5: a) resíduos hidrofóbicos que formam a cavidade de 20 Å da alfa hélice. fonte :Armstrong et al ¹⁸ b) Resíduo de histidina da primeira folha beta em destaque. Fonte: Kauppi et al ¹⁹	Erro! Indicador não definido.
Figura 2-6: Estrutura do sítio ativo da 2,3-dihydroxibifenil 1,2-dioxigenase sem o substrato, mostrando os principais resíduos de aminoácidos conservados do sítio ativo e o ambiente de coordenação do íon ferro (II). Fonte:Vaillancourt et al, 2006. ²¹	34
Figura 2-7: Sobreposição de estruturas cristalográficas mostrando o sítio ativo da enzima 2,3-dioxigenase e comparando a estabilização do intermediário na enzima nativa versus o mutante H200C. Fonte: Meier et al, 2015. ³¹	37
Figura 2-8: (a): Estruturas otimizadas dos adutos Fe-O ₂ e comprimentos das ligações entre os átomos envolvidos na reação; (b): Estruturas otimizadas dos estados de transição e comprimentos das ligações entre os átomos envolvidos na reação de clivagem oxidativa de 2-aminofenol pela 2-aminofenol dioxigenase. Fonte: Dong et al. ³⁰	38
Figura 2-9: Conversão do mio-inositol em glicuronato pela dioxigenase MIOX. Fonte: Hirao 2009 ⁴⁹	42
Figura 2-10: Mudança geométrica durante a etapa de clivagem C–H catalisada pela MIOX. Fonte: Hirao 2009 ⁴⁹	43

Figura 2-11: (A) Estrutura cristalográfica da extradiol dioxigenase (B) Modelo estrutural do sítio ativo NahC construído a partir da mesma enzima (PDB 2EI1). Fonte: o autor.....	46
Figura 2-12: Sobreposição entre a estrutura cristalográfica (bege) PDB: 2EI1 e as estruturas otimizadas, no nível de teoria B3LYP/def2-TZVP dos estados: a) singleto, b) tripleto e c) quinteto (azul). Fonte: o autor. ...	Erro! Indicador não definido.
Figura 2-13: Sobreposição entre a estrutura cristalográfica (bege) PDB: 2EI1 e as estruturas otimizadas, no nível de teoria B3LYP/def2-TZVP dos estados a) tripleto, b) quinteto e c) septeto respectivamente em azul com o dado cristalográfico em bege. Fonte: o autor.	Erro! Indicador não definido.
Figura 2-14: Otimização cálculo ONIOM da enzima completa com o método híbrido. ONIOM (B3LYP/:UFF) mostrando a geometria octaédrica em torno do íon ferro II do sítio ativo da NahC. Fonte: o autor.....	50
Figura 2-15: Interação da Histidina 200 da segunda esfera de coordenação com a água presente no sítio ativo da NahC. Fonte: o autor.	51
Figura 2-16: a) Sobreposição entre a estrutura otimizada pelo cálculo ONIOM sem o dioxigênio (bege) com a molécula de água 1 coordenada, e a espécie Fe-superóxido obtida pelo cálculo ONIOM (DFT/B3LYP: UFF) (Azul) com a molécula de água 2 interagindo com a H200. b) Sobreposição entre a estrutura cristalográfica (Azul) PDB: 2EI1 e a espécie Fe-superóxido obtida pelo cálculo ONIOM (Bege) (DFT/B3LYP: UFF). Fonte: o autor.....	52
Figura 2-17: Interação da Histidina 200 da segunda esfera de coordenação com a água deslocada, após a inserção do dioxigênio no sítio ativo da NahC. Fonte: o autor.	53
Figura 2-18: Dados do cálculo ONIOM do sítio ativo da NahC ligado ao substrato, mostrando a interação do resíduo de Y256 com o substrato.	54
Figura 2-19: Dados do cálculo ONIOM do sítio ativo da NahC do intermediário superóxido destacando a interação do resíduo de Y256 com o substrato. Fonte: o autor.....	54
Figura 2-20: Dados do cálculo ONIOM do sítio ativo da NahC ligado ao substrato. a) Interação do resíduo de E266 com o substrato da NahC e b) interações da H247 com o E266 e H247 com substrato da NahC. Fonte: o autor.	55
Figura 2-21: Dados do cálculo ONIOM do sítio ativo da NahC do intermediário epóxido da NahC (azul) sobreposto com o dado cristalográfico da NahC (bege) PDB 2EI1 Fonte: o autor.....	56

Figura 2-22: Dados do cálculo ONIOM do sítio ativo da NahC do intermediário lactona da NahC em (a) destacando a interação do intermediário com o resíduo E266 e, b) interações importantes na estabilização do intermediário lactona. Fonte: o autor.	Erro! Indicador não definido.
Figura 3-1: Síntese do FAD a partir da Riboflavina ou FMN. Fonte: o autor.....	62
Figura 3-2: Estados de ionização da flavina. Fonte: o autor.	63
Figura 3-3: Difusão do dioxigênio através de túneis que convergem para a flavina reativa onde os resíduos de passagem podem operar como controle da reação da flavina com o dioxigênio. Fonte: adaptado de Hiromoto et al. ⁸⁰	65
Figura 3-4: Três conformações possíveis adotadas na catálise por PHBH: aberta, fechada e externa. Fonte: Ballou et al, 2005. ⁷⁵	70
Figura 3-5: Atividade enzimática da NahG em função da concentração de FMN após incubação com 0,4 μM de FAD na presença de 200 μM de NADH e 120 μM de salicilato. Fonte: o autor.....	80
Figura 3-6: Perfis cinéticos para (a) riboflavina, (b) FMN e (c) FAD para a oxidação catalisada de NADH (200 μM) por NahG na presença de salicilato (150 μM) na ausência e presença de AMP e ADP a pH 8,5, I = 0,21 M (NaCl) e 25 °C. Os ajustes dos dados foram de acordo com a Eq. 1. Fonte o autor.	81
Figura 3-7: Perfis cinéticos para (a) AMP e (b) ADP ativando a oxidação catalisada de NADH (200 μM) por NahG na presença de salicilato (150 μM) e as flavinas, riboflavina, FMN e FAD, a pH 8,5, I = 0,21 (NaCl) e 25 °C.....	85
Figura 3-8: Flavoproteínas homólogas mostrando os diferentes estados conformacionais na fenda de ligação do FAD: (a)enzima Conformação da alça de E38 a G53 da conformação fechada da NahG na forma Apo (PDB 6BZ5); (b) conformação aberta do mesmo loop correspondente da holoenzima PhzS de Pseudomonas aeruginosa (PDB 3C96) (c)conformação externa do mesmo loop da holoenzima 3HB6H da Rhodococcus jostii (PDB 4BJZ) O salicilato (Sal) foi modelado considerando a posição correspondente do 2,4-dihidroxibenzoato na estrutura cristalográfica da 4-hidroxibenzoato hidroxilase 4HBH, (PDB 1DOD). ...	88
Figura 3-9: Perfis cinéticos para a oxidação do salicilato catalisada pela NahG em concentrações crescentes de fosfito na presença de riboflavina 69 μM , AMP 150 μM , NADH 200 μM e 150 μM de salicilato; FMN 20 μM , AMP 75 μM , NADH 200 μM , 150 μM de salicilato; na presença de salicilato (150 μM) na ausência e presença de AMP e ADP a pH 8,5, I = 0,21 M (NaCl) e 25 °C. Fonte: o autor.	90

Figura 3-10:Perfis cinéticos para NADH usando (a) riboflavina, (b) FMN, (c) FAD para mediar a oxidação catalisada de NADH na presença de salicilato (150 µM) e ausência e presença de AMP e ADP a pH 8,5, I = 0,21 (NaCl) e 25 °C.	93
Figura 3-11: Cromatograma das purificações por exclusão molecular da NahG nativa e mutantes utilizando a coluna Hiprep™ 26/10 desalting eluída isocraticamente a 1,5 mL/min com tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,4, contendo NaCl 50mM. Fonte; o autor.....	95
Figura 3-12: Velocidade de reação em função da concentração de ácido salicílico, FAD e NADH para reação de conversão de salicilato em catecol catalisada pelas variantes da NahG (a) E38A, b) D314A, c) H110N em pH 8,5 e 25 °C.	97
Figura 4-1: Representação esquemática do enovelamento de Rossmann: uma repetição consecutiva de porções compreendendo diversas fitas-β (em amarelo), uma alça de conexão (verde) e hélices-α (laranja). As fitas-β formam um núcleo de fitas na ordem 3-2-1-4-5-6. A dobra de Rossmann compreende duas repetições consecutivas, cada uma compreendendo de fitas-β (3-2-1 e 4-5-6) e duas hélices-α. Fonte: Laurino et al, 2016.¹⁰⁸	103
Figura 4-2: Diferentes conformações da porção da nicotinamida e a orientação do anel de adenina de NAD demonstrada na ALDH1 de ovelha e ALDH2 bovina (PDB: 1BXS e 1A4Z), ALDH1 (cinza escuro) e ALDH2 (cinza claro) modelados com a sobreposição com NAD⁺ em amarelo e azul, respectivamente. As medições demonstram um deslocamento aproximado de 5 Å da porção nicotinamida. Os principais resíduos de ligação do cofator são destacados em vermelho. Fonte: Adaptado de Moore et al 1998.¹⁰⁷	105
Figura 4-3: As duas conformações observadas para REA e NAD⁺ são acopladas conforme indicado pelas setas, um par representando o estado fechado (no monD) e o estado aberto (no monC) que representa a conformação de liberação do produto. O resíduo E280 oscila entre duas conformações seguindo aquelas observadas para os ligantes. Fonte: Adaptado de Moretti et al, 2016¹¹³.....	107
Figura 4-4: :Sobreposição das estruturas cristalográficas da NahI (Azul) e NahF (Bege) (PDB 4JZ6) das duas aldeído desidrogenase da via de degradação do naftaleno em PpG7. A sobreposição possuiu um valor de RMSD de 1,65Å para 350 átomos. Fonte: o autor.....	117
Figura 4-5: Perfil de inibição das enzimas NahF (a) e NAhI (b) em concentrações crescentes de salicilato. As reações foram realizadas na presença de salicilaldeído 50 µM, pH 8,5, I=0,2 e 25°C. Fonte: o autor.....	124

Figura 4-6: Perfil das cinéticas obtidas para a NahF a diferentes concentrações de inibidor e substrato, na presença de 200 μM de NAD^+ em pH 8,5, $I = 0,2$ e 25°C. Fonte: o autor.....	125
Figura 4-7: Perfil das cinéticas obtidas para a NahF a diferentes concentrações de inibidor e cofator, na presença de 50 μM de salicilaldeído em pH 8,5, $I = 0,2$ e 25°C. Fonte: o autor.....	126
Figura 4-8: Perfil das cinéticas obtidas para a Nahl a diferentes concentrações de inibidor e substrato em pH 8,5, $I=0,2$ e 25°C. Fonte: o autor.....	127
Figura 4-9: Perfil das cinéticas obtidas para a Nahl em diferentes concentrações de inibidor e cofator, na presença de 33 μM de 2-hidróxi muconato semialdeído em pH 8,5, $I = 0,2$ e 25°C. Fonte: o autor.....	128
Figura 4-10: Interações do salicilato com os resíduos de aminoácidos W163, E254, L160, F448, L289, F456, R450 e R106 no sítio catalítico da Nahl. Fonte: o autor.	130
Figura 4-11: Imagem da interação do salicilato com os resíduos de aminoácidos L158, Y236, Y220 e K178 do sítio de ligação do cofator da Nahl. Fonte: o autor.	131

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1-1: Via metabólica de degradação do naftaleno da bactéria <i>Pseudomonas putida</i> da cepa G7 (PpG7). Em destaque, as reações catalisadas pelas enzimas que serão estudadas neste trabalho. Fonte: o autor.....	26
Esquema 2-1 Mecanismo proposto para extradiol dioxigenases ilustrando os estados intermediários importantes na oxidação de catecóis. Detalhes sobre o mecanismo podem ser encontrados no texto. Fonte: Christian 2012. ²²	35
Esquema 3-1: Redução da flavina e a formação do C-4 α -hidroperoxiflavina e os caminhos produtivo e improdutivo em uma monooxigenase.	64
Esquema 3-2: Possíveis caminhos de ativação do dioxigênio pela flavina via C4 α em A e via N5 em B. Fonte: O autor.	67
Esquema 3-3: Mecanismo proposto para a salicilato hidroxilase NahG via SEAr. Fonte: Adaptado de Costa et al, 2019. ⁷⁹	69
Esquema 3-4: Truncagem do cofator FAD, as linhas pontilhadas indicam as ligações covalentes rompidas resultando nos cofatores cataliticamente ativos. Fonte: o autor.....	78
Esquema 3-5: Possíveis espécies formadas e os caminhos reacionais com a truncagem da flavina (Flav) e a ativação de nucleotídeos AMP e ADP (Nu).....	83
Esquema 4-1: Mecanismo proposto para as enzimas da superfamília das ALDHs. Fonte: adaptado de Coitinho et al, 2016. ¹¹⁴	102
Esquema 4-2: Equilíbrios reacionais de inibição mista do salicilato nas reações catalisadas pelas enzimas a) NahF e b) NahI.....	118
Esquema 4-3: Via de oxidação de naftaleno, salicilato e catecol. Em destaque, estão as enzimas NahF, NahG e NahI. Fonte: adaptado de You et. al. ¹³¹	132

LISTA DE TABELAS

Tabela 3-1: Massa molares (MM) e absorvidade molares (ϵ) a 280 nm para a NahG nativa e mutantes. Esses valores foram obtidos pelo servidor PROTEIN CALCULATOR v3.4, disponível em http://protcalc.sourceforge.net	72
Tabela 3-2: Dados cinéticos do efeito de diferentes flavinas na oxidação do NADH e na descarboxilação oxidativa do salicilato catalisada por NahG em pH 8,5, I = 0,21M (NaCl) e 25 °C. Os valores entre parênteses são proporções em relação ao FAD. Os erros são desvios padrão.	82
Tabela 3-3: Dados cinéticos e termodinâmicos para o efeito de diferentes ativadores na descarboxilação oxidativa de salicilato catalisado por NahG ligado a diferentes flavinas a pH 8,5, I = 0,21 M (NaCl) e 25 °C.	86
Tabela 3-4: Dados cinéticos e termodinâmicos para o efeito do fosfito na descarboxilação oxidativa de salicilato catalisado por NahG ligado a diferentes flavinas e nucleotídeos de adenosina a pH 8,5, I = 0,21 M (NaCl) e 25 °C.	91
Tabela 3-5: Parâmetros de Michaelis-Menten para NADH em sua oxidação catalisada por NahG ligado a diferentes flavinas na presença de salicilato (150 μ M) a pH 8,5, I = 0,21 M (NaCl) e 25 °C. Os valores entre parênteses são proporções em relação ao FAD.	94
Tabela 3-6: Parâmetros cinéticos para o ácido salicílico, FAD e NADH na reação de conversão de salicilato em catecol catalisada pelas variantes da NahG Nativa, E38A, D314A e H110N em pH 8,5 e 25 °C.....	98
Tabela 4-1: Valores de K_m , k_{cat} para salicilaldeído na reação catalisada pela NahF em 200 μ M de NAD^+ e diferentes concentrações de salicilato em pH 8,5, I=0,2 e 25°C. Fonte: o autor.	126
Tabela 4-2 Valores de K_m , k_{cat} para o NAD^+ na reação catalisada pela NahF na presença 50 μ M de salicilaldeído e diferentes concentrações de salicilato em pH 8,5, I=0,2 e 25°C. Fonte: o autor.	127
Tabela 4-3: Valores de K_m , k_{cat} para 2-hidróxi muconato semialdeído na reação catalisada pela NahF em 200 μ M de NAD^+ e diferentes concentrações de salicilato em pH 8,5, I=0,2 e 25°C. Fonte: o autor.....	128
Tabela 4-4 Valores de K_m , k_{cat} para o NAD^+ na reação catalisada pela NahF na presença 30 μ M de 2-hidróxi muconato semialdeído e diferentes concentrações de salicilato em pH 8,5, I=0,2 e 25°C. Fonte: o autor.....	129

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
ALDH	Aldeído Desidrogenase
AMP	Adenosina monofosfato
DFT	Teoria do Funcional de Densidade
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino tetra-acético
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
EPR	Ressonância Paramagnética Eletrônica
FAD	Dinucleótideo de Flavina e Adenina
FMN	Mononucleótideo de Flavina
HAPs	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
IPTG	β -D-1-tiogalactopiranosido de isopropilo
LB	Luria-Bertani
MM	Mecânica Molecular
NAD ⁺	Dinucleótideo de Nicotinamida e Adenina, forma oxidada
NADH	Dinucleótideo de Nicotinamida e Adenina, forma reduzida
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PB	Pares de Base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDB	Protein Data Bank
PHBH	<i>p</i> -Hidroxi-Benzoato Hidroxilase
Pi	Fosfato inorgânico

PpG7 *Pseudomonas putida cepa G7*

QM Mecânica Quântica

QOV Quelantes de oxigênio vicinal

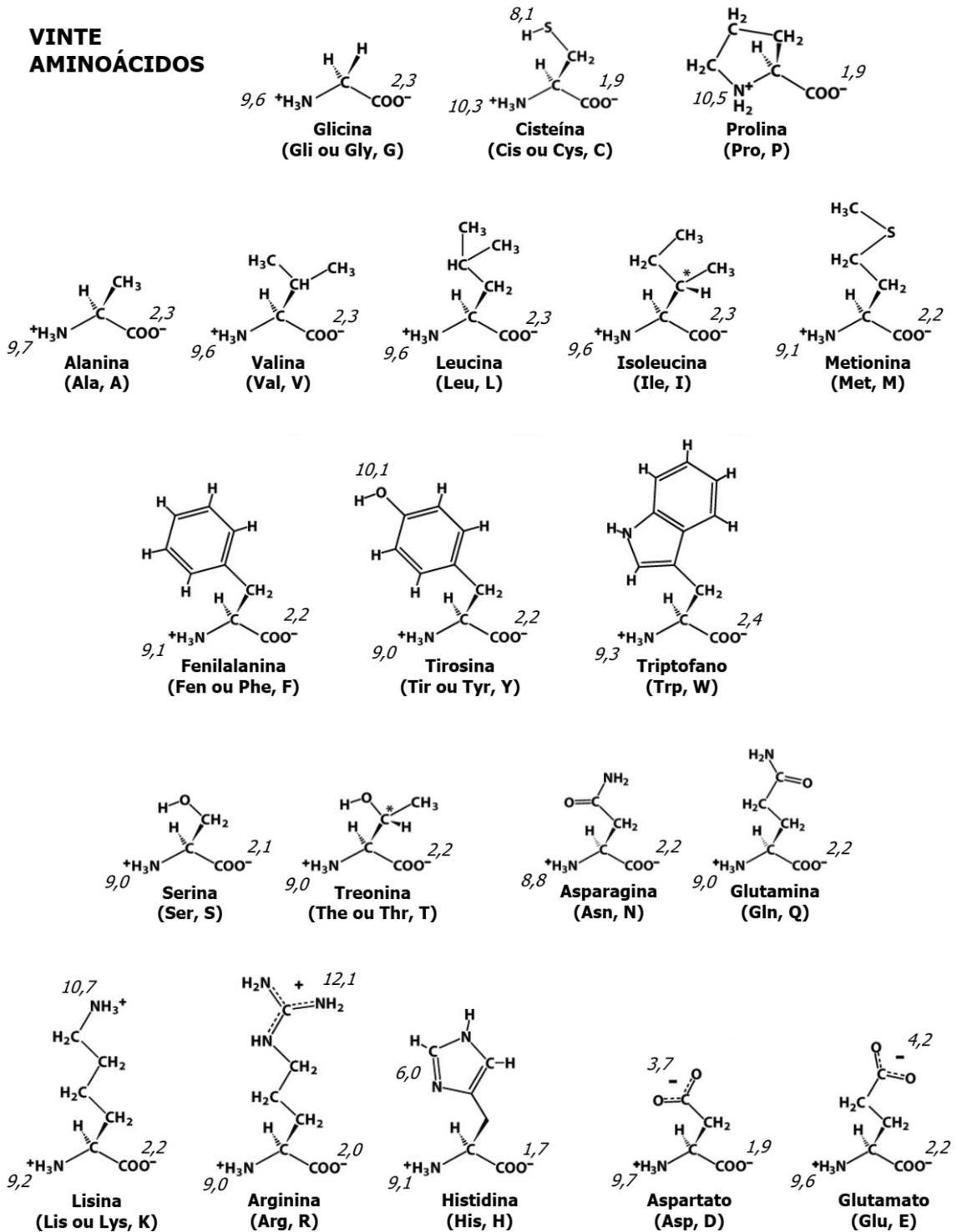
RPM Rotação por minuto

SDS Dodecil Sulfato de Sódio

UV-Vis Ultra Violeta-Visível

LISTA DE AMINOÁCIDOS

VINTE AMINOÁCIDOS



As cargas nas cadeias laterais correspondem ao pH fisiológico de 7,4
Os pK_a s em itálico correspondem as formas ácidas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	22
1.1	HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS.....	22
1.2	BIORREMEDIAÇÃO.....	24
1.3	OBJETIVOS GERAIS.....	28
2	EXTRADIOL DIOXIGENASES E A NAHC	29
2.1	OBJETIVOS.....	44
2.2	METODOLOGIA	45
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
2.4	CONCLUSÕES	60
3	MONOOXIGENASES FLAVODEPENDENTES.....	61
3.1	OBJETIVOS.....	71
3.2	METODOLOGIA	72
3.2.1	<i>Expressão da 6xHis-NahG nativa e mutantes.....</i>	<i>72</i>
3.2.2	<i>Purificação por cromatografia de afinidade e exclusão molecular</i>	<i>73</i>
3.2.3	<i>Estudos de cinética enzimática.....</i>	<i>74</i>
3.2.4	<i>Determinação da quantidade de peróxido formado no meio reacional</i>	<i>75</i>
3.2.5	<i>Ensaio de incubação de FMN.....</i>	<i>76</i>
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
3.3.1	<i>Estudos com a truncagem do cofator FAD</i>	<i>77</i>
3.3.2	<i>Estudos cinéticos com as variantes mutantes da NahG</i>	<i>95</i>
3.4	CONCLUSÕES	99
4	ALDEÍDO DESIDROGENASE.....	100
4.1	OBJETIVOS.....	112
4.2	METODOLOGIA	113
4.2.1	<i>Expressão das proteínas recombinantes NahF e NahI de P. putida</i>	<i>113</i>
4.2.2	<i>Purificação das proteínas recombinantes NahF e NahI de P. putida</i>	<i>113</i>
4.2.3	<i>Ensaio cinético de inibição da NahF e NahI.....</i>	<i>114</i>
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	116
4.4	CONCLUSÕES	133
5	CONCLUSÕES GERAIS	134
	REFERÊNCIAS.....	135
	ANEXO A	152

ANEXO B PARTICIPAÇÃO DE CONGRESSOS E MINICURSOS	163
ANEXO C --- PUBLICAÇÕES	165
ANEXO D --- CÁLCULOS OM PROGRAMA BOKIN.....	166

1 INTRODUÇÃO GERAL

Esta introdução consistirá em uma apresentação sobre o uso do petróleo e as características físico-químicas e reacionais dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HAPs) que o compõe. No âmbito da biorremediação desses compostos, também será apresentada uma descrição estrutural e reacional das enzimas foco deste trabalho, NahC, NahF, NahI e NahG, pertencentes à *via* de degradação do naftaleno na bactéria *Pseudomonas putida* da cepa G7 (*PpG7*). Essa bactéria adquiriu evolutivamente uma maquinaria enzimática capaz de utilizar os HAPs como única fonte de carbono, tornando-se, assim, um alvo interessante para a biorremediação.

1.1 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

Na sociedade moderna o petróleo é considerado um dos principais recursos naturais, sendo aplicado como matéria-prima para inúmeros insumos e, também, como fonte de energia. O petróleo é uma mistura complexa de uma miríade de moléculas orgânicas, sendo, em sua maioria, hidrocarbonetos alifáticos, alicíclicos e aromáticos e, em sua minoria, compostos nitrogenados, oxigenados, sulfurados e com íons metálicos.^{1,2} É do petróleo que a sociedade moderna extrai os principais combustíveis para veículos automotores, embarcações e aeronaves. Além disso, do refino do petróleo obtém-se diversos materiais para a fabricação de uma vasta gama de produtos de constante demanda, como parafinas, lubrificantes, mantas asfálticas, solventes orgânicos, plásticos, entre outros.

A exploração do petróleo traz sérias consequências, devido a uma grande variedade de poluentes ser liberada no meio ambiente em decorrência de sua extração e o uso de seus derivados. Derramamentos de óleo cru durante perfurações em poços marítimos ou acidentes durante seu transporte são bastante conhecidos e bem reportados pela mídia devido às grandes dimensões que tais contaminações podem tomar.

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) são compostos constituídos de dois ou mais anéis benzênicos ligados covalentemente. Esses compostos estão amplamente distribuídos no ambiente, sendo formados naturalmente a partir da combustão incompleta da matéria orgânica, do carvão, diesel e madeira.³ O HAPs também podem ser introduzidos no meio ambiente de forma antropogênica, como por exemplo, em derramamentos de derivados do petróleo e por processos industriais como a liquefação do carvão em alcatrão de hulha. Esses compostos são hidrofóbicos, possuem baixa solubilidade em água, sendo considerados de difícil remoção do meio ambiente.^{4,5} De fato, os HAPs encabeçam a lista *Priority List* de substâncias perigosas da EPA (*Environmental Protection Agency*, E.U.A.) (Figura 1.1).

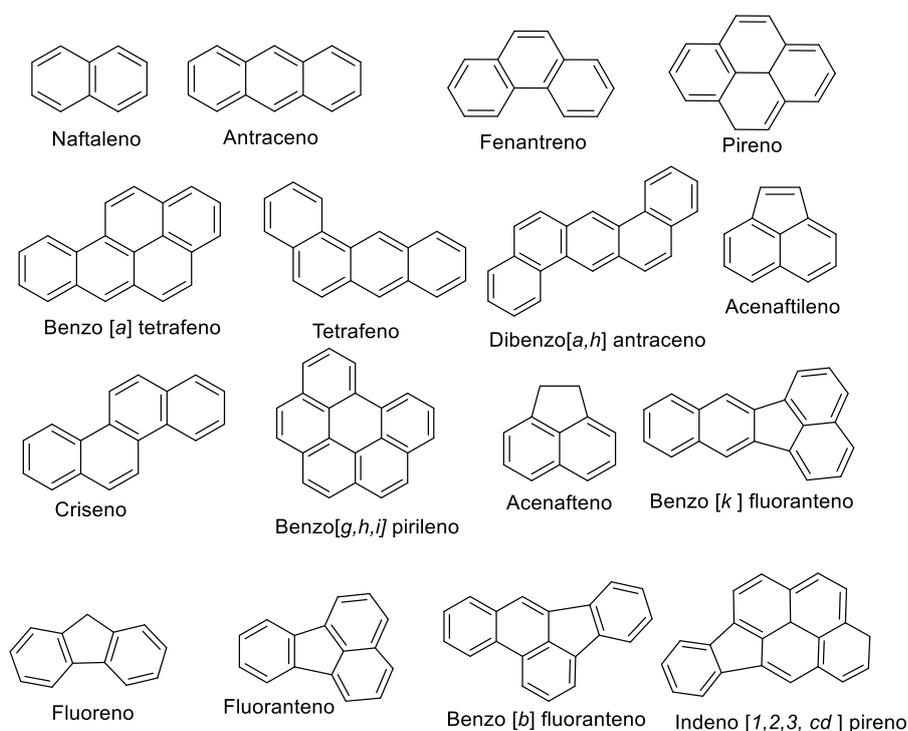


Figura 1-1: Estrutura química dos dezesseis principais HAPs monitorados no meio ambiente pela EPA. Fonte: Adaptado de Habe, 2003.³

1.2 Biorremediação

Pelos aspectos relatados na seção 1.1, os HAPs persistem nos ecossistemas por anos, sendo um problema importante de saúde pública. Esses hidrocarbonetos possuem toxicidade conhecida nos seres humanos, causando diversos males à saúde como, por exemplo, câncer e a má-formação fetal.⁶ O metabolismo dos HAPs no organismo envolve uma série de enzimas presentes em todos os tecidos e que catalisam reações de oxidação, redução, hidrólise e conjugação. Alguns mecanismos foram propostos para a transformação dos HAPs em moléculas com um elevado potencial carcinogênico. Um dos mecanismos, ocorre via formação de diol-epóxidos, que envolve monooxigenases dependentes do citocromo P450 envolvidas na oxidação dos HAPs para formar epóxidos que podem reagir espontaneamente a fenóis ou, por ação de enzimas epóxido hidrolases, produzir di-hidrodióis (Figura 1.2). Os di-hidrodióis podem sofrer outra epoxidação, que leva à formação de di-hidrodióis epóxidos capazes de reagir com o DNA e, eventualmente, iniciar um processo mutagênico.⁷

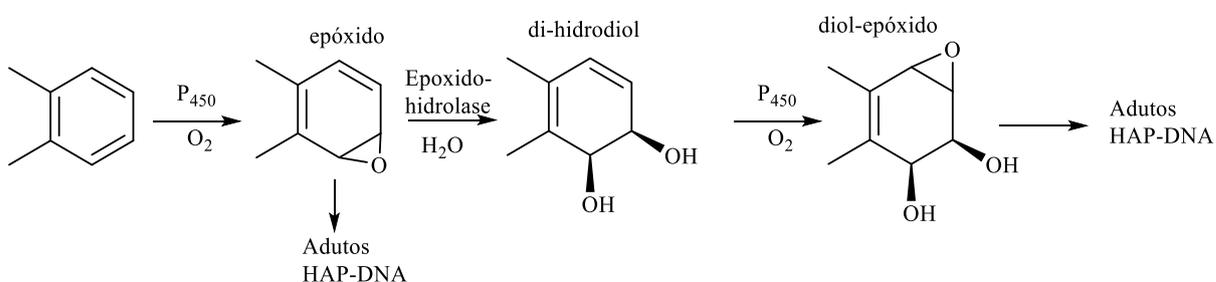
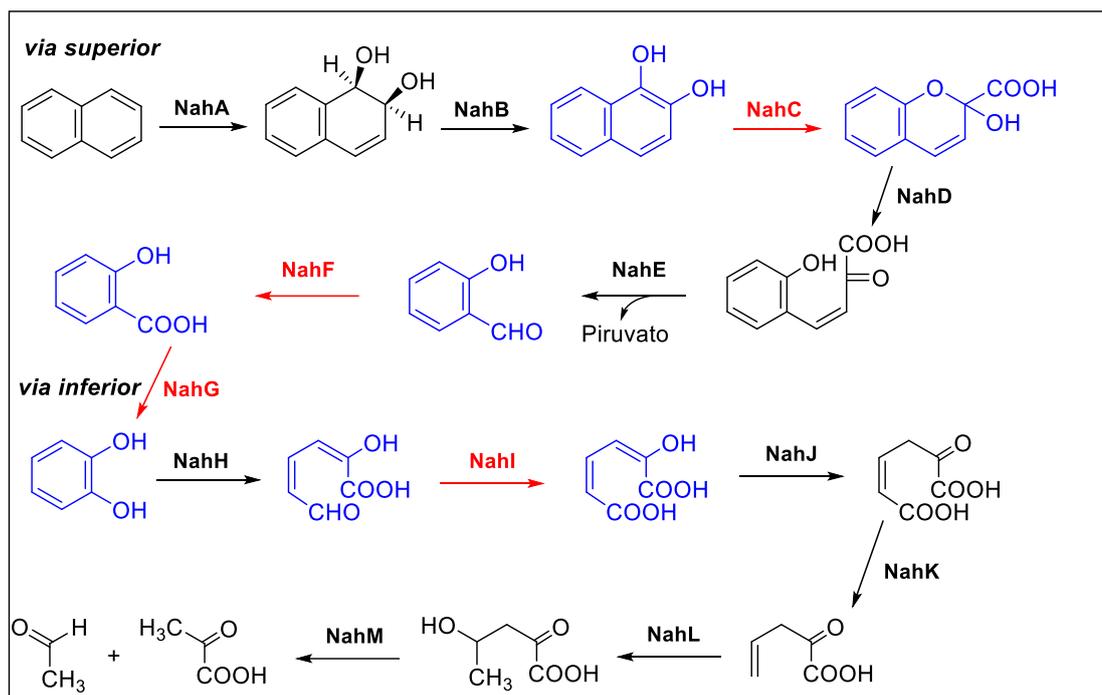


Figura 1-2: Mecanismo de ativação dos HAP, formação de adutos e danos ao DNA via a formação de diol-epóxidos. Fonte: Adaptado de Jacques, 2007.⁷

Uma forma de degradar os HAPs em ambientes contaminados é através da biorremediação que, em linhas gerais, consiste na utilização de processo ou atividade biológica para transformar os contaminantes em substâncias inertes. Na biorremediação pode ser utilizada uma combinação de microrganismos, como por

exemplo, fungos ou bactérias, ou associação de enzimas isoladas capazes de degradar o poluente.⁸ Esta abordagem biotecnológica é geralmente mais segura, menos agressiva ao meio ambiente, além de ter uma boa relação custo-benefício quando comparada aos métodos de incineração e de lavagem do solo contaminado.⁹

Desde 1950 vêm sendo isoladas bactérias capazes de degradar HAPs. Os principais gêneros são *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Beijerinckia*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Paracoccus*, *Burkholderia*, *Microbacterium*, *Gordonia*, entre outros.^{10,11} A *Pseudomonas putida* cepa G7 possui o plasmídeo Nah7, responsável por codificar uma sequência de enzimas capazes de degradar o naftaleno. A sequência completa e os genes integrantes deste plasmídeo estão disponíveis no banco de dados de nucleotídeos do National Center for Biotechnology Information (NCBI).¹² As enzimas codificadas pelo plasmídeo Nah7 são classificadas em duas vias: superior e inferior. A via superior dispõe das enzimas que catalisam a conversão do naftaleno em salicilato e a via inferior daquelas que catalisam a conversão do salicilato em piruvato e acetaldeído, que podem ser convertidos em acetil coenzima A (Esquema 1.1).



Esquema 1-1: Via metabólica de degradação do naftaleno da bactéria *Pseudomonas putida* da cepa G7 (*PpG7*). Em destaque, as reações catalisadas pelas enzimas que serão estudadas neste trabalho. Fonte: o autor.

Apesar da via metabólica da *PpG7* ser bem descrita, os mecanismos das reações catalisadas pela maioria dessas enzimas, assim como suas estruturas tridimensionais, não estão bem estabelecidas. A compreensão dos mecanismos de catálise possibilita uma melhor racionalização para aplicações dessas enzimas em bases tecnológicas, seja na aplicação em ambientes contaminados, seja na obtenção de compostos de maior valor comercial por rotas simplificadas.¹³ Além disso, o uso de enzimas provê um sistema simplificado e controlado em detrimento ao uso do microrganismo inteiro, pois as enzimas catalisam reações específicas sem gerar subprodutos indesejáveis. Mesmo as enzimas, após algum tempo, são removidas do ambiente pela degradação realizada pelos próprios microrganismos do meio.

As próximas seções detalharão quais fatores estruturais e propriedades físico-químicas influenciam o funcionamento das enzimas estudadas neste trabalho. O foco será o entendimento de como essas enzimas interagem com o substrato, e de como

estas interações, em nível molecular, influenciam no comportamento catalítico apresentado por elas.

1.3 Objetivos Gerais

Esta tese teve como **objetivo geral** o estudo de fatores que envolvem o mecanismo de catálise, avaliação da interação enzima cofator e controle inibitório de enzimas da via de degradação do naftaleno.

A abordagem envolveu três classes e quatro enzimas diferentes da via:

Classe	Enzima da via
1 Dioxigenase dependentes de Fe^{2+}	1,2-Dihidroxi-naftaleno dioxigenase – NahC
2 Monooxigenases flavodependentes	Salicilato hidroxilase – NahG
3 Aldeído desidrogenases	Salicilaldeído desidrogenase – NahF 2-Hidroxi-muconato semialdeído desidrogenase – NahI

2 EXTRADIOL DIOXIGENASES E A NAHC

A enzima NahC é uma extradiol dioxigenase ferro-dependente pertencente à superfamília das quelantes do oxigênio vicinal (QOV).¹⁴ A NahC catalisa a conversão do composto 1,2-dihidroxi-naftaleno em ácido 2-hidróxi-2H-cromeno-2-carboxílico conforme mostrado na Figura 2.1.

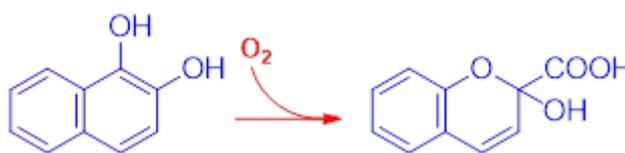


Figura 2-1: Reação de conversão do 1,2-dihidroxi-naftaleno em ácido 2-hidroxi-2H-cromeno-2-carboxílico catalisada pela NahC. Fonte: o autor.

A superfamília de metaloproteínas quelantes de oxigênio vicinal (QOV) apresentam um ambiente de coordenação de metal com dois ou três locais de coordenação vacantes de fácil acesso para promover a participação eletrofílica direta do íon metálico na catálise. Nesse ambiente químico, o centro metálico coordena um substrato orgânico, intermediário ou estado de transição, através de ambos os átomos de oxigênio vicinais do substrato, por exemplo, os grupos hidroxila do substrato são tipicamente quelados no sítio ativo contendo Fe^{2+} nas dioxigenases.¹⁵

O domínio estrutural que compõe esses locais é constituído de uma fita beta seguida de uma hélice alfa e de uma folha beta constituída por três fitas ($\beta\alpha\beta\beta$). Os resíduos de aminoácidos presentes no interior da região $\beta\alpha\beta\beta$ pareadas são ideais para a formação de uma geometria bipiramidal entre o metal e o ligante.

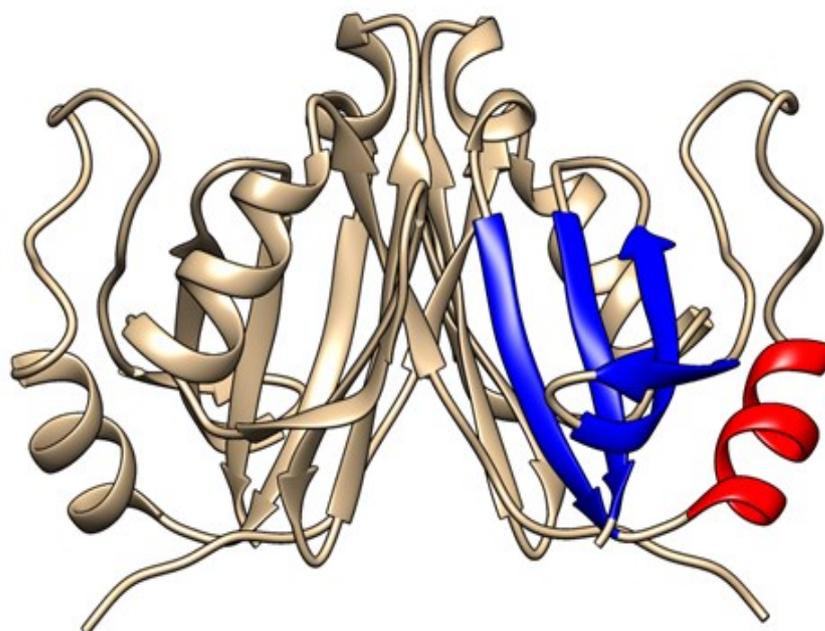


Figura 2-2: Estrutura cristalográfica do homodímero da glioxilase (PDB 1BLY) que degrada bleomicina. A estrutura conservada $\beta\beta\beta\beta$ está destacada em azul (motivos em conformação β) e vermelho (motivo α -helicoidal). Fonte: adaptado de Bergdoll *et al*, 1998.¹⁶

Os resíduos de aminoácidos que se coordenam ao metal em a todas as extradiol dioxigenases são dois resíduos de histidina e um grupo carboxilato do resíduo de glutamato ou aspartato que compõem a tríade facial (2H1C) conforme ilustrado na Figura 2-3.

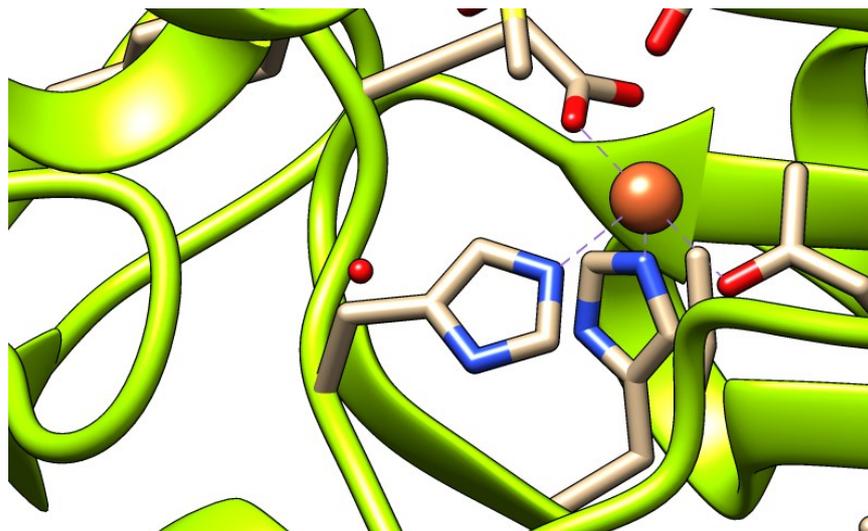


Figura 2-3: Ambiente de coordenação do Fe²⁺ formado por dois resíduos de histidina e um grupo carboxilato na enzima alfa-cetoglutarato, PDB: 1OS7. Fonte: o autor.

Além da tríade 2H1C, as extradiol dioxigenases possuem outros resíduos de aminoácidos conservados. Há uma histidina no sítio ativo (H240), que possui a função de fornecer estabilização do complexo substrato-enzima durante a catálise oxidativa do substrato. Há ainda uma tirosina altamente conservada no sítio ativo (Y249), que participa da ligação de hidrogênio com o substrato catecólico, conforme visto na figura 2-4.¹⁶

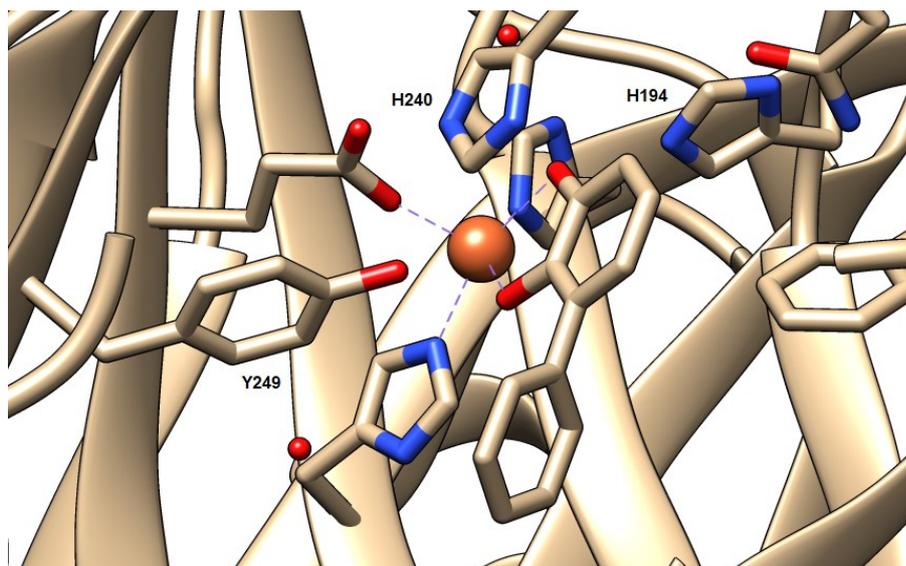
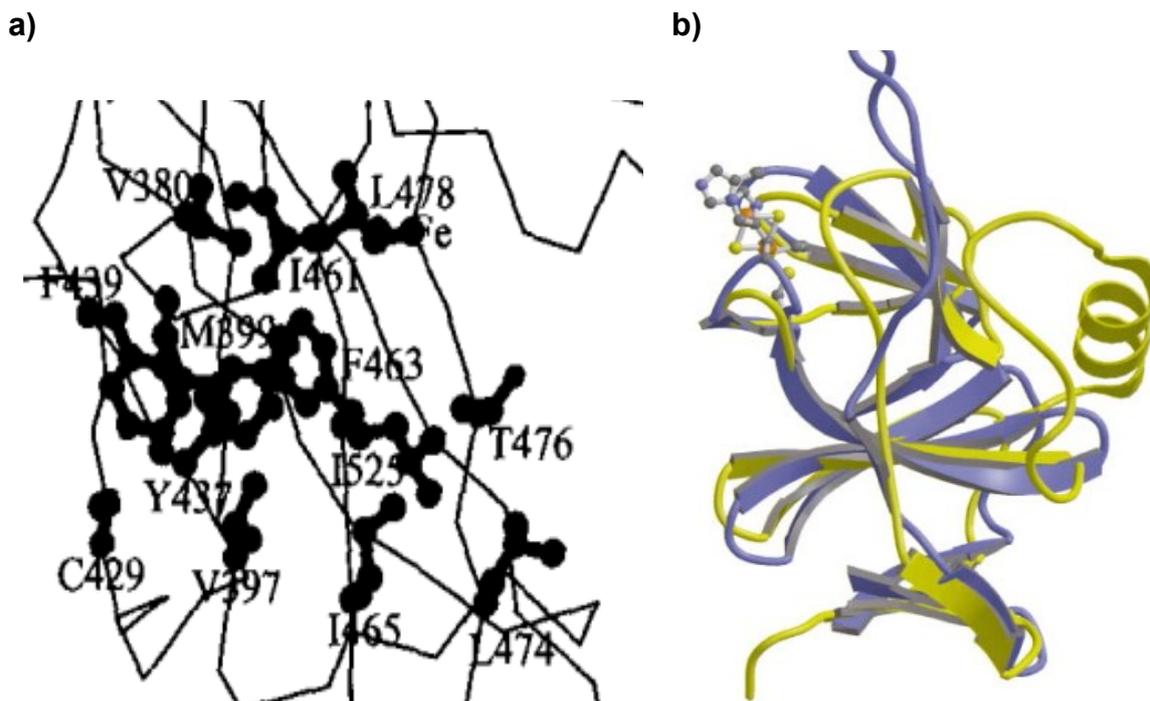


Figura 2-4: posição espacial das cadeias laterais dos resíduos altamente conservados Y249, H194 e H240 da BphC, PDB: 1KW6. Fonte: o autor.

A maioria das enzimas dioxigenase intradiol e extradiol contém duas ou mais subunidades e são comumente encontradas como dímeros e tetrâmeros. Dentro de uma única subunidade, as extradiol dioxigenases tipo I contém quatro cópias estrutural $\beta\alpha\beta\beta$.¹⁷ Duas das cópias são encontradas dentro do primeiro domínio N-terminal e duas no segundo domínio catalítico da porção C-terminal. Duas estruturas $\beta\alpha\beta\beta$ são mantidas unidas por meio de interações hidrofóbicas, que são o produto das interações entre os resíduos de aminoácidos apolares conservados. Essas interações promovem uma forma de funil de 20 Å de comprimento em cada um dos domínios conforme figura 2.5 a .¹⁸ O funil do domínio C-terminal contém o íon ferro (II), que está ligado à tríade facial 2H1C. Um resíduo de histidina é encontrado na primeira fita- β da terceira cópia da estrutura $\beta\alpha\beta\beta$ que se encontra dentro do domínio C-terminal, enquanto os resíduos de histidina e glutamato estão localizados na primeira e quarta fitas- β , respectivamente, da quarta cópia do motivo $\beta\alpha\beta\beta$ figura 2.5 b.¹⁹



Existem vários exemplos de substratos que se ligam de forma bidentada ao ferro (II) resultando em um sistema pentacoordenado pronto para ligação da molécula do dioxigênio (Figura 2-6). Na maioria das vezes, o sistema hexacoordenado de ferro (II) não é reativo ao dioxigênio,²⁰ indicando que a natureza utiliza dessa estratégia para controlar a formação de espécies de oxigênio nos sistemas vivos por meio da química de coordenação.

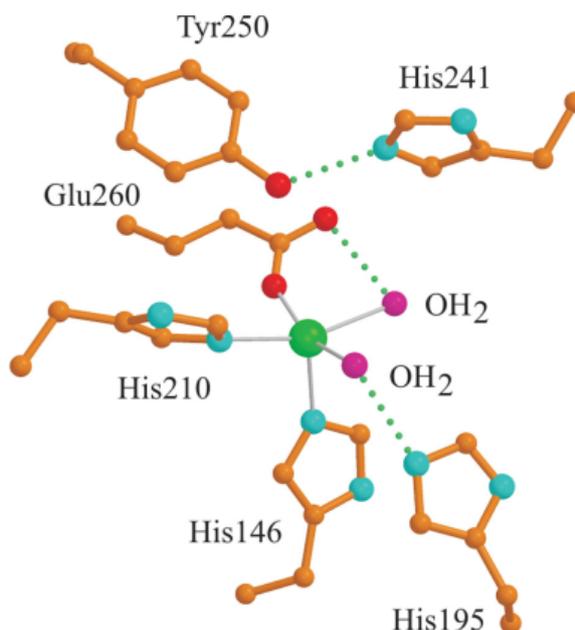
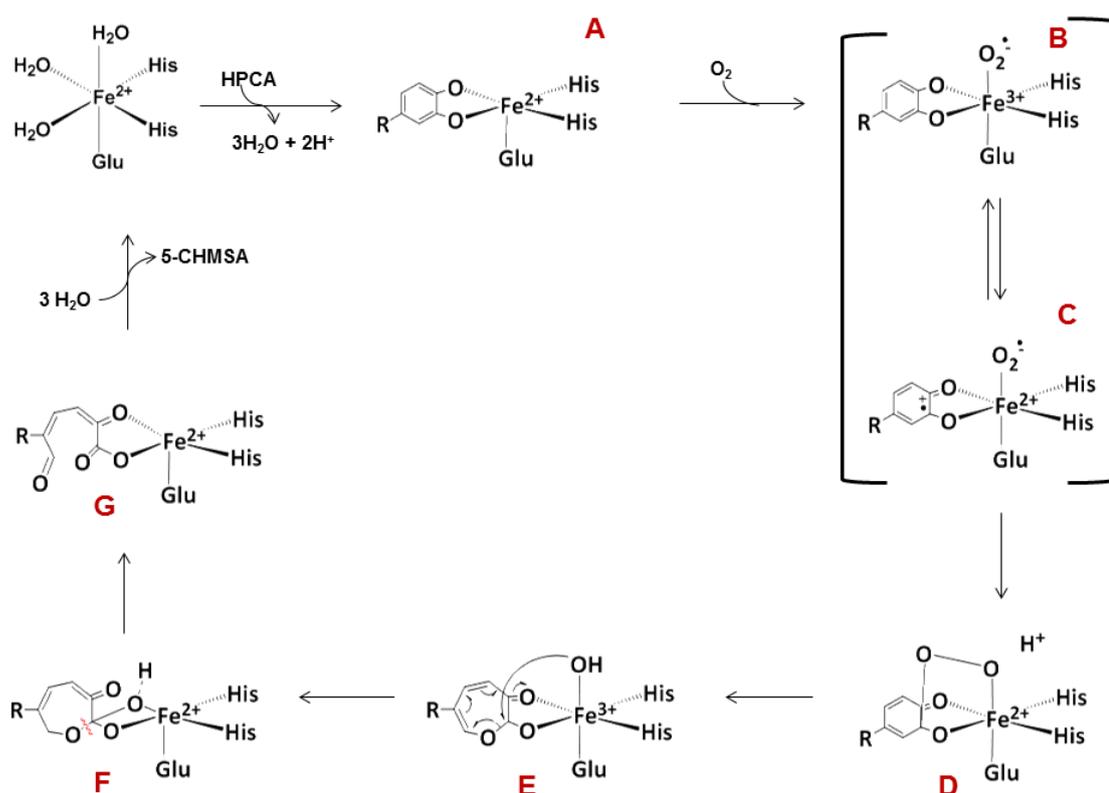


Figura 2-5: Estrutura do sítio ativo da 2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenase sem o substrato, mostrando os principais resíduos de aminoácidos conservados do sítio ativo e o ambiente de coordenação do íon ferro (II). Fonte: Vaillancourt *et al*, 2006.²¹

A partir das análises dos dados cristalográficos e cinéticos das extradiol dioxigenases foi proposto o mecanismo mostrado no esquema 2.1. Inicialmente ocorre a complexação do substrato catecólico com o cofator ferro (esquema 2.1), deslocando duas de suas moléculas de água. A complexação favorece a perda de uma molécula de água adicional levando à espécie pentacordenada (A), que se liga ao oxigênio molecular (B). Em seguida, ocorre a transferência de elétrons da hidroxila ligada ao ferro para o catecol, levando à formação de um intermediário semiquinona-Fe(II)-superóxido (C, D). Esse intermediário reage para formar um segundo intermediário ferro-alkilperóxido, que sofre a migração de um grupo alquenila e o rompimento da ligação O-O (rearranjo de Criegee) (E). Desta reação forma-se um terceiro intermediário lactona insaturada, que sofre hidrólise na última etapa para formar o produto da reação (F, G).^{16,18,22,23}



Esquema 2-1 Mecanismo proposto para extradiol dioxigenases ilustrando os estados intermediários importantes na oxidação de catecóis. Detalhes sobre o mecanismo podem ser encontrados no texto. Fonte: Christian 2012.²²

Em 2002, Vaillancourt *et al.* forneceram evidências para um complexo enzima substrato monoaniônico através do uso de espectroscopia de ressonância Raman e UV-vis.²⁴ Os dados de ressonância Raman mostraram que a forma monoaniônica do substrato foi a mais efetiva na formação do complexo enzima-substrato. Acredita-se que o estado de protonação do catecol pode diminuir o potencial de redução ferro (III) / ferro (II). Quando o catecol existe na forma monoaniônica, tem-se uma carga neutra no complexo com o ferro (II) sendo: uma carga negativa proveniente do resíduo de glutamato no 2H1C, e a segunda carga negativa decorrente do substrato ligado. Isso permite que o ferro (II) possa deslocar a densidade eletrônica do catecol para o dioxigênio ligado,²⁵ criando uma região mais densa em elétrons no complexo ferro (II)-substrato que pode facilitar a oxidação de metais e a doação de elétrons para o dioxigênio.

A importância dos resíduos de aminoácidos na tríade 2H1C para as enzimas é evidente, mas a escolha do íon metálico também é importante para a funcionalidade ideal. Experimentos de substituição de metal foram realizados em uma série de enzimas para fornecer uma visão sobre o papel específico do íon ferro (II). Bleijlevens *et al.* relataram a substituição por cobre (II) e cobalto (II) na enzima AlkB, uma enzima de alquilação e reparo de DNA, Hausinger e colaboradores substituíram o centro de ferro (II) da dioxigenase alfa-cetoglutarase, TauD, por vários metais de transição, dentre eles, o zinco (II), níquel (II), cobre (II) e cobalto (II), mostrando que a maioria desses íons metálicos tinham afinidades aparentes mais baixas para o sítio ativo 2H1C do que o íon ferro (II).²⁶ Uma situação interessante é observada para as extradiol dioxigenases 2,3-homoprotocatecolato dioxigenase (HPCD) e Mn-HPCD, enzimas homólogas de diferentes espécies, que clivam o anel aromático do 3,4-dihidroxifenilacetato utilizando centros metálicos ferro (II) e manganês (II), respectivamente. Os dois metais podem ser facilmente intercambiados mantendo a atividade catalítica.²⁷ Além disso, a substituição do ferro (II) por cobalto (II) em HPCD resultou em uma enzima altamente ativa na catálise da clivagem de catecol.²⁸ Estes são casos atípicos em termos de troca de metal e a grande maioria das enzimas não apresenta atividade quando o ferro (II) é substituído por manganês (II).

Parece que a evolução das extradiol dioxigenases levou ao ajuste perfeito do potencial de redução do ferro (II), permitindo que o O₂ seja facilmente ativado. No entanto, esse fator não explica o porquê do manganês (II) e cobalto (II) poderem ser substituídos no sítio ativo sem detrimento da catálise. Potenciais redox para manganês (II) (1,51 V) e cobalto (II) (1,92 V) são mais do que o dobro do potencial do ferro (II) (0,77 V), o que tornaria os íons divalentes de manganês e cobalto fracos candidatos para a ativação de O₂.²⁸ Estudos teóricos com essas enzimas sugerem que o manganês (II) sofre uma transição de spin após a ligação do dioxigênio para produzir uma reação coordenada mais favorável. Isso poderia sugerir diferenças eletrônicas sutis no mecanismo de ação dessas enzimas.^{29,30}

Um trabalho de modelagem molecular com uma extradiol dioxigenase por Meier e colaboradores combinou estudos teóricos QM e dados experimentais para

determinar o mecanismo reacional da 2,3-catecol dioxigenase.³¹ A partir dos dados obtidos pelas técnicas espectroscópicas, UV-Vis, UV-Vis-*stopped-flow*, *Mössbauer* e ressonância paramagnética eletrônica (EPR) e cálculos de teoria do funcional de densidade (DFT), os autores propuseram que uma espécie hidroperóxido-Fe(III) distalmente protonada forma-se no sítio ativo e a clivagem do anel extradiol ocorre a partir deste intermediário levando aos produtos. Eles também observaram, por mutação sítio-dirigida, que a mutação H200C desestabiliza eletrostaticamente a hidroxila do carbono 1 do substrato e o intermediário hidroperóxido-Fe(III).

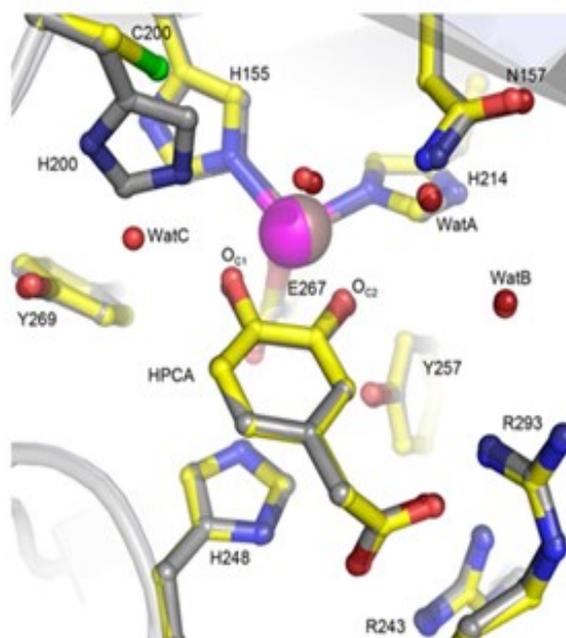


Figura 2-6: Sobreposição de estruturas cristalográficas mostrando o sítio ativo da enzima 2,3-dioxigenase e comparando a estabilização do intermediário na enzima nativa versus o mutante H200C. Fonte: Meier *et al*, 2015.³¹

A modelagem do sítio ativo de uma enzima por cálculos teóricos tem sido útil para racionalizar o direcionamento dos orbitais do sistema reacional de interesse.³² Há diversos estudos teóricos de mecânica quântica (QM) que avaliam sistemas envolvendo a coordenação do íon ao sítio ativo da enzima e o caminho reacional que modela os possíveis intermediários e estados de transição presentes na catálise enzimática.^{33,34}

No que refere às enzimas da família de extradiol dioxigenases, Dong e colaboradores modelaram a ligação do substrato na primeira esfera de coordenação do íon Fe^{2+} no sítio ativo da aminofenol dioxigenase.³⁵ Os autores avaliaram as energias das estruturas otimizadas dos adutos e dos estados de transição utilizando QM/MM conforme apresentado na figura 2-8. Eles concluíram que a ligação do substrato é um fator crucial na ativação do dioxigênio e propuseram que a etapa de abertura do anel pode ser a etapa determinante na reação.

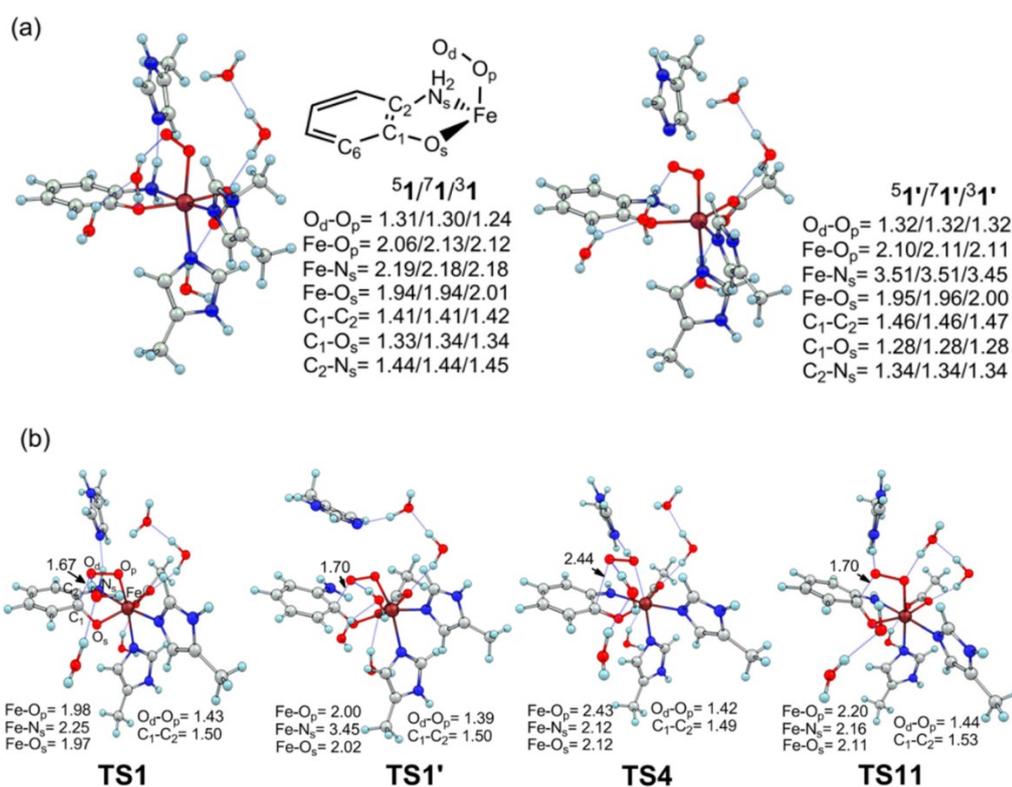


Figura 2-7: (a): Estruturas otimizadas dos adutos Fe-O2 e comprimentos das ligações entre os átomos envolvidos na reação; (b): Estruturas otimizadas dos estados de transição e comprimentos das ligações entre os átomos envolvidos na reação de clivagem oxidativa de 2-aminofenol pela 2-aminofenol dioxigenase. Fonte: Dong *et al.*³⁰

Os métodos computacionais contemporâneos são ferramentas elegantes para interpretação e complementação de informações experimentais, além de produzir detalhes sobre o mecanismo reacional que não são diretamente evidentes em estudos experimentais. Dentre os métodos computacionais empregados nas últimas décadas ressalta-se a modelagem de “cluster” usando mecânica quântica (QM), mecânica

quântica / mecânica molecular (QM / MM) e QM / MM implementada com dinâmica molecular (MD). As metodologias de QM incluem metodologias *ab initio* e da teoria do funcional de densidade (DFT).³⁶ Com isso, combinar métodos de campo de força *ab initio* QM e MM abre uma vasta área de aplicações na descrição da termodinâmica e catálise e até mesmo dependente do tempo quando combinados à MD.

A modelagem de processos bioquímicos ou biofísicos envolve um nível de complexidade que desafia esse campo de pesquisa pois, o modelo molecular adequado e uma metodologia de química quântica suficientemente precisas são fundamentais. Por exemplo, na catálise enzimática, faz-se necessário saber quais resíduos da proteína são importantes para representar o sítio ativo, o papel de moléculas de água explícitas e contra-íons, além dos potenciais mecanismos de reação que precisam ser considerados.³⁷ As técnicas de análise estrutural (cristalografia de proteínas, RMN, criomicroscopia, etc) são importantes ferramentas, fornecendo modelos estruturais que podem inclusive representar as várias etapas no processo catalítico. Dependendo do tamanho do modelo e dos recursos computacionais disponíveis, deve-se então escolher uma metodologia da química quântica com precisão adequada. Para um determinado sistema enzimático, o ponto de partida pode acabar fornecendo uma visão significativa sobre os mecanismos catalíticos e até energias de ativação precisas. Não é incomum que os efeitos do ambiente químico (o restante da proteína, águas explícitas, contra-íons e solvente) devam ser considerados, assim como os efeitos de temperatura finita e entropia.³⁸

O primeiro modelo que geralmente é utilizado para obter uma visão mecanística de uma enzima é conhecido como a abordagem de "*cluster*" ou somente "QM", que tem sido um dos métodos preferidos para elucidar reações e propriedades enzimáticas usando sistemas químicos relativamente simples. Este modelo aborda quanticamente uma parte significativa da enzima, isto é, o sítio ativo e os resíduos circundantes relevantes para o curso das reações enzimáticas. Uma modelagem enzimática adequada deve conter todos os átomos que participam da quebra e formação de ligações químicas e os resíduos responsáveis pela estabilização e ligação do substrato ou manutenção de sua configuração, ou seja, resíduos que

estabelecem interações eletrostáticas substanciais de curto e longo alcance. Um modelo de cluster QM é construído a partir de um modelo estrutural disponível em um banco de dados, tal como, o “*Protein Data Bank*” (PDB). Dados com altas resoluções ($< 2 \text{ \AA}$) podem ser essenciais para a escolha das estruturas iniciais, embora a estrutura do verdadeiro sítio ativo nem sempre coincide com os sítios de ligação *in vitro*.^{34,39–41} No modelo QM-*cluster*, é necessário fixar alguns dos átomos periféricos em suas posições cristalográficas. Além disso, deve-se incluir os efeitos da proteína circundante e do solvente por meio do uso de um contínuo dielétrico, tal como o PCM.⁴² De qualquer modo, o modelo escolhido contém apenas um número limitado de átomos, normalmente algumas centenas, em comparação aos milhares, ou centenas de milhares, que constituem uma enzima. Essa restrição está diretamente ligada ao poder computacional disponível e ao método químico-quântico empregado. Portanto, a seleção do sistema, denominado truncado, é um dos problemas mais significativos na modelagem de “*cluster*”.

A estratégia convencional para modelar a influência eletrostática do ambiente de proteína é assumir um meio polarizável homogêneo, usando uma constante dielétrica.^{29,30,43} Apesar do modelo de solvatação contínua ter muitas vantagens para uma descrição dos efeitos de solvatação, a escolha da constante dielétrica parece arbitrária. Encontrar a constante dielétrica correta prova ser ainda bastante problemático, como por exemplo, na proximidade de sítios ativos polares e carregados negativamente em enzimas de molibdênio.⁴⁴ No entanto, à medida que modelos maiores são empregados, a escolha de constante dielétrica torna-se cada vez menos importante.

Em suma, há vários pontos que devem ser observados ao construir um modelo de “*cluster*”, e essa tarefa não é trivial, deve-se atentar ao método QM a ser usado (métodos *ab initio*, DFT ou SQM; a necessidade de correções de dispersão) nos parâmetros computacionais (estados de rotação, conjuntos de base, conjuntos de bases auxiliares, índices de convergência do campo autoconsistente sendo a sigla (SCF) e critérios de convergência de geometria).

Vários trabalhos foram desenvolvidos para explorar o mecanismo catalítico em enzimas usando o modelo *QM-cluster*.^{42,43,45,46} Mesmo quando esses estudos forneceram uma descrição correta das vias catalíticas e o papel do ambiente da proteína no mecanismo catalítico, a aproximação da interação de longo alcance por um contínuo dielétrico pode afetar os perfis de energia. Em tais casos, outros métodos como QM /QM ou mesmo QM / MM podem ser necessários. O modelo *QM-cluster* pode fornecer uma visão mecanicista convincente, mas expandir o modelo em uma estrutura QM / MM pode ser muito interessante para detalhamento do que foi proposto pelo modelo de “*cluster*”.⁴⁷ Embora modelos moleculares relativamente grandes tenham sido estudados apenas pelos métodos QM, o emprego de outros métodos para simular sistemas maiores é inevitável com os hardwares e softwares contemporâneos. Metodologias híbridas QM/MM foram desenvolvidas para tais sistemas complexos, em que uma pequena parte do sistema é tratada com QM, enquanto os métodos clássicos de campo de força são normalmente empregados para o resto do sistema.⁴⁸ Essa combinação de mecânica quântica/mecânica molecular é utilizada desde o trabalho pioneiro de Warshel e Levitt em 1976, laureados em 2013 com o prêmio Nobel em Química.

Existem três aspectos essenciais a serem considerados no estudo dos mecanismos enzimáticos por modelos QM/MM: primeiro, como se dá a interação entre QM e as regiões MM tratadas; segundo, como tratar as ligações covalentes entre os átomos no limite QM / MM e; por fim, como calcular a energia total. É interessante estender o modelo, na maioria das vezes, usando métodos híbridos QM /MM para incorporar os efeitos da proteína e do solvente, pois o papel da água pode ser crucial.

As reações enzimáticas podem ser estudadas por cálculos puros de QM, o que requer que o sítio ativo seja extraído para simplificar o cálculo. A abordagem QM permite estudar os aspectos intrínsecos das reações enzimáticas, mas o ambiente proteico às vezes exerce uma influência considerável na reação. Em comparação com o tratamento QM puro, modelos ONIOM permitem a análise de um número muito maior de átomos no sistema, fornecendo assim imagens mais realistas das enzimas. Um progresso significativo foi feito em vários aspectos técnicos do ONIOM e, portanto,

as reações enzimáticas podem ser exploradas com eficiência e eficácia usando modelos realistas.

Hirao e Morokuma empreenderam extensos estudos ONIOM (B3LYP: AMBER), para obter uma compreensão detalhada das espécies reativas de superóxido férrico e para elucidar como o mio-inositol (MI) é convertido em uma dioxigenase denominada MIOX.⁴⁹

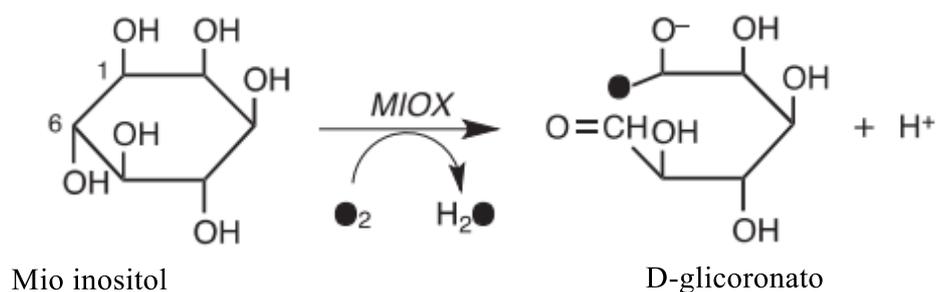


Figura 2-8: Conversão do mio-inositol em glicoronato pela dioxigenase MIOX. Fonte: Hirao 2009⁴⁹

O potencial efetivo de caroço SDD foi usado para o Fe e o conjunto de bases 6-31G* foi empregado para os outros átomos. Para cálculos no ponto, o conjunto de base usado foi o TZVP. Os cálculos ONIOM sugeriram que a espécie de superóxido férrico tem uma geometria bem direcionada e um valor de *spin* $S = \frac{1}{2}$. Ambos os íons de ferro têm estados de spin alto e são antiferromagneticamente acoplados. A figura 2.10 mostra a mudança na geometria do centro metálico durante o processo de clivagem da ligação C-H do substrato.

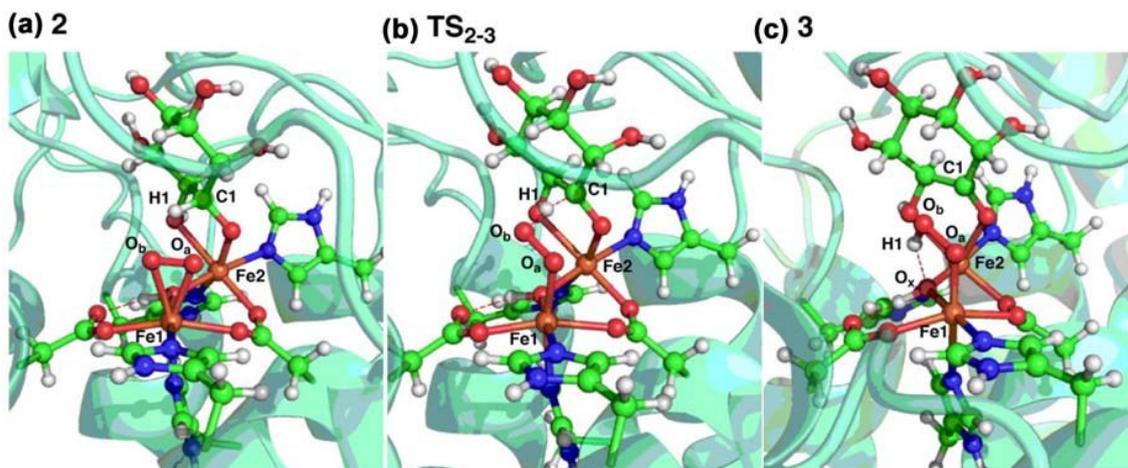


Figura 2-9: Mudança geométrica durante a etapa de clivagem C–H catalisada pela MIOX.
 Fonte: Hirao 2009⁴⁹

Os cálculos do ONIOM identificaram ainda o papel essencial desempenhado pelo ambiente de proteína em torno do sítio ativo. Quando os cálculos DFT foram empregados para um modelo truncado sem incluir o ambiente de proteína, o “cluster” do sítio ativo entrou em colapso após a clivagem da ligação O–O. Para evitar esse colapso estrutural indesejado, o substrato MI deve ser ancorado em uma posição apropriada o que pode ser feito por meio de interações do tipo ligação de hidrogênio entre os grupos hidroxila do MI e os resíduos circundantes, bem como a restrição estérica imposta pela proteína.

Os trabalhos reportados sobre as extradiol dioxigenases levantam vários questionamentos, dentre eles: a função dos resíduos de aminoácidos da segunda esfera de coordenação do metal; se há formação de intermediário hidroperóxido Fe(III) e quais outros intermediários são formados no mecanismo de reação; quais propriedades físico-químicas do sítio ativo que favorecem a reação; durante o mecanismo reacional se ocorre *via* a formação de um intermediário epóxido, esses pontos em aberto são a motivação do trabalho com a NahC.

2.1 Objetivos

Em relação aos objetivos específicos referentes aos estudos com a dioxigenase Fe(II)-dependente NahC, temos:

- Otimizar as estruturas e definir o estado de *spin* mais provável para diferentes espécies envolvidas na catálise.
- Determinar via cálculos QM/MM, quais resíduos do sítio ativo são importantes no mecanismo reacional.
- Determinar as espécies intermediárias na reação e propor um mecanismo reacional para a oxidação do 1,2-dihidroxi-naftaleno.

2.2 Metodologia

A partir da estrutura determinada por Eltis e colaboradores por cristalografia de raio x e depositada no PDB, com o código 2EI1, foram criados modelos simplificados do sítio ativo, levando em consideração a primeira esfera de coordenação do Fe^{2+} (figura 2.11). Para o modelo simplificado, considerou-se em cada cálculo os estados de spin total: singleto, tripleto e quinteto. As estruturas foram otimizadas usando o programa ORCA⁵⁰ pelo método de QM. A metodologia DFT (*Density Functional Theory*) baseou-se no funcional híbrido de três parâmetros de Becke com as correções de gradiente fornecidas pelos funcionais de Lee, Yang e Parr B3LYP⁵¹ e para o íon Fe^{2+} utilizou as funções de bases auxiliares def2-TZVP para otimização. Restrições de coordenadas congeladas foram aplicadas às coordenadas atômicas dos átomos de carbono terminais do modelo a fim de considerar os efeitos restritivos conformacionais do ambiente proteico. As sobreposições entre as estruturas otimizadas e a depositada no PDB foram utilizadas como indicativo da correta definição do estado de *spin* total. Utilizou-se o propka para adição dos hidrogênios na estrutura cristalográfica, o propka é um servidor que auxilia na obtenção e definição dos estados de protonação dos resíduos de aminoácidos nas proteínas em função do pH.⁵² A nossa escolha foi a utilização de um pseudopotencial de caroço (*ECP-Effective core potencial*) para o átomo de ferro. O efeito relativístico é mais importante nos elétrons de caroço, por isso o potencial efetivo de caroço leva em conta efeitos relativísticos escalares.

A abordagem teórica considerou a simplificação do sítio ativo pela construção de um modelo enzimático levando em conta a primeira esfera de coordenação do sítio ativo, sendo H152, H215, E266, Fe II e o 1,2 dihidróxinaftaleno (figura 2.11). Essa metodologia é usualmente utilizada em trabalhos teóricos que envolvem enzimas metalo-dependentes.^{35,53,54}

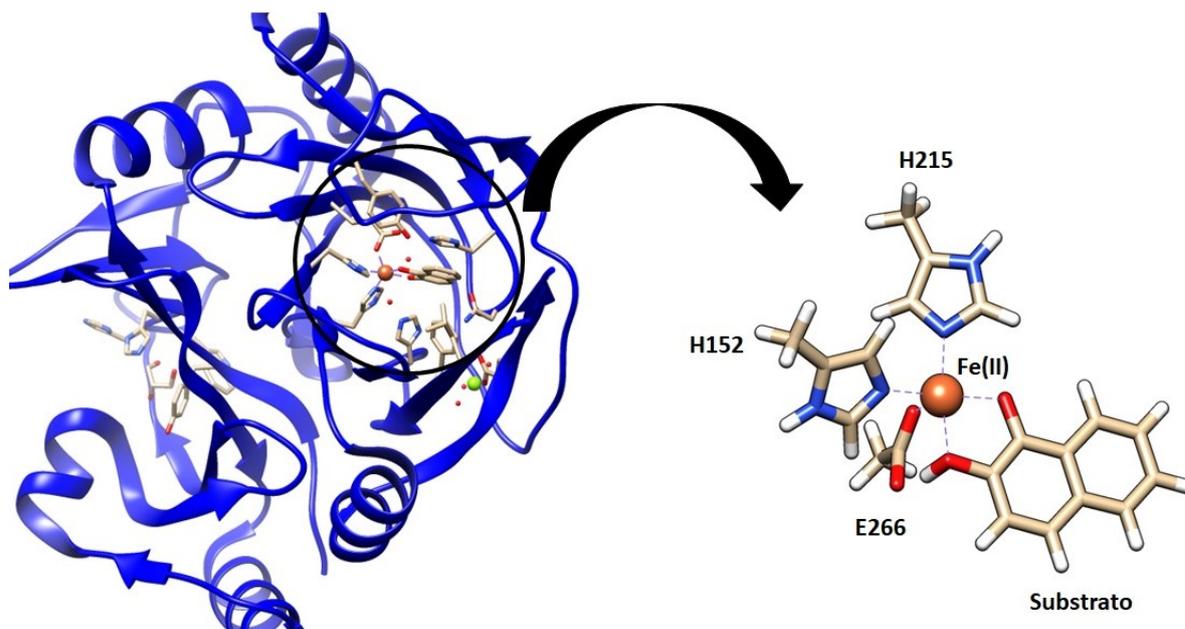


Figura 2-10: (A) Estrutura cristalográfica da estradiol dioxigenase (B) Modelo estrutural do sítio ativo NahC construído a partir da mesma enzima (PDB 2EI1). Fonte: o autor

Para o cálculo QM/MM utilizou-se a estrutura depositada no PDB após adição dos hidrogênios nessa estrutura, utilizando o programa *molprobit* (<http://molprobit.biochem.duke.edu>). A partir dessa estrutura, utilizou o cálculo ONIOM, sendo que a parte QM do cálculo ONIOM foi descrita pelo mesmo nível de teoria B3LYP empregado no sistema modelo de “*cluster*” truncado e a parte MM foi descrita com o campo de força universal UFF. A parte QM incluiu os mesmos resíduos e moléculas de água do sítio ativo da estrutura cristalográfica. Átomos de hidrogênio foram usados como átomos de ligação conectando as duas partes QM e MM.

2.3 Resultados e Discussão

Conforme reportado por Lipscomb e Que (2003)⁵⁵, para o mecanismo de catálise das extradiol dioxigenases, a coordenação do dioxigênio produz um intermediário ferroperoxido em ponte, seguido por um rearranjo do tipo Criegee, onde o estado de transição envolve a quebra concertada das ligações O-O e C-C do substrato. Já Bugg e colaboradores (2001) sugeriram um mecanismo alternativo para a formação da lactona,^{20,56} em que o peróxido se ligaria ao catecol e ao centro metálico Fe (II), sendo em seguida clivado heteroliticamente por um ataque nucleofílico do sistema- π do catecol, produzindo o epóxido, que leva à lactona. Esta segunda proposta também é suportada por dados cristalográficos com um análogo do substrato.⁵⁷ Com isso, este trabalho fará uma análise teórica dos intermediários reacionais do ciclo de catálise da NahC.

A abordagem teórica considerou a simplificação do sítio ativo pela construção de um modelo enzimático levando em conta a primeira e a segunda esfera de coordenação do Fe²⁺ no sítio ativo. Essa metodologia é usualmente utilizada em trabalhos teóricos que envolvem enzimas metalo-dependentes.^{33,3734}

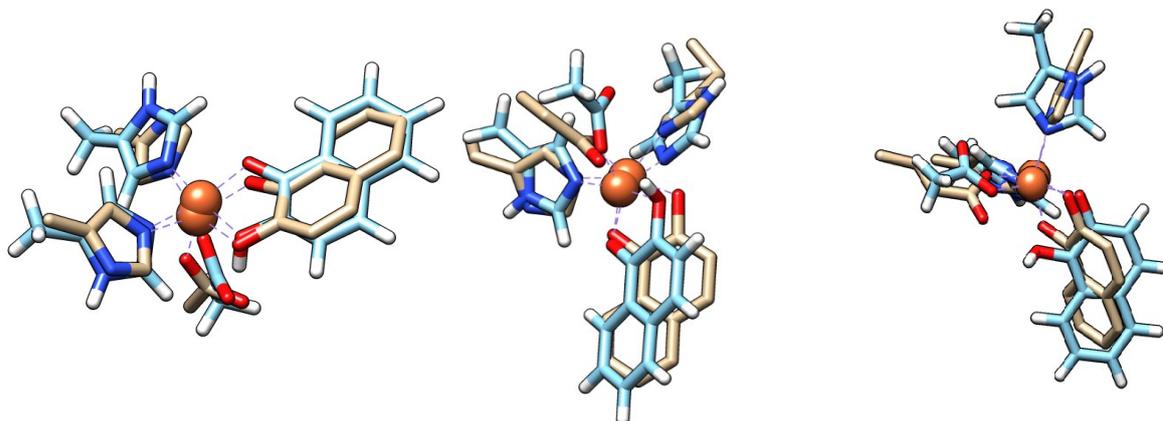
A estrutura depositada no PDB com o código 2E11 foi utilizada para criar modelos truncados do sítio ativo, que levam em consideração a primeira esfera de coordenação do Fe²⁺. O sítio ativo é constituído por uma tríade de aminoácidos, a saber, duas histidinas e um carboxilato, coordenados ao íon metálico além do substrato. O modelo considera a estrutura do substrato ligado pois, conforme reportado anteriormente, promove a ativação da inserção do dioxigênio, gerando um intermediário superóxido.⁵⁸ Além disso, o modelo apresenta geometria pentacoordenada,⁵⁹ podendo apresentar três possibilidades de *spin* total: singleto, tripleto e quinteto.

Sabe-se que os substratos, na forma de um monoânion, se ligam de forma bidentada ao ferro (II). Isso ocorre pois o complexo enzima-substrato tem sua carga

estabilizada pelo centro ferro (II) e ligantes de carboxilato e catecolato carregados negativamente.⁶¹ Além disso, evidências espectroscópicas indicam que a ligação do substrato se dá na forma monoaniônica. Estudos com técnicas de espectroscopia Raman indicam que um próton permanece no catecol coordenado ao Fe (II)²⁸, o que justifica essa escolha nos modelos do substrato na forma monoaniônica.

As sobreposições entre as estruturas otimizadas e a depositada no PDB foram utilizadas como indicativo da correta definição do estado de *spin* total (Figura 2.12). A melhor sobreposição estrutural foi a do estado de *spin* total singlete. Além disso, o estado singlete foi o que melhor descreveu o dado experimental em termos de comprimento de ligação metal-ligante e foi a estrutura com a menor ΔE .

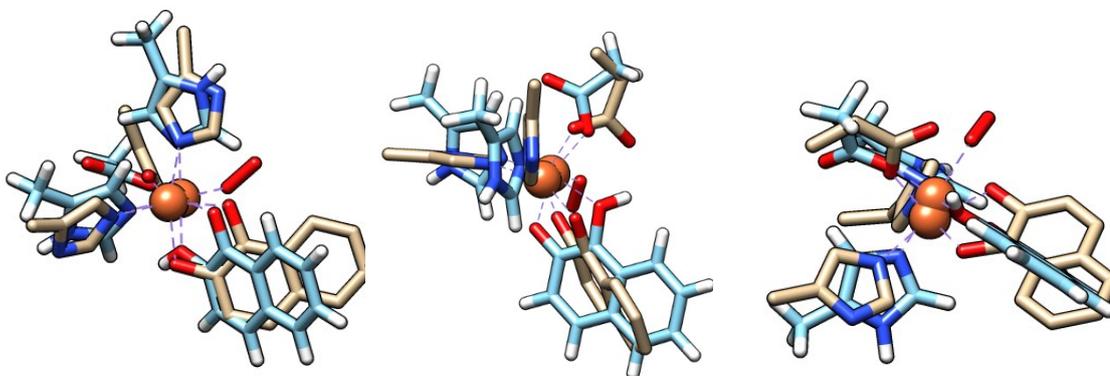
a) S=0 $\Delta E(\text{kcal/mol})= 0$ b) S=1 $\Delta E(\text{kcal/mol})= +2,7$ c) S=2 $\Delta E(\text{kcal/mol})=+26,0$



Os cálculos das estruturas com o oxigênio molecular coordenado ao íon ferro (II) foram feitos levando em conta o acoplamento do estado singlete do Fe (II) com o estado tripleto do dioxigênio. Esse tipo de combinação resulta em estados de spin total septeto, quinteto ou tripleto. O resultado da sobreposição das estruturas otimizadas com o dado cristalográfico não foi coerente com o obtido anteriormente para o estado singlete. Entretanto, dentre os três estados de *spin* total, o estado

tripleto foi o que melhor sobrepôs ao dado cristalográfico, conforme visto na figura 2.12.

a) $S=1 \Delta E(\text{kcal/mol})=0$ b) $S=2 \Delta E(\text{kcal/mol})=+0,34$ c) $S=3 \Delta E(\text{kcal/mol})=+0,38$



A sobreposição das estruturas otimizadas com o dado obtido por cristalografia, mostrou que o melhor resultado obtido com a inserção do oxigênio molecular indica que a reação passa espécie no estado tripleto. Tal observação difere do dado obtido para a salicilato dioxigenase (SDO) de *Pseudaminobacter salicylatoxidans*, que envolve o estado quinteto.⁶⁰ Isso pode ser devido ao fato dessa SDO clivar o substrato na ligação intradiol, enquanto a NahC o faz na ligação extradiol.⁶¹ Essa mudança de posição de quebra de ligação pode estar relacionada ao estado de *spin* diferente para essa espécie. O substrato com oxigênio inserido, possui *spin* tripleto, conforme observado por Tiwary e colaboradores.^{62,37}

A sobreposição dos dados do cluster com a estrutura cristalográfica mostrou um valor de RMSD de 5,78 Å para o estado septeto do domínio catalítico da estrutura com mesmo número de átomos que o modelo, 3,52 Å e 2,98 Å para os estados tripleto e singleto, respectivamente. Esses altos valores apontam a necessidade de criar um modelo mais completo, que leve em conta a segunda esfera de coordenação do íon Fe^{2+} . O cálculo ONIOM tem sido reportado como a melhor escolha para uma completa descrição de sistemas complexos.³³ Esse tipo de técnica combinada (QM/MM) produz um método computacional que facilita a modelagem de reações enzimáticas, pois, permite associar um cálculo quântico com a flexibilidade e simplicidade da mecânica clássica.^{42,43,44}

O resultado obtido para o cálculo ONIOM mostrou que o íon ferro (II) apresenta uma geometria octaédrica em que o íon metálico coordena-se aos aminoácidos H152, H215 e E266, além de uma molécula de água (figura 2.12). Portanto, pode-se inferir que o sistema octaédrico leva à formação de um complexo de *spin* baixo em que os elétrons do íon Fe^{2+} ocupam os orbitais t_{2g} . Esse dado é coerente com aquele obtido para o modelo simplificado, no qual o estado singleto é o mais favorável. Além disso, é reportado que complexos de *spin* alto nestas enzimas não são observados espectroscopicamente, sugerindo à ausência de transições do tipo $\pi - \pi^{*60,59}$

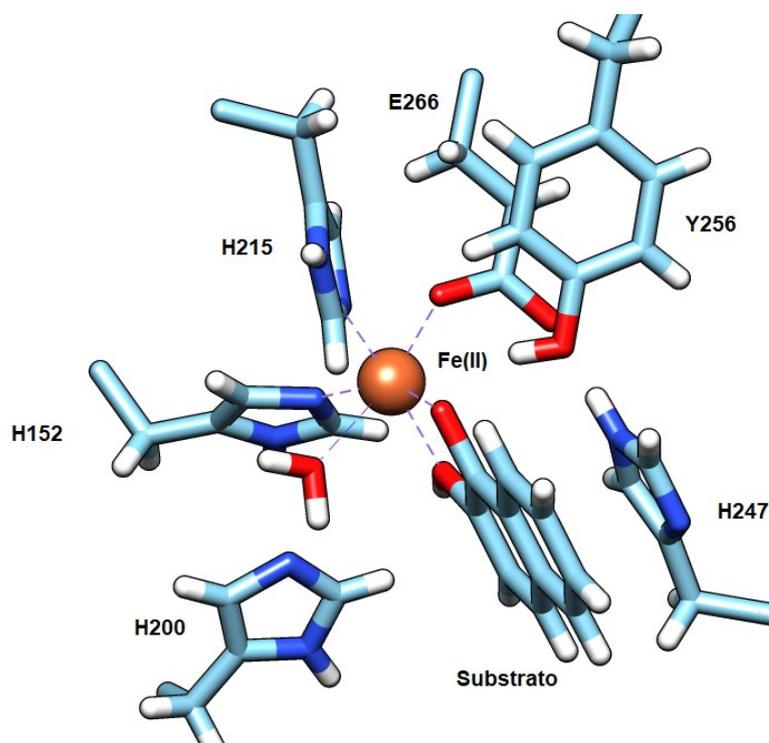


Figura 2-11: Otimização cálculo ONIOM da enzima completa com o método híbrido. ONIOM (B3LYP/UFF) mostrando a geometria octaédrica em torno do íon ferro II do sítio ativo da NahC. Fonte: o autor.

O dado mostra que a molécula de água complexada ao metal também faz uma interação do tipo ligação de hidrogênio com o resíduo de aminoácido H200, pertencente à segunda esfera de coordenação. É reportado que, para essas dioxigenases, uma histidina da segunda esfera de coordenação é importante para a atividade enzimática, pois ela sofre uma alteração conformacional com a inserção do oxigênio molecular. Além disso, mutações sítio-dirigidas na segunda esfera de

coordenação do íon metálico também mostraram que essa histidina participa na estabilização das espécies reacionais por interações coulombianas e de ligação de hidrogênio, além de catalisar a transferência do segundo próton hidroxila do substrato, para promover a clivagem da ligação O-O do intermediário alquilperóxido formado após o ataque do grupo ferroperóxido sobre o substrato

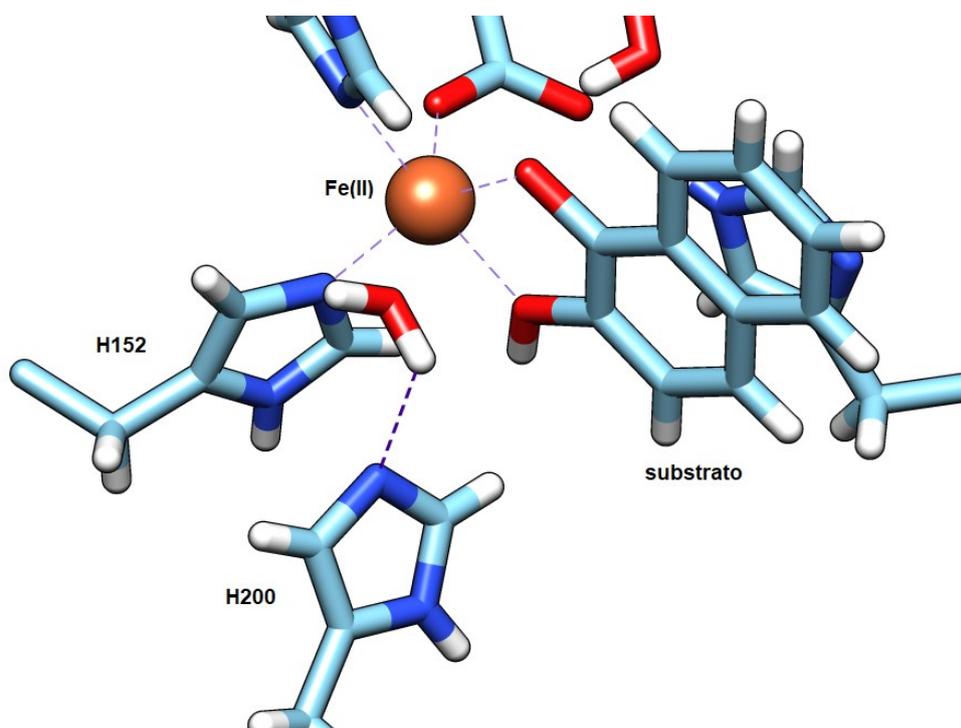
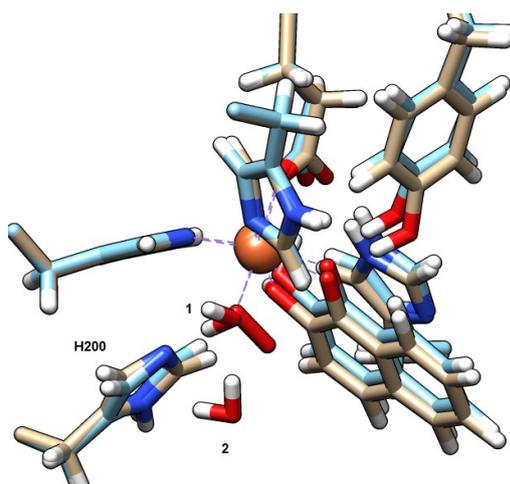


Figura 2-12: Interação da Histidina 200 da segunda esfera de coordenação com a água presente no sítio ativo da NahC. Fonte: o autor.

A análise da estrutura com a inserção de dióxigênio sobreposta ao dado cristalográfico sem oxigênio mostra que o resíduo H200 possui uma pequena alteração conformacional. Além disso, a sobreposição das estruturas sem o oxigênio e com a molécula de oxigênio coordenada mostrou que esse resíduo é responsável pela estabilização da molécula de água deslocada pelo O₂. (figura 2.15 a e b). Estudos de mutação desse resíduo sugerem que ele desempenha um papel importante na atividade catalítica e na transferência de prótons.^{65,66} De fato, H200 tem sido apontado como um catalisador básico-geral, que leva a um intermediário epóxido (figura 2.16).⁵³

a)



b)

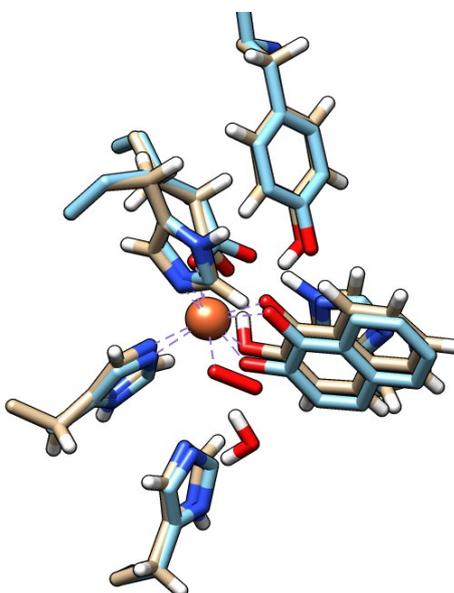


Figura 2-13: a) Sobreposição entre a estrutura otimizada pelo cálculo ONIOM sem o dióxigênio (bege) com a molécula de água 1 coordenada, e a espécie Fe-superóxido obtida pelo cálculo ONIOM (DFT/B3LYP: UFF) (Azul) com a molécula de água 2 interagindo com a H200. b) Sobreposição entre a estrutura cristalográfica (Azul) PDB: 2E11 e a espécie Fe-superóxido obtida pelo cálculo ONIOM (Bege) (DFT/B3LYP: UFF). Fonte: o autor.

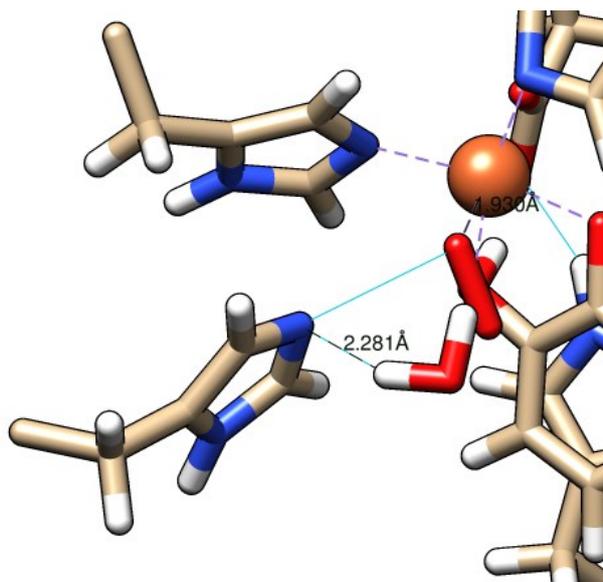


Figura 2-14: Interação da Histidina 200 da segunda esfera de coordenação com a água deslocada, após a inserção do dióxigênio no sítio ativo da NahC. Fonte: o autor.

Verificou-se também que o resíduo de Y256 interage com o substrato. Essa interação ocorre entre o hidrogênio fenólico da tirosina com um átomo de oxigênio do substrato, favorecendo a formação de um intermediário tetraédrico do substrato no mecanismo reacional. Observou-se um comprimento de 1,52 Å, indicando que esse próton está estabilizado pela interação com a Y256. Além disso, é reportado na literatura que a mutação Y257F resulta em uma considerável diminuição nas constantes catalíticas com redução de aproximadamente 100 vezes na velocidade das etapas de ligação e inserção de oxigênio.⁶⁷

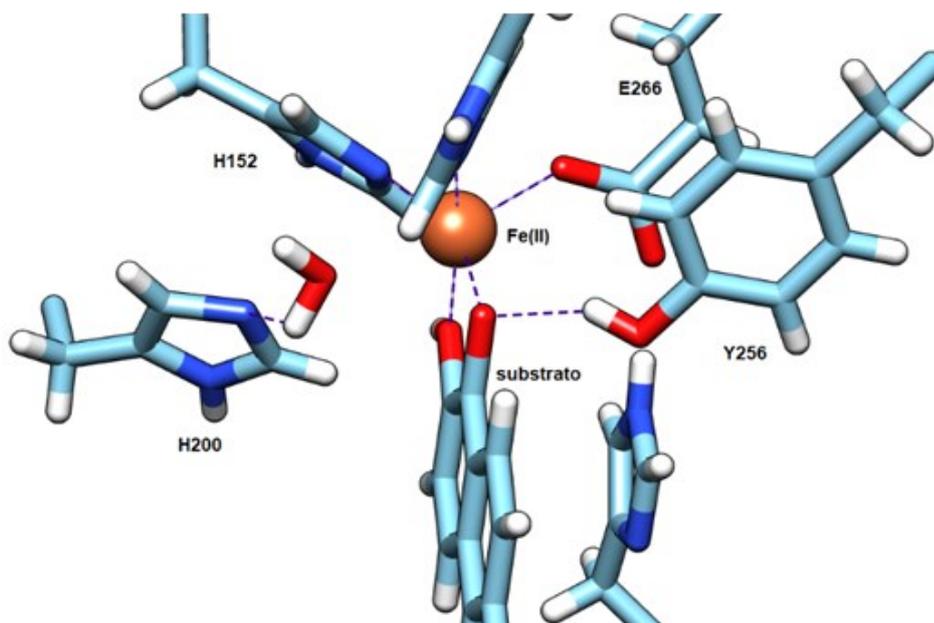


Figura 2-15: Dados do cálculo ONIOM do sítio ativo da NahC ligado ao substrato, mostrando a interação do resíduo de Y256 com o substrato.

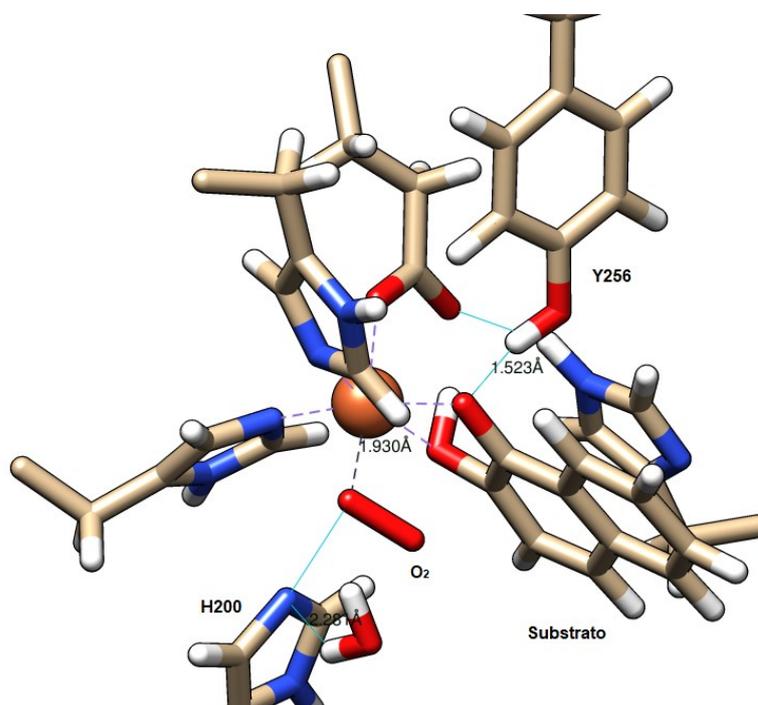
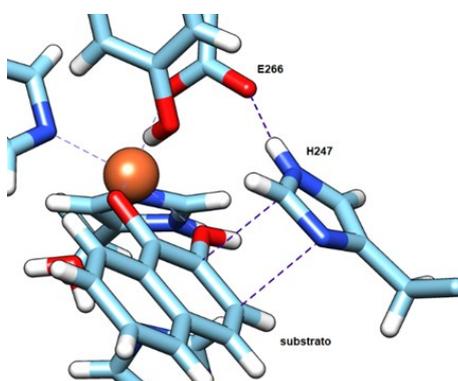


Figura 2-16: Dados do cálculo ONIOM do sítio ativo da NahC do intermediário superóxido destacando a interação do resíduo de Y256 com o substrato. Fonte: o autor

Outro resíduo importante na estabilização do substrato é H247, que estabiliza o sistema aromático do substrato por interações de empacotamento- π (π -stacking) no sítio ativo e faz uma ligação de hidrogênio com o E266 (figura 2.19 a). No intermediário superóxido, o substrato possui um comprimento de ligação de 1,57 Å, indicando uma ligação de hidrogênio com o E266 que, segundo a literatura, estabilizaria e manteria o substrato na posição correta durante o ataque do dióxigênio.⁶⁸ Estudos teóricos e de dados cristalográficos indicam que esses dois resíduos de aminoácidos participam na estabilização e orientação do intermediário alquilperóxido.^{23,31,53}

a)



b)

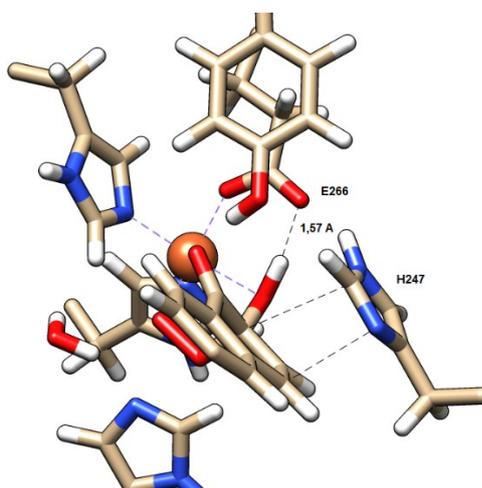


Figura 2-17: Dados do cálculo ONIOM do sítio ativo da NahC ligado ao substrato. a) Interação do resíduo de E266 com o substrato da NahC e b) interações da H247 com o E266 e H247 com substrato da NahC. Fonte: o autor.

A estrutura do intermediário epóxido foi sobreposta à estrutura do dado cristalográfico, mostrando pouca alteração conformacional dos resíduos do sítio ativo conforme indicado na figura 2-20. Essa estrutura foi obtida a partir do intermediário superóxido, sendo a orientação da molécula de água presente no sítio ativo crucial para obter a espécie epóxido. Essa espécie se forma a partir de arranjos intermediários em que a ligação O-O é rompida, tal que o átomo de oxigênio distal ao metal liga-se covalentemente à porção adjacente ao grupo fenólico do substrato.⁶²

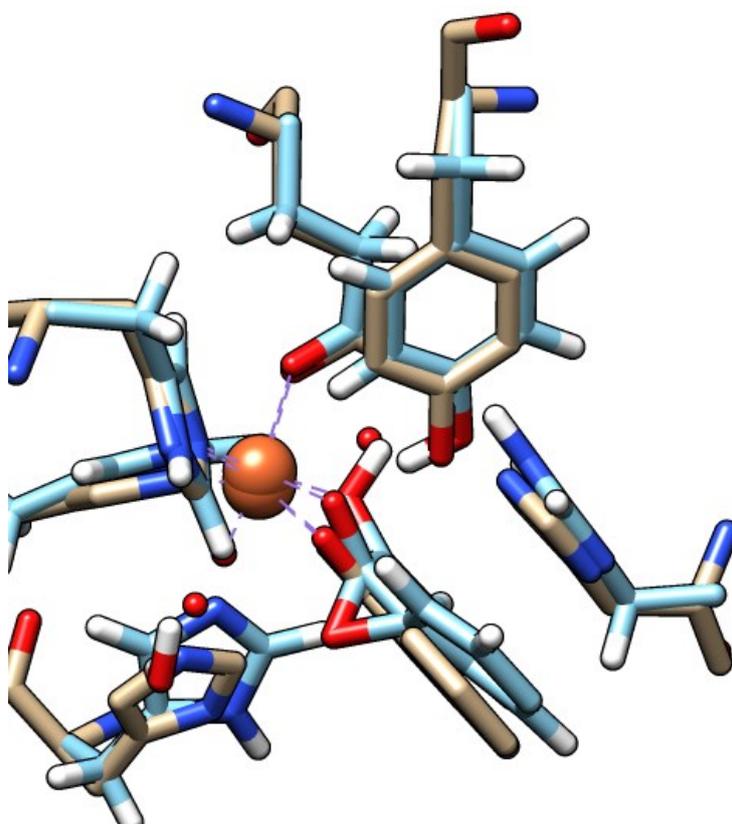
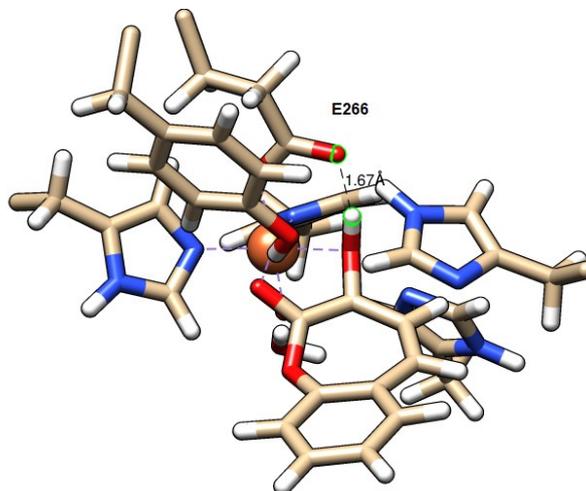


Figura 2-18:Dados do cálculo ONIOM do sítio ativo da NahC do intermediário epóxido da NahC (azul) sobreposto com o dado cristalográfico da NahC (bege)PDB 2E11 Fonte: o autor

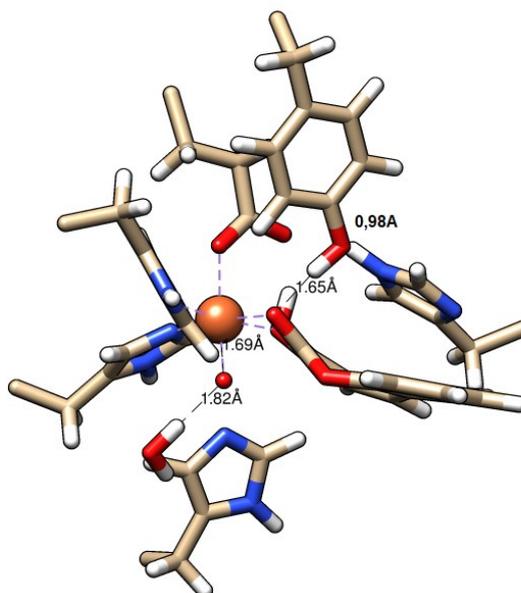
A espécie lactona pode ser obtida via um rearranjo de Criegee pela clivagem da ligação O-O, simultaneamente à inserção de um oxigênio no anel. Alternativamente, a lactona pode ser obtida a partir do intermediário epóxido. Na estrutura obtida para a lactona, observa-se a completa transferência do próton para o resíduo de Y246 com valores de distância O-H de 0,98 Å. Além disso, observa-se uma

interação com o resíduo de E266, que se manteve ao longo de todas as espécies obtidas nesse estudo, indicando que esse resíduo é de importância crucial ao mecanismo de catálise da NahC.

a)

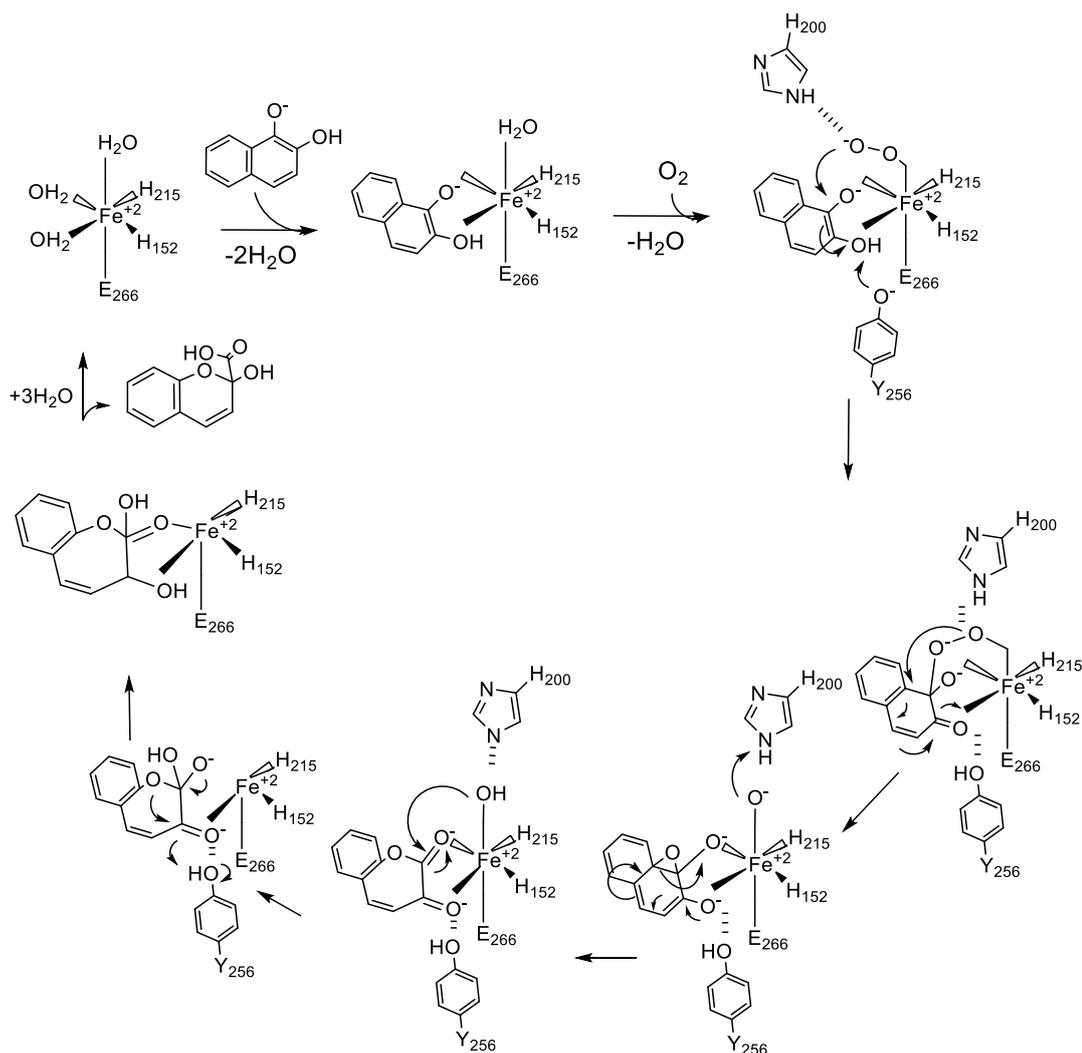


b)



Baseado nas observações da literatura e nos resultados deste trabalho, uma proposta mecanística para a NahC é apresentada no esquema abaixo, a qual está de acordo com o proposto por Kovaleva e Lipscomb.⁵⁷ A reação inicia-se com a coordenação substrato ao centro metálico Fe (II) do sítio ativo da enzima. Em seguida o O₂ é coordenado ao íon ferroso, deslocando uma molécula de água. A espécie Fe-

peróxido formada é estabilizada pelo resíduo de H200, seguindo-se ataque nucleofílico ao anel catecólico do substrato, que leva à formação do epóxido. Segue-se rearranjo e consequente expansão do anel para formar a lactona de sete membros e o Fe-hidróxido. Por fim, essa hidroxila coordenada ao ferro ataca nucleofilicamente a lactona, levando à segunda inserção de oxigênio no substrato para render o produto da reação.⁵⁸



Esquema 2: mecanismo proposto para a oxidação do 1,2-dihidróxinaftaleno em 2-hidroxicromato catalisada pela NahC. Fonte: o autor.

Vários trabalhos teóricos abordam as duas possibilidades, porém o mecanismo em que ocorre a formação do epóxido é sustentado por dados cristalográficos, nos quais tanto Bugg quanto Kovaleva utilizaram análogos do substrato, que favoreceram

a cristalização do intermediário no sítio ativo da enzima.^{23,56,57} Mesmo que o caminho da formação do epóxido envolva mais espécies que o da formação direta da lactona pelo rearranjo de Criegee, as barreiras energéticas do caminho reacional via epóxido são menores.

2.4 Conclusões

Comparações de parâmetros de energia relativa das estruturas otimizadas dos modelos simplificados do sítio ativo da NahC com a primeira esfera de coordenação do Fe^{2+} e suas e de sobreposições a estruturas obtidas por cristalografia de raio-X mostraram que a estrutura com estado de *spin* singleto é a que melhor descreve o sistema sem a inserção do oxigênio. O sistema simplificado não se mostrou eficiente para descrever as principais interações presentes no sítio ativo da enzima. A partir desse dado inicial, verificou-se a necessidade de inserção da segunda esfera de coordenação do metal aos dados de entrada do cálculo.

O cálculo ONIOM descreveu melhor o sistema e mostrou que os resíduos de histidina e tirosina, presentes na segunda esfera de coordenação do metal do sítio ativo, desempenham papel importante na interação e ativação dos intermediários reacionais. Ademais, a formação do intermediário epóxido, experimentalmente reportada na literatura, também foi prevista. Os resultados obtidos são consistentes com estudos computacionais anteriores, que observaram o mesmo intermediário e que as interações com resíduos da segunda esfera de coordenação são de extrema importância no mecanismo de catálise das extradiol dioxigenases e na formação do intermediário epóxido.^{55,56}

Este trabalho sugere fortemente que a inserção de oxigênio na reação da NahC não é concertada e, portanto, um intermediário epóxido precede a formação da lactona no mecanismo reacional.

3 MONOOXIGENASES FLAVODEPENDENTES

Esta classe reúne enzimas que estão amplamente distribuídas na natureza e catalisam uma imensa variedade de reações químicas, tais como hidroxilação, redução, halogenação, além de processos de reparo de DNA, emissão de luz e sinalização celular.⁶⁹ Devido à essa variabilidade, há muito interesse nessas enzimas devido à sua notável atividade e seletividade, o que as tornam ferramentas promissoras para aplicações biocatalíticas. Por exemplo, as FMO's são conhecidas por catalisar a epoxidação de alquenos substituídos, levando à formação de produtos enantiopuros, que são amplamente utilizados na indústria farmacêutica⁷⁰. Além disso, os FMOs são responsáveis pela síntese de produtos naturais altamente complexos, incluindo-se alguns medicamentos promissores para o tratamento de cânceres e infecções bacterianas e fúngicas.^{71,72}

As monooxigenases flavodependentes usam como cofator as flavinas, que são compostos derivados da vitamina B2 (riboflavina), geralmente em sua forma derivada dinucleotídeo de flavina adenina (FAD) ou mononucleotídeo de flavina (FMN). A gênese desses cofatores em sistemas biológicos se dá numa reação que envolve a fosforilação da cadeia lateral do grupo ribitila da riboflavina em uma reação dependente de trifosfato de adenosina (ATP) catalisada pela enzima flavoquinase, produzindo o mononucleotídeo de flavina (FMN). Por sua vez, a reação entre o FMN e o ATP catalisada pela FAD sintase, leva à inserção de uma porção de monofosfato de adenosina, produzindo a flavina dinucleotídeo de adenina (FAD) conforme figura 3.1.

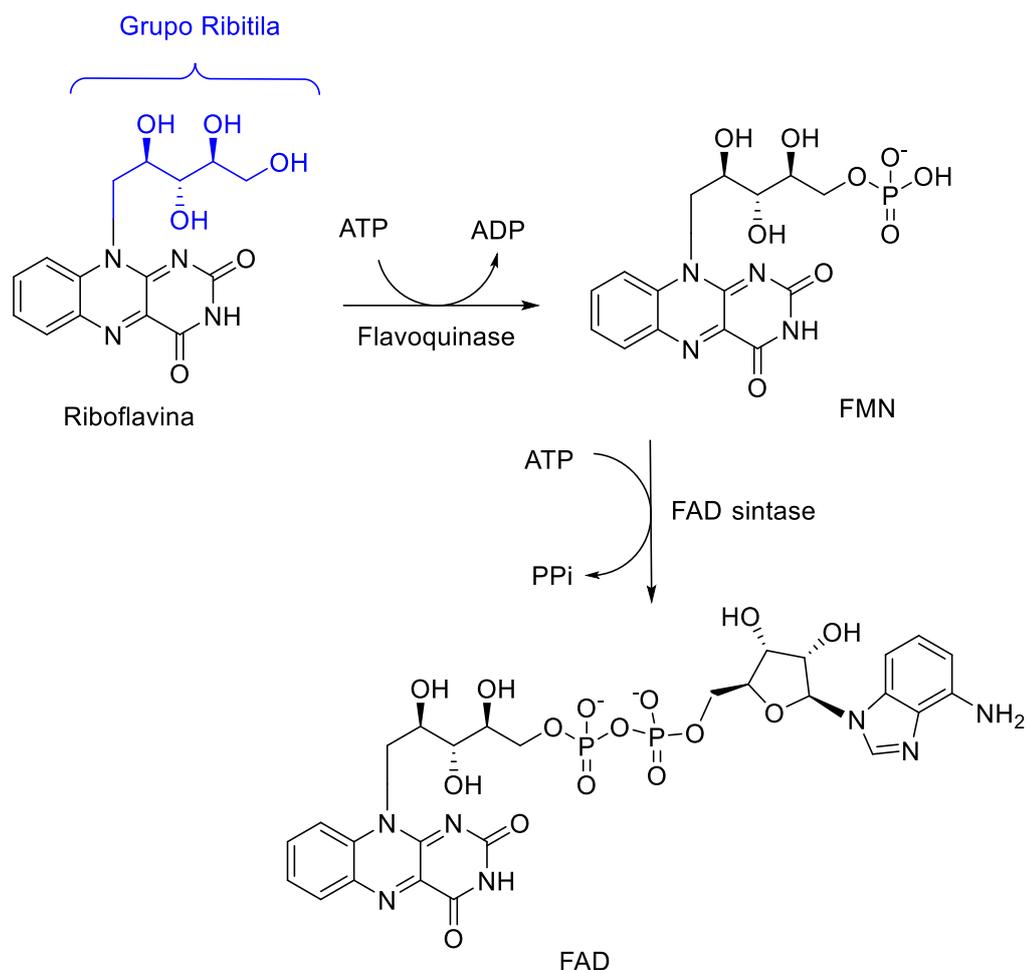


Figura 3-1: Síntese do FAD a partir da Riboflavina ou FMN. Fonte: o autor.

Essas flavinas possuem características físico-químicas interessantes. A denominação deriva do latim “flavus”, que significa amarelo. Essa coloração amarela está relacionada à transição eletrônica no anel isoaloxazina em aproximadamente 450 nm.⁷³ O espectro de absorção é diretamente influenciado pelas ionizações do anel de isoaloxazina oxidado, cujos valores de pK_a estão fora da faixa fisiológica. Essas ionizações envolvem a protonação na posição N(1) ($pK_a < 0$) e a desprotonação na posição N(3)-H ($pK_a = 10,2$) conforme figura 3-2. As flavinas em ambos os seus estados, reduzido ou oxidado, possuem a capacidade de catalisar diversas reações em sistemas bioquímicos.⁷⁴

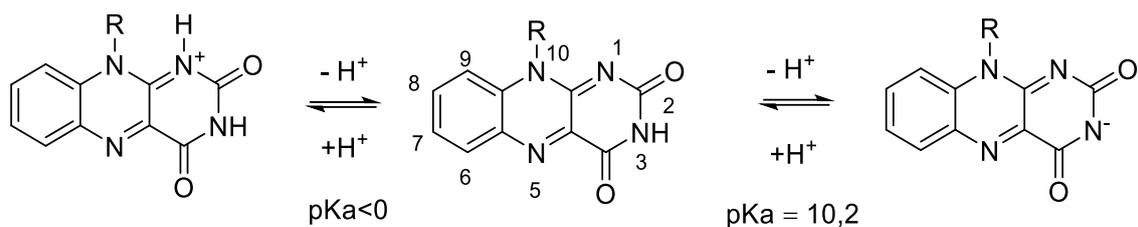
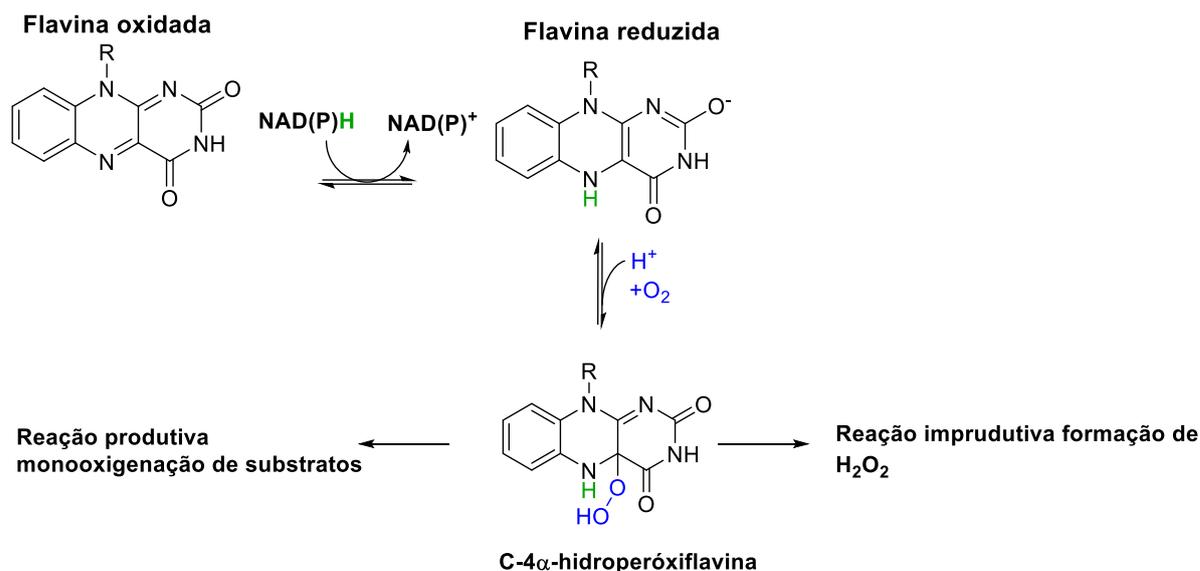


Figura 3-2: Estados de ionização da flavina. Fonte: o autor.

As flavinas podem receber até dois elétrons em reações de oxirredução.⁷⁵ Um dos caminhos mais empregados por FMO's leva à formação de um intermediário C-4 α -hidroperoxiflavina (**Esquema 3-1**).⁷⁶ Dependendo do estado de protonação, essa espécie ativada reage com substratos nucleofílicos ou eletrofílicos, acompanhado-se a cisão da ligação oxigênio-oxigênio.⁷⁷

No processo de ativação do oxigênio pelo grupo isoaloxazina, os sistemas enzimáticos fazem o aproveitamento produtivo do potencial reativo do flavoperóxido na oxigenação do substrato. Outro provável caminho envolve a eliminação de peróxido de hidrogênio da espécie flavoperóxido para formar a flavina oxidada sem a oxigenação do substrato. Embora, as enzimas evitem essa eliminação ao bloquear o acesso do solvente ao N5 do anel isoaloxazina.⁷⁸



Esquema 3-1: Redução da flavina e a formação do C-4 α -hidroperóxiflavina e os caminhos produtivo e imprudente em uma monooxigenase.

O benefício biológico da oxigenação bem-sucedida do substrato é seu uso no metabolismo ou na transdução de sinais nos sistemas biológicos. As reações imprudentes privam os organismos de um valioso metabólito. Assim, a evolução das monooxigenases pode ter sido guiada por pressão seletiva, para desenvolver mecanismos de controle, garantindo que o processo catalítico resulte nas reações de interesse.⁷⁹

As interações do substrato, dioxigênio e do peróxido de hidrogênio na flavoenzima álcool vinílico oxidase foram exploradas com uso de uma abordagem computacional. Os cálculos sugeriram que o dioxigênio e o peróxido de hidrogênio formado compartilham o mesmo caminho para entrar e sair do sítio ativo da oxidase (figura 3-3).⁸⁰

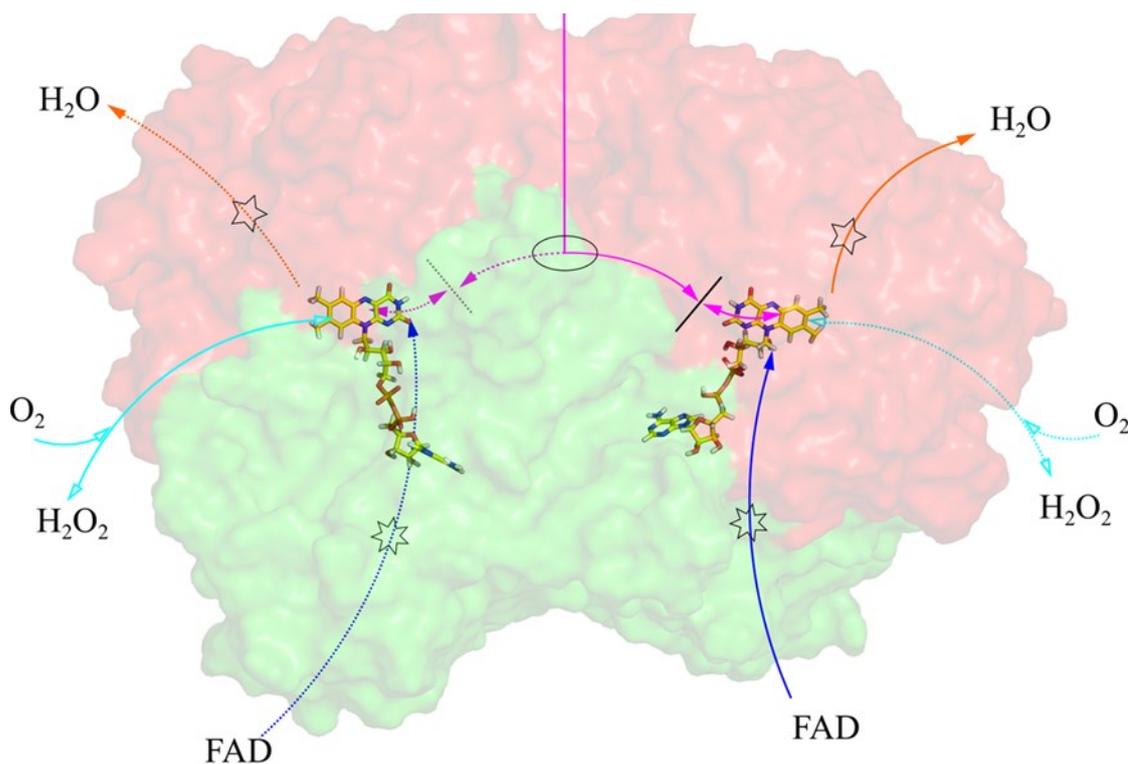
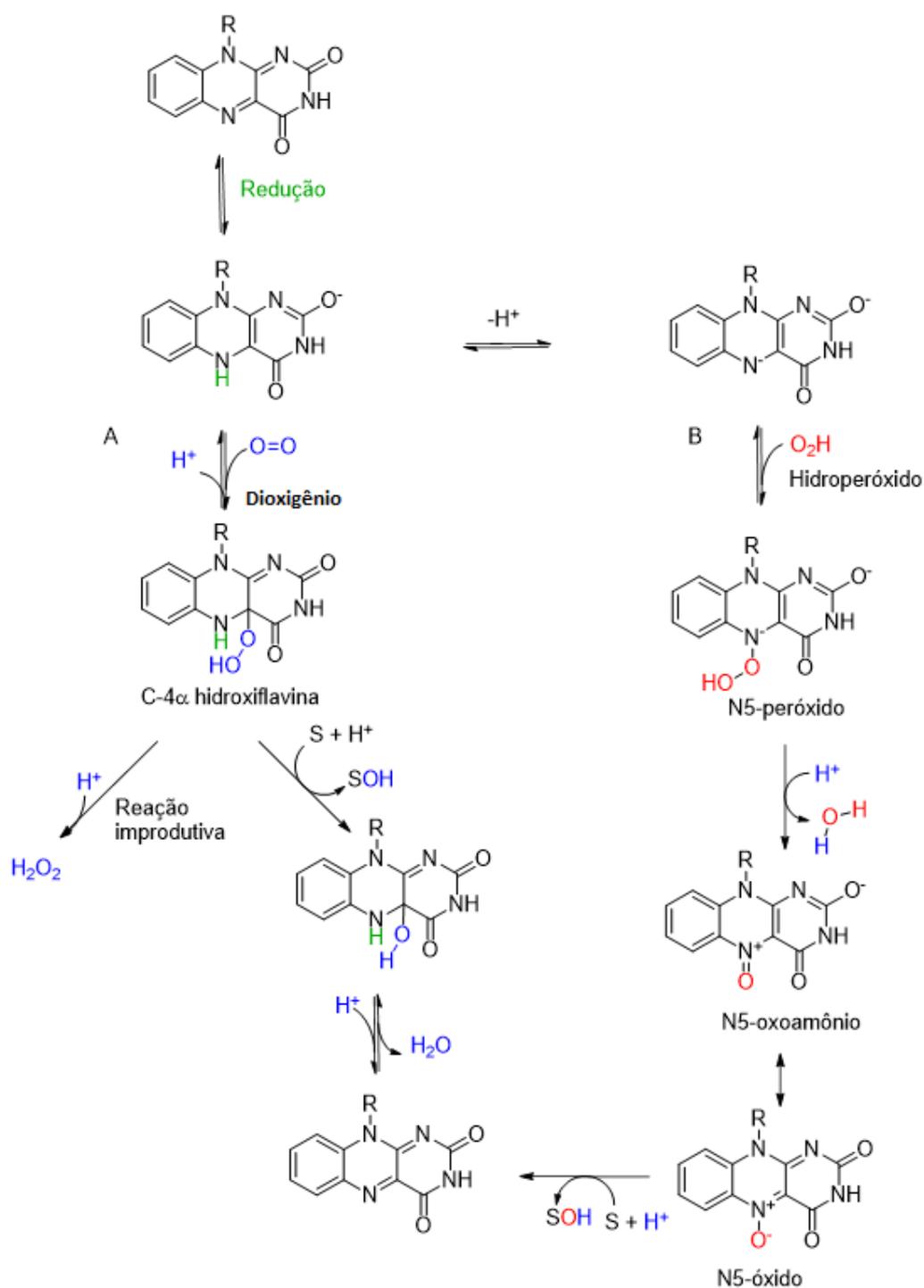


Figura 3-3: Difusão do dióxigênio através de túneis que convergem para a flavina reativa onde os resíduos de passagem podem operar como controle da reação da flavina com o dióxigênio. Fonte: adaptado de Hiromoto et al.⁸⁰

Dois métodos evoluíram para evitar as reações improdutivoas. O primeiro método, requer que o substrato seja rapidamente ligado ao sítio ativo, a fim de permitir a redução rápida de flavina e, por conseguinte, a catálise efetiva do substrato. Assim, a formação de hidropéroxido a partir da enzima reduzida é desencadeada pela presença do substrato a ser catalisado.⁸¹ Enzimas que empregam esta estratégia aceleram a transferência do grupo péroxido para o substrato, evitando a eliminação desnecessária de péroxido para o meio. O segundo meio consiste na rápida redução de flavina e subsequente formação de flavopéroxido, independentemente da presença de um substrato, mas o meio protéico estabiliza efetivamente a espécie flavopéroxido.⁸² Essas enzimas paralisam o ciclo catalítico, até que um substrato competente seja encontrado, evitando novamente a formação de péroxido de hidrogênio no meio. Um exemplo, é a reação catalisada pela enzima fenil acetato hidroxilase (HAPH), que mostra que a formação da C-4 α -hidropéroxiflavina é favorecida na ausência do substrato, *p*-hidroxifenilacetato (HPA), exibindo uma

eficiência catalítica da enzima k_{cat}/K_m , de $1,1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Em contrapartida, na presença do substrato, o valor de k_{cat}/K_m cai para $4,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ em pH 7, a $4 \text{ }^\circ\text{C}$.⁸³ A eliminação de H_2O_2 de C-4 α -peroxiflavina em HAPH na ausência do substrato é relativamente lenta com uma constante de $0,003 \text{ s}^{-1}$.⁸⁴

A formação do intermediário C-4 α -peroxiflavinaformado é rápida com valores de constantes de segunda-ordem típicas de 10^4 a $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Esse intermediário C-4- α -hidroperoxiflavina é muito versátil e capaz de realizar reações químicas diferentes, incluindo hidroxilação, oxidação Baeyer-Villiger, sulfoxidação, epoxidação, halogenação, descarboxilação oxidativa e emissão de luz.⁶⁹ Outro caminho reacional, envolve a formação e uso de um aduto de flavina N-(5)-peroxiflavina (Esquema 3-2), que é a espécie que promoverá a inserção do átomo de oxigênio no substrato em vez do C-4- α -hidroperoxiflavina.^{85,86}

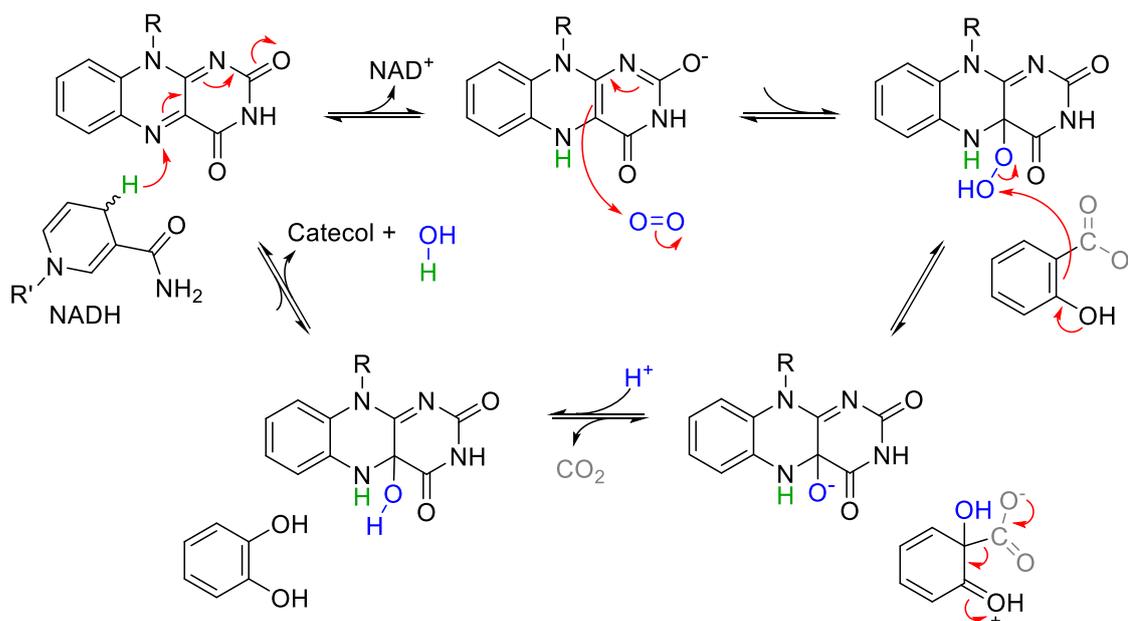


Esquema 3-2: Possíveis caminhos de ativação do dioxigênio pela flavina via C4 α em A e via N5 em B. Fonte: O autor.

Com relação ao mecanismo, as monooxigenases flavodependentes dividem-se em dois grupos. No primeiro, que inclui as classes A, B e G, as reações entre o substrato, o NADH e o oxigênio são realizadas por uma única proteína, que se liga fortemente ao seu cofator flavina. O segundo grupo, que inclui todas as demais classes, usa uma redutase para reduzir a flavina, que posteriormente difunde-se até a monooxigenase para realizar a reação de oxidação do substrato.⁷¹ Dentre as monooxigenases flavodependentes, existem as hidroxilases dependentes de flavina, enzimas que oxidam compostos aromáticos. As hidroxilações aromáticas são reações catalisadas por membros de dois grupos de monooxigenase flavodependente monocomponente do grupo A e monooxigenases de flavoproteína de dois componentes do grupo D⁸⁷.

As hidroxilases utilizam como agente redutor da flavina o NAD(P)H e a hidroxilação ocorre nas posições *orto* ou *para* do substrato. O ciclo catalítico das hidroxilases requer a formação de um complexo ternário, que é composto por FAD oxidado ligado à enzima, o substrato aromático e NAD(P)H. Uma característica fundamental neste mecanismo é o papel desempenhado pela ligação do substrato e pela protonação/desprotonação na ativação do oxigênio. A ligação do substrato favorece a reação da flavina reduzida com o oxigênio molecular, sendo que essa reação se torna 10 vezes mais lenta na ausência do substrato.⁸⁸

Dentre as hidroxilases, há a salicilato hidroxilase (NahG), que catalisa a reação de descarboxilação do salicilato produzindo catecol. Essa enzima faz parte da via de degradação do naftaleno da *PpG7*. Essa reação ocorre na presença de NADH, O₂, liberando CO₂, H₂O e NAD⁺.⁸⁹ Além disso, o mecanismo proposto para a NahG e, de forma geral, para todas as hidroxilases, ocorre via Substituição Eletrofílica Aromática (SEAr), na qual há a inserção do oxigênio no anel aromático do substrato e o intermediário formado sofre uma descarboxilação levando ao produto conforme esquema 3-3.



Esquema 3-3: Mecanismo proposto para a salicilato hidroxilase NahG via SEAr. Fonte: Adaptado de Costa *et al*, 2019.⁷⁹

As monooxigenases dependentes de flavinas exibem dinâmica relacionada ao movimento da flavina e catálise. Dados cristalográficos da NahG sugerem três conformações distintas. Uma conformação aberta, que permite a interação do substrato e do produto da reação com o solvente. Outra conformação denominada fechada, em que ocorre a reação do dioxigênio com a flavina e a hidroxilação do substrato. Essa conformação fechada também estabiliza a espécie C4a-hidroperoxiflavina. No caso da terceira conformação, denominada externa, a porção isoaloxazina do FAD move-se em direção ao solvente, permitindo sua redução pelo NADH.⁷⁸

A comparação entre as estruturas de difração de raios-X da apoenzima e da holoenzima mostram que as mudanças estruturais causadas pela ligação do FAD envolvem regiões afastadas do sítio de ligação do grupo isoaloxazina. Essa dinâmica proteica depende dos resíduos conservados próximos ao sítio de ligação do FAD (E38, D314 e R111) que possuem uma flexibilidade ao interagir com o FAD, conforme figura 3-4, presentes em uma região distante em relação a sua alça de ligação (resíduos 36-51).⁸⁵

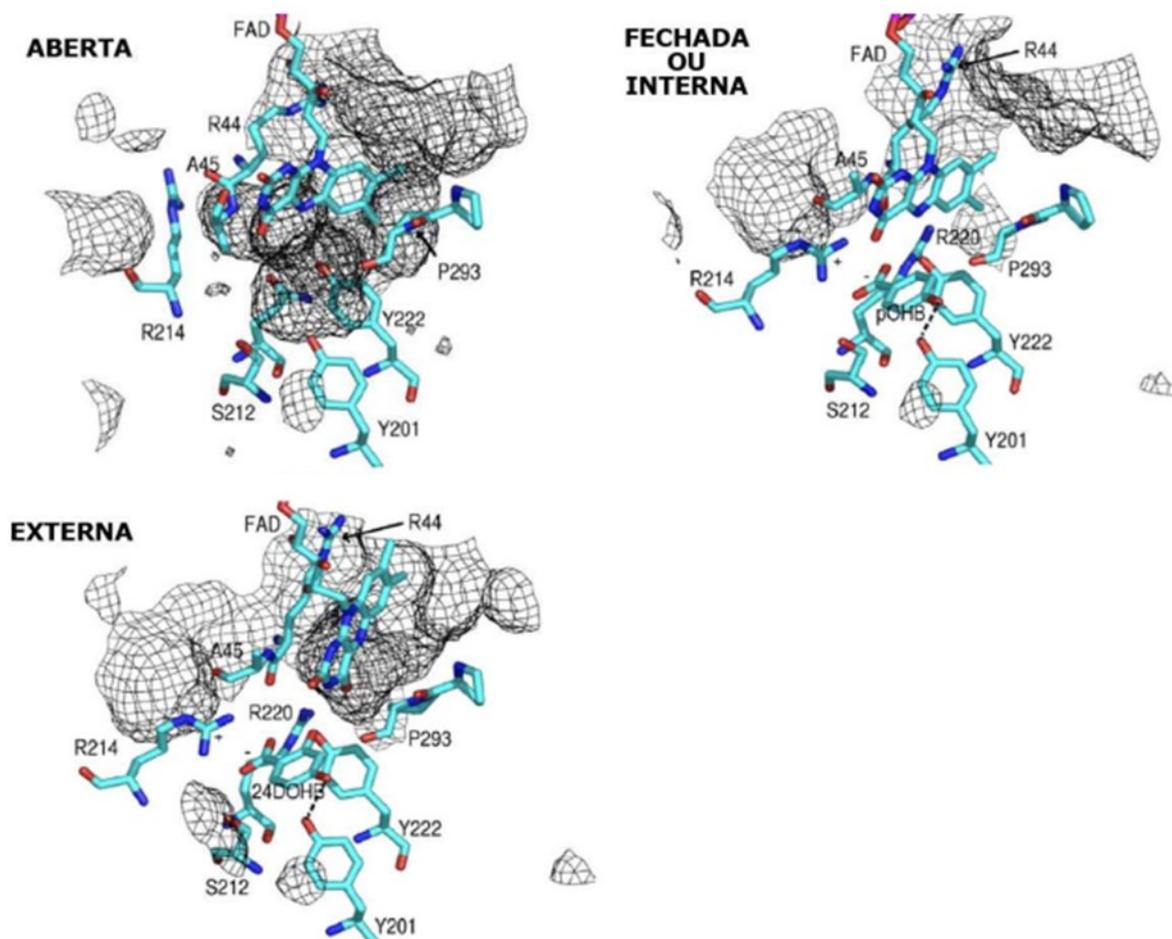


Figura 3-4: Três conformações possíveis adotadas na catálise por PHBH: aberta, fechada e externa. Fonte: Ballou *et al*, 2005.⁷⁵

A diversidade e a complexidade das reações catalisadas pelas flavoenzimas ativadoras do oxigênio são fascinantes e, mesmo após anos da descoberta dessa classe de enzimas, ainda se observam reações novas e inesperadas. Este trabalho busca entender qual o papel da alça do FAD na conformação proteica que favorece a estabilização do estado de transição da reação catalisada pela NahG. A metodologia que será aplicada será a truncagem do cofator, como por exemplo o uso do fosfito como ativador de um substrato truncado na Orotidina 5' Fosfato Descarboxilase,⁹⁰ esse tipo de estudo baseia-se na clivagem de ligações covalentes em posições específicas da molécula de maneira a conservar sua capacidade catalítica.

3.1 Objetivos

Em relação aos objetivos específicos referentes aos estudos com a monooxigenase flavodependente NahG, temos:

- Determinar o efeito do truncamento do FAD em FMN e riboflavina para a ligação da flavina e catálise.
- Avaliar a extensão da reação produtiva utilizando os cofatores truncados na oxigenação do salicilato via o intermediário C(4 α)-hidroperoxiflavina.
- Determinar o papel ativador dos nucleotídeos AMP e ADP na ligação e catálise pelas flavinas truncadas.
- Avaliar como os cofatores truncados e os nucleotídeos AMP e ADP afetam a atividade do NADH.
- Determinar por mutação sítio dirigida o papel de diferentes resíduos da alça de ligação do FAD na atividade enzimática.

3.2 Metodologia

3.2.1 Expressão da 6xHis-NahG nativa e mutantes

As bactérias BL21(DE3) códon plus contendo os plasmídeos para expressão dos genes da 6xHis-NahG nativa e de seus mutantes H110N, E38A, R111Q e D314A da cepa bacteriana *Pseudomonas putida* G7 foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Biologia Estrutural BIOEST (Prof. Ronaldo Nagem) do ICB/UFMG, Belo Horizonte/MG.⁹¹

A Tabela 1 apresenta os valores de massa molar, antes e após a clivagem, para a NahG nativa e mutantes, bem como o valor de absorvidade molar calculado pelo servidor PROTEIN CALCULATOR v3.4.

Tabela 3-1: Massa molares (MM) e absorvidade molares (ϵ) a 280 nm para a NahG nativa e mutantes. Esses valores foram obtidos pelo servidor PROTEIN CALCULATOR v3.4, disponível em <http://protcalc.sourceforge.net>.

6xHis-NahG	M.M. com cauda 6xHis (Da)	$\epsilon_{280\text{nm}}$ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
Nativa	48.964	77.950
E38A	48.906	77.950
R111Q	48.936	77.950
H110N	48.942	77.950
D314A	48.992	77.950

Preparou-se um pré-inóculo das bactérias em meio LB líquido (Luria-Bertani: 0,5% extrato de levedura, 1% peptona, 1% NaCl e pH 7,0) contendo canamicina e cloranfenicol para concentrações de 35 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. O pré-inóculo foi incubado por 16 h a 37°C sob agitação a 200 rpm. Em seguida, preparou-se o inóculo na proporção 1 parte de pré-inóculo para 50 partes de meio LB líquido com 35 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de canamicina e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cloranfenicol. As células do inóculo cresceram a 37°C sob agitação a 200 rpm em Erlenmeyer de 2 L contendo 1 L de meio de cultura; um total de 2 litros de meio de cultura foram utilizados em cada expressão. O crescimento bacteriano foi monitorado em um espectrofotômetro até a absorvância alcançar 0,6 a 0,8 em 600 nm. Alcançada essa leitura, o inóculo foi incubado por mais 20 minutos a 18°C sob agitação a 200 rpm. Em seguida, foi adicionado o indutor IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) com uma concentração final de 0,5 mM. A indução foi feita por 16 horas (*overnight*) a 21°C sob rotação a 200 rpm. Então, o meio de cultura foi centrifugado a 5.000 g por 5 min a 4°C para render aproximadamente 4,8 g de bactéria por litro de meio de cultura. O sobrenadante foi descartado e a porção sólida foi utilizada imediatamente ou congelada para a lise e purificação proteica.

3.2.2 Purificação por cromatografia de afinidade e exclusão molecular

As células obtidas da centrifugação foram ressuspensas em tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1% m/v sacarose, 1% v/v Tween 20 e 1% v/v glicerol). O volume de tampão de lise utilizado foi na proporção de 3 para 100 v/v de meio de cultura centrifugado. Após a ressuspensão, adicionou-se lisozima na concentração final de 0,25% m/V e a suspensão foi mantida em banho de gelo por 30 min. Em seguida, o material foi sonicado com amplitude de 30%, com três ciclos de 30 segundos, em sonicador Fisher Scientific Sonic Dismembrator modelo 500. Após a lise, o extrato celular foi centrifugado a 10.000 g por 45 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi reservado e o corpo de fundo descartado.

As próximas etapas foram realizadas a 4 °C. A fração solúvel do lisado foi imediatamente injetada em uma coluna de afinidade Ni²⁺ de 10 mL (Chelating

Sepharose Fast-Flow, GE Healthcare) conectada a um sistema de cromatografia ÄKTA start (GE Healthcare). Após a injeção da amostra, a coluna foi lavada com tampão A (50 mL, tampão Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 500 mM, imidazol 30 mM) e um gradiente linear foi aplicado usando tampão A (100 mL) e tampão B (100 mL, tampão Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM) com um fluxo de 1,5 mL/min. As frações obtidas da cromatografia de afinidade, que continham as proteínas recombinantes, foram reunidas e imediatamente eluídas em tampão C (50 mM Tris-HCl pH 7,4 e 50 mM NaCl) utilizando uma coluna de dessalinização HiPrep™ 26/10 (GE Healthcare). A NahG obtida dessa eluição foi concentrada utilizando um concentrador para centrífuga Vivaspín (faixa de corte de peso molecular de 10.000 GE Healthcare) para um volume de 2 mL, posteriormente, diluídas com glicerol 80% resultando em uma concentração final de 30% v/v de glicerol. As concentrações das proteínas foram calculadas pelo coeficiente de extinção molar de cada enzima, de acordo com a tabela 3-1, levando em consideração um fator de correção devido à presença de FAD, presente na fração de holoenzima produzida no processo de expressão da enzima (aproximadamente 22%), que possui uma contribuição de absorção de $23.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 280 nm. Uma segunda forma de quantificação para a quantidade de FAD foi utilizado, consistiu em medições de absorbância de soluções contendo 0,1% de dodecil sulfato de sódio que desnaturou a proteína, para ambos os métodos, foram obtidos as mesmas concentrações de FAD.

3.2.3 Estudos de cinética enzimática

As reações catalisadas pela NahG foram acompanhadas pelo consumo de NADH em um espectrofotômetro Cary50. As amostras foram comportadas em cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm. Utilizou-se o método das velocidades iniciais levando em conta valores menores que 10% de consumo de NADH a 25 °C. A velocidade de reação foi calculada considerando $v = \Delta[\text{NADH}]/\Delta t$. A concentração de NADH foi determinada em diferentes comprimentos de onda: 305 nm ($\epsilon = 2.295 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), 340 nm ($\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) e 375 nm ($\epsilon = 1.663 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). O comprimento de

onda foi escolhido levando em conta a contribuição de absorção total das espécies em solução como menor do que 1,2 unidades de absorvância. As reações, com um volume total de 1 mL, foram realizadas a pH 8,5 em tampão Hepes 56 mM, EDTA 1,1 mM e NaCl suficiente para resultar numa força iônica de 0,21 M. Todos os reagentes, com exceção do salicilato, foram incubados por 2 min a 25 °C antes de iniciar a reação pela adição de salicilato (10 µL de uma solução estoque 15 mM preparada no mesmo tampão de reação) usando um "add-mixer". Este procedimento elimina o evento inicial, em que se observa o lento consumo de NADH sob baixa concentração de flavina para as reações iniciadas pela adição de enzima.

3.2.4 Determinação da quantidade de peróxido formado no meio reacional

As concentrações de peróxido de hidrogênio foram quantificadas em triplicata utilizando peroxidase, uma enzima que catalisa a reação de aminoantipirina na presença de H₂O₂ e fenol para produzir antipirilquinonimina e água. Este produto absorve em 505 nm no espectro de UV-Vis. Para a quantificação, foi utilizada uma solução cuja composição foi de peroxidase (700 unidades de enzima/L), fenol 20 mM e 4-aminoantipirina 5 mM em fosfato de sódio 50 mM, pH 7,2, 0,02% (v/v) azida de sódio e BSA 0,5% (m/v) (armazenada à 4°C). Após incubação dessa solução com H₂O₂ a 37°C por 10 minutos, a absorbância da antipirilquinonimina foi medida a 505 nm.

A concentração de H₂O₂ produzida na solução reacional foi quantificada com auxílio de uma curva de calibração para H₂O₂, previamente padronizada por permanganometria. Após o preparo do padrão de H₂O₂, essa solução foi diluída oito vezes. A partir dessas diluições e com uso da solução comercial, a 505 nm, foi gerada uma curva de calibração. De modo a induzir somente a formação de H₂O₂, utilizou-se benzoato como pseudosubstrato, que promove exclusivamente a formação de peróxido sem que ocorra a hidroxilação do substrato pela espécie FAD-hidroperóxido.

3.2.5 Ensaio de incubação de FMN

As reações catalisadas pela NahG no ensaio de incubação foram feitas separadamente, em dois períodos de incubação, de 2 minutos e 6 dias com concentrações crescentes de flavinas(0-100 μ M) em um volume total de 1 mL, a pH 8,5 em tampão Hepes 56 mM, EDTA 1,1 mM e NaCl suficiente para resultar numa força iônica de 0,21 M. Todos os reagentes, à exceção do salicilato, foram incubados a 25 °C nos períodos descritos acima, antes de iniciar a reação pela adição de salicilato (10 μ L de uma solução estoque 15 mM preparada no mesmo tampão de reação) usando um "add-mixer".

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Estudos com a truncagem do cofator FAD

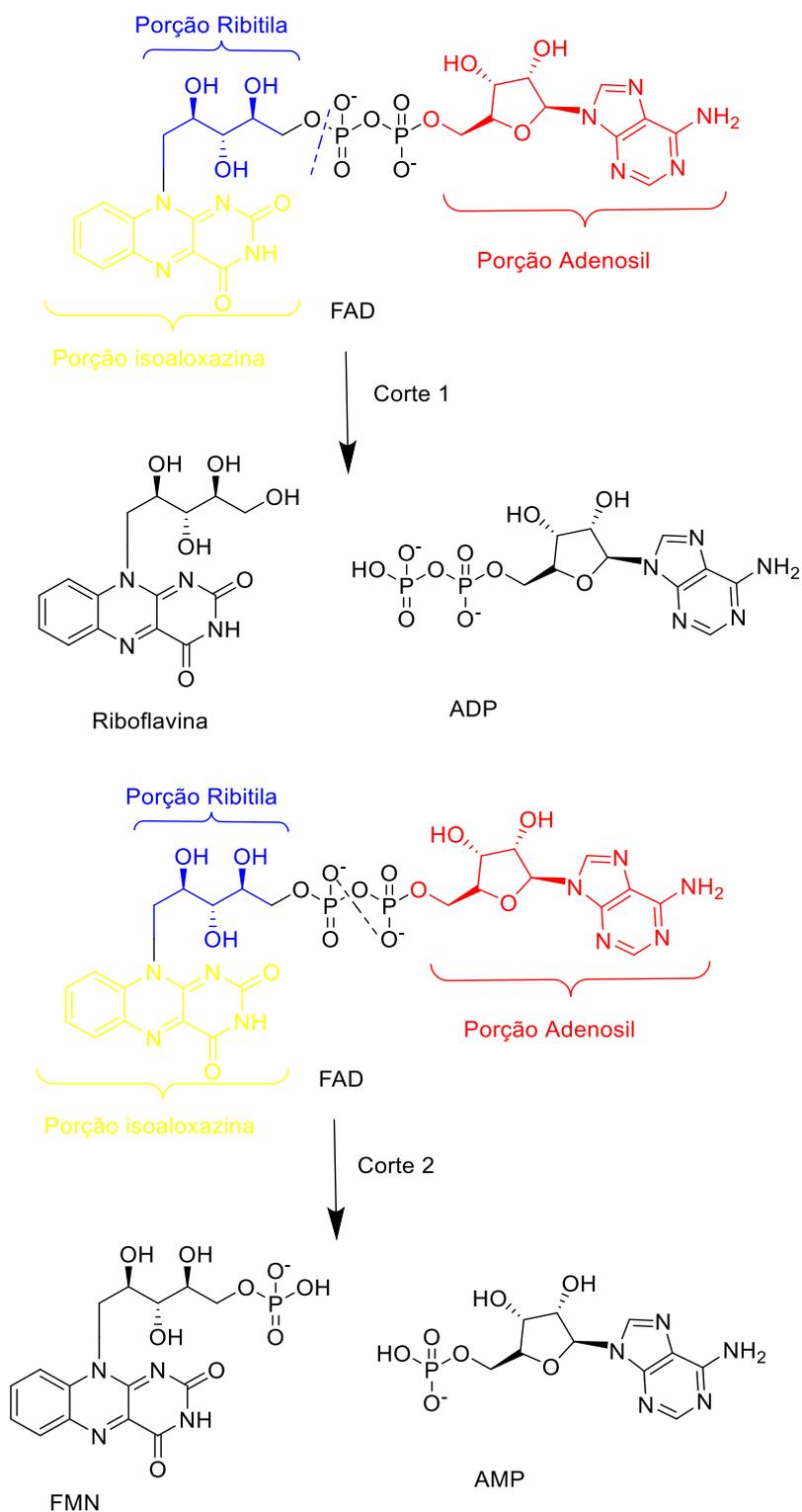
A ligação do FAD na NahG se dá em uma alça dinâmica que, juntamente com a dinâmica do grupo isoaloxazina do FAD, desempenha um papel importante na catálise dessa família de enzimas monooxigenases. Estudos envolvendo a truncagem do FAD possibilitam melhor entendimento de como cada porção do FAD exerce influência nessa dinâmica da alça. Além disso, para uma melhor descrição do papel da alça, foram desenvolvidos estudos cinéticos de enzimas mutadas justamente nessa porção de ligação do FAD.

A truncagem de um substrato ou cofator visa desconstruir essas moléculas por clivagem de ligações covalentes, formando duas ou mais partes que participam das funções catalíticas (Esquema 3-4). Neste trabalho, avaliaram-se os aspectos físico-químicos responsáveis pela ligação do cofator FAD na NahG. Para tal, utilizaram-se as versões truncadas riboflavina e FMN na ausência e presença dos nucleotídeos de adenosina, AMP e ADP, que representam as porções excluídas do FAD.

O efeito de truncagem do FAD e de ativação das flavinas pelos nucleotídeos de adenosina foram avaliados utilizando cinética no estado estacionário. Os dados cinéticos em diferentes concentrações de flavinas mostram um comportamento de saturação para $v/[E]$ (figura 3-12). A equação 1 foi utilizada para o ajuste não-linear dos dados.

$$\frac{v}{[E]} = \left(\frac{v}{[E]} \right)_0 + \frac{k_{cat}^{ap} \cdot [flavina]}{K_d^{ap} + [flavina]} \quad (1);$$

Onde $\left(\frac{v}{[E]} \right)_0$ é a atividade catalítica basal da holoenzima ligada ao FAD quando as flavinas utilizadas como cofatores truncados possuem concentração = 0, e k_{cat}^{ap} e K_d^{ap} são os parâmetros cinéticos para as flavinas ligadas à apoenzima.



Esquema 3-4: Truncagem do cofator FAD, as linhas pontilhadas indicam as ligações covalentes rompidas resultando nos cofatores cataliticamente ativos. Fonte: o autor.

A atividade basal ($v/[E]_0$) representa o efeito de 22% de NahG ligada ao FAD co-purificada durante o processo de obtenção da *apo* enzima. Todos os esforços para a conversão dos 22% de holoenzima ligada ao FAD em apoenzima via diálise exaustiva foram em vão e resultaram em uma enzima inativa. O k_{cat}^{ap} corresponde à constante catalítica determinada em excesso de flavina, quando toda a enzima presente está presente em sua forma *holo*. O valor de k_{cat}^{ap} relaciona com k_{cat} de acordo com a fração da *holo* NahG ligada ao NADH, salicilato e O₂. A concentração de flavina necessária para atingir metade do valor de k_{cat}^{ap} é definida por K_d^{ap} . Para a reação catalisada pela NahG em excesso de FAD, foi determinado um k_{cat}^{ap} de 15,9 s⁻¹. Esse valor é cerca de 4,5 vezes maior do que o determinado por Costa e colaboradores (2019) sob as mesmas condições ⁹².

Duas modificações na purificação da enzima NahG são propostas como razão para esse efeito. No presente trabalho, todas as etapas de purificação foram realizadas a 4 °C em um único dia usando apenas duas colunas cromatográficas, uma coluna de afinidade a Ni²⁺ para obtenção da homogeneidade e cromatografia de exclusão de tamanho para troca de tampão. O k_{cat} determinado neste trabalho corresponde a um valor mais próximo ao de 21 s⁻¹ relatado para a salicilato hidroxilase de *P. putida S-1*.⁹³

O processo de ligação do FAD na NahG é consistente com multietapas, que dependem da concentração de flavina adicionada. Em condições diluídas, quando a concentração de FAD foi próxima a K_d^{ap} ($[FAD] = 0,4 \mu M$), observou-se que pelo menos 2 minutos de incubação do cofator com a *apo* NahG são requeridos para a ligação do cofator. A $v/[E]$ sob tais condições não difere significativamente em relação a 50 minutos, quando a adição de FMN exógeno foi capaz de deslocar o FAD diminuindo a velocidade de oxidação do NADH. No entanto, a incubação com FAD por vários dias produz uma holoenzima fortemente ligada ao FAD, que não pode ser substituído pelo FMN. Isso foi observado previamente em outras FMOs monocomponentes.⁹⁴ Essas observações (figura 3-5) são consistentes com uma situação em que a ligação do FAD passa por um pré-equilíbrio antes de ocorrer um

estado fortemente ligado à enzima, ou seja, indicando a existência de pelo menos dois estados.

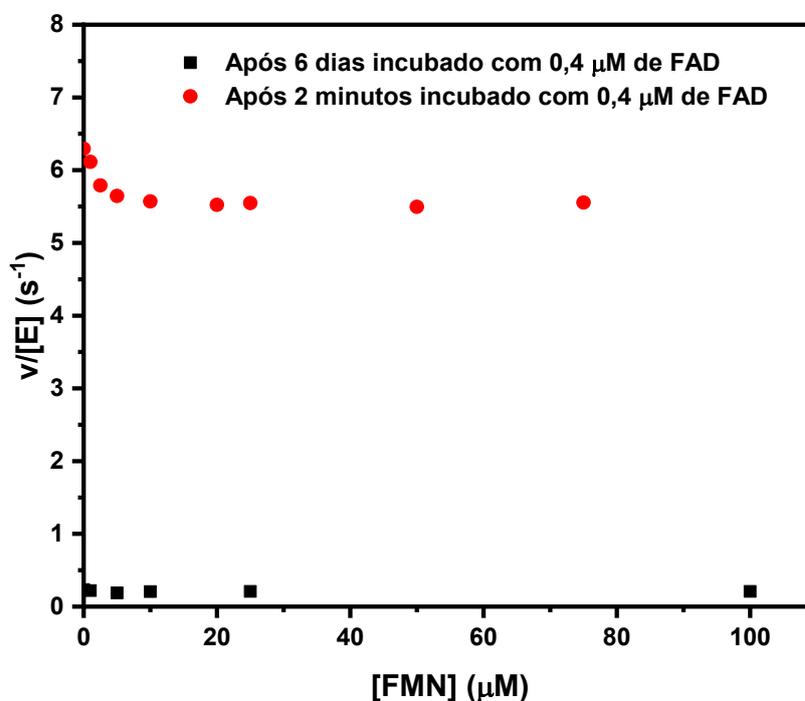


Figura 3-5: Atividade enzimática da NahG em função da concentração de FMN após incubação com 0,4 μM de FAD na presença de 200 μM de NADH e 120 μM de salicilato. Fonte: o autor.

Outras enzimas que utilizam flavinas como cofator, as flavodoxinas, apresentaram um comportamento semelhante. Um estudo relatou que os efeitos na ligação do cofator na flavodoxina de *Azotobacter vinelandii* se dá em dois estados: um fracamente ligado e o segundo fortemente ligado, sendo que, para atingir esse segundo estado, é requerido um longo lapso temporal. Os autores demonstram que esse estado fortemente ligado, na escala de picomolar, está relacionado à uma reorganização conformacional dos resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação da flavina.^{94,95}

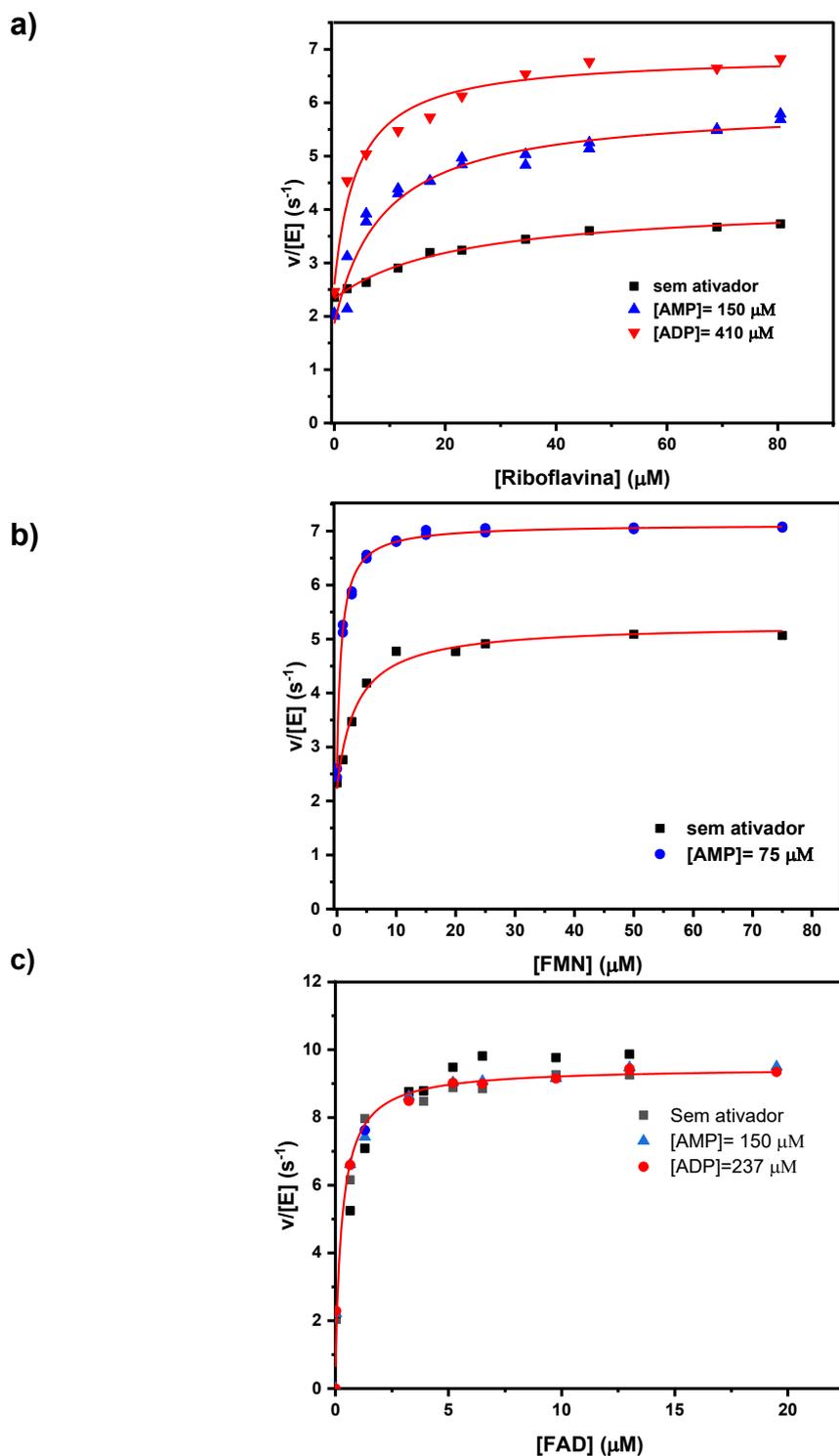


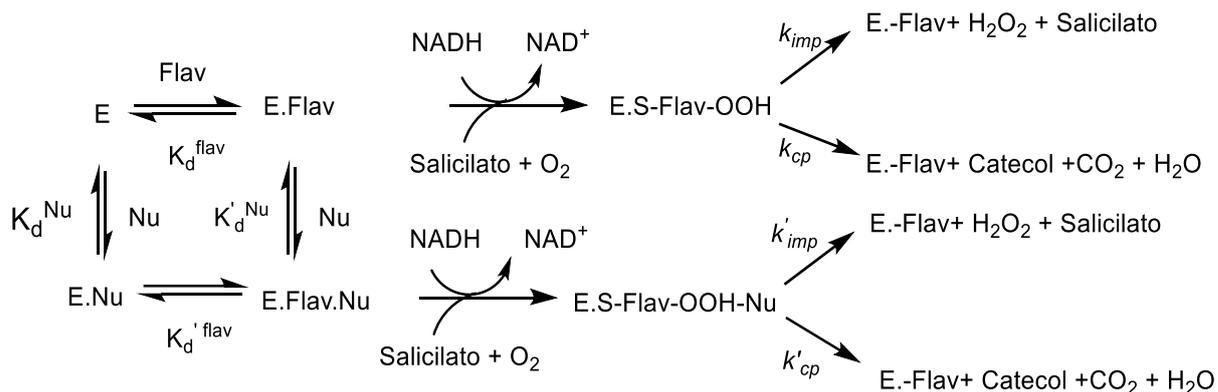
Figura 3-6: Perfis cinéticos para (a) riboflavina, (b) FMN e (c) FAD para a oxidação catalisada de NADH (200 μM) por NahG na presença de salicilato (150 μM) na ausência e presença de AMP e ADP a pH 8,5, $I = 0,21 \text{ M}$ (NaCl) e 25 $^{\circ}\text{C}$. Os ajustes dos dados foram de acordo com a Eq. 1. Fonte o autor.

A partir das curvas cinéticas obtida para a riboflavina na ausência e presença dos nucleotídeos (figura 3-6 a), FMN na ausência e presença do nucleotídeo (figura 3-6 b), FAD na ausência e presença dos nucleotídeos (figura 3-6 c), foram obtidos os valores para k_{cat}^{ap} e K_d^{ap} estão mostrados na tabela 3-2. Em altas concentrações das flavinas, os valores de k_{cat}^{ap} diminui de $11,7 \text{ s}^{-1}$ com FAD para $2,8$ e $4,1 \text{ s}^{-1}$ com FMN e riboflavina. Os valores são aparentes pois os experimentos foram realizados em concentrações de NADH e substrato insuficientes para causar a saturação da NahG. O real valor de k_{cat} foi calculado considerando a fração total de holoenzima ligada ao NADH e ao substrato. Os termos k_{cp} ou k_{cp}' referem as constantes de velocidade para os caminhos reacionais produtivo e improdutivo respectivamente (Esquema 3-5) e foram calculados a partir de k_{cat} e a extensão de reação improdutivo, determinada pela quantidade H_2O_2 formado.

Tabela 3-2: Dados cinéticos do efeito de diferentes flavinas na oxidação do NADH e na descarboxilação oxidativa do salicilato catalisada por NahG em pH 8,5, I = 0,21M (NaCl) e 25 °C. Os valores entre parênteses são proporções em relação ao FAD. Os erros são desvios padrão.

Flavinas	X_{E-NADH}	K_d (μM)	k_{cat}^{ap} (s^{-1})	k_{cat}^b (s^{-1})	%Reação improdutiva	k_{cp} ou $k_{cp}'^c$ (s^{-1})
FAD	0,87	$0,39 \pm 0,08$ (1)	$11,7 \pm 0,3$ (1)	$15,9 \pm 0,4$ (1)	$7,6 \pm 0,9$	$14,7 \pm 0,4$ (1)
FMN	0,50	$2,4 \pm 0,5$ (6,1)	$2,8 \pm 0,2$ (4,2)	$8,3 \pm 0,5$ (1,9)	45 ± 1	$4,6 \pm 0,3$ (3,2)
FMN + AMP 75 μM	0,69	$0,80 \pm 0,05$ (2,0)	$4,6 \pm 0,1$ (2,5)	$10,2 \pm 0,2$ (1,6)	17 ± 1	$8,5 \pm 0,2$ (1,7)
Riboflavina	0,42	26 ± 3 (67)	$1,8 \pm 0,1$ (6,5)	$6,6 \pm 0,3$ (2,4)	77 ± 1	$1,5 \pm 0,1$ (10)
Riboflavina + AMP 150 μM	0,47	15 ± 3 (38)	$3,7 \pm 0,2$ (3,2)	$12,1 \pm 0,7$ (1,3)	31 ± 1	$8,3 \pm 0,5$ (1,8)
Riboflavina + ADP 410 μM	0,56	4 ± 1 (11)	$4,3 \pm 0,3$ (2,7)	$11,7 \pm 0,8$ (1,4)	22 ± 2	$9,1 \pm 0,6$ (1,6)

O Esquema 3-5 apresenta as possíveis espécies e vias que envolvem o truncamento da flavina e o processo de ativação pelos nucleotídeos de adenosina. Os valores de K_d^{ap} incluem K_d e K_d' , enquanto k_{imp} e k_{cp} representam as constantes de velocidade para as reações improdutivas e produtivas, respectivamente.



Esquema 3-5: Possíveis espécies formadas e os caminhos reacionais com a truncagem da flavina (Flav) e a ativação de nucleotídeos AMP e ADP (Nu).

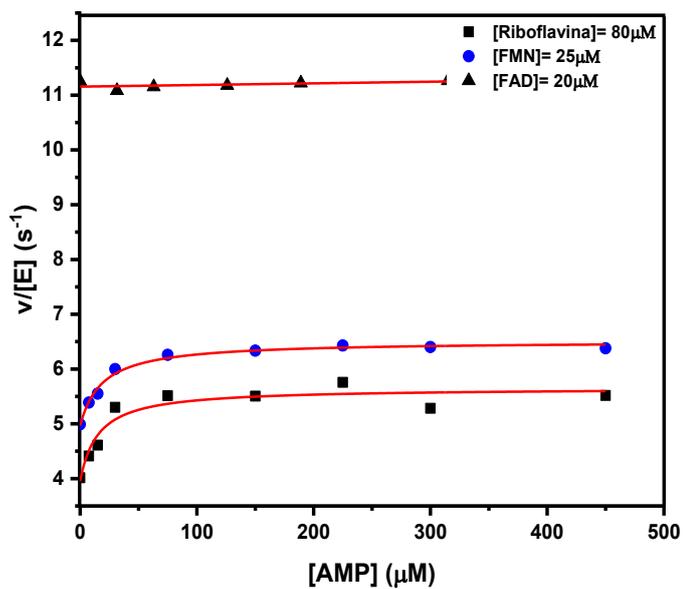
Os valores de k_{cat}^{ap} e K_d^{ap} obtidos para os sistemas com FMN e riboflavina substituindo FAD indicam que os grupos adenosina monofosfato e adenosina difosfato do FAD atuam na ativação da flavina na catálise pela enzima NahG. Essas porções atuam como ativadores ao favorecer uma conformação ativa da enzima. Isso ocorre a exemplo de outras enzimas que utilizam substratos e cofatores diversos, em que porções remotas desses compostos ativam o local da reação à medida que conformações catalíticas rígidas da enzima são acessadas.⁹⁶ Um caso bem interessante é observado para o diânion de fosfito, que ativa as reações de substratos truncados com o fosfodiânion da orotidina 5'-monofosfato descarboxilase (OMPDC), triosefosfato isomerase (TIM) e glicerol fosfato desidrogenase (GPDH).^{90,97} Outro exemplo é o fragmento ADP-ribose de NAD/NADH, os fragmentos pirofosfato e tripolifosfato de ADP e ATP, respectivamente.^{98,99}

Neste trabalho, o AMP e o ADP foram usados como ativadores para as reações catalisadas por NahG usando as flavinas truncadas. A presença dos nucleotídeos adenosina monofosfato (AMP) e adenosina difosfato (ADP) em elevadas concentrações e variando as concentrações das flavinas causou uma diminuição na constante de ligação K_d^{ap} das flavinas, conforme indicado na tabela 3-2. Para a riboflavina, o K_d^{ap} diminuiu de 26 μ M na ausência de ativadores para 15 μ M na presença de 150 μ M de AMP e para 4 μ M na presença de 410 μ M de ADP. Para o

FMN, o valor de K_d^{AP} diminuiu de 2,4 μM para 0,80 μM pela adição de AMP 75 μM no sistema.

Também foi avaliado o efeito de concentrações crescentes dos ativadores na presença de elevadas concentrações de flavinas, na figura 3-7 a, AMP na presença de Riboflavina, FMN e FAD, e, figura 3-7 b ADP na presença de Riboflavina e FAD, todos os parâmetros obtidos são apresentados na tabela 3-3, observou-se a ativação para a riboflavina e para o FMN. Nenhuma ativação foi observada para o FAD, confirmando o efeito ativador dos nucleotídeos de adenosina para as flavinas truncadas.

a)



b)

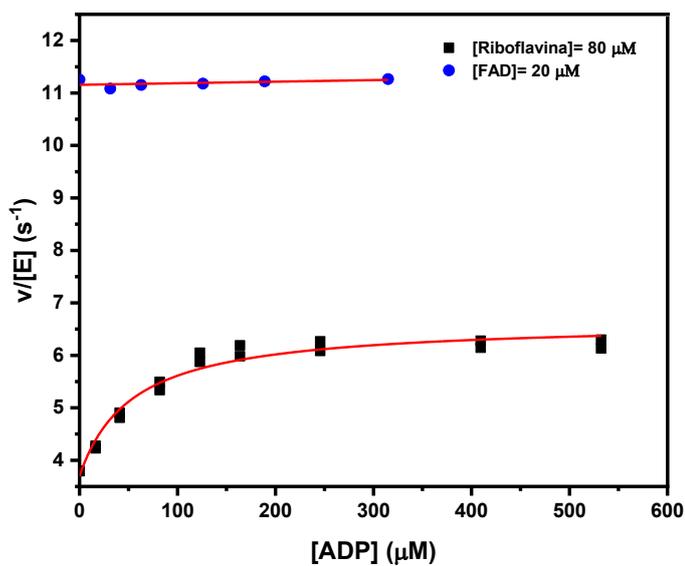


Figura 3-7: Perfis cinéticos para (a) AMP e (b) ADP ativando a oxidação catalisada de NADH (200 μM) por NahG na presença de salicilato (150 μM) e as flavinas, riboflavina, FMN e FAD, a pH 8,5, I = 0,21 (NaCl) e 25 °C.

Tabela 3-3: Dados cinéticos e termodinâmicos para o efeito de diferentes ativadores na descarboxilação oxidativa de salicilato catalisado por NahG ligado a diferentes flavinas a pH 8,5, I = 0,21 M (NaCl) e 25 °C.

Ativador	K_d (μM)	k_{cat}^{AP} (s^{-1})
FMN 25 μM + AMP	22 \pm 6	3,0 \pm 0,2
Riboflavina 80 μM + AMP	13 \pm 3	1,7 \pm 0,1
Riboflavina 80 μM + ADP	45 \pm 10	3,2 \pm 0,2

A ativação das flavinas pela presença de AMP e ADP favorece o caminho produtivo. Com a adição dos ativadores, a concentração de peróxido diminui como resultado da recuperação do caminho produtivo (esquema 3-5), parcialmente inabilitado com o uso de FMN e riboflavina (tabela3-3). Ambos os caminhos, produtivo e improdutivo, envolvem o consumo de NADH e sua extensão depende da identidade do substrato. A contribuição do caminho improdutivo na oxidação de salicilato mediada pelo holo enzima ligada ao FAD é de apenas 7,6% (Tabela 3-2). Para as reações catalisadas mediadas por FMN e riboflavina, têm-se 45% e 77% de caminho improdutivo, respectivamente. A adição de excesso de AMP (75 μM) à reação mediada por FMN diminui a quantidade da via improdutiva de 45%, na ausência, para 17%, na presença de AMP. Na reação com riboflavina, tem-se uma diminuição na extensão do caminho improdutivo de 77% para 22% na ausência e presença de AMP, respectivamente. Substituindo ADP por AMP (150 μM), um ativador mais fraco para a catálise da riboflavina, a extensão do caminho improdutivo aumenta de 22% para 31%. Para avaliar a eficiência da determinação de H_2O_2 e a viabilidade do caminho improdutivo na presença de cada flavina, mediu-se o consumo de NADH catalisado pela holo NahG usando benzoato, um conhecido indutor responsável pela formação quantitativa de H_2O_2 a partir de NADH. Aqui, a quantidade estimada de peróxido foi de 100 \pm 2% para FAD, 99 \pm 3% para FMN e 100 \pm 3% para riboflavina.

Os valores de ΔG de ligação obtidos para FMN é de -7,7 kcal/mol e de AMP é de -6,7 kcal/mol sendo que a soma dessas duas contribuições são de -14,4 kcal/mol, tais valores deveriam ser proporcionais ao valor de ΔG para a ligação do cofator FAD. Contudo, o valor de ΔG para a ligação do FAD, obtido espectroscopicamente, é de 10,5 kcal/mol, indicando um maior desestabilização para o cofator completo, porém ao utilizarmos os valores da constante de ligação do FAD obtido por medidas eletroquímicas, por Tu e colaboradores¹⁰⁰, o valor de ΔG para a ligação do FAD é de 15,4 kcal/mol mais condizente com o esperado. Essa variação de aproximadamente 1 kcal/mol se dá por fatores de perdas entrópicas ao utilizarmos um sistema com maior número de componentes, no caso FMN AMP.

As estruturas de inúmeras flavoproteínas foram determinadas por difração de raios-X. Apesar da reação catalisada por cada flavoproteína, as estruturas compartilham diversas características relacionadas às interações no sítio de ligação do cofator e dos substratos e permitem uma visão detalhada de diferentes estados conformacionais: Apo NahG com a alça de E38 a G53 em uma conformação fechada (PDB 6BZ5) figura 3-8 a; estados mostrando uma conformação aberta para a alça correspondente em PhzS de *Pseudomonas aeruginosa* (PDB 3C96), 3HB6H de *Rhodococcus jostii* (PDB 4BJZ) com o grupo isoaloxazina nas posições figura 3-8 (b) "externa" e figura 3-8 (c) "interna", respectivamente.

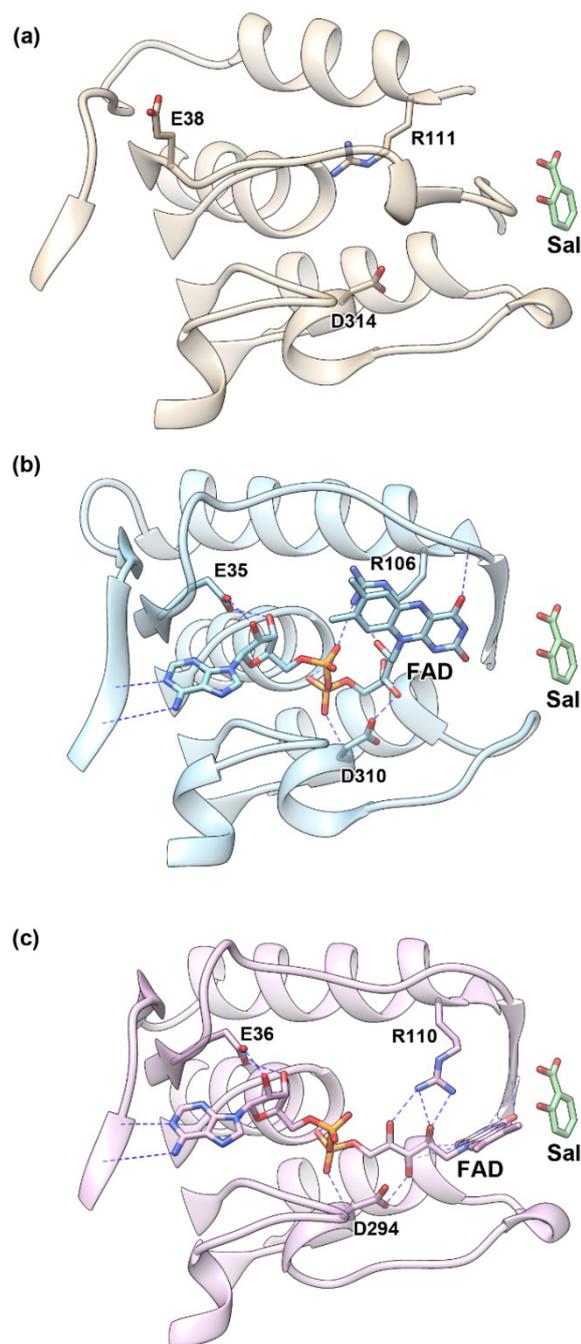


Figura 3-8: Flavoproteínas homólogas mostrando os diferentes estados conformacionais na fenda de ligação do FAD: (a)enzima Conformação da alça de E38 a G53 da conformação fechada da NahG na forma Apo (PDB 6BZ5); (b) conformação aberta do mesmo loop correspondente da holoenzima PhzS de *Pseudomonas aeruginosa* (PDB 3C96) (c)conformação externa do mesmo loop da holoenzima 3HB6H da *Rhodococcus jostii* (PDB 4BJZ) O salicilato (Sal) foi modelado considerando a posição correspondente do 2,4-dihidroxibenzoato na estrutura cristalográfica da 4-hidroxibenzoato hidroxilase 4HBH, (PDB 1DOD).

Ao comparar a estrutura cristalográfica para a *apo* 6xHis-NahG (entrada PDB 6BZ5) e os homólogos contendo o FAD ligado. A alça de E38 a G53 é encontrada em uma conformação aberta na estrutura da *apo* 6xHis-NahG e ocupa a posição equivalente do FAD no estado *holo*, no qual a alça assume uma conformação fechada distinta que se dobra sobre a estrutura do FAD controlando o acesso ao substrato e o produto reacional no sítio ativo.^{92,101,102} É bastante plausível que esta alça mantenha as porções flavina e adenosina do FAD de uma maneira cooperativa.

Resíduos polares altamente conservados estão envolvidos na interação com o FAD no estado *holo*: o resíduo E38 liga-se de forma bidentada com cada um dos grupos hidroxila do grupo ribosila; R111 interage com o grupo difosfato; D314 faz ligações de hidrogênio com o átomo O3' do grupo ribitila.

Embora as cadeias laterais de E38 e D314 não mostrem nenhuma mudança conformacional aparente durante a catálise, a cadeia lateral de R111 oscila entre duas posições diferentes e desempenha um papel importante na dinâmica do grupo de isoaloxazina. Na posição "interna", este resíduo faz ligações de hidrogênio com o átomo de O2' (e possivelmente com o átomo de O4') do grupo ribitila, enquanto na posição "externa" interage com o grupo fosforila da adenosina espacialmente próxima ao átomo de O2' do grupo ribitila.¹⁰³ Com isso, há uma correlação entre os efeitos do truncamento na flavina e as interações existentes na fenda de ligação do FAD na NahG. O mais notório é a excisão de pedaços maiores do FAD enfraquece a ligação da flavina e favorece o caminho improdutivo devido a menos interações entre a flavina e a NahG. A deleção do grupo ribitol fosfato resulta na perda de interações com os grupos NH da estrutura principal dos resíduos S18 e D314 e um aumento de 11 vezes nos valores de K_d^{ap} . Um truncamento mais remoto com excisão da porção adenosina monofosfato rende FMN e resulta em um aumento de 6,1 vezes em K_d^{ap} . Neste caso, as interações ausentes são as interações de ligações de hidrogênio entre os átomos do esqueleto de K131 e o anel de adenina, entre os grupos hidroxila da ribosila e a cadeia lateral de E38 e entre o grupo adenosina fosfato e a cadeia lateral de R111 quando a conformação "interna" prevalece.⁷⁸

Também avaliou-se o efeito do fosfito como ativador nas reações com as flavinas na ausência e presença de AMP e ADP. Os dados cinéticos em diferentes concentrações de fosfito para $v/[E]$ mostram um comportamento de saturação (figura 3-12).

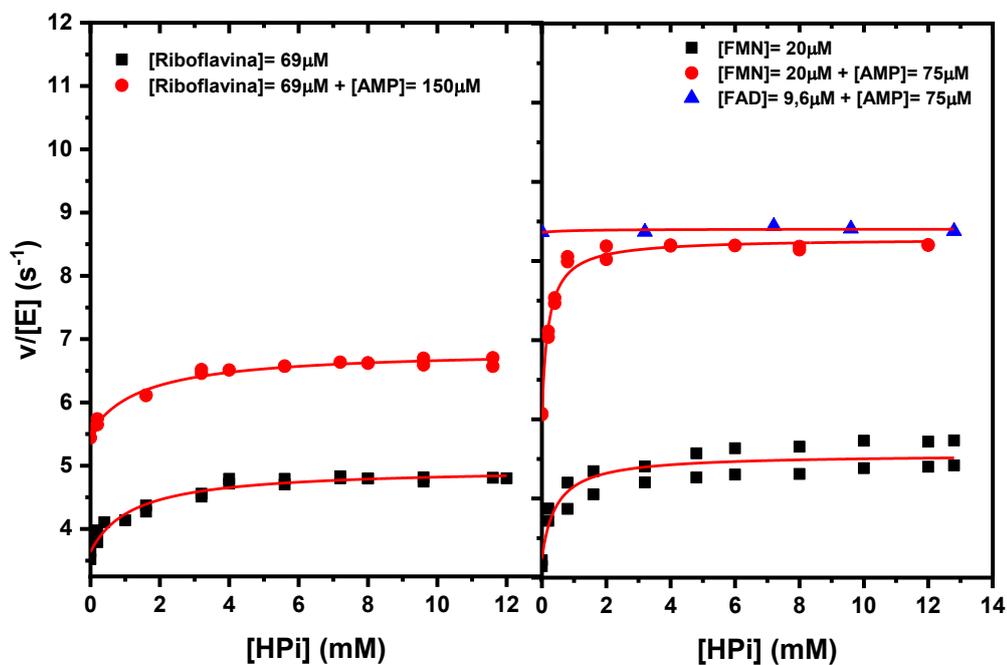


Figura 3-9: Perfis cinéticos para a oxidação do salicilato catalisada pela NahG em concentrações crescentes de fosfito na presença de riboflavina 69 µM, AMP 150 µM, NADH 200 µM e 150 µM de salicilato; FMN 20 µM, AMP 75 µM, NADH 200 µM, 150 µM de salicilato; na presença de salicilato (150 µM) na ausência e presença de AMP e ADP a pH 8,5, I = 0,21 M (NaCl) e 25 °C. Fonte: o autor.

Tabela 3-4: Dados cinéticos e termodinâmicos para o efeito do fosfito na descarboxilação oxidativa de salicilato catalisado por NahG ligado a diferentes flavinas e nucleotídeos de adenosina a pH 8,5, I = 0,21 M (NaCl) e 25 °C.

Sistema	K_d (mM)	k_{cat}^{ap} (s ⁻¹)
Fosfito + FMN 20µM	0,44 ± 0,04	6,6 ± 0,1
Fosfito + FMN 20µM + AMP 75µM	0,20 ± 0,02	9,3 ± 0,2
Fosfito + Riboflavina 69µM	1,2 ± 0,3	5,0 ± 0,1
Riboflavina 80µM + AMP=150 µM	1,5 ± 0,3	6,8 ± 0,1

Os dados obtidos mostram que o grupo fosfito também atua como um ativador aumentando os valores de k_{cat} das reações. Observou-se aproximadamente o dobro do valor de k_{cat} para o sistema contendo Riboflavina e AMP e o triplo para o sistema contendo FMN. Os valores obtidos mostram o fosfito favorece a ligação dos grupos flavina e adenosina na enzima, favorecendo as conformações cataliticamente ativas. Os valores de K_d para o fosfito diminuem na presença dos nucleotídeos de adenosina, indicando que sua ligação é favorecida pela presença dos nucleotídeos de adenosina.

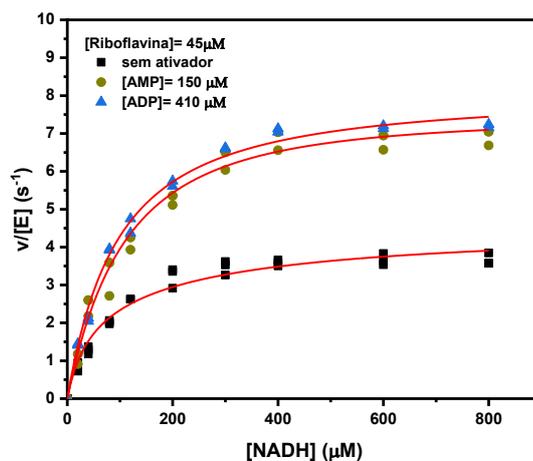
Estudos cinéticos em concentrações crescentes de NADH foram realizados para investigar o efeito do truncamento do FAD e ativação pelos nucleotídeos de adenosina nos parâmetros de Michaelis-Menten do NADH (Figura 3-11). Para o cálculo desses parâmetros, utilizou-se a equação:

$$\frac{v}{[E]} = \frac{k_{cat}^{FAD}[NADH]}{K_m^{FAD} + [NADH]} \chi_{ELFAD} + \frac{k_{cat}^{FIV}[NADH]}{K_m^{FIV} + [NADH]} \chi_{ELFIV} \quad 2;$$

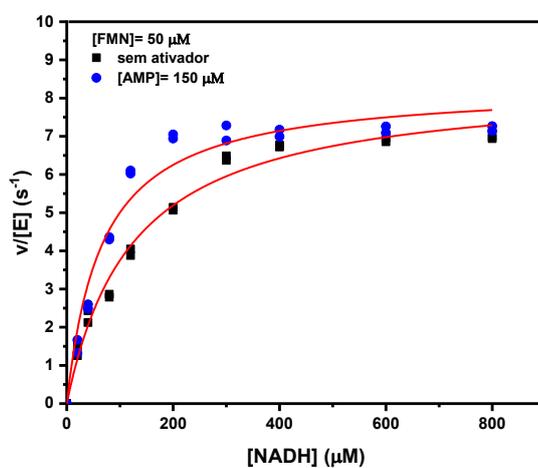
que leva em conta as espécies cataliticamente ativas da NahG ligada ao FAD residual (K_m^{FAD} constante de ligação da enzima ao FAD e k_{cat}^{FAD} relacionada à atividade basal

da enzima ligada ao FAD) da purificação e da enzima ligada à flavinas estudadas neste trabalho. O valor do K_m para a reação catalisada pela *holo* NahG ligada ao FAD é de 29 μM , ou seja, da mesma ordem de magnitude determinada em um estudo anterior nas mesmas condições ($K_m = 39 \mu\text{M}$) e para a salicilato hidroxilase de *P. putida* S-1, que apresentou um valor de K_m de 2,6 μM sob condições de saturação para salicilato, cerca de 10 vezes maior ($K_m = 1,1 \text{ mM}$) do que na ausência de salicilato.¹⁰⁴ Os valores de K_m para NADH nas reações mediadas por FMN e riboflavina são cerca de 7 e 10 vezes maiores em comparação com FAD (Tabela 3-4). O excesso de AMP diminui esses valores em 2,2 e 1,3 vezes para FMN e riboflavina, respectivamente, enquanto a adição de excesso de ADP, no último caso, teve um efeito de 1,8 vezes.

a)



b)



c)

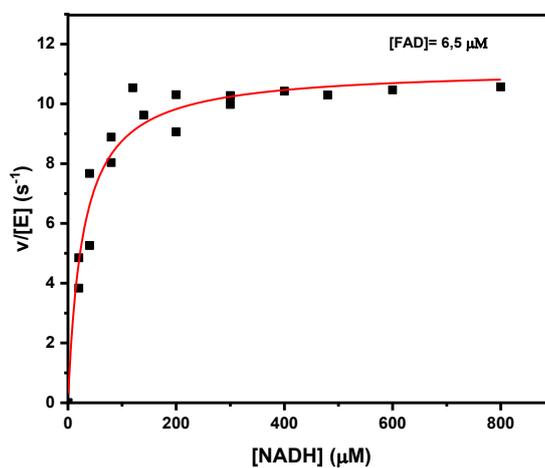


Figura 3-10: Perfis cinéticos para NADH usando (a) riboflavina, (b) FMN, (c) FAD para mediar a oxidação catalisada de NADH na presença de salicilato (150 μM) e ausência e presença de AMP e ADP a pH 8,5, I = 0,21 (NaCl) e 25 °C.

Tabela 3-5: Parâmetros de Michaelis-Menten para NADH em sua oxidação catalisada por NahG ligado a diferentes flavinas na presença de salicilato (150 μM) a pH 8,5, I = 0,21 M (NaCl) e 25 °C. Os valores entre parênteses são proporções em relação ao FAD.

Sistema	$X_{E\cdot\text{FAD}}$	$X_{E\cdot\text{Flv}}$	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})
FAD 6,5 μM	0,94	-	29 \pm 3 (1)	14,1 \pm 0,3 (1)
FMN 50 μM	0,22	0,74	198 \pm 9 (6,9)	9,3 \pm 0,4 (1,5)
FMN 50 μM + AMP 150 μM	0,22	0,77	90 \pm 10 (3,2)	8,8 \pm 0 (1,6)
Riboflavina 45 μM	0,22	0,49	280 \pm 30 (9,7)	5,0 \pm 0,8 (2,9)
Riboflavina 45 μM + AMP 150 μM	0,22	0,59	220 \pm 20 (7,8)	12,0 \pm 1,0 (1,2)
Riboflavina 45 μM + ADP 410 μM	0,22	0,71	157 \pm 8 (5,4)	12,3 \pm 0,5 (1,1)

O forte efeito nos valores de K_m com a truncagem do FAD denota a sua estreita relação com o NADH. Como tipicamente encontrado para enzimas dependentes de NADH, a NahG exibe o motivo GxG perto do final da alça sobre o grupo isoaloxazina (resíduos E38 a G53)⁷⁹ e a ligação de FAD culmina com várias mudanças conformacionais e a formação de uma cavidade rasa para ligação do NADH. Evidências bioquímicas indicam que a redução do grupo isoaloxazina ocorre na posição "externa", quando este é empilhado em seu lado direito com o grupo nicotinamida do NADH. Sob este arranjo, a transferência de hidreto ocorre do lado pro-R do grupo nicotinamida reduzido para a face *si* do átomo N5 do grupo isoaloxazina oxidado.^{105,106} Como resultado da transferência de hidreto, a flavina carrega uma carga negativa no átomo N1, o que muito provavelmente leva o grupo isoaloxazina para a posição "interna", onde é estabilizado pela extremidade N-terminal da hélice que reside o A307 na enzima NahG. A excisão da porção adenosina monofosfato do FAD para produzir FMN causa um grande aumento no K_m para NADH (7 vezes) e muito provavelmente afeta a interação adequada entre a alça

compartilhada entre o NADH e a flavina.⁹⁴ A recuperação parcial da atividade perdida pode ser realizada usando AMP em excesso (Tabela 3-5) O grupo ribitol fosfato do FAD, enterrado na estrutura da proteína e longe do local de ligação do NADH, desempenha um papel marginal no K_m para o NADH em relação à porção adenosina monofosfato. A excisão do grupo fosforila do FMN rendendo a riboflavina causa um aumento do K_m para NADH de apenas 1,4 vezes, o que coincide com o efeito da substituição do ADP por AMP nas reações mediadas pela riboflavina.

3.3.2 Estudos cinéticos com as variantes mutantes da NahG

As frações obtidas da cromatografia de afinidade, que continham as proteínas recombinantes (vide Figura 3-11).

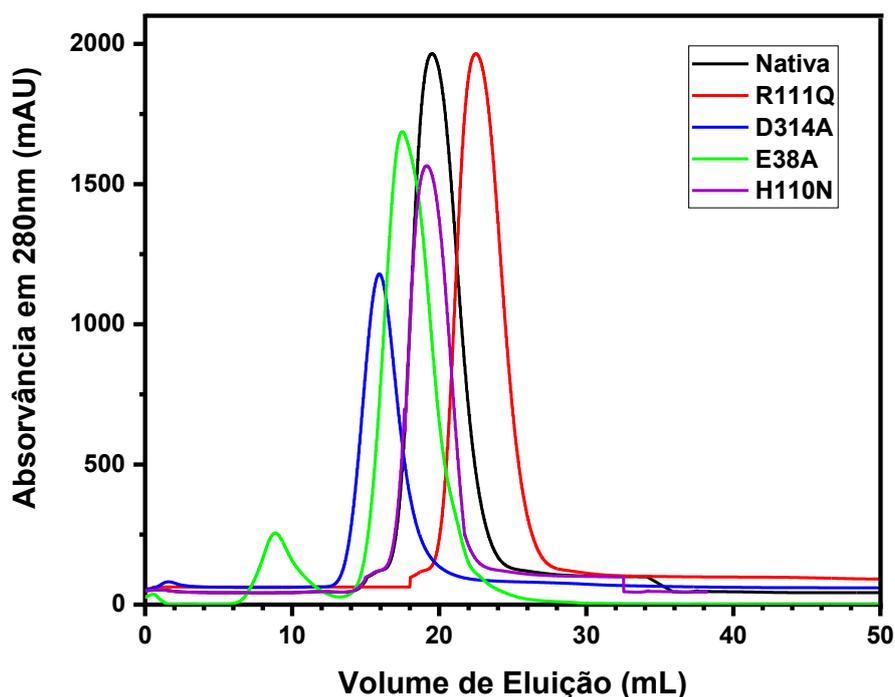


Figura 3-11: Cromatograma das purificações por exclusão molecular da NahG nativa e mutantes utilizando a coluna HiperTM 26/10 desalting eluída isocraticamente a 1,5 mL/min com tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,4, contendo NaCl 50mM. Fonte; o autor.

Variantes da NahG nativa foram obtidas com mutações na alça de ligação do FAD: E38A, R111Q, D314A e H110N pois conforme relatado anteriormente, esses resíduos estabelecem interações importantes com o FAD e são altamente conservados nas monooxigenases flavodependentes. As mutações foram planejadas levando em consideração da carga e do comprimento da porção do resíduo de aminoácido que interage com o cofator FAD. No caso, avaliamos as possíveis interações: E38 liga-se aos grupos hidroxila do grupo ribosila; R111 interage com grupo difosfato; D314 faz ligações de hidrogênio com o átomo O3' do grupo ribitila e H110 localiza-se próximo da alça e sofre um forte reposicionamento com a ligação do FAD, estabelecendo papéis chave na interação enzima-FAD. Os perfis cinéticos para cada variante ativa apresentam tendência a saturação para o substrato, NADH e FAD conforme a Figura 3.12 a para mutante E38A, a Figura 3.12 b para mutante D314A, a Figura 3.12 c para mutante H110N.

As mutações na alça do FAD em especial E38A, resultou em um aumento em K_m de 1,3 para 4,6 μM . Esse dado indica que o grupo ribosila do FAD, que interage com esse resíduo favorecendo a conformação cataliticamente ativa na NahG, a exemplo da *Rhodococcus jostii* (PDB 4BJZ),¹⁰⁷ exerce um papel importante na ligação do FAD. A mutação D314A não mostrou nenhuma alteração significativa na constante de ligação do FAD indicando que, embora altamente conservado, o resíduo de aspartato (D314 na NahG; D310 na phzS; D294 na 3HB6H) tem pouco efeito sobre a ligação e dinâmica do FAD. Contudo, a mutação R111Q gerou a perda da atividade catalítica da NahG, indicando que esse resíduo tem papel crucial para a atividade, visto que a posição do grupo isoaloxazina entre as conformações externa e interna parece ser controlada por ligações de hidrogênio entre o grupo ribitol do FAD e o resíduo de arginina (R111 na NahG; R106 na phzS; R110 na 3HB6H). Para a identificação das interações descritas acima, se faz necessário a utilização de critérios tais como a distância doador/aceptor de ligação de hidrogênio e o ângulo entre C-H-O. Além disso, a distância C-O é um dos atributos importantes para determinar a existência deste tipo de interação e seu valor deve ser menor do que a soma dos raios de Van der Waals do carbono e do oxigênio. Dessa forma, se o raio de Van der Waals do átomo de oxigênio é de 1,40 Å e o do átomo de carbono ligado

covalentemente ao átomo de hidrogênio é de 1,85 Å, a distância C-O deve ser menor do que 3,25 Å para observar uma interação do tipo ligação de hidrogênio¹⁰⁸. A mutação da histidina na posição 110 não alterou a K_m do FAD sendo essa posição sensível somente a ligação do substrato, pois o valor de K_m do substrato foi alterado de 39 μM para 47 μM .

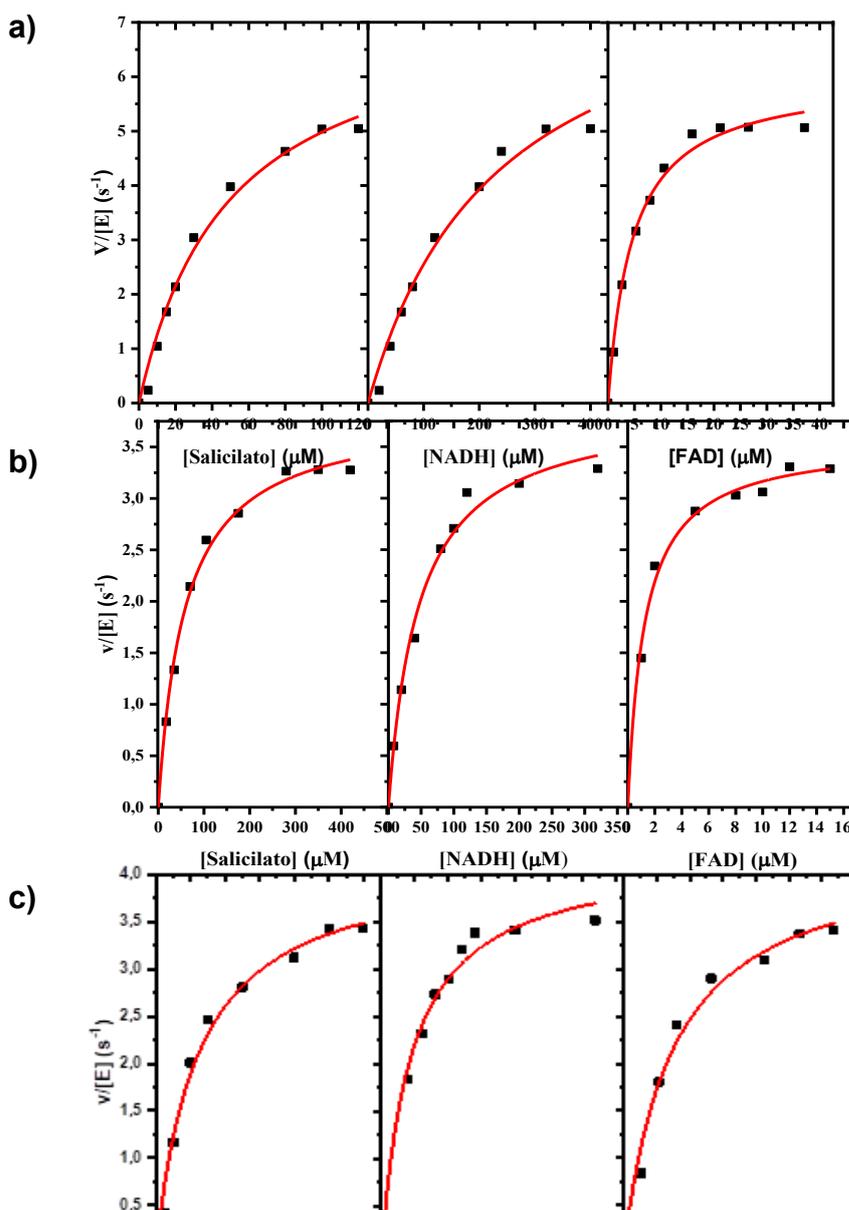


Figura 3-12: Velocidade de reação em função da concentração de ácido salicílico, FAD e NADH para reação de conversão de salicilato em catecol catalisada pelas variantes da NahG (a) E38A, b) D314A, c) H110N em pH 8,5 e 25 °C.

Tabela 3-6: Parâmetros cinéticos para o ácido salicílico, FAD e NADH na reação de conversão de salicilato em catecol catalisada pelas variantes da NahG Nativa, E38A, D314A e H110N em pH 8,5 e 25 °C

NahG	Salicilato K_m (μM)	NADH K_m (μM)	FAD K_m (μM)	k_{cat}^{AP} (s^{-1})
Nativa	28 \pm 3	39 \pm 3	0,39 \pm 0,08	11,7 \pm 0,3
E38A	48 \pm 2	234 \pm 4	4,6 \pm 0,5	7,4 \pm 0,5
D314A	25 \pm 3	45 \pm 7	1,5 \pm 0,3	4,2 \pm 0,2
H110N	59 \pm 3	47 \pm 5	1,3 \pm 0,1	3,9 \pm 0,1
R111Q	-	não houve atividade	-	-

A variante da NahG E38A tem um valor de K_m para o NADH de 234 μM um aumento de oito vezes em relação à nativa, isso indica que a interação desse resíduo com a porção ribosila do FAD influencia na ligação do NADH. Essa observação corrobora os dados obtidos para os cofatores truncados, pois a adição da porção AMP e ADP para a riboflavina causou a diminuição do valor de K_m , da mesma forma, observou-se a diminuição nos valores do FMN com a adição do AMP. Entretanto, para a variante D314A não houve uma variação significativa do valor de K_m do NADH, aumentando de 29 μM para a enzima nativa para 45 μM na variante, indicando a menor influência desse resíduo na ligação da alça com o FAD. De maneira semelhante, a mutante H110N teve um pequeno efeito no valor de K_m do NADH. A inatividade da variante R111Q pode indicar que esse resíduo de arginina desempenha papel crucial na ligação do FAD na enzima NahG, outra hipótese é que ele pode influenciar na formação do correto formato da alça da enzima que se liga ao FAD.

3.4 Conclusões

A ligação de flavina e a catálise na maioria dos FMOs monocomponente dependem de eventos altamente dinâmicos. O truncamento do FAD em FMN e riboflavina enfraquece a ligação e a capacidade da enzima NahG de promover produtivamente a oxigenação do salicilato via o intermediário C(4 α)-hidroperoxiflavina. A adição dos nucleotídeos AMP e ADP à reação com as flavinas truncadas promove remotamente a capacidade de ligação da enzima à flavina, a extensão e a velocidade do caminho acoplado chegam a níveis comparáveis à reação usando FAD. Isso ocorre mediante uma barreira entrópica para a ligação de FAD, que é aparentemente menor em comparação com a ligação de suas partes componentes individuais. O grupo ribitol fosfato do FAD auxilia na ligação de a outras partes do FAD. No entanto, essa porção tem pequena influência no K_m para o NADH, que depende mais prontamente do grupo adenosina monofosfato. Este resultado é consistente com os dados estruturais, que mostram o grupo ribitol fosfato ligado profundamente na estrutura da proteína,^{101,109} enquanto o grupo adenosina monofosfato está posicionado lateralmente em relação ao grupo adenosina monofosfato do NAD(P)H.

Os experimentos de mutagênese indicaram que E38 tem influência na ligação do NADH, indicando ser um resíduo importante na alça de ligação do FAD e imprescindível para a interação do NADH. Além disso, o resíduo de R111 também é imprescindível para a atividade enzimática.

Este trabalho apresenta um novo campo de aplicabilidades de flavoenzimas. A adição de nucleotídeos remotos às flavinas truncadas adiciona uma nova ferramenta para potencial a aplicação de FMO's monocomponente em biocatálise e ativação de flavinas modificadas quimicamente.

4 ALDEÍDO DESIDROGENASE

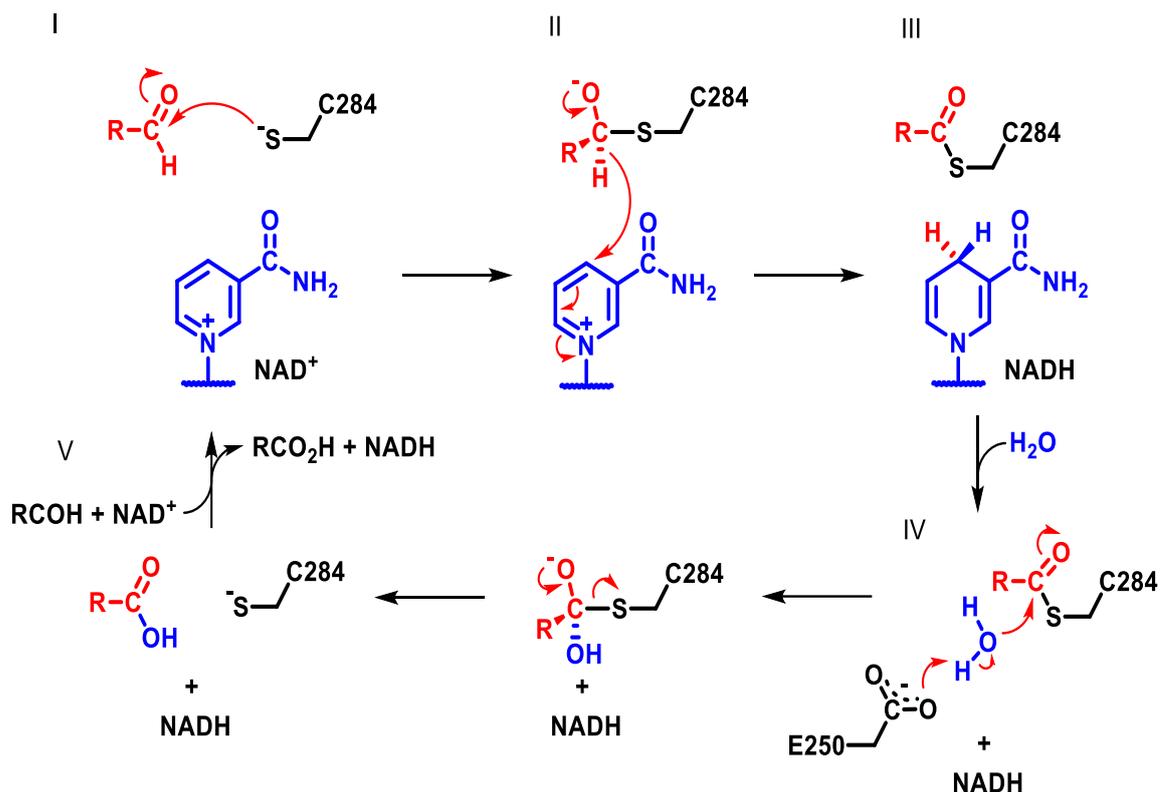
As enzimas da família de aldeído desidrogenases (ALDHs) são ubíquas em sistemas biológicos. Elas participam da oxidação de aldeídos a ácidos carboxílicos, sendo essenciais para muitos processos biológicos, incluindo o catabolismo de fontes de carbono para obtenção de energia e metabólitos.¹¹⁰ As ALDHs também estão envolvidas na inativação de compostos tóxicos. Curiosamente, é bem conhecido que indivíduos orientais apresentam a mutação K487E que diminui a atividade catalítica da aldeído desidrogenase mitocondrial, resultando no acúmulo de acetaldeído após o consumo de bebidas alcoólicas.¹¹¹ As ALDHs catalisam a oxidação de uma vasta gama de aldeídos aromáticos e alifáticos. Tais reações dependem do cofator dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD^+) ou de sua forma fosforilada (NADP^+). Embora, a vasta maioria de ALDHs sejam específicas para o NAD^+ .¹¹²

As ALDHs são geralmente agrupadas de acordo com a sequência de identidade, filogenia e características estruturais combinadas. Contudo, o sistema de classificação tem evoluído com a identificação de novos membros. A classificação inicial das ALDHs começou no final dos anos 1980, quando apenas algumas sequências de ALDHs estavam disponíveis, o que levou à sua classificação em três classes distintas, ALDH 1, 2 e 3, geralmente composta por ALDHs de humanos ou isoenzimas de mamíferos.¹¹³ As classes 1 e 3 consistem, em ambos os casos, de enzimas citosólicas constitutivamente expressas e induzíveis, com a classe 3 sendo expressa especificamente em tumor, estômago e células da córnea, enquanto a classe 2 agrupa enzimas constitutivas da mitocôndria. Cada classe oxida uma variedade de substratos, que podem ser derivados de uma fonte endógena ou exógena, incluindo aldeídos derivados do metabolismo xenobiótico.¹¹⁴ As Classes 1 e 2 contêm principalmente enzimas promíscuas quanto ao substrato, enquanto a classe 3 contém enzimas específicas em relação aos substratos.¹⁰⁶ Com um número crescente de sequências de ALDHs atualmente conhecidas, uma nova classificação

com base no trabalho de Dayhoff foi adotada a partir de 1999. As proteínas com sequência de identidade maior que 40% foram consideradas pertencentes à mesma classe.¹¹⁵ Dentro dessa classificação, a família das ALDHs humana consiste em 19 genes supostamente funcionais codificados em localizações cromossômicas distintas. No entanto, pesquisas emergentes demonstram que existem significativamente mais classes de ALDHs. Um estudo recente sobre o gênero *Pseudomonas* identificou 42 classes diferentes de ALDHs, demonstrando a diversidade dessas enzimas.¹¹⁶

O sítio ativo das ALDHs está localizado na base de um túnel hidrofóbico, em forma de funil. Há um resíduo de cisteína altamente conservado em todas as famílias das ALDHs, sendo consenso que ele detém um papel catalítico essencial.¹¹⁷ A cadeia do resíduo de cisteína se projeta para o túnel catalítico, que se estende por cada subunidade. Além disso, o funil é identificado como um “*pocket*” catalítico, onde o aldeído forma um intermediário tetraédrico ao reagir com um resíduo de cisteína para iniciar a catálise (Esquema 4 1).¹¹⁸ Além da oxidação de aldeído, algumas ALDHs possuem atividade esterase. Essas enzimas utilizam os mesmos resíduos do sítio ativo para realizar esta função, sem a necessidade de uso do cofator NAD(P).¹¹⁹ Interessantemente, a chamada “pseudoenzima” humana ALDH16 não possui este resíduo de cisteína catalítico, o que resulta na ausência de atividade catalítica, sendo considerada uma proteína de ligação.¹¹⁹

A partir de análises de sequências de aminoácidos e dados cristalográficos, verificou-se que dois resíduos, uma cisteína e um glutamato, são altamente conservados em ALDHs.¹²⁰ Com base nessas informações, propôs-se um mecanismo de reação para as ALDHs (Esquema 4.1). O grupo tiol da cisteína em sua forma aniônica ataca nucleofilicamente o átomo de carbono carbonílico do aldeído formando um intermediário hemitioacetil (I), que transfere um hidreto para o NAD(P)⁺(II), formando um intermediário tioacilenzima e NAD(P)H (III). O resíduo de glutamato altamente conservado atua por meio de catálise básica-geral, uma molécula de água nucleofílica na etapa de desacilação (IV), produzindo o produto ácido carboxílico e o resíduo de cisteína nucleofílico regenerado (V)¹¹⁸



Esquema 4-1: Mecanismo proposto para as enzimas da superfamília das ALDHs. Fonte: adaptado de Coitinho *et al*, 2016.¹¹⁴

As ALDHs apresentam uma estrutura característica composta por seis fitas beta, associadas a quatro hélices alfa, conforme destacado na figura 4-1. Essas regiões foram observadas pela primeira vez por Rossmann e colaboradores, sendo atualmente denominada como enovelamento de *Rossmann*. Os autores concluíram que essa região é responsável por ligar-se ao NAD(P)^+ ^{121,112}

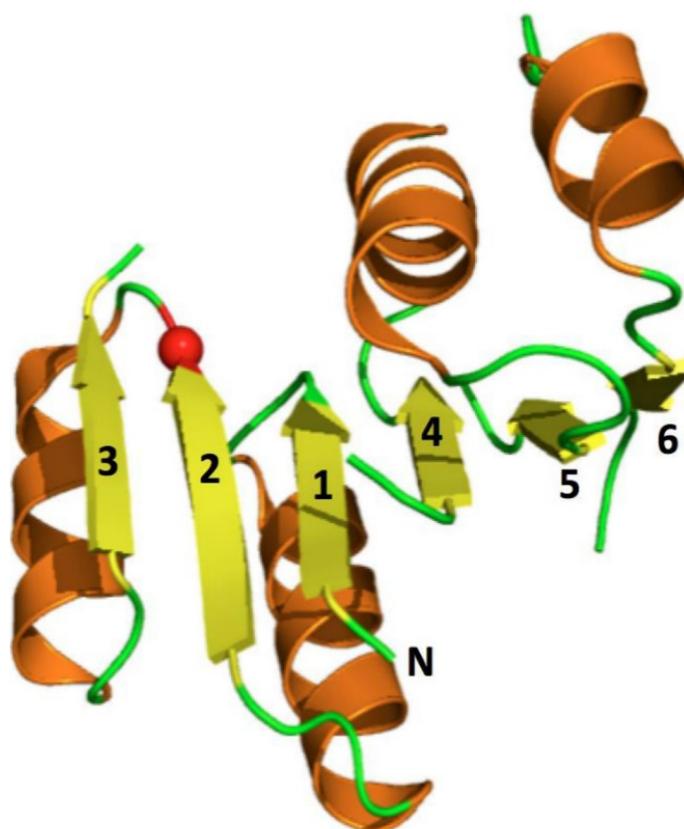


Figura 4-1: Representação esquemática do enovelamento de Rossmann: uma repetição consecutiva de porções compreendendo diversas fitas- β (em amarelo), uma alça de conexão (verde) e hélices- α (laranja). As fitas- β formam um núcleo de fitas na ordem 3-2-1-4-5-6. A dobra de Rossmann compreende duas repetições consecutivas, cada uma compreendendo de fitas- β (3-2-1 e 4-5-6) e duas hélices- α . Fonte: Laurino et al, 2016.¹⁰⁸

Na ligação NAD^+ , a porção adenina do cofator se conserva através de ALDHs numa conformação fixa, sem movimento durante a catálise. Em contrapartida, a porção nicotinamida parece ser flexível, contribuindo para conformações variáveis em todos os membros da superfamília de ALDHs (Figura 4.2). O movimento da nicotinamida dentro e fora do sítio ativo durante a catálise ocorre em um local conservado e importante no mecanismo de ALDHs.

Tanto na estrutura ALDH1 como na ALDH2, a adenosina forma ligações de hidrogênio com os resíduos de K192, E195 e I166. A sequência específica de aminoácidos, G1XG2XXG3, que se curva ao final da primeira fita- β , interage com a adenosina da molécula NAD^+ .^{111,122} A porção de nicotinamida do cofator,

aparentemente demonstra uma desordem discreta durante a ligação que leva a um número de conformações do cofator. Na ALDH2 bovina e ALDH3 de rato a ligação do anel de nicotinamida difere da ALDH1 de ovelha.¹²³ Em duas conformações da nicotinamida foram observadas diferenças específicas entre a ALDH1 e ALDH2 de mais de 5 Å na interação da nicotinamida (Figura 4-2). Além disso, os mesmos resíduos de aminoácidos, Q349, E399 e F401, conferem a estabilização da porção de nicotinamida tanto em ALDH1 quanto na ALDH2, no entanto, fazem-no de uma forma muito diferente.

A flexibilidade da nicotinamida também é auxiliada pela fraca ligação da porção pirofosfato nas ALDHs. Em contraste com outras desidrogenases dependentes de NAD^+ , existem poucas interações entre os grupos fosforila negativos e os resíduos da proteína, especialmente devido à falta de lisinas ou argininas na região de ligação do cofator. Em vez disso, as interações ocorrem com um pedaço de forte potencial eletrostático negativo de uma região conservada nas enzimas ALDH1 e ALDH2 próximo à ligação de fosfato. Essas interações agem como uma junta esférica, conferindo flexibilidade dentro do sistema. O entendimento de como ocorre a flexibilidade da nicotinamida está relacionado à desprotonação mediada pela água usando E268 durante a catálise. Especificamente, durante a etapa de transferência de hidreto, a cadeia lateral de E268 deve ser posicionada longe do anel de nicotinamida do cofator. Antes que a desacilação do tioéster possa ocorrer, a porção da nicotinamida deve pelo menos sair metade do sítio ativo para gerar espaço para a molécula de água se posicionar perto do carbono do intermediário tioéster. A flexibilidade do resíduo de E268 e do anel de nicotinamida são fundamentais para a ação adequada da ALDH.¹²³

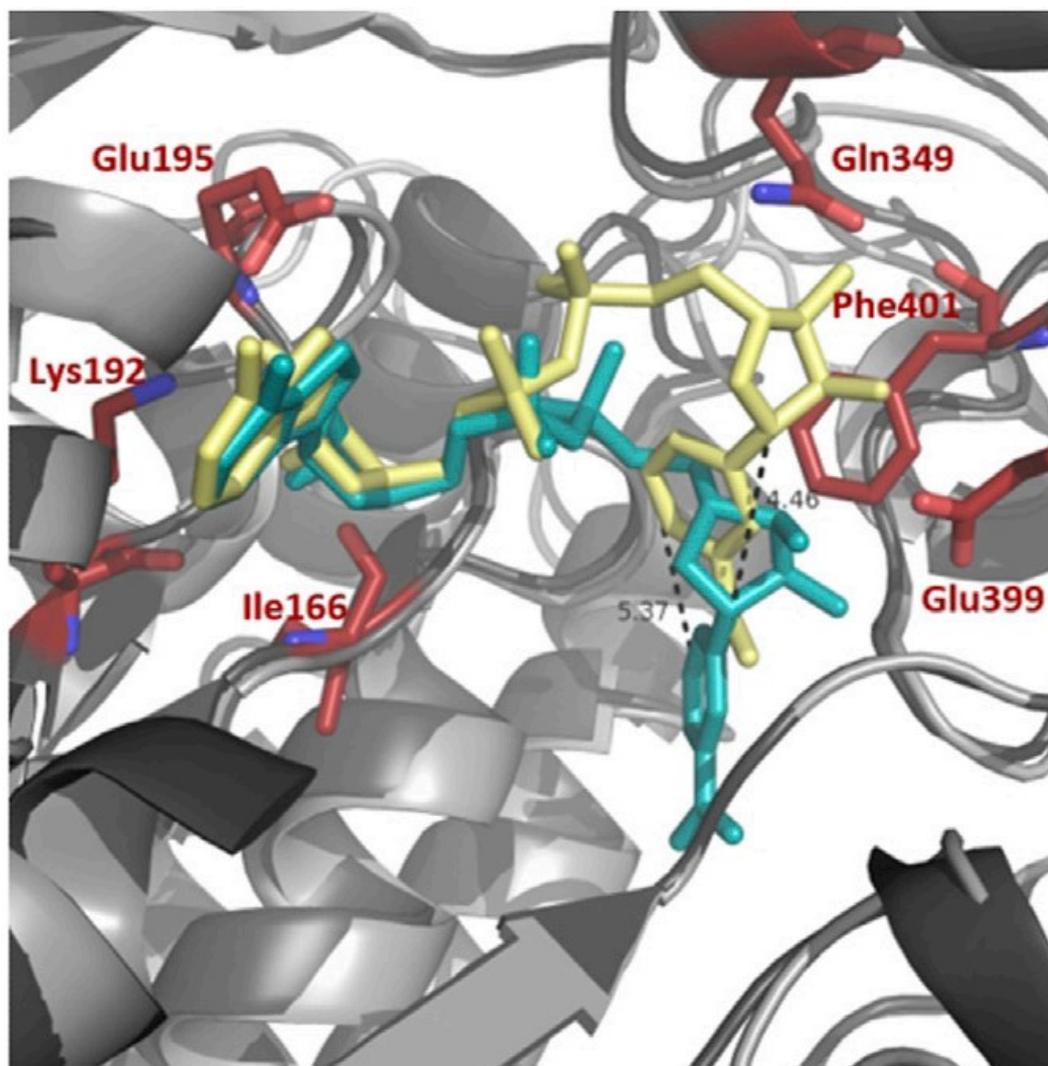


Figura 4-2: Diferentes conformações da porção da nicotinamida e a orientação do anel de adenina de NAD demonstrada na ALDH1 de ovelha e ALDH2 bovina (PDB: 1BXS e 1A4Z), ALDH1 (cinza escuro) e ALDH2 (cinza claro) modelados com a sobreposição com NAD⁺ em amarelo e azul, respectivamente. As medições demonstram um deslocamento aproximado de 5 Å da porção nicotinamida. Os principais resíduos de ligação do cofator são destacados em vermelho. Fonte: Adaptado de Moore *et al* 1998.¹⁰⁷

Os dados cristalográficos de um tetrâmero de uma ALDH revelaram que ambos, o substrato ácido retinóico (REA) e o NAD⁺, se ligam ao sítio ativo da enzima em monômeros diferentes com duas conformações também distintas. Nos monômeros A e D (MonD), o substrato exibe uma conformação fechada com seu grupo apontando para o resíduo catalítico C314. Nos mesmos monômeros, a porção de ácido nicotínico do NAD⁺ é orientada na direção do sítio ativo. Por outro lado, nos

monômeros B e C (MonC), o ácido retinóico adota uma conformação que indica ser a conformação do produto, com a cadeia isoprênica se afastando do sítio ativo em direção à superfície da proteína, de tal modo que toda a molécula do ácido retinóico ocupa eficientemente um túnel, que fornece acesso ao substrato e liberação do produto. Nesses monômeros B e C, o anel nicotínico NAD^+ também se afasta do sítio ativo com uma configuração que aponta para a superfície da proteína (Fig. 4-3). As conformações associadas ao ácido retinóico e ao NAD^+ não parecem ser determinadas ou influenciadas por contatos que ocorrem entre os diferentes monômeros de estrutura tetramérica. Com isso, foi suposto que as duas conformações adotadas pelo substrato e cofator são consequência de interações específicas com resíduos conservados de ALDHs.^{117,124}

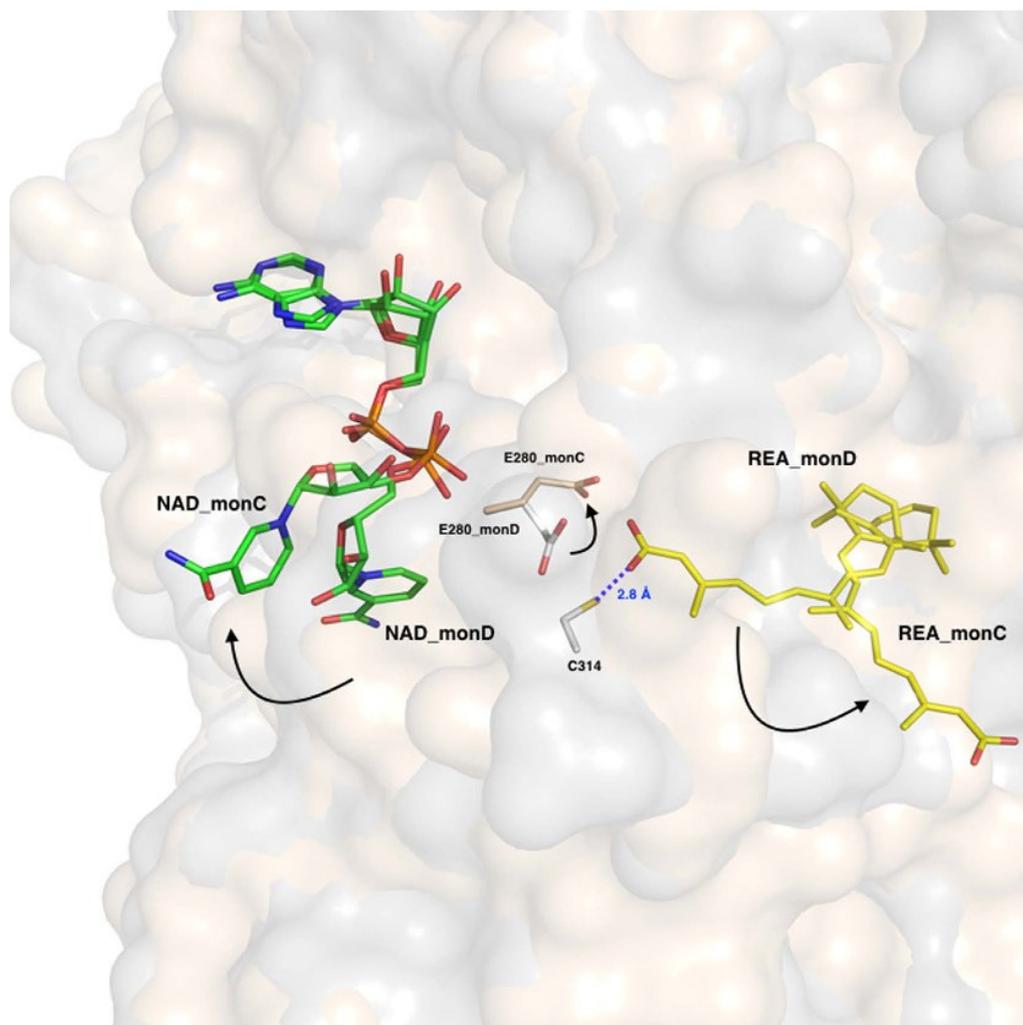


Figura 4-3: As duas conformações observadas para REA e NAD⁺ são acopladas conforme indicado pelas setas, um par representando o estado fechado (no monD) e o estado aberto (no monC) que representa a conformação de liberação do produto. O resíduo E280 oscila entre duas conformações seguindo aquelas observadas para os ligantes. Fonte: Adaptado de Moretti *et al*, 2016¹¹³

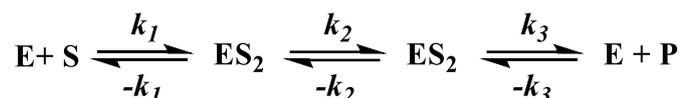
Por sua vez, Araújo (2015) sugere que na Nahl, a presença de resíduos com cadeia lateral volumosa no sítio catalítico oclui a entrada de substratos aromáticos e lineares longos.¹²⁵ A especificidade da Nahl deve-se a um fragmento de 21 resíduos de aminoácidos que não ocorre em outras 2-hidroxiacetonato semialdeído desidrogenases. Os autores concluíram que uma inserção e uma mutação de deleção podem ter produzido um desvio do quadro de leitura, levando a uma mudança drástica nas propriedades catalíticas da Nahl.¹²⁶

É interessante que as enzimas ALDHs da via de degradação do naftaleno na *PpG7* apresentam características distintas quanto à atividade catalítica, apesar de suas estruturas secundárias serem similares. O principal ponto deste trabalho é entender o papel da Nahl, pois a NahF exibe promiscuidade e uma maior atividade catalítica que poderia substituir ou suplementar a ação da Nahl.

O método de estudo utilizado foi a inibição das duas enzimas ALDHs da *PpG7*. Pensando nisso, os próximos parágrafos descrevem um pouco dos aspectos teóricos que envolvem o estudo de cinética enzimática com o método de *King e Altman*.¹²⁷ Equilíbrios complexos com muitas formas de enzimas são mais bem tratados por este método. O método *King-Altman* explora a abordagem topológica. Várias formas da enzima são configuradas com equilíbrio adequado na forma de uma figura, tomando o cuidado que cada forma de enzima ocorra apenas uma vez em cada figura. A fração de $[E_0]$ presente em cada forma de enzima é então avaliada usando esta representação. Com isso, traça-se uma lista de todos os padrões possíveis que interconectam todas as formas da enzima, mas sem fechar um ciclo. Por exemplo, para “ n ” espécies de enzimas, cada padrão deve conter $n-1$ setas. Uma equação de partição agora pode ser escrita para cada forma que defina a proporção da enzima nessa forma, em termos de taxa individual das constantes e concentrações relevantes. Uma equação de partição para qualquer forma de enzima (E_n) pode ser escrito em termos de $[E_0]$ geralmente, é dado pela equação 2:

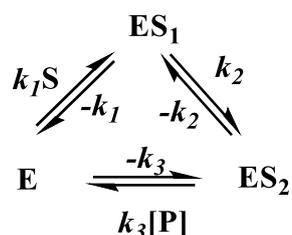
$$[E_n] = \frac{D_n}{D_1 + D_2 + \dots + D_n} [E_0] \quad (2)$$

onde D_1 a D_n são numeradores para as respectivas formas de enzima enquanto sua soma (E_0) é o denominador. Assim, para cada forma de enzima, há uma expressão que, quando dividida pela soma de todas essas expressões, resulta na equação de partição que descreve a fração de cada forma enzimática presente no estado estacionário. A função de partição adequada das equações é usada para avaliar a evolução da reação. O exemplo abaixo, mostra uma situação simples para aplicar o método de *King-Altman*. Dado o sistema:



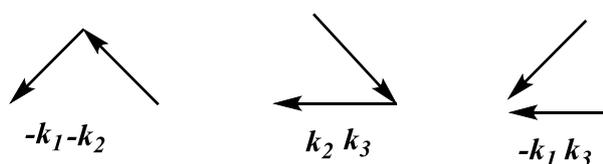
onde D_1 a D_n são numeradores para as respectivas formas de enzima enquanto sua soma (E_0) é o denominador.

O primeiro passo é a obtenção de um sistema que descreve todas as formas da enzima e suas interconversões. O resultado neste caso será:



a seguir, desenham-se setas dos termos que afetam uma espécie, que são calculados em cada polígono aberto, percorrendo-se o caminho para chegar à espécie, multiplicando-se as constantes de velocidade e as concentrações de S e P se aplicáveis;

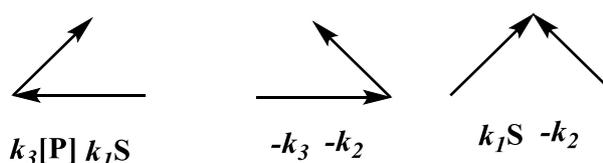
Para a espécie **E** temos os seguintes caminhos:



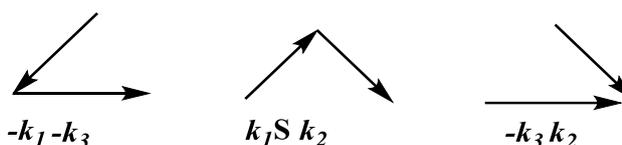
Temos:

$$E = -k_1 - k_2 + k_2 k_3 + -k_1 k_3,$$

Para as demais espécies temos:



$$ES_1 = k_3[P] k_1S + -k_3 -k_2 + k_1S -k_2;$$



$$ES_2 = -k_1 -k_3 + k_1S k_2 + -k_3 k_2$$

$$E_0 = E + ES_1 + ES_2$$

$$E_0 = -k_1 -k_2 + k_2 k_3 + -k_1 k_3 + k_3[P] k_1S + -k_3 -k_2 + k_1S -k_2 + -k_1 -k_3 + k_1S k_2 + -k_3 k_2$$

Feito isso, substitui-se os valores encontrados na equação de velocidade correspondente:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_3[ES_2] - -k_3[E][P];$$

Aplicando a noção da função de partição descrita acima, temos:

$$v = k_3 \left(\frac{k_1 k_2 [S] + -k_1 -k_3 [P] + k_2 -k_3 [P]}{E_0} \right) - (-k_3 [P] \left(\frac{-k_1 -k_2 + k_2 k_3 + -k_1 k_3}{E_0} \right));$$

Agrupando os termos em função de E_0 , $[S]$ e $[P]$ temos:

$$v = E_0 \left(\frac{k_1 k_2 k_3 [S] - -k_1 -k_2 -k_3 [P]}{-k_1 k_2 + k_2 k_3 + -k_1 k_3 + k_3 [P] k_1 [S] + -k_3 -k_2 + k_1 [S] -k_2 + -k_1 -k_3 + k_1 [S] k_2 + -k_3 k_2} \right);$$

Dividindo o numerador e o denominador por $-k_1 -k_2 + k_2 k_3 + -k_1 k_3$ e rearranjando, temos:

$$v = E_0 \left(\frac{\frac{k_1 k_2 k_3}{-k_1 -k_2 + k_2 k_3 + -k_1 k_3} [S] - \frac{-k_1 -k_2 -k_3}{-k_1 -k_2 + k_2 k_3 + -k_1 k_3} [P]}{1 + \frac{k_1 k_2 + k_1 -k_2 + k_1 k_3}{-k_1 -k_2 + k_2 k_3 + -k_1 k_3} [S] + \frac{-k_2 -k_3 + -k_1 -k_3 + k_2 -k_3}{-k_1 -k_2 + k_2 k_3 + -k_1 k_3} [P]} \right);$$

por substituições apropriadas para os termos V_{max} do substrato e produto e K_m do substrato e produto, temos:

$$v_{max}^S = \frac{k_2 k_3}{-k_2 + k_2 + k_3}; K_m^S = \frac{-k_1 -k_2 + k_2 k_3 + -k_1 k_3}{k_1 k_2 + k_1 -k_2 + k_1 k_3}; v_{max}^P = \frac{-k_1 -k_2}{-k_2 + -k_1 + k_2};$$

$$K_m^P = \frac{-k_1 - k_2 + k_2 k_3 + -k_1 k_3}{-k_2 - k_3 + -k_1 - k_3 + k_2 - k_3};$$

Com isso a expressão final é:

$$v = \left(\frac{\frac{v_{max}^S}{K_m^S} [S] - \frac{v_{max}^P}{K_m^P} [P]}{1 + \frac{[S]}{K_m^S} + \frac{K_m^P}{[P]}} \right);$$

Sendo esta equação acima, capaz de descrever o comportamento cinético do sistema estudado. Essa abordagem é muito robusta e será aplicada neste trabalho. O ponto central dessa parte do trabalho visa o entendimento do papel dessas duas ALDHs na via de degradação do naftaleno, para isso será desenvolvido um estudo de inibição das duas enzimas frente ao salicilato.

4.1 Objetivos

Em relação aos objetivos específicos referentes aos estudos com as aldeído desidrogenases da via de degradação do naftaleno, pretende-se:

- Determinar por cinética o perfil de inibição das enzimas NahF e NahI para o salicilato
- Propor um mecanismo de inibição com base em dados cinéticos e estruturais.
- Alcançar um melhor entendimento do papel da NahF e NahI na via de degradação de HAPs.

4.2 Metodologia

4.2.1 Expressão das proteínas recombinantes NahF e Nahl de *P. putida*

Bactérias *E. coli* BL21 Arctic Express transformadas com o vetor de expressão pET28a(TEV) contendo o gene para *nahF* ou Nahl foram inoculadas em 10 mL de meio LB suplementado com gentamicina 40 µg/mL e canamicina 50 µg/mL. Após feita a incubação por 16 h a 37 °C e 200 rpm, a cultura foi transferida para 2 L de meio LB também com antibióticos gentamicina 40 µg/mL e canamicina 50µg/mL e cultivada a 30 °C, 200 rpm, por 3 h. A expressão foi induzida pela adição de IPTG 0,5 mM e a cultura incubada a 12°C, 200 rpm, por 24h. O acompanhamento da expressão e a verificação da presença da proteína na fase solúvel ou insolúvel após a lise foram realizados por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%.

As células bacterianas foram coletadas por centrifugação (4000g, 10 min) e ressuspensas em 20 mL de tampão de lise (Tris-Cl 50 mM pH 7,4,sacarose 1% (p/v), Tween 1% (v/v), glicerol 1% (v/v) e lisozima 0,25% (p/v)) e lisadas por três ciclos de congelamento e descongelamento seguidos de três ciclos de sonicação por 30 s em banho de gelo a 30% de amplitude com intervalos de 30 s. Os lisados celulares foram removidos por centrifugação a 4 °C durante 45 min a 10.000g.

4.2.2 Purificação das proteínas recombinantess NahF e Nahl de *P. putida*

A fração solúvel do lisado foi imediatamente injetada em uma coluna de afinidade Ni²⁺ de 10 mL (Chelating Sepharose Fast-Flow, GE Healthcare) conectada a um sistema de cromatografia ÄKTA start (GE Healthcare). Após a injeção da amostra, a coluna foi lavada com tampão A (50 mL, tampão Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 500 mM, imidazol 30 mM) e um gradiente linear foi aplicado usando tampão A

(100 mL) e tampão B (100 mL, tampão Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM) com um fluxo de 3 mL/min (figura 5). As frações obtidas da cromatografia de afinidade, que continham as proteínas recombinantes, foram reunidas e imediatamente eluídas em tampão C (50 mM Tris-HCl pH 7,4 e 50 mM NaCl), utilizando uma coluna de dessalinização HiPrep™ 26/10 (GE Healthcare). Ressaltando que, em todas as etapas, a solução da enzima foi mantida em banho de gelo a 4°C. As frações obtidas com a enzima de interesse foram reunidas e concentradas utilizando um concentrador para centrífuga Vivaspin (faixa de corte de peso molecular de 10.000 GE Healthcare) para um volume de 2 mL. Posteriormente, adicionou-se glicerol 80% resultado em uma concentração final de 30% v/v de glicerol. As concentrações de proteína obtidas foram calculadas pelo coeficiente de extinção molar de cada enzima a 280 nm.

4.2.3 Ensaios cinéticos de inibição da NahF e NahI

A atividade enzimática da NahF (0,069 μM) foi avaliada na presença de concentrações crescentes de inibidor salicilato a 25 °C com concentrações fixas de substrato a 50 μM e de cofator NAD^+ a 200 μM . As reações foram acompanhadas por espectrofotometria no UV-Vis, pela formação de NADH que absorve a 340 nm com um coeficiente de absorvidade molar (ϵ) de $6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.¹¹⁸ A velocidade reacional foi calculada considerando $v = dC/dt$. De modo a garantir condições de velocidades iniciais, somente 5% de formação dos produtos foi considerada. Também se avaliou a velocidade reacional com concentrações fixas de salicilato e de cofator NAD^+ a 200 μM , com concentrações crescentes de substrato. Além disso, foram obtidos dados de velocidade com concentrações crescentes de cofator NAD^+ a 200 μM e concentrações fixas de salicilato e de substrato, para a NahF 50 μM e para a NahI 33 μM .

Para a NahI, a concentração de enzima foi de 0,013 μM . Foram utilizados os valores de concentração de substrato de 33 μM e para o NAD^+ de 200 μM e sua atividade foi avaliada acompanhando-se a taxa de desaparecimento do substrato 2-hidroxiuconato semialdeído em 375nm ($\epsilon = 22.966 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)¹²⁸, na presença de concentrações crescentes de inibidor salicilato a 25 °C.

Os dados de velocidade foram tratados segundo o modelo misto de inibição e os valores de K_m , V_{max} e as constantes que descrevem o sistema de inibição das enzimas foram calculados utilizando ajustes não-lineares com equações deduzidas com o método de King-Altman. O pH foi mantido a 8,5 em cada análise pela adição de 50 mM do tampão Hepes com força iônica ajustada em 0,2 com a adição de NaCl 0,181 mM e 0,111 mM de EDTA.

4.3 Resultados e Discussão

As enzimas NahF e Nahl possuem 33% de identidade de sequência e elevada homologia estrutural (figura 4.4), apresentando as mesmas porcentagens de perfis de estruturas secundárias, compostas por 43% de hélices- α e 20% de fitas- β . Análise das estruturas cristalográficas de ambas as enzimas indica uma diferença marcante no sítio ativo, caracterizada por uma entrada mais ocluída na Nahl em relação à NahF.¹³¹ Além dessa diferença estrutural, elas também diferem na capacidade catalítica. A sensibilidade das ALDHs ao salicilato já foram reportadas no metabolismo de oxidação de álcoois em mamíferos.^{123,129} Além disso, foi observada a presença de uma molécula de salicilaldeído localizada entre as duas subunidades que compõem o dímero da NahF, o que indica uma possível regulação alostérica para esta enzima.¹³⁵ Com base nesses estudos, uma avaliação dos dados cinéticos envolvendo a inibição do salicilato nas ALDHs da via de degradação do naftaleno foram conduzidos e obteve-se os perfis de inibição para as enzimas NahF e Nahl.

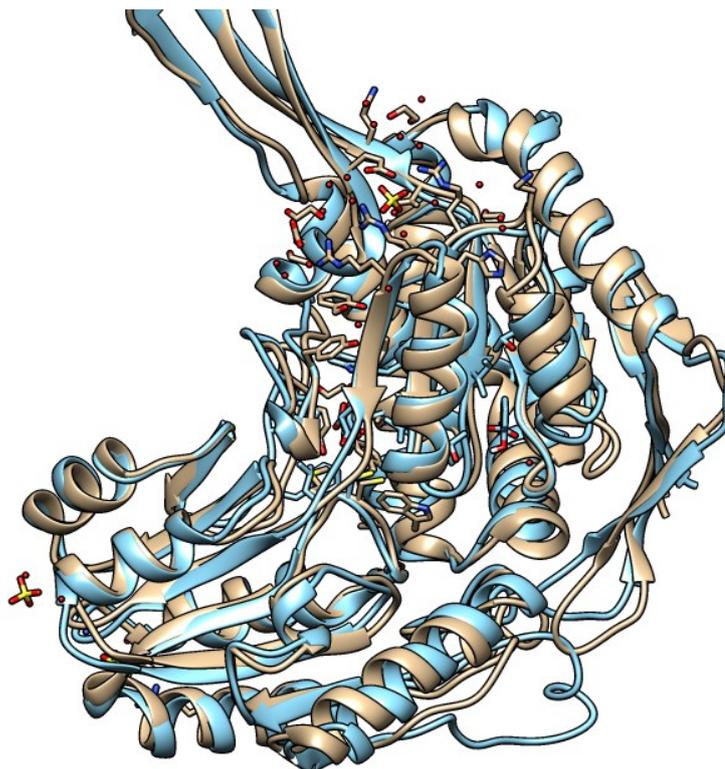


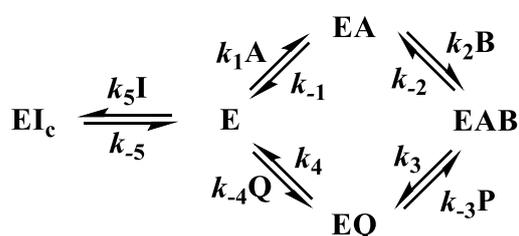
Figura 4-4: Sobreposição das estruturas cristalográficas da NahI (Azul) e NahF (Bege) (PDB 4JZ6) das duas aldeído desidrogenase da via de degradação do naftaleno em PpG7. A sobreposição possuiu um valor de RMSD de 1,65Å para 350 átomos. Fonte: o autor.

Os ensaios cinéticos foram feitos a diferentes concentrações de inibidor, salicilato, concentrações fixas de enzima, substrato e cofator. As velocidades de reação em função da concentração de inibidor estão apresentadas nas figuras 4.5 e 4.6. Os dados experimentais foram analisados com base no sistema de inibição mista. Esse tipo de inibição é descrito em vários trabalhos da literatura, porém, com notações diferentes para as constantes envolvidas no mecanismo.^{130,131,132}

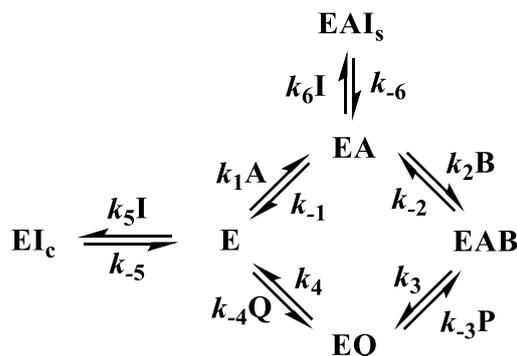
A partir do sistema misto de inibição, considerando que o salicilato pode se ligar tanto no sítio ativo quanto no sítio do cofator NAD^+ , montaram-se os esboços dos processos de inibição para a NahF e para a NahI, apresentados no Esquema 4.2a e 4.2b, respectivamente, onde a enzima livre E é inibida pelo inibidor I durante a reação com o cofator A e o substrato B, sendo o complexo EAB que representa a espécie da enzima ligada ao substrato e cofator que precede a formação dos produtos. Em

ambas, o salicilato parece ter uma possível regulação alostérica. Estudos cinéticos reportam que o salicilato atua como inibidor competitivo ou não-competitivo para ALDHs com constantes de inibição na escala de milimolar.^{117,133} Em estudos enzimáticos, o componente competitivo do componente de inibição pode ser acentuado em sistemas com concentrações muito altas. Em concentrações de substrato perto do valor da constante de Michaelis, o peso do componente competitivo pode não ser observado.

a)



b)



Esquema 4-2: Equilíbrios reacionais de inibição mista do salicilato nas reações catalisadas pelas enzimas a) NahF e b) NahI.

As leis de velocidade para estas reações foram deduzidas com auxílio do método de King-Altman. Para qualquer um dos sistemas, temos que a velocidade da reação é dada por:

$$v = N/D = \frac{d[P]}{dt} = k_3[EAB] - k_{-3}[EQ][P] \quad (1)$$

Sendo o numerador N dado por:

$$N = n_1[P][Q] + n_2[A][B] \quad (2)$$

onde:

para NahF

$$n_1 = -(k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4}k_{-5}) \quad (3)$$

$$n_2 = +(k_1k_2k_3k_4k_{-5}) \quad (4)$$

para NahI

$$n_1 = -(k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4}k_{-5}k_{-6}) \quad (5)$$

$$n_2 = +(k_1k_2k_3k_4k_{-5}k_{-6}) \quad (6)$$

e o denominador D dado por:

Para NahF:

$$\begin{aligned} D = & d_1[B][P][Q] + d_2[A][B][P] + d_3[P][I] + d_4[P][Q] + d_5[B][I] \\ & + d_6[B][Q] + d_7[A][P] + d_8[A][B] + d_9[I] + d_{10}[Q] \\ & + d_{11}[P] + d_{12}[B] + d_{13}[A] + d_{14} \end{aligned} \quad (7)$$

Sabendo que sob condições de velocidade inicial $[Q] \ll 1$ e $K_{ic} = k_{-5}/k_5$, temos que os termos d_1 , d_4 , d_6 e d_{10} podem ser desprezados e os demais expressos de acordo com a terminologia proposta por Cleland como indicado abaixo:

$$d_1 = k_2 k_3 k_4 k_5 / (k_1 k_2 k_4 k_5 + k_1 k_2 k_3 k_5)$$

$$d_2 = k_1 k_2 k_3 k_5 / (k_1 k_2 k_4 k_5 + k_1 k_2 k_3 k_5) = 1/K_{ip}$$

$$d_3 = k_{-1} k_{-2} k_3 k_5 / (k_1 k_2 k_4 k_5 + k_1 k_2 k_3 k_5) = K_{iA} K_{mB} K_{mQ} / K_{ic} K_{mP} K_{iQ}$$

$$d_4 = (k_2 k_3 k_4 k_5 + k_1 k_3 k_4 k_5) / (k_1 k_2 k_4 k_5 + k_1 k_2 k_3 k_5)$$

$$d_5 = k_2 k_3 k_4 k_5 / (k_1 k_2 k_4 k_5 + k_1 k_2 k_3 k_5) = K_{mA} / K_{ic}$$

$$d_6 = k_2 k_3 k_4 k_5 / (k_1 k_2 k_4 k_5 + k_1 k_2 k_3 k_5)$$

$$d_7 = k_1 k_2 k_3 k_5 / (k_1 k_2 k_4 k_5 + k_1 k_2 k_3 k_5) = K_{mB} K_{mQ} / K_{mP} K_{iQ}$$

$$d_8 = (k_1 k_2 k_4 k_5 + k_1 k_2 k_3 k_5) / (k_1 k_2 k_4 k_5 + k_1 k_2 k_3 k_5) = 1$$

$$d_9 = (k_{-1} k_{-2} k_4 k_5 + k_{-1} k_3 k_4 k_5) / (k_1 k_2 k_4 k_5 + k_1 k_2 k_3 k_5) = K_{iA} K_{mB} / K_{ic}$$

$$d_{10} = (k_{-1} k_{-2} k_4 k_5 + k_{-1} k_3 k_4 k_5) / (k_1 k_2 k_4 k_5 + k_1 k_2 k_3 k_5)$$

$$d_{11} = k_{-1} k_{-2} k_3 k_5 / (k_1 k_2 k_4 k_5 + k_1 k_2 k_3 k_5) = K_{iA} K_{mB} K_{mQ} / K_{mP} K_{iQ}$$

$$d_{12} = k_2 k_3 k_4 k_5 / (k_1 k_2 k_4 k_5 + k_1 k_2 k_3 k_5) = K_{mA}$$

$$d_{13} = (k_1 k_2 k_4 k_5 + k_1 k_3 k_4 k_5) / (k_1 k_2 k_4 k_5 + k_1 k_2 k_3 k_5) = K_{mB}$$

$$d_{14} = (k_{-1} k_{-2} k_4 k_5 + k_{-1} k_3 k_4 k_5) / (k_1 k_2 k_4 k_5 + k_1 k_2 k_3 k_5) = K_{iA} K_{mB}$$

Para Nahl:

$$\begin{aligned}
 D = & d_1[P][Q][I] + d_2[B][P][Q] + d_3[A][P][I] + d_4[A][B][P] + d_5[P][I] \\
 & + d_6[P][Q] + d_7[B][I] + d_8[B][Q] + d_9[A][I] \\
 & + d_{10}[A][P] + d_{11}[A][B] + d_{12}[I] + d_{13}[Q] + d_{14}[P] \\
 & + d_{15}[B] + d_{16}[A] + d_{17}
 \end{aligned} \tag{8}$$

Sabendo que sob condições de velocidade inicial $[P]$ e $[Q] \ll 1$, $K_{ic} = k_5/k_6$ e $K_{iu} = k_6/k_6$, temos que os termos d_1 - d_6 , d_8 , d_{10} e d_{13} - d_{14} , podem ser desprezados e os demais expressos de acordo com a terminologia proposta por Cleland como indicado abaixo:

$$\begin{aligned}
 d_1 &= k_2 k_3 k_4 k_5 k_6 / (k_1 k_2 k_4 k_5 k_6 + k_1 k_2 k_3 k_5 k_6) \\
 d_2 &= k_2 k_3 k_4 k_5 k_6 / (k_1 k_2 k_4 k_5 k_6 + k_1 k_2 k_3 k_5 k_6) \\
 d_3 &= k_1 k_2 k_3 k_5 k_6 / (k_1 k_2 k_4 k_5 k_6 + k_1 k_2 k_3 k_5 k_6) \\
 d_4 &= k_1 k_2 k_3 k_5 k_6 / (k_1 k_2 k_4 k_5 k_6 + k_1 k_2 k_3 k_5 k_6) \\
 d_5 &= k_1 k_2 k_3 k_5 k_6 / (k_1 k_2 k_4 k_5 k_6 + k_1 k_2 k_3 k_5 k_6) \\
 d_6 &= (k_2 k_3 k_4 k_5 k_6 + k_1 k_3 k_4 k_5 k_6) / (k_1 k_2 k_4 k_5 k_6 + k_1 k_2 k_3 k_5 k_6) \\
 d_7 &= k_2 k_3 k_4 k_5 k_6 / (k_1 k_2 k_4 k_5 k_6 + k_1 k_2 k_3 k_5 k_6) = K_{mA} / K_{ic} \\
 d_8 &= k_2 k_3 k_4 k_5 k_6 / (k_1 k_2 k_4 k_5 k_6 + k_1 k_2 k_3 k_5 k_6) \\
 d_9 &= (k_1 k_2 k_4 k_5 k_6 + k_1 k_3 k_4 k_5 k_6) / (k_1 k_2 k_4 k_5 k_6 + k_1 k_2 k_3 k_5 k_6) = K_{mB} / K_{iu} \\
 d_{10} &= k_1 k_2 k_3 k_5 k_6 / (k_1 k_2 k_4 k_5 k_6 + k_1 k_2 k_3 k_5 k_6) \\
 d_{11} &= (k_1 k_2 k_4 k_5 k_6 + k_1 k_2 k_3 k_5 k_6) / (k_1 k_2 k_4 k_5 k_6 + k_1 k_2 k_3 k_5 k_6) = 1 \\
 d_{12} &= (k_1 k_2 k_4 k_5 k_6 + k_1 k_3 k_4 k_5 k_6) / (k_1 k_2 k_4 k_5 k_6 + k_1 k_2 k_3 k_5 k_6) = K_{iA} K_{mB} / K_{ic} \\
 d_{13} &= (k_1 k_2 k_4 k_5 k_6 + k_1 k_3 k_4 k_5 k_6) / (k_1 k_2 k_4 k_5 k_6 + k_1 k_2 k_3 k_5 k_6) \\
 d_{14} &= k_1 k_2 k_3 k_5 k_6 / (k_1 k_2 k_4 k_5 k_6 + k_1 k_2 k_3 k_5 k_6) \\
 d_{15} &= k_2 k_3 k_4 k_5 k_6 / (k_1 k_2 k_4 k_5 k_6 + k_1 k_2 k_3 k_5 k_6) = K_{mA} \\
 d_{16} &= (k_1 k_2 k_4 k_5 k_6 + k_1 k_3 k_4 k_5 k_6) / (k_1 k_2 k_4 k_5 k_6 + k_1 k_2 k_3 k_5 k_6) = K_{mB} \\
 d_{17} &= (k_1 k_2 k_4 k_5 k_6 + k_1 k_3 k_4 k_5 k_6) / (k_1 k_2 k_4 k_5 k_6 + k_1 k_2 k_3 k_5 k_6) = K_{iA} K_{mB}
 \end{aligned}$$

Substituindo os termos d_n nas equações 7 e 8 para NahF e Nahl, respectivamente, e expressando o numerado N e demoninador D na equação 1, temos a expressão final para $v/[E]$ para cada um dos sistemas:

Para NahF:

$$v/[E] = \frac{k_{cat} [A][B]}{\frac{1}{K_{iP}}[A][B][P] + \frac{K_{iA} K_{mB} K_{mQ}}{K_{ic} K_{mP} K_{iQ}}[P][I] + \frac{K_{mA}}{K_{ic}}[B][I] + \frac{K_{mB} K_{mQ}}{K_{mP} K_{iQ}}[A][P] + [A][B] + \frac{K_{iA} K_{mB}}{K_{ic}}[I] + \frac{K_{iA} K_{mB} K_{mQ}}{K_{mP} K_{iQ}}[P] + K_{mA}[B] + K_{mB}[A] + K_{iA} K_{mB}} \quad (9)$$

Para Nahl:

$$v/[E] = \frac{k_{cat} [A][B]}{\frac{K_{mA}}{K_{ic}}[B][I] + \frac{K_{mB}}{K_{iu}}[A][I] + [A][B] + \frac{K_{iA} K_{mB}}{K_{ic}}[I] + K_{mA}[B] + K_{mB}[A] + K_{iA} K_{mB}} \quad (10)$$

$$v/[E] = \frac{k_{cat} [A][B]}{\frac{1}{K_{iP}}[A][B][P] + \frac{K_{iA} K_{mB} K_{mQ}}{K_{ic} K_{mP} K_{iQ}}[P][I] + \frac{K_{mA}}{K_{ic}}[B][I] + \frac{K_{mB} K_{mQ}}{K_{mP} K_{iQ}}[A][P] + [A][B] + \frac{K_{iA} K_{mB}}{K_{ic}}[I] + \frac{K_{iA} K_{mB} K_{mQ}}{K_{mP} K_{iQ}}[P] + K_{mA}[B] + K_{mB}[A] + K_{iA} K_{mB}} \quad ; \quad (11)$$

A fim de obter uma equação reduzida, podemos dividir por [B], dessa forma, consideramos que a concentração de cofator constante, com isso, teremos:

$$v/[E] = \frac{k_{cat} [A][B]}{\frac{1}{K_{iP}}[A][P] + \frac{K_{iA} K_{mB} K_{mQ}}{K_{ic} K_{mP} K_{iQ}[B]}[P][I] + \frac{K_{mA}}{K_{ic}}[I] + \frac{K_{mB} K_{mQ}}{K_{mP} K_{iQ}[B]}[A][P] + [A] + \frac{K_{iA} K_{mB}}{K_{ic}[B]}[I] + \frac{K_{iA} K_{mB} K_{mQ}}{K_{mP} K_{iQ}[B]}[P] + K_{mA} + \frac{K_{mB}}{[B]}[P][A] + K_{iA} \frac{K_{mB}}{[B]}} \quad ; \quad (12)$$

Além disso, como consideramos velocidades iniciais, a concentração de P, o salicilato produzido pela oxidação do substrato, é muito menor do que a concentração do salicilato adicionado como inibidor [I], dessa maneira, podemos considerar esse termo $[P] \ll [I]$.

$$v/[E] = \frac{k_{cat} [A][B]}{\frac{1}{K_{iP}}[A] + \frac{K_{iA} K_{mB} K_{mQ}}{K_{ic} K_{mP} K_{iQ}[B]}[I] + \frac{K_{mA}}{K_{ic}}[I] + \frac{K_{mB} K_{mQ}}{K_{mP} K_{iQ}[B]}[A] + [A] + \frac{K_{iA} K_{mB}}{K_{ic}[B]}[I] + K_{mA} + \frac{K_{mB}}{[B]}[A] + K_{iA} \frac{K_{mB}}{[B]}} \quad ; \quad (13)$$

Podemos considerar o produto das constantes $\frac{K_{mB} K_{mQ}}{K_{mP} K_{iQ}[B]}$ em uma única constante denominada α , teremos então:

$$v/[E] = \frac{k_{cat} [A]}{\frac{1}{K_{iP}}[A] + \frac{K_{iA}}{K_{ic}} \alpha [I] + \frac{K_{mA}}{K_{ic}} [I] + \alpha [A] + [A] + \frac{K_{iA} K_{mB}}{K_{ic}} [I] + K_{mA} + K_{mB} [A] + K_{iA} K_{mB}}}; \quad (14)$$

rearranjando, teremos:

$$v/[E] = \frac{k_{cat} [A]}{[A] \left(\frac{1}{K_{iP}} + K_{mB} + \alpha + 1 \right) + K_{mA} \left(\frac{[I]}{K_{ic}} + 1 \right) + K_{mB} \left(\frac{K_{iA} [I]}{K_{ic}} + K_{iA} \right)}; \quad (15)$$

Da mesma forma podemos manter o substrato A constante, ou seja, dividir a equação por [A], e variarmos o cofator B, e teremos a seguinte equação:

$$v/[E] = \frac{k_{cat} [B]}{\frac{1}{K_{iP}} [B][P] + \frac{K_{iA} K_{mB} K_{mQ}}{K_{ic} K_{mP} K_{iQ} [A]} [P][I] + \frac{K_{mA}}{K_{ic} [A]} [B][I] + \frac{K_{mB} K_{mQ}}{K_{mP} K_{iQ}} [P] + [B] + \frac{K_{iA} K_{mB}}{K_{ic} [A]} [I] + \frac{K_{iA} K_{mB} K_{mQ}}{K_{mP} K_{iQ} [A]} [P] + \frac{K_{mA}}{[A]} [B] + K_{mB} + K_{iA} \frac{K_{mB}}{[A]}}}; \quad (16)$$

Fazendo as mesmas considerações anteriores para [P], $\frac{K_{mB} K_{mQ}}{K_{mP} K_{iQ} [A]}$, $\frac{K_{iA}}{K_{ic}}$ e $\frac{K_{mA}}{[A]} = \varepsilon \frac{K_{iA}}{[A]} = \gamma$, temos:

$$v/[E] = \frac{k_{cat} [B]}{\frac{1}{K_{iP}} [B] + \alpha \delta [I] + \frac{\varepsilon}{K_{ic}} [B][I] + [B] + \delta K_{mB} [I] + \varepsilon [B] + K_{mB} + \gamma K_{mB}}}; \quad (17)$$

Rearranjando, temos:

$$v/[E] = \frac{k_{cat} [B]}{([B] \left(\frac{1}{K_{iP}} + \frac{\varepsilon}{K_{ic}} [I] + 1 + \varepsilon \right) + (K_{mB} \left(\frac{\alpha \delta [I]}{K_{mB}} + \delta [I] + 1 + \gamma \right))}}}; \quad (18)$$

Para a Nahl temos:

$$v/[E] = \frac{k_{maxcat} [A][B]}{\frac{K_{mA}}{K_{ic}} [B][I] + \frac{K_{mB}}{K_{iu}} [A][I] + [A][B] + \frac{K_{iA} K_{mB}}{K_{ic}} [I] + K_{mA} [B] + K_{mB} [A] + K_{iA} K_{mB}}}. \quad (19)$$

Repetindo os passos que foram feitos para a NahF, temos inicialmente para o substrato, dividimos por [B] que é uma constante:

$$v/[E] = \frac{k_{cat} [A]}{\frac{K_{mA}[I] + \frac{K_{mB}[A][I]/[B] + [A] + \frac{K_{iA}K_{mB}[I] + K_{mA} + K_{mB}[A]/[B] + \frac{1}{[B]}K_{iA}K_{mB}}{K_{iu}}}}}; \quad (20)$$

Considerando, $\frac{1}{[B]}K_{mB}$ como uma constante β , podemos reescrever a equação:

$$v/[E] = \frac{k_{cat} [A]}{\frac{K_{mA}[I] + \frac{\beta}{K_{iu}}[A][I] + [A] + \beta \frac{K_{iA}}{K_{ic}}[I] + K_{mA} + \beta[A] + \beta K_{iA}}}}}; \quad (21)$$

Rearranjando, temos:

$$v/[E] = \frac{k_{cat} [A]}{[A] \left(\frac{\beta}{K_{iu}}[I] + 1 + \beta \right) + K_{mA} \left(\frac{[I]}{K_{ic}} + 1 \right) + \beta \frac{K_{iA}}{K_{ic}}[I] + \beta K_{iA}}}; \quad (22)$$

Considerando o cofator [B] sendo a variável e substrato constante, temos:

$$v/[E] = \frac{k_{cat} [B]}{\frac{K_{mA}[B][I]/[A] + \frac{K_{mB}[I] + [B] + \frac{K_{iA}K_{mB}[I] + K_{mA}[B] + K_{mB} + K_{iA}K_{mB}/[A]}{K_{iu}}}}}; \quad (23)$$

considerando $\frac{K_{mA}}{[A]} = \delta$ e $\frac{K_{iA}}{[A]} = \varepsilon$, temos:

$$v/[E] = \frac{k_{cat} [B]}{\frac{[B][I]}{K_{ic}} \delta + \frac{K_{mB}[I] + [B] + \frac{K_{mB}[I]\varepsilon + \delta[B] + K_{mB} + \varepsilon K_{mB}}{K_{iu}}}}}; \quad (24)$$

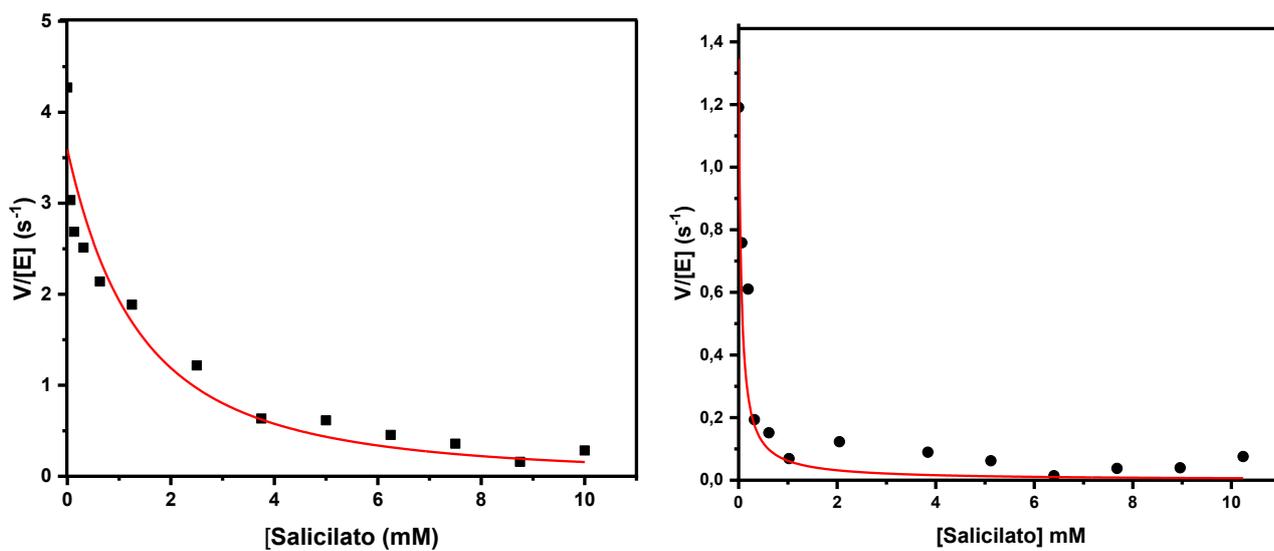
rearranjando,

$$v/[E] = \frac{k_{cat} [B]}{[B] \left(\frac{[I]}{K_{ic}} \delta + 1 + \delta \right) + K_{mB} \left(\frac{[I]}{K_{iu}} + \frac{[I]\varepsilon}{K_{ic}} + 1 + \varepsilon \right)}; \quad (25)$$

Com as equações 15 e 18 para a NahF e as equações 22 e 25 para a NahI, conseguimos ajustar as curvas baseados nos valores de K_m , k_{cat} e concentração do inibidor obtidos via equação de Michaelis-Menten mostras abaixo nas figuras.

Os ajustes não-lineares dos dados cinéticos apresentados nas figuras 4-5 e 4-6, foram realizados com as equações 2 e 3 para a NahF e NahI, respectivamente.

Figura 4-5: Perfil de inibição das enzimas NahF (a) e NahI (b) em concentrações crescentes de salicilato. As reações foram realizadas na presença de salicilaldeído 50 μM , pH 8,5, $I=0,2$ e 25°C. Fonte: o autor.



Os valores de inibição para IC50 para os dados acima, indicam uma inibição 10 vezes maior na enzima NahI. A partir destes dados iniciais, foram realizados ensaios cinéticos em que se variaram as quantidades de substrato e cofator em diferentes concentrações fixas de inibidor, a fim de se obterem dados para um melhor detalhamento do efeito de inibição das enzimas e dados obtidos são apresentados nas figuras 4-7 a 4-10.

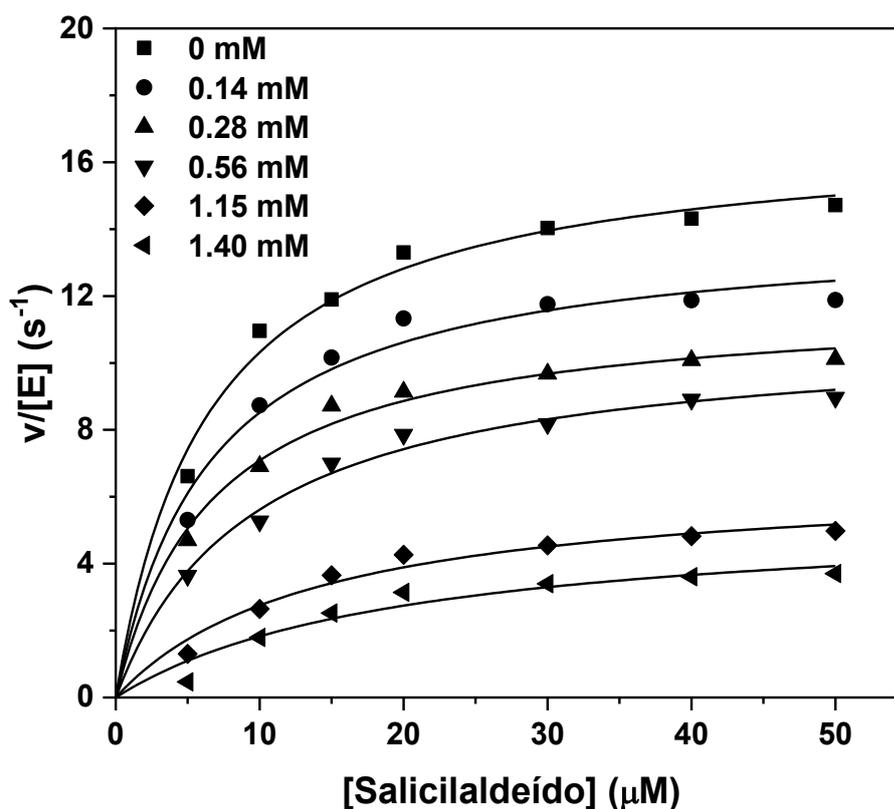


Figura 4-6: Perfil das cinéticas obtidas para a NahF a diferentes concentrações de inibidor e substrato, na presença de 200 μM de NAD⁺ em pH 8,5, I = 0,2 e 25°C. Fonte: o autor.

Tabela 4-1: Valores de K_m , k_{cat} para salicilaldeído na reação catalisada pela NahF em 200 μM de NAD^+ e diferentes concentrações de salicilato em pH 8,5, $I=0,2$ e 25°C. Fonte: o autor.

[salicilato] mM	k_{cat}^{ap} s^{-1}	K_{ma}^{ap} μM	K_{mb}^{ap} μM	α	K_{IC} mM	K_{IA} mM	K_{IP} mM
0	$16,9 \pm 0,5$	$6,4 \pm 0,8$	200	0	1	1	1
0,14	$14,1 \pm 0,6$	7 ± 1	200	$0,69 \pm 0,07$	$3,5 \pm 0,5$	$0,28 \pm 0,02$	11 ± 1
0,28	$11,8 \pm 0,4$	$6,7 \pm 0,8$	200	$0,90 \pm 0,02$	$3,6 \pm 0,1$	$0,20 \pm 0,01$	10 ± 1
0,56	$10,9 \pm 0,4$	10 ± 1	200	$0,46 \pm 0,02$	$5,9 \pm 0,4$	$0,35 \pm 0,04$	12 ± 4
1,15	$6,6 \pm 0,5$	14 ± 3	200	$0,24 \pm 0,05$	$6,2 \pm 0,2$	$0,45 \pm 0,02$	9 ± 1
1,40	$5,5 \pm 0,8$	20 ± 7	200	$0,32 \pm 0,04$	$5,8 \pm 0,5$	$0,52 \pm 0,01$	10 ± 3

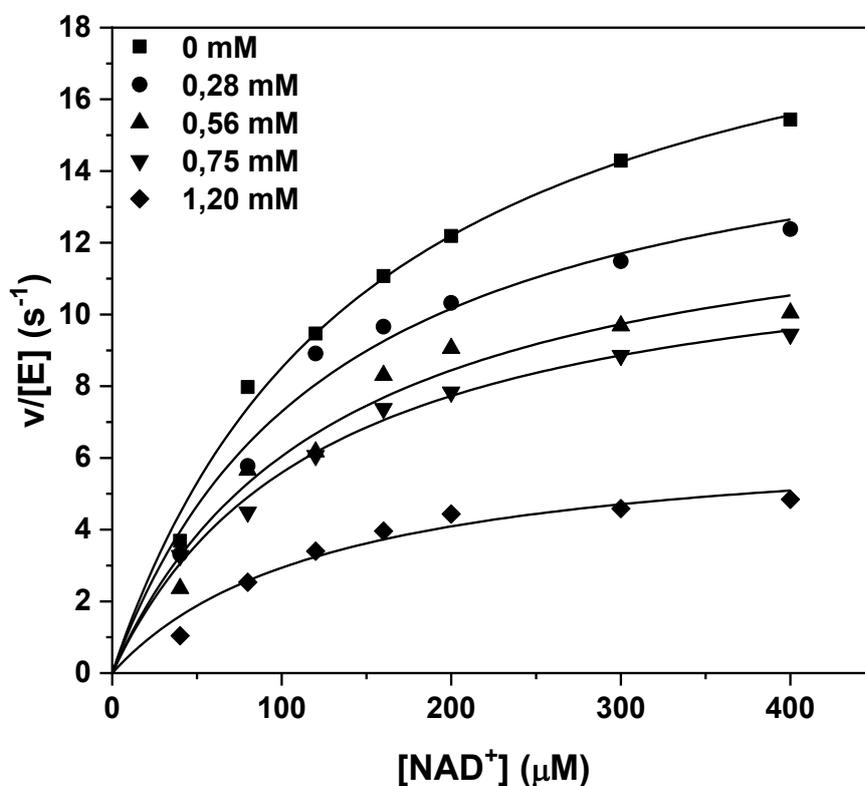


Figura 4-7: Perfil das cinéticas obtidas para a NahF a diferentes concentrações de inibidor e cofator, na presença de 50 μM de salicilaldeído em pH 8,5, $I = 0,2$ e 25°C. Fonte: o autor.

Tabela 4-2 Valores de K_m , k_{cat} para o NAD^+ na reação catalisada pela NahF na presença $50 \mu M$ de salicialdeído e diferentes concentrações de salicilato em pH 8,5, $I=0,2$ e $25^\circ C$.
Fonte: o autor.

[salicilato] mM	k_{cat}^{ap} s^{-1}	K_{mB}^{ap} μM	K_{ma}^{ap} μM	α	K_{IC} mM	ϵ	K_{IP} mM	δ
0	22 ± 1	$152 \pm$	6,4	0	1	0	1	0
0,28	17 ± 1	$130 \pm$	6,7	$0,81 \pm 0,02$	$4,1 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,1$	12 ± 2	$2,8 \pm 0,1$
0,56	14 ± 1	$132 \pm$	10	$0,75 \pm 0,03$	$4,6 \pm 0,1$	$3 \pm 0,1$	10 ± 1	$3 \pm 0,1$
0,75	$12,5 \pm 0,5$	$124 \pm$	10	$0,90 \pm 0,05$	$5,2 \pm 0,3$	$3,5 \pm 0,3$	12 ± 4	$3,5 \pm 0,3$
1,20	$6,7 \pm 0,7$	$129 \pm$	14	$0,80 \pm 0,08$	$6,3 \pm$	$4,5 \pm 0,2$	9 ± 1	$4,5 \pm 0,2$

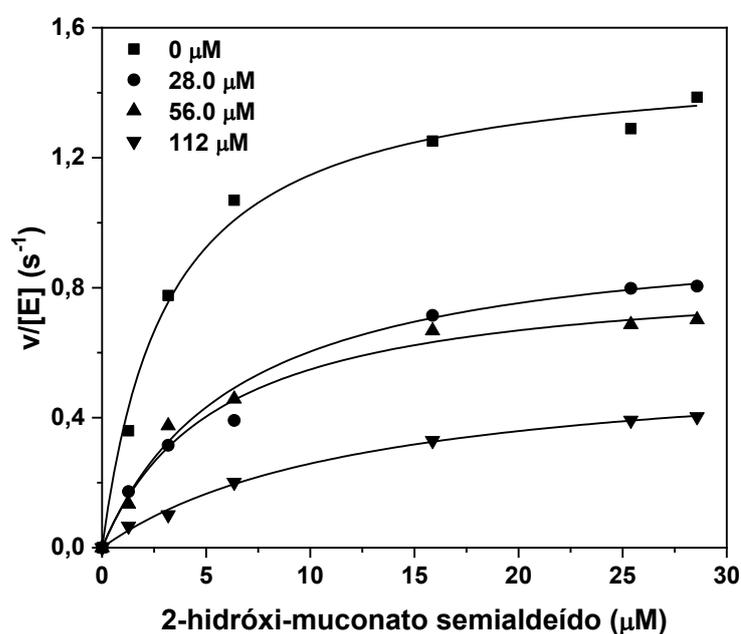


Figura 4-8: Perfil das cinéticas obtidas para a NahI a diferentes concentrações de inibidor e substrato em pH 8,5, $I=0,2$ e $25^\circ C$. Fonte: o autor.

Tabela 4-3: Valores de K_m , k_{cat} para 2-hidróxi muconato semialdeído na reação catalisada pela Nahl em 200 μM de NAD^+ e diferentes concentrações de salicilato em pH 8,5, $I=0,2$ e 25°C. Fonte: o autor.

[salicilato] mM	k_{cat}^{ap} s^{-1}	K_{ma} μM	β	K_{IC} mM	K_{IA} mM (10^{-3})	K_{IU} mM (10^{-3})
0	$1,51 \pm 0,05$	$3,2 \pm 0,4$	0	1	1	1
28,0	$1,00 \pm 0,02$	$6,6 \pm 0,3$	$0,41 \pm 0,02$	$0,39 \pm 0,01$	$2 \pm 0,1$	12 ± 1
56,0	$0,86 \pm 0,04$	$5,6 \pm 0,9$	$0,50 \pm 0,01$	$0,36 \pm 0,02$	$2,8 \pm 0,2$	15 ± 7
112,0	$0,59 \pm 0,03$	13 ± 1	$0,46 \pm 0,03$	$0,42 \pm 0,06$	$3,2 \pm 0,3$	12 ± 3

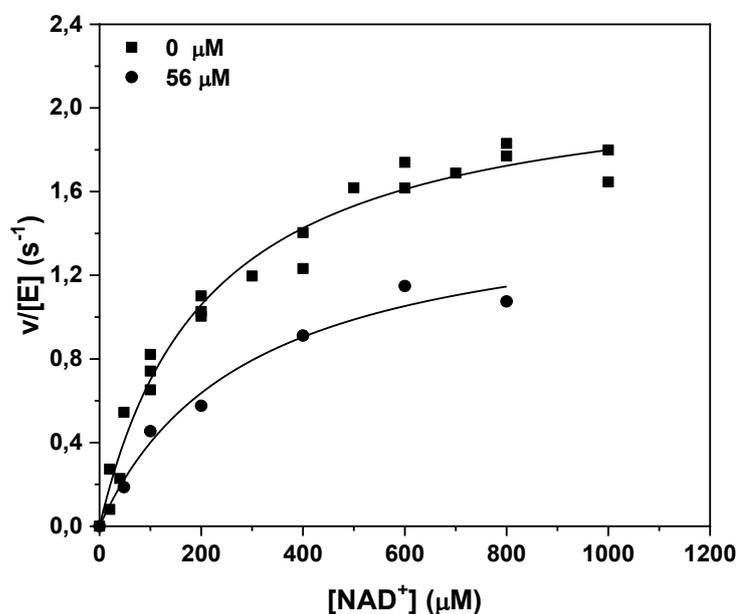


Figura 4-9: Perfil das cinéticas obtidas para a Nahl em diferentes concentrações de inibidor e cofator, na presença de 33 μM de 2-hidróxi muconato semialdeído em pH 8,5, $I = 0,2$ e 25°C. Fonte: o autor.

Tabela 4-4 Valores de K_m , k_{cat} para o NAD^+ na reação catalisada pela NahF na presença 30 μM de 2-hidróxi muconato semialdeído e diferentes concentrações de salicilato em pH 8,5, $I=0,2$ e 25°C. Fonte: o autor.

[salicilato] mM	k_{cat}^{ap} s^{-1}	K_m μM	δ	K_{ic} mM	ϵ	K_{iu} mM (10^{-3})
0	$2,18 \pm 0,09$	212 ± 25	0	1	0	1
56,0	$1,6 \pm 0,2$	291 ± 72	$0,81 \pm 0,02$	$0,48 \pm 0,06$	$1,48 \pm 0,01$	26 ± 1

As constantes K_{ip} para a NahF e NahI indicam a afinidade do complexo EAI quando o salicilato compete com o sítio de ligação do substrato. O menor valor ~ 10 vez menor de K_{iu} para a NahI que para a NahF, indica a NahI é mais sensível à inibição competitiva e impede a ligação de outra molécula de inibidor no sítio de ligação do NAD^+ e vice-versa. O caso em que $K_{ip} > K_{ic}$ para a NahF, pode ser uma inibição predominantemente competitiva.¹²⁹

Os dados de k_{cat} e K_m mostram que a NahI é mais sensível à inibição que a NahF. Além disso, os dados cinéticos em função da concentração de NAD^+ para a NahI indicaram um aumento nos valores de K_m e k_{cat} , o que confirma a inibição no sítio de ligação do cofator.

Dados cristalográficos da NahI obtidos pelo grupo de pesquisa BIOEST do professor Ronaldo Nagem do ICB, mostram o salicilato ligado tanto ao sítio de ligação do substrato quanto ao sítio de ligação do cofator. O salicilato liga-se na região do sítio ativo, formado pelos resíduos V287, C288, L289, F448, R450 e F456.¹³² A parte aromática do salicilato interage com os resíduos hidrofóbicos F456, F448, L160 e L289 (figura 4.11). A porção polar do salicilato interage com os resíduos W163 e R450. Esse resultado sugere que o salicilato interage de forma eficaz, seja por ligações de hidrogênio seja por interações do tipo empacotamento- π (π stacking) no sítio ativo. Essas interações fazem com que o substrato da NahI, um substrato que apresenta uma cadeia linear e com somente uma ligação π em sua estrutura, seja menos propenso a deslocar o inibidor do sítio ativo com a mesma eficiência, que o substrato da NahF. Isso justifica os valores das constantes de inibição para a NahI serem maiores do que para a NahF.

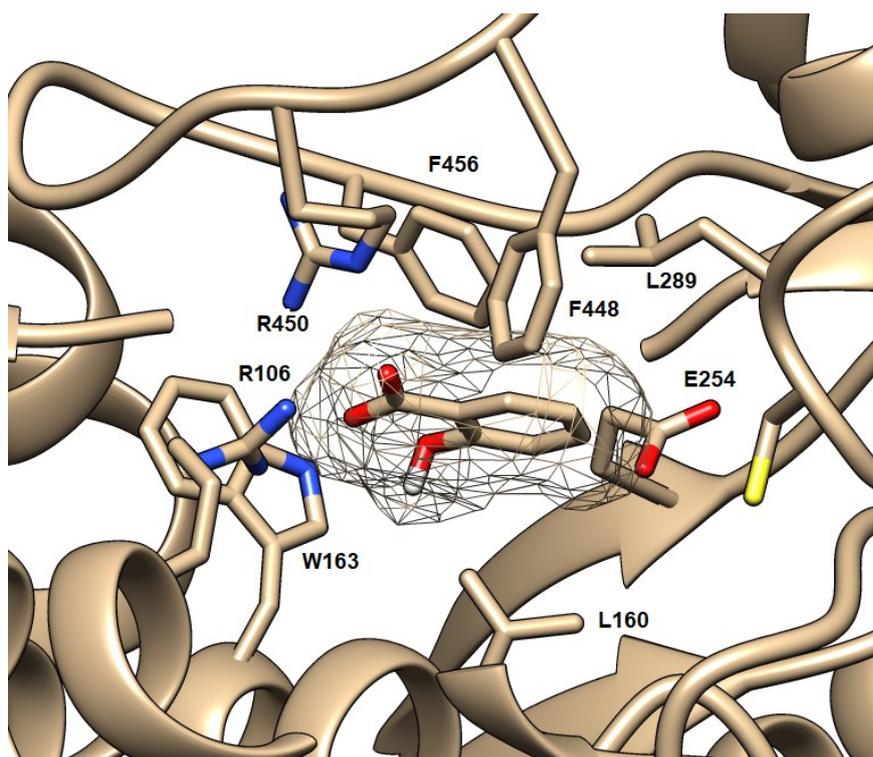


Figura 4-10: Interações do salicilato com os resíduos de aminoácidos **W163, E254, L160, F448, L289, F456, R450 e R106** no sítio catalítico da Nahl. Fonte: o autor.

O dado cristalográfico da Nahl também mostra que o salicilato interage na região de ligação do NAD^+ , denominada *Rossmann-like*, participando no processo de inibição da ligação do cofator. A interação especificamente se dá nos resíduos I158, Y236 e K178 (figura 4-12), responsáveis pela interação da enzima com a porção nicotinamida do NAD^+ .^{107,127}

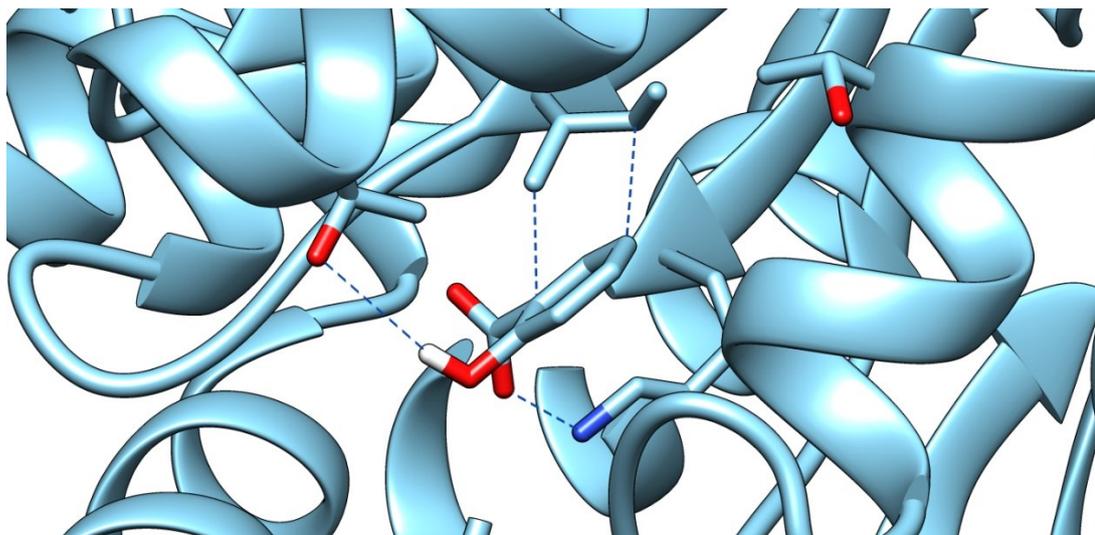
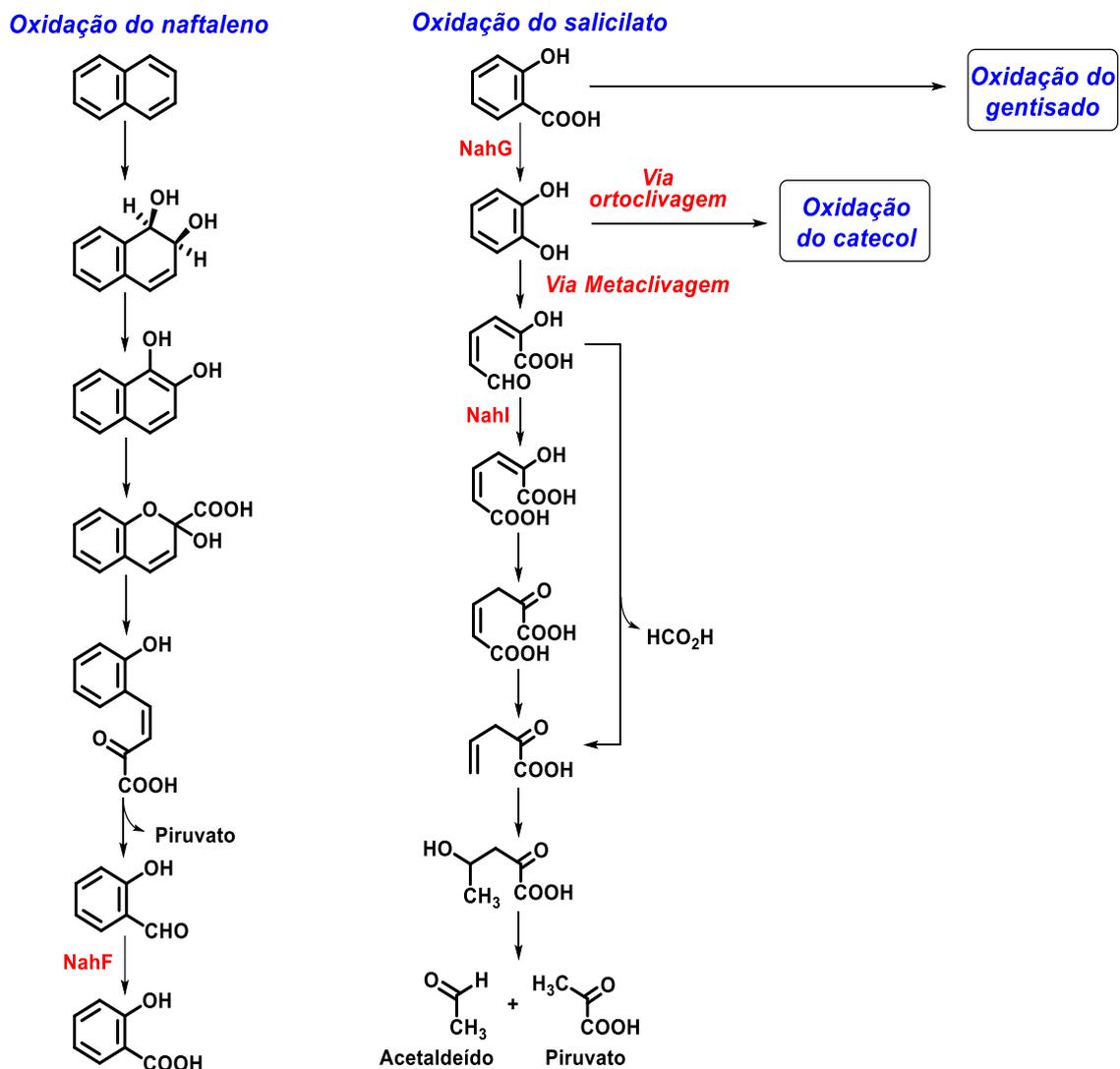


Figura 4-11: Imagem da interação do salicilato com os resíduos de aminoácidos L158, Y236, Y220 e K178 do sítio de ligação do cofator da NahI. Fonte: o autor.

Dados cristalográficos da NahF mostram que, no sítio de ligação do substrato, o salicilaldeído está inserido em um funil formado por vários resíduos hidrofóbicos, a saber W96, F99, A103, V107, V153, L154, F274, L278, F279, I283, V438 e Y446.^{118,134} A similaridade estrutural entre o salicilaldeído e o salicilato, produto da reação, favorece a interação do salicilato nessa região hidrofóbica. Estudos de *docking* também mostram que na ALDH humana o salicilato é um inibidor que se liga na porção hidrofóbica do sítio ativo.¹³³

O fato da enzima NahI não apresentar atividade sobre o substrato natural da NahF indica que o organismo evoluiu para produzir estas enzimas de modo a desempenharem funções específicas e diferenciadas nas vias de degradação às quais pertencem;¹³⁵ Os dados obtidos neste trabalho mostram uma possível regulação na *PpG7*. As diversas rotas de obtenção de produtos na *via* metabólica da *PpG7* (esquema 4-5) e os dados de inibição para a NahF e NahI indicam que essas enzimas desenvolvem um papel chave no fluxo metabólico de degradação do naftaleno. Quando a NahI é inibida, a *via* inferior funciona pelo atalho que não necessita das enzimas NahI, NahJ e NahK, formando ácido fórmico. Contudo, a inibição da NahI e, possivelmente, o excesso de ácido fórmico tornam a via inferior inviável, sendo o

metabolismo direcionado para outras vias: oxidação do gentisato e ortoclivagem do anel aromático do catecol (esquema 4.3).



Esquema 4-3: Via de oxidação de naftaleno, salicilato e catecol. Em destaque, estão as enzimas NahF, NahG e NahI. Fonte: adaptado de You *et. al.*¹³¹

4.4 Conclusões

O salicilato inibe fortemente a NahF e a Nahl na via de degradação do naftaleno da *Pseudomonas putida* G7. Os dados de inibição mostram que o salicilato atua como um inibidor misto, ligando-se tanto ao sítio do cofator quanto ao sítio ativo. Esses dados sugerem que o salicilato é uma molécula chave ao metabolismo dessa bactéria, sendo essa inibição uma via que alimenta outros caminhos metabólicos de degradação, para produzir moléculas com diferentes propósitos para manutenção do funcionamento biológico da *PpG7*.

Uma forma de melhor se entender estes processos em estudos futuros, pode ser a realização de investigações de cinética, variando a concentração de cofator NAD⁺ na presença de NahF com concentrações fixas de substrato e inibidor. Podem ser realizados bem como experimentos a diferentes concentrações das enzimas, NahF e Nahl, que poderiam vir a fornecer respostas complementares aos dados obtidos no que diz respeito ao processo de inibição dessas ALDHs por salicilato.

5 CONCLUSÕES GERAIS

Os mecanismos de catálise da NahC, controle e reconhecimento molecular de cofatores pela NahG e de inibição das enzimas NahF e NahI foram explorados para desvendar as múltiplas facetas da via de degradação biológica do naftaleno. Os estudos representam um novo avanço no conhecimento científico no que tange principalmente pontos específicos.

Este trabalho mostrou, via cálculos teóricos, não só a importância do que o íon ferro II no sítio ativo para a ativação do O₂, mas demonstrou a importância dos resíduos da primeira e segunda esfera de coordenação do metal para a estabilização e formação de intermediários reacionais em um mecanismo que deve passar por espécie epóxido.

O mecanismo de ativação do oxigênio para a NahG ocorre via um intermediário C(4 α)-hidroperoxiflavina, que tem sua estabilidade frente a água fortemente dependente dos grupos de nucleotídeo de adenosila do FAD. Embora, o papel desses grupos em catálise não seja crucial para a atividade enzimática.

O salicilato tem um papel importante na inibição das enzimas NahF e NahI, indicando pontos de controle no metabolismo da bactéria que podem estar relacionados a formação de produtos por diferentes vias a partir do salicilato, uma molécula central no metabolismo de HAPs.

REFERÊNCIAS

1. Robbins WK, Hsu CS. Petroleum, Composition. *Kirk-Othmer Encycl Chem Technol.* Published online 2000:1-17. doi:10.1002/0471238961.0315131618150202.a01
2. Van Hamme JD, Singh A, Ward OP. Recent Advances in Petroleum Microbiology Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67(4):503-549. doi:10.1128/MMBR.67.4.503
3. HABE H, OMORI T. Genetics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism in Diverse Aerobic Bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2003;67(2):225-243. doi:10.1271/bbb.67.225
4. Peng RH, Xiong AS, Xue Y, et al. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol Rev.* 2008;32(6):927-955. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00127.x
5. Bamforth SM, Singleton I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: Current knowledge and future directions. *J Chem Technol Biotechnol.* 2005;80(7):723-736. doi:10.1002/jctb.1276
6. Harvey RG. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Chemistry and Carcinogenicity.* CUP Archive; 1991.
7. Josemar R, Jacques S, Bento FM, Anastácio F, Camargo DO. Biodegradação De Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos. *Ciência e Nat.* 2007;29(1):7-24. doi:10.5902/2179460X9736
8. Johnsen AR, Wick LY, Harms H. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ Pollut.* 2005;133(1):71-84. doi:10.1016/j.envpol.2004.04.015
9. Alcalde M, Ferrer M, Plou FJ, Ballesteros A. Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. *Trends Biotechnol.*

- 2006;24(6):281-287. doi:10.1016/j.tibtech.2006.04.002
10. Mutnuri S, Vasudevan N, Kaestner M. Degradation of anthracene and pyrene supplied by microcrystals and non-aqueous-phase liquids. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005;67(4):569-576. doi:10.1007/s00253-005-1905-6
 11. [Www.elsevier.com/locate/ibiod](http://www.elsevier.com/locate/ibiod) IB& B 56 (2005) 143–150, Site A biodegradation by *P* sp. isolated from a petrochemical sludge landfarming, Rodrigo J.S. Jacquesa, Eder C. Santosa, Fa´tima M. Bentoa, Maria C.R. Peralbab, Pedro A. Selbacha, Enilson L.S. Sa´ a F vio AOC. Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp. isolated from a petrochemical sludge landfarming site. *Ann Chir Gynaecol*. 2005;86(4):319-324. doi:10.1016/j.ibiod.2005.06.005
 12. Sota M, Yano H, Ono A, 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. *J Bacteriol*. 2006;188(11):4057-4067. doi:10.1128/JB.00185-06
 13. Hult K, Berglund P. Enzyme promiscuity: mechanism and applications. *Trends Biotechnol*. 2007;25(5):231-238. doi:10.1016/j.tibtech.2007.03.002
 14. de Lorenzo V, Eltis L, Kessler B, Timmis KN. Analysis of *Pseudomonas* gene products using *lacIq/P_{trp}-lac* plasmids and transposons that confer conditional phenotypes. *Gene*. 1993;123(1):17-24. doi:10.1016/0378-1119(93)90533-9
 15. Fortin PD, MacPherson I, Neau DB, Bolin JT, Eltis LD. Directed evolution of a ring-cleaving dioxygenase for polychlorinated biphenyl degradation. *J Biol Chem*. 2005;280(51):42307-42314. doi:10.1074/jbc.M510456200
 16. Lipscomb JD. Mechanism of extradiol aromatic ring-cleaving dioxygenases. *Curr Opin Struct Biol*. 2008;18(6):644-649. doi:10.1016/j.sbi.2008.11.001
 17. Bergdoll M, Eltis LD, Cameron AD, Dumas P, Bolin JT. All in the family: Structural and evolutionary relationships among three modular proteins with diverse functions and variable assembly. *Protein Sci*. 1998;7(8):1661-1670.

doi:10.1002/pro.5560070801

18. Armstrong RN. Mechanistic diversity in a metalloenzyme superfamily. *Biochemistry*. 2000;39(45):13625-13632. doi:10.1021/bi001814v
19. Kauppi B, Lee K, Carredano E, et al. Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenasenaphthalene 1,2-dioxygenase. *Structure*. 1998;6(5):571-586. doi:10.1016/S0969-2126(98)00059-8
20. Bugg TD, Ramaswamy S. Non-heme iron-dependent dioxygenases: unravelling catalytic mechanisms for complex enzymatic oxidations. *Curr Opin Chem Biol*. 2008;12(2):134-140. doi:10.1016/j.cbpa.2007.12.007
21. Vaillancourt F, Bolin J, Eltis L. The ins and outs of ring-cleaving dioxygenases. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2006;41(4):241-267. doi:10.1080/10409230600817422
22. Heiss G, Stolz A, Kuhm AE, et al. Characterization of a 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase from the naphthalenesulfonate-degrading bacterium strain BN6. *J Bacteriol*. 1995;177(20):5865-5871. doi:10.1128/jb.177.20.5865-5871.1995
23. Christian GJ, Ye S, Neese F. Oxygen activation in extradiol catechol dioxygenases - A density functional study. *Chem Sci*. 2012;3(5):1600-1611. doi:10.1039/c2sc00754a
24. Vaillancourt FH, Barbosa CJ, Spiro TG, et al. Definitive evidence for monoanionic binding of 2,3-dihydroxybiphenyl to 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase from UV resonance Raman spectroscopy, UV/Vis absorption spectroscopy, and crystallography. *J Am Chem Soc*. 2002;124(11):2485-2496. doi:10.1021/ja0174682
25. Mbughuni MM, Chakrabarti M, Hayden JA, et al. Oxy intermediates of homoprotocatechuate 2,3-dioxygenase: Facile electron transfer between substrates. *Biochemistry*. 2011;50(47):10262-10274. doi:10.1021/bi201436n
26. Grzyska PK, Hausinger RP, Proshlyakov DA. Metal and substrate binding to an

- Fe(II) dioxygenase resolved by UV spectroscopy with global regression analysis. *Anal Biochem.* 2010;399(1):64-71. doi:10.1016/j.ab.2009.11.022
27. Whiting AK, Boldt YR, Hendrich MP, Wackett LP, Que L. Manganese (II) - Dependent Extradiol-Cleaving Catechol Dioxygenase from. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;(35):160-170.
 28. Fielding AJ, Kovaleva EG, Farquhar ER, Lipscomb JD, Que L. A hyperactive cobalt-substituted extradiol-cleaving catechol dioxygenase. *J Biol Inorg Chem.* 2011;16(2):341-355. doi:10.1007/s00775-010-0732-0
 29. Georgiev V, Borowski T, Siegbahn PEM. Theoretical study of the catalytic reaction mechanism of MndD. *J Biol Inorg Chem.* 2006;11(5):571-585. doi:10.1007/s00775-006-0106-9
 30. Georgiev V, Borowski T, Blomberg MRA, Siegbahn PEM. A comparison of the reaction mechanisms of iron- and manganese-containing 2,3-HPCD: An important spin transition for manganese. *J Biol Inorg Chem.* 2008;13(6):929-940. doi:10.1007/s00775-008-0380-9
 31. Meier KK, Rogers MS, Kovaleva EG, et al. A long-lived FeIII-(hydroperoxo) intermediate in the active H200C variant of homoprotocatechuate 2,3-dioxygenase: Characterization by mössbauer, electron paramagnetic resonance, and density functional theory methods. *Inorg Chem.* 2015;54(21):10269-10280. doi:10.1021/acs.inorgchem.5b01576
 32. Carlos Gesse J, Yunes S, M. Clementin R, Nome F. 10 -10 14). *Reações Intramol Como Model Não Miméticos Catálise Enzimática.* Published online 1997:631-637.
 33. Siegbahn PEM. Mechanisms of metalloenzymes studied by quantum chemical methods. *Q Rev Biophys.* 2003;36(1):91-145. doi:10.1017/S0033583502003827
 34. Siegbahn PEM, Himo F. Recent developments of the quantum chemical cluster approach for modeling enzyme reactions. *JBIC J Biol Inorg Chem.*

- 2009;14(5):643-651. doi:10.1007/s00775-009-0511-y
35. Dong G, Lu J, Lai W. Insights into the mechanism of aromatic ring cleavage of noncatecholic compound 2-aminophenol by aminophenol dioxygenase: A quantum mechanics/molecular mechanics study. *ACS Catal.* 2016;6(6):3796-3803. doi:10.1021/acscatal.6b00372
 36. Car R, Parrinello M. Unified Approach for Molecular Dynamics and Density-Functional Theory. *Phys Rev Lett.* 1985;55(22):2471-2474. doi:10.1103/PhysRevLett.55.2471
 37. Tiwary P, Mondal J, Morrone JA, Berne BJ. Role of water and steric constraints in the kinetics of cavity-ligand unbinding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(39):12015-12019. doi:10.1073/pnas.1516652112
 38. Salahub DR, De La Lande A, Goursot A, Zhang R, Zhang Y. *Recent Progress in Density Functional Methodology for Biomolecular Modeling.* Vol 150.; 2013. doi:10.1007/978-3-642-32750-6_1
 39. Himo F. Quantum chemical modeling of enzyme active sites and reaction mechanisms. *Theor Chem Acc.* 2006;116(1-3):232-240. doi:10.1007/s00214-005-0012-1
 40. Leopoldini M, Marino T, Michelini MDC, et al. The role of quantum chemistry in the elucidation of the elementary mechanisms of catalytic processes: From atoms, to surfaces, to enzymes. *Theor Chem Acc.* 2007;117(5-6):765-779. doi:10.1007/s00214-006-0199-9
 41. Siegbahn PEM, Himo F. The quantum chemical cluster approach for modeling enzyme reactions. *Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci.* 2011;1(3):323-336. doi:10.1002/wcms.13
 42. Ramos MJ, Fernandes PA. Computational enzymatic catalysis. *Acc Chem Res.* 2008;41(6):689-698. doi:10.1021/ar7001045
 43. Blomberg MRA, Borowski T, Himo F, Liao RZ, Siegbahn PEM. Quantum

- chemical studies of mechanisms for metalloenzymes. *Chem Rev.* 2014;114(7):3601-3658. doi:10.1021/cr400388t
44. Fouda A, Ryde U. Does the DFT Self-Interaction Error Affect Energies Calculated in Proteins with Large QM Systems? *J Chem Theory Comput.* 2016;12(11):5667-5679. doi:10.1021/acs.jctc.6b00903
45. Liao R-Z, Himo F, Yu J-G, Liu R-Z. Dipeptide hydrolysis by the dinuclear zinc enzyme human renal dipeptidase: Mechanistic insights from DFT calculations. *J Inorg Biochem.* 2010;104(1):37-46. doi:https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.09.025
46. Noodleman L, Lovell T, Han WG, Li J, Himo F. Quantum Chemical Studies of Intermediates and Reaction Pathways in Selected Enzymes and Catalytic Synthetic Systems. *Chem Rev.* 2004;104(2):459-508. doi:10.1021/cr020625a
47. Minenkov Y, Bistoni G, Riplinger C, Auer AA, Neese F, Cavallo L. Pair natural orbital and canonical coupled cluster reaction enthalpies involving light to heavy alkali and alkaline earth metals: the importance of sub-valence correlation. *Phys Chem Chem Phys.* 2017;19(14):9374-9391. doi:10.1039/C7CP00836H
48. Van Der Kamp MW, Mulholland AJ. Combined quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) methods in computational enzymology. *Biochemistry.* 2013;52(16):2708-2728. doi:10.1021/bi400215w
49. Hirao H, Morokuma K. Insights into the (superoxo)Fe(III)Fe(III) intermediate and reaction mechanism of myo-inositol oxygenase: DFT and ONIOM(DFT:MM) study. *J Am Chem Soc.* 2009;131(47):17206-17214. doi:10.1021/ja905296w
50. A. K. Rappé, C. J. Casewit, K. S. Colwell, W. A. Goddard III WMS. Full Periodic Table Force Field for Molecular Mechanics and Molecular Dynamics Simulations. Published online 1992:10024-10035. doi:10.1021/ja00051a040
51. Lee C, Yang W, Parr RG. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys Rev B.* 1988;37(2):785-

789. doi:10.1103/PhysRevB.37.785
52. Li H, Robertson AD, Jensen JH. Very fast empirical prediction and rationalization of protein pK_a values. *Proteins Struct Funct Genet.* 2005;61(4):704-721. doi:10.1002/prot.20660
53. Meier KK, Rogers MS, Kovaleva EG, Lipscomb JD, Bominaar EL, Münck E. Enzyme Substrate Complex of the H200C Variant of Homoprotocatechuate 2,3-Dioxygenase: Mössbauer and Computational Studies. *Inorg Chem.* 2016;55(12):5862-5870. doi:10.1021/acs.inorgchem.6b00148
54. Sutherlin KD, Liu L V., Lee YM, et al. Nuclear Resonance Vibrational Spectroscopic Definition of Peroxy Intermediates in Nonheme Iron Sites. *J Am Chem Soc.* 2016;138(43):14294-14302. doi:10.1021/jacs.6b07227
55. Emerson JP, Kovaleva EG, Farquhar ER, Lipscomb JD, Que L. Swapping metals in Fe- and Mn-dependent dioxygenases: evidence for oxygen activation without a change in metal redox state. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(21):7347-7352. doi:10.1073/pnas.0711179105
56. Bugg TDH, Lin G. Solving the riddle of the intradiol and extradiol catechol dioxygenases: How do enzymes control hydroperoxide rearrangements? *Chem Commun.* 2001;(11):941-952. doi:10.1039/b100484k
57. Kovaleva EG, Lipscomb JD. Kovaleva-Biochemistry-2008-11168. Published online 2008:3. papers2://publication/uuid/1EDA1101-E274-4F41-83AD-05C617C36B55
58. Kovaleva EG, Lipscomb JD. Versatility of biological non-heme Fe(II) centers in oxygen activation reactions. *Nat Chem Biol.* 2008;4(3):186-193. doi:10.1038/nchembio.71
59. Shu L, Chiou YM, Orville AM, Miller MA, Lipscomb JD, Que L. X-ray Absorption Spectroscopic Studies of the Fe(II) Active Site of Catechol 2,3-Dioxygenase. Implications for the Extradiol Cleavage Mechanism. *Biochemistry.*

- 1995;34(20):6649-6659. doi:10.1021/bi00020a010
60. Roy S, Kästner J. Catalytic Mechanism of Salicylate Dioxygenase: QM/MM Simulations Reveal the Origin of Unexpected Regioselectivity of the Ring Cleavage. *Chem - A Eur J.* 2017;23(37):8949-8962. doi:10.1002/chem.201701286
61. Roy S, Kästner J. Synergistic substrate and oxygen activation in salicylate dioxygenase revealed by QM/MM simulations. *Angew Chemie - Int Ed.* 2016;55(3):1168-1172. doi:10.1002/anie.201506363
62. Christian GJ, Neese F, Ye S. Unravelling the Molecular Origin of the Regiospecificity in Extradiol Catechol Dioxygenases. *Inorg Chem.* 2016;55(8):3853-3864. doi:10.1021/acs.inorgchem.5b02978
63. Thom Vreven, K. Suzie Byun, Istvan Komaromi, Stefan Dapprich, John A. Montgomery, Jr. Keiji Morokuma and MJF. Combining Quantum Mechanics Methods with Molecular Mechanics Methods in ONIOM. Published online 2006:815-826. doi:10.1021/ct050289g
64. FELIU MASERAS KM. Optimization Scheme of Equilibrium Structures and Transition States FELIU MASERAS IMOMM: A New Integrated Ab Initio +. 1995;16(9).
65. Dong G, Shaik S, Lai W. Oxygen activation by homoprotocatechuate 2,3-dioxygenase: A QM/MM study reveals the key intermediates in the activation cycle. *Chem Sci.* 2013;4(9):3624-3635. doi:10.1039/c3sc51147b
66. Hernández-Ortega A, Quesne MG, Bui S, et al. Catalytic Mechanism of Cofactor-Free Dioxygenases and How They Circumvent Spin-Forbidden Oxygenation of Their Substrates. *J Am Chem Soc.* 2015;137(23):7474-7487. doi:10.1021/jacs.5b03836
67. Siegbahn PEM, Haeffner F. Mechanism for catechol ring-cleavage by non-heme iron extradiol dioxygenases. *J Am Chem Soc.* 2004;126(29):8919-8932.

doi:10.1021/ja0493805

68. Davis MI, Wasinger EC, Decker A, et al. Spectroscopic and Electronic Structure Studies of 2,3-Dihydroxybiphenyl 1,2-Dioxygenase: O₂ Reactivity of the Non-Heme Ferrous Site in Extradiol Dioxygenases. *J Am Chem Soc.* 2003;125(5):11214-11227.
69. Macheroux P, Kappes B, Ealick SE. Flavogenomics – a genomic and structural view of flavin-dependent proteins. 2011;2:2625-2634. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08202.x
70. Heine T, Scholtissek A, Hofmann S, Koch R, Tischler D. Accessing Enantiopure Epoxides and Sulfoxides: Related Flavin-Dependent Monooxygenases Provide Reversed Enantioselectivity. *ChemCatChem.* 2020;12(1):199-209. doi:10.1002/cctc.201901353
71. Gibson M, Nur-E-Alam M, Lipata F, Oliveira MA, Rohr J. Characterization of kinetics and products of the Baeyer-Villiger oxygenase MtmOIV, the key enzyme of the biosynthetic pathway toward the natural product anticancer drug mithramycin from *Streptomyces argillaceus*. *J Am Chem Soc.* 2005;127(50):17594-17595. doi:10.1021/ja055750t
72. Baker Dockrey SA, Narayan ARH. Flavin-dependent biocatalysts in synthesis. *Tetrahedron.* 2019;75(9):1115-1121. doi:10.1016/j.tet.2019.01.008
73. Koziol J. Fluorometric Analyses of Riboflavin and Its Coenzymes. *Methods Enzymol.* 1971;18(PB):253-285. doi:10.1016/S0076-6879(71)18089-5
74. Ghisla S, Edmondson DE. Flavin Coenzymes. *Encycl Life Sci.* Published online 2009:1-10. doi:10.1002/9780470015902.a0000654.pub2
75. Kanda M, Brady FO, Rajagopalan K V., Handler P. Studies on the Dissociation Metalloflavoproteins * of Flavin Adenine Dinucleotide from. 1972;(3).
76. Visitsatthawong S, Chenprakhon P, Chaiyen P, Surawatanawong P. Mechanism of Oxygen Activation in a Flavin-Dependent Monooxygenase: A Nearly

- Barrierless Formation of C4a-Hydroperoxyflavin via Proton-Coupled Electron Transfer. Published online 2015. doi:10.1021/jacs.5b04328
77. Huijbers MME, Montersino S, Westphal AH, Tischler D, Berkel WJH Van. Flavin dependent monooxygenases. *Arch Biochem Biophys*. 2014;544:2-17. doi:10.1016/j.abb.2013.12.005
 78. Ballou DP, Entsch B, Cole LJ. Dynamics involved in catalysis by single-component and two-component flavin-dependent aromatic hydroxylases. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;338(1):590-598. doi:10.1016/j.bbrc.2005.09.081
 79. Reis RAG, Li H, Johnson M, Sobrado P. New frontiers in flavin-dependent monooxygenases. *Arch Biochem Biophys*. 2021;699(November 2020):108765. doi:10.1016/j.abb.2021.108765
 80. Gygli G, Lucas MF, Guallar V, van Berkel WJH. The ins and outs of vanillyl alcohol oxidase: Identification of ligand migration paths. *PLoS Comput Biol*. 2017;13(10):1-27. doi:10.1371/journal.pcbi.1005787
 81. Hiromoto T, Fujiwara S, Hosokawa K, Yamaguchi H. Crystal Structure of 3-Hydroxybenzoate Hydroxylase from *Comamonas testosteroni* Has a Large Tunnel for Substrate and Oxygen Access to the Active Site. *J Mol Biol*. 2006;364(5):878-896. doi:10.1016/j.jmb.2006.09.031
 82. Anyanwu VE, Hall SJ. Oxidation of cadaverine by putrescine oxidase from *Rhodococcus erythropolis*. 2021;(April). doi:10.1002/jctb.6851
 83. Thotsaporn K, Chenprakhon P, Sucharitakul J, Mattevi A, Chaiyen P. Stabilization of C4a-hydroperoxyflavin in a two-component flavin-dependent monooxygenase is achieved through interactions at flavin N5 and C4a Atoms. *J Biol Chem*. 2011;286(32):28170-28180. doi:10.1074/jbc.M111.241836
 84. Ruangchan N, Tongsook C, Sucharitakul J, Chaiyen P. pH-dependent studies reveal an efficient hydroxylation mechanism of the oxygenase component of p-

- hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase. *J Biol Chem.* 2011;286(1):223-233. doi:10.1074/jbc.M110.163881
85. Wang J, Ortiz-Maldonado M, Entsch B, Massey V, Ballou D, Gatti DL. Protein and ligand dynamics in 4-hydroxybenzoate hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99(2):608-613. doi:10.1073/pnas.022640199
86. Gatti DL, Palfey BA, Lah MS, et al. The mobile flavin of 4-OH benzoate hydroxylase. *Science* (80-). 1994;266(5182):110-114. doi:10.1126/science.7939628
87. Sucharitakul J, Chaiyen P, Entsch B, Ballou DP. Kinetic mechanisms of the oxygenase from a two-component enzyme, p-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase from *Acinetobacter baumannii*. *J Biol Chem.* 2006;281(25):17044-17053. doi:10.1074/jbc.M512385200
88. Crozier-Reabe K, Moran GR. Form follows function: Structural and catalytic variation in the class a flavoprotein monooxygenases. *Int J Mol Sci.* 2012;13(12):15601-15639. doi:10.3390/ijms131215601
89. Costa DMA, Gómez SV, de Araújo SS, et al. Catalytic mechanism for the conversion of salicylate into catechol by the flavin-dependent monooxygenase salicylate hydroxylase. *Int J Biol Macromol.* 2019;129. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.01.135
90. Richard JP, Amyes TL, Reyes AC. Orotidine 5'-Monophosphate Decarboxylase: Probing the Limits of the Possible for Enzyme Catalysis. *Acc Chem Res.* 2018;51(4):960-969. doi:10.1021/acs.accounts.8b00059
91. Federal U, Gerais DM. Universidade Federal de Minas Gerais Instituto de Ciências Biológicas Departamento de Bioquímica e Imunologia. Published online 2011.
92. Costa DMA, Gómez S V., de Araújo SS, et al. Catalytic mechanism for the conversion of salicylate into catechol by the flavin-dependent monooxygenase

- salicylate hydroxylase. *Int J Biol Macromol*. Published online 2019:#pagerange#. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.01.135
93. Shigeki Takemori, Hiroshi Yasuda, Katsuyoshi Mihara KS, Katagiri and M. Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanazawa University, Kanazawa 920 (Japan). *Biochim Biophys Acta*. 1971;263(1972):272-278.
 94. Muralidhara BK, Chen M, Ma J, Wittung-Stafshede P. Effect of inorganic phosphate on FMN binding and loop flexibility in *Desulfovibrio desulfuricans* apo-flavodoxin. *J Mol Biol*. 2005;349(1):87-97. doi:10.1016/j.jmb.2005.03.054
 95. Bollen YJM, Westphal AH, Lindhoud S, Van Berkel WJH, Van Mierlo CPM. Distant residues mediate picomolar binding affinity of a protein cofactor. *Nat Commun*. 2012;3. doi:10.1038/ncomms2010
 96. Richard JP. Protein Flexibility and Stiffness Enable Efficient Enzymatic Catalysis. *J Am Chem Soc*. 2019;141(8):3320-3331. doi:10.1021/jacs.8b10836
 97. Amyes TL, Richard JP. Enzyme proton transfer at C activation triosephosphate isomerase by phosphite dianion. *Biochemistry*. 2007;46(19):5841-5854. doi:10.1111/j.1365-294X.2009.04380.x
 98. Plapp B V., Charlier HA, Ramaswamy S. Mechanistic implications from structures of yeast alcohol dehydrogenase complexed with coenzyme and an alcohol. *Arch Biochem Biophys*. 2016;591:35-42. doi:10.1016/j.abb.2015.12.009
 99. Kerns SJ, Agafonov R V., Cho YJ, et al. The energy landscape of adenylate kinase during catalysis. *Nat Struct Mol Biol*. 2015;22(2):124-131. doi:10.1038/nsmb.2941
 100. Einarsdottir GH, Stankovich MT, Tu S chun. Studies of Electron-Transfer Properties of Salicylate Hydroxylase from *Pseudomonas cepacia* and Effects of Salicylate and Benzoate Binding. *Biochemistry*. 1988;27(9):3277-3285. doi:10.1021/bi00409a023
 101. Hicks KA, O'Leary SE, Begley TP, Ealick SE. Structural and mechanistic studies

- of HpxO, a novel flavin adenine dinucleotide-dependent urate oxidase from *Klebsiella pneumoniae*. *Biochemistry*. 2013;52(3):477-487. doi:10.1021/bi301262p
102. Enroth C, Neujahr H, Schneider G, Lindqvist Y. The crystal structure of phenol hydroxylase in complex with FAD and phenol provides evidence for a concerted conformational change in the enzyme and its cofactor during catalysis. :605-617.
103. Manenda MS, Picard MÈ, Zhang L, et al. Structural analyses of the Group A flavin-dependent monooxygenase PieE reveal a sliding FAD cofactor conformation bridging out and in conformations. *J Biol Chem*. 2020;295(14):4709-4722. doi:10.1074/jbc.RA119.011212
104. Hayaishi O, Shimazono H, Katagiri M, Saito Y. Enzymatic formation of oxalate and acetate from oxaloacetate. *J Am Chem Soc*. 1956;78(19):5126-5127. doi:10.1021/ja01600a084
105. Ryerson CC, Walsh C, Ballou DP. Kinetic Isotope Effects in the Oxidation of Isotopically Labeled NAD(P)H by Bacterial Flavoprotein Monooxygenases. *Biochemistry*. 1982;21(6):1144-1151. doi:10.1021/bi00535a006
106. Manstein DJ, Pai EF, Schopfer LM, Massey V. Absolute Stereochemistry of Flavins in Enzyme-Catalyzed Reactions. *Biochemistry*. 1986;25(22):6807-6816. doi:10.1021/bi00370a012
107. Montersino S, Orru R, Barendregt A, et al. Crystal structure of 3-hydroxybenzoate 6-hydroxylase uncovers lipid-assisted flavoprotein strategy for regioselective aromatic hydroxylation. *J Biol Chem*. 2013;288(36):26235-26245. doi:10.1074/jbc.M113.479303
108. Derewenda ZS, Lee L, Derewenda U. The Occurrence of C–H · · · O Hydrogen Bonds in Proteins. *J Mol Biol*. 1995;252(2):248-262. doi:https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0492
109. Hicks KA, Leary SEO, Begley TP, Ealick SE. Structural and Mechanistic Studies

- of HpxO , a Novel FAD- dependent Urate Oxidase from *Klebsiella pneumoniae* Structural and Mechanistic Studies of HpxO , a Novel FAD-dependent Urate Oxidase from *Klebsiella pneumoniae* †‡. Published online 2012. doi:10.1021/bi301262p
110. Hempel J, Nicholas H, Lindahl R. Aldehyde dehydrogenases: Widespread structural and functional diversity within a shared framework. *Protein Sci.* 1993;2(11):1890-1900. doi:10.1002/pro.5560021111
 111. Lee SL, Lee YP, Wu ML, et al. Inhibition of human alcohol and aldehyde dehydrogenases by aspirin and salicylate: Assessment of the effects on first-pass metabolism of ethanol. *Biochem Pharmacol.* 2015;95(1):71-79. doi:10.1016/j.bcp.2015.03.003
 112. Laurino P, Tóth-Petróczy Á, Meana-Pañeda R, Lin W, Truhlar DG, Tawfik DS. An Ancient Fingerprint Indicates the Common Ancestry of Rossmann-Fold Enzymes Utilizing Different Ribose-Based Cofactors. *PLoS Biol.* 2016;14(3):1-23. doi:10.1371/journal.pbio.1002396
 113. Jia B, Jia X, Hyun Kim K, Ji Pu Z, Kang MS, Ok Jeon C. Evolutionary, computational, and biochemical studies of the salicylaldehyde dehydrogenases in the naphthalene degradation pathway. *Sci Rep.* 2017;7(November 2016):1-13. doi:10.1038/srep43489
 114. Morgan CA, Hurley TD. Characterization of two distinct structural classes of selective aldehyde dehydrogenase 1A1 inhibitors. *J Med Chem.* 2015;58(4):1964-1975. doi:10.1021/jm501900s
 115. Dayhoff MO. The origin and evolution of protein superfamilies. *Fed Proc.* 1976;35(10):2132-2138.
 116. Riveros-Rosas H, Julián-Sánchez A, Moreno-Hagelsieb G, Muñoz-Clares RA. Aldehyde dehydrogenase diversity in bacteria of the *Pseudomonas* genus. *Chem Biol Interact.* 2019;304(March):83-87. doi:10.1016/j.cbi.2019.03.006

117. Moretti A, Li J, Donini S, Sobol RW, Rizzi M, Garavaglia S. Crystal structure of human aldehyde dehydrogenase 1A3 complexed with NAD⁺ and retinoic acid. *Sci Rep*. 2016;6(October):1-12. doi:10.1038/srep35710
118. Coitinho JB, Pereira MS, Costa DMA, et al. Structural and kinetic properties of the aldehyde dehydrogenase NahF, a broad substrate specificity enzyme for aldehyde oxidation. *Biochemistry*. 2016;55(38). doi:10.1021/acs.biochem.6b00614
119. Liu LK, Tanner JJ. Crystal Structure of Aldehyde Dehydrogenase 16 Reveals Trans-Hierarchical Structural Similarity and a New Dimer. *J Mol Biol*. 2019;431(3):524-541. doi:10.1016/j.jmb.2018.11.030
120. Luo M, Tanner JJ. Structural Basis of Substrate Recognition by Aldehyde Dehydrogenase 7A1. *Biochemistry*. 2015;54(35):5513-5522. doi:10.1021/acs.biochem.5b00754
121. Rossmann MG, Moras D, Olsen KW. Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. *Nature*. 1974;250(5463):194-199. doi:10.1038/250194a0
122. Ni L, Sheikh S, Weiner H. Involvement of glutamate 399 and lysine 192 in the mechanism of human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *J Biol Chem*. 1997;272(30):18823-18826. doi:10.1074/jbc.272.30.18823
123. Moore SA, Baker HM, Blythe TJ, Kitson KE, Kitson TM, Baker EN. Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase: The structure reveals the basis for the retinal specificity of class I aldehyde dehydrogenases. *Structure*. 1998;6(12):1541-1551. doi:10.1016/S0969-2126(98)00152-X
124. Su T, Su J, Liu S, Zhang C, He J, Huang Y. Structural and Biochemical Characterization of BdsA from *Bacillus subtilis* WU-S2B, a Key Enzyme in the "4S" Desulfurization Pathway. 2018;9(February):1-11. doi:10.3389/fmicb.2018.00231

125. De Araújo SS, Neves CML, Guimarães SL, et al. Structural and kinetic characterization of recombinant 2-hydroxymuconate semialdehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida* G7. *Arch Biochem Biophys*. 2015;579(1):8-17. doi:10.1016/j.abb.2015.05.006
126. Bosch R, García-Valdés E, Moore ERB. Complete nucleotide sequence and evolutionary significance of a chromosomally encoded naphthalene-degradation lower pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. *Gene*. 2000;245(1):65-74. doi:10.1016/S0378-1119(00)00038-X
127. King EL, Altman C. A schematic method of deriving the rate laws for enzyme-catalyzed reactions. *J Phys Chem*. 1956;60(10):1375-1378. doi:10.1021/j150544a010
128. Neidhart DJ, Kenyon GL, Gerlt JA, Petsko GA. Mandelate racemase and muconate lactonizing enzyme are mechanistically distinct and structurally homologous. *Nature*. 1990;347(6294):692-694. doi:10.1038/347692a0
129. Koppaka V, Thompson DC, Chen Y, et al. Aldehyde Dehydrogenase Inhibitors: a Comprehensive Review of the Pharmacology, Mechanism of Action, Substrate Specificity, and Clinical Application. Sibley DR, ed. *Pharmacol Rev*. 2012;64(3):520-539. doi:10.1124/pr.111.005538
130. Botts J, Morales M. Analytical description of the effects of modifiers and of enzyme multivalency upon the steady state catalyzed reaction rate. *Trans Faraday Soc*. 1953;49(696):696-707. doi:10.1039/tf9534900696
131. Bauer C, Osman AM, Cercignani G, Gialluca N. A unified theory of enzyme kinetics based upon the systematic analysis of the variations of k_{cat} , K_M , and k_{cat} / K_M and the relevant $\square G^0$ values — possible implications in chemotherapy and biotechnology. 2001;61:1049-1055.
132. Baici A, Schenker P, Wächter M, Rüedi P. 3-Fluoro-2,4-dioxo-3-phosphadecalins as inhibitors of acetylcholinesterase. A reappraisal of kinetic mechanisms and diagnostic methods. *Chem Biodivers*. 2009;6(3):261-282.

doi:10.1002/cbdv.200800334

133. Lee SL, Lee YP, Wu ML, et al. Inhibition of human alcohol and aldehyde dehydrogenases by aspirin and salicylate: Assessment of the effects on first-pass metabolism of ethanol. *Biochem Pharmacol.* 2014;95(1):71-79. doi:10.1016/j.bcp.2015.03.003
134. Singh R, Trivedi VD, Phale PS. Purification and characterization of NAD⁺-dependent salicylaldehyde dehydrogenase from carbaryl-degrading pseudomonas sp. Strain C6. *Appl Biochem Biotechnol.* 2014;172(2):806-819. doi:10.1007/s12010-013-0581-8
135. You IS, Ghosal D, Gunsalus IC. Nucleotide sequence of plasmid NAH7 gene nahR and DNA binding of the nahR product. *J Bacteriol.* 1988;170(12):5409-5415. doi:10.1128/jb.170.12.5409-5415.1988

ANEXO A**--- PROJETO DE DOUTORADO**

Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG
Instituto de Ciências Exatas – ICEX
Departamento de Química

PROJETO DE PESQUISA PARA TESE DE
DOUTORADO

**Abordagem cinética do estudo de enzimas da *Pseudomonas putida*
G7 pertencentes da *via* de degradação de hidrocarbonetos
aromáticos policíclicos**

Área de Concentração: Química Orgânica
Nome do doutorando: Mozart Silvio Pereira
Nome do Orientador: Tiago A. S. Brandão
Nome do Coorientador: Willian R. Rocha

Belo Horizonte – MG
Agosto de 2018

1 Introdução

Este projeto visa mapear as características essenciais de reconhecimento molecular e catálise de enzimas da vida de degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) em bactérias do gênero Pseudomonas. Esses compostos apresentam dois ou mais anéis benzênicos fundidos, sendo o naftaleno um dos principais membros. Eles estão amplamente distribuídos no ambiente.¹ HAPs ocorrem naturalmente durante a combustão incompleta da matéria orgânica no carvão, diesel, madeira e vegetação, também sendo introduzidos no meio ambiente em derramamentos de petróleo e seus derivados, ou ainda, por processos industriais como a liquefação do carvão em alcatrão de hulha.^{2,3}

Esses compostos, por serem hidrofóbicos, possuem baixa solubilidade em água, sendo considerados de difícil remoção do meio ambiente. O acúmulo desses compostos é um problema importante em saúde pública, visto que esses hidrocarbonetos possuem toxicidade elevada nos seres humanos, causando diversos males a saúde, por exemplo, o câncer e a má-formação fetal.⁴ De fato, os HAPs encabeçam a lista da *Priority List* de substâncias perigosas da EPA (*Environmental Protection Agency*, E.U.A.).⁵

Uma estratégia utilizada para a descontaminação ambiental causada por HAPs é a biorremediação, que em linhas gerais consiste em um processo de degradação mediada por microrganismos que reduzem sua concentração e toxicidade.⁶

Dentre os organismos capazes de promover a biorremediação do naftaleno destaca-se as bactérias do gênero *Pseudomonas sp.* que contém um plasmídeo capaz de codificar uma sequência de enzimas que degradam o naftaleno e outros HAPs de modo eficiente.⁷ Na *Pseudomonas putida* cepa G7 (PpG7), de interesse a este projeto, são treze enzimas divididas em duas vias: superior e inferior. A via superior envolve as enzimas que catalisam a conversão do naftaleno em salicilato e a via inferior envolve as enzimas que catalisam a conversão do salicilato em piruvato e acetil coenzima A (Figura 1).⁸

Apesar da via metabólica da PpG7 ser bem descrita, os mecanismos das reações catalisadas pela maioria dessas enzimas, assim como suas estruturas tridimensionais, não estão bem estabelecidas, portanto, o interesse nesse campo de pesquisa é de grande relevância. A compreensão dos mecanismos reacionais de catálise promove uma melhor racionalização para aplicações dessas enzimas em bases tecnológicas, seja na aplicação das enzimas em ambientes contaminados, seja na obtenção de compostos de maior valor comercial por rotas simplificadas.⁹

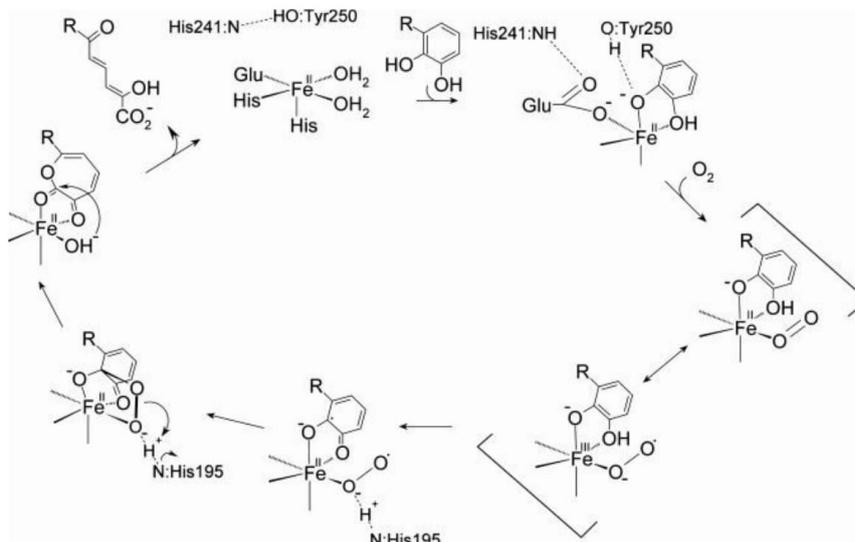


Figura 2. Mecanismo proposto para extradiol dioxigenases, ilustrando o papel de grupos protéicos envolvidos na catálise.¹¹

Devido à peculiaridade da reação catalisada por NahC e a pobre literatura disponível, essa enzima torna-se um vasto campo de pesquisa, motivo que originou inseri-la nesta proposta de trabalho, que visa a compreensão das suas características estruturais e de seu mecanismo de catálise utilizando metodologias experimentais e teóricas. As questões específicas que norteiam esse projeto são:

1. *Clonagem, expressão e purificação da NahC?* O plasmídeo codificante será construído por técnicas de tecnologia do DNA-recombinante. Contudo, caso esta etapa não possa ser atingida por dificuldades inerentes ao método, utilizaremos a enzima análoga DoxG, que será obtida de plasmídeo já disponível ao grupo;
2. *Quais são as condições ótimas para a atividade catalítica de NahC (ou DoxG)?* Estudos cinéticos visarão a determinação das constantes K_m e k_{cat} para 1,2- dihidroxinaftaleno e oxigênio molecular;
3. *Aplicar métodos teóricos para avaliar o mecanismo de catálise de extradiol dioxigenases da mesma família da NahC.* A metodologia teórica QM/MM será aplicada para explorar as etapas apresentadas na Figura 2.

As questões expostas acima referem aos aspectos mais importantes que norteiam este projeto referente a NahC. As respostas a estas questões devem promover uma compreensão mais aprofundada do mecanismo de catálise das extradiol dioxigenases.

No que concerne a NahG, sabe-se que esta enzima faz parte da família das oxidoreductases FAD-dependentes.¹² A NahG catalisa a conversão do salicilato em catecol ao custo de oxigênio molecular e NADH. Estudos cinéticos mostram que a atividade ótima para $\log k_{cat}$ ocorre entre os valores de pH de 8 e 8,5. Os resultados obtidos pelo grupo permitiram a caracterização do mecanismo enzimático da NahG (Figura 3).

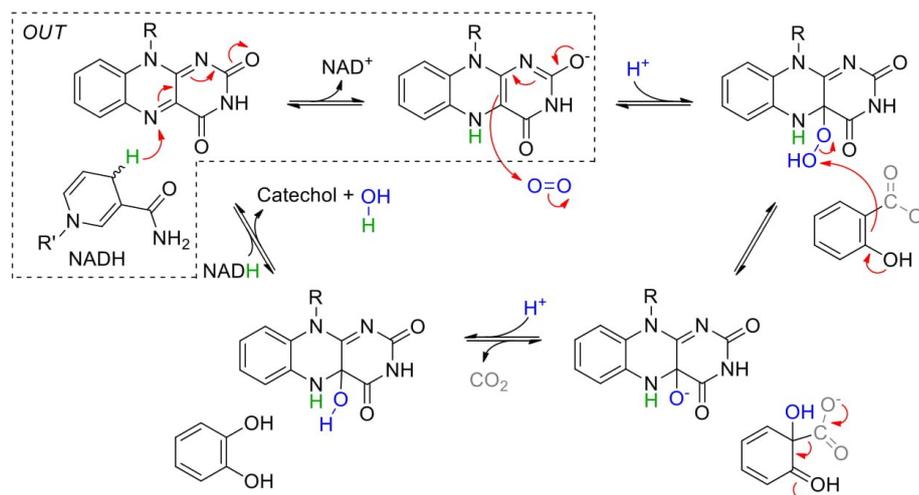


Figura 3. Mecanismo catalítico proposto para a conversão de salicilato em catecol pela enzima NahG.

Estas observações, juntamente com outros estudos da literatura,¹³ levaram a novos questionamentos em relação a função dos cofatores FAD e NADH. As questões que guiam este projeto no que refere a tal problemática são:

1. A NahG possui atividade catalítica com outro cofator diferente do FAD? Para isso, outras flavinas (riboflavina e FMN) serão aplicadas;
2. O papel do NADH se resume a redução do FAD? Estudos cinéticos mostram que o NAD⁺, produto da oxidação do NADH por FAD, permanece ligado ao complexo enzima-substrato.¹⁴ Nosso interesse é avaliar a razão deste comportamento;
3. Outro agente, além do NADH, pode ser utilizado na redução do FAD ou alternativas podem ser aplicadas para regenerar o NADH? Visto que o cofator NADH é necessário na redução do FAD, são necessárias alternativas para reduzir o FAD ou regenerar o NADH utilizado. Um modo alternativo para a redução do FAD em flavoproteínas tem sido a fotoredução, aplicada diretamente ou mediada por diversos compostos orgânicos.¹⁵

As respostas as questões acima devem auxiliar na busca pela comprovação do mecanismo de catálise da NahG.

Por fim, as últimas duas enzimas que serão estudadas neste projeto são a salicilaldeído desidrogenase (NahF) e a 2-hidroxiacetoaldeído desidrogenase (NahI). Ambas as enzimas fazem parte da superfamília das aldeído desidrogenases, são dependentes de cofator NAD^+ e catalisam a oxidação de aldeídos para seus respectivos carboxilatos. O mecanismo de reação das enzimas pertencentes à essa família é conhecido e está apresentado na Figura 4.¹⁶

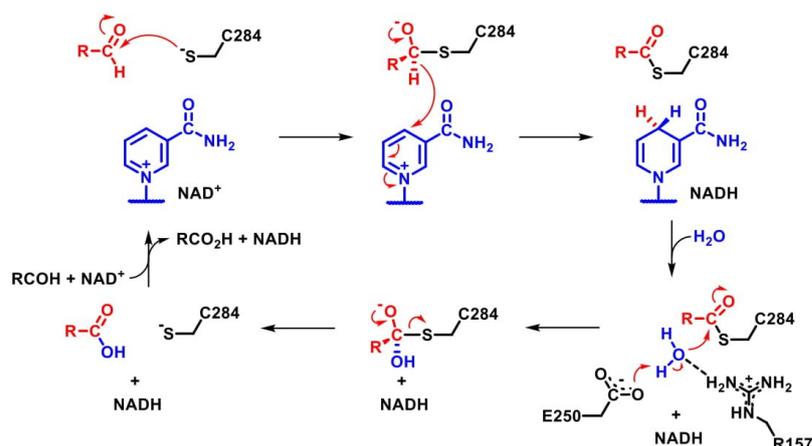


Figura 4. Mecanismo proposto para enzimas da superfamília das aldeído desidrogenases. A numeração dos resíduos de aminoácidos refere a NahF.¹⁶

O fato da via de degradação do naftaleno utilizar duas enzimas que desempenham o mesmo papel causou interesse do grupo, principalmente porque estudos prévios do grupo mostram que a NahF catalisa a oxidação do substrato da NahI. Os questionamentos desta parte do projeto são:

1. *Há uma forma de controle que permite que a NahI continue ativa mesmo quando a NahF está inibida?* Inibidores comuns de enzimas em vias metabólicas são seus próprios produtos. Nosso interesse é avaliar a inibição da NahF e NahI por salicilato, uma molécula central da via de degradação do naftaleno, e outros produtos da via;
2. *Se houver, qual o tipo de inibição?* Avaliar cineticamente o efeito dos inibidores sobre as reações catalisadas por NahF e NahI. Se possível, confrontar os dados cristalográficos e “docking” molecular;

As respostas para as questões levantadas neste projeto de pesquisa ajudarão na melhor compreensão da via de degradação do naftaleno e do papel de cada uma das enzimas na rota metabólica de biorremediação do naftaleno.

2 Proposta de Trabalho

Para a enzima NahC, o projeto visa o estudo das suas características básicas, bem como, um estudo mais aprofundado sobre os mecanismos de inserção do oxigênio molecular no substrato. A parte prática do projeto focará principalmente em estudos cinéticos. Em relação a parte teórica, o projeto aplicará cálculos de QM e QM/MM, além de “docking molecular” para avaliar a interação de substratos e o mecanismo reacional. As etapas específicas do projeto são:

1. clonagem do gene de NahC *PpG7* em vetor pET, expressão da NahC-6xHis em células competentes e purificação através de técnicas cromatográficas de afinidade utilizando resina Ni-NTA. A caracterização da enzima será feita através de eletroforese em gel, técnicas cromatográficas e espectroscópicas;
2. medir cineticamente a conversão do substrato 1,2-dihidroinaftaleno em 2-hidroxi-2H-cromeno-2-carboxilato e determinar os parâmetros cinéticos K_m e k_{cat} para o substrato e oxigênio molecular;
3. avaliar a reação em diferentes pHs para determinação do pK_a de grupos envolvidos na catálise, no mecanismo de reação enzimática por meio de um perfil de pH;
4. realizar estudos teóricos QM e QM/MM para modelar as espécies envolvidas no mecanismo de catálise e como sua reatividade corrobora os dados experimentais;

Para a enzima NahG, o projeto visa um estudo mais aprofundado sobre os mecanismos de redução do FAD por NADH e da reação do produto formado com oxigênio molecular. O estudo desses mecanismos será realizado por técnicas cinéticas e os intermediários e produtos serão identificados por técnicas espectroscópicas. As etapas serão:

1. Avaliar do uso de cofatores truncados do FAD: riboflavina, riboflavina mais AMP (adenosina monofosfato) e riboflavina mais ADP (adenosina trifosfato);
2. Avaliar o sítio de ligação do FAD utilizando mutações de sítio-dirigidas;
3. Avaliar o potencial de fotoredução do FAD. Isto será importante para substituir o NADH que é um cofator de elevado custo;
4. Estabelecer qual é a região de ligação e a importância do NADH e NAD^+ no mecanismo de catálise.

No que refere a última parte. O projeto tem como foco estabelecer um comparativo entre as enzimas NahF e NahI, pertencentes à mesma família. Essa parte do trabalho envolverá as seguintes etapas:

1. Avaliar a possível inibição das enzimas NahF e NahI pelo salicilato, e estabelecer o modelo cinético que rege o tipo de inibição observado para a(s)enzima(s).
2. Comparar as constantes cinéticas obtidas da NahI com as constantes reportadas para a NahF, de forma a entender a função de cada enzima no metabolismo da *Pseudomonas putida*;

3 Metodologia

Para alcançar os objetivos propostos, os trabalhos serão conduzidos permeando duas áreas específicas: Físico-Química Orgânica e Biologia Molecular. As principais metodologias que serão utilizadas são apresentadas a seguir:

Clonagem, expressão e purificação da NahC: Os genes serão obtidos por técnicas de clonagem a partir do DNA de *Pseudomonas putida* G7 e inseridos no vetor plasmidial pET.¹² O sucesso da clonagem será avaliado por meio de sequenciamento genético. As proteínas serão expressas de modo a apresentar uma cauda com seis resíduos de histidina (cauda 6xHis) e poderão ser purificadas por cromatografia de afinidade. A caracterização utilizará técnicas básicas: SDS-PAGE, gel filtração, espectroscopia UV-Vis, fluorescência, dicroísmo circular e EPR.^{17,18}

Estudos cinéticos em diferentes pHs: As cinéticas serão acompanhadas por espectroscopia UV-Vis em diferentes concentrações de substratos. Ajuste dos dados com o modelo de Michaelis-Menten proverá os parâmetros k_{cat} e K_m . Os dados de $\log k_{cat}$ e $\log(k_{cat}/K_m)$ em diferentes pHs permitirão determinar o pK_a de grupos envolvidos na catálise.

Estudos de QM e QM/MM: Os cálculos iniciais serão do tipo QM com nível de teoria DFT e função de base B3LYP com conjunto de bases auxiliares def2-TZVP. Em seguida, serão aplicados cálculos QM/MM com nível de teoria da camada quântica DFT B3LYP e camada clássica com campo de força UFF. Dessa forma, pretende-se estabelecer um comparativo entre as duas técnicas aplicadas. Os dados teóricos obtidos contribuirão para a modelagem dos intermediários reacionais no mecanismo de catálise das extradiol dioxigenases.

Estudos cinéticos da NahG na presença de riboflavina: As cinéticas serão acompanhadas por espectroscopia UV-Vis em diferentes concentrações de cofatores truncados. O Ajuste dos dados serão com o modelo de Michaelis-Menten. Os parâmetros cinéticos obtidos com a riboflavina ajudarão na melhor interpretação da extensão de estabilização da holoenzima.

Fotoativação da NahG: O sistema contendo tampão enzima, substrato e FAD será irradiado por luz visível e a reação será acompanhada em diferentes tempos de irradiação por meio de técnicas espectroscópicas. Com isso, verificar a viabilidade da fotoativação do FAD.

Estudos cinéticos das enzimas NahF e NahI na presença do salicilato: As cinéticas enzimáticas serão acompanhadas por espectroscopia UV-Vis em diferentes concentrações de inibidor. A possível alteração na velocidade reacional em diferentes concentrações de inibidor indicará o tipo de inibição que a(s) enzima(s) sofre(m) com a presença do salicilato.

4 Cronograma

Atividades	Semestre (48 meses)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1. Cumprimento das matérias obrigatórias	x	x	x	x				
2. Pesquisa científica								
a. Levantamento e atualização bibliográfica	x	x	x	x	x	x	x	x
b. Clonagem, expressão e purificação da NahC	x	x	x		x	x		
c. Experimentos cinéticos em diferentes pHs			x	x	x			
d. Cálculos computacionais		x	x	x	x	x		
e. Expressão e purificação da NahG nativa e mutantes			x					
f. Estudos da NahG com cofatores análogos ao FAD			x	x	x	x		
g. Ensaio cinéticos como os mutantes da NahG						x	x	
h. Expressão e purificação de NahF e NahI nativas		x				x		
i. Ensaio cinéticos como as enzimas NahF e NahI			x	x		x	x	
3. Exame de Qualificação (24º mês)				x				
4. Apresentação de seminário departamental (36º mês)						x		
5. Participação em eventos e publicação de artigos científicos				x		x	x	x
6. Redação da tese								x
7. Defesa da tese de doutorado (48º mês)								x

5 Justificativa de coorientação

O desenvolvimento deste projeto terá a coorientação do Prof. Willian Ricardo Rocha, docente deste programa de Pós-Graduação. O Prof. Willian é especialista em estudos teóricos que modelam sítios enzimáticos, com experiência e com estrutura disponível para as etapas que envolvem os cálculos computacionais deste projeto. A contribuição do professor Willian no desenvolvimento deste projeto é, portanto, imprescindível.

Referências Bibliográficas

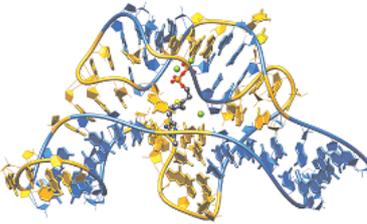
- 1) Habe, H.; Omori, T. *Biosci., Biotechnol., Biochem*, 2003, 67.2: 225-243.
- 2) Bamforth, S. M.; Singleton, I. *J Chem Technol Biotechnol*, 2005, 80.7: 723-736.
- 3) Peng R.H.; Xiong A.S.; Xue Y.; Fu X.Y.; Gao F.; Zhao W.; Tian Y.S.; Yao Q.H. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2008, 32.6: 927-955.
- 4) Harvey, R.G.. *CUP Archive*, 1991.
- 5) Agency, U. S. E. P. Priority Pollutants. [Online Early Access]. Accessed Online: 30 de Junho, 2017. <http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/pollutants.cfm>
- 6) Fernández M.; Niqui-Arroyo J. L.; Conde S.; Ramos J. L.; Duqueb E. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012, 78.15: 5104-5110.
- 7) Kanaly, R. A.; Harayama, S. *J. bacterial.*, 2000, 182.8: 2059- 2067.
- 8) Van hamme, J. D.; Singh, A.; Ward, O. P. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 2003, 67.4: 503- 549.
- 9) Hult, K.; Berglund, P. *Trends Biotechnol.*, 2007, 25.5: 231-238.
- 10) Vaillancourt, F. H.; Bolin, J. T.; Eltis, L. D. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2006, 41.4: 241-267.
- 11) Bugg, T. D. H; Lin, G. *Chem. Com.* 2001, 11: 941-952.
- 12) Suzuki, K.; Mizuguchi, M.; Ohnishi, K.; Itagaki, E. *Biochim. Biophys. Acta*, 1996, 1275.
- 13) Ballou, D. P.; Entsch, B.; Cole, L. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, 338, 590.
- 14) Carneiro, F. R.; Silvia, T. C.; Alves, A. C.; Haline-vaz, T.; Gozzo, F. C.; Zanchin, N. I. *Biochem. and biophys. r. com.*, 2006, 343, 260-268.
- 15) Takemori, S.; Yasuda, H.; Mihara, K.; Suzuki, K.; Katagiri, M. *Biochim. Biophys. Acta* 1969, 191, 69.
- 16) Coitinho, J. B.; Pereira, M. S.; Costa, D. M. A.; Guimarães, S. L.; Araújo, S. S.; Hengge, A. C.; Brandão, T. A. S.; Nagem, R. A. P. *Biochem.* 2016, 55 (38).
- 17) Scopes, R. K. Protein Purification Principles and Practice 3rd Edition (Cantor CR ed) pp. 270-277 Springer-Verlag. *New York*, 1994.
- 18) Berg, J. M; Stryer, L.; Tymoczko, J. L. *Bioquímica*. Reverté, 2007.
- 19) Williams, A. *Free energy relationships in organic and bio-organic chemistry*. Royal Society of Chemistry, 2003.
- 20) Emerson, J. P.; Kovaleva, E. G.; Farquhar, E. R.; Lipscomb, J. D.; Que, L. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008 105, 7347-7352.

ANEXO B PARTICIPAÇÃO DE CONGRESSOS E MINICURSOS

IX Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos 0261



Agosto
2018
www.emsb.lncc.br



CERTIFICADO

Mozart Silvio Pereira

A comissão organizadora certifica que foi apresentado na forma de pôster, na **IX Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos**, realizada no período de 20 a 24 de agosto de 2018 no Laboratório Nacional de Computação Científica LNCC/MCTIC, o trabalho **Simulação QM do sítio ativo de uma extradiol ferro dependente da via de degradação do naftaleno.**



Laurent E. Dardenne
P/ Comissão Organizadora

Petrópolis, 24 de agosto de 2018



Abimael Fernando Dourado Loula
Coordenador da Pós-Graduação e Aperfeiçoamento - COPGA
PO 787/2017





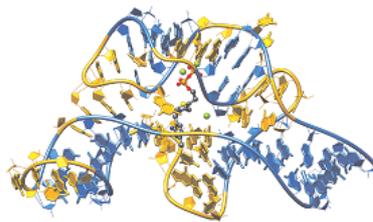


Laboratório Nacional de Computação Científica
Av. Getúlio Vargas, 333 - Quitandinha - Petrópolis, RJ
Tel.: 24 2233-6150 - www.lncc.br




IX Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos

9 EMSB
LNCC, de 20 a 24
Agosto | **2018**
www.emsb.lncc.br



Registro no CAPES sob o número 31036015001

Registro nº.: 1989 - Folha: 45 - Livro: 2

CERTIFICADO**Mozart Silvio Pereira**

Participou na **IX Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos**, realizada no período de 20 a 24 de agosto de 2018, no Laboratório Nacional de Computação Científica - LNCC/MCTIC, do minicurso prático com 06 horas de duração,

Simulações de Dinâmica Molecular.

Petrópolis, 24 de agosto de 2018


Laurent E. Dardenne
P/ Comissão Organizadora


Abimael Fernando Dourado Loula
Coordenador da Pós-Graduação e Aperfeiçoamento - COPGA
PO 787/2017



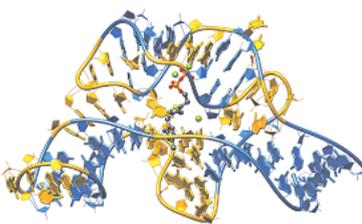
Laboratório Nacional de Computação Científica
Av. Getúlio Vargas, 333 - Quitandinha - Petrópolis, RJ
Tel.: 24 2233-6150 - www.lncc.br



MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES

IX Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos

9 EMSB
LNCC, de 20 a 24
Agosto | **2018**
www.emsb.lncc.br



Registro no CAPES sob o número 31036015001

Registro nº.: 2022 - Folha: 47 - Livro: 2

CERTIFICADO**Mozart Silvio Pereira**

Participou na **IX Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos**, realizada no período de 20 a 24 de agosto de 2018, no Laboratório Nacional de Computação Científica - LNCC/MCTIC, do minicurso prático com 06 horas de duração,

MÉTODOS DE DOCKING RECEPTOR-LIGANTE.

Petrópolis, 24 de agosto de 2018


Laurent E. Dardenne
P/ Comissão Organizadora


Abimael Fernando Dourado Loula
Coordenador da Pós-Graduação e Aperfeiçoamento - COPGA
PO 787/2017



Laboratório Nacional de Computação Científica
Av. Getúlio Vargas, 333 - Quitandinha - Petrópolis, RJ
Tel.: 24 2233-6150 - www.lncc.br



MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES

ANEXO C --- PUBLICAÇÕES



Catalytic mechanism for the conversion of salicylate into catechol by the flavin-dependent monooxygenase salicylate hydroxylase^{a,b}

Débora M.A. Costa ^{a,1}, Stefanya V. Gómez ^{b,1}, Simara S. de Araújo ^a, Mozart S. Pereira ^a, Rosemeire B. Alves ^a, Denize C. Favaro ^a, Alvan C. Hengge ^a, Ronaldo A.P. Nagern ^{a,c}, Tiago A.S. Brandão ^{a,d}

^a Departamento de Biologia e Fisiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil
^b Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil
^c Instituto de Química, Universidade Federal de Campina Grande, CP 50071-570, Brazil
^d Department of Chemistry and Biochemistry, East Tennessee State University, Japan, TN 37602-3206, USA

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 19 October 2018
 Received in revised form 24 January 2019
 Accepted 24 January 2019
 Available online 03 January 2019

Keywords:
 Pseudomonas putida C7
 salicylate hydroxylase
 NADH
 Mechanism
 Crystal structure

ABSTRACT

Salicylate hydroxylase (SalH) is a flavin-dependent monooxygenase that catalyzes the decarboxylative hydroxylation of salicylate into catechol in the naphthalene degradation pathway in *Pseudomonas putida* C7. We explored the mechanism of action of this enzyme in detail using a combination of structural and biophysical methods. SalH shares many structural and mechanistic features with other versatile flavin-dependent monooxygenases, with potential biocatalytic applications. The crystal structure at 2.6 Å resolution for the apo form of SalH adds a new insight regarding the FAD binding in flavin-dependent monooxygenases. The $K_{m,cat}$ for the salicylate reaction catalyzed by SalH increases to 10^4 fold at pH 8.5 and 10 °C. Kinometric plots for $K_{m,cat}$ using substrates with salicylate substrate change in carboxylate and electron-withdrawing groups show the hydroxylation of salicylate by SalH requires a Wheland-like intermediate, whereas the decarboxylation of this intermediate is faster for electron-withdrawing groups. The mechanism is supported by structural data and kinetic studies in different pH. The salicylate carboxyl group lies near a hydrophobic region that aids decarboxylation. A conserved histidine residue is proposed to assist the reaction by general base/general acid catalysis.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Salicylate hydroxylase (SalH, EC 1.14.13.1) is a flavin-dependent monooxygenase that catalyzes the decarboxylative hydroxylation of salicylate into catechol, CO₂, and water with stoichiometric consumption of NADH and O₂ [Schirmer 1] [1]. This reaction links the upper and lower pathways of naphthalene degradation by soil *Pseudomonas* [2], a bacterial genus encompassing many species that can use naphthalene or salicylate as sole carbon sources [3–5].

A number of SalH genes and encoded proteins have been identified in several naphthalene-degrading strains, such as *P. putida* C7 [6,7], which harbors the archetypic catalytic domain NADH [8]. *P. putida* 1-1

[9–11], *P. putida* K2715 [12], *P. stutzeri* AN10 [13], whose dissimilatory genes are chromosomally encoded [14], and *Pseudomonas* sp. ND6 [15], among others [16]. Other salicylate hydroxylase genes situated outside, but in close proximity, to the transcriptional unit forming the naphthalene degradation lower pathway, i.e. *nahW* and *nahL*, have been reported for *P. stutzeri* AN10 [17,18] and *Pseudomonas* sp. ND6 [19], respectively. Interestingly, the coexistence of the classic SalH with NahW was shown to improve cell growth in salicylate-supplemented media [17]. The structure and catalytic mechanism of NahW and NahL are unknown. NahL is the most studied salicylate hydroxylase, though poorly understood.

NahL hydroxylates and decarboxylates the substrate at the same aromatic carbon atom (para substitution) [17,20], an exquisite feature that is remarkable from a synthetic perspective. NahL is one of the few examples of a flavin enzyme that catalyzes an ortho hydroxylation relative to the substrate's phenol group, which is usually required for efficient catalysis. Other monooxygenases exhibit different regioselectivities. For example, the oxidative decarboxylation of 6-hydroxynicotinate catalyzed by 6-hydroxynicotinate 3-monooxygenase (Nac3O) occurs para to the substrate phenol group [1]. In the reaction catalyzed by 3-hydroxybenzoate 6-hydroxylase [3H6H], which the substrate

Abbreviations: SalH, salicylate hydroxylase; NahL, NahL; monooxygenase; NADH, nicotinamide adenine dinucleotide; SalH, salicylate hydroxylase; NADH, nicotinamide adenine dinucleotide.

^a Corresponding author. E-mail: tiago.brandao@ufmg.br (T.A.S. Brandão).

^b Equal authors. E-mail: stefanya.gomez@ufmg.br (S.V. Gómez).

^c Equal authors. E-mail: ronaldo.nagern@ufmg.br (R.A.P. Nagern).

^d Equal authors. E-mail: debora.m.a.costa@ufmg.br (D.M.A. Costa).

^e Equal authors. E-mail: denize.favaro@ufmg.br (D.C. Favaro).

^f Equal authors. E-mail: alvan.hengge@ufmg.br (A.C. Hengge).

^g Equal authors. E-mail: mozart.pereira@ufmg.br (M.S. Pereira).

^h Equal authors. E-mail: rosemeire.alves@ufmg.br (R.B. Alves).

ⁱ Equal authors. E-mail: debora.m.a.costa@ufmg.br (D.M.A. Costa).

^j Equal authors. E-mail: denize.favaro@ufmg.br (D.C. Favaro).

^k Equal authors. E-mail: alvan.hengge@ufmg.br (A.C. Hengge).

^l Equal authors. E-mail: mozart.pereira@ufmg.br (M.S. Pereira).

^m Equal authors. E-mail: rosemeire.alves@ufmg.br (R.B. Alves).

ⁿ Equal authors. E-mail: debora.m.a.costa@ufmg.br (D.M.A. Costa).

^o Equal authors. E-mail: denize.favaro@ufmg.br (D.C. Favaro).

^p Equal authors. E-mail: alvan.hengge@ufmg.br (A.C. Hengge).

^q Equal authors. E-mail: mozart.pereira@ufmg.br (M.S. Pereira).

^r Equal authors. E-mail: rosemeire.alves@ufmg.br (R.B. Alves).

^s Equal authors. E-mail: debora.m.a.costa@ufmg.br (D.M.A. Costa).

^t Equal authors. E-mail: denize.favaro@ufmg.br (D.C. Favaro).

^u Equal authors. E-mail: alvan.hengge@ufmg.br (A.C. Hengge).

^v Equal authors. E-mail: mozart.pereira@ufmg.br (M.S. Pereira).

^w Equal authors. E-mail: rosemeire.alves@ufmg.br (R.B. Alves).

^x Equal authors. E-mail: debora.m.a.costa@ufmg.br (D.M.A. Costa).

^y Equal authors. E-mail: denize.favaro@ufmg.br (D.C. Favaro).

^z Equal authors. E-mail: alvan.hengge@ufmg.br (A.C. Hengge).

^{aa} Equal authors. E-mail: mozart.pereira@ufmg.br (M.S. Pereira).

^{ab} Equal authors. E-mail: rosemeire.alves@ufmg.br (R.B. Alves).

^{ac} Equal authors. E-mail: debora.m.a.costa@ufmg.br (D.M.A. Costa).

^{ad} Equal authors. E-mail: denize.favaro@ufmg.br (D.C. Favaro).

^{ae} Equal authors. E-mail: alvan.hengge@ufmg.br (A.C. Hengge).

^{af} Equal authors. E-mail: mozart.pereira@ufmg.br (M.S. Pereira).

^{ag} Equal authors. E-mail: rosemeire.alves@ufmg.br (R.B. Alves).

^{ah} Equal authors. E-mail: debora.m.a.costa@ufmg.br (D.M.A. Costa).

^{ai} Equal authors. E-mail: denize.favaro@ufmg.br (D.C. Favaro).

^{aj} Equal authors. E-mail: alvan.hengge@ufmg.br (A.C. Hengge).

^{ak} Equal authors. E-mail: mozart.pereira@ufmg.br (M.S. Pereira).

^{al} Equal authors. E-mail: rosemeire.alves@ufmg.br (R.B. Alves).

^{am} Equal authors. E-mail: debora.m.a.costa@ufmg.br (D.M.A. Costa).

^{an} Equal authors. E-mail: denize.favaro@ufmg.br (D.C. Favaro).

^{ao} Equal authors. E-mail: alvan.hengge@ufmg.br (A.C. Hengge).

^{ap} Equal authors. E-mail: mozart.pereira@ufmg.br (M.S. Pereira).

^{aq} Equal authors. E-mail: rosemeire.alves@ufmg.br (R.B. Alves).

^{ar} Equal authors. E-mail: debora.m.a.costa@ufmg.br (D.M.A. Costa).

^{as} Equal authors. E-mail: denize.favaro@ufmg.br (D.C. Favaro).

^{at} Equal authors. E-mail: alvan.hengge@ufmg.br (A.C. Hengge).

^{au} Equal authors. E-mail: mozart.pereira@ufmg.br (M.S. Pereira).

^{av} Equal authors. E-mail: rosemeire.alves@ufmg.br (R.B. Alves).

^{aw} Equal authors. E-mail: debora.m.a.costa@ufmg.br (D.M.A. Costa).

^{ax} Equal authors. E-mail: denize.favaro@ufmg.br (D.C. Favaro).

^{ay} Equal authors. E-mail: alvan.hengge@ufmg.br (A.C. Hengge).

^{az} Equal authors. E-mail: mozart.pereira@ufmg.br (M.S. Pereira).

^{ba} Equal authors. E-mail: rosemeire.alves@ufmg.br (R.B. Alves).

^{bb} Equal authors. E-mail: debora.m.a.costa@ufmg.br (D.M.A. Costa).

^{bc} Equal authors. E-mail: denize.favaro@ufmg.br (D.C. Favaro).

^{bd} Equal authors. E-mail: alvan.hengge@ufmg.br (A.C. Hengge).

^{be} Equal authors. E-mail: mozart.pereira@ufmg.br (M.S. Pereira).

^{bf} Equal authors. E-mail: rosemeire.alves@ufmg.br (R.B. Alves).

^{bg} Equal authors. E-mail: debora.m.a.costa@ufmg.br (D.M.A. Costa).

^{bh} Equal authors. E-mail: denize.favaro@ufmg.br (D.C. Favaro).

^{bi} Equal authors. E-mail: alvan.hengge@ufmg.br (A.C. Hengge).

^{bj} Equal authors. E-mail: mozart.pereira@ufmg.br (M.S. Pereira).

^{bk} Equal authors. E-mail: rosemeire.alves@ufmg.br (R.B. Alves).

^{bl} Equal authors. E-mail: debora.m.a.costa@ufmg.br (D.M.A. Costa).

^{bm} Equal authors. E-mail: denize.favaro@ufmg.br (D.C. Favaro).

^{bn} Equal authors. E-mail: alvan.hengge@ufmg.br (A.C. Hengge).

^{bo} Equal authors. E-mail: mozart.pereira@ufmg.br (M.S. Pereira).

^{bp} Equal authors. E-mail: rosemeire.alves@ufmg.br (R.B. Alves).

^{bq} Equal authors. E-mail: debora.m.a.costa@ufmg.br (D.M.A. Costa).

^{br} Equal authors. E-mail: denize.favaro@ufmg.br (D.C. Favaro).

^{bs} Equal authors. E-mail: alvan.hengge@ufmg.br (A.C. Hengge).

^{bt} Equal authors. E-mail: mozart.pereira@ufmg.br (M.S. Pereira).

^{bu} Equal authors. E-mail: rosemeire.alves@ufmg.br (R.B. Alves).

^{bv} Equal authors. E-mail: debora.m.a.costa@ufmg.br (D.M.A. Costa).

^{bw} Equal authors. E-mail: denize.favaro@ufmg.br (D.C. Favaro).

^{bx} Equal authors. E-mail: alvan.hengge@ufmg.br (A.C. Hengge).

^{by} Equal authors. E-mail: mozart.pereira@ufmg.br (M.S. Pereira).

^{bz} Equal authors. E-mail: rosemeire.alves@ufmg.br (R.B. Alves).

^{ca} Equal authors. E-mail: debora.m.a.costa@ufmg.br (D.M.A. Costa).

^{cb} Equal authors. E-mail: denize.favaro@ufmg.br (D.C. Favaro).

^{cc} Equal authors. E-mail: alvan.hengge@ufmg.br (A.C. Hengge).

^{cd} Equal authors. E-mail: mozart.pereira@ufmg.br (M.S. Pereira).

^{ce} Equal authors. E-mail: rosemeire.alves@ufmg.br (R.B. Alves).

^{cf} Equal authors. E-mail: debora.m.a.costa@ufmg.br (D.M.A. Costa).

^{cg} Equal authors. E-mail: denize.favaro@ufmg.br (D.C. Favaro).

^{ch} Equal authors. E-mail: alvan.hengge@ufmg.br (A.C. Hengge).

^{ci} Equal authors. E-mail: mozart.pereira@ufmg.br (M.S. Pereira).

^{cj} Equal authors. E-mail: rosemeire.alves@ufmg.br (R.B. Alves).

^{ck} Equal authors. E-mail: debora.m.a.costa@ufmg.br (D.M.A. Costa).

^{cl} Equal authors. E-mail: denize.favaro@ufmg.br (D.C. Favaro).

^{cm} Equal authors. E-mail: alvan.hengge@ufmg.br (A.C. Hengge).

^{cn} Equal authors. E-mail: mozart.pereira@ufmg.br (M.S. Pereira).

^{co} Equal authors. E-mail: rosemeire.alves@ufmg.br (R.B. Alves).

^{cp} Equal authors. E-mail: debora.m.a.costa@ufmg.br (D.M.A. Costa).

^{cq} Equal authors. E-mail: denize.favaro@ufmg.br (D.C. Favaro).

^{cr} Equal authors. E-mail: alvan.hengge@ufmg.br (A.C. Hengge).

^{cs} Equal authors. E-mail: mozart.pereira@ufmg.br (M.S. Pereira).

^{ct} Equal authors. E-mail: rosemeire.alves@ufmg.br (R.B. Alves).

^{cu} Equal authors. E-mail: debora.m.a.costa@ufmg.br (D.M.A. Costa).

^{cv} Equal authors. E-mail: denize.favaro@ufmg.br (D.C. Favaro).

^{cw} Equal authors. E-mail: alvan.hengge@ufmg.br (A.C. Hengge).

^{cx} Equal authors. E-mail: mozart.pereira@ufmg.br (M.S. Pereira).

^{cy} Equal authors. E-mail: rosemeire.alves@ufmg.br (R.B. Alves).

^{cz} Equal authors. E-mail: debora.m.a.costa@ufmg.br (D.M.A. Costa).

^{ca} Equal authors. E-mail: denize.favaro@ufmg.br (D.C. Favaro).

^{cb} Equal authors. E-mail: alvan.hengge@ufmg.br (A.C. Hengge).

^{cc} Equal authors. E-mail: mozart.pereira@ufmg.br (M.S. Pereira).

^{cd} Equal authors. E-mail: rosemeire.alves@ufmg.br (R.B. Alves).

^{ce} Equal authors. E-mail: debora.m.a.costa@ufmg.br (D.M.A. Costa).

^{cf} Equal authors. E-mail: denize.favaro@ufmg.br (D.C. Favaro).

^{cg} Equal authors. E-mail: alvan.hengge@ufmg.br (A.C. Hengge).

^{ch} Equal authors. E-mail: mozart.pereira@ufmg.br (M.S. Pereira).

^{ci} Equal authors. E-mail: rosemeire.alves@ufmg.br (R.B. Alves).

^{cj} Equal authors. E-mail: debora.m.a.costa@ufmg.br (D.M.A. Costa).

^{ck} Equal authors. E-mail: denize.favaro@ufmg.br (D.C. Favaro).

^{cl} Equal authors. E-mail: alvan.hengge@ufmg.br (A.C. Hengge).

^{cm} Equal authors. E-mail: mozart.pereira@ufmg.br (M.S. Pereira).

^{cn} Equal authors. E-mail: rosemeire.alves@ufmg.br (R.B. Alves).

^{co} Equal authors. E-mail: debora.m.a.costa@ufmg.br (D.M.A. Costa).

^{cp} Equal authors. E-mail: denize.favaro@ufmg.br (D.C. Favaro).

^{cq} Equal authors. E-mail: alvan.hengge@ufmg.br (A.C. Hengge).

^{cr} Equal authors. E-mail: mozart.pereira@ufmg.br (M.S. Pereira).

^{cs} Equal authors. E-mail: rosemeire.alves@ufmg.br (R.B. Alves).

^{ct} Equal authors. E-mail: debora.m.a.costa@ufmg.br (D.M.A. Costa).

^{cu} Equal authors. E-mail: denize.favaro@ufmg.br (D.C. Favaro).

^{cv} Equal authors. E-mail: alvan.hengge@ufmg.br (A.C. Hengge).

^{cw} Equal authors. E-mail: mozart.pereira@ufmg.br (M.S. Pereira).

^{cx} Equal authors. E-mail: rosemeire.alves@ufmg.br (R.B. Alves).

^{cy} Equal authors. E-mail: debora.m.a.costa@ufmg.br (D.M.A. Costa).

^{cz} Equal authors. E-mail: denize.favaro@ufmg.br (D.C. Favaro).

^{ca} Equal authors. E-mail: alvan.hengge@ufmg.br (A.C. Hengge).

^{cb} Equal authors. E-mail: mozart.pereira@ufmg.br (M.S. Pereira).

^{cc} Equal authors. E-mail: rosemeire.alves@ufmg.br (R.B. Alves).

^{cd} Equal authors. E-mail: debora.m.a.costa@ufmg.br (D.M.A. Costa).

^{ce} Equal authors. E-mail: denize.favaro@ufmg.br (D.C. Favaro).

^{cf} Equal authors. E-mail: alvan.hengge@ufmg.br (A.C. Hengge).

^{cg} Equal authors. E-mail: mozart.pereira@ufmg.br (M.S. Pereira).

^{ch} Equal authors. E-mail: rosemeire.alves@ufmg.br (R.B. Alves).

^{ci} Equal authors. E-mail: debora.m.a.costa@ufmg.br (D.M.A. Costa).

^{cj} Equal authors. E-mail: denize.favaro@ufmg.br (D.C. Favaro).

^{ck} Equal authors. E-mail: alvan.hengge@ufmg.br (A.C. Hengge).

^{cl} Equal authors. E-mail: mozart.pereira@ufmg.br (M.S. Pereira).

^{cm} Equal authors. E-mail: rosemeire.alves@ufmg.br (R.B. Alves).

^{cn} Equal authors. E-mail: debora.m.a.costa@ufmg.br (D.M.A. Costa).

^{co} Equal authors. E-mail: denize.favaro@ufmg.br (D.C. Favaro).

^{cp} Equal authors. E-mail: alvan.hengge@ufmg.br (A.C. Hengge).

^{cq} Equal authors. E-mail: mozart.pereira@ufmg.br (M.S. Pereira).

^{cr} Equal authors. E-mail: rosemeire.alves@ufmg.br (R.B. Alves).

^{cs} Equal authors. E-mail: debora.m.a.costa@ufmg.br (D.M.A. Costa).

^{ct} Equal authors. E-mail: denize.favaro@ufmg.br (D.C. Favaro).

^{cu} Equal authors. E-mail: alvan.hengge@ufmg.br (A.C. Hengge).

^{cv} Equal authors. E-mail: mozart.pereira@ufmg.br (M.S. Pereira).

^{cw} Equal authors. E-mail: rosemeire.alves@ufmg.br (R.B. Alves).

^{cx} Equal authors. E-mail: debora.m.a.costa@ufmg.br (D.M.A. Costa).

^{cy} Equal authors. E-mail: denize.favaro@ufmg.br (D.C. Favaro).

^{cz} Equal authors. E-mail: alvan.hengge@ufmg.br (A.C. Hengge).

^{ca} Equal authors. E-mail: mozart.pereira@ufmg.br (M.S. Pereira).

^{cb} Equal authors. E-mail: rosemeire.alves@ufmg.br (R.B. Alves).

^{cc} Equal authors. E-mail: debora.m.a.costa@ufmg.br (D.M.A. Costa).

^{cd} Equal authors. E-mail: denize.favaro@ufmg.br (D.C. Fav

ANEXO D --- CÁLCULOS OM PROGRAMA BIKIN

Input Data

```
; 'Ordered Bi-Bi' mechanism with product inhibition and cofactor competitive inhibition.
;
```

```
[reaction]
  A + B <==> P + Q
```

```
[modifiers]
  I
```

```
[mechanism]
  E + A <==> EA
  EA + B <==> EXY
  EXY <==> EQ + P
  EQ <==> E + Q
  E + I <==> EI
```

```
[end]
```

Overall Reaction

$A + B \rightarrow P + Q$

Modifiers

I

Enzyme Forms

E, EA, EXY, EQ, EI

Mechanism

k_1	$A + E \rightarrow EA$
k_{-1}	$EA \rightarrow A + E$
k_2	$B + EA \rightarrow EXY$
k_{-2}	$EXY \rightarrow B + EA$
k_3	$EXY \rightarrow P + EQ$
k_{-3}	$P + EQ \rightarrow EXY$
k_4	$EQ \rightarrow Q + E$
k_{-4}	$Q + E \rightarrow EQ$
k_4	$I + E \rightarrow EI$
k_5	$EI \rightarrow I + E$
k_{-5}	

Stoichiometric matrix

	A	B	P	Q	I	E	EA	EXY	EQ	EI
k_1	-1	0	0	0	0	-1	1	0	0	0
k_{-1}	1	0	0	0	0	1	-1	0	0	0
k_2	0	-1	0	0	0	0	-1	1	0	0
k_{-2}	0	1	0	0	0	0	1	-1	0	0
k_3	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0
k_{-3}	0	0	-1	0	0	0	0	0	-1	0
k_4	0	0	0	1	0	1	0	0	-1	0
k_{-4}	0	0	0	-1	0	-1	0	0	1	0
k_5	0	0	0	0	-1	-1	0	0	0	1
k_{-5}	0	0	0	0	1	1	0	0	0	-1

Adjacency Matrix

	E	EA	EXY	EQ	EI
E		$k_1[A]$		$k_{-4}[Q]$	$k_5[I]$
EA	k_{-1}		$k_2[B]$		
EXY		k_{-2}		k_3	
EQ			$k_{-3}[P]$		
EI	k_{-5}				

Rate Equation

$$v = \mathbf{N/D} = d[P]/dt = + k_3 [EXY]' - k_{-3} [P] [EQ]'$$

Numerator

$$\mathbf{N} = + n_1 [P][Q] + n_2 [A][B]$$

where

$$n_1 = - k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4}k_{-5}$$

$$n_2 = + k_1k_2k_3k_4k_{-5}$$

Denominator

$$\begin{aligned} \mathbf{D} = & + d_1 [B][P][Q] + d_2 [A][B][P] + d_3 [P][I] + d_4 [P][Q] + d_5 [B][I] \\ & + d_6 [B][Q] + d_7 [A][P] + d_8 [A][B] + d_9 [I] + d_{10} [Q] + d_{11} [P] \\ & + d_{12} [B] + d_{13} [A] + d_{14} \end{aligned}$$

where

$$d_1 = k_2 k_3 k_4 k_5$$

$$d_2 = k_1 k_2 k_3 k_5$$

$$d_3 = k_{-1} k_2 k_3 k_5$$

$$d_4 = k_2 k_3 k_4 k_5 + k_{-1} k_3 k_4 k_5$$

$$d_5 = k_2 k_3 k_4 k_5$$

$$d_6 = k_2 k_3 k_4 k_5$$

$$d_7 = k_1 k_2 k_3 k_5$$

$$d_8 = k_1 k_2 k_4 k_5 + k_1 k_2 k_3 k_5$$

$$d_9 = k_{-1} k_2 k_4 k_5 + k_{-1} k_3 k_4 k_5$$

$$d_{10} = k_{-1} k_2 k_4 k_5 + k_{-1} k_3 k_4 k_5$$

$$d_{11} = k_{-1} k_2 k_3 k_5$$

$$d_{12} = k_2 k_3 k_4 k_5$$

$$d_{13} = k_1 k_2 k_4 k_5 + k_1 k_3 k_4 k_5$$

$$d_{14} = k_{-1} k_2 k_4 k_5 + k_{-1} k_3 k_4 k_5$$