

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

JULIANA BARBOSA COITINHO

Cristalização, estrutura e atividade de duas proteínas com apelo biotecnológico: Pb27 de *Paracoccidioides brasiliensis* e salicilaldeído desidrogenase (NahF) de *Pseudomonas putida*.

Belo Horizonte
2013

JULIANA BARBOSA COITINHO

Cristalização, estrutura e atividade de duas proteínas com apelo biotecnológico: Pb27 de *Paracoccidioides brasiliensis* e salicilaldeído desidrogenase (NahF) de *Pseudomonas putida*.

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

Área de concentração: Estrutura e função de proteínas e peptídeos.

Orientador: Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem

Co-orientador: Dr. Alfredo Miranda de Góes

Belo Horizonte

2013



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE JULIANA BARBOSA COITINHO. Aos vinte e um dias do mês de março de 2013 às 13:30 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais a Comissão Examinadora da tese de doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “Cristalização, estrutura e atividade de duas proteínas com apelo biotecnológico: Pb27 de paracoccidioides brasiliensis e salicilaldeído desidrogenase (NAHf) de pseudomonas putida” requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão o Presidente da Comissão, Prof. Ronaldo Alves Pinto Nagem após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra a candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Valéria Monteze Guimarães da Universidade Federal de Viçosa, aprovada; Dr. Ricardo Aparício da Universidade Estadual de Campinas, aprovada; Dra. Patrícia Silva Cisalpino da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dr. Adriano Monteiro de Castro Pimenta da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dr. Alfredo Miranda de Góes, co-orientador, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem, orientador da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 21 de março de 2013.


 Dra. Valéria Monteze Guimarães – UFV

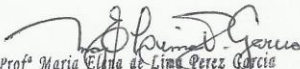

 Dr. Ricardo Aparício – UNICAMP


 Dra. Patrícia Silva Cisalpino – UFMG


 Dr. Adriano Monteiro de Castro Pimenta – UFMG


 Dr. Alfredo Miranda de Góes - co-orientador - UFMG


 Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem – orientador - UFMG


 Prof. Maria Eliza de Lima Perez Garcia
 Coordenadora do Curso de Pós Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

Dedico a meus pais, minhas irmãs e a meu esposo, Emerson, pelo apoio indispensável para a realização desse sonho.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, a quem sempre recorro quando tudo parece difícil demais para ser superado;
- Aos meus pais, Advarte e Nalzirene e minhas irmãs, Luciana e Tatiane, que nunca deixaram de me apoiar e sempre se sentiram orgulhosos por tudo o que tenho alcançado, às vezes até mais que eu mesma;
- Ao meu orientador de tantos anos, Prof. Dr. Ronaldo A. P. Nagem, que sempre se empenhou para engrandecer esse trabalho, seja me ajudando a participar de cursos, congressos e do doutorado sanduiche, seja nas longas e cansativas viagens ao LNLS e nas inúmeras discussões científicas;
- Ao meu co-orientador, Prof. Alfredo M. Góes, pela gentileza e que sempre se mostrou confiante em meu trabalho e, junto com o Prof. Ronaldo, nunca me deixaram desistir da proteína Pb27, com que trabalho desde o Mestrado;
- Aos meus amigos do Bioest, do LICM, do LFQP e do LGB, por facilitarem grandemente o meu trabalho e, principalmente, pela amizade;
- A todos os meus amigos, em especial Vivi, Cíntia, Lili, Isa, Cacai, Mari, Cíntia Neves, Débora, Fê, Lu, Betinha, Jamil por serem essenciais para minha vida, tornando meus dias mais felizes, por ouvirem minhas reclamações, enfim, por serem amigos verdadeiros;
- A todos os Professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia, pelas contribuições grandiosas e por permitirem a realização desse trabalho das mais diversas formas;
- Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron e aos amigos do BMC - *Uppsala University* por permitirem a realização de diversos experimentos e pelas contribuições científicas, especialmente Dr. Terese Bergfors e Dr. Alwyn Jones;
- À CAPES pela concessão da bolsa e, junto com o CNPq, Fapemig e Vale SA, pelo apoio financeiro;
- E finalmente, agradeço ao Emerson, meu amor, que se mostrou extremamente compreensivo com a carreira que escolhi, me apoiando das mais diversas formas e que se tornou imprescindível para que eu superasse mais esse desafio. Minha vida mudou depois de você!

*O saber a gente aprende com os mestres
e os livros. A sabedoria se aprende é
com a vida e com os humildes.*

Cora Coralina

RESUMO

COITINHO, J. B. **Cristalização, estrutura e atividade de duas proteínas com apelo biotecnológico: Pb27 de *Paracoccidioides brasiliensis* e salicilaldeído desidrogenase (NahF) de *Pseudomonas putida***. 2013. Tese (Doutorado) – Departamento de Bioquímica e Imunologia. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2013.

A cristalografia de raios-X, em relação ao número de estruturas depositadas no Protein Data Bank (PDB), é o método mais utilizado para se obter informações estruturais de macromoléculas biológicas. Tais informações são úteis para o entendimento dos sistemas biológicos dos quais essas macromoléculas participam. Nesse trabalho, duas proteínas com interesse biotecnológico foram estudadas do ponto de vista bioquímico e estrutural: a proteína antigênica Pb27 de *Paracoccidioides brasiliensis* e a enzima NahF de *Pseudomonas putida*. O fungo *P. brasiliensis* é o agente causador de uma das mais importantes micoses sistêmicas do Brasil, a paracoccidioidomicose (PCM) e a proteína Pb27, apesar de já ter sido utilizada com alta especificidade e sensibilidade no diagnóstico e como adjuvante no tratamento da PCM, tem sua função ainda desconhecida e não apresenta proteínas similares com estrutura terciária resolvida. Com o intuito de resolver sua estrutura por cristalografia de raios-X, a proteína Pb27 recombinante (Pb27r) foi expressa em bactérias *E. coli* BL21(DE3) e purificada por cromatografia de afinidade e gel filtração de onde eluiu com volume equivalente a um monômero (24 kDa após remoção da cauda de histidinas N-terminal). Estudos de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e dicroísmo circular (CD) mostraram essa proteína estava monodispersa e enovelada. Cristais da Pb27 foram obtidos em MgCl₂ 0,25 M, PEG 4000 25%, Tris-Cl 100 mM pH 7,0, com grupo espacial P2₁2₁2₁ e difrataram com resolução de 1,9 Å. Para a obtenção de cristais derivados para a resolução da estrutura da Pb27r por espalhamento anômalo ou substituição isomórfica, foram realizados *soaking* e co-cristalização com sais de átomos pesados (NaI, CsCl, GdCl₃, sais de Hg e Pt) além de marcação com Se-Met, no entanto, ainda não foram obtidos cristais com diferença isomórfica/anômala suficiente para determinação da estrutura da Pb27. Já a enzima NahF catalisa a oxidação do salicilaldeído em salicilato utilizando NAD⁺ como cofator, última reação da via superior de degradação do naftaleno em *P. putida*. O naftaleno é o composto mais abundante e tóxico do petróleo e tem sido utilizado como modelo em estudos de biorremediação. Para a compreensão dos determinantes estruturais da atividade dessa enzima, a proteína NahF recombinante (NahFr) foi expressa em *E. coli Arctic Express* a 12 °C e purificada por cromatografias de afinidade e gel filtração de onde eluiu em três frações. A fração principal, que continha a proteína em sua forma dimérica e monodispersa (dados obtidos por DLS) foi utilizada em ensaios cinéticos e estruturais. A NahFr apresentou maior atividade em pH 8,5 e 60 °C. EDTA, DTT e SDS inibiram a atividade enzimática enquanto Ni²⁺ a elevou em quase 20%. A enzima apresentou altos valores de k_{cat}/K_M e preferência para aldeídos aromáticos e por aldeídos alifáticos de cadeia longa. A sua estrutura mostrou um enovelamento do tipo α/β com os domínios de oligomerização de ligação ao cofator e catalítico bem definidos. O salicilaldeído estava presente em um bolsão profundo na estrutura da enzima

onde também estavam a Cys284 e o Glu250 catalíticos. Os resíduos Arg157, Gly150 e Trp96 se mostraram importantes para a especificidade por aldeídos aromáticos. O entendimento das características da enzima NahF que são responsáveis por sua atividade e especificidade e, também, suas diferenças para outras ALDHs de outros organismos pode abrir possibilidades para, por exemplo, o aumento da sua estabilidade e outras características por mutações sistemáticas, tornando possível o seu uso e o de outras enzimas relacionadas em processos biotecnológicos.

Palavras-chave: Pb27, *Paracoccidioides brasiliensis*, NahF, salicilaldeído desidrogenase, *Pseudomonas putida*, estrutura, função

ABSTRACT

COITINHO, J. B. **Crystallization, structure and activity of two proteins with biotechnological interest: Pb27 from *Paracoccidioides brasiliensis* and salicylaldehyde dehydrogenase (NahF) from *Pseudomonas putida*.** 2013. Tese (Doutorado) – Departamento de Bioquímica e Imunologia. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2013.

According to the number of structures deposited on Protein Data Bank (PDB), the X-ray crystallography is the main method used to obtain structural information of biological macromolecules. Such information is useful for understanding the biological systems of which these macromolecules participate. In this study, two proteins with biotechnological interest were studied from the structural and biochemical view: the antigenic protein Pb27 from *Paracoccidioides brasiliensis* and the enzyme NahF from *Pseudomonas putida*. The fungus *P. brasiliensis* is the agent of one of the most important systemic mycoses in Brazil, paracoccidioidomycosis (PCM) and the protein Pb27, despite having been used with high sensitivity and specificity in the diagnosis and as an adjuvant in the treatment of PCM, Pb27's function is still unknown and this protein has no similar proteins with tertiary structure solved. Aiming to solve its structure by X-ray crystallography, recombinant Pb27 protein (Pb27r) was expressed in bacteria *E. coli* BL21(DE3) and purified by affinity chromatography and gel filtration, which was eluted with a volume equivalent to a monomer (24 kDa after removing the N-terminal Histag). Studies of dynamic light scattering (DLS) and circular dichroism (CD) revealed that protein is monodisperse and folded. Pb27 crystals were obtained in 0.25 M MgCl₂, 25% PEG 4000, 100 mM Tris-Cl pH 7.0, with space group P2₁2₁2₁ and diffracted up to 1.9 Å of resolution. In order to obtain crystals derivatives for solving the structure of Pb27r by anomalous scattering or isomorphous substitution it was performed soaking and co-crystallization with heavy atom salts (NaI, CsCl, GdCl₃, Hg and Pt salts) were performed in addition to Se-Met labeling. However, derivative crystals with isomorphous/anomalous difference enough to determine Pb27 structure were not obtained yet. The NahF enzyme catalyzes the oxidation of salicylaldehyde to salicylate using NAD⁺ as a cofactor, the last reaction of the degradation upper pathway of naphthalene in *P. putida*. The naphthalene is the most abundant and toxic compound in oil and has been used as a model for bioremediation studies. To understand the structural determinants of activity of this enzyme, the recombinant protein NahF (NahFr) was expressed in *E. coli* Arctic Express at 12 °C and purified by affinity chromatography and gel filtration in which it eluted in three fractions. The main fraction contained the protein in its dimeric form and monodisperse (data obtained by DLS) and was used for kinetic and structural studies. NahFr was most active at pH 8.5 and 60 °C. EDTA, DTT and SDS inhibited the enzymatic activity while the Ni²⁺ increased by almost 20%. The enzyme showed high values of k_{cat}/K_M and preference for aromatic and long chain aliphatic aldehydes. The structure showed an α/β folding with the oligomerization, cofactor binding and catalytic domains well defined. The salicylaldehyde was

present in a deep pocket in the structure where the catalytic Cys284 and Glu250 were seen. Moreover, the residues Arg157, Gly150 and Trp96 were important to specificity for aromatic aldehydes. The understanding of the characteristics of the enzyme NahF that are responsible for its activity and specificity and also its differences for other ALDHs from other organisms may open up possibilities for, for example, increased stability and other characteristics by systematic mutations, making it possible its use and other related enzymes in biotechnological processes.

Key-words: Pb27, *Paracoccidioides brasiliensis*, NahF, salicylaldehyde dehydrogenase, *Pseudomonas putida*, structure, function

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Transição de fase de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	9
Figura 2. Distribuição geográfica da PCM.	11
Figura 3. Ciclo biológico hipotético de <i>P. brasiliensis</i> demonstrando a sua transição de fases.	13
Figura 4. Desenho esquemático do vetor pET28a(TEV).	25
Figura 5. PCR de colônia das bactérias <i>E. coli</i> BL21(DE3) transformadas com o vetor recombinante pET28a-pb27.	35
Figura 6. Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína sequenciada nesse trabalho e aquelas apresentaram similaridades após pesquisa no BLASTp.	37
Figura 7. Expressão da proteína Pb27 recombinante em <i>E. coli</i> BL21(DE3) a 37 °C.	38
Figura 8. Purificação da Pb27r.	40
Figura 9. SDS-PAGE 12% da purificação da Pb27r.	41
Figura 10. Análise da estrutura secundária da proteína Pb27r clivada.	43
Figura 11. Espalhamento dinâmico da luz (DLS) da proteína Pb27r.	46
Figura 12. Cristalização da Pb27r.	47
Figura 13. Imagem de difração de um cristal tipo agulha da proteína Pb27r. ..	48
Figura 14. SDS-PAGE 12% da purificação da Pb27r-SeMet.	51
Figura 15. Estruturas químicas dos 16 HAPs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental americana.	60
Figura 16. Vias de metabolização de HAPs em bactérias e fungos.	61
Figura 17. Organização dos genes de degradação do naftaleno em <i>Pseudomonas putida</i>	66
Figura 18. Vias de oxidação do naftaleno, salicilato e catecol.	68
Figura 19. Estrutura tridimensional de uma ALDH classe 3.	72
Figura 20. Mecanismo de ação para ALDHs.	73
Figura 21. Aldeídos utilizados como substratos para medida da atividade da enzima NahFr.	83
Figura 22. Digestão dos plasmídeos pET28a(TEV) e pET28a-nahF com as enzimas <i>NdeI</i> e <i>XhoI</i>	88

Figura 23. Expressão da NahF recombinante em <i>E. coli Arctic Express</i> a 12 °C.	89
Figura 24. Purificação da enzima NahFr.	91
Figura 25. Espalhamento dinâmico de luz (DLS) da enzima NahF sozinha e na presença de seus substratos.....	93
Figura 26. Efeito do pH na atividade da enzima NahF recombinante de <i>Pseudomonas putida</i>	95
Figura 27. Efeito da temperatura na atividade da enzima NahF recombinante de <i>Pseudomonas putida</i>	96
Figura 28. Efeito da temperatura na estabilidade da enzima NahFr.	97
Figura 29. Efeito de íons e outros agentes na concentração de na atividade da enzima NahFr de <i>P. putida</i>	99
Figura 30. Efeito do substrato salicilaldeído na atividade da NahFr.....	102
Figura 31. Atividade da enzima NahFr sobre diferentes aldeídos.	106
Figura 32. Análise de dicroísmo circular da NahFr em diferentes temperaturas.	108
Figura 33. Ensaio de DSF para a enzima NahFr.....	110
Figura 34. Temperatura de desnaturação (T _m) da enzima NahF na presença de seus substratos.	111
Figura 35. Cristalização da NahFr em sulfato de amônio e isopropanol. 106	112
Figura 36. Imagem de difração de um cristal da proteína NahFr.....	113
Figura 37. Estrutura cristalográfica da enzima NahFr de <i>Pseudomonas putida</i>	117
Figura 38. Sítio ativo da NahFr mostrando o substrato salicilaldeído.....	118
Figura 39. Dímero de NahFr mostrando o salicilaldeído na interface entre as subunidades.	119
Figura 40. Alinhamento das sequencias de aminoácidos das enzimas NahFr, Nahl, 3R64 e 1BXS.	121
Figura 41. Sítio ativo da NahF e alinhamento das estruturas das enzimas NahFr (azul), 3R64 (amarelo) e 1BXS(rosa).	123
Figura 42. Interação do tipo “Pi-stacking” em NahFr.....	125
Figura 43. Região de oligomerização das subunidades do dímero de NahF. 126	
Figura 44. Interação dos resíduos de aminoácidos da enzima aldeído desidrogenase de <i>Ovis aries</i> (1BXS) com o cofator NAD	127
Figura 45. Região em NahFr que interage com a coenzima nicotinamida.	128
Figura 46. Alinhamento das estruturas das enzimas NahFr, 3R64 e 1BXS mostrando a região de ligação do cofator nicotinamida.	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimento da purificação da proteína Pb27r.	41
Tabela 2. Estatísticas dos dados nativos de difração dos cristais de Pb27r. ...	48
Tabela 3. Estatísticas do processamento de diferentes conjuntos de dados de difração de cristais da proteína Pb27r.....	50
Tabela 4. As 13 famílias de ALDHs.....	70
Tabela 5. Purificação da NahF recombinante de <i>Pseudomonas putida</i>	94
Tabela 6. Atividade da enzima NahFr sobre aldeídos aromáticos e alifáticos.	101
Tabela 7. Estatísticas dos dados de difração dos cristais de NahFr e dos dados de refinamento.	114
Tabela 8. Coeficientes de Matthews calculados para o cristal da NahF.	116
Tabela 9. Resíduos de aminoácidos que interagem com o cofator em 1BXS e seus equivalentes nas ALDHs estudadas.	127

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1BXS	aldeído desidrogenase de <i>Ovis aries</i>
3R64	benzaldeído desidrogenase putativa de <i>Corynebacterium glutamicum</i>
ALDH	Aldeído desidrogenase
a.u.	Unidades arbitrárias
CD	“Circular dichroism”, dicroísmo circular
DLS	“Dynamic Light Scattering”, espalhamento dinâmico de luz
DSF	“Differential Scanning Fluorimetry”
ELISA	Imunoensaio enzimático
HAP	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
k_{cat}	Constante catalítica
K_M	Constante de Michaelis-Mentem
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
LTTRs	Reguladores transcricionais do tipo Lys-R
[Θ] MRW	Elipcidade molar
MS	Ministério da Saúde
MWCO	“Molecular weight cut-off”
NAGE	Núcleo de Análise de Genoma
NahF	Salicilaldeído desidrogenase de <i>Pseudomonas putida</i>
NahFr	Salicilaldeído desidrogenase recombinante
NahI	2-hidroximucônico semialdeído desidrogenase de <i>P. putida</i>
NCBI	“National Center for Biotechnology Information”
NK	Salicilaldeído
PCM	Paracoccidiodomicose
Pd	Polidispersidade
Pb27	Proteína Pb27 de <i>Paracoccidoides brasiliensis</i>
Pb27r	Proteína Pb27 recombinante
RT-PCR	“Reverse-transcription” PCR
sal	Salicilaldeído
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida desnaturante
TEV	“Tobacco etch virus”
T _m	Temperatura de desnaturação
V _{máx}	Velocidade máxima

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

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

SUMÁRIO

1. Introdução e justificativa	4
2. Objetivos	6
2.1 - Geral	6
2.2 - Específicos.....	6
Parte I – Cristalização da proteína Pb27 de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	7
I.1. Revisão bibliográfica	8
I.1.1 – O fungo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	8
I.1.2. Paracoccidioidomicose (PCM)	11
I.1.2.1. Infecção e formas clínicas da PCM.....	12
I.1.2.2. Diagnóstico da PCM	15
I.1.2.3. Tratamento da PCM.....	16
I.1.3. A proteína Pb27	17
II.2. Metodologia.....	22
I.2.1. Cultivo do fungo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	22
I.2.2. Extração do RNA e produção do cDNA de células leveduriformes <i>P. brasiliensis</i>	22
I.2.3. Desenho dos iniciadores e amplificação da sequência codificadora da Pb27 (gene <i>pb27</i>)	23
I.2.4. Clonagem do gene <i>pb27</i> no vetor de clonagem pGEM-T (Promega) ..	24
I.2.5. Clonagem do gene <i>pb27</i> no vetor de expressão pET28a(TEV).....	24
I.2.6 - Extração de DNA plasmidial e sequenciamento dos clones positivos	26
I.2.7. Eletroforese em gel de agarose	26
I.2.8. Expressão da proteína recombinante Pb27	27
I.2.9. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida- SDS-PAGE 12%	28
I.2.10. Purificação e clivagem da proteína recombinante Pb27 com protease TEV	29
I.2.10.1. Purificação por cromatografia de afinidade da proteína Pb27r e clivagem da cauda de histidinas	29
I.2.10.2. Purificação por cromatografia de exclusão molecular (gel filtração) da proteína recombinante Pb27.....	30
I.2.11. Determinação da concentração de proteínas	30
I.2.12. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS – <i>dynamic light scattering</i>) da proteína Pb27 recombinante	31

I.2.13. Estudos de estrutura secundária da proteína Pb27 recombinante por Dicroísmo circular (CD – <i>circular dichroism</i>)	31
I.2.14. Cristalização da proteína recombinante Pb27 e coleta dos dados de difração de raios-X	32
I.2.15. Estratégias para derivatização dos cristais da proteína Pb27r.....	33
I.3. Resultados e discussão.....	35
I.3.1. Clonagem e expressão do gene <i>pb27</i> de <i>P. brasiliensis</i>	35
I.3.2. Purificação e clivagem da cauda de histidinas da proteína Pb27r de <i>P. brasiliensis</i>	38
I.3.3. Análise de estrutura secundária da Pb27r	42
I.3.4. Cristalização da proteína Pb27r e difração de raios-X	46
I.4 – Considerações finais	52
I.5. Conclusões.....	56
I.6. Perspectivas	57
Parte II – Estrutura e cinética da enzima salicilaldeído desidrogenase de <i>Pseudomonas putida</i> G7	58
II.1. Revisão bibliográfica	59
II.1.1. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) e biorremediação	59
II.1.2. <i>Pseudomonas putida</i> e degradação de HAPs	65
II.1.3. Aldeído desidrogenases.....	69
II.2. Metodologia.....	75
II.2.1. Cultivo da bactéria <i>Pseudomonas putida</i>	75
II.2.2. Extração do plasmídeo NAH7 de <i>Pseudomonas putida</i>	75
II.2.3. Desenho dos iniciadores e amplificação da sequência codificadora da NahF (gene <i>nahF</i>).....	76
II.2.4. Clonagem do gene <i>nahF</i> no vetor de clonagem pGEM-T (Promega) .	77
II.2.5. Clonagem do gene <i>nahF</i> no vetor de expressão pET28a(TEV)	78
II.2.6 - Expressão da proteína recombinante NahF de <i>P. putida</i>	79
II.2.7. Purificação da proteína recombinante NahF	79
II.2.8. Ensaio da atividade enzimática da NahFr	80
II.2.9. Efeito do pH na atividade enzimática de NahFr	80
II.2.10. Efeito da temperatura na atividade enzimática e termoestabilidade da NahFr	81
II.2.11. Efeito de íons e outros agentes na atividade enzimática da NahFr ..	81
II.2.12. Efeito da concentração do substrato na atividade da enzima NahFr	81

II.2.13. Atividade da NahFr com outros substratos	82
II.2.14. Efeito da ligação do substrato na estabilidade da enzima	83
II.2.15. Estudos da estrutura secundária e estado de oligomerização da proteína NahFr por Dicroísmo Circular e Espalhamento Dinâmico de Luz ...	84
II.2.16. Testes de cristalização da proteína recombinante NahF	85
II.2.17. Coleta dos dados de difração, processamento e determinação das fases da proteína NahFr	85
II.2.18. Determinação da estrutura cristalográfica da NahFr	86
II.2.19. Análise comparativa da estrutura da NahFr	87
II.3. Resultados e discussão.....	88
II.3.1 – Clonagem e expressão do gene <i>nahF</i> de <i>P. putida</i>	88
II.3.2. Purificação da NahFr de <i>P. putida</i>	89
II.3.3. Efeito do pH e temperatura na atividade enzimática de NahFr	94
II.3.4. Efeito de íons e outros agentes sobre a atividade da NahFr	97
II.3.5. Efeito da concentração de substrato salicilaldeído e outros aldeídos na atividade de NahFr.....	100
II.3.6. Análise de estrutura secundária da proteína NahFr.....	106
II.3.7. Efeito da ligação do substrato na estabilidade da enzima NahFr.....	108
II.3.8. Cristalização da NahFr e difração de raios-X.....	111
II.3.9. Estrutura da enzima NahFr de <i>Pseudomonas putida</i>	113
II.3.10. Análise comparativa da estrutura da NahFr com outras ALDHs	120
II.4 – Considerações finais	131
II.5. Conclusões.....	134
II.6. Perspectivas.....	135
3. Bibliografia.....	136
Apêndice I – Estudos <i>in silico</i> da proteína Pb27	145
Apêndice II – Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene <i>pb27</i>	148
Apêndice III – Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene <i>nahF</i> e de aminoácidos da proteína NahFr	151
Apêndice IV – Artigos publicados durante o período do Doutorado (2009 – 2013)	156

1. Introdução e justificativa

Os modelos tridimensionais das estruturas atômicas das macromoléculas são amplamente utilizados para desvendar detalhes moleculares de processos biológicos. Tais modelos podem ser utilizados para entender como as moléculas atuam, como enzimas catalisam reações metabólicas, como proteínas transportadoras carregam suas moléculas-cargo, como anticorpos se ligam a antígenos e, também, como proteínas se ligam ao DNA (Rhodes 2000).

Nesse trabalho, duas proteínas de interesse biotecnológico foram estudadas do ponto de vista bioquímico e estrutural: a proteína Pb27 de *Paracoccidioides brasiliensis* e a enzima salicilaldeído desidrogenase (NahF) de *Pseudomonas putida*.

A Pb27 foi a segunda proteína antigênica do fungo *P. brasiliensis* a ser clonada e sequenciada e, até o momento, nenhuma outra estrutura similar à Pb27 está descrita nos bancos de dados (McEwen et al. 1996). A paracoccidioidomicose (PCM), doença causada pelo *P. brasiliensis* é a mais importante micose sistêmica no Brasil, país que conta com as principais áreas endêmicas do mundo. Em estudos prévios, essa proteína foi reconhecida com alta sensibilidade e especificidade por soros de pacientes com PCM (Fernandes et al. 2011a; Fernandes et al. 2011b) confirmando o potencial dessa proteína para utilização em ensaios de sorodiagnóstico.

O estudo da estrutura tridimensional da Pb27 possibilitaria um entendimento mais detalhado desta molécula como, por exemplo, a localização dos seus epitopos, o tipo de enovelamento protéico e bem possivelmente de sua função no fungo, fato este desconhecido até o momento. No Brasil, não existem programas específicos de controle da PCM nem diagnóstico padronizado da doença, assim, os estudos com a Pb27 poderiam facilitar o uso da mesma em testes de diagnóstico, como auxiliar no tratamento e também como uma possível vacina contra a PCM.

Mais ainda, em estudos de alinhamento de sequência, BLAST e *Conserved Domains* (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>), a Pb27 apresenta alinhamento apenas com proteínas hipotéticas e mostra um domínio DUF1814 (nucleotidil

transferase de função desconhecida). Assim, a determinação da estrutura inédita dessa proteína pode trazer informações úteis para a caracterização desse “novo” domínio, além de agregar conhecimento para a resolução de outras proteínas novas.

A enzima NahF (salicilaldeído desidrogenase) catalisa a última reação da via de degradação do naftaleno ao salicilato pela bactéria *P. putida*. Os genes para as enzimas dessa via estão localizados no operon *nah* dentro do plasmídeo NAH7 (Yen & Gunsalus 1982).

O naftaleno é um hidrocarboneto aromático policíclico presente em diversos combustíveis fósseis como o petróleo, sendo um dos mais tóxicos e abundantes. A degradação microbiana ou enzimática de compostos tóxicos representa a rota principal responsável pela recuperação ecológica de áreas contaminadas (biorremediação) (Bamforth 2005).

O entendimento do mecanismo de reação das enzimas responsáveis por essa degradação poderia auxiliar até mesmo na produção de enzimas mutantes com propriedades catalíticas e físico-químicas melhoradas que permitissem seu uso efetivo no processo de biorremediação.

Por esse trabalho tratar de duas proteínas bem diferentes com organismos de origens completamente distintas, decidimos dividi-lo em duas etapas: Parte I – Cristalização da proteína inédita Pb27 de *Paracoccidioides brasiliensis* e Parte II – Estrutura e cinética da enzima salicilaldeído desidrogenase de *Pseudomonas putida* G7.

2. Objetivos

2.1 - Geral

Caracterizar bioquímica e estruturalmente as proteínas recombinantes Pb27 de *Paracoccidoides brasiliensis* e NahF (salicilaldeído desidrogenase) de *Pseudomonas putida*.

2.2 - Específicos

- Obter as proteínas recombinantes NahF e Pb27 puras e em grandes quantidades (pelo menos 20 mg de proteína pura por litro de expressão).
- Caracterizar bioquímica e cineticamente a enzima NahF recombinante;
- Caracterizar as estruturas secundárias das proteínas recombinantes NahF e Pb27;
- Realizar ensaios de cristalização da enzima NahF e da Pb27 recombinantes;
- Coletar dados de difração de raios-X dos cristais das duas proteínas recombinantes;
- Determinar a estrutura da enzima NahF e da proteína Pb27.

**Parte I – Cristalização da proteína Pb27 de
*Paracoccidioides brasiliensis***

I.1. Revisão bibliográfica

I.1.1 – O fungo *Paracoccidioides brasiliensis*

Paracoccidioides brasiliensis, o agente etiológico da Paracoccidioidomicose (PCM), pertence à família Ajellomycetaceae (Ordem Onygenales, Ascomycota), no mesmo grupo de fungos como *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* e *Lacazia loboi*. Os membros desse grupo apresentam muitas características micológicas e ecológicas em comum, como, por exemplo, dimorfismo (formas filamentosas, na condição saprofítica e formas leveduriformes, na condição patogênica), distribuição geográfica restrita, formação de corpo de frutificação infectivo (artroconídia) e alguma afinidade por rejeitos animais, como fezes e ácido úrico (Bialek et al. 2000; San-Blas et al. 2002).

Até 2006 acreditava-se que o gênero *Paracoccidioides* incluía somente a espécie *Paracoccidioides brasiliensis*. No entanto, estudos recentes revelaram a existência de quatro espécies crípticas: S1, PS2 e PS3 do complexo *P. brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii* (originalmente conhecido como *Pb01-like*) (Matute et al. 2006; Carrero et al. 2008; Theodoro 2012).

A espécie S1 é a mais amplamente distribuída, ocorrendo no Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai, Peru e Venezuela. PS2 ocorre na Venezuela e no Brasil, enquanto PS3 é restrita à Colômbia. *P. lutzii*, a espécie mais recentemente descoberta, é também a mais divergente, ocorrendo predominantemente na região Centro Oeste do Brasil (Matute et al. 2006; Teixeira et al. 2009)

P. brasiliensis já foi isolado do solo (Shome 1993), de fezes de morcegos - *Artibeus lituratus* (Grose 1965), pingüins - *Pygoscelis adeliae*, tatus - *Dasybus novemcinctus* (Corredor et al. 1999) e de rações para cães (Ferreira et al. 1990). Além disso, evidências sorológicas apontam a infecção por *P. brasiliensis* em cabras (Ferreira et al. 2013), ovelhas (Oliveira et al. 2012), galinhas (Oliveira et al. 2011), gado (Silveira 2008), sugerindo que esses animais possam ser utilizados como marcadores epidemiológicos da PCM. Cães urbanos e rurais também são comumente infectados com o fungo, no

entanto, eles parecem ser naturalmente resistentes ao desenvolvimento da PCM (Fontana 2010).

O fungo é termicamente dimórfico (Figura 1). Em temperaturas próximas a 24 °C, ele cresce como um micélio saprofítico infectante com hifas septadas e presença frequente de estruturas de resistência (clamidósporos), sofrendo influência de diferentes fatores como mudanças na temperatura e umidade e competição com outros microrganismos. Com a elevação da temperatura para 37 °C, quando em contato com o hospedeiro, o fungo adota a forma leveduriforme com brotamentos característicos e ocupando diversos nichos dentro dos órgãos internos do hospedeiro, de acordo com sua tolerância a fatores como temperatura, hormônios e resposta do sistema imune (San-Blas et al. 2002; Bagagli et al. 2008).

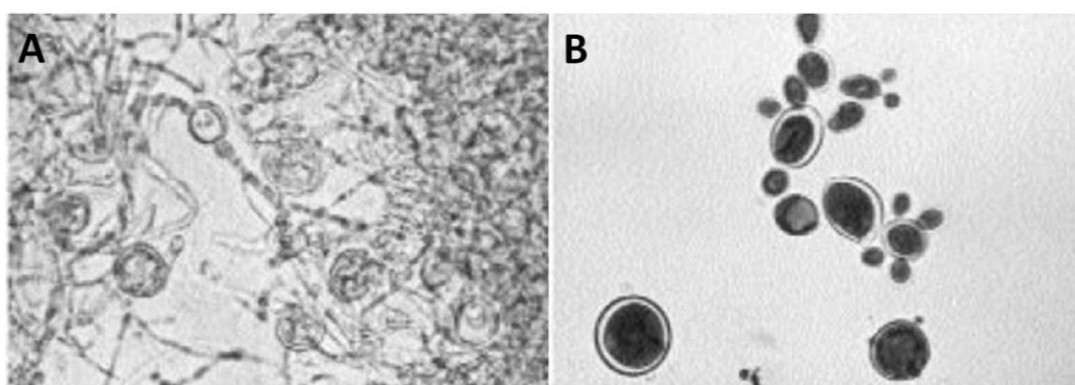


Figura 1. Transição de fase em *Paracoccidioides brasiliensis*. **A** - Aparência microscópica da forma micelial do fungo *P. brasiliensis* a 24 °C onde se observa a formação de hifas septadas e clamidósporos - estruturas de resistência (40X). **B** - Aparência microscópica da forma leveduriforme a 36 °C onde se observa a formação de múltiplos brotamentos, característicos de *P. brasiliensis* (40X) (Corredor et al. 1999).

A parede celular do fungo, uma matriz contendo complexos proteína-polissacarídeos, é uma estrutura intercambiável cuja composição e organização estrutural são reguladas durante o ciclo celular em resposta às mudanças nas condições ambientais. As formas leveduriforme e micelial apresentam quitina como polissacarídeo comum, com o carboidrato α -1,3-glucana predominante na forma leveduriforme e β -1,3-glucana predominante na forma micelial (Kanetsuna et al. 1972; San-Blas & San-Blas 1977; San-Blas 1985).

Esses polissacarídeos são fibrilares e determinam, em certo grau, a forma do fungo. Além disso, galactomananas são encontradas na parede celular da forma micelial (Kanetsuna et al. 1972). Em 1985, San-Blas e San-Blas (San-Blas 1985) propuseram que, pela atividade combinada de β -glucanases e dissulfeto redutases, a parede celular da forma leveduriforme vai se tornando 'afrouxada' em torno de ilhotas discretas de β -1,3-glucanas. A 37 °C, a alta atividade das dissulfeto redutases e mais alta taxa de síntese de quitina e α -1,3-glucanas em relação às β -1,3-glucanas, resulta na forma leveduriforme. A 22 °C, as dissulfeto redutases apresentam baixa atividade e a síntese de glucanas ocorre em baixa velocidade. Assim, longas fibrilas de β -1,3-glucanas são formadas nos sítios nascentes.

A transição morfológica em *P. brasiliensis*, além da alteração na composição e estrutura dos carboidratos da parede celular, também é precedida por outras alterações moleculares (San-Blas 2001). Genes diferentemente expressos correspondem a diversas categorias funcionais, como catabolismos de aminoácidos, metabolismo da parede celular, a resposta ao estresse oxidativo e a síntese de proteínas (Bastos et al. 2007). Por exemplo, várias proteínas relacionadas ao choque térmico/estresse oxidativo são expressas preferencialmente na transição micélio-levedura, incluindo a HSP88, HSP90 e as isoformas de HSP70 (Rezende 2011).

Uma reorganização global do metabolismo de carboidratos também é observada durante a transição morfológica micélio-levedura (Rezende 2011). A fase micelial apresenta um metabolismo mais aeróbico comparado com a fase leveduriforme, com alta expressão de genes codificadores da isocitrato desidrogenase e da succinil-CoA, sugerindo uma mudança metabólica para a fosforilação oxidativa (Felipe et al. 2005). Em contraste, a fase leveduriforme exibe um metabolismo direcionado para a produção de etanol via fermentação (Felipe et al. 2005). Além disso, foi demonstrado que a via do glioxalato é prevalente na fase leveduriforme (Felipe et al. 2005).

I.1.2. Paracoccidioidomicose (PCM)

A paracoccidioidomicose, descoberta em 1908 por Aldofo Lutz (Lutz 1908), é a infecção granulomatosa sistêmica causada pelo fungo *P. brasiliensis*. Primeiramente ela afeta os pulmões, de onde pode se disseminar para outros órgãos e sistemas. Lesões secundárias frequentemente aparecem nas membranas mucosas, linfonodos, pele e glândulas adrenais (Brummer et al. 1993; Visbal et al. 2005).

Essa doença é altamente prevalente na América Latina (Figura 2), particularmente no Brasil, Colômbia, Venezuela e Argentina, sendo que o Brasil é o país de maior endemicidade e responde por 80% dos casos relatados (Fava e Netto 1998). As áreas endêmicas possuem temperaturas médias (entre 17 e 28 °C), chuvas moderadas (900 – 1810 mm/ano), florestas abundantes, numerosos cursos d'água e inverno curto e verão chuvoso

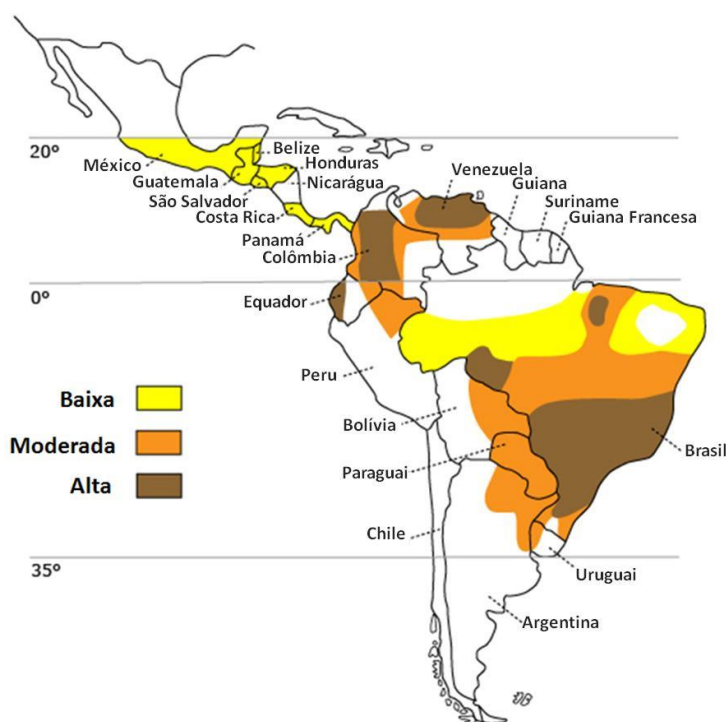


Figura 2. Distribuição geográfica da PCM. A PCM é prevalente na América Latina e, no Brasil, o maior número de casos é observado nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (Colombo AL 2007).

A PCM é um problema de saúde pública importante cuja magnitude a mantém entre as principais doenças endêmicas no Brasil. Em um estudo de 15

anos (1980 –1995), Coutinho e colaboradores (Coutinho et al. 2002) evidenciaram 3181 mortes por PCM, com uma média de 1,85 mortes para cada 100.000 habitantes. Em outro estudo, foi observado que, dentre as mortes por micoses sistêmicas ocorridas entre 1996 e 2006 no Brasil, a PCM (incluindo a blastomicose) foi a mais frequente, com uma média anual de 171 mortes (53,9%) no começo do estudo e 148 mortes (44,6%) no final (Prado 2009).

A mortalidade por PCM é maior que por leishmaniose, sendo a oitava causa mais comum de morte quando se consideram as doenças infecto-parasitárias crônicas e recorrentes. Além disso, é a micose sistêmica de mais alta mortalidade no país (Coutinho et al. 2002).

No Brasil, a maioria dos casos ocorre nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste com caráter endêmico entre as populações de zona rural. Também tem sido relatada a ocorrência de casos em áreas de colonização mais recente, submetidas a desmatamento, como em partes da Amazônia, atingindo áreas dos estados do Maranhão, Tocantins, Pará, Mato Grosso, Rondônia, Acre e Amazonas, onde a PCM pode ser considerada uma micose sistêmica emergente (MS 2012). Os maiores índices de mortalidade ocorrem na região Sudeste, especialmente nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, e na região Sul, nos estados do Paraná e Rio Grande do Sul (Prado 2009).

I.1.2.1. Infecção e formas clínicas da PCM

A infecção por *P. brasiliensis* se dá por inalação dos esporos fúngicos da fase micelial (Figura 3). A adesão dos propágulos infecciosos de *P. brasiliensis* durante a infecção das células hospedeiras é o passo inicial crucial para subsequente invasão, colonização e crescimento. Provavelmente, o fungo entra como protoplasto e regenera sua parede celular no citoplasma hospedeiro. Esse processo parece envolver grandes alterações no citoesqueleto do hospedeiro (interferência na morfologia da actina, tubulina e componentes da citoqueratina), sugerindo que a capacidade das células fúngicas serem internalizadas pode ser importante no desenvolvimento da doença (Mendes-Giannini, Soares et al. 2005).

A internalização de *P. brasiliensis* pelas células epiteliais e endoteliais poderia ser um mecanismo de evasão dos macrófagos, já que as células epiteliais e endoteliais do hospedeiro serviriam como reservatório para o fungo, protegendo-o dos macrófagos e permitindo seu acesso à corrente sanguínea e, conseqüentemente, aos outros tecidos (Mendes-Giannini et al. 2004; Mendes-Giannini et al. 2005; Filler & Sheppard 2006).

Em um hospedeiro competente, o crescimento das leveduras fúngicas é inibido e a interação termina sem dano aparente ao hospedeiro (infecção subclínica). Nesses casos, o *foco* primário desaparece e o fungo é normalmente destruído. Porém, se o balanço hospedeiro-parasita é quebrado por imunossupressão ou outras causas, a infecção pode progredir dando origem à doença propriamente dita (Bialek et al. 2000).

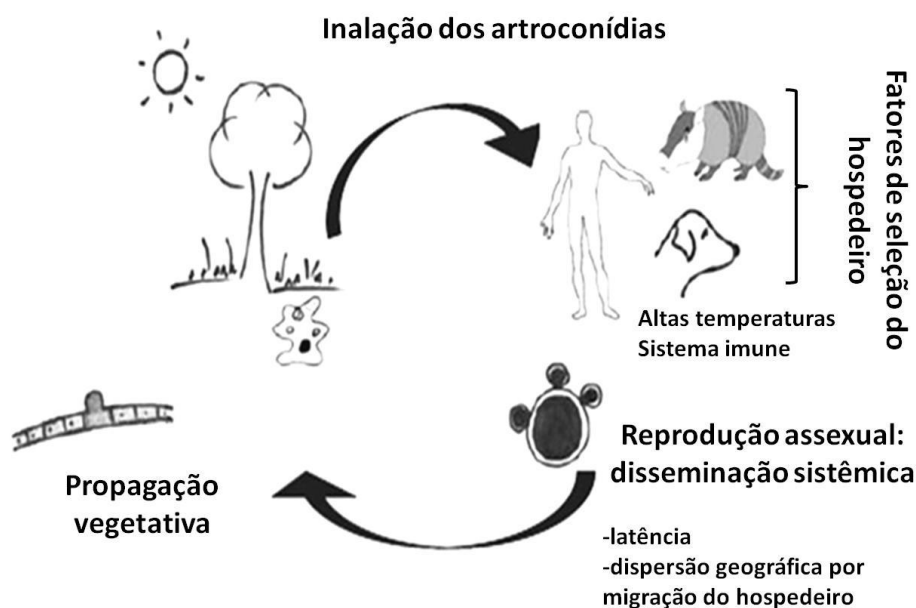


Figura 3. Ciclo biológico hipotético de *P. brasiliensis* demonstrando a sua transição de fases. Inicialmente o fungo encontra-se no solo, sob a forma micelial. Quando os propágulos infectivos são inalados pelo hospedeiro, *P. brasiliensis* pode assumir seu estado assexuado, leveduriforme, e levar à doença clínica. Adaptado de Bagagli et al, 2008 (Bagagli et al. 2008).

Em 1987, Franco e colaboradores (Franco et al. 1987) propuseram uma classificação que se tornou referência para a PCM:

- 1- Fase infecciosa – subclínica, detectada apenas por positividade em testes na pele;
- 2- Doença propriamente dita:

2.1. Forma aguda ou subaguda – usualmente pacientes jovens, ambos os sexos, com tropismo do fungo para o sistema reticulo endotelial;

2.2. Forma crônica – principalmente em adultos do sexo masculino. Pode ser unifocal, quando apenas um órgão está envolvido, ou multifocal, quando envolve mais órgãos, principalmente pulmões e mucosa oral;

3- PCM sequelar – normalmente uma doença pulmonar crônica e obstrutiva.

A forma clínica aguda, também chamada juvenil, representa cerca de 3 a 5% dos casos, tem um curso rápido (semanas a meses) e é marcada pelo envolvimento do sistema reticulo-endotelial (baço, fígado, linfonodos e medula óssea). A resposta imune celular é severamente deprimida nos pacientes com esta forma da doença (Franco et al. 1987). Nos pacientes com a forma aguda, frequentemente se observa linfadenomegalia, manifestações digestivas, hepatoesplenomegalia, envolvimento ósteo-articular e lesões cutâneas (Shikanai-Yasuda 2006).

Já a forma crônica ou adulta ocorre em mais de 90% dos pacientes, mais frequentemente em homens. Isso porque o hormônio estrógeno inibe a transição micélio-levedura. Essa forma da doença progride lentamente podendo demorar meses ou anos até se estabelecer completamente. Além dos sintomas da fase juvenil, as manifestações pulmonares são evidentes na maioria dos casos (Franco et al. 1987).

Na fase crônica são comuns os sintomas nos pulmões, sistema tegumentar e laríngeo (tosse, dispneia, expectoração muco purulenta, lesões ulceradas em pele, mucosa de nasofaringe, odinofagia, disfagia, disfonia). Sintomas relacionados ao comprometimento adrenal (astenia, emagrecimento, hipotensão, escurecimento de pele, dor abdominal) ocorrem em cerca de 50% dos casos e o envolvimento do sistema nervoso central (cefaleia, *déficit* motor, convulsões, alterações de comportamento e/ou nível de consciência) ocorre em cerca de 6 a 25% dos casos (MS 2012).

Independentemente do órgão acometido pela infecção, a PCM geralmente causa fibrose, o que pode interferir seriamente no bem-estar do paciente já que a esta leva a alterações anatômicas e funcionais dos órgãos

afetados durante a doença, particularmente os pulmões, supra-renais e sistema nervoso central (Borges-Walmsley et al. 2002).

I.1.2.2. Diagnóstico da PCM

Um diagnóstico rápido e preciso da PCM possibilitaria o pronto início da terapia específica evitando maiores danos aos pulmões (sítios primários da infecção), além da disseminação para outros órgãos e desenvolvimento de fibrose (Correa et al. 2007).

O padrão-ouro do diagnóstico da PCM baseia-se na identificação direta do fungo. O diagnóstico definitivo da PCM é tipicamente dependente da visualização do fungo em biópsias e amostras clínicas ou de seu isolamento por cultura. No entanto, esse processo consome muito tempo, além de ser pouco sensível (Londero 1986).

Os testes sorológicos podem ajudar a definir o diagnóstico e a avaliar a resposta ao tratamento ou a recorrência da doença (Marques 2012). Dentre os métodos imunológicos, baseados na detecção de anticorpos específicos, destacam-se as técnicas como fixação de complemento, imunodifusão e ensaios imunoenzimáticos (ELISA).

Vários trabalhos têm demonstrado o uso de antígenos recombinantes derivados do fungo em ensaios imunológicos para o diagnóstico de PCM (Diez et al. 2003; Albuquerque et al. 2005; Correa et al. 2007). O uso de antígenos recombinantes facilita a purificação do antígeno, melhora o rendimento do diagnóstico, além de diminuir reatividade cruzada.

Os métodos moleculares permitem a identificação do fungo sem a necessidade de cultura. São rápidos, altamente específicos e sensíveis. O fungo *P. brasiliensis* já foi identificado utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) com iniciadores para sequências específicas codificadoras de proteínas desse fungo (Goldani & Sugar 1998; Gomes et al. 2000).

O envolvimento pulmonar deve ser investigado em todos os casos utilizando diferentes técnicas de diagnóstico por imagem (Marques 2012).

O diagnóstico diferencial em indivíduos imuno-comprometidos com infiltrado pulmonar e que apresentam problemas respiratórios crônicos inclui tuberculose, histoplasmose e pneumonia por *Pneumocystis carinii*. As imagens clínicas e radiológicas da pneumonia podem ser semelhantes à PCM. O diagnóstico de ambas as infecções pode ser estabelecido por análises histológicas do tecido comprometido em lâminas coradas pelo método de Grocott, porém, em alguns casos, ainda assim existem dúvidas quanto à presença de células de *P. brasiliensis* (Silletti 1996).

I.1.2.3. Tratamento da PCM

O tratamento da paracoccidioidomicose é normalmente prolongado, com muitos pacientes recebendo terapia por um ou dois anos. Na ausência de tratamento, a doença é usualmente fatal (Borges-Walmsley et al. 2002).

O principal tratamento contra a doença é a terapia química, com uso de antifúngicos que interferem na via metabólica de esteróides de membrana ou na síntese da β -1,3-glucana da parede celular (Odds et al. 2003).

Dentre os antifúngicos que interferem no metabolismo dos componentes da membrana fúngica estão as sulfonamidas, a anfotericina B e os derivados de imidazol (Shikanai-Yasuda 2006).

As sulfonamidas, que inibem competitivamente a enzima catalizadora da reação de síntese de ácido fólico (precursor de ácidos nucléicos), ultimamente complementadas com trimetopim, são normalmente eficientes, de baixo custo, com baixa toxicidade e de fácil administração oral. Porém, o longo período de tratamento frequentemente desencoraja os pacientes a segui-lo (Shikanai-Yasuda 2006). O tratamento usual demora 12 meses para os casos leves e 24 meses para as infecções clínicas moderadas (Marques 2012).

O antifúngico anfotericina B se liga ao ergosterol (esteróide da membrana fúngica) levando à quebra da integridade osmótica da membrana. Essa droga só é administrada intravenosamente sob condições restritas e com avaliação renal freqüente, já que é nefrotóxica. Além disso, o custo do tratamento é elevado (San-Blas & Nino-Vega 2008).

A introdução dos azóis representa um avanço no tratamento das doenças fúngicas. Eles agem na biossíntese do ergosterol alterando a permeabilidade e fluidez da membrana. Imidazóis (cetoconazol) e triazóis (fluconazol, saperconazol e itraconazol) são altamente ativos contra culturas *in vivo* de *P. brasiliensis* e apresentam poucos efeitos colaterais. O tratamento dura de 2 a 12 meses com poucas recidivas (San-Blas & Nino-Vega 2008; Marques 2012).

O itraconazol é considerado a melhor opção para as formas clínicas moderadas da doença e o tratamento dura de 12 a 18 meses. O fluconazol, por sua vez, é indicado para a PCM no sistema nervoso central (Marques 2012).

Antifúngicos que bloqueiam a síntese de glucanas da parede celular fúngica, como as equinocandinas (micafungina – Mycamine[®], Astellas Pharma ou caspofungina – Cancidas[®], Merck) estão sendo utilizados no tratamento, sob condições restritas, de candidíase e aspergilose. Essas drogas podem ser promissoras no tratamento de PCM por serem altamente específicas, já que as glucanas são carboidratos específicos de fungos e, portanto, ausentes em mamíferos (Shikanai-Yasuda 2006).

A pesquisa por agentes quimioterápicos novos e mais efetivos contra *P. brasiliensis* com pouco ou nenhum efeito colateral continua, visto que as drogas atuais apresentam muitos problemas associados como longo tempo de tratamento, efeitos colaterais, alto custo e resistência iminente (San-Blas & Nino-Vega 2008).

I.1.3. A proteína Pb27

Em 1996, McEwen e colaboradores (McEwen et al. 1996) descreveram a clonagem e sequenciamento de uma região genômica de *P. brasiliensis* que codificava para uma proteína antigênica de aproximadamente 27 kDa. Essa proteína, denominada Pb27, foi a segunda proteína recombinante de *P. brasiliensis* a ter seu gene clonado. A primeira foi a Gp43, um antígeno imunodominante que teve sua sequência nucleotídica clonada em 1996 e caracterizada por Cisalpino et al (Cisalpino et al. 1996)

A proteína Pb27 já foi imunolocalizada como uma proteína citoplasmática e associada à parede celular (Reis et al. 2008; Garcia Blanco et al. 2011). Essa localização é interessante visto que proteínas da parede celular são alvo preferencial para o desenho de drogas antifúngicas e vacinas, já que a parede celular dos fungos desempenha papel ativo na interação patógeno-hospedeiro e seus componentes são específicos para fungos (Pitarch et al. 2008).

Em 1998, Ortiz et al (Ortiz et al. 1998) utilizaram essa proteína recombinante em ensaios de ELISA para detecção de anticorpos reativos em soros de pacientes com PCM. O antígeno foi capaz de identificar a presença de anticorpos em 73,4% dos soros analisados. Mais tarde, em 2003, Díez et al (Diez et al. 2003), utilizaram uma combinação da Pb27 com outra proteína recombinante de *P. brasiliensis* de 87 kDa e observaram, em ensaios de ELISA, sensibilidade de 92% e especificidade de 88% na detecção da PCM.

A proteína recombinante Pb27 (Pb27r) também já foi utilizada como o antígeno em testes de *dotblot*. Nesses ensaios, soros de pacientes com PCM, utilizados em conjunto ou individualmente, reconheceram a proteína sem reação cruzada com outras micoses e tuberculose e com sensibilidade de 100%. Mais uma vez, a Pb27 recombinante foi confirmada como sendo de grande valor no sorodiagnóstico de PCM; agora em um novo formato de teste diferente do ELISA (Correa et al. 2007).

Diéz et al em 1999 (Diez et al. 1999) utilizaram a técnica de PCR para estudos ecológicos de *P. brasiliensis*. Nesse ensaio, eles avaliaram a amplificação da sequência nucleotídica de Pb27 em solos artificialmente contaminados com o fungo e em tecidos de tatus capturados em uma área endêmica na Colômbia. Esse estudo mostrou que a sequência do gene codificador da Pb27 pode ser utilizada como marcador da presença do fungo em diferentes amostras.

A proteína Pb27 recombinante também foi utilizada em ensaios de imunização em camundongos BALB/c desafiados com *P. brasiliensis*. Foi observado um efeito aditivo entre a imunização associada à quimioterapia com fluconazol, sugerindo que uma vacina baseada na Pb27r pode ser utilizada para melhorar o tratamento com antifúngicos (Fernandes et al. 2011b). A mesma proteína, combinada com outro antígeno de *P. brasiliensis*, o Pb40r,

forneceu um excelente ensaio de imunodiagnóstico, com altos valores de sensibilidade e especificidade, mesmo em relação a outras micoses semelhantes (Fernandes et al. 2011a; Fernandes et al. 2011c).

Além do uso de proteínas recombinantes em ensaios imunológicos, o uso de peptídeos antigênicos sintéticos se tornou uma alternativa interessante para a confecção de vacinas e ensaios diagnósticos. As regiões antigênicas de uma proteína que são reconhecidas pelo sítio de ligação ou paratopo de imunoglobulinas são chamadas de epitopos de células B e esses epitopos são mais eficientes em ativar células B quando localizados em regiões expostas da proteína (Nossal. 1994). Assim, a validação de epitopos depende de sua localização espacial na proteína.

Análises da sequência do gene da Pb27 em diferentes isolados de *P. brasiliensis* revelaram que ela é uma proteína altamente conservada entre as espécies S1, PS2 e PS3, sendo a mais alta expressão observada no isolado A1, com uma tendência geral de maior expressão na fase leveduriforme. No entanto, a Pb27 apresentou uma sequência divergente no isolado Pb01 (*P. lutzii*) (Garcia Blanco et al. 2011).

Assim, a baixa variabilidade genética desta proteína nas espécies não-Pb01 junto com sua expressão em todos os isolados, sua expressão preferencial na fase leveduriforme e sua localização associada à superfície reforça seu potencial uso como ferramenta de diagnóstico (Garcia Blanco et al. 2011).

Além do fato da proteína Pb27 ser uma boa candidata para procedimentos imunoterapêuticos e de diagnóstico, a compreensão de sua estrutura tridimensional poderá ser importante para se desvendar sua função biológica no fungo, permitindo talvez, um maior entendimento da interação hospedeiro-parasita em paracoccidiodomicose.

Mais ainda, a estrutura tridimensional desta proteína, obtida em resolução atômica, possibilitará a caracterização dos epitopos de superfície de células B, tanto no que diz respeito às suas identidades quanto às suas conformações estruturais. Isso será útil também para o desenvolvimento de kits diagnósticos e vacinas para a PCM.

Algumas características bioquímicas da proteína Pb27 de *P. brasiliensis* foram preditas a partir da pesquisa da sequência codificadora para

essa proteína depositada por McEwen e colaboradores (McEwen et al. 1996), código de acesso U41503.1 depositada no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) em diversos servidores gratuitos como o CDD, que faz uma predição de domínios conservados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>); o PsiPred, que realiza predição de estrutura secundária (<http://bioinf3.cs.ucl.ac.uk/cgi-bin/psipred>) e XtalPred, que faz diversas predições como facilidade de cristalização da proteína, presença de peptídeo sinal e região transmembrana (<http://ffas.burnham.org/XtalPred-cgi/xtal.pl>). Essas predições estão apresentadas no Apêndice I.

O servidor CDD (Marchler-Bauer 2013) consiste de uma coleção de alinhamentos múltiplos de sequências para domínios antigos e proteínas completas. Inclui domínios certificados pelo NCBI e utiliza a informação da estrutura tridimensional para explicitar domínios definidos e fornecer relações sequência/estrutura/função bem como modelos de domínios importados de diversos bancos de dados externos (Pfam, SMART, COG, PRK e TIGRFAM). Assim, a proteína Pb27 apresenta um domínio nucleotidil transferase de função desconhecida (DUF1814) que faz parte de uma grande família de proteínas não caracterizadas.

O PsiPred (McGuffin 2000) é um servidor de predição de estrutura secundária que incorpora três métodos para inferir o enovelamento de proteínas globulares e de membrana para obtenção de informação estrutural a partir unicamente da sequência de aminoácidos. A proteína Pb27 apresenta elementos de estrutura secundária preditos com sete regiões de α -hélice e sete regiões de fitas- β .

O servidor XtalPred (Slabinski L 2007) realiza uma predição da propensão à cristalização de proteínas. A previsão é feita comparando várias características da proteína e combinando esses resultados em uma probabilidade global de cristalização dividida em cinco classes: ótima, subótima, média, difícil e muito difícil. As características das proteínas calculadas incluem: tamanho, massa molecular, índice de hidrofobicidade, índice de instabilidade, coeficiente de extinção, ponto isoelétrico e quantidade de resíduos de Cys, Met, Trp, Tyr e Phe, úteis no cálculo dos índices citados. As características das proteínas previstas incluem: estrutura secundária,

regiões desordenadas, regiões de baixa complexidade, *coiled-coil*, hélices transmembrana e peptídeos de sinal. Essas predições são realizadas por outros servidores que o XtalPred utiliza. A proteína Pb27 foi classificada como pertencente à classe de difícil cristalização. No entanto, algumas características foram promissoras, como não apresentar regiões transmembrana e peptídeo sinal.

II.2. Metodologia

I.2.1. Cultivo do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*

O fungo *P. brasiliensis* Pb18 é mantido no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular coordenado pelo professor Alfredo Góes do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

As células leveduriformes são cultivadas em meio de cultura YPD sólido (extrato de levedura 0,5% (p/v), peptona 0,5% (p/v), glicose 1,5% (p/v) e ágar 1,5% (p/v)) e são realizados repiques semanais.

I.2.2. Extração do RNA e produção do cDNA de células leveduriformes *P. brasiliensis*

Células leveduriformes de *P. brasiliensis* crescidas em meio YPD líquido (extrato de levedura 0,5% (p/v), peptona 0,5% (p/v) e glicose 1,5% (p/v)) por 7 dias a 35 °C e agitação de 100 rpm foram centrifugadas a 1550g por 3 minutos a 25 °C. As células recuperadas foram então lavadas três vezes com PBS estéril (Tampão fosfato salino: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 9,1 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM pH7,4) por adição do tampão seguida de centrifugação (1550g, 3 min, 25 °C) e descarte do sobrenadante.

A extração do RNA foi realizada com o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA): 1 mL do reagente foi adicionado para cada 0,2 g de células e foram adicionadas micropérolas de vidro estéreis. Essa mistura foi vortexada por 30 minutos.

Para a remoção dos restos celulares, a mistura foi centrifugada a 10.000g por 1 min a 25 °C e o sobrenadante obtido foi utilizado nas etapas de separação de fases, precipitação do RNA e lavagem de acordo com o manual do fabricante do reagente Trizol.

O RNA obtido foi utilizado para a síntese da primeira fita do cDNA por RT-PCR utilizando o kit RevertAid H (Fermentas, Glen Burnie, USA) de acordo com o manual do fabricante.

I.2.3. Desenho dos iniciadores e amplificação da sequência codificadora da Pb27 (gene *pb27*)

Iniciadores foram desenhados a partir da sequência codificadora para a proteína Pb27 de *P. brasiliensis* depositada por McEwen e colaboradores (McEwen et al. 1996): código de acesso U41503.1/ AAC49615.1 – “*Paracoccidioides brasiliensis* 27 kDa antigen mRNA, partial CDS”.

Esses iniciadores foram utilizados para amplificação dessa sequência a partir do cDNA de células leveduriformes de *P. brasiliensis*. Eles continham as sequências para as enzimas de restrição *NdeI* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) no iniciador direto e *XhoI* (Fermentas, Glen Burnie, USA) no iniciador reverso para clonagem no vetor de expressão pET28a((TEV). As sequências correspondentes aos sítios de clivagem das enzimas de restrição estão em negrito.

pb27-NdeI (Direto) **CAT ATG** GCG CCG CTC AGT TCC

($T_{\text{anelamento}} = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$)

pb27-XhoI (Reverso) **C TCG AGT** CTA GTT GTG GAA GAC AGC GCT

($T_{\text{anelamento}} = 57\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Após teste inicial de amplificação, foi preparada uma reação de 50 μL utilizando 10 μg de cDNA, 0,2 pmol/ μl de cada iniciador, 0,5 U de *Platinum Taq* DNA polimerase *High Fidelity* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2 mM de MgSO_4 , 0,2 mM da mistura dos 4 desoxinucleotídeos e o tampão da enzima (Tris- SO_4 60 mM pH 8,9 e sulfato de amônio 18 mM). O programa utilizado foi:

94 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 minutos (desnaturação inicial);

30 ciclos de desnaturação a 94 $^{\circ}\text{C}$ por 30 segundos, anelamento a

55 $^{\circ}\text{C}$ por 30 segundos e extensão a 68 $^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto;

68 $^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos (ciclo final de extensão).

I.2.4. Clonagem do gene *pb27* no vetor de clonagem pGEM-T (Promega)

A sequência amplificada anteriormente foi purificada utilizando o kit '*Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification*' da GE Healthcare (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) e posteriormente ligada ao plasmídeo pGEM-T (Promega) utilizando o kit do vetor de acordo com as recomendações do fabricante na proporção 3 inserto: 1 vetor.

Bactérias *Escherichia coli* DH5 α eletrocompetentes foram transformadas da seguinte forma: 50 μ L de bactérias e 1 μ L da reação de ligação foram adicionados a uma cubeta apropriada e eletroporados a 1,8 V. Logo em seguida, foram adicionados 200 μ L de meio LB líquido (peptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L e NaCl 5 g/L pH 7,4) e a mistura foi deixada sob agitação por 1 h a 37 °C para expressão do gene de resistência. Posteriormente, a mistura foi plaqueada em meio seletivo LB/ágar 1,5% (p/v) com ampicilina 100 μ g/ml e deixada em estufa, a 37 °C por 16 horas.

As colônias foram avaliadas por PCR de colônia (segundo o mesmo protocolo de amplificação do gene *pb27*) e aquelas positivas foram crescidas por 18 h a 37 °C e 200 rpm em meio LB líquido com ampicilina 100 μ g/mL.

Após extração plasmidial, o vetor recombinante obtido (pGEM-*pb27*) foi utilizado para a digestão com as enzimas de restrição *Nde*I e *Xho*I para liberação do inserto e posterior ligação no vetor pET28a((TEV) também digerido com as mesmas enzimas.

I.2.5. Clonagem do gene *pb27* no vetor de expressão pET28a(TEV)

Para a expressão da proteína Pb27 recombinante foi utilizado o vetor pET28a((TEV), um vetor pET28a (Novagen, Darmstadt, Alemanha) modificado pela inserção de um sítio de clivagem para a protease TEV (*Tobacco etch virus*) que retira a cauda de histidinas N-terminal adicionada pelo vetor (Carneiro et al. 2006) (Figura 4).

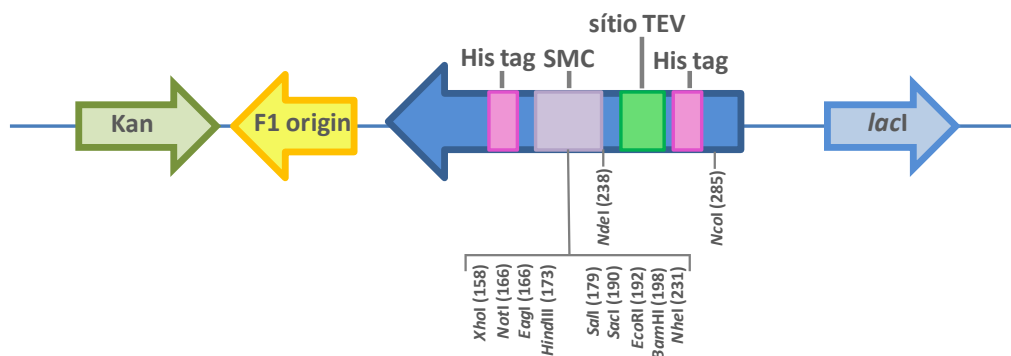


Figura 4. Desenho esquemático do vetor pET28a(TEV) – 5357 pb. Observamos a cauda de histidinas (*His tag*) e o sítio de clivagem para a TEV protease que são adicionados à sequência da proteína recombinante, além do sítio múltiplo de clonagem (SMC) e as enzimas de restrição compatíveis.

Para a transferência do gene *pb27* do vetor de clonagem pGEM para o vetor de expressão pET28a((TEV) foram utilizadas as enzimas *NdeI* (Invitrogen) e *XhoI* (Fermentas) em dupla digestão: 5 µg do vetor pET28a((TEV) foram digeridos por 4 h a 37 °C com 10 U da enzima *NdeI* e 20 U enzima *XhoI* utilizando o tampão React6 (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, MgCl₂ 6 mM, KCl 50 mM e NaCl 50 mM, Invitrogen). O vetor recombinante pGEM-*pb27* também foi digerido com as duas enzimas: 5 µg do vetor foram incubados com 10 U de *NdeI* e 20 U de *XhoI* a 37 °C por 4 h.

Ambos, pET28a((TEV) digerido e gene *pb27* liberado do pGEM digerido, foram purificados em gel de agarose utilizando o kit '*Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification*' da GE.

A ligação do inserto (*pb27* digerido) com o vetor pET28a((TEV) foi realizada na proporção 5 inserto: 1 vetor.

Bactérias *E. coli* BL21 eletrocompetentes foram transformadas com o vetor recombinante pET28a-*pb27*. A reação de transformação foi realizada de acordo com o item I.2.4. A mistura foi plaqueada em meio seletivo LB/ágar 1,5% com canamicina 50 µg/ml e deixada em estufa, a 37 °C por 16 horas. Os clones obtidos foram analisados através do PCR de colônias utilizando os iniciadores específicos para a sequência do gene *pb27* e o programa apresentado no item I.2.3, seguido de ensaio eletroforético em gel de agarose

para visualizar a presença do inserto. Os clones positivos foram crescidos e, após extração plasmidial, foram sequenciados como no item I.2.6.

I.2.6 - Extração de DNA plasmidial e sequenciamento dos clones positivos

Os clones bacterianos contendo o vetor desejado foram cultivados a 37 °C durante 16 horas em 5 mL de meio LB líquido com o antibiótico correspondente. O *pellet* bacteriano obtido, após 10 minutos de centrifugação a 5000g e temperatura ambiente, foi lisado e os plasmídeos recombinantes purificados com a utilização do Kit Mini-prep QIAprep (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo as recomendações do fabricante. Esses plasmídeos correspondentes aos clones positivos foram sequenciados no núcleo de Análise do Genoma e Expressão Gênica (NAGE/ICB/UFMG) com o auxílio do *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit For MegaBACE DNA Analysis* (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Inglaterra) utilizando, para o vetor pET28a((TEV), os iniciadores T7 específicos:

T7 (direto) 5´ TAATACGACTCACTATAGGG 3´ (T_{anelamento} = 48 °C)

T7 (reverso) 5´ GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3´ (T_{anelamento} = 51 °C)

Os cromatogramas obtidos foram analisados manualmente e as sequências comparadas com a sequência depositada no GenBank. Os alinhamentos comparativos foram realizados no programa Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/cgi-bin/multalin.pl>).

I.2.7. Eletroforese em gel de agarose

Esse método é capaz de separar fragmentos de DNA através de sua migração diferencial na agarose. A localização do DNA é realizada diretamente

através do fluoróforo *Syber safe* (Invitrogen, Carlsbad, USA) devido à afinidade desse componente por sequência de nucleotídeos.

O gel constituiu-se de 1% (p/v) de agarose dissolvida por aquecimento em tampão TAE 0,5X (1,14 mL ácido acético glacial; 2 mL de EDTA 0,5 M e Tris-base 4,8 g/L pH 8,0). A esta solução adicionou-se o corante *Syber Safe* (na concentração 1X).

Após a polimerização, as amostras foram aplicadas no gel e a corrida eletroforética realizada em uma voltagem constante de 80 V. A visualização das bandas foi realizada utilizando-se radiação ultravioleta.

I.2.8. Expressão da proteína recombinante Pb27

Após teste inicial de expressão em volume de 10 mL, bactérias *E. coli* BL21 DE3 transformadas com o vetor de expressão pET28a((TEV) contendo o gene *pb27* clonado foram inoculadas em 20 mL de meio LB suplementado com canamicina 50 µg/ml. Após incubação por 16 h a 37 °C e 200 rpm, essa cultura foi transferida para 2 L de meio LB com canamicina 50 µg/ml e, após alcançar a OD 600 entre 0,5 – 0,6, a cultura foi induzida com IPTG na concentração final de 0,5 mM e cultivada a 37 °C, 200 rpm por mais 4 h.

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 debris celulares foram removidos por centrifugação a 4 °C durante 30 min a 10.000g.

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 %.

I.2.9. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida- SDS-PAGE 12%

A análise eletroforética de proteínas foi realizada em géis de poliacrilamida com SDS, como descrita por Laemmli, 1970 (Laemmli 1970) no sistema Mini-Protean Tetra Cell da BioRad (Hercules, USA). As proteínas foram aquecidas a 100 °C por 15 minutos em tampão de amostra (SDS 2% (p/v), glicerol 10% (v/v) e azul de bromofenol 0,002% (p/v) em Tris-HCl 0,065 M pH 6,8) e separadas em gel contendo poliacrilamida 12% (p/v), bis-acrilamida 0,3% (p/v) e SDS 0,1% (p/v), em Tris-HCl 0,375 M pH 8,8. O gel de empilhamento foi constituído de poliacrilamida 3% (p/v), bis-acrilamida 0,3% (p/v) e SDS 0,1% (p/v) em Tris-HCl 0,125 M pH 6,8. Os géis de separação e empilhamento foram polimerizados na presença de persulfato de amônio 0,1% (p/v) e TEMED (1:2000, v/v). A corrida foi realizada em tampão constituído de glicina 0,192 M, SDS 0,1% (p/v) e Tris 0,025 M pH 8,5 em uma voltagem constante de 100 V.

Para visualizar as bandas de proteínas, o gel foi incubado por duas horas em solução de etanol 15% (v/v), ácido acético 7% (v/v) e “*Coomassie Brilliant Blue*” R250. A seguir, a solução de etanol 10% (v/v) e ácido acético 5% (v/v) foi utilizada para a remoção do excesso de corante. Os géis foram então fotografados.

O marcador de peso molecular utilizado foi o *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas, Glen Burnie, USA) com as seguintes proteínas: β -galactosidase (116 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), ovoalbumina (45 kDa), lactato desidrogenase (35 kDa), REase Bsp981 (25 kDa), β -lactoglobulina (18,4 kDa) e lisozima (14,4 kDa).

I.2.10. Purificação e clivagem da proteína recombinante Pb27 com protease TEV

I.2.10.1. Purificação por cromatografia de afinidade da proteína Pb27r e clivagem da cauda de histidinas

O sobrenadante, obtido após lise e remoção dos debrís celulares, adicionado de 30 mM de imidazol, foi carregado na coluna de afinidade HisTrap HP (GE Healthcare Biosciences) de 5 mL conectada ao ÄKTA Prime (GE Healthcare Biosciences) pré-equilibrada com 5 volumes de tampão de equilíbrio A (tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4; NaCl 500 mM e imidazol 30 mM) filtrado e degaseificado.

Após lavagem com esse mesmo tampão, a proteína recombinante foi eluída com gradiente crescente e linear de tampão de eluição B (tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4; NaCl 500 mM e imidazol 500 mM) filtrado e degaseificado. O fluxo durante a aplicação da amostra foi de 1 mL/min e durante as lavagens, 5 mL/min.

A amostra obtida após a primeira afinidade foi dessalinizada em coluna HiPrep 26/10 (GE Healthcare), que permite a rápida dessalinização da amostra em pouco tempo. Um volume de 15 mL da amostra foi aplicado na coluna a um fluxo de 5 mL/min e eluída em tampão Tris-Cl 20 mM pH 7,4 e NaCl 50 mM com o mesmo fluxo.

A amostra dessalinizada foi adicionada de DTT 1 mM e submetida à clivagem com a protease TEV para retirada da cauda de histidinas na proporção 1 TEV: 5 Pb27 *overnight* a 30 °C. A clivagem foi confirmada por espectrometria de massas, gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% e/ou pela presença da amostra da proteína Pb27r no *eluato* após a segunda cromatografia de afinidade.

Após a clivagem, a amostra foi submetida a uma nova purificação por cromatografia de afinidade para retirada da protease TEV (que possui cauda de histidinas, mas não o sítio de clivagem). O protocolo utilizado foi o mesmo da primeira cromatografia de afinidade.

I.2.10.2. Purificação por cromatografia de exclusão molecular (gel filtração) da proteína recombinante Pb27

A amostra obtida foi concentrada em Vivaspin 6 - 10000 MWCO (GE Healthcare) até um volume de 5 mL e aplicada em coluna de gel filtração – Superdex 30 prepgrade (HiLoad 16/60) da GE também conectada ao Äkta Prime. A coluna foi previamente equilibrada em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 e NaCl 50 mM e a proteína foi eluída no mesmo tampão com um fluxo de 0,5 mL/min.

I.2.11. Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas em solução foi determinada por dois métodos. No primeiro, o método de Bradford (Bradford 1976), as amostras de proteína com volume de 20 µl em diferentes diluições foram distribuídas em duplicata em placas de 96 poços com adição de 180 µL de reagente de Bradford (“Coomassie Brilliant Blue” G-250 0,1% (p/v) em solução aquosa contendo etanol 5% (v/v) e ácido fosfórico 10% (v/v), filtrado em papel de filtro número 1). Uma curva padrão também foi realizada para cada placa utilizando solução de BSA (albumina sérica bovina) 1 mg/mL em diferentes diluições como proteína padrão. A leitura das absorvâncias a 595 nm foi realizada em espectrofotômetro (Elx800, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA) e os valores obtidos comparados com a curva padrão com o objetivo de expressar a concentração de proteínas na amostra em mg/mL.

Outro método utilizado para dosagem das proteínas foi através da medida da absorvância a 280 nm. Como a proteína Pb27 já foi sequenciada, seu coeficiente de extinção molar foi obtido no servidor ExPASy – ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>). Com o uso da seguinte fórmula:

$$A = \varepsilon \times l \times c$$

Onde A , é a absorvância a 280 nm; ε , o coeficiente de extinção molar; l , o caminho óptico da cubeta em cm, e c , a concentração molar da proteína. Para a Pb27r, $\varepsilon = 19940 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ com a cauda de histidinas ou $\varepsilon = 18450 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, para a Pb27r clivada com a TEV.

I.2.12. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS – *dynamic light scattering*) da proteína Pb27 recombinante

A Pb27r purificada em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 e NaCl 20 mM na concentração aproximada de 1,9 mg/mL foi submetida ao ensaio de espalhamento dinâmico de luz (DLS) realizado no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) hoje Laboratório Nacional de Biociências, LNBio, em Campinas, São Paulo.

A amostra protéica foi previamente centrifugada a 12.000g por 15 minutos a temperatura ambiente para retirar qualquer material suspenso. Um volume de 80 µL do sobrenadante obtido foi colocado em uma cubeta de quartzo de 3 mm de caminho óptico. A cubeta foi acoplada ao aparelho DynaPro (Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, CA, USA) com temperatura controlada em 18 °C. Os dados coletados após 300 medidas foram analisados no programa Dynamics V6. O valor médio do raio da partícula foi expresso em nanômetros e sua massa molecular em kDa.

I.2.13. Estudos de estrutura secundária da proteína Pb27 recombinante por Dicroísmo circular (CD – *circular dichroism*)

Para estudos de estrutura secundária, a proteína Pb27r clivada foi diluída para a concentração de 0,2 mg/mL em tampão fosfato de sódio 2 mM pH 7,4 e NaCl 2 mM. A amostra foi centrifugada a 12.000g por 15 minutos à temperatura ambiente para retirar qualquer material suspenso. Um volume de 250 µL foi submetido ao dicroísmo circular.

Os espectros de dicroísmo circular foram medidos com o espectropolarímetro Jasco 810 (Jasco corporation, Tóquio, Japão) do LNBio, com a temperatura variando de 20 a 80 °C em uma cubeta de quartzo com 0,1 cm de caminho óptico, entre 190 a 260 nm de comprimento de onda. Cada espectro corresponde à diferença entre a média das dez varreduras realizadas para cada temperatura e as cinco varreduras realizadas para o tampão em que elas estavam diluídas.

Os parâmetros utilizados foram os seguintes: sensibilidade: 100 mdeg; início: 260 nm; fim: 190 nm; intervalo: 0,5 nm; modo de varredura: contínuo; velocidade de varredura de 50 nm/min; resposta de 4 s; raio de 1 nm e acumulação de 10 leituras.

I.2.14. Cristalização da proteína recombinante Pb27 e coleta dos dados de difração de raios-X

Os ensaios iniciais de cristalização foram realizados com a Pb27r com cauda 6xHis (10 mg/mL) e sem a cauda 6xHis (7 mg/mL) e se utilizou a técnica da gota suspensa. Nessa técnica, a solução de proteína, juntamente com uma solução precipitante adequada, é adicionada a uma lamínula na forma de uma gota invertida sobre um recipiente contendo 1 mL da mesma solução precipitante, vedando-o. Com a difusão do vapor do solvente, a gota se torna supersaturada possibilitando a formação de cristais.

Foram utilizados, nos ensaios iniciais, os kits *Crystal Screen* HR2-110 e HR2 -112 (Hampton Research, Aliso Viejo, USA) com gotas em várias proporções solução protéica/solução precipitante. Um total de quatro placas de 48 poços foram produzidas para cada proteína avaliada e mantidas a 18 °C.

Também foram realizados testes com a Pb27 clivada nas concentrações entre 25 e 60 mg/mL em diversas proporções proteína/solução do poço. As caixinhas foram incubadas a 4 °C na tentativa de melhoria dos cristais obtidos.

Além disso, alíquotas da Pb27 clivada (concentração de 20 mg/mL) foram enviadas para o Laboratório Nacional de Biociências - LNBio em Campinas, para o teste de mais de 500 condições de cristalização pelo uso de um robô de cristalização (RoboLab).

Os cristais formados foram submetidos à difração de raios-X nas facilidades do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) na linha MX2.

Para a coleta dos dados de difração, um cristal em forma de agulha foi separado de um feixe cristalino e submetido à difração de raios-X. Essa “agulha” foi removida com um *loop* de nylon e transferida para uma solução criogênica contendo etilenoglicol na concentração final de 10% (9 µL da

solução do poço de cristalização e 1 µL de etilenoglicol). Esse cristal foi então vitrificado em nitrogênio líquido na temperatura de 100 K e os dados de difração foram obtidos.

Foi utilizado o detector MARCCD na linha MX2 no LNLS e cada imagem de difração foi exposta por 90 s com 1° de rotação. Essas imagens foram processadas utilizando o pacote de programas HKL2000 (Otwinowski 1997) sendo que quando referido ao processamento de dados derivados, foi realizado o escalonamento anômalo.

I.2.15. Estratégias para derivatização dos cristais da proteína Pb27r

Como ponto de partida para a preparação de cristais derivados, foi utilizada a abordagem da crio-derivatização rápida. Imediatamente antes de congelar o cristal para a coleta dos dados, ele foi imerso, durante um curto intervalo de tempo (15 – 300 segundos), em uma gota de solução crioprotetora a base de etilenoglicol com alta concentração (0,25 – 1,0 M) de sais de átomos pesados. Foram utilizados NaI, CsCl, GdCl₃, Fenil Acetato de mercúrio (Hg), Pt(NH₃)₂Cl₂, K₂PtCl₄ e *JBS Magic Triangle* (Jena Biosciences).

Também foram realizados ensaios de co-cristalização da proteína Pb27r na presença desses mesmos sais em concentrações variadas entre 5 e 10 vezes maiores que a concentração molar da proteína.

A proteína Pb27r foi expressa com substituição dos resíduos de metionina por seleno-metionina (SeMet) seguindo o protocolo disponível em (Bergfors 2009).

Assim, bactérias *E. coli* BL21 DE3 transformadas com o vetor de expressão pET28a(TEV) contendo o gene *pb27* clonado foram inoculadas em 20 mL de meio LB suplementado com canamicina 50 µg/ml. Após incubação por 16 h a 37 °C e 200 rpm, o volume de 1 mL dessa cultura foi centrifugado à 13000g por 2 minutos.

O pellet foi então ressuspendido em 1 mL de meio M9 (200 mL de uma solução M9 5X autoclavada composta por 64 g/L Na₂HPO₄·7H₂O, 15 g/L KH₂PO₄ monobásico, 2,5 g/L NaCl e 5 g/L NH₄Cl adicionada de 2 mL de MgSO₄ 1M autoclavado, 20 mL de glicose 20% esterelizada por filtração e 0,1

mL de CaCl_2 1 M autoclavado para 1 litro de meio) suplementado com canamicina (concentração final de 50 $\mu\text{g/ml}$) e adicionado à 1 litro de meio M9/canamicina.

A cultura foi incubada a 37 °C e 200 rpm até $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 0,5 – 0,8 (aproximadamente 9 horas) e então adicionou-se, para cada litro de cultura, 100 mg de L-lisina, L-fenilalanina e L-treonina; 50 mg de L-isoleucina, L-leucina e L-valina e 60 mg de Se-Met. Após incubação por 15 min, a 37 °C e 200 rpm, a temperatura foi diminuída para 20 °C e, após a estabilização da cultura nesta temperatura, foram adicionados 500 μL de IPTG 1M para cada litro (concentração final 0,5 mM). Após 16 horas a 20 °C e 200 rpm, as células foram recuperadas, lisadas e a proteína Pb27r-SeMet foi purificada conforme os itens I.2.8 e I.2.10.

A proteína Pb27r-SeMet foi então submetida à novos testes de cristalização utilizando os kits comerciais Morpheus (Molecular Dimensions, Suffolk – UK) e JCSG (Qiagen, Netherlands); PEG ion (Hampton Research), além das mesmas condições em que a Pb27r nativa foi cristalizada.

Essa etapa de expressão e cristalização da proteína Pb27r-SeMet foi realizada durante o período de estágio de doutoramento no laboratório do Dr. Alwyn Jones no Department of Cell and Molecular Biology, BioMedical Center - Uppsala University, Suécia, sob orientação da Dr. Terese Bergfors.

I.3. Resultados e discussão

I.3.1. Clonagem e expressão do gene *pb27* de *P. brasiliensis*

O gene *pb27* de *Paracoccidioides brasiliensis* após amplificação e subclonagem no vetor de clonagem pGEM, foi ligado no vetor pET28a(TEV) também digerido com as mesmas enzimas. Bactérias *E. coli* BL21(DE3) foram transformadas com o vetor recombinante obtido. Na figura 5, observamos um gel de agarose das amostras obtidas após um PCR das colônias resultantes da transformação das bactérias *E. coli* BL21(DE3) com o vetor recombinante pET28a-*pb27*. As colônias 3, 4, 5, 6, 8 e 9 foram positivas, ou seja, um fragmento de aproximadamente 700 pb (equivalente ao gene *pb27*) foi amplificado.

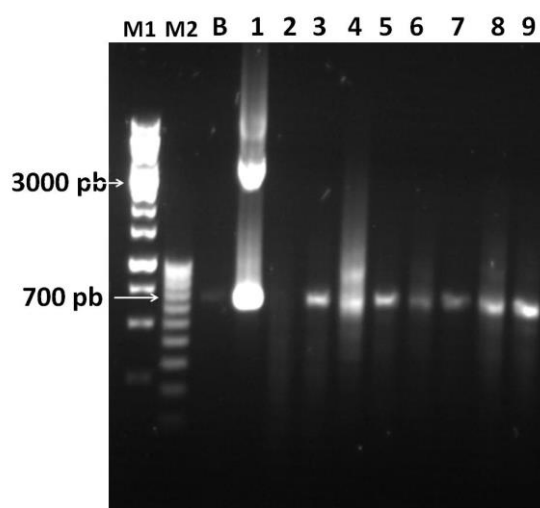


Figura 5. PCR de colônia das bactérias *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com o vetor recombinante pET28a-*pb27*. Observamos que as colônias 3, 4, 5, 6, 8 e 9 apresentaram a amplificação de um fragmento de aproximadamente 700 pb. M1 – marcador λ Hind; M2 – marcador 100 pb plus; B – branco da reação de PCR (todos os reagentes são adicionados com exceção do DNA); 1 – controle positivo, utilizando um plasmídeo que já continha o gene *pb27* clonado como DNA molde; 2 - 8 – colônias de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com pET28a-*pb27*.

A sequência de nucleotídeos da Pb27r obtida nesse trabalho (ver Apêndice II) apresentou algumas substituições quando alinhada com aquela depositada no banco de dados NCBI (número de acesso U41503.1, “*Paracoccidioides brasiliensis* 27 kDa antigen mRNA, partial cds”). Porém,

todas as substituições correspondem ao mesmo aminoácido após tradução, como observado na figura 6, que mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos entre a proteína Pb27 sequenciada e aquelas que apresentam identidade após pesquisa no BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Observamos que os três primeiros resíduos de aminoácidos que correspondem à proteína Pb27 nativa (quando se retira os resíduos adicionados pelo vetor) divergem da sequência depositada por McEwen e colaboradores (McEwen et al. 1996). Nessa sequência, os três resíduos iniciais eram Ala-Arg-Ala (ARA) e para a proteína desse trabalho são Met- Ala-Pro (MAP), que é consistente com as sequências **EEH17245.1**, “*conserved hypothetical protein P. brasiliensis Pb18*” e **EEH37678.1**, “*conserved hypothetical protein Paracoccidioides sp. 'lutzii' Pb01*” obtidas após o sequenciamento do genoma de duas espécies de *P. brasiliensis*, Pb03 e Pb18 e uma de *P. lutzii*, Pb01 (Desjardins CA 2011).

É interessante notar na figura 6 que a proteína Pb27 de *P. brasiliensis* apresenta grande similaridade com proteínas de outros fungos, *Uncinocarpus reesii*, *Ajellomyces dermatitidis*, *Ajellomyces capsulatus* e *Coccidioides immitis*. No entanto, todas essas proteínas são hipotéticas. Assim, a caracterização da proteína Pb27 pode, também, servir para a identificação de função de proteínas tidas como hipotéticas em outros fungos.

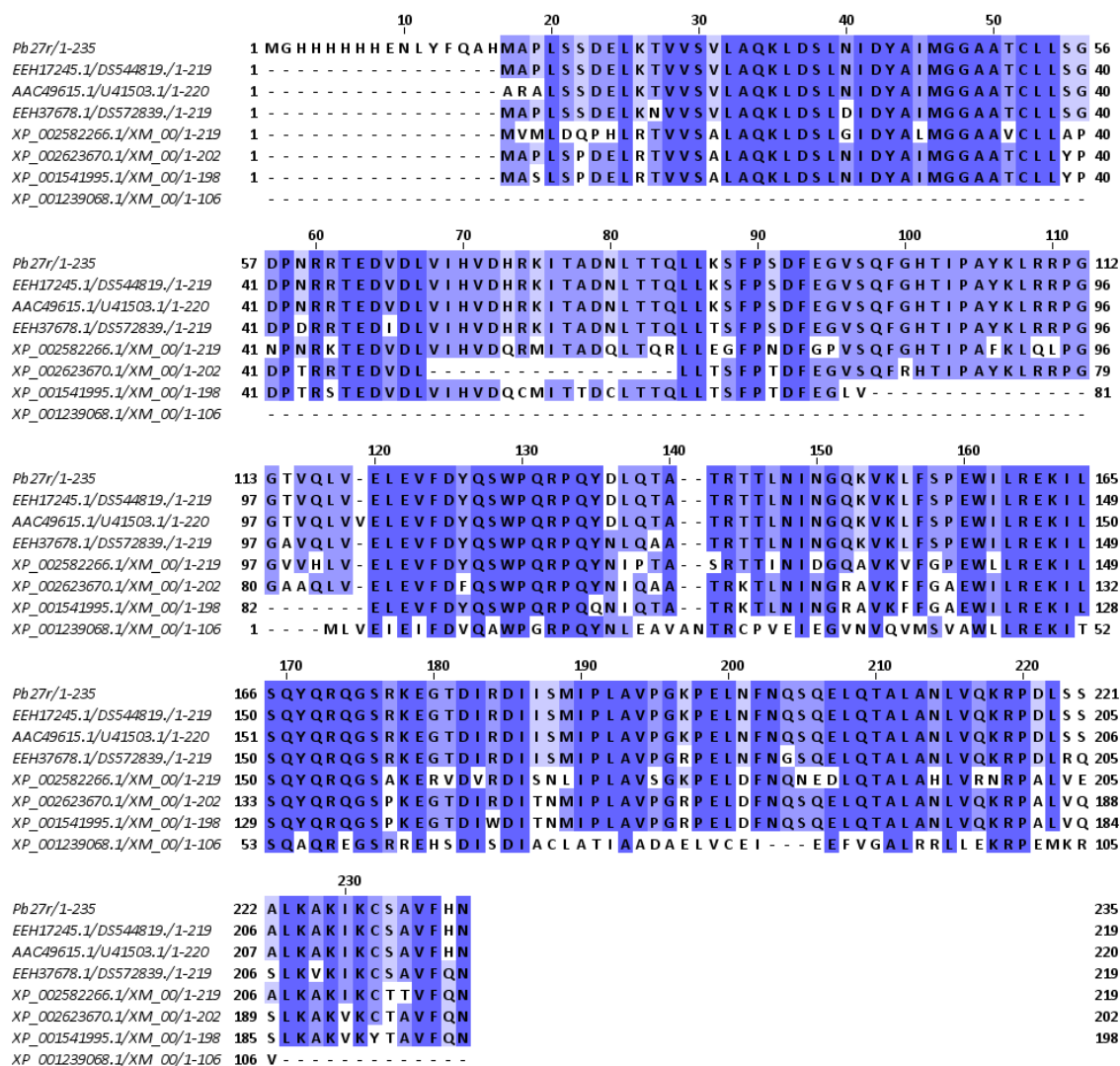


Figura 6. Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína sequenciada nesse trabalho e aquelas que apresentaram similaridades após pesquisa no BLASTp. EEH17245.1, “conserved hypothetical protein *P. brasiliensis* Pb18”; AAC49615.1, “27 kDa antigen *P. brasiliensis*”; EEH37678.1, “conserved hypothetical protein *Paracoccidioides* sp. ‘lutzii’ Pb01”; XP_002582266.1, “hypothetical protein *Uncinocarpus reesii* 1704”; XP_002623670.1, “hypothetical protein *Ajellomyces dermatitidis* SLH14081”; XP_001541995.1, “conserved hypothetical protein *Ajellomyces capsulatus* NAm1”; XP_001239068.1, “hypothetical protein *Coccidioides immitis* RS”. O alinhamento foi realizado no servidor Multalin (Corpet 1988) e visualizado no programa Jalview (Waterhouse et al. 2009). O alinhamento foi colorido de acordo com a porcentagem de identidade entre as sequências, sendo que a quanto maior a identidade entre as sequências, mais escura é a cor aplicada.

Um dos clones positivos obtidos foi então submetido à expressão da proteína recombinante Pb27 (Pb27r). A expressão a 37 °C mostrou a Pb27r no extrato solúvel com uma pequena parte presente no extrato insolúvel. Prosseguimos com a purificação a partir do extrato solúvel, já que esta

apresentou um bom rendimento. Na figura 7 observamos uma banda de pouco mais de 25 kDa após 4 horas de expressão e, em sua maior parte, no extrato solúvel. A massa molecular teórica da Pb27r é 24,4 kDa mais 2 kDa adicionados pelo vetor (cauda de histidinas e sítio de clivagem da TEV), resultando em uma proteína de 26,4 kDa.

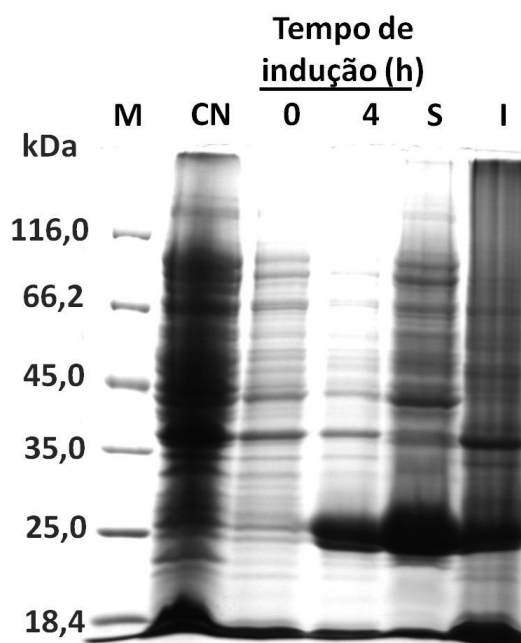


Figura 7. Expressão da proteína Pb27 recombinante em *E. coli* BL21 (DE3) a 37 °C. A proteína Pb27r (~26 kDa) foi expressa na fração solúvel. M – marcador de peso molecular; CN – controle negativo, bactérias *E. coli* BL21 (DE3) não transformadas; 0 e 4 h – tempos de indução; S – extrato solúvel e I – extrato insolúvel.

I.3.2. Purificação e clivagem da cauda de histidinas da proteína Pb27r de *P. brasiliensis*

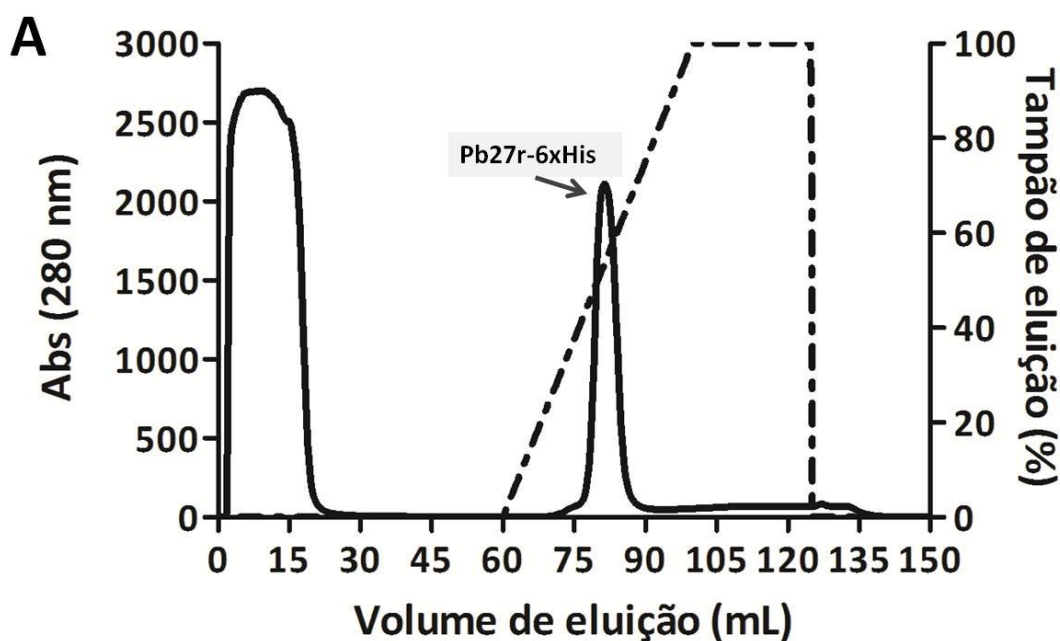
O extrato solúvel obtido após expressão foi purificado por cromatografia de afinidade ao níquel (Figura 8A). Após essa etapa, com o volume de amostra correspondente a um litro de expressão, obtivemos aproximadamente 63 mg de proteína, na concentração de 5,3 mg/mL.

A amostra obtida foi então clivada com a protease TEV na proporção 5 mg de Pb27r para cada 1 mg de TEV *overnight* à temperatura de 30 °C. Para retirada da TEV, a amostra foi submetida a uma nova purificação por

cromatografia de afinidade (Figura 8B). Como a protease TEV recombinante também possui cauda de histidinas, nessa segunda etapa de purificação, a TEV fica ligada à coluna e a Pb27r sai no eluato, antes do gradiente. Após a segunda cromatografia de afinidade, a quantidade de proteína obtida foi menor: 43,5 mg, numa concentração de 4,3 mg/mL, ou seja, quase 30% da amostra é perdida durante a clivagem.

A Pb27r clivada foi então submetida à cromatografia de gel filtração Superdex 30 (Figura 8C) e eluída em um único pico de eluição correspondendo a uma massa de aproximadamente 21 kDa (volume de eluição de 97 mL), o que aproxima bastante da massa de um monômero de Pb27r. Esse resultado foi possível após a calibração da coluna por meio de uma regressão linear do gráfico dos volumes de eluição de proteínas padrão com a sua massa molecular conhecida.

Após a purificação por gel filtração, obtivemos 30,2 mg de Pb27r na concentração de 2,7 mg/mL, em um volume de 11 mL. Essa quantidade, apesar das perdas, permite o teste de inúmeras condições de cristalização. Na tabela 1 podemos acompanhar o rendimento das etapas de purificação da proteína Pb27r com um valor final de 47,7% ou 30,2 mg de proteína após a última etapa de purificação.



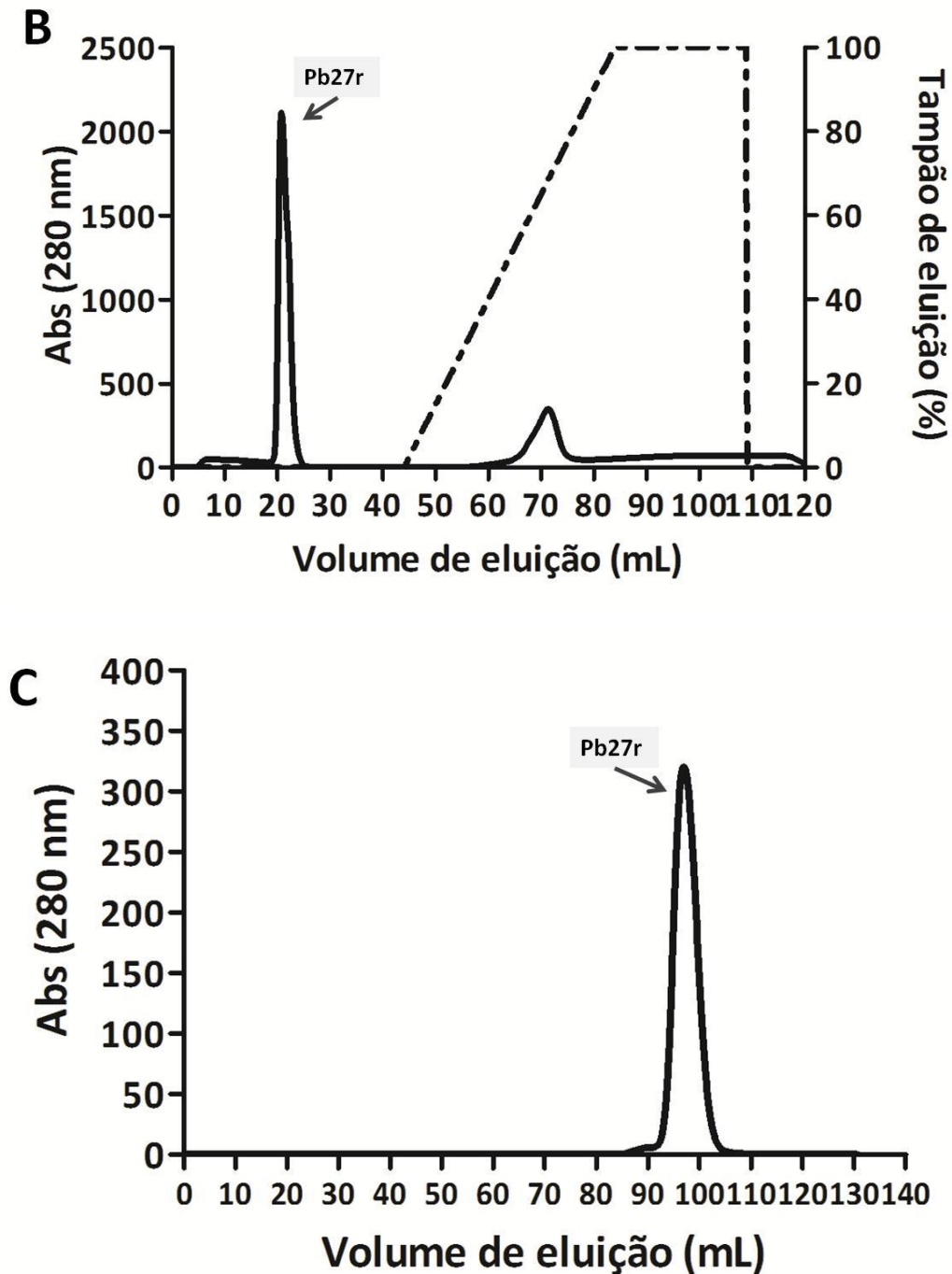


Figura 8. Purificação da Pb27r. A proteína recombinante Pb27 foi purificada por cromatografias de afinidade e gel filtração, onde eluiu com um volume correspondente a um monômero. **A** – Perfil após primeira purificação por cromatografia de afinidade; **B** – Perfil após segunda purificação por afinidade, agora da Pb27r clivada; **C** – Perfil após cromatografia de gel filtração. Linhas tracejadas correspondem ao gradiente de eluição (% de tampão de eluição).

Tabela 1. Rendimento da purificação da proteína Pb27r. O rendimento foi calculado em relação à quantidade de proteína total obtida após cada etapa de purificação medida utilizando leitura à 280 nm e o coeficiente de extinção molar da Pb27 não clivada e clivada.

Etapa de purificação	Volume total (mL)	Proteína total (mg)	Rendimento (%)
1ª. HisTrap	12	63,3	100
2ª. HisTrap	10	43,5	68,7
Superdex 30	11	30,2	47,7

As etapas de purificação da proteína Pb27r foram acompanhadas por SDS-PAGE (figura 9), onde observamos um alto grau de pureza.

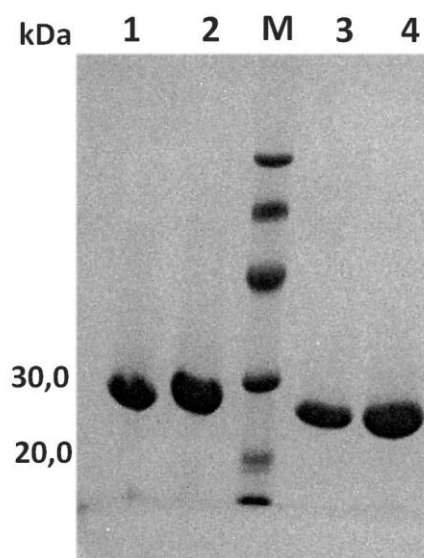


Figura 9. SDS-PAGE 12% da purificação da Pb27r. A proteína Pb27 apresentou um alto grau de pureza após a purificação por gel filtração. 1 – Amostra obtida após a primeira purificação por cromatografia de afinidade; 2 – Amostra obtida após dessalinização; 3 - Marcador de massa molecular; 4 – Amostra obtida após clivagem com a protease TEV e segunda purificação por cromatografia de afinidade e 5 – Amostra obtida após purificação por cromatografia de gel filtração.

I.3.3. Análise de estrutura secundária da Pb27r

O dicroísmo circular é uma técnica particularmente útil para o estudo de moléculas quirais, tais como proteínas e carboidratos, que possuem unidade opticamente ativas. Quando tais moléculas interagem com a luz circularmente polarizada provocam uma alteração da luz incidente. O fenômeno de dicroísmo circular consiste na absorção diferencial da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita por essas moléculas quirais (Sreerama & Woody 2004).

Para proteínas, essa técnica tem sido utilizada com frequência em estudos de estrutura secundária e enovelamento. Um espectro típico de α -hélice é caracterizado por duas bandas negativas próximas a 222 e 208 nm e uma banda negativa próxima a 192 nm. Um espectro de CD característico de folhas- β apresenta uma banda negativa em 215 nm e uma positiva em 198 nm e pequenas bandas adicionais próximas a 175 nm (negativa) e 168 nm (positiva) também são frequentes. No entanto, espectros de CD para estruturas- β são difíceis de caracterizar devido às variações na geometria de tais estruturas (Sreerama & Woody 2004).

A análise da estrutura secundária da Pb27r utilizando Dicroísmo Circular mostrou que a proteína, em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, está enovelada e apresenta um perfil típico de α -hélices, com a presença de dois picos negativos em 220 e 208 nm e um positivo em 195 nm no gráfico de elipcidade molar *versus* comprimento de onda (figura 10A).

Após a deconvolução dos dados (figura 10B), utilizando o programa CDNN, observamos que a proteína apresenta cerca de 25% de α -hélices a 20 °C, e parece ser bem sensível à aumentos de temperatura, já que na temperatura de 45 °C, a quantidade de estruturas “*random coil*” aumentou bastante e a 55 °C, a quantidade de α -hélices ficou menor que a quantidade de “*random coil*”.

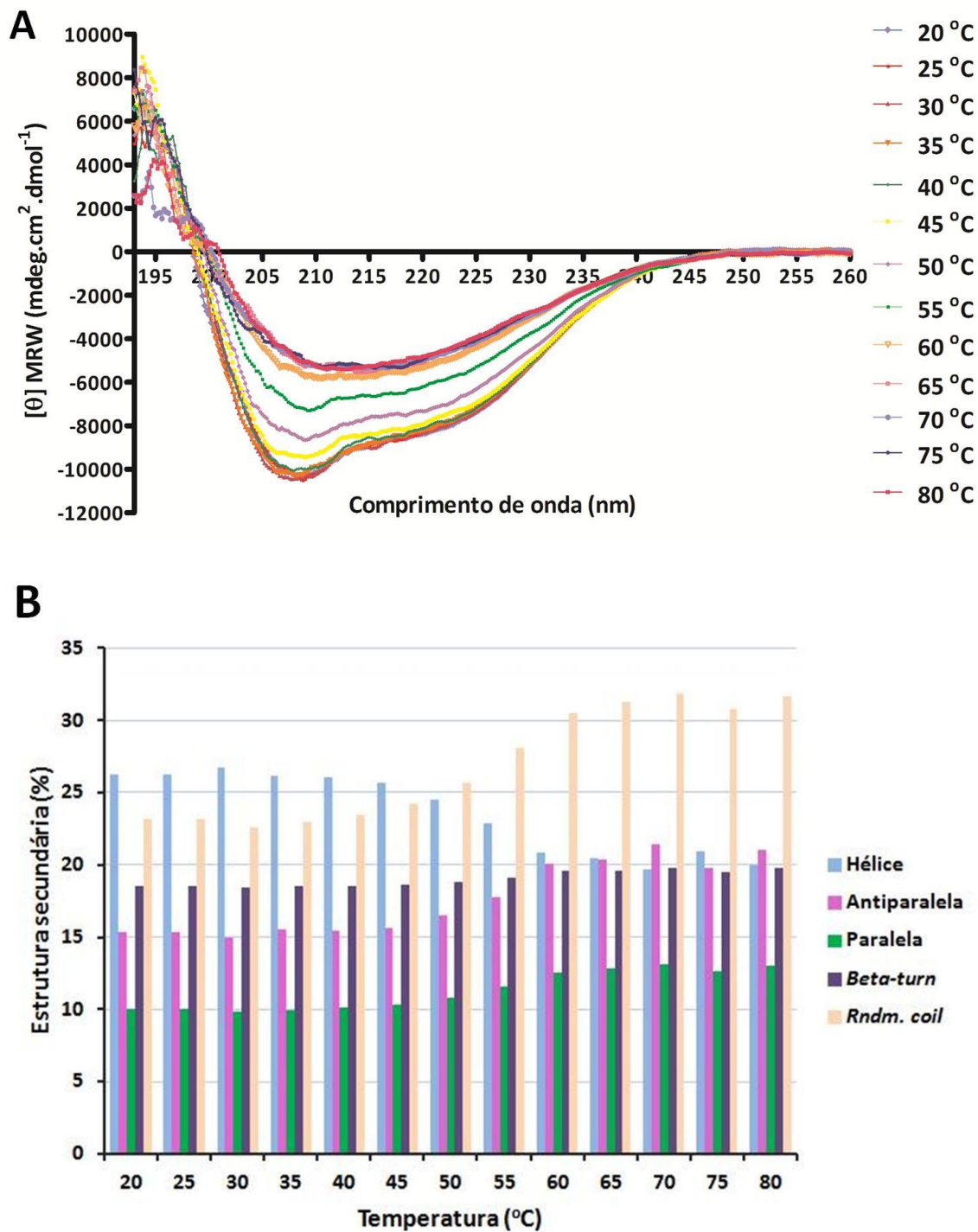


Figura 10. Análise da estrutura secundária da proteína Pb27r clivada. Em **A**, o gráfico de elipicidade molar (MRW) *versus* comprimento de onda, mostrando um perfil típico de α -hélices. Em **B**, o gráfico obtido após a deconvolução dos dados obtidos em A, onde observamos a porcentagem de estrutura secundária em cada temperatura testada. Na temperatura de 55 °C, a proteína Pb27r perde grande parte de sua estrutura secundária enovelada.

Com os resultados de deconvolução dos dados de difração circular também observamos que já na temperatura de 20 °C, a proteína Pb27r apresentou cerca de 20% de “*random coil*”. Regiões desordenadas (“*random coil*”) em uma cadeia polipeptídica são regiões com ausência de um enovelamento bem estruturado de sua estrutura terciária, sendo parcialmente ou totalmente desenoveladas (revisado por (Dunker 2002; Dyson 2005)). Devido à sua natureza flexível, tais regiões têm sido relacionadas a diversas funções de sinalização celular, regulação e controle, muitas vezes se tornando enoveladas no contato com seu ligante (Fink 2005). Vale notar também que os valores de elipcidade molar próximos a 190 nm são bastante variados diminuindo a confiabilidade da predição de estrutura secundária nessa região. Essa variação de leitura nessa região acontece principalmente pela elevada voltagem nessa região com o tampão utilizado.

O DLS (*Dynamic Light Scattering*) é uma técnica que utiliza as flutuações de intensidade da luz espalhada para medir o tamanho de partículas em solução. As flutuações de intensidade da luz são induzidas pelo movimento das partículas devido a colisões com as moléculas do solvente (movimento Browniano). Especificamente, a luz espalhada pelas moléculas sob movimento Browniano interfere construtiva ou destrutivamente, dependendo das posições relativas das moléculas da partícula no volume de espalhamento. Essas flutuações ocorrem em escalas de tempo relacionadas com a velocidade de movimento das moléculas, e, portanto, dependem de seu tamanho e forma (Matte 2007).

A taxa das flutuações de intensidade detectadas é utilizada para calcular um coeficiente de difusão, que é convertido em um raio hidrodinâmico da partícula através da equação de Stoke-Einstein:

$$D = \frac{\kappa_B T}{6\pi\eta R_h}$$

Onde D é o coeficiente de difusão translacional, κ_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, η é a viscosidade e R_h é o raio hidrodinâmico da partícula (Harding 1994; Harding & Jumel 2001; Lorber et al. 2012).

Por definição, o raio medido no DLS é o raio de uma esfera hipotética que se difunde na mesma velocidade que a partícula examinada. Na prática,

macromoléculas em solução são não esféricas, dinâmicas e solvatadas. Assim, o raio medido no DLS é um indicativo do tamanho aparente da partícula hidratada/solvatada, daí a terminologia raio hidrodinâmico (Harding 1994; Harding & Jumel 2001; Lorber et al. 2012).

Quando a amostra está polidispersa, vários raios são observados nas diferentes medidas, ou seja, existem partículas de tamanhos diferentes na amostra. Quando a amostra é monodispersa, praticamente o mesmo raio é observado nas várias repetições, assim, a amostra apresenta partículas mais semelhantes.

Essa técnica é útil para informar sobre a polidispersidade de uma amostra, já que é sensível à agregação e conseqüentemente, tentar prever uma melhor capacidade de formar cristais. Isso ocorre porque observações empíricas sugerem que macromoléculas monodispersas (com todas as partículas do mesmo tamanho), sob condições normais de solvente, cristalizam mais facilmente (Ferre-D'Amare & Burley 1994). Além disso, a polidispersidade origina-se de interações não específicas entre partículas, que, em altas concentrações, leva à agregação randômica em maior quantidade que a cristalização ordenada (Rhodes 2000).

Com os resultados de DLS obtidos com a Pb27r (Figura 11), observamos que 83% da massa das partículas em solução apresenta um raio de 2,2 nm que corresponde a aproximadamente 22 kDa, mostrando que a proteína se comporta como um monômero em solução. O valor massa é estimado com base na massa de uma partícula esférica de mesmo coeficiente de difusão translacional da amostra em teste.

Além disso, os dados de DLS também dão informação sobre a polidispersidade das soluções em teste. A polidispersidade descreve a largura da curva da distribuição de tamanho de partícula, indicando uma maior variabilidade nos valores de raios hidrodinâmicos estimados para as partículas na solução em teste. Assim, a Pb27 se comporta como uma partícula monodispersa já que sua polidispersidade (%Pd) foi de quase 11% e soluções monodispersas usualmente apresentam polidispersidade menor que 20%.

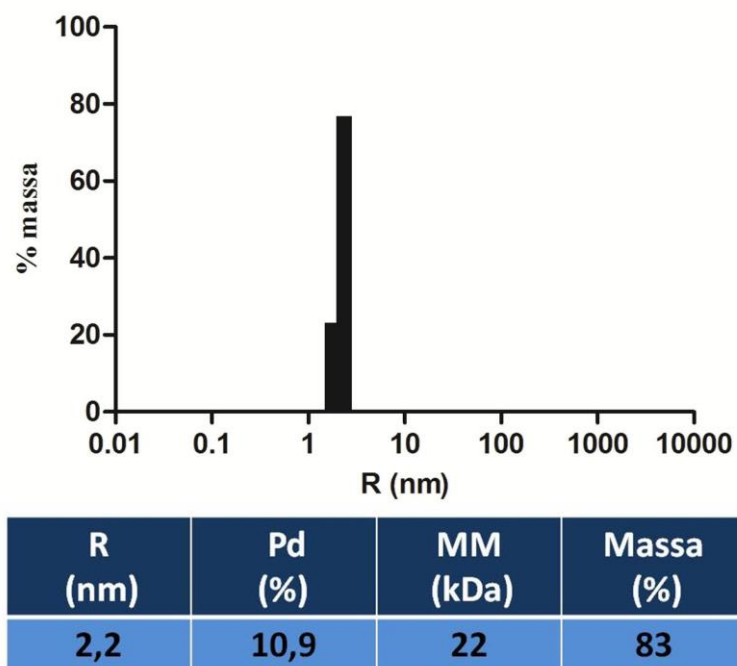


Figura 11. Espalhamento dinâmico de luz (DLS) da proteína Pb27r sem a cauda 6xHis. A proteína Pb27r apresenta-se como uma partícula monomérica e monodispersa em solução. R – raio hidrodinâmico; Pd – polidispersidade; MM – massa molecular.

I.3.4. Cristalização da proteína Pb27r e difração de raios-X

Inicialmente, foram utilizados os kits de cristalização *Crystal Screen I* e *II* (Hampton Research) disponíveis em nosso laboratório com a proteína Pb27 não clivada e clivada nas concentrações de 10 mg/mL e 7 mg/mL, proporção 1µL proteína para 1µL da solução do poço (proporção 1/1) na temperatura de 18 °C. Nesses testes, não houve formação de cristais.

Em uma nova tentativa, aumentamos a concentração das proteínas para 25 mg/mL para a Pb27r clivada e 11 mg/mL para a Pb27r não clivada, proporção 1/1, temperatura de 4 °C. Com essas alterações, observamos o crescimento de cristais em diferentes condições.

Um desses cristais obtidos a 4 °C parecia ser mais promissor pelo fato que eram cristais de agulhas nunca antes obtidos para a Pb27. Os outros cristais obtidos, apesar de serem maiores, já haviam aparecido nas mesmas condições (com LiSO₄, CaCl₂, por exemplo) em outros testes e foram todos cristais de sal.

A condição promissora: MgCl_2 0,2 M, PEG 4000 30% (v/v) e Tris-Cl 0,1 M pH 8,5 foi amplificada pela variação da concentração da Pb27r (20 a 60 mg/mL), das concentrações dos precipitantes e do valor de pH do tampão, até a ida ao LNLS para a coleta dos dados de difração. Na figura 12 observamos os cristais inicialmente obtidos e aqueles após as otimizações realizadas.

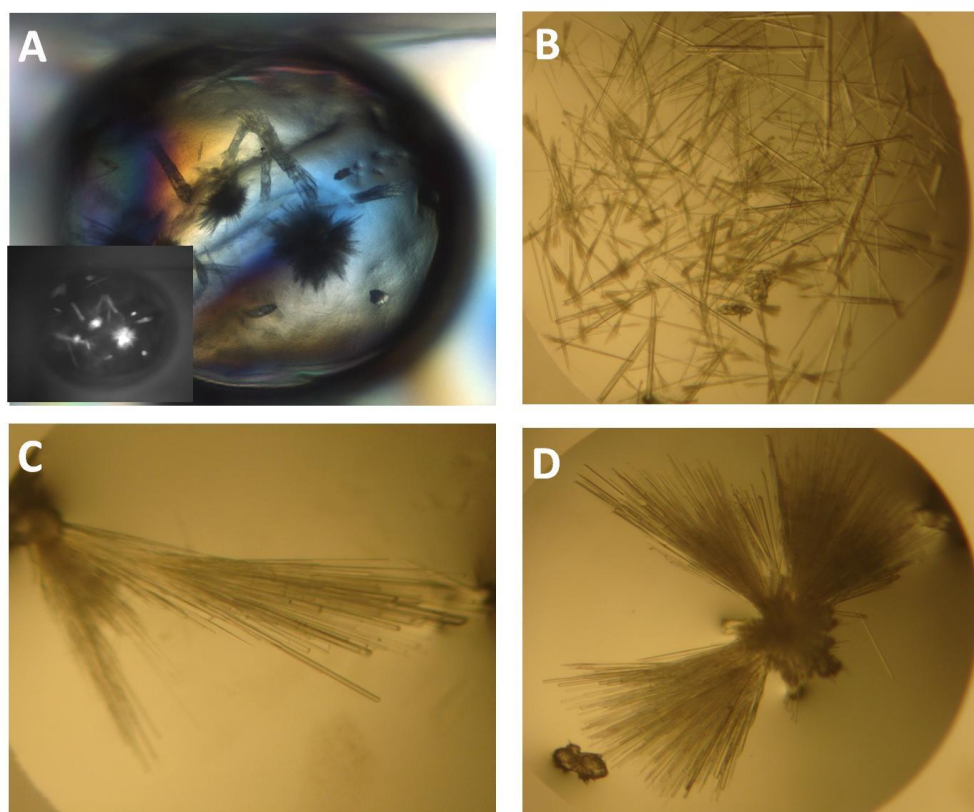


Figura 12. Cristalização da Pb27r. **A** – Pb27r (16,7 mg/mL) clivada em MgCl_2 0,2 M, PEG 4000 30%, Tris-Cl 100 mM pH 8,5. A imagem menor corresponde à foto da mesma gota com luz UV; **B** – Pb27r (38,4 mg/mL) clivada em MgCl_2 0,3 M, PEG 4000 20%, Tris-Cl 100 mM pH 7,0; **C** – Pb27r (45 mg/mL) clivada em MgCl_2 0,25 M, PEG 4000 25%, Tris-Cl 100 mM pH 8,0; **D** - Pb27r (45 mg/mL) clivada MgCl_2 0,25 M, PEG 4000 25%, Tris-Cl pH 7,0 100 mM.

Durante a coleta dos dados, os cristais em forma de agulha difrataram e vários conjuntos de dados foram medidos. Todos os cristais avaliados eram ortorrômbicos e pertenciam ao grupo espacial $P2_12_12_1$.

Na figura 13, observamos um padrão de difração típico de um cristal tipo agulha da Pb27r e na tabela 2, de forma mais detalhada, as estatísticas do processamento de um dos conjuntos nativos obtidos.

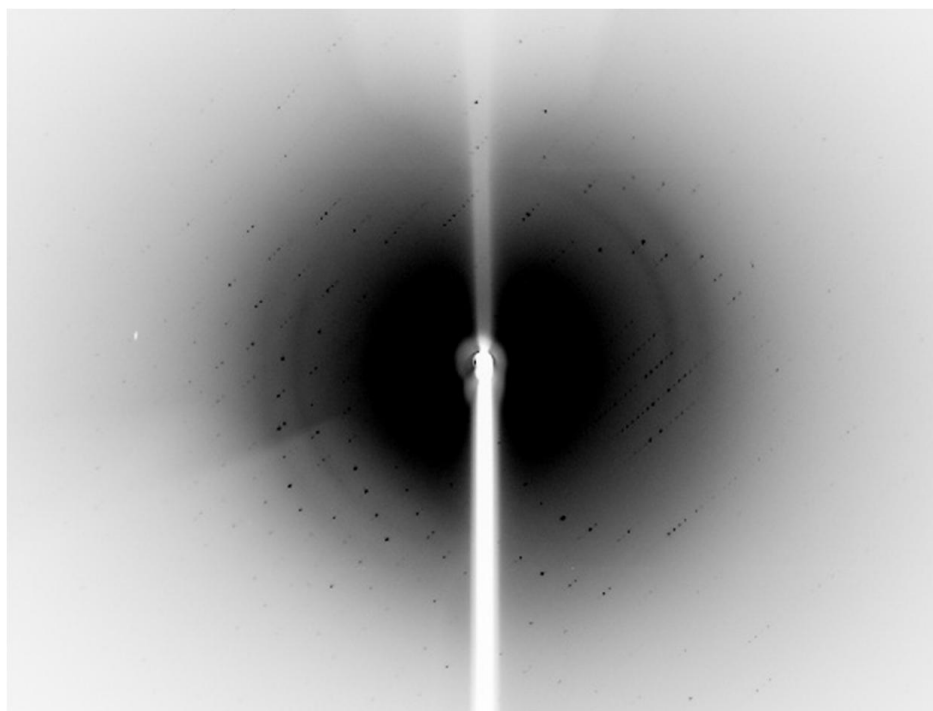


Figura 13. Uma imagem de difração de um cristal tipo agulha da proteína Pb27r. Os dados de difração foram coletados a 1,98 Å.

Tabela 2. Estatísticas dos dados nativos de difração dos cristais de Pb27r. Valores entre parênteses são para a camada de mais alta resolução.

Comprimento de onda (Å)	1,653
Temperatura (K)	100
Distância cristal-detector (mm)	120
Rotação por imagem (°)	1
Variação total de rotação (°)	110
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Parâmetros da célula unitária (Å)	a = 33,43; b = 49,06; c = 121,93
Resolução (Å)	33,4 – 1,98 (2,09 – 1,98)
No. de observações	52542
No. de reflexes únicas	13782
Completeza (%)	94,1 (85,4)

<I/σ (I)>	4,5 (1,2)
Redundância	3,8 (3,7)
R_{merge}^{\dagger}	0,261 (1,036)
Mosaicidade média (°)	0,91
Coeficiente de Matthews (Å ³ Da ⁻¹)	2,07
Conteúdo de Solvente (%)	40,5

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

Por se tratar de uma proteína inédita, ou seja, que não apresenta nenhum modelo tridimensional similar previamente depositado nos bancos de dados, a obtenção de cristais derivados se torna um pré-requisito para a determinação de sua estrutura 3D.

Para a obtenção de cristais derivados, realizamos diversas tentativas:

- i) *Soaking* com as soluções de NaI, CsCl, GdCl₃, Fenil Acetato de mercúrio (Smithgall et al.), Pt(NH₃)₂Cl₂, K₂PtCl₄ e *JBS Magic Triangle* (Jena Biosciences) em várias concentrações e por diferentes tempos.
- ii) Co-cristalização com vários desses sais (NaI, CsCl, GdCl₃), onde eles foram misturados à solução protéica antes da cristalização.
- iii) *Seeding* com cristais nativos na tentativa de aumentar o tamanho dos cristais de agulha obtidos.

Nenhuma dessas tentativas permitiu a obtenção de cristais com diferença isomórfica ou sinal anômalo. Dependendo do tempo e da concentração dos sais de metais pesados, as agulhas de Pb27 começam a se desfazer.

Na tabela 3 estão apresentadas algumas das estatísticas de processamento de alguns dados nativos e de outros que foram coletados a partir de cristais submetidos ao soaking com algumas soluções de sais de metais pesados.

Tabela 3. Estatísticas do processamento de diferentes conjuntos de dados de difração de cristais da proteína Pb27r. Os conjuntos de dados referidos como “Nativo_x” são aqueles coletados na ausência de *soaking* com soluções de metais pesados e os conjuntos “Nal_x” e “CsCl_x” referem-se àqueles cristais submetidos à *soaking* com essas soluções.

Conjunto de dados	Número de imagens	Resolução (Å)	Mosaicidade	Multiplicidade	Completeza (%)	R_{merge}	$\langle I/\sigma(I) \rangle$
Nativo_1	200	50,00 - 4,68	0,775	6,9	97,9	0,073	15,52
		1,94 - 1,90		6,1	100	0,495	3,51
		50,00 - 1,90		7,4	99,8	0,121	13,09
Nativo_2	110	50,00 - 5,18	0,639	3,8	98,9	0,106	10,89
		2,15 - 2,10		2,6	77,2	0,508	1,67
		50,00 - 2,10		3,7	95,6	0,181	6,50
Nativo_3	120	50,00 - 5,05	0,843	5,0	84	0,067	19,81
		2,10 - 2,05		2,2	85,7	0,475	1,83
		50,00 - 2,05		3,8	91,6	0,136	8,66
Nal_1	120	50,00 - 5,95	0,592	2,9	86,6	0,125	8,90
		2,68 - 2,60		1,2	51,1	0,412	1,52
		50,00 - 2,60		2,3	83,5	0,171	5,22
Nal_2	200	50,00 - 4,68	0,782	4,2	98,3	0,065	14,37
		1,94 - 1,90		3,2	99,8	0,463	2,38
		50,00 - 1,90		4,0	99,9	0,115	10,02
Nal_3	270	50,00 - 4,22	0,832	5,8	99,8	0,072	15,19
		2,03 - 1,96		1,5	50,5	0,568	1,11
		50,00 - 1,96		4,3	92,3	0,148	5,90
Nal_4	90	50,00 - 5,60	1,602	2,3	79,7	0,053	11,85
		2,69 - 2,60		1,3	46,5	0,416	1,24
		50,00 - 2,60		2	77,3	0,098	6,66
Nal_5	100	50,00 - 4,09	1,354	2,4	86,2	0,081	9,70
		1,97 - 1,90		2,2	75,1	0,475	1,85
		50,00 - 1,90		2,3	80,2	0,108	7,97
CsCl_1	90	50,00 - 4,74	0,844	2,5	74,9	0,047	16,11
		2,28 - 2,20		1,5	44,7	0,543	1,08
		50,00 - 2,20		2,2	68,5	0,122	5,27
CsCl_2	120	50,00 - 5,05	0,852	3,1	83,1	0,060	20,28
		2,10 - 2,05		1,4	74,7	0,481	1,50
		50,00 - 2,05		2,1	85,1	0,123	6,63

A proteína Pb27r marcada com SeMet foi expressa e purificada da mesma forma que a proteína nativa (Figura 14), no entanto, até o momento, ainda não foram obtidos cristais.

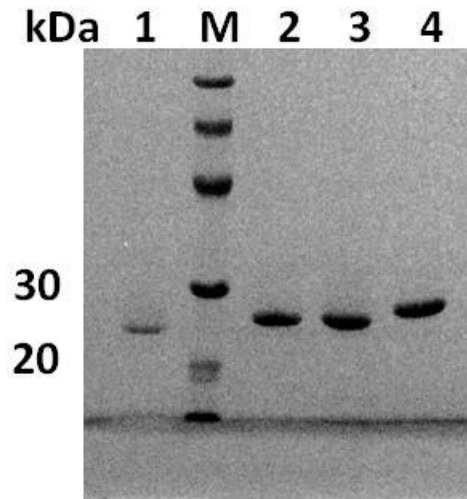


Figura 14. SDS-PAGE 12% da purificação da Pb27r-SeMet. 1 – Amostra obtida após purificação por gel filtração da proteína Pb27r nativa; 2 – Amostra obtida após purificação por gel filtração da proteína Pb27r-SeMet; 3 – Amostra obtida após clivagem com a protease TEV e segunda purificação por cromatografia de afinidade da Pb27r-SeMet, e 4 – Amostra obtida após purificação por cromatografia de afinidade da Pb27r-SeMet e M – Marcador de massa molecul

I.4 – Considerações finais

A caracterização bioquímica e estrutural da proteína Pb27 recombinante vem sendo desenvolvida desde 2007 (Coitinho 2009) quando a sequência do gene *pb27* foi clonada no vetor pET-DEST42 (Invitrogen, Carlsbad, USA) que levava à expressão da proteína (Pb27-V5-CHis) com uma cauda de histidinas C-terminal (CHis). Contudo, esta construção adicionava também uma grande sequência carboxi-terminal (V5 epitopo) que, junto com a cauda de histidinas, não podia ser removida e aumentava o tamanho da proteína recombinante em 23 aminoácidos (aproximadamente 2,5 kDa).

Como os testes de cristalização dessa proteína não foram bem sucedidos, a sequência do gene *pb27* foi transferida para outro vetor, pDEST17 (Invitrogen) que adicionava apenas a cauda de histidinas na porção N-terminal da proteína recombinante (Pb27-NHis). Com esse novo vetor seria possível investigar o efeito da posição da cauda de histidinas na cristalização, além da ausência dos aminoácidos extras (V5 epitopo) na estrutura da proteína. Mais uma vez, os testes de cristalização não foram promissores. Contudo, para ambas as construções foram realizados ensaios de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e dicroísmo circular (CD) e esses mostraram que a proteína recombinante se encontrava enovelada e monodispersa em solução; condições quase que essenciais para o sucesso na cristalização.

Foram realizados também, testes de proteólise limitada utilizando as duas construções da proteína Pb27, Pb27-V5-CHis e Pb27-NHis, com o intuito de determinar quais regiões dessas proteínas eram mais susceptíveis à proteólise e assim, seriam regiões mais flexíveis capazes de atrapalhar o empacotamento ordenando das moléculas de proteína durante a cristalização (Fontana et al. 1997; Gao et al. 2005). Esses testes mostraram que as regiões mais susceptíveis à proteólise pela enzima tripsina eram, principalmente, as regiões adicionadas pelos vetores de clonagem (Coitinho 2009).

Nesse trabalho, tentamos modificar todos os aspectos que pareciam impedir a cristalização da Pb27 recombinante. Assim, a sequência do gene *pb27* foi clonada no vetor de expressão pET28a(TEV) (Carneiro et al. 2006) que adiciona uma cauda de histidinas na porção amino terminal da proteína recombinante, mas permite sua remoção por meio da protease TEV. Além

disso, foi adicionado um passo a mais na etapa de purificação: além das duas cromatografias de afinidade (uma para a purificação inicial da Pb27 recombinante e a outra para separação da protease TEV), uma cromatografia por gel filtração permitiu uma purificação ainda melhor dessa proteína.

Dessa forma, a proteína Pb27 recombinante sem cauda de histidinas (Pb27r) foi utilizada em novos testes de cristalização. Os testes iniciais, utilizando a Pb27r nas concentrações mais comuns utilizadas para cristalização (entre 10 e 20 mg/mL) também falharam ou os cristais formados eram frágeis, não permitindo a coleta dos dados de difração. Percebemos então, após muitos testes, que a proteína Pb27 cristalizava em concentrações muito elevadas (entre 40 e 60 mg/mL) e somente quando se utilizava a proporção de 2 μ L de proteína para 1 μ L da solução precipitante na temperatura de 4 °C. Mais ainda, essa condição de cristalização foi única dentre as mais de 500 avaliadas.

Após todas essas tentativas, finalmente, obtivemos cristais da proteína Pb27 recombinante. Tais cristais, mesmo em formato de frágeis agulhas, foram capazes de difrataram com resolução de até 1,98 Å. Mas ainda esbarramos no problema das fases: como a proteína Pb27 não apresenta outra proteína similar com estrutura resolvida, o caminho mais curto e fácil para a resolução de sua estrutura tridimensional com o uso do método da substituição molecular não pôde ser seguido.

Decidimos assim, preparar cristais derivados de Pb27r: realizamos as técnicas de *soaking* com soluções de sais de metais pesados em várias concentrações e por diferentes tempos, co-cristalização com vários desses sais e *seeding* com cristais nativos na tentativa de aumentar o tamanho dos cristais de agulha obtidos.

Ainda pretendemos avaliar outros metais pesados e kits de derivatização que estão sendo adquiridos por nosso laboratório. Além disso, testes de expressão da Pb27r marcada com Se-Met já foram realizados e, apesar de menos solúvel, a proteína marcada foi expressa e purificada em quantidades suficientes para os testes iniciais de cristalização. No entanto, quando avaliamos as mesmas condições de cristalização da Pb27 nativa, não houve crescimento de cristais de Pb27r-SeMet. Novos testes de cristalização serão realizados utilizando a infraestrutura disponível no Laboratório Nacional de Biociência (LNBio – Campinas); incluindo um robô de cristalização.

O uso de metais pesados para determinação das fases enfrenta diversos problemas causados pela incorporação desses átomos na estrutura cristalina como mudanças na célula unitária, reorientação da molécula protéica, dificuldades em encontrar todos os átomos pesados, ocupância, dificuldades no refinamento das posições desses átomos dentre outros. O uso de cristais da proteína marcada com Se-Met usualmente evita esses problemas. No entanto, sabemos que o selênio tem um dos sinais anômalos mais baixos dentre os átomos pesados comumente utilizados, assim, é muito importante garantir a máxima incorporação do selênio para permitir o melhor poder de faseamento para a determinação da estrutura (Walden 2010).

A proteína Pb27r apresenta, após clivagem da cauda de histidinas, apenas três resíduos de Metionina. O sinal dos três átomos de selênio (mesmo que a incorporação seja de 100%) pode não ser suficiente para a determinação da estrutura da Pb27, além de que a primeira Metionina usualmente é desordenada, diminuindo ainda mais o sinal esperado. Existem, porém, diversas estratégias que podem ser empregadas para maximizar o poder de faseamento do experimento: mutações para adição de metioninas; dupla marcação utilizando selênio-cisteína em combinação com Se-Met (esta técnica aumenta os custos experimentais e limita o rendimento da expressão) (Strub 2003); uso do análogo telúrio-Met, que é maior, porém menos estável que a Se-Met, mas, quando bem sucedido, permite a obtenção de um forte sinal anômalo (Budisa 1997).

A determinação da estrutura tridimensional da proteína Pb27 pode ser importante não só para que sua função seja inferida através da descoberta de algum motivo ou domínio funcionalmente caracterizado, mas também para auxiliar nos estudos dos aspectos imunológicos dessa proteína. Epitopos de células B podem ser determinados pela correlação da posição estrutural de peptídeos reativos ao soro dos camundongos imunizados com a proteína Pb27r.

Sabemos também da importância, não só da estrutura tridimensional da proteína Pb27, da necessidade de determinarmos sua função biológica. Esse objetivo pode ser atingido, mesmo para essa proteína sem nenhuma informação funcional, nem mesmo de homólogos, através de técnicas como a Fluorimetria Diferencial de Varredura (*Differential Scanning Fluorimetry* – DSF).

O DSF realizado em modo *high throughput* pode nos dar indícios sobre o papel bioquímico desempenhado pela proteína Pb27. Por meio desta técnica podemos verificar o efeito da ligação/interação de diversos compostos sobre a proteína alvo e identificar aqueles com maiores chances de participarem de um complexo proteína-ligante. Estes resultados podem sugerir um papel bioquímico para o alvo protéico estudado.

I.5. Conclusões

- 1- A proteína recombinante Pb27r foi purificada por cromatografia de afinidade e gel filtração, além de ter tido sua cauda de histidinas removida apresentando um alto rendimento (cerca de 30 mg de proteína obtidos após a última etapa de purificação).
- 2- Ensaios de dicroísmo circular e DLS mostraram que a proteína Pb27 está enovelada e se apresenta como um monômero monodisperso em solução. Essas características fazem da Pb27r uma boa candidata para a cristalização.
- 3- Cristais da proteína Pb27r foram obtidos na presença de $MgCl_2$, PEG 4000 e Tris-Cl pH entre 7 e 8,5.
- 4- Um dos cristais obtidos em forma de agulha difratou até 1,98 Å e pertence ao grupo espacial $P2_12_12_1$, com célula unitária de dimensões $a = 33,43$; $b = 49,06$; $c = 121,93$ Å, com uma única molécula de Pb27r sugerida na unidade assimétrica.

I.6. Perspectivas

- 1- Expressão da proteína Pb27 recombinante marcada com Selênio-Metionina (Se-Met) e cristalização;
- 2- Obtenção destes cristais da proteína Pb27 derivados com sais de átomos pesados como NaI, KI, CsCl e GdCl₃ e outros ainda não testados;
- 3- Mutações sítio-dirigidas com o intuito de aumentar o número de metioninas na proteína Pb27 e assim, o sinal da marcação com Se-Met;
- 4- Coleta de dados de difração de raios-X e resolução da estrutura da proteína Pb27;
- 5- Identificação dos determinantes antigênicos na estrutura da proteína Pb27 através da identificação dos peptídeos mais reativos ao soro dos camundongos imunizados com a proteína Pb27r e posterior correlação com a estrutura tridimensional obtida.

**Parte II – Estrutura e cinética da enzima
salicilaldeído desidrogenase de
Pseudomonas putida G7**

II.1. Revisão bibliográfica

II.1.1. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) e biorremediação

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) são um grupo de compostos formados por dois ou mais anéis benzênicos fusionados e amplamente distribuídos no ambiente, tanto devido a fontes naturais quanto antropogênicas. As atividades de refino e transporte de petróleo são as principais contribuintes para o despejo localizado de HAPs no ambiente. Apesar de pontuais, a concentração de contaminantes nessas áreas é frequentemente alta e associada com co-contaminantes como benzeno, tolueno, etileno e xileno (os conhecidos BTEX), metais pesados e hidrocarbonetos alifáticos (Kanaly & Harayama 2000).

Quando ingeridos, os HAPs são rapidamente absorvidos no trato gastrointestinal devido à sua alta solubilidade lipídica, porém, a principal rota de entrada dos HAPs é via adsorção dérmica. Por isso, em geral, quanto maior o número de anéis benzênicos, maior é a toxicidade do HAP (Cerniglia 1984).

Também devido à sua alta hidrofobicidade, esses compostos apresentam alta estabilidade e baixa solubilidade em água, o que contribui para sua persistência na natureza (Samanta et al. 2002). Somada a essa alta persistência ambiental, os HAPs apresentam toxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade comprovados (Park et al. 2006; Spink et al. 2008; Topinka et al. 2008), levando ao aumento de seu potencial tóxico e despertando a atenção da comunidade científica no sentido de diminuir sua concentração no ambiente. Tanto que a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA- *U.S. Environmental Protection Agency*) classificou, com base na abundância e toxicidade, 16 HAPs como poluentes prioritários (Habe & Omori 2003). A estrutura desses compostos está apresentada na Figura 15.

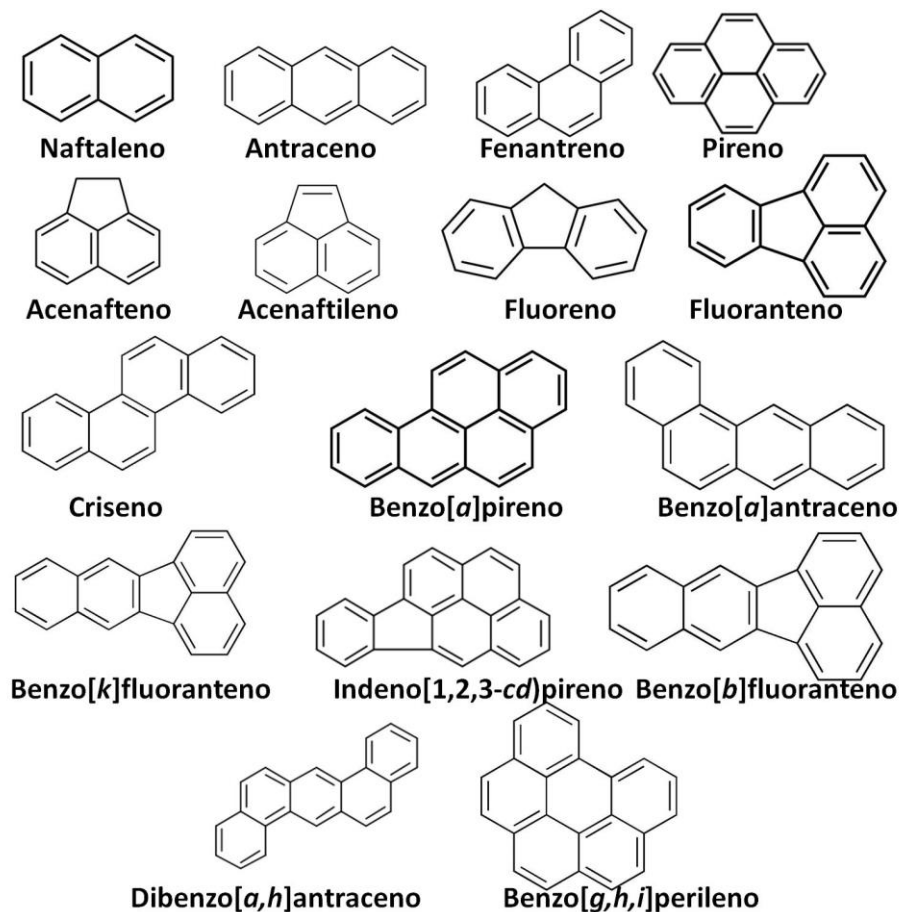


Figura 15. Estruturas químicas dos 16 HAPs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental americana. Destaque para o naftaleno que apresenta dois anéis fusionados. Adaptado de Habe 2003 (Habe & Omori 2003).

Existem três mecanismos diferentes para o metabolismo de HAPs resumidos na figura 16: aquele utilizado por bactérias, por fungos lignolíticos ou por fungos não-lignolíticos. Porém, a base de todos os processos é a oxidação do anel aromático e subsequente quebra sistemática do composto a metabólitos de HAPs e/ou dióxido de carbono (revisados por (Bamforth 2005).

Diversas espécies de bactérias são capazes de degradar HAPs. Bactérias como as do gênero *Pseudomonas* e *Rhodococcus* fazem isso pela oxidação inicial do anel benzênico pela ação de enzimas dioxigenases formando *cis*-dihidrodióis. Esses compostos são então desidrogenados para formar intermediários dihidroxilados que podem ser metabolizados ainda mais para formar CO₂ e água (Sutherland 1995; Bamforth 2005). Uma forma menos comum de degradação bacteriana de HAPs, feita, por exemplo, pela

Mycobacterium sp., ocorre pela ação da enzima citocromo P₄₅₀ monoxigenase para formar *trans*-dihidrodióis (Kelley 1990).

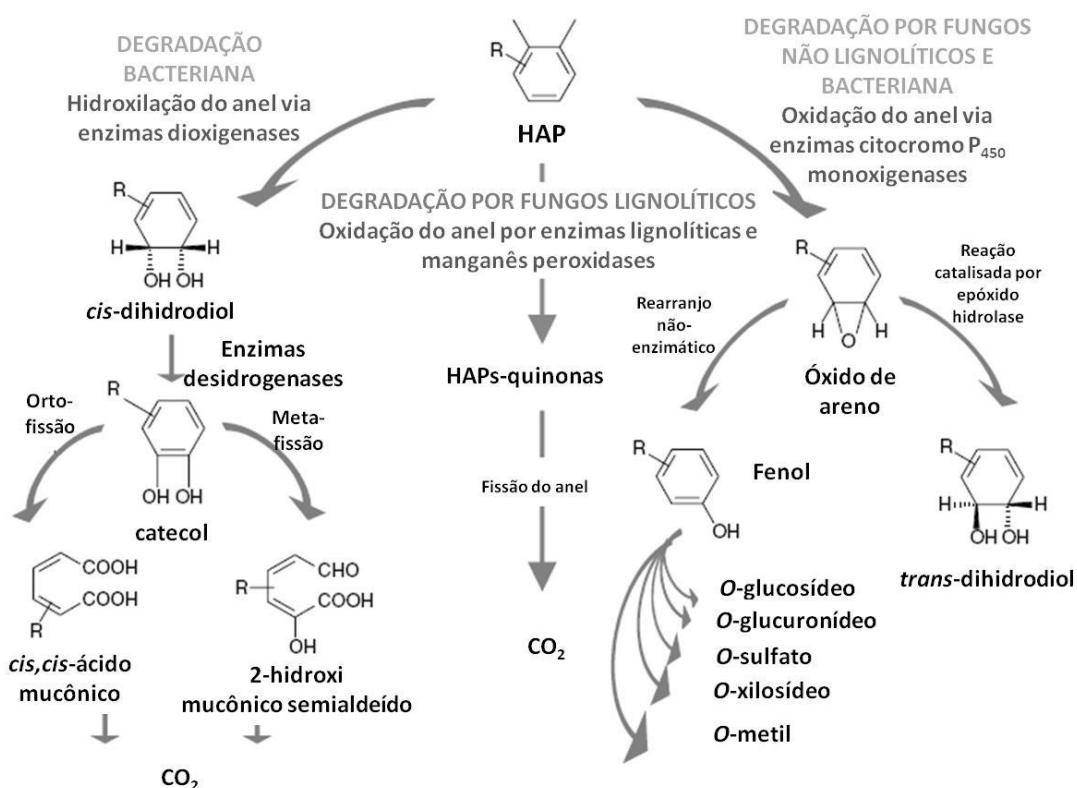


Figura 16. Vias de metabolização de HAPs em bactérias e fungos. Bactérias usualmente degradam HAPs pela ação de enzimas desidrogenases; fungos não-lignolíticos principalmente pela citocromo P₄₅₀ monoxigenase e fungos lignolíticos via enzimas lignolíticas. Adaptado de (Bamforth 2005).

Fungos não-lignolíticos, como *Chrysosporium pannorum*, *Cunninghamella elegans* e *Aspergillus niger*, não são capazes de degradar os HAPs completamente, mas seu metabolismo gera produtos menos tóxicos e mais solúveis. Nesse caso, o primeiro passo da oxidação do anel aromático ocorre pela ação da enzima citocromo P₄₅₀ monoxigenase com a produção de óxido de areno, em processo similar ao metabolismo de HAPs em mamíferos (Sutherland 1995).

Já os fungos lignolíticos, como *Phanerochaete chrysosporium* e *Pleurotus ostreatus*, oxidam HAPs principalmente por meio de enzimas lignolíticas, lignina peroxidase e manganês peroxidase, mas também por meio

de citocromo P₄₅₀ monoxigenases e epóxido hidrolases que podem metabolizar os HAPs completamente (Bezalel 1997).

O conhecimento básico dos genes do catabolismo de HAPs em diferentes espécies pode fornecer informações úteis sobre a evolução da relação estrutura-função e diversidade de vias catabólicas dessas espécies. Esse conhecimento poderia facilitar o uso desses microrganismos em processos de remoção desses compostos tóxicos do ambiente e mesmo na criação de microrganismos mais robustos ou dos próprios produtos desses genes do catabolismo de HAPs para seu uso nos processos de descontaminação (Chen *et al.* 1999).

Nesse sentido é que surge a biorremediação, que consiste na utilização de microrganismos ou enzimas capazes de metabolizar compostos tóxicos a substâncias inertes, com pouca ou nenhuma toxicidade (Holliger *et al.* 1997), e que poderia ser utilizada no tratamento de solos e águas contaminados com HAPs.

A biorremediação é geralmente o tratamento mais seguro, menos invasivo e que tem maior custo-benefício para a retirada de compostos tóxicos do ambiente. Em muitos casos, o uso de microrganismos ou de enzimas pode ser complementado com processos físicos, químicos ou mecânicos para melhorar sua segurança e efetividade (Alcalde *et al.* 2006). Como exemplo, desde novembro de 2002, a biorremediação microbiana, utilizando microrganismos naturalmente presentes no local associada a processos mecânicos, foi realizada na remoção de HAPs provenientes do acidente com o petroleiro Prestige na costa norte da Espanha (Gallego J.R. 2006).

Como já mencionado, a biorremediação pode utilizar microrganismos ou enzimas. Muitos poluentes ambientais são facilmente degradados por microrganismos naturalmente presentes no local. Porém, a velocidade de degradação pode, em muitos casos, não ser ótima para a biorremediação em alta escala. Assim, a engenharia genética de vias biodegradativas oferece o potencial de expansão das atividades catalíticas já encontradas na natureza (Chen *et al.* 1999).

Por exemplo, a enzima intracelular organofosfohidrolase (Sophos & Vasiliou) hidrolisa uma grande variedade de pesticidas organofosforados produzindo compostos com toxicidade bastante reduzida. Porém, o uso de

microrganismos que expressam a OPH na biorremediação era limitado pela dificuldade de transportar os pesticidas para o interior das células. Para superar essa limitação, passou-se à produção de microrganismos que expressam a enzima OPH na superfície permitindo a biorremediação mais efetiva. Mais ainda, a imobilização desses microrganismos expressando OPH na superfície permitiu a degradação ainda mais eficiente de pesticidas (Chen & Mulchandani 1998; Mulchandani et al. 1999).

Uma das principais preocupações em relação ao uso de microrganismos, particularmente em áreas marinhas, é que esses microrganismos podem acabar competindo com os microrganismos da população natural da área alterando seu ecossistema (Alcalde et al. 2006). Além disso, essa técnica enfrenta outras limitações (Boopathy 2000):

- i) Transferência de massas: a velocidade com a qual um microrganismo converte contaminantes durante a biorremediação depende da velocidade da entrada desse contaminante e seu metabolismo, além da velocidade de transferência para a célula (transferência de massa). Um aumento na capacidade metabólica de um microrganismo não resultará em aumento da biotransformação quando a transferência de massa for o fator limitante;
- ii) Necessidade de aeração em muitos casos;
- iii) Nível de nutrientes nas regiões contaminadas (pode haver necessidade de bio-estimulação);
- iv) Problemas relacionados às condições térmicas.

A maioria dos xenobióticos pode ser submetida à biorremediação enzimática (Samanta et al. 2002) e esta técnica tem se tornado uma alternativa interessante para a biorremediação por diversas razões, como por exemplo (Ahuja et al. 2004):

- i) As enzimas constituem um sistema mais simples;
- ii) Dependendo das condições, as enzimas podem ser utilizadas em condições mais brandas, substituindo as condições extremas e/ou produtos químicos perigosos, economizando energia e evitando poluição;

- iii) Enzimas são altamente específicas e sua biotransformação não gera subprodutos tóxicos, o que normalmente acontece com o uso de microrganismos e compostos químicos;
- iv) As enzimas podem ser degradadas *in situ* por microrganismos presentes no local;
- v) É muito mais fácil aumentar a biodisponibilidade das enzimas pela introdução de co-solventes orgânicos ou surfactantes;
- vi) É mais factível a produção de enzimas em alta escala, com estabilidade e/ou atividade aumentadas e a baixo custo utilizando a tecnologia do DNA recombinante;
- vii) O uso de enzimas não gera tanta biomassa como aquela produzida ao se utilizar microrganismos, principalmente em tratamentos aeróbicos.

A aplicação efetiva de enzimas em diversas áreas, incluindo a biorremediação está diretamente relacionada ao melhor entendimento das comunidades microbianas, de suas vias metabólicas e da genética microbiana, além do desenvolvimento de métodos de biorremediação com custos menos elevados. Várias técnicas vêm sendo empregadas nesse sentido, como a tecnologia do DNA recombinante, engenharia de proteínas e *design* racional de enzimas (Ahuja et al. 2004).

A aplicação das duas últimas técnicas depende de um amplo conhecimento de como as enzimas funcionam e isso, na maioria das vezes, é conseguido pelo estudo cinético e estrutural das mesmas. Com a estrutura tridimensional em mãos e uma boa caracterização bioquímica e cinética é possível, por exemplo, realizar estudos de modificações químicas, obter informações sobre os resíduos importantes para ligação e catálise, construção de mutantes com características melhoradas e assim, tornar seu uso na biorremediação muito mais efetivo.

II.1.2. *Pseudomonas putida* e degradação de HAPs

Como previamente apresentado, bactérias são altamente versáteis e estão ativamente envolvidas na degradação de poluentes orgânicos, inclusive na degradação dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos - HAPs (Haritash & Kaushik 2009). Espécies do gênero *Pseudomonas* são capazes de utilizar um grande número de compostos orgânicos como fonte de carbono, incluindo hidrocarbonetos aromáticos, como o naftaleno, um constituinte natural do petróleo (Rossello-Mora et al. 1994).

Hidrocarbonetos aromáticos como o naftaleno são lipossolúveis na membrana celular e prontamente absorvidos pelo organismo humano via inalação, exposição oral e dérmica, com posterior acúmulo no tecido adiposo. O metabolismo desses hidrocarbonetos gera compostos epóxidos com propriedades carcinogênicas e mutagênicas, tendo sido relatados inúmeros casos de câncer no pulmão, intestino, fígado, pâncreas e na pele, devido à presença desses compostos (Chakradeo et al. 1993).

O naftaleno foi reclassificado pela EPA americana (EPA 2004) como um possível carcinógeno humano (grupo B). A exposição aguda a esse composto causa catarata em humanos, coelhos, ratos e camundongos. A inalação ou ingestão de naftaleno por crianças ou a exposição da mãe durante a gravidez, pode levar a anemia hemolítica, já que o naftaleno, em altas concentrações, pode destruir células vermelhas do sangue (IARC 2002).

Saeed e colaboradores, em 2009, propuseram que o naftaleno leva à formação de sítiosapurínicos no DNA pela perda de adutos de depurinação. Isso poderia agir na iniciação do câncer pelo naftaleno (Saeed et al. 2009).

Mais ainda, o naftaleno é frequentemente utilizado como molécula modelo para investigar a habilidade de bactérias em degradar HAPs devido à sua estrutura mais simples e maior solubilidade. Além disso, estudos sobre a degradação bacteriana do naftaleno têm sido utilizados para entender e prever vias de degradação de HAPs mais complexos, com três ou mais anéis benzênicos (Seo et al. 2009).

Em *P. putida*, os genes envolvidos na degradação do naftaleno estão organizados em dois operons (Figura 17): o da via superior, *nah* (*nahAaAbAcBFCED*), que codifica as enzimas envolvidas na conversão do

naftaleno ao salicilato, e o da via inferior, *sal* (*nahGTHINLOMKJ*), que codifica a conversão do salicilato a intermediários do ciclo do ácido cítrico através das enzimas da via da meta-clivagem (Yen & Gunsalus 1982; Yen & Gunsalus 1985).

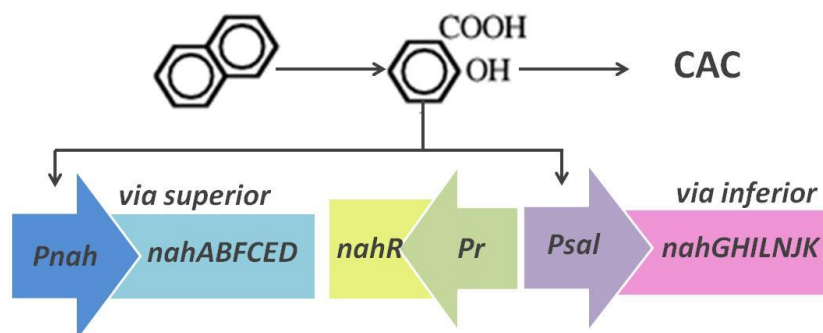


Figura 17. Organização dos genes de degradação do naftaleno em *Pseudomonas putida*. Aqui estão representados os dois operons *nah* e *sal* com os genes das vias superior e inferior de degradação do naftaleno. *Pnah*, *Psal* e *Pr*, promotores dos operons *nah* e *sal* e do gene regulatório *nahR*; CAC, ciclo do ácido cítrico.

Bactérias do gênero *Pseudomonas* com o plasmídeo NAH7 também apresentam o gene *nahY*, que codifica para a proteína NahY. Esta proteína é capaz de se ligar ao naftaleno ou outros compostos relacionados no lado periplasmático de *P. putida* e agir como um quimiorreceptor para estes compostos, facilitando a biodegradação (Grimm & Harwood 1999).

Outro gene presente no plasmídeo NAH7 é o *nahR*, que codifica a proteína regulatória NahR. Essa proteína pertence à classe dos reguladores transcricionais do tipo Lys-R (LTTRs), talvez o tipo mais comum de reguladores positivos em procariotos. Essa classe de reguladores compartilha uma estrutura em comum, com um domínio de ligação ao DNA hélice-volta-hélice bem conservado e um motivo C-terminal menos conservado, envolvido no reconhecimento do co-indutor (revisado por (Schell 1993; Maddocks & Oyston 2008).

NahR é positivamente regulado pelo salicilato, o último produto da via superior da degradação do naftaleno, e, como muitos reguladores LTTRs, é transcrito por um promotor que está muito próximo aos promotores dos genes que ele regula, os genes dos operons *nah* e *sal* (Figura 17). Parece que o

NahR aceita uma ampla variedade de análogos estruturais do salicilato como efetores (Cebolla et al. 1997; Park et al. 2002).

O primeiro passo do catabolismo do naftaleno (Figura 18) é a incorporação do oxigênio molecular ao núcleo aromático do naftaleno para produzir *cis*-naftaleno dihidrodíol catalisada pelo complexo da naftaleno dioxigenase (NahAaAbAcAd). Esse complexo é formado por três componentes: ferredoxina redutase, ferredoxina e proteína Fe-S que catalisam a transferência de dois elétrons do NAD(P)H, um de cada vez, através de cada um desses componentes, o que auxilia na transferência do oxigênio ao naftaleno.

Os passos subsequentes são catalisados pela *cis*-naftaleno dihidrodíol desidrogenase (NahB), 1,2-dehidroxinaftaleno dioxigenase (NahC), 2-hidroxicromeno-2-carboxilato isomerase (NahD), 2-hidroxibenzil-piruvato aldolase (NahE) que resulta na formação do salicilaldeído. A última reação da via é catalisada pela enzima salicilaldeído desidrogenase (NahF) que converte o salicilaldeído em salicilato (Davies & Evans 1964).

O salicilato é oxidado pela salicilato hidroxilase (NahG) a catecol, que pode sofrer *meta*-clivagem e continuar sua degradação até piruvato e acetilaldeído pelas enzimas da via inferior (NahH, catecol dioxigenase; NahI, 2-hidroximuconato semialdeído desidrogenase; NahJ, 2-hidroximuconato tautomerase; NahK, 4-oxalcrotonato decarboxilase; NahL, 2-oxo-4-pentenoato hidratase e NahM, 2-oxo-4-hidroxipentanoato aldolase) codificadas pelos genes do *operon sal*. O catecol pode também sofrer *orto*-clivagem por enzimas presentes no cromossomo da bactéria, gerando succinil-CoA e acetil-CoA. A entrada em uma ou outra via depende do metabolismo bacteriano.

II.1.3. Aldeído desidrogenases

A superfamília das aldeído desidrogenases (ALDHs) representa um grupo de enzimas que catalisa a oxidação de vários aldeídos exógenos e endógenos a seus ácidos carboxílicos correspondentes (Perozich et al. 1999a; Vasiliou et al. 2000).

Aldeídos endógenos são formados durante o metabolismo de aminoácidos, carboidratos, lipídeos, aminas biogênicas, vitaminas e esteróides. A biotransformação de um grande número de drogas e agentes ambientais também gera aldeídos (Vasiliou & Pappa 2000). No entanto, os aldeídos tóxicos formados endogenamente são tóxicos mesmo a baixos níveis devido a sua alta reatividade química. Assim, existe um controle bastante cuidadoso dos níveis desses compostos e, por esse motivo, a maioria dos organismos apresenta ALDHs distintas que participam de diversos processos fisiológicos (Lindahl 1992).

As ALDHs se agrupam em duas classes divergentes em estudos filogenéticos (Tabela 4): Classe 3 e as Classes 1 e 2. Essas classes apresentam algumas diferenças entre si, como o fato de que a maioria das famílias presentes na Classe 3 são ALDHs substrato-específicas enquanto que as famílias pertencentes às Classes 1 e 2 apresentam maior variabilidade em relação à especificidade pelo substrato. No entanto, em relação à diversidade de estruturas quaternárias e preferência pelos cofatores, as ALDHs não apresentam tanta distinção entre a Classe 3 e as Classes 1 e 2. Famílias de ALDHs de todas as classes apresentam proteínas homotetraméricas e homodiméricas e em todas, as proteínas parecem ligar NAD^+ ou NADP^+ (Perozich et al. 1999b).

Na época em que as 13 famílias de ALDHs foram identificadas, três foram consideradas como novas ou muito recentemente descobertas: as ALDHs fúngicas, as ALDHs de resposta ao turgor e as ALDHs de metabolização de aldeídos aromáticos. Essa última classe contém aquelas ALDHs que oxidam, de forma relativamente específica, xenobióticos aromáticos encontrados no ambiente (Perozich et al. 1999b), como a NahF. Entre os seus substratos estão vanilina, salicilaldeído e benzaldeído. São membros dessa família, por exemplo, a enzima betaína aldeído desidrogenase

de *Pseudomonas aeruginosa* (Velasco-Garcia et al. 2006), a benzaldeído desidrogenase de *P. putida* (Yeung et al. 2008) e a vanilina desidrogenase de *Pseudomonas* sp. HR199 (Priefert et al. 1997).

Mesmo participando de diferentes vias catabólicas, as sequências das ALDHs aromáticas são altamente relacionadas, sugerindo que elas podem ter tido um ancestral comum recente (Perozich et al. 1999b).

Tabela 4. As 13 famílias de ALDHs. A superfamília das aldeído desidrogenases são classificadas em duas classes divergentes. Adaptado de Perozich, Nicholas et al. 1999.

Classe	Família	Especificidade ao substrato	Estrutura quaternária	Coenzima
	Betaína ALDH	Específica	Tetâmero	NAD ⁺
	Metilmalonil semialdeído desidrogenase	Específica	Tetâmero	NAD ⁺ e CoA
	γ-Glutamil semialdeído desidrogenase	Específica	Dímero	NAD ⁺
	ALDH de resposta ao turgor	n.d.	n.d.	n.d.
Classe 3	ALDH classe 3	Variável	Dímero	NAD ⁺
	ALDH de aldeídos aromáticos	Específica	Tetâmero	NAD ⁺
	Succinato semialdeído desidrogenase	Específica	Tetâmero	NAD ⁺ (animais) e NADP ⁺ (bactérias)
	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	Específica	Tetâmero	NADP ⁺
	ALDH classe 1	Variável	Tetâmero	NAD ⁺
	ALDH classe 2	Variável	Tetâmero	NAD ⁺
	ALDH de fungos	Variável	Tetâmero	NAD ⁺
Classe 1/2	Formiltetrahidrofolato desidrogenase	Específica	Tetâmero	NADP ⁺
	2-Hidroximucônico semialdeído desidrogenase	Específica	Dímero	NAD ⁺

ALDH – aldeído desidrogenase; n.d. – não determinado; CoA – coenzima A

A maioria das famílias da ALDH são específicas para o NAD⁺, algumas são específicas para NADP⁺, e outras ainda precisam ser caracterizadas neste sentido. As ALDHs da Classe 3, no entanto, são notáveis como a única família das ALDHs com uma bem estabelecida capacidade de utilizar NAD⁺ ou NADP⁺, embora, *in vivo*, dadas as concentrações fisiológicas de cada coenzima, essas enzimas sejam mais susceptíveis a funcionar apenas

com NAD^+ e a ligação ao NADP^+ parece ser mais fraca (constante de Michaelis-Menten, K_M , maior) (Perozich 2000).

Liu e colaboradores em 1997 (Liu 1997) determinaram a primeira estrutura de uma aldeído desidrogenase (ALDH) classe 3, que apresentou duas subunidades idênticas numa estrutura do tipo α/β . Cada subunidade continha três domínios: domínio de ligação ao NAD^+ , domínio catalítico e domínio conector (Figura 19).

Nessa estrutura, o domínio conector forma ligações de hidrogênio com o domínio catalítico da outra subunidade e tem papel importante na formação e estabilização do dímero. A cadeia polipeptídica forma uma estrutura α/β aberta no domínio de ligação ao NAD^+ que apresenta um enovelamento um pouco diferente do Rossmann comum com cinco fitas- β , ao invés das seis usualmente observadas.

O sítio catalítico está posicionado na base de uma estrutura de um funil profundo e é composto por resíduos dos três domínios com uma Cys243 agindo como o tiol catalítico. A cadeia polipeptídica se estende de volta para o domínio de ligação do NAD^+ e os resíduos finais no C-terminal formam um *loop* sobre o domínio catalítico da outra subunidade, completando o domínio conector (Liu 1997).

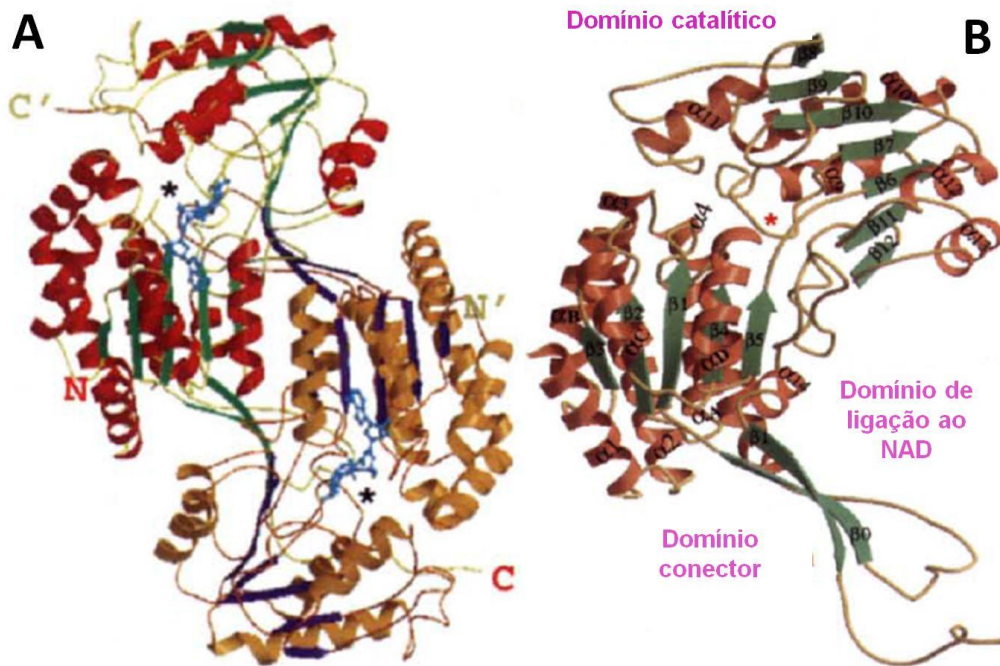


Figura 19. Estrutura tridimensional de uma ALDH classe 3. Em **A** está representado o dímero de ALDH: uma das moléculas do dímero está colorida de vermelho e verde e a outra de amarelo e azul. Note a estrutura do tipo α/β . Na figura **B** está representado o monômero de ALDH, onde estão assinalados os três domínios de ALDH. O asterisco azul em **A** e vermelho em **B** representa a entrada do funil catalítico. Adaptado de Liu 1997.

No mecanismo de ação proposto para as ALDHs (Figura 20), o NAD^+ liga primeiro na enzima e o aldeído sofre, então, o primeiro ataque nucleofílico pela cisteína catalítica, formando um intermediário covalente. Em seguida, o grupo carbonila é transferido para o anel nicotinamida. Na etapa limitante do processo, o glutamato catalítico ativa uma molécula de água que fará o segundo ataque nucleofílico na ligação tioéster, liberando o produto ácido (Perez-Miller & Hurley 2003; Wymore et al. 2004; Ho et al. 2006).

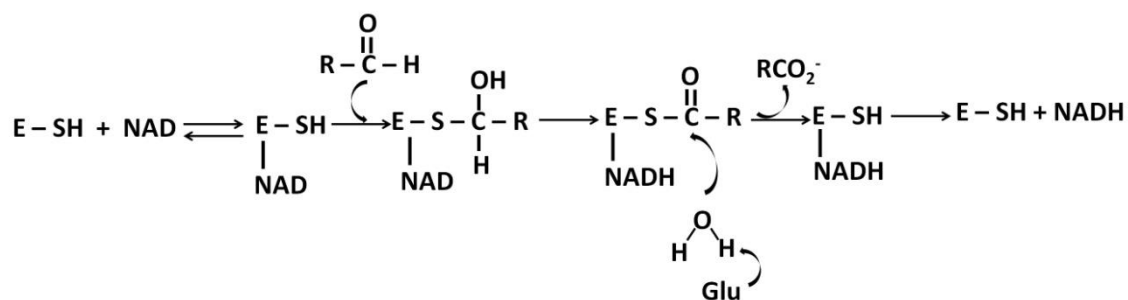


Figura 20. Mecanismo de ação proposto para ALDHs. O NAD se liga primeiro à enzima antes do substrato aldeído. A Cys faz um ataque nucleofílico no substrato aldeído formando um intermediário tiohemiacetal. Ocorre então a transferência de um hidreto do intermediário para o NAD, formando NADH e um tioéster. Uma molécula de água é ativada por um Glu e faz o segundo ataque nucleofílico no tioéster liberando o ácido carboxílico e o NADH. E-SH indica a enzima com a Cys como o nucleófilo. Adaptado de (Perez-Miller & Hurley 2003; Wymore et al. 2004; Ho et al. 2006).

Por comparação entre diferentes sequências de ALDHs de diferentes classes e entre diferentes densidades de resíduos de aminoácidos altamente conservados nas regiões catalíticas, Liu e colaboradores (Liu 1997) sugeriram que a estrutura por eles determinada deve ser compartilhada por todas as ALDHs.

Porém, apesar dessa sugerida estrutura geral das ALDHs, é de grande importância a determinação da estrutura tridimensional da NahF, já que essa proteína é específica para um reação diferente das outras ALDHs que já tiveram sua estrutura resolvida. Mais ainda, a estrutura da NahF pode permitir saber em que grau, como um resultado de condições de crescimento extraordinariamente exigentes da bactéria *Pseudomonas putida*, as enzimas da sua via de degradação dos HAPs diferem das suas contrapartes previamente caracterizadas em outros organismos. E talvez ajudar a corroborar evidências da capacidade das enzimas de evoluir atividades mais eficazes, ou mesmo novas atividades, em um período de tempo relativamente curto dependendo das condições ambientais em que se encontram.

Além disso, o acúmulo de estudos de caracterização bioquímica e estrutural de enzimas, encontrando as diferenças estruturais que as fazem únicas em suas reações catalisadas pode permitir, por exemplo, a criação de enzimas degradadoras de naftaleno mais efetivas, através de modificações de

enzimas existentes sendo assim útil em processos de biorremediação (Habe & Omori 2003).

II.2. Metodologia

II.2.1. Cultivo da bactéria *Pseudomonas putida*

Bactérias *P. putida* G7 foram cultivadas inicialmente em meio mínimo sem glicose ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 12,8 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, NaCl 0,5 g/L e NH_4Cl 1 g/L pH 7,4). Após autoclavagem, foram adicionadas soluções filtradas de MgSO_4 e CaCl_2 para as concentrações finais de 2 e 0,1 mM, respectivamente. Esse meio foi ainda suplementado com 0,5 % (v/v) de naftaleno 300 mg/mL diluído em DMF - N',N' – dimetilformamida. Após crescimento durante 48 h a 150 rpm e 28 °C, essa cultura foi diluída 1:20 em meio LB (peptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 5 g/L pH 7,4) e incubou-se também por 48 h a 150 rpm e 28 °C.

II.2.2. Extração do plasmídeo NAH7 de *Pseudomonas putida*

Para a extração do plasmídeo NAH7 de *P. putida*, que possui 83 kDa, foi utilizado um protocolo de extração de DNA genômico de bactérias com algumas modificações.

A cultura de bactérias *P. putida* crescidas como mostrado no item II.2.1 foi centrifugada a 5000g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 1 mL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM). Essa mistura foi centrifugada por 2 minutos a 13000g. Novamente o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspenso em 230 µL de tampão TE. Adicionou-se 15 µL de SDS 10% (p/v) e misturou-se lentamente. Foi adicionado o mesmo volume de fenol/clorofórmio 1:1 e homogeneizou-se gentilmente. Centrifugou-se por 10 min a 13000g.

A fase superior aquosa foi transferida para um novo tubo e as etapas de adição de fenol/clorofórmio e centrifugação foram repetidas. A fase superior aquosa resultante foi novamente transferida para um novo tubo.

Foram adicionados um décimo do volume da solução da fase aquosa obtida anteriormente de NaCl 2 M. Posteriormente, 0,6 vezes o volume de

isopropanol foram adicionados e a mistura homogeneizada lentamente e incubada por 30 min a -80 °C. Centrifugou-se por 10 min a 13000g.

O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 250 µL de etanol 70% (v/v) ao *pellet*, Após centrifugação por 10 min a 13000g o processo foi repetido. Por fim, o *pellet* ficou à temperatura ambiente até que o etanol restante evaporasse. Esse *pellet* foi ressuspensão em 100 µL de água livre de nuclease.

II.2.3. Desenho dos iniciadores e amplificação da sequência codificadora da NahF (gene *nahF*)

Para a amplificação do inserto (gene *nahF*) por PCR (reação em cadeia da polimerase) foram utilizados iniciadores obtidos a partir da sequência codificadora para a salicilaldeído desidrogenase de *Pseudomonas putida* G7, na região 34222 a 35673 do plasmídeo NAH7 (acesso NC_007926.1) depositada no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

A amplificação dessa sequência foi realizada utilizando o par de iniciadores mostrado abaixo. Esses iniciadores foram desenhados para a clonagem no vetor de expressão pET28a(TEV). Os iniciadores continham as sequências para as enzimas de restrição *NdeI* (Fermentas, Glen Burnie, USA) no iniciador direto e *XhoI* (Fermentas) para o iniciador reverso (em negrito, as sequências correspondentes aos iniciadores).

nahF-NdeI(Direto) 5'**CAT ATG** AAG ACA AAA CTG TTT ATC AAC AAC 3'

($T_{\text{anelamento}} = 49 \text{ }^{\circ}\text{C}$)

nahF-XhoI(Reverso) 5'**TCG AGT** TCA GAA GGG ATA TTG CTG CT 3'

($T_{\text{anelamento}} = 50 \text{ }^{\circ}\text{C}$)

Para a amplificação do gene *nahF* foi realizada uma reação de 50 µL utilizando 1 µg do plasmídeo NAH7 extraído anteriormente como DNA molde, 0,2 pmol/µl de cada iniciador, 0,5 U de *Platinum Taq* DNA polimerase *High*

Fidelity (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM da mistura dos 4 desoxinucleotídeos e o tampão da enzima que acompanha o kit (KCl 50 mM, DTT 1 mM, EDTA 0,1 mM em Tris-HCl 50 mM pH 8,0). A reação foi executada de acordo com o seguinte programa:

95 °C durante 2 minutos (desnaturação inicial);

30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 minuto, anelamento a 50 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1,5 minutos;

72 °C por 5 minutos (ciclo final de extensão).

II.2.4. Clonagem do gene *nahF* no vetor de clonagem pGEM-T (Promega)

A sequência codificadora da proteína NahF (gene *nahF*) amplificada com os iniciadores *NdeI*-direto e *XhoI*-reverso de acordo com o tópico anterior foi purificada utilizando o kit '*Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification*' da GE (GE Healthcare Biosciences, Piscataway, NJ, USA).

Assim, a sequência amplificada e purificada foi ligada ao plasmídeo pGEM-T (Promega, Madison, WI, USA) utilizando o kit do vetor de acordo com as recomendações do fabricante. Foram testadas as proporções inserto: vetor, de 5:1 e de 3:1.

Bactérias *Escherichia coli* TOP10 quimiocompetentes foram transformadas por choque térmico (Sambrook 1989) com 1, 2 e 4 µL da reação de ligação. As bactérias transformadas foram crescidas em placas LB-ágar com ampicilina 100 µg/mL, X-gal 20 µg/mL e IPTG 20 µg/mL.

As colônias foram avaliadas por PCR de colônias (seguindo o mesmo protocolo de amplificação do gene *nahF*) e aquelas positivas foram inoculadas em meio LB líquido com ampicilina 100 µg/mL para crescerem por 18 h a 37 °C e 200 rpm. Após o crescimento, foi realizada a extração plasmidial utilizando o kit Mini-prep QIAprep Spin miniprep 150 (Qiagen, Hilden, Alemanha), segundo as recomendações do fabricante. O vetor recombinante obtido (pGEM-*nahF*) foi utilizado para a digestão com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* para liberação do inserto e posterior ligação no vetor pET28a(TEV) também digerido com as mesmas enzimas.

II.2.5. Clonagem do gene *nahF* no vetor de expressão pET28a(TEV)

A sequência codificadora da NahF (gene *nahF*) já clonada no vetor de clonagem pGEM foi transferida para o vetor de expressão pET28a(TEV). Para isso, 400 ng do vetor pET28a(TEV) foram digeridos por 16 h a 37 °C com a enzima *NdeI* da Fermentas (10 U) utilizando o tampão O fornecido pelo kit. Após esse tempo, a enzima *NdeI* foi inativada a 65 °C por 20 min e foi adicionada a enzima *XhoI* (20 U) incubando-se novamente a 37 °C por 4 h. O vetor recombinante pGEM-*nahF* também foi digerido com as duas enzimas: 2 µg do vetor foram incubados com 20 U de *NdeI* e 40 U de *XhoI* a 37 °C por 4 h.

Tanto o pET28a(TEV) quanto a sequência codificadora da NahF (gene *nahF*) digeridos foram purificadas em gel de agarose utilizando o kit '*Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification*' da GE.

Para a ligação do inserto (*nahF* digerido) com o vetor pET28a(TEV), 40 ng do vetor foram incubados com 54 ng do inserto por 16 h a 16 °C juntamente com 1 U da enzima T4 DNA ligase (USB, Santa Clara, CA, USA) para a proporção 5 inserto: 1 vetor. Também foi avaliada a proporção 3:1 com 20,3 ng do inserto e 25 ng do vetor.

Bactérias *E. coli Arctic Express* eletrocompetentes foram transformadas com o plasmídeo recombinante pET28a-*nahF*. As bactérias *Arctic Express* possuem um plasmídeo com genes duas chaperonas: Cnp10 e Cnp60 além do gene de resistência à gentamicina. Na reação, 50 µL de bactérias e 1 µL da reação de ligação foram adicionados a uma cubeta apropriada e eletroporados a 1,8 V. Logo em seguida, foram adicionados 200 µL de meio LB líquido e a mistura foi deixada sob agitação por 1 h a 37 °C para expressão do gene de resistência. Posteriormente, a mistura foi plaqueada em meio seletivo LB/ágar 1,5% com canamicina 50 µg/ml e gentamicina 20 µg/ml e deixada em estufa, a 37 °C por 16 horas. Os clones obtidos foram analisados através do PCR de colônias utilizando os iniciadores específicos para a sequência do gene *nahF* e o programa apresentado no item II.2.4, seguido de ensaio eletroforético em gel de agarose para visualizar a presença do inserto. Os clones positivos tiveram seus plasmídeos extraídos e sequenciados como no item I.2.6.

II.2.6 - Expressão da proteína recombinante NahF de *P. putida*

Bactérias *E. coli* BL21 Arctic Express transformadas com o vetor de expressão pET28a((TEV) com o gene *nahF* clonado foram inoculadas em 10 mL de meio LB suplementado com gentamicina 40 µg/ml e canamicina 50 µg/ml. Após incubação por 16 h a 37 °C e 200 rpm, essa cultura foi transferida para 2 L de meio LB sem antibióticos 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 24 h. A lise das bactérias foi realizada como no item I.2.8.

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%.

II.2.7. Purificação da proteína recombinante NahF

O sobrenadante, obtido após lise e remoção dos debrís celulares, foi purificado em coluna de afinidade HisTrap HP como no item I.2.10.1.

A amostra obtida foi dessalinizada em coluna HiPrep 26/10 como no item I.2.10.1 e testes de clivagem com a protease TEV para retirada da cauda de histidinas foram realizados: a amostra protéica foi adicionada de DTT 1 mM e submetida à clivagem nas proporções TEV:NahFr de 1:20, 1:5, 1:3 e 1:1, durante 4, 16 ou 20 horas nas temperaturas de 4, 30 ou 34 °C. Nenhum dos testes realizados resultou na clivagem da cauda de histidinas.

Assim, a amostra contendo a enzima NahFr com cauda de histidinas foi concentrada até o volume de 500 µL em Vivaspin 6, 10000 MWCO (GE Healthcare). Dependendo do volume obtido da amostra, ela foi concentrada até 2 mL e fizemos quatro passagens na coluna de gel filtração.

A amostra concentrada foi então aplicada na coluna de gel filtração Superdex 200 (GE Healthcare) também conectada ao ÄKTA Prime e previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 e NaCl 20 mM. A proteína foi eluída no mesmo tampão a um fluxo de 0,5 mL/min.

A concentração da proteína NahFr foi determinada, quando necessário, de acordo com o item I.2.11. O coeficiente de extinção molar utilizado foi $41410 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para a NahFr-6xHis.

II.2.8. Ensaio da atividade enzimática da NahFr

A atividade de salicilaldeído desidrogenase foi determinada espectrofotometricamente seguindo a regeneração do NADH como um aumento na absorvância a 340 nm.

O ensaio padrão (volume total de 1 mL) continha salicilaldeído 200 μM , NAD^+ 200 μM (Sigma, St. Louis, MO, USA para ambos) e tampão fosfato de sódio 100 mM pH 8,5 (valor de pH ótimo determinado anteriormente). A mistura foi previamente incubada a 25 °C e a reação iniciada pela adição da solução enzimática.

Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de NADH por minuto a 25 °C. Atividades específicas foram expressas como unidade por miligrama de proteína.

II.2.9. Efeito do pH na atividade enzimática de NahFr

Para determinar o pH ótimo de ação da enzima, as atividades foram medidas em diversos valores de pH que variaram entre 2,0 e 9,0 com incrementos de meia unidade de pH utilizando as condições de ensaio enzimático padrão. Os tampões utilizados foram fosfato de sódio 100 mM e tampão ácido acético-acetato de sódio 100 mM. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

II.2.10. Efeito da temperatura na atividade enzimática e termoestabilidade da NahFr

A temperatura ótima de ação da enzima foi determinada utilizando as condições de ensaio padrão em diversas temperaturas variando de 20 a 70 °C.

A estabilidade em diferentes temperaturas foi testada pela incubação de alíquotas da enzima nas temperaturas 40, 50, 60 e 70 °C durante diversos tempos. A atividade remanescente foi determinada de acordo com as condições padrão. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

II.2.11. Efeito de íons e outros agentes na atividade enzimática da NahFr

O efeito de diferentes íons e outros agentes na atividade enzimática foi examinado pela pré-incubação da enzima purificada com cada composto (na concentração final de 2 mM) em tampão fosfato 100 mM pH 8,5 durante 20 minutos à 25 °C. A atividade remanescente após a incubação foi determinada de acordo com o ensaio padrão. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

II.2.12. Efeito da concentração do substrato na atividade da enzima NahFr

Para a determinação do efeito da concentração do substrato salicilaldeído na atividade da enzima NahFr, a oxidação do salicilaldeído foi monitorada espectrofotometricamente à 340 nm.

As reações foram realizadas em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico à 25 °C. A mistura de reação continha tampão HEPES 50 mM pH 8,5, EDTA e NaCl 0,2 M. O substrato salicilaldeído foi dissolvido em acetonitrila (concentração final 0,5%) antes de ser adicionado à reação nas concentrações entre 0 e 90 µM e o NAD⁺ foi mantido constante na concentração de 200 µM. A reação foi iniciada pela adição de 100 µL de enzima para um volume final de 2 mL. Para garantir o estado estacionário, a

concentração da enzima foi mantida cerca de 30 vezes abaixo dos valores de K_M .

Para a determinação das constantes de Michaelis-Menten (Puccia) e velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) o coeficiente de extinção molar (ϵ) do substrato salicilaldeído (S) e dos produtos, NADH e a forma oxidada do substrato (P) foram consideradas: $\Delta\epsilon(\text{reação}) = \epsilon(\text{NADH}) + \epsilon(\text{P}) - \epsilon(\text{S})$. Os parâmetros cinéticos K_M e $V_{m\acute{a}x}$ foram então obtidos pelo ajuste não-linear da velocidade inicial (v) versus $[S]$ seguindo a equação de Michaelis-Menten:

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

II.2.13. Atividade da NahFr com outros substratos

A atividade da enzima NahFr também foi avaliada para diversos outros aldeídos variando posição e tipo de substituição no anel, quantidade de anéis aromáticos e ausência desses, seguindo as mesmas condições descritas no item II.2.12. Os aldeídos avaliados estão representados na figura 21.

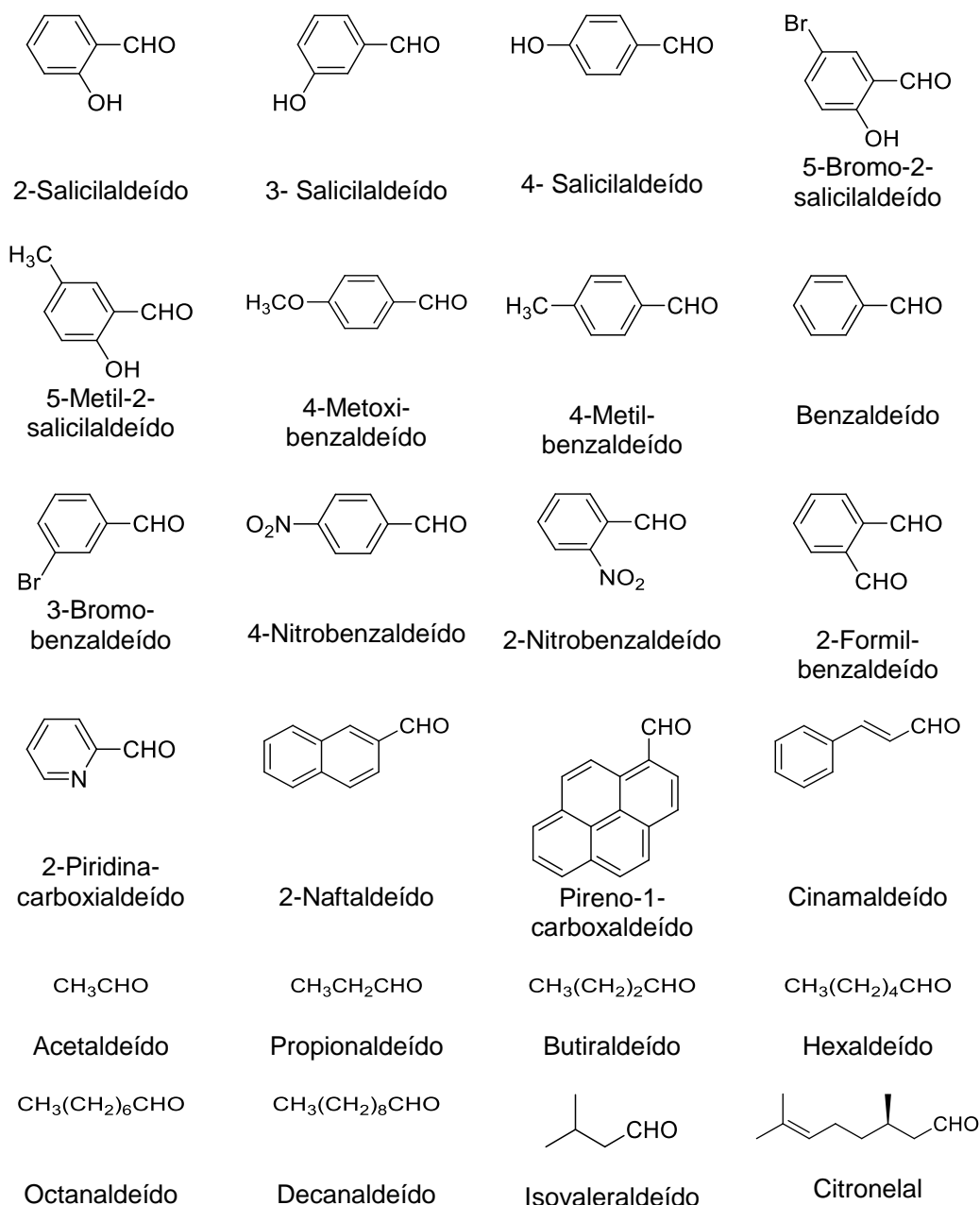


Figura 21. Aldeídos utilizados como substratos para medida da atividade da enzima NahFr. A atividade da enzima NahFr foi avaliada para diferentes aldeídos aromáticos e alifáticos.

II.2.14. Efeito da ligação do substrato na estabilidade da enzima

Para verificar o efeito da ligação dos substratos salicilaldeído e NAD^+ na estabilidade da enzima NahFr, a temperatura de desnaturação (“*melting temperature*”, T_m) foi determinada utilizando a técnica de “*Differential Scanning*

Fluorimetry” (DSF) de acordo com o procedimento proposto por Niesen e colaboradores (Niesen et al. 2007).

A enzima NahFr foi concentrada à 15 mg/mL em solução tampão (fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4 e NaCl 20 mM) e as soluções estoque dos ligantes diluídas no mesmo tampão. Foram adicionados em cada poço de uma placa de 96 poços a solução proteica (concentração final 2 µM), as soluções dos ligantes (concentrações finais de 10 e 50 µM), a solução do corante Sypro Orange (diluída para concentração final 1X, de acordo com as recomendações do fabricante) e solução tampão para completar o volume final de 20 µL. Também foram realizados ensaios para as soluções dos ligantes na ausência da enzima.

As placas foram colocadas em um equipamento de *real time*-PCR e submetidas a acréscimos na temperatura de 1 °C/min, com a temperatura variando de 20 à 90 °C. A fluorescência do corante Sypro Orange (a.u.) foi monitorada em função da temperatura em cada poço.

Para a determinação da T_m , os dados foram analisados por meio da equação de Boltzman e os valores dos pontos de inflexão de cada curva correspondem à T_m da enzima na ausência ou presença de seus substratos.

$$y = LL + \frac{(UL - LL)}{1 + e^{\left(\frac{T_m - x}{a}\right)}}$$

Onde UL e LL são as intensidades de fluorescência mínima e máxima, respectivamente; a é a inclinação da curva dentro de T_m e T_m é o ponto de inflexão da curva de transição (Niesen et al. 2007).

Todos os gráficos e análises de Boltzman foram realizados no programa GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (www.graphpad.com).

II.2.15. Estudos da estrutura secundária e estado de oligomerização da proteína NahFr por Dicroísmo Circular e Espalhamento Dinâmico de Luz

Os ensaios de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) foram realizados como no item I.2.12. A proteína NahFr em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 e NaCl 20 mM estava na concentração de 2,27 mg/mL. Também

foi avaliado a proteína NahFr pré-incubada por 30 minutos a 25 °C, com os substratos salicilaldeído 200 µM, NAD⁺ 200 µM ou ambos nas mesmas concentrações cada.

Para os ensaios de Dicroísmo Circular (CD), a proteína NahFr foi diluída para a concentração de 0,144 mg/mL em tampão fosfato de sódio 2 mM pH 7,4 e NaCl 2 mM. O protocolo foi o mesmo do item I.2.13.

II.2.16. Testes de cristalização da proteína recombinante NahF

Para a proteína NahFr também foram realizados testes de cristalização na presença dos substratos salicilaldeído (2 mM) e NAD⁺ (2 mM) utilizando os kits *Crytal Screen* I e II (Hampton Research). Os substratos foram adicionados à solução protéica minutos antes de se preparar a gota de cristalização. A concentração da proteína foi variada entre 10 e 20 mg/mL, nas proporções de 1:1; 1:2 e 2:1 (µL de proteína para µL da solução do poço).

Após a visualização da presença de cristais de NahFr em determinada condição, também foram realizados ensaios de cristalização em diferentes valores de pH. Para isso foram utilizados os tampões fosfato de sódio 100 mM pH 6,0 e 7,0 e tampão acetato de sódio/ácido acético pH 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0.

II.2.17. Coleta dos dados de difração, processamento e determinação das fases da proteína NahFr

Para a coleta dos dados de difração, um dos cristais em forma de flor obtidos teve uma das “pétalas” removida e esta foi submetida à difração de raios-X. Essa pétala foi removida com um *loop* de nylon e transferida para uma solução criogênica contendo etilenoglicol na concentração final de 10% (9 µL da solução do poço de cristalização e 1 µL de etilenoglicol). Esse cristal foi então vitrificado em nitrogênio líquido na temperatura de 100 K e os dados de difração foram obtidos.

Foi utilizado o detector MARCCD na linha DB03-MX1 (Polikarpov et al. 1998) no LNLS e cada imagem de difração foi exposta por 60 s com 0,5° de rotação. Essas imagens foram processadas utilizando os programas iMOSFLM (Battye et al. 2011) e SCALA (Evans 2006), ambos distribuídos pelo pacote de programas CCP4 (Collaborative Computational Project Number 4 1994).

Para a resolução das fases foi utilizado o método de Substituição Molecular no programa Phaser (McCoy et al. 2007) e, como modelo, a estrutura cristalográfica da aldeído desidrogenase citosólica do fígado de ovelha (código do PDB: 1BXS) (Moore et al. 1998), que compartilha 37% de identidade de sequência com a NahF (o alinhamento da sequência de aminoácidos da NahF e da 1BXS é apresentado na figura 40).

II.2.18. Determinação da estrutura cristalográfica da NahFr

Para a determinação do conteúdo de solvente e número de subunidades na unidade assimétrica do cristal foi utilizado o programa Matthews (Matthews 1968). O modelo para a enzima NahFr foi construído utilizando os programas Buccaneer (Cowtan 2006) e Coot (Emsley et al. 2010).

O refinamento das fases encontradas foi realizado utilizando, inicialmente, o programa REFMAC (Murshudov et al. 1997), também disponível no pacote CCP4, que utiliza o método estatístico do “*Maximum Likelihood - ML*” (máxima verosimilhança), que é a melhor opção de refinamento do espaço recíproco para macromoléculas, já que o modelo final obtido é menos afetado pela não-completude dos dados. Nesse programa, foi utilizada a opção “*Restrained refinement*”, onde o modelo é refinado para dar o melhor ajuste para a densidade experimental, mantendo a estereoquímica adequada.

Os ciclos finais de refinamento e os ajustes no modelo foram realizados com o programa Phenix (Adams et al. 2010). A visualização do modelo e os ajustes manuais das posições atômicas foram realizados no programa Coot.

II.2.19. Análise comparativa da estrutura da NahFr

Para a análise comparativa da estrutura da NahFr foram escolhidas as proteínas:

- 1- NahI (2-hidroximucônico semialdeído desidrogenase) de *Pseudomonas putida* G7 (referência no NCBI: YP_534834.1, cuja estrutura está sendo concluída no Grupo de Biologia Estrutural do ICB);
- 2- *cg*BLDH (benzaldeído desidrogenase) de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (referência no NCBI: YP_226908.1, código do PDB: 3R64);
- 3- *oa*ALDH (aldeído desidrogenase) de *Ovis aries*, (referência no NCBI: NP_001009778.1, código PDB: 1BXS; (Moore et al. 1998).

Vários critérios foram utilizados para a escolha dessas enzimas como: organismo de origem, similaridades estruturais, especificidade pelo substrato, dentre outras. Assim, a sequência de aminoácidos e a estrutura das mesmas foram alinhadas/sobrepostas para as análises comparativas dos sítios de ligação do substrato e do cofator.

II.3. Resultados e discussão

II.3.1 – Clonagem e expressão do gene *nahF* de *P. putida*

O gene *nahF* (1500 pb) de *P. putida* G7, após amplificação e subclonagem no vetor pGEM, foi clonado no vetor de expressão pET28a((TEV) que expressa a proteína recombinante com cauda de histidinas N-terminal.

Para confirmar essa clonagem, o vetor recombinante pET28a-*nahF* foi digerido com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* e, como apresentado na figura 22, foi liberado um inserto de aproximadamente 1500 pb correspondente ao tamanho do gene *nahF* de *P. putida* G7. O vetor recombinante também foi sequenciado (Apêndice III) apresentando identidade total com a sequência do gene codificador da enzima NahF depositada no NCBI.

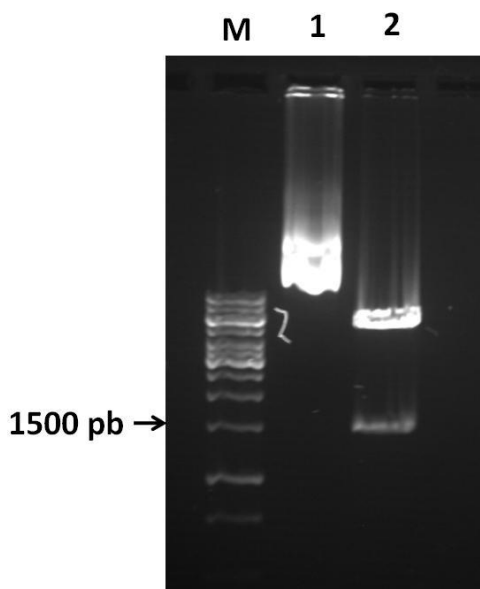


Figura 22. Digestão dos plasmídeos pET28a(TEV) e pET28a-*nahF* com as enzimas *NdeI* e *XhoI*. Observamos a liberação de um inserto de aproximadamente 1500 pb, correspondente ao gene *nahF*. M – marcador λ Hind; 1 – pET28a(TEV) não digerido; 2 – pET28a-*nahF* digerido com *NdeI* e *XhoI*.

A proteína recombinante NahF (NahFr) foi expressa inicialmente em *E. coli* BL21(DE3) a 37 °C, porém, com essa cepa e nessa temperatura, a proteína recombinante mostrou-se insolúvel. Assim, o vetor recombinante pET28a-*nahF* foi transferido para bactérias *E. coli* Arctic Express para expressão da NahFr a 12 °C (Figura 23). Essa cepa ainda contém um plasmídeo para expressão de duas chaperoninas (Cnp60, 60kDa e Cnp10, 10 kDa) que auxiliam no enovelamento da proteína recombinante. Na figura 23, observamos uma banda entre 45 e 60 kDa após 24 horas de expressão e em sua maior parte, no extrato solúvel. A massa molecular teórica da proteína NahFr é 52,2 kDa, mais os 2 kDa adicionados pelo vetor.

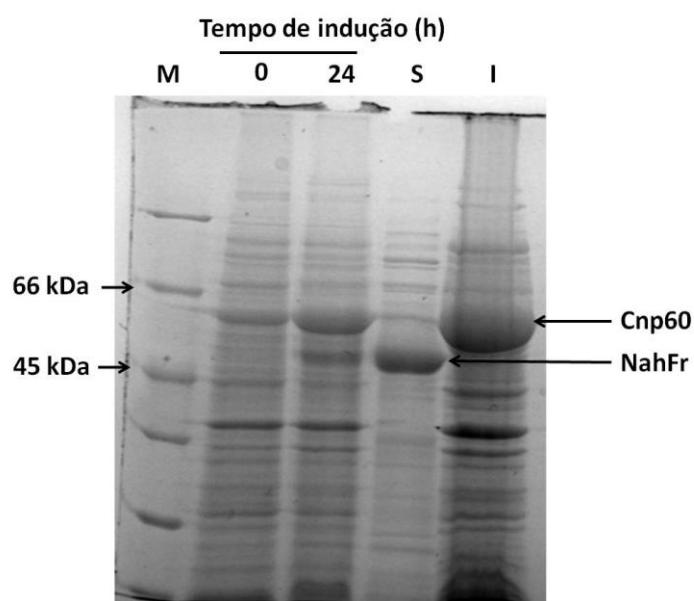


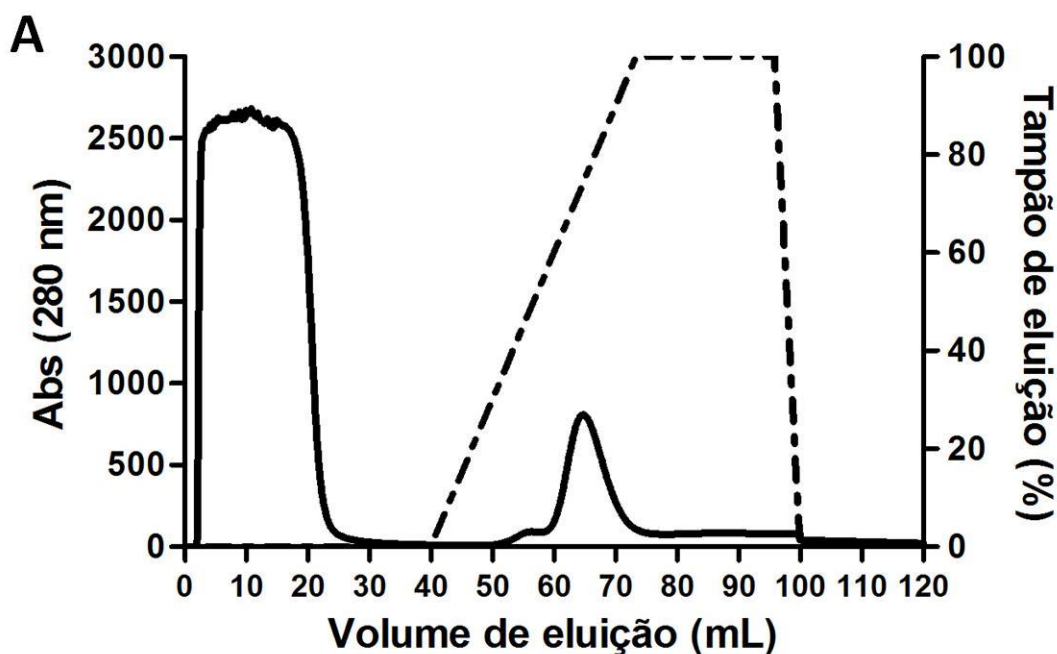
Figura 23. Expressão da NahF recombinante em *E. coli* Arctic Express a 12 °C. M- marcador de peso molecular; 0 e 24 h – tempos de indução; S – extrato solúvel e I – extrato insolúvel. Note que, nesse teste de expressão, a chaperonina Cnp60 ficou no extrato insolúvel e a NahFr no solúvel.

II.3.2. Purificação da NahFr de *P. putida*

A NahFr solúvel foi então purificada utilizando cromatografia de afinidade (HisTrap HP) (Figura 24A) e posterior gel filtração na coluna Superdex 200 (Figura 24B).

Diversas tentativas de clivar a cauda de histidinas da enzima recombinante foram realizadas. Testamos várias proporções NahFr/TEV, várias temperaturas e tempos de incubação, mas em nenhum desses testes obtivemos sucesso na remoção da cauda. Assim, a partir desse momento, todos os ensaios posteriores foram realizados com a proteína NahFr com cauda de histidinas.

Para acompanhar a purificação da enzima recombinante durante os processos cromatográficos, as amostras provenientes de cada uma das etapas de purificação foram submetidas à eletroforese desnaturante em gel de poli-acrilamida (SDS-PAGE) 12,0 %. O perfil eletroforético assim obtido pode ser observado na Figura 23C que mostra a NahFr com alto grau de pureza.



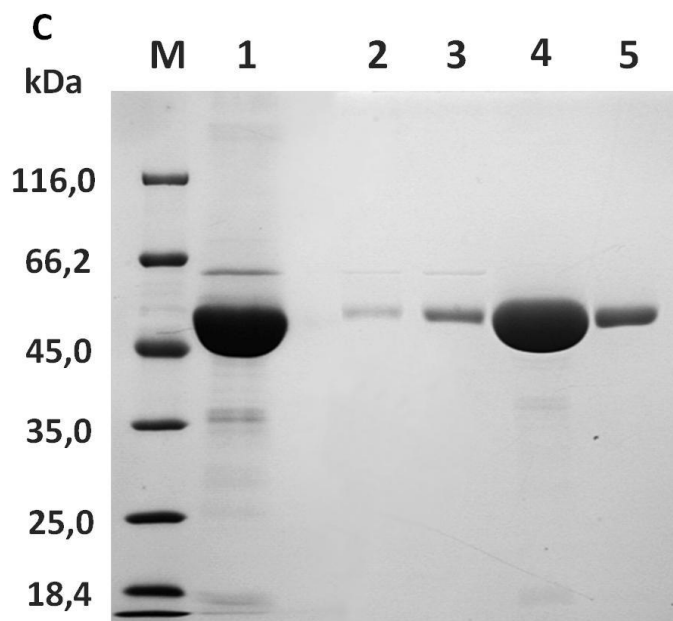
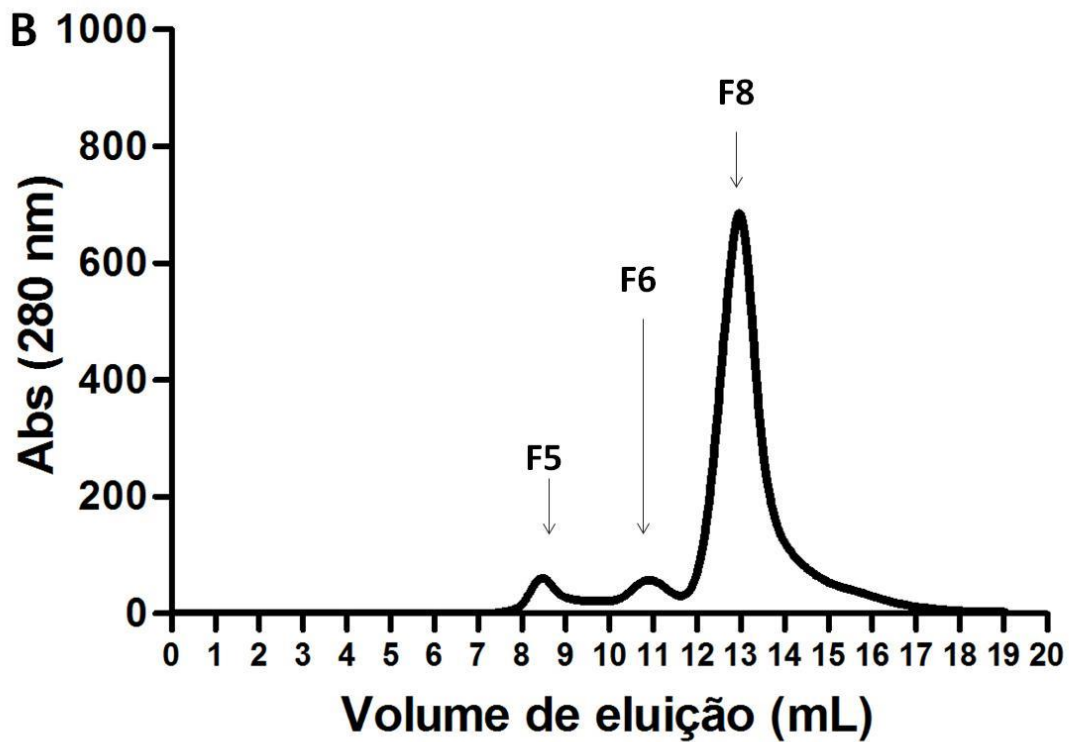


Figura 24. Purificação da enzima NahFr. É interessante notar que os três picos obtidos após a gel filtração correspondem à NahFr. **A** – Perfil após purificação por cromatografia de afinidade. A linha tracejada corresponde à % do tampão de eluição; **B** – Perfil após purificação por gel filtração; **C** - SDS-PAGE 12% da purificação da NahFr: 1 – ‘Pool’ das frações obtidas após eluição em coluna de afinidade; 2, 3, 4 e 5 – frações 5, 6, 8 e 9 após gel filtração; M – marcadores de massa molecular.

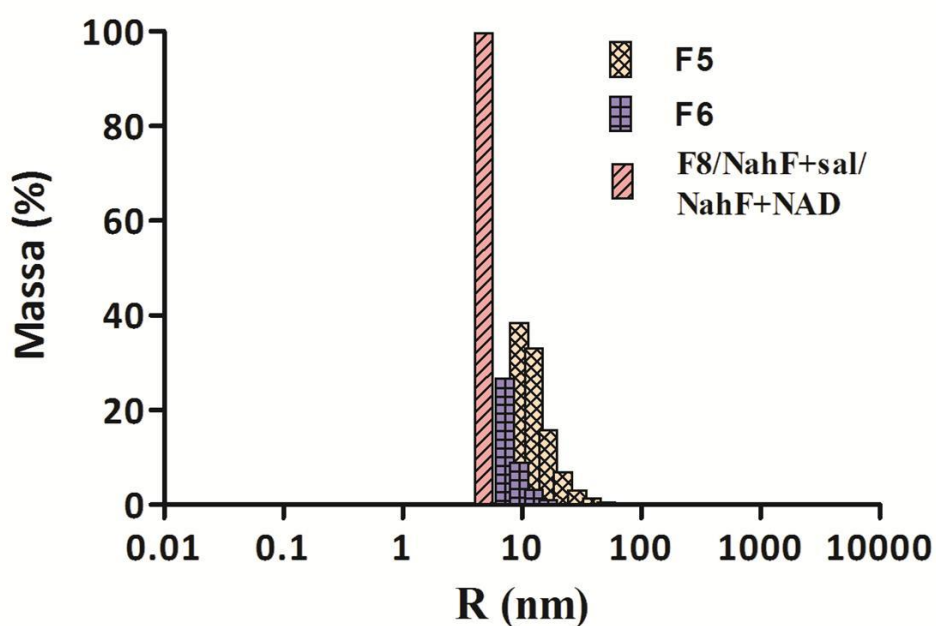
A proteína NahFr eluiu em três frações na coluna de gel filtração Superdex 200 sendo que o terceiro pico, correspondendo à fração 8 (F8), eluiu com um volume correspondente a um dímero (massa aproximada de 117 kDa). Essa massa foi determinada pela comparação com o volume de eluição de proteínas com massa molecular conhecida durante a calibração da coluna.

Os resultados de DLS obtidos com a NahFr contida nas fração 8 (Figura 25) mostram que 99,6 % da massa da solução apresenta um raio de 4,7 nm que corresponde a aproximadamente 125 kDa, confirmando que a NahFr se comporta como um dímero em solução.

Esses resultados também mostraram que essa fração 8, correspondente à NahFr monodispersa, possui polidispersidade (%Pd) de 14% (lembrando que soluções monodispersas apresentam polidispersidade menor que 20%).

Por sua vez, as frações 5 e 6 correspondem a diferentes estados polidispersos, evidenciados pela maior distribuição de raios de partícula no ensaio de DLS (cada barra corresponde a um diferente valor de raio medido).

Ensaio de DLS também foram realizados com a NahFr na presença dos substratos salicilaldeído e NAD^+ . Em ambos os casos, também foi observado um único pico na figura 25, correspondente a um único estado de oligomerização da proteína em solução. Ainda nessa figura, observamos que este estado também corresponde a um dímero, já que os raios hidrodinâmicos são bem próximos daquele observado para a NahFr na ausência dos substratos.



Frações	R (nm)	Pd (%)	MM (kDa)	Massa (%)
F8	4,7	14,0	125	99,6
F8 + NAD ⁺	4,6	13,9	120	99,7
F8 + sal	4,7	14,0	124	99,7
F8 + NAD ⁺ + sal	4,5	13,4	114	99,0

Figura 25. Espalhamento dinâmico da luz (DLS) da enzima NahF sozinha e na presença de seus substratos. O gráfico de DLS mostra a monodispersividade da NahFr. Nele observamos diversos picos para as frações F5 e F6 após gel filtração e um único pico para a fração F8 após a gel filtração e para a NahF na presença de salicilaldeído e NAD⁺. Na tabela, observamos os valores dos raios hidrodinâmicos observados para a NahFr na ausência e na presença dos substratos salicilaldeído (sal) e NAD⁺ ou ambos. R – raio em nm; %Pd – porcentagem de polidispersidade; MM – massa molar.

Em relação à eficiência do processo de purificação, observamos, na tabela 5, que a NahFr foi purificada em cerca de 12,3 vezes com um rendimento de 83,3% da atividade de salicilaldeído desidrogenase em relação à amostra do extrato bacteriano bruto.

Tabela 5. Purificação da NahF recombinante de *Pseudomonas putida*.

	Volume total (mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação	Rendimento (%)
Extrato bacteriano	16	475,2	14,9	0,031	1	100
HisTrap	12	59,5	12,2	0,205	6,6	82,1
Superdex 200	10	32,1	12,4	0,386	12,3	83,3

1 U: quantidade de enzima que libera 1 μmol de NADH por minuto nas condições padrão.

II.3.3. Efeito do pH e temperatura na atividade enzimática de NahFr

A atividade da NahFr foi avaliada em valores de pH variando entre 2,0 e 10,0 na temperatura de 25 °C, utilizando salicilaldeído e NAD⁺ como substratos (Figura 26). Em valores de pH ácidos, a atividade enzimática é baixa e, à medida que o pH vai se tornando básico, a atividade vai aumentando até atingir seu máximo pH 8,5. Valores de pH acima de 9,0 levam à perda significativa da atividade.

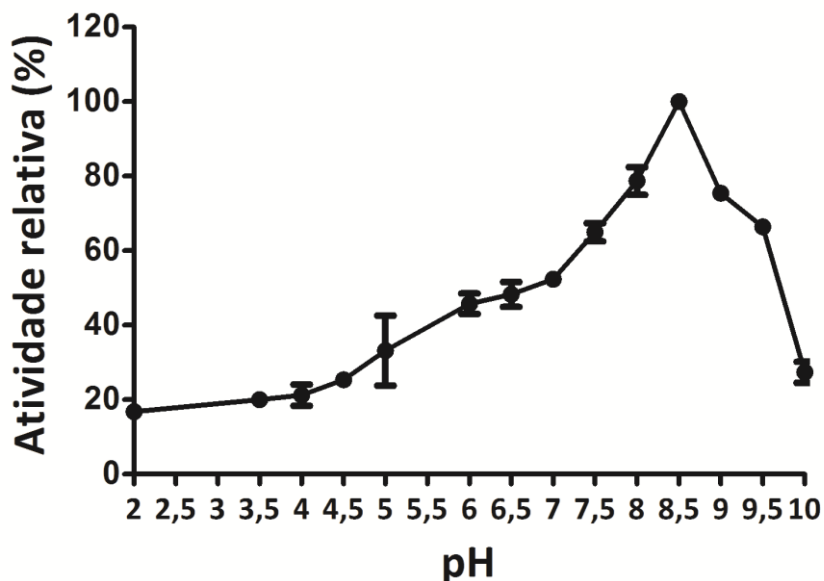


Figura 26. Efeito do pH na atividade da enzima NahF recombinante de *Pseudomonas putida*. Observamos que a atividade máxima da enzima foi observada em valores de pH entre 8 e 9.

Aldeído desidrogenases apresentam, em geral, pH ótimo básico em torno de 8,0 a 9,0 como a ALDH de *E. coli* que utiliza 3-hidroxi propionaldeído, cujo pH ótimo é 8,0 (Jo et al. 2008), a betaína ALDH de *P. aeruginosa*, com atividade máxima entre pH 8,0 e 8,5 (Velasco-Garcia et al. 2006); a ALDH de *Klebsiella pneumoniae*, pH ótimo também de 8 (Raj 2010); a ALDH de *Rattus norvegicus*, cujo pH ótimo foi de 8,5 (Bedino 1990) e encontramos até enzimas com pH ótimo bem elevado, como a ALDH de *Phanerochaete chrysosporium*, com pH ótimo de 10 (Tin et al. 2000).

A atividade da enzima NahFr também foi avaliada em temperaturas entre 20 e 70 °C, utilizando salicilaldeído e NAD⁺ como substratos. De acordo com o gráfico apresentado na figura 27, a atividade máxima foi a 60 °C, com um decréscimo acentuado acima dessa temperatura. Nas temperaturas de 40 e 50 °C, a enzima manteve cerca de 50 a 60 % de sua atividade. Já em temperaturas acima de 70 °C, a enzima perdeu totalmente sua atividade.

Mais uma vez, comparando com dados da literatura, vemos que as ALDHs apresentam valores de temperatura ótima bem variáveis. Encontramos ALDHs com temperatura ótima de 25 °C em humanos (Giebultowicz 2009); 37

°C em *E. coli* (Jo et al. 2008); 50 °C em *R. norvegicus* (Bedino 1990) e 60 °C (Li 2010), mesma temperatura ótima da NahFr.

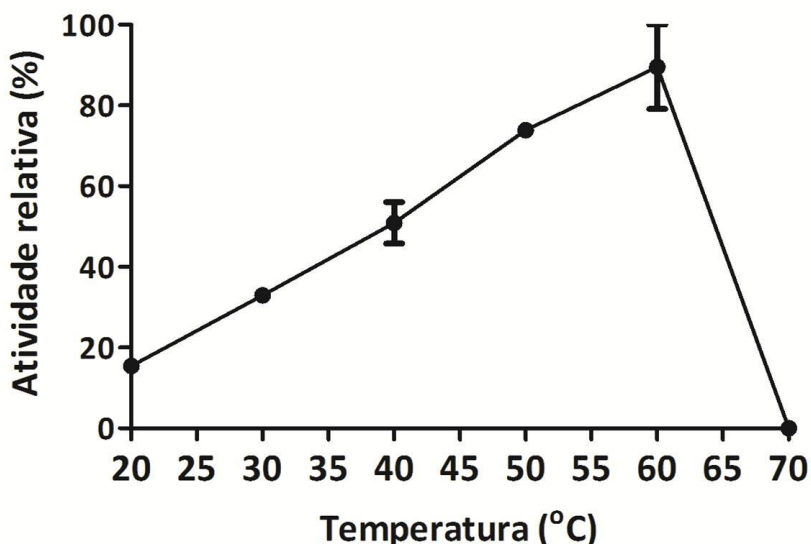


Figura 27. Efeito da temperatura na atividade da enzima NahF recombinante de *Pseudomonas putida*. A temperatura em que a NahFr apresentou maior atividade foi de 60 °C.

Quando a termoestabilidade da enzima foi avaliada, ou seja, quando a NahFr foi pré-incubada nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C e a atividade remanescente avaliada, a NahFr se mostrou estável a 40 °C, mantendo próximo de 60% de sua atividade mesmo após 7 h de incubação. Porém, a 50 e 60 °C, a enzima perdeu totalmente a sua atividade após 2 e 1 hora, respectivamente (Figura 28).

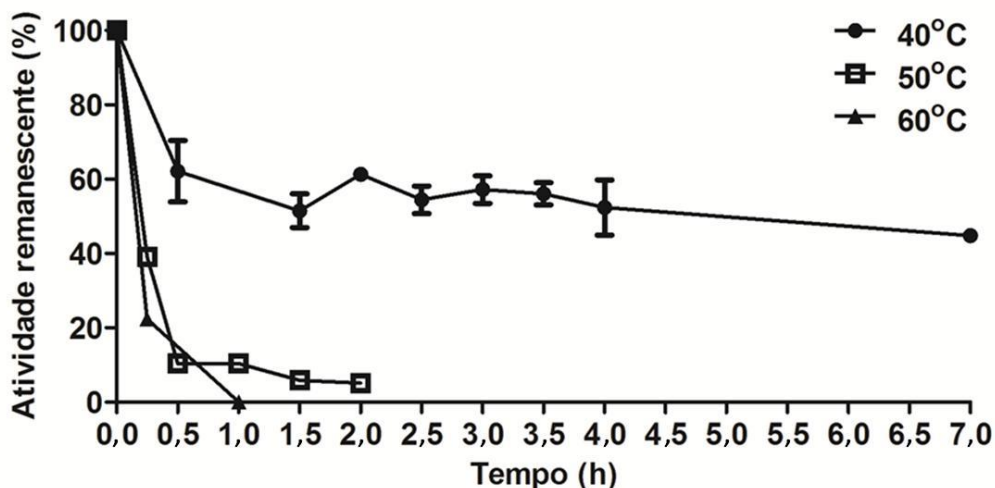


Figura 28. Efeito da temperatura na estabilidade da enzima NahFr. A enzima recombinante NahFr mantém cerca de 60% de sua atividade até 7 horas após incubação a 40 °C. Nas temperaturas de 50 e 60 °C, ela é completamente inativada após incubação por 2 e 1 hora.

Assim como a NahFr, em geral, as aldeído desidrogenases parecem ser bem sensíveis à incubação em temperaturas elevadas: por exemplo, a ALDH de *E. coli* que utiliza 3-hidroxi propionaldeído (Jo et al. 2008) se mostrou muito sensível às variações de temperatura. Ela foi estável de 20 a 50 °C, mas muito instável em temperaturas iguais ou maiores que 50 °C. A ALDH de *Klebsiella pneumoniae* foi totalmente instável a 60 °C (Raj 2010), apesar de se manter estável a 30 e 50 °C. Já a ALDH de *Euglena gracilis* perdeu 50% de sua atividade a 50 °C e 100% a 60 °C após 5 minutos (Rodriguez-Zavala 2006). Mas existem exceções: no organismo termofílico *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 (Li 2010), a ALDH manteve 97%, 85%, 71% e 56% de sua atividade original após incubação a 40, 50, 60 e 70°C por 60 minutos e só foi completamente inativada após incubação a 80°C.

II.3.4. Efeito de íons e outros agentes sobre a atividade da NahFr

A influência de diferentes íons e outros agentes na atividade da enzima NahFr também foi testada. Inicialmente, testamos a atividade remanescente pela pré-incubação da enzima por 20 minutos na presença de

1 mM de cada agente (Figura 29A), mas, para a maioria deles, não houve qualquer influência na atividade enzimática. Decidimos então, aumentar a concentração dos agentes para 2 mM e a atividade remanescente da enzima foi calculada em relação à atividade da enzima na ausência dos mesmos, considerada 100% (Figura 29B).

A atividade da NahFr parece não ser alterada na presença dos íons monovalentes Na^+ , K^+ e Rb^+ e divalentes, Mg^{2+} , Ca^{2+} . As ALDHs de *K. pneumoniae* (Raj 2010), de *G. thermodenitrificans* (Li 2010) e de *E. coli* (Jo et al. 2008) também parecem não sofrer efeito desses íons ou, quando existe algum efeito, ele é pequeno, com redução de no máximo 20%. Para o Co^{2+} , que não influenciou a atividade da enzima NahFr e a de *K. pneumoniae* (Raj 2010), para as ALDHs de *G. thermodenitrificans* (Li 2010) e de *E. coli* (Jo et al. 2008), houve completa inibição na concentração de 1 mM. Vale ressaltar que, nesses trabalhos aqui citados como exemplo, a enzima não foi pré-incubada com os metais, mas eles foram adicionados à reação. Porém, a reação durava 15 minutos, o que equivale, aproximadamente, ao tempo de pré-incubação utilizado em nosso trabalho.

Os íons NH_4^+ , Li^{2+} e os agentes EDTA e DTT tiveram uma pequena influência na atividade da NahFr, com inibição de no máximo 20%. A pequena influência do EDTA na atividade da enzima indica que ela não deve necessitar de íons metálicos para sua atividade, já que o EDTA funciona como quelante de tais íons. O mesmo ocorreu com as ALDHs de *E. coli* (Jo et al. 2008), de *K. pneumoniae* (Raj 2010) e de *G. thermodenitrificans* (Li 2010).

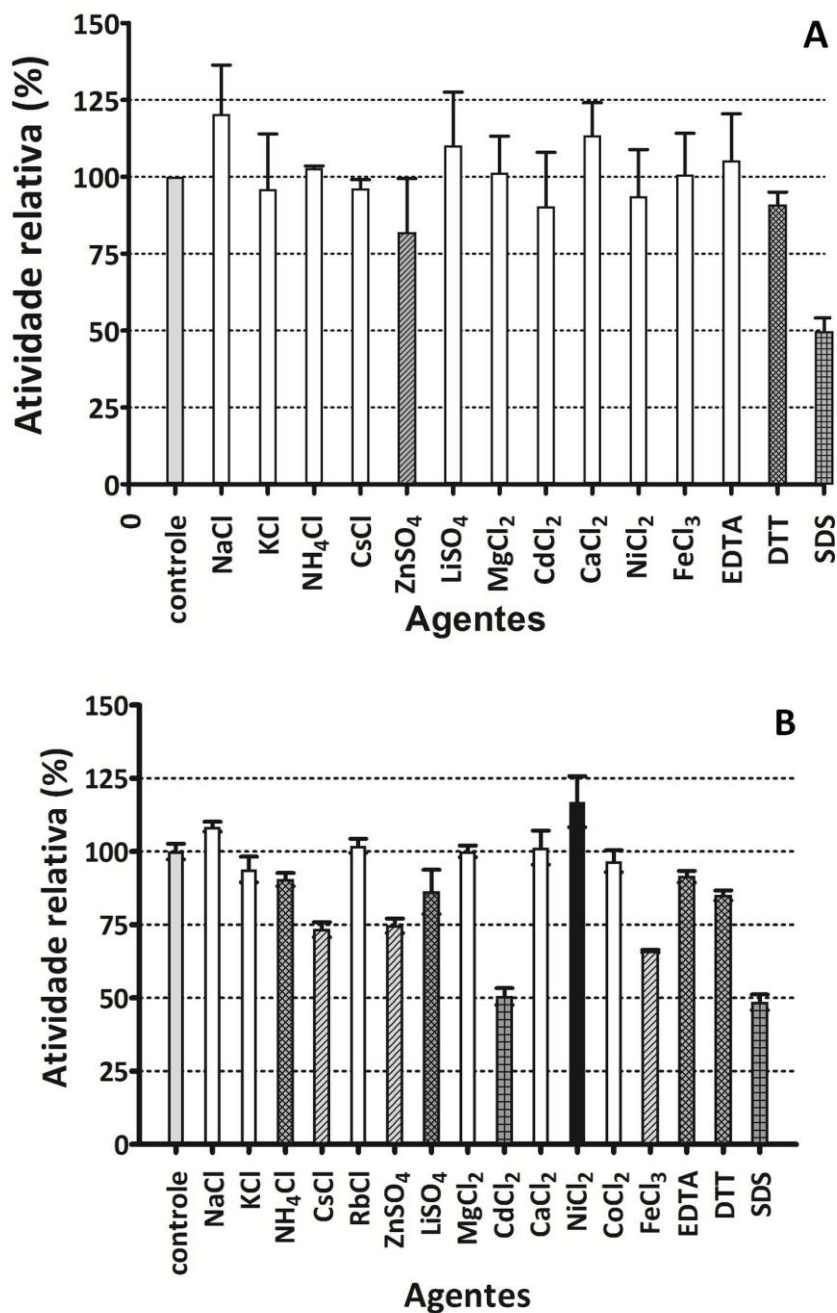


Figura 29. Efeito de íons e outros agentes na concentração de na atividade da enzima NahFr de *P. putida*. Os agentes apresentaram efeitos diversos na atividade enzimática, com destaque para a inibição de cerca de 50% pela pré-incubação com CdCl₂ e SDS. A concentração utilizada dos agentes foi de 1 mM (em **A**) e 2 mM (em **B**).

O DTT, usualmente, aumenta a atividade das ALDHs, já que essas enzimas necessitam de grupos sulfidril (-SH) livres para sua atividade, no caso, uma cisteína. Em nossos ensaios, o DTT reduziu a atividade da NahFr quando

avaliamos a concentração de 2 mM, já na concentração de 1 mM, não houve alteração na atividade enzimática, como esperado.

Os íons Cs^+ , Zn^{2+} e Fe^{3+} inibiram 25-35% a atividade da enzima NahFr na concentração de 2 mM. Já o íon Cd^{2+} que causou uma inibição de 50% na concentração de 2 mM, em 1 mM foi de apenas 10%. Para a ALDH de *G. thermodenitrificans* (Li 2010), Fe^{3+} levou à perda total da atividade enzimática. O agente SDS inibiu a atividade da NahFr em cerca de 50% em ambas as concentrações, 1 e 2 mM.

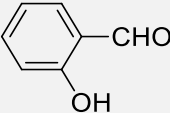
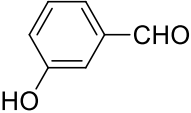
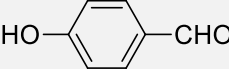
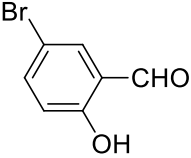
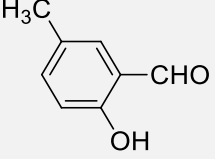
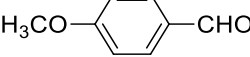
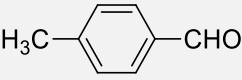
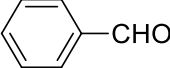
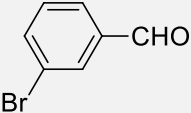
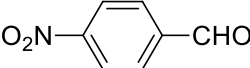
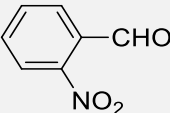
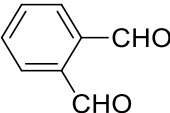
O íon Ni^{2+} que para outras ALDHs apresentou efeito inibitório: 27% em *E. coli* (Jo et al. 2008), 10% em *G. thermodenitrificans* (Li 2010) e inibição total em *K. pneumoniae* (Raj 2010) na concentração de 1 mM não afetou a atividade da NahFr nessa mesma concentração e, à 2 mM apresentou uma pequena elevação da atividade de aproximadamente 20%, que, considerando o erro associado, pode não ser significativa.

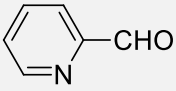
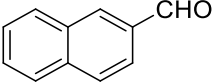
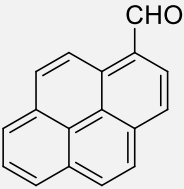
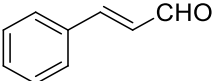
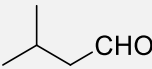
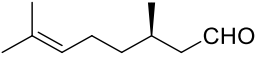
II.3.5. Efeito da concentração de substrato salicilaldeído e outros aldeídos na atividade de NahFr

O efeito da concentração do substrato salicilaldeído na velocidade da reação catalisada pela NahFr de *P. putida* G7, foi determinado seguindo a cinética de Michaelis-Menten.

Os valores da constante cinética K_M , k_{cat} e k_{cat}/K_M para o salicilaldeído e os outros aldeídos são apresentados na Tabela 6 e o gráfico de Michaelis-Menten para o substrato salicilaldeído na figura 30.

Tabela 6. Atividade da enzima NahFr sobre aldeídos aromáticos e alifáticos.

Substrato	Estrutura química	K_m μM	k_{cat} s^{-1}	k_{cat}/K_m $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
2-Salicilaldeído		2,48±0,30	12,7±0,3	5132±634
3- Salicilaldeído		0,90±0,16	0,743±0,033	824±155
4- Salicilaldeído		0,55±0,17	0,186±0,006	336±106
5-Bromo-2-salicilaldeído		12,1±2,3	4,65±0,49	383±83
5-Metil-2-salicilaldeído		5,20±0,42	14,0±0,5	2696±234
4-Metoxi-benzaldeído		2,41±0,21	0,687±0,014	284±26
4-Metil-benzaldeído		1,43±0,43	1,50±0,14	1053±330
Benzaldeído		0,89±0,22	1,79±0,10	2002±503
3-Bromo-benzaldeído		--	--	--
4-Nitrobenzaldeído		4,47±0,98	1,00±0,05	224±50
2-Nitrobenzaldeído		2,67±0,98	5,86±1,65	2197±1019
2-Formil-benzaldeído		29,8±5,9	10,8±1,7	362±91

2-Piridina-carboxialdeído		13,3±2,8	13,5±1,8	1015±251
2-Naftaldeído		1,55±0,42	9,37±1,16	6033±1795
Pireno-1-carboxialdeído		0,75±0,09	3,20±0,10	4285±528
Cinamaldeído		7,09±0,56	1,62±0,04	229±19
Acetaldeído	CH ₃ CHO	9555±459	0,186±0,004	0,0195±0,0010
Propionaldeído	CH ₃ CH ₂ CHO	1798±161	0,383±0,011	0,213±0,020
Butiraldeído	CH ₃ (CH ₂) ₂ CHO	2431±201	1,70±0,07	0,701±0,064
Hexaldeído	CH ₃ (CH ₂) ₄ CHO	52,5±3,3	0,749±0,014	14,2±0,9
Octanaldeído	CH ₃ (CH ₂) ₆ CHO	9,15±0,46	0,662±0,012	72,3±3,8
Decanaldeído	CH ₃ (CH ₂) ₈ CHO	1,50±0,11	0,867±0,014	576±45
Isovaleraldeído		150±5	0,231±0,003	1,55±0,06
Citronelal		8,25±3,29	0,251±0,059	30,4±14,1

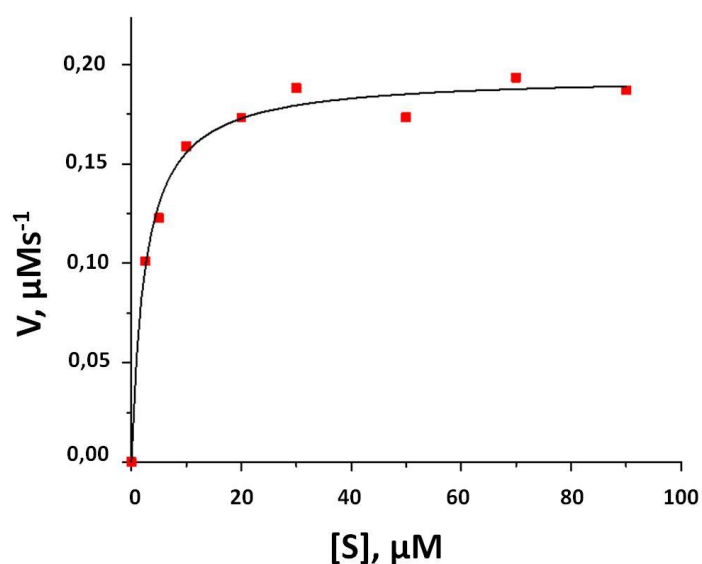


Figura 30. Efeito do substrato salicilaldeído na atividade da NahFr. Com a concentração fixa do cofator NAD⁺, a enzima NahFr apresenta um perfil típico da cinética Micheliana para o substrato salicilaldeído com um K_M de 2,48 μM.

A $V_{\text{máx}}$ é equivalente à etapa limitante da velocidade da reação enzimática. Mas muitas vezes é difícil determinar essa etapa limitante e se utiliza a constante k_{cat} que é o recíproco do tempo e é equivalente ao número de moléculas do substrato convertidas em produto por uma única molécula de enzima em uma dada unidade de tempo, quando a enzima está saturada pelo substrato. Assim, calculamos:

$$k_{\text{cat}} = V_{\text{max}}/[E_{\text{total}}]$$

Onde, $V_{\text{máx}}$ é a velocidade máxima calculada para a reação enzimática e E_{total} é a concentração total de enzima utilizada no ensaio.

Porém, a melhor maneira de se comparar a eficiência catalítica de diferentes enzimas é analisar a relação k_{cat}/K_M para as duas reações, muitas vezes denominada constante específica. Essa constante indica qual é o substrato “natural” ou preferido pela enzima. Assim, nossa discussão sobre a atividade da NahFr sobre os diferentes substratos apresentados na tabela 5 será feita por comparação de seus valores de k_{cat}/K_M .

Assim, comparando a atividade da enzima NahFr para os diferentes aldeídos vemos que a NahFr catalisa a oxidação de aldeídos aromáticos com grandes valores de k_{cat}/K_M próximos à $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Lembrando que o limite físico para a eficiência enzimática é o coeficiente de difusão com valor entre 10^8 e $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Os aldeídos alifáticos lineares e saturados apresentaram valores maiores de K_M e menores de k_{cat}/K_M quando comparados com os aldeídos aromáticos.

Mudanças na posição da hidroxila em 3-Salicilaldeído, 4-Salicilaldeído e a adição de uma substituição como em 5-Bromo-2-salicilaldeído levam à diminuição dos valores de k_{cat}/K_M em cerca de 10 vezes em relação ao substrato natural salicilaldeído (2-salicilaldeído). Já a adição de um grupo metil em 5-Metil-2-salicilaldeído, levou à diminuição menos significativa do valor de k_{cat}/K_M em 2 vezes.

A ausência da hidroxila com a adição dos respectivos grupos substituintes em 4-Metoxi-benzaldeído, 4-Nitro-benzaldeído, 2-Formil-benzaldeído também diminuiu o valor de k_{cat}/K_M em cerca de 7, 22 e 14 vezes. De forma interessante, comparando os valores de k_{cat}/K_M para os substratos 4-Nitro- e 2-Nitro-benzaldeído, vimos que a adição do grupo nitro (NO_2) no carbono 2 (posição *orto*) ao invés do carbono 4 (posição *para*) levou à

diminuição de cerca de 2 vezes no valor de k_{cat}/K_M sendo que para o 4-Nitrobenzaldeído essa diminuição tinha sido de 22 vezes. Para o 4-Metilbenzaldeído, essa diminuição foi de quase 5 vezes.

Comparando assim o efeito da adição de diferentes grupos substituintes ao anel do benzaldeído, foi possível evidenciar que os benzaldeídos *meta*- e *para*-substituídos, como o 4-Metoxi-, o 4-Nitro- e o 3-Bromo-, são oxidados menos efetivamente que o benzaldeído. Já o benzaldeído *orto*-substituído, 2-Nitro-benzaldeído, foi oxidado com a mesma eficiência que o benzaldeído. Talvez a presença do grupo $-NO_2$ no carbono 2 torne o 2-Nitro-benzaldeído mais similar ao 2-salicilaldeído, tornando-se um substrato mais susceptível à oxidação que os outros compostos com substituições nas outras posições.

Interessantemente, a atividade da NahFr não foi alterada de forma significativa para os substratos poliaromáticos 2-naftaldeído e pireno-1-carboxaldeído quando comparamos seus valores de k_{cat}/K_M com aquela para o 2-salicilaldeído. Mas, como para esses substratos a constante catalítica é menor, podemos dizer que número de moléculas do substrato convertidas em produto por uma única molécula da NahFr em um segundo, quando a enzima está saturada pelo substrato, é maior para o substrato 2-salicilaldeído.

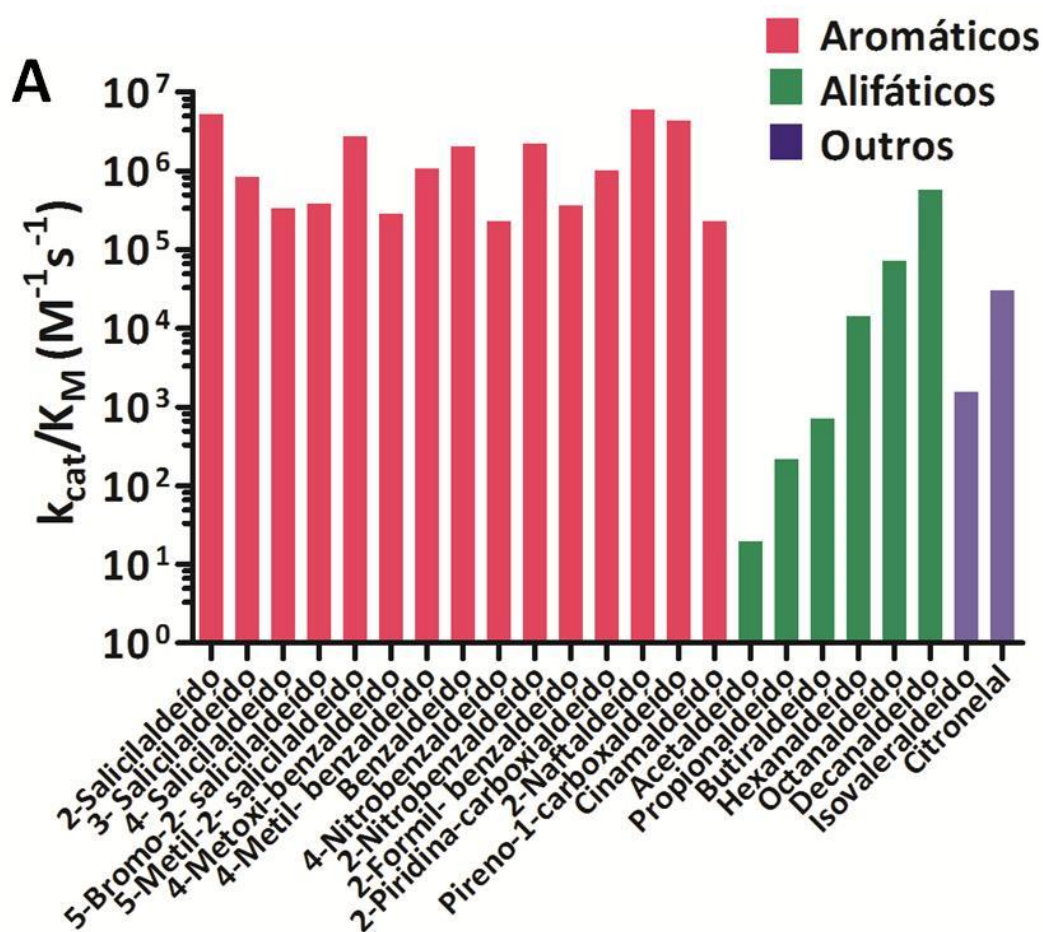
Para os aldeídos alifáticos, apesar dos valores de k_{cat}/K_M serem inferiores que para os aldeídos aromáticos, há um aumento significativo nesses valores à medida que a cadeia alifática aumenta. Assim, para hexanaldeído até decanaldeído, os valores de k_{cat}/K_M são bem maiores que para os aldeídos de cadeia menor como o acetaldeído e propionaldeído.

Mesmo assim, para os aldeídos alifáticos de cadeia longa, como o decanaldeído, o valor k_{cat}/K_M é cerca de 10 vezes menor que o do 2-salicilaldeído e os aldeídos de cadeia curta apresentam valores da ordem de 10^3 vezes menor.

A atividade da NahFr sobre os aldeídos discutidos anteriormente pode ser melhor visualizada na figura 31A, que mostra a clara preferência da NahFr por aldeídos aromáticos e, em segundo lugar, por aldeídos alifáticos de cadeia longa.

Assim, de forma resumida, vimos que, em relação aos aldeídos aromáticos, a troca da posição da hidroxila levou à diminuição da eficiência

catalítica, sendo que os *para*- e *meta*-substituídos apresentaram uma diminuição mais acentuada (Figura 31B). Da mesma forma, quando a hidroxila é removida e/ou se adicionam grupos substituintes como o $-\text{NO}_2$, a eficiência catalítica diminui e, de forma mais acentuada, quando as substituições ocorrem nas posições *para* e *meta*. Para os aldeídos alifáticos, a eficiência catalítica aumenta com o aumento da cadeia carbônica.



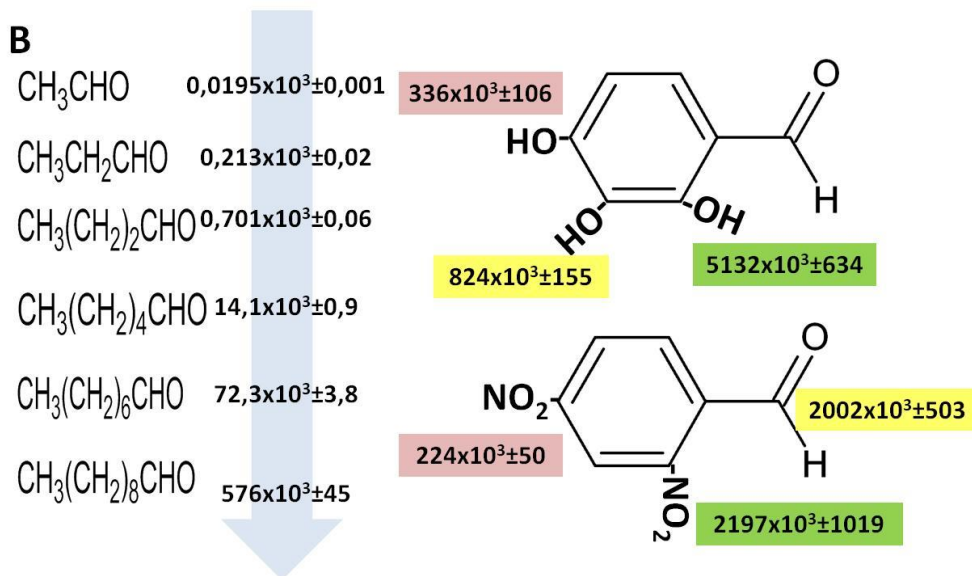


Figura 31. Atividade da enzima NahFr sobre diferentes aldeídos. Em A está apresentado um gráfico relacionando os aldeídos estudados e a constante K_{cat}/K_M mostrando a preferência da NahFr por aldeídos aromáticos e alifáticos de cadeia longa. Em B estão representados os valores de k_{cat}/K_M para os aldeídos de cadeia alifática em ordem crescente e os valores de k_{cat}/K_M para as substituições nos aldeídos aromáticos.

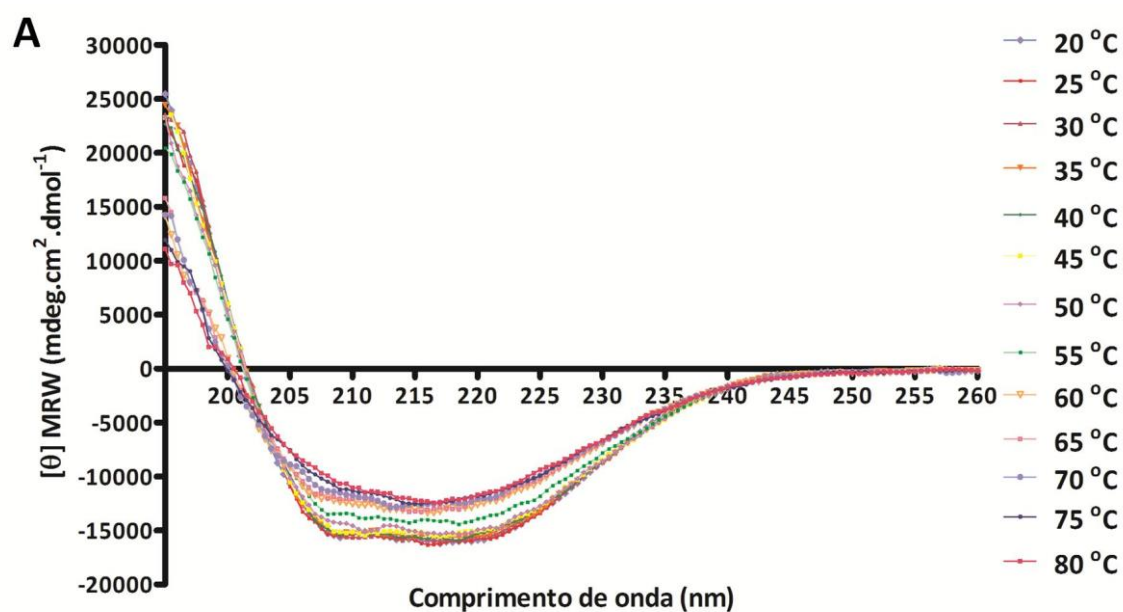
II.3.6. Análise de estrutura secundária da proteína NahFr

A análise da estrutura secundária da NahFr utilizando Dicroísmo Circular (CD) mostrou que a enzima, em tampão fosfato pH 7,4, está enovelada e é rica em α -hélices, evidenciada pela presença de dois picos negativos em 220 e 208 nm e um positivo em 195 nm no gráfico de elipicidade molar *versus* comprimento de onda (figura 32A). Também percebemos a discreta perda de estrutura secundária com o aumento da temperatura através da pouca alteração do formato do gráfico de elipicidade molar, principalmente a partir de 55 °C.

Os dados de elipicidade molar também fornecem informação sobre a porcentagem de estrutura secundária. Após a deconvolução desses dados, foi observado que a NahFr apresenta cerca de 40% de α -hélices. Com os gráficos de porcentagem de estrutura secundária fica mais evidente que a NahFr é bastante resistente à temperatura (em relação à perda de estrutura secundária) e que apenas entre 60 e 65 °C é que a quantidade de α -hélices cai significativamente. Vale lembrar que, em relação à atividade enzimática, a

temperatura ótima de ação da NahFr foi 60 °C. De forma interessante, porém, a estabilidade dessa enzima foi de poucos minutos nessa temperatura.

Os substratos salicilaldeído e NAD⁺ parecem afetar ligeiramente o padrão dos gráficos de elipcidade molar mostrando algum rearranjo da estrutura da NahFr para se ligar aos mesmos (Figura 32B). A resistência à temperatura também parece ser pouco afetada pela presença dos substratos.



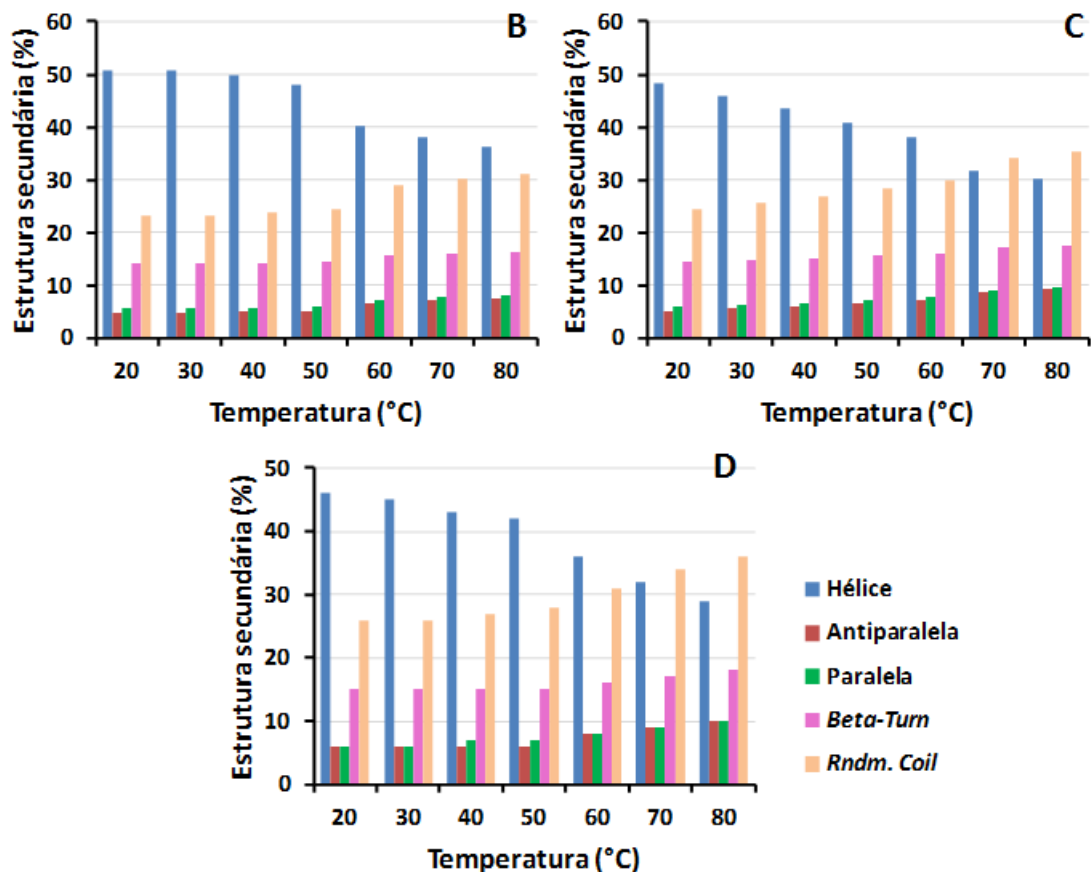


Figura 32. Análise de dicroísmo circular da NahFr em diferentes temperaturas. Em A, os dados foram plotados em função de elipcidade molar $[\theta]$ versus comprimento de onda (195 a 260nm) em temperaturas variando de 20 a 80 °C. Em B, temos os resultados da deconvolução dos espectros pelo programa CDNN versão 2 para a enzima na ausência dos substratos, em C, na presença do substrato salicilaldeído (sal) e em D, na presença de NAD^+ . Esses gráficos correlacionam temperatura e porcentagem de estrutura secundária: hélice, fitas- β paralela e antiparalela, *beta-turn* e *rndm. coil* – estrutura randômica.

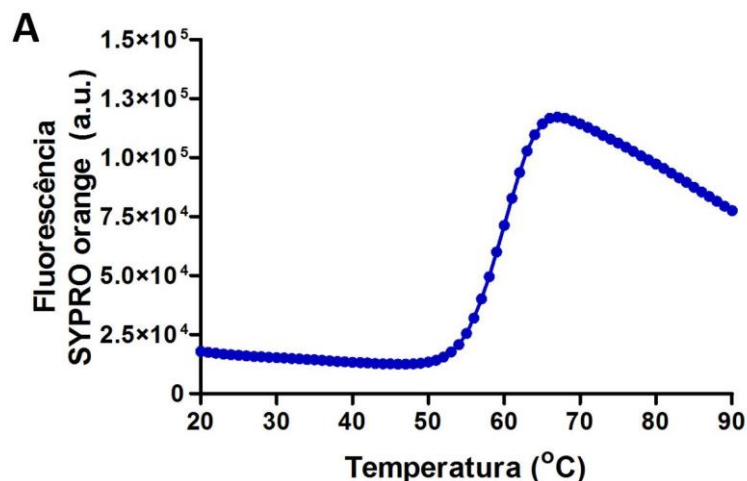
II.3.7. Efeito da ligação do substrato na estabilidade da enzima NahFr

A técnica de *Differential Scanning Fluorimetry* (DSF) é muito útil para identificar rapidamente ligantes de baixo peso molecular capazes de estabilizar proteínas purificadas e também comparar diretamente proteínas diferentes ou a mesma proteína em condições diferentes, tudo isso com o uso de pouca quantidade de proteína.

O DSF monitora o desenovelamento térmico na presença de um corante fluorescente que tem afinidade por regiões hidrofóbicas (aquelas normalmente expostas quando a proteína desnatura). Esse corante, como o Sypro Orange, só fluoresce em ambiente não-polar, sendo “inibido” em solução aquosa. A intensidade de fluorescência é representada em função da temperatura, o que gera uma curva sigmoidal, que pode ser descrita por uma transição de dois estados. O ponto de inflexão da transição curva (T_m) é calculado usando equações simples, como a de Boltzmann (Niesen et al. 2007).

A enzima NahFr na concentração final $2 \mu\text{M}$ em tampão fosfato de sódio 20 mM , pH 7,4 e NaCl 20 mM foi analisada na presença de seus dois substratos salicilaldeído e NAD^+ (10 e $50 \mu\text{M}$) variando a temperatura de 20 à 90°C .

Na figura 33A, observamos o comportamento da enzima sozinha em função da fluorescência do corante Sypro Orange, mostrando a sua transição entre os estados enovelado (em baixas temperaturas) e desenovelado (em temperaturas acima de 60°C). Na figura 33B, mostramos já a regressão de Boltzmann para a determinação precisa do ponto de inflexão do gráfico apresentado na figura 33A para a enzima pura e na presença dos substratos, apenas no intervalo de temperatura em que ocorre a transição de fase. Nas maiores concentrações dos substratos, foi possível observar um arraste da curva de Boltzmann, ou seja, os valores dos pontos de inflexão são maiores, conseqüentemente, a T_m da NahFr nessas condições.



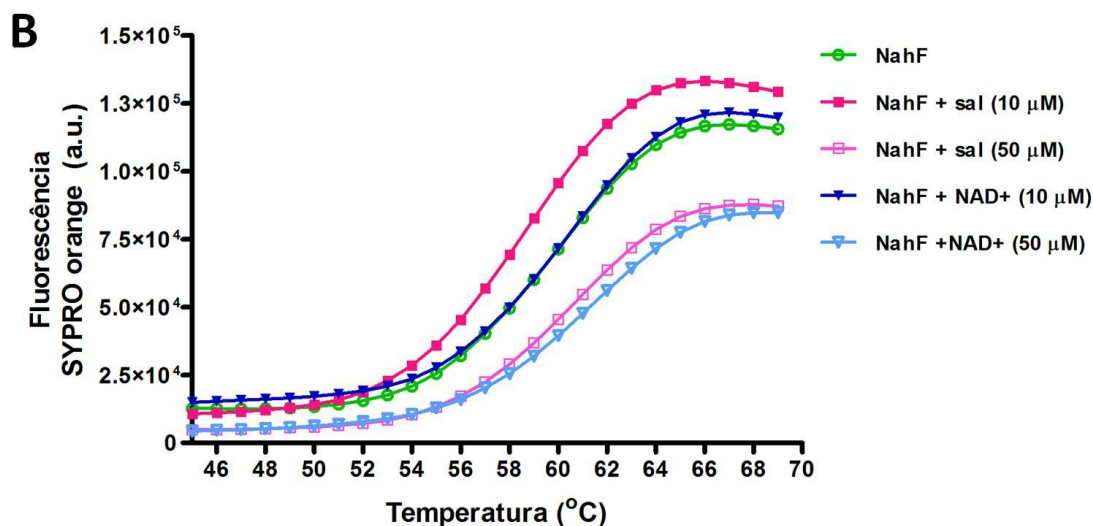


Figura 33. Ensaio de DSF para a enzima NahFr. Em A, observamos a transição de suas fases para a enzima NahF com o aumento da temperatura. Em B, regressão dos dados obtidos em gráficos como o de A para a NahF sozinha e na presença de diferentes concentrações de seus substratos salicilaldeído (sal) e NAD^+ .

Para uma melhor observação do efeito dos substratos na estabilidade da enzima, os valores de T_m foram analisados em função da temperatura para a NahFr sozinha e na presença das duas concentrações dos substratos (Figura 34). Observamos que a NahF apresenta uma temperatura de desenovelamento, T_m de $58,5\text{ }^\circ\text{C}$ e que, na presença de $50\text{ }\mu\text{M}$ de salicilaldeído e NAD^+ , os valores de T_m aumentaram para 60 e $61\text{ }^\circ\text{C}$. O cofator NAD^+ , em menor concentração ($10\text{ }\mu\text{M}$) foi capaz de estabilizar mais a enzima NahF que o substrato salicilaldeído nessa mesma concentração. Esse efeito pode ser devido à maior quantidade de interações que o NAD^+ , que é uma molécula bem maior, faz com a enzima. Assim, seu efeito estabilizador se torna mais evidente.

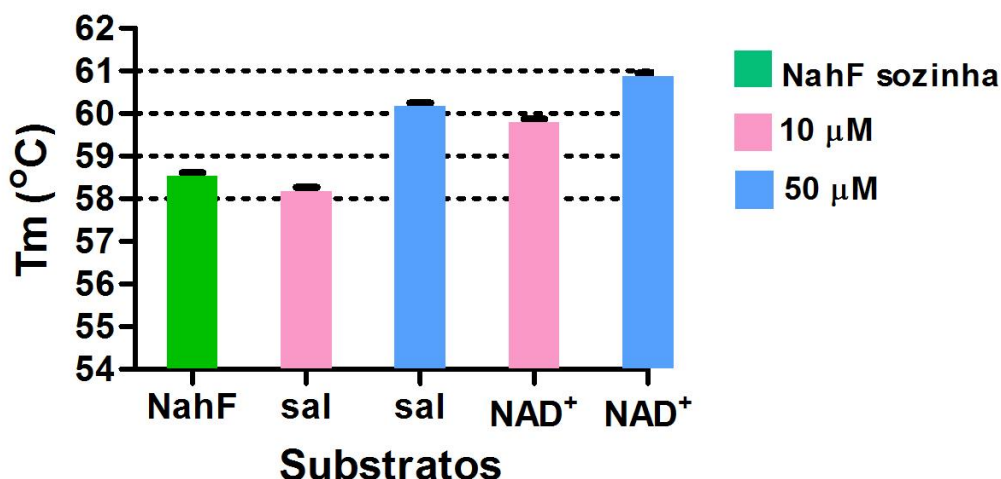


Figura 34. Temperatura de desnaturação (T_m) da enzima NahF na presença de seus substratos. Os substratos salicilaldeído (sal) e NAD⁺ aumentaram a T_m da NahFr.

II.3.8. Cristalização da NahFr e difração de raios-X

Inicialmente, foram realizados testes de cristalização da proteína NahFr após purificação por cromatografia de afinidade e concentrada para 15 mg/mL. Esses testes iniciais não foram positivos, uma vez que nas gotas de cristalização não cresceram quaisquer cristais.

Após a purificação por gel filtração, apareceram três picos, todos correspondentes à NahFr, mas em estados de oligomerização diferentes, evidenciados tanto por DLS quanto por gel filtração. Assim, talvez pela eliminação dessas outras formas, depois da purificação por gel filtração, nos novos testes utilizando a amostra da fração 8 (figura 24B), foram obtidos cristais da NahFr a 17 mg/mL em uma única condição das quase cem testadas: sulfato de amônio 2 M e isopropanol 5%.

Essa condição de cristalização resultou em monocristais, mas com poder de difração limitado a 4,5 Å de resolução, mesmo com coletas realizadas utilizando a linha de luz MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).

Após essa tentativa inicial de cristalização, foram avaliadas as mesmas condições dos kits comerciais, agora com a NahFr na presença de seus ligantes: salicilaldeído 2 mM, ou NAD⁺ 2 mM ou ambos. Nessa nova

tentativa, apareceram monocristais maiores que os anteriores, na presença de salicilaldeído e, novamente, na mesma condição com sulfato de amônio 2 M e isopropanol 5%.

Também foram realizadas outras otimizações dessa condição inicial. Variamos as concentrações dos precipitantes e adicionamos tampão acetato de sódio pH 4 ou pH 5 e tampão fosfato de sódio pH 6 ou 7.

Nas condições apresentadas na figura 35, apareceram outros monocristais semelhantes aos anteriores só que em maior quantidade e tamanho. Esses cristais foram submetidos à difração de raios-X nas linhas MX1 do LNLS e apresentaram uma melhora na difração para 2,42 Å para um dos cristais da condição apresentada na figura 35D.

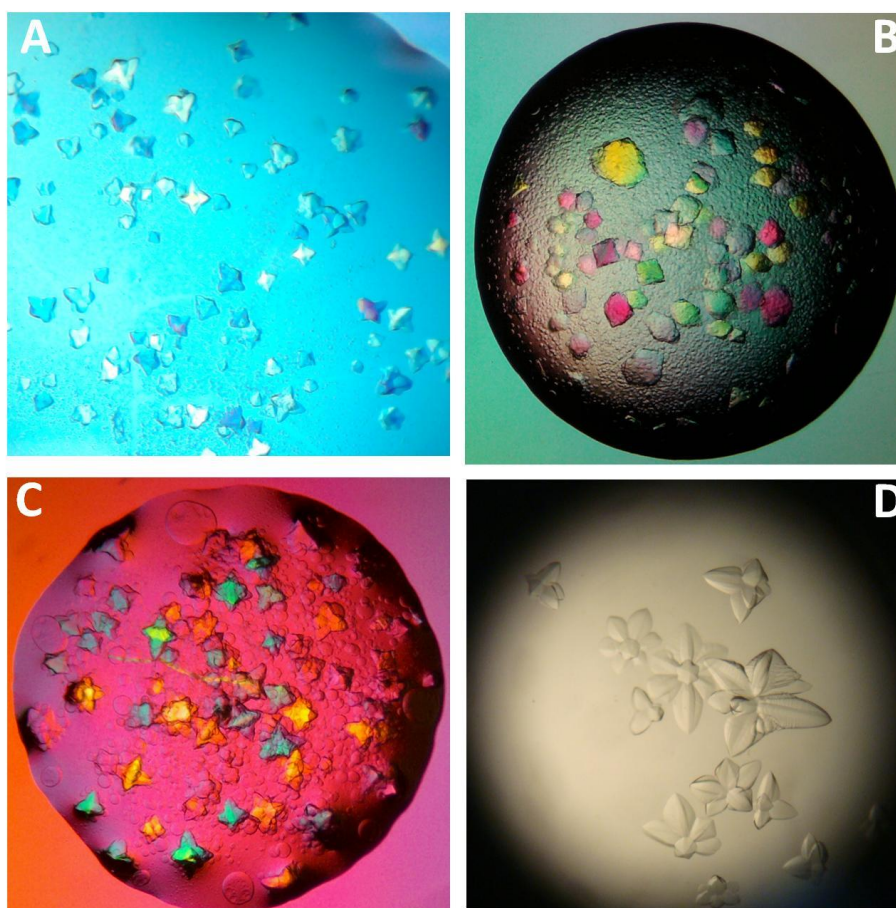


Figura 35. Cristalização da NahFr em sulfato de amônio e isopropanol. Os quatro conjuntos de cristais foram obtidos em gotas contendo: **A** – NahF/salicilaldeído em sulfato de amônio 1,5 M, isopropanol 4,6 %, tampão acetato 100 mM pH 4,0; **B** – NahF/salicilaldeído em sulfato de amônio 1,5 M, isopropanol 5,0 %, tampão acetato 100 mM pH 4,0; **C** – NahF/salicilaldeído em sulfato de amônio 1,5 M, isopropanol 4,0 %, tampão acetato 100 mM pH 4,0; **D** - NahF/salicilaldeído em sulfato de amônio 1,5 M, isopropanol 5,0 %, tampão acetato 100 mM pH 5,0.

II.3.9. Estrutura da enzima NahFr de *Pseudomonas putida*

Cristais em “forma de flor” da enzima NahFr foram obtidos em diversas variações da condição com sulfato de amônio, isopropanol e tampão acetato de sódio pH ácido. Um cristal que cresceu na condição com sulfato de amônio 1,5 M, isopropanol 5,0 %, tampão acetato 100 mM pH 5,0, na presença de salicilaldeído 2 mM foi quebrado e difratou até 2,42 Å de resolução, pertencendo ao grupo espacial P6₄22 e com parâmetros de célula unitária $a = b = 169,47$, $c = 157,94$ Å. Na figura 36 observamos um padrão de difração típico desse cristal e na tabela 7, as estatísticas dos dados de difração do cristal de NahFr.

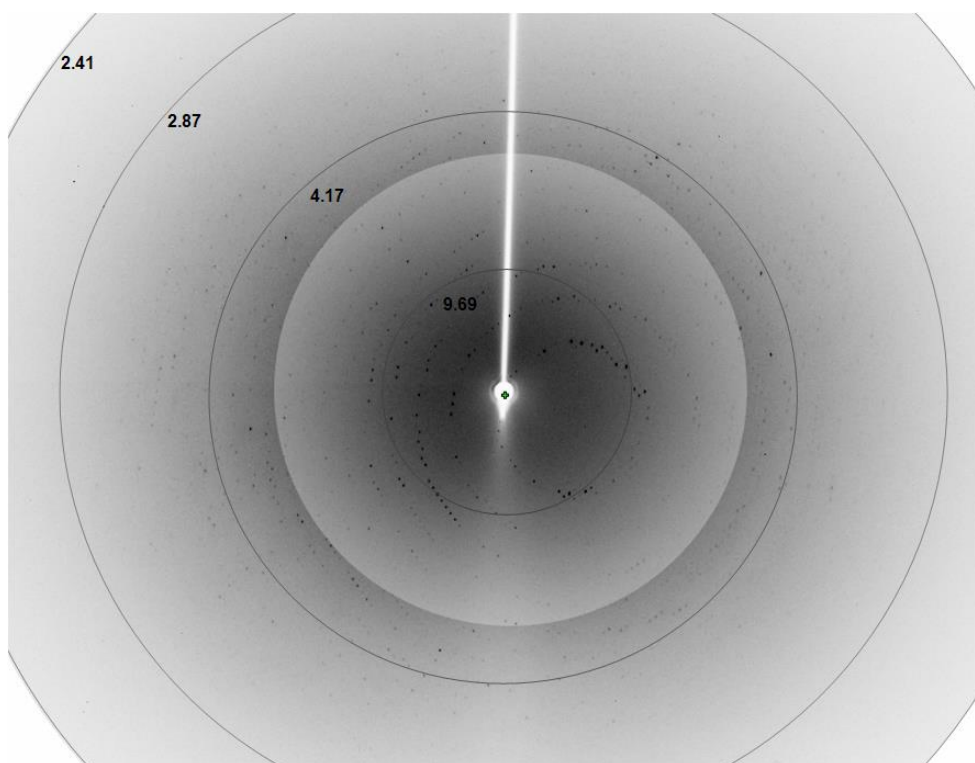


Figura 36. Uma imagem de difração de um cristal da proteína NahFr. Os dados de difração foram coletados a 2,42 Å. A cor de fundo do padrão de difração perto do centro da imagem foi alterada para melhor visualização dos pontos de difração nessa região.

Tabela 7. Estatísticas dos dados de difração dos cristais de NahFr e dos dados de refinamento. Os valores estatísticos para as faixas de mais baixa e mais alta resolução estão dadas entre parênteses.

Comprimento de onda (Å)	1,608
Temperatura (K)	100
Distância cristal-detector (mm)	100
Rotação por imagem (°)	0,5
Varição total de rotação (°)	120
Grupo espacial	P6 ₄ 22
Parâmetros da célula unitária (Å)	a = b = 169,47, c = 157,94
Resolução (Å)	32,17 – 2,42 (32,17 – 7,64/ 2,55 – 2,42)
No. de observações	710305 (23697/ 97367)
No. de reflexões únicas	51558 (1811/ 7385)
Completeza (%)	99,9 (98,7/99,8)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	10,4 (34,8/4,0)
Redundância	13,8 (13,1/13,2)
$R_{\text{merge}}^{\dagger}$	0,272 (0,062/0,651)
Mosaicidade média (°)	0,38
B-factor de Wilson (Å ²)	18,8
Coeficiente de Matthews (Å ³ Da ⁻¹)	6,06
Conteúdo de Solvente (%)	79,7
$R_{\text{work}}^{\ddagger}$ (%)	20,9
$R_{\text{free}}^{\ddagger}$ (%)	24,6
No. Átomos:	
Proteína	3673

Água	1125
SO ₄	15
Salicilaldeído	18
Etilenoglicol	20
R.m.s:	
Comprimento de ligação (Å)	0,005
Ângulo de ligação (°)	0,93
Gráfico de Ramachandran (resíduos em regiões):	
Favoráveis (%)	97,1
Permitidas (%)	2,9
Proibidas (%)	0

[†] $R_{merge} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$, onde $I_i(hkl)$ é a $i^{\text{ª}}$ intensidade medida de cada reflexão hkl e $\langle I(hkl) \rangle$ é sua média.

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

O cálculo do coeficiente de Matthews (V_m) resultou nos valores apresentados na tabela 8 (<http://www.ruppweb.org/mattprob/>). Assim, seria mais provável (probabilidade de 0,5356) que o cristal contivesse duas moléculas de NahFr em cada unidade assimétrica, com um V_m de 3,03 Å³/Da e conteúdo de solvente de aproximadamente 59%. Porém, a substituição molecular para a resolução das fases tentando encontrar duas moléculas por unidade assimétrica falhou. Tentamos então a pesquisa com uma molécula de NahFr por unidade assimétrica e, assim, a substituição molecular foi bem sucedida. Para uma molécula de NahFr por unidade assimétrica, o coeficiente de Matthews foi de 6,06 Å³/Da e conteúdo de solvente de quase 80%.

O modelo utilizado para a substituição molecular, 1BXS (Moore et al. 1998) foi escolhido como proteína molde na substituição molecular por ter sua sequência de aminoácidos com a maior identidade (37%) com a NahF.

Tabela 8. Coeficientes de Matthews calculados para o cristal da NahF.

Número de moléculas	Probabilidade total	Coeficiente de Matthews - V_m ($\text{\AA}^3/\text{Da}$)	Conteúdo de solvente - V_s (%)	MM (Da)
1	0,0069	6,06	79,69	54000
2	0,5356	3,03	59,38	108000
3	0,4520	2,02	39,07	162000
4	0,0054	1,51	18,75	216000

O empacotamento do cristal da NahFr apresentou um túnel de aproximadamente 90 Å de diâmetro ao longo do eixo parafuso-6₄ responsável pelo alto conteúdo de solvente observado. Além disso, apesar de um monômero ter sido observado na unidade assimétrica, a unidade biológica da NahFr (dímero) pode ser gerada por moléculas relacionadas por simetria (eixo de ordem 2 nos outros eixos P6₄22).

Em seguida, a solução obtida pelo Phaser e a sequência de aminoácidos da NahFr foram submetidas ao programa Buccaneer (Cowtan 2006) para construção automática do modelo. O arquivo PDB assim obtido passou então por ciclos de construção manual no programa Coot (Emsley et al. 2010) e refinamento contra o arquivo com os dados originais no REFMAC (Murshudov et al. 1997). O refinamento foi acompanhado pela diminuição dos parâmetros de R_{factor} e R_{free} chegando aos valores finais de 20,9% e 24,6%, respectivamente. Os dados das estatísticas do refinamento da estrutura da NahFr também estão mostrados na tabela 7.

O modelo da estrutura da NahFr contém todos os 483 resíduos de aminoácidos da proteína nativa mais um resíduo de histidina adicionado pelo vetor de expressão. A densidade eletrônica correspondente à cauda de histidinas N-terminal e o sítio de clivagem da protease TEV também adicionados pelo vetor de expressão não foi observada no modelo obtido. A estrutura mostra o enovelamento α/β típico da superfamília das ALDHs organizado em três domínios (Figura 37A): domínio de ligação ao nucleotídeo, domínio de oligomerização e domínio catalítico.

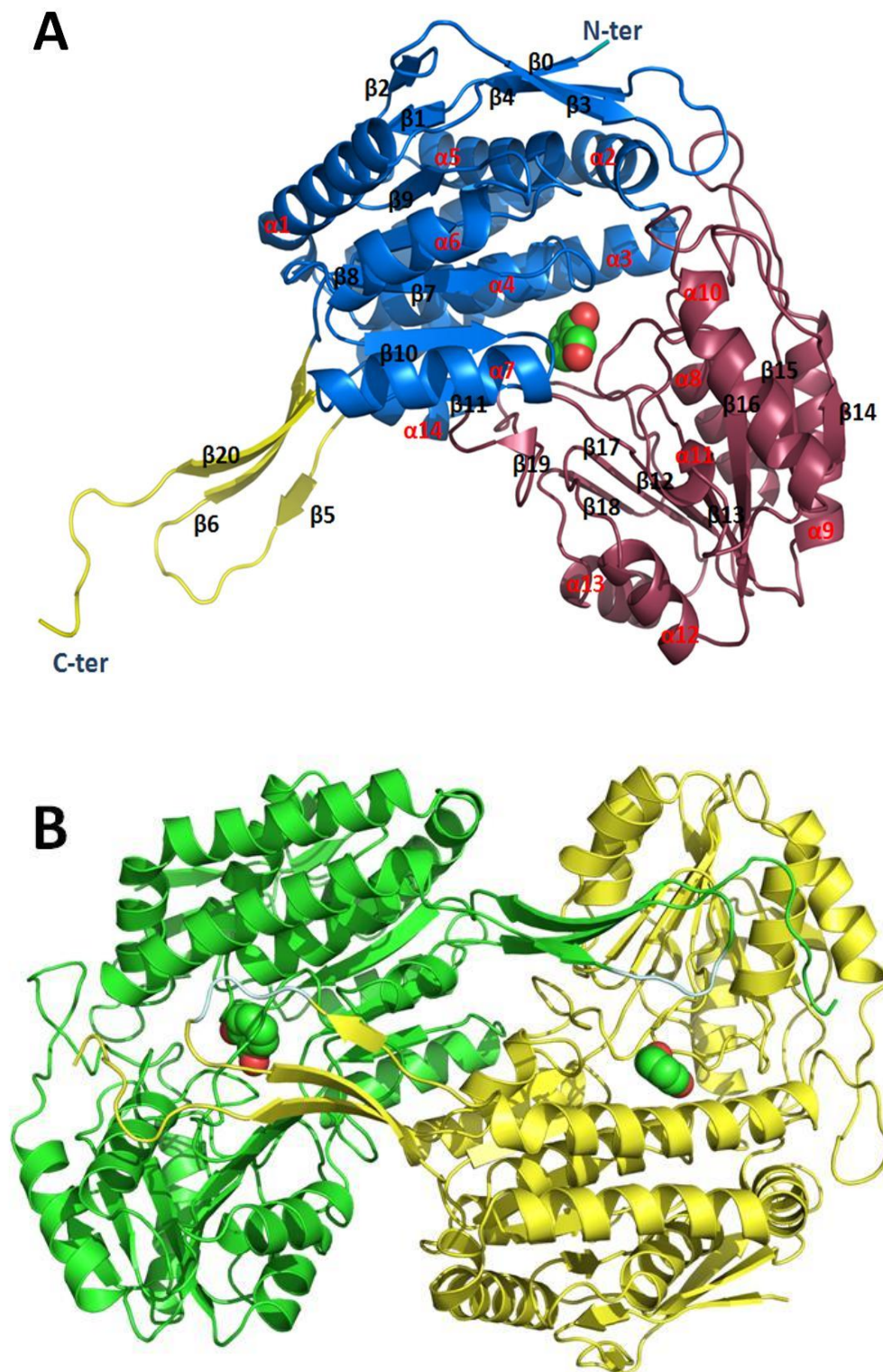


Figura 37. Estrutura cristalográfica da enzima NahFr de *Pseudomonas putida*. Em **A**, monômero da NahFr com destaque para os três domínios: em azul, domínio de ligação ao nucleotídeo (resíduos 1-116, 137-250 e 459-466), em vermelho, domínio catalítico (resíduos 251-458) e em amarelo, domínio de oligomerização (resíduos 117-136 e 467-483). Em **B**, a unidade biológica da NahFr mostrada como um dímero (verde e amarelo), cujas subunidades são unidas pelo domínio de oligomerização.

O domínio de oligomerização formado por três fitas- β antiparalelas ($\beta 5$, $\beta 6$ e $\beta 20$) é responsável pelo união dos monômeros para gerar a unidade biológica dimérica da NahFr (Figura 37B). O domínio de ligação ao nucleotídeo, por sua vez, apresenta um enovelamento “*Rossmann-like*”, com cinco fitas- β paralelas ($\beta 7$, $\beta 8$, $\beta 9$, $\beta 10$ e $\beta 11$), ao invés das seis, comuns nesse tipo de enovelamento. As cinco fitas- β são ligadas a quatro α -hélices ($\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ e $\alpha 7$), duas em cada lado da folha- β .

O substrato salicilaldeído foi localizado em um funil formado pela interface entre os domínios de ligação ao nucleotídeo e catalítico. O volume desse funil, calculado pelo servidor CASTp (<http://sts-fw.bioengr.uic.edu/castp/calculation.php>; Dundas, Ouyang et al. 2006), apresentou um volume de 565 \AA^3 na ausência do substrato. Após a ligação do salicilaldeído, o volume desse funil diminui bastante, mas ainda sobram aproximadamente 150 \AA^3 . Como mostrado na figura 38, os únicos resíduos de aminoácidos com distância de contato com o salicilaldeído (menos que 3 \AA) são a Cys284 (SH-COOH $3,45 \text{ \AA}$) e a Gly150 (CA-COH $2,93 \text{ \AA}$).

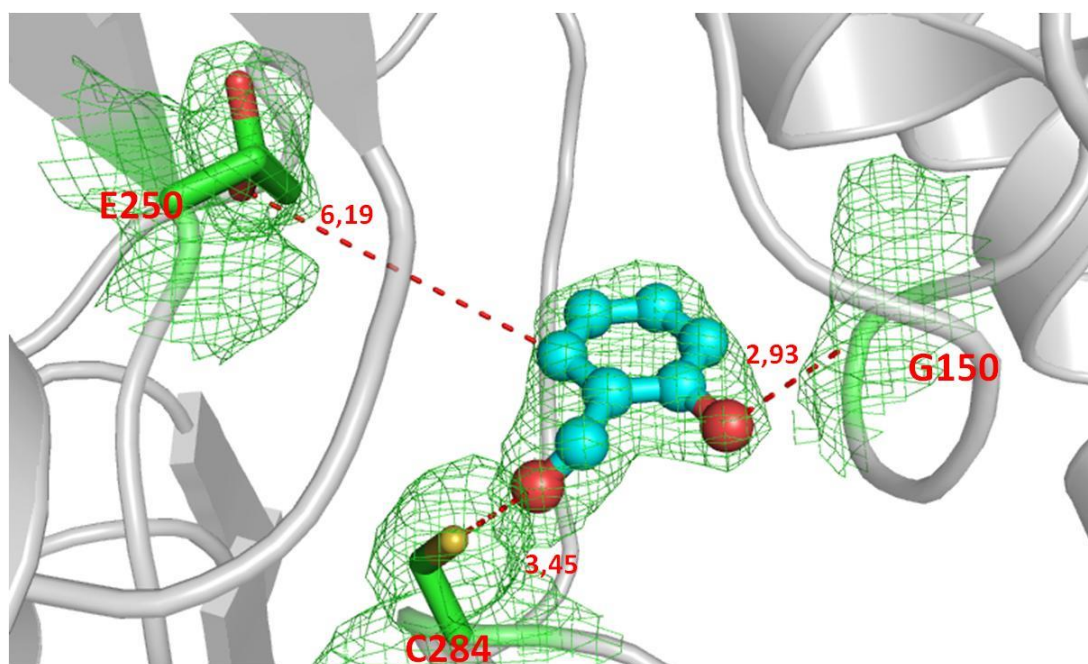


Figura 38. Sítio ativo da NahFr mostrando o substrato salicilaldeído. Podemos observar os resíduos catalíticos Cys284 e Glu250 e a Gly150 próximos ao substrato salicilaldeído. A interação entre esses resíduos e o substrato é mostrada pelas linhas pontilhadas com as distâncias dadas em Å .

No mapa de densidade eletrônica do modelo da NahFr foi observado um salicilaldeído em uma posição diferente do sítio ativo, entre as duas subunidades, em um eixo de simetria do dímero (Figura 39). Esse salicilaldeído parece estar fazendo interações do tipo “ π -stacking” com duas Tyr454, uma de cada subunidade. A presença do substrato nessa posição corrobora resultados preliminares de que o ácido salicílico, o produto da reação catalisada pela NahFr, inibe a atividade enzimática de forma não competitiva.

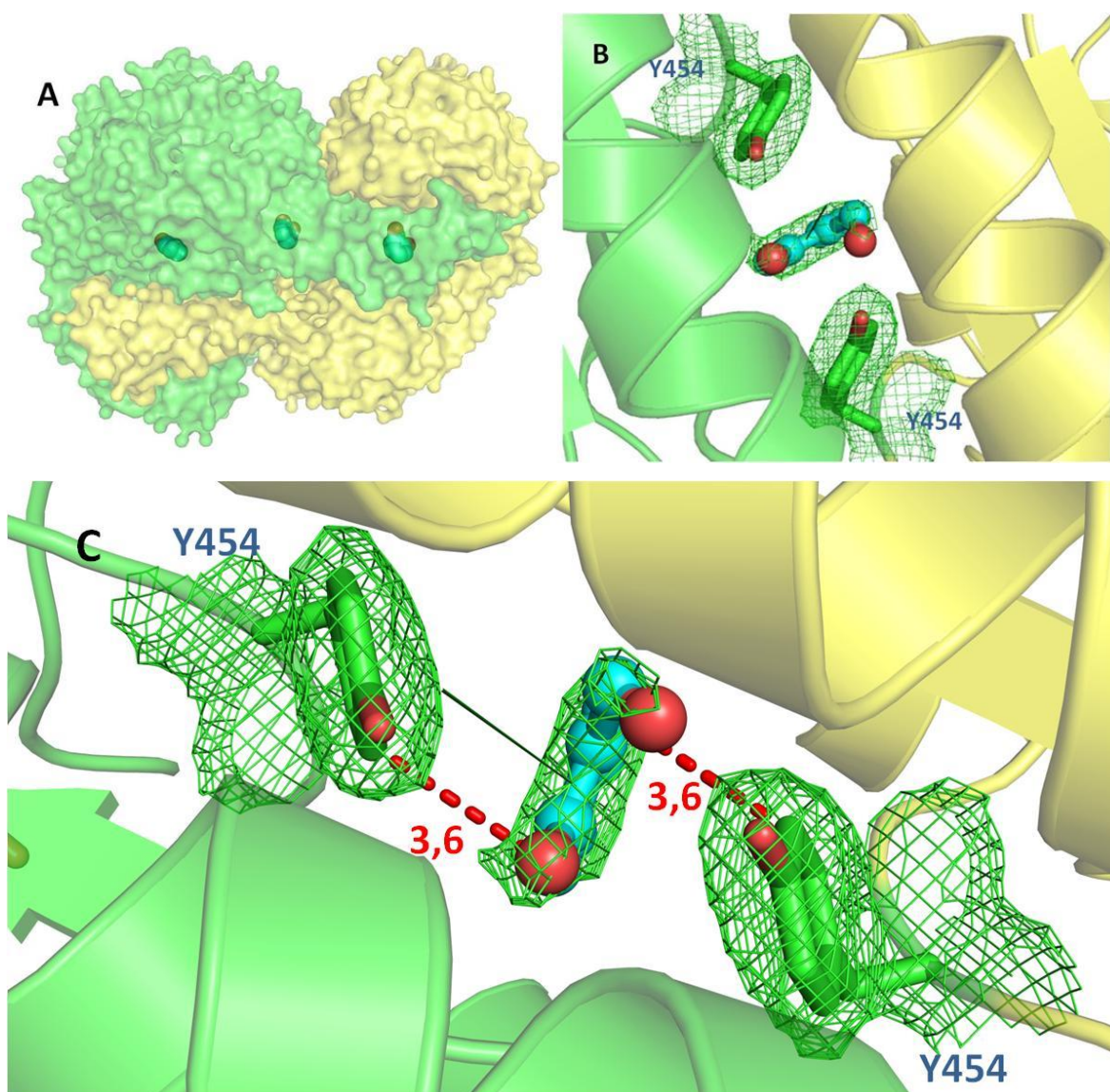


Figura 39. Dímero de NahFr mostrando o salicilaldeído na interface entre as subunidades. Em A, representação da superfície do dímero de NahFr mostrando as moléculas de salicilaldeído nos sítios ativos e entre as subunidades; em B, visualização do substrato no eixo de simetria entre as subunidades; em C, os resíduos de Tyr454 e as distâncias para o salicilaldeído em Å.

II.3.10. Análise comparativa da estrutura da NahFr com outras ALDHs

A análise comparativa da estrutura da NahFr foi realizada com três outras aldeído desidrogenases: a **Nahl** (2-hidroxi-mucônico semialdeído desidrogenase de *Pseudomonas putida* G7), a **3R64** ou *cgBLDH* (benzaldeído desidrogenase de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032) e a **1BXS** ou *oaALDH* (aldeído desidrogenase de *Ovis aries*). Na figura 40, podemos ver o alinhamento das sequências de aminoácidos dessas quatro enzimas.

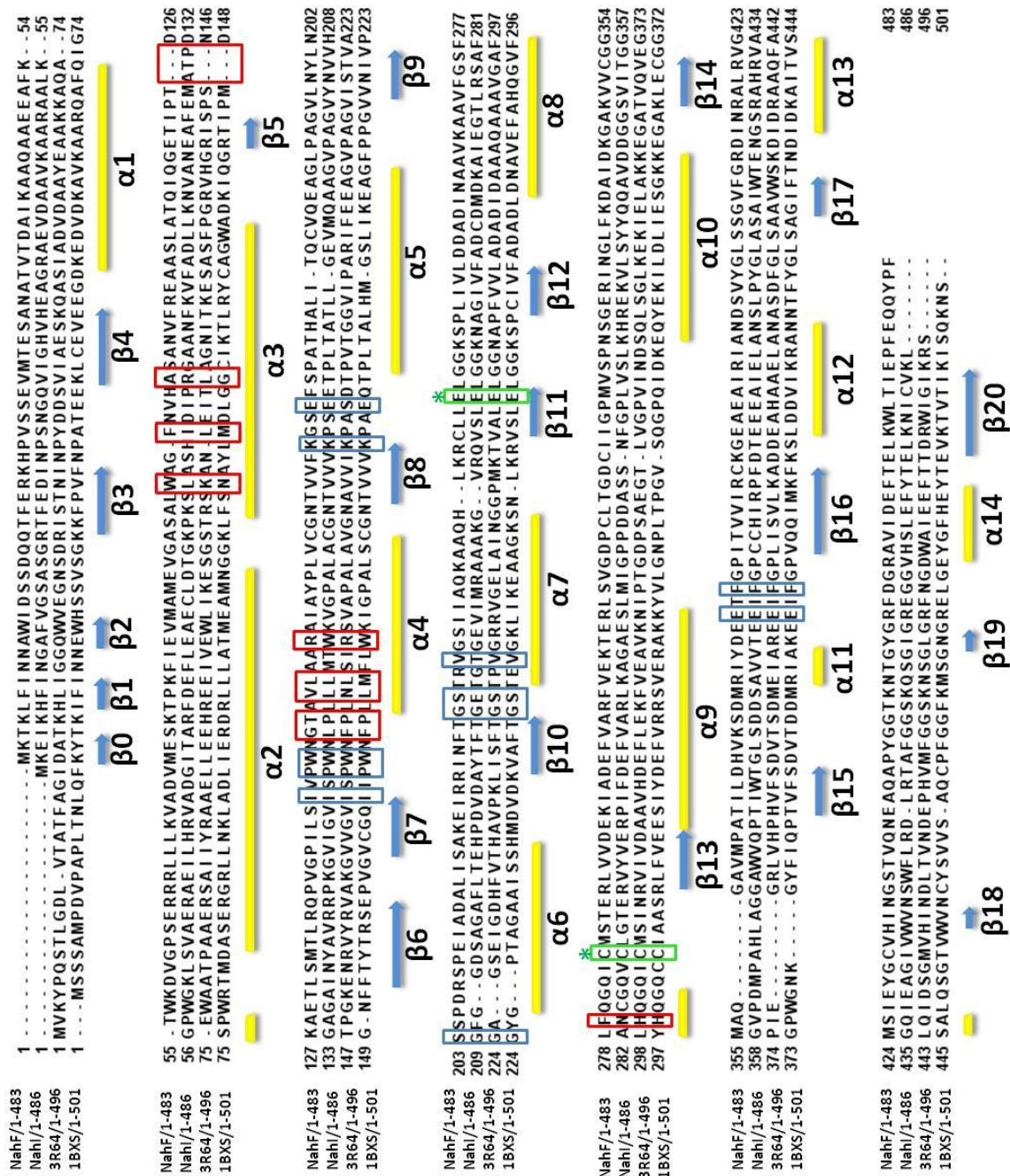
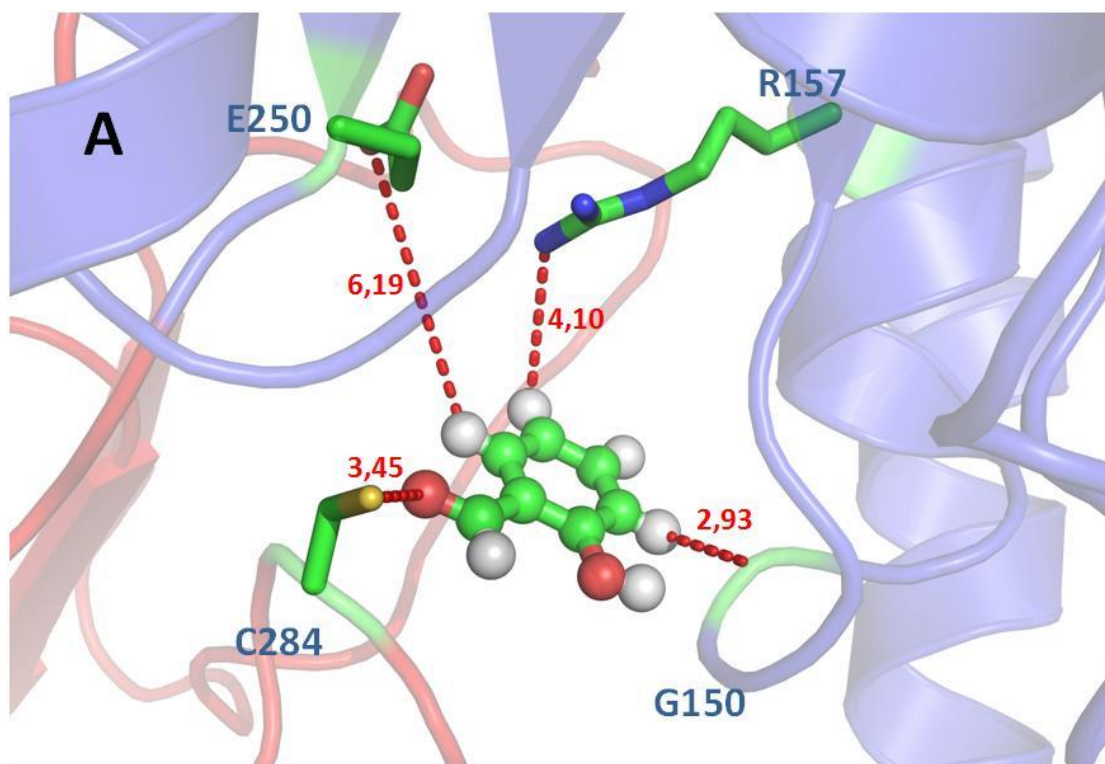


Figura 40. Alinhamento das seqüências de aminoácidos das enzimas NahFr, Nahl, 3R64 e 1BXS. NahFr, salicilaldeído desidrogenase; Nahl, 2-hidroximucônico semialdeído desidrogenase de *Pseudomonas putida* G7; **3R64**, benzaldeído desidrogenase de *Corynebacterium glutamicum* e **1BXS**, aldeído desidrogenase de *Ovis aries*. Os cilindros em amarelo correspondem à α -hélices e as setas em azul, fitas- β , baseadas na predição de estrutura secundária da NahFr (Stride - <http://webclu.bio.wzw.tum.de/stride/>). Os resíduos marcados em vermelho e azul que interagem com NAD são aqueles discutidos ao longo do texto e, em verde, estão destacados os resíduos catalíticos, Cys e Glu. O alinhamento foi realizado no servidor Multalin (Corpet 1988) e visualizado no programa Jalview (Waterhouse et al. 2009).

Comparando a estrutura da NahFr com as ALDHs 3R64, Nahl e 1BXS observamos que, em NahFr, uma Arg157 está bem próxima do substrato salicilaldeído (figura 41A). Essa posição é ocupada, em 3R64 por uma Arg177, em 1BXS, por um Trp178 e em Nahl, por um Trp163 (Figura 41B). Assim, essa posição deve ser uma importante diferença entre as ALDHs aromáticas (NahFr e 3R64) e as ALDHs de alifáticos (1BXS e Nahl), já que o triptofano, sendo um resíduo de cadeia lateral volumosa, poderia impedir a acomodação de um substrato aromático. Isso pode indicar um papel importante desse aminoácido na catálise de substratos aromáticos, que poderia ser investigado ao se fazer, por exemplo, mutação nesse resíduo e verificando se a atividade é alterada.



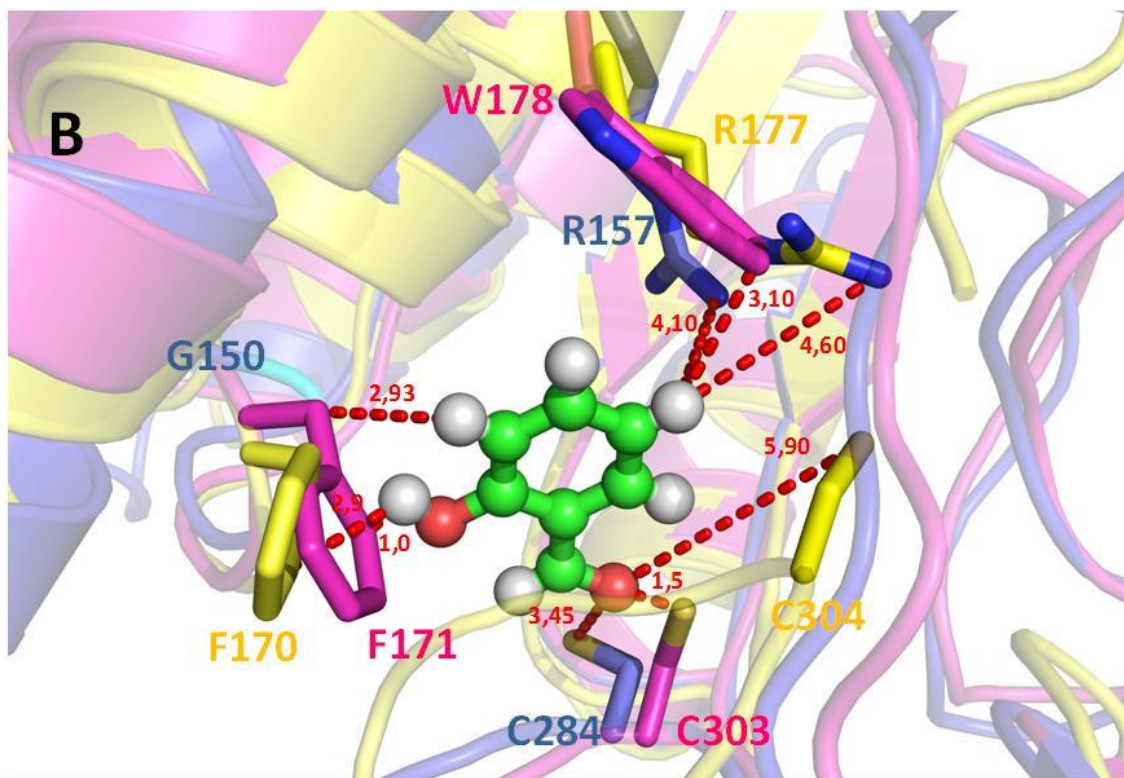


Figura 41. Sítio ativo da NahF e alinhamento das estruturas das enzimas NahFr (azul), 3R64 (amarelo) e 1BXS(rosa). Em A, a região do sítio ativo da NahFr mostrando a Arg157. Em B, o alinhamento estrutural entre as ALDHs destacando os resíduos NahFr-Arg157, 3R64-Arg177 e 1BXS-Trp178; NahFr-Gly150, 3R64-Phe170 e 1BXS-Phe171; NahFr-Cys284, 3R64-Cys304 e 1BXS-Cys303. A interação entre esses resíduos e o substrato é mostrada pelas linhas pontilhadas com as distâncias dadas em Å.

A entrada do substrato em NahF faz com que a conformação do *loop* que vai da Phe277 até Thr287 coloque o resíduo Gly150 muito próximo ao substrato (Figura 38 e 41). A mesma posição em NahI é ocupada por uma Leu156, um resíduo com cadeia lateral maior que também poderia interferir na especificidade para substratos aromáticos.

Esse mesmo *loop* de NahF (Phe277-Thr287) em 3R64 corresponde a uma região com alta similaridade em sequência (Phe297-Ile307). Nessa região também está presente a Cys284 catalítica de NahFr (Figura 41B). Mas, por alinhamento estrutural, em 3R64, esse *loop* apresenta uma orientação bastante diferente daquela de NahFr (distâncias maiores que 5 Å entre átomos equivalentes). O modelo gerado para a 3R64 não apresenta todos os resíduos de aminoácidos (falta a região entre os resíduos 455 e 474). Provavelmente essa é uma região flexível que não foi visualizada no mapa gerado e essa

flexibilidade pode ter posicionado o *loop* em 3R64 (Phe297-Ile307) de forma diferente que em NahF.

Além disso, existe uma diferença importante entre a 3R64 e a NahF, a posição ocupada pela Gly150 de NahF é ocupada por uma Phe170 (Figura 39B). Vimos na figura 38 e 41A que a Gly150 está muito próxima ao salicilaldeído (CA-COH 2,93 Å). Essa diferença gera uma dúvida sobre como o substrato proposto para a 3R64, um benzaldeído, se posicionaria nessa região com a presença de um resíduo de aminoácido tão volumoso quanto a Phe170.

A aldeído desidrogenase de *Ovis aries*, 1BXS, catalisa a conversão de *trans*-retinal em *trans*-ácido retinóico (Moore et al. 1998). Nessa enzima (cuja estrutura tridimensional mostra o cofator NAD⁺), a região do *loop* entre Phe296 e Ala306 (equivalente ao loop Phe277 – Thr287 em NahFr) está em uma conformação bem mais semelhante à adotada em NahFr (cuja estrutura mostra o substrato) que aquela em 3R64 (sem substrato e cofator). Além disso, uma Phe171 em 1BXS ocupa a posição da Gly150 em NahFr, assim como em 3R64 (figura 39B). Lembrando que o substrato da 1BXS é o retinaldeído e o grupo -COH está na porção alifática desse composto. A posição Gly150 em NahFr parece, portanto, ser uma posição importante de diferenciação entre ALDHs de aldeídos aromáticos e alifáticos, mas ainda fica a dúvida em relação à 3R64, classificada como uma ALDH aromática, mas que apresenta um resíduo volumoso na posição equivalente à Gly150 assim como as ALDHs alifáticas.

Outra região de divergência entre ALDHs aromáticas e alifáticas é aquela ocupada pelos resíduos Trp96, Phe99, Phe279, Val153, Leu154 e Ala103 em NahFr que geram um ambiente favorável para a interação hidrofóbica com o substrato. Os três primeiros resíduos (Trp96, Phe99 e Phe279), na entrada do sítio ativo, estão ausentes nas posições equivalentes em NahI, onde estão a Leu98, Ile 102 e Asn283. Esses resíduos com cadeias laterais aromáticas em NahFr fazem uma interação do tipo “ π -stacking” que parece ser importante para a manutenção da abertura do bolsão catalítico (Figura 42). Essa interação é ausente em NahI, uma enzima específica para aldeídos alifáticos.

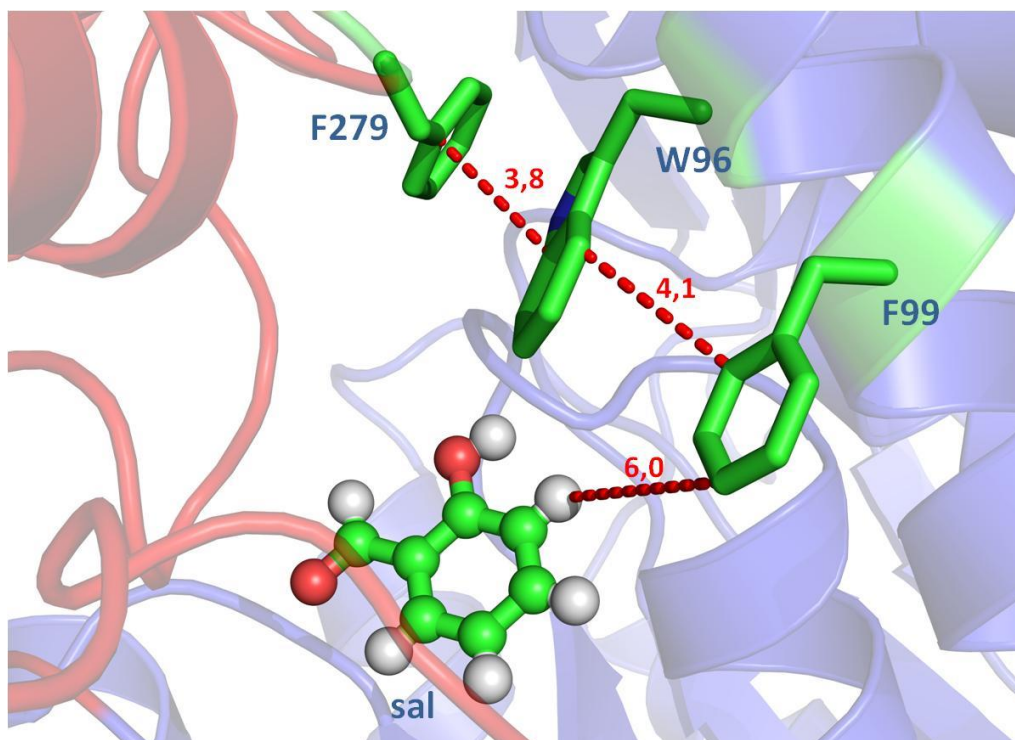


Figura 42. Interação do tipo “ π -stacking” em NahFr. A figura mostra a entrada do sítio ativo de NahF mostrando a interação “ π -stacking” entre os resíduos Thp96, Phe99 e Phe279. A interação entre esses resíduos e o substrato é mostrada pelas linhas pontilhadas com as distâncias dadas em Å.

No dímero de NahFr, o interlaçamento entre os domínios de oligomerização não obstrui a entrada do sítio ativo, deixando um bolso acessível ao solvente de modo que podemos observar o substrato salicilaldeído, em vermelho (Figura 43). Em NahI, a região Ala129-Thr130-Pro131 é ausente em NahF. Essa região, em NahFr, é próxima à entrada do sítio catalítico (resíduos 124-126, que flanqueiam a região de inserção em NahI). Em 1BXS e 3R64, essa região também não existe e, da mesma forma que em NahF, a região de ligação do substrato está acessível ao solvente.

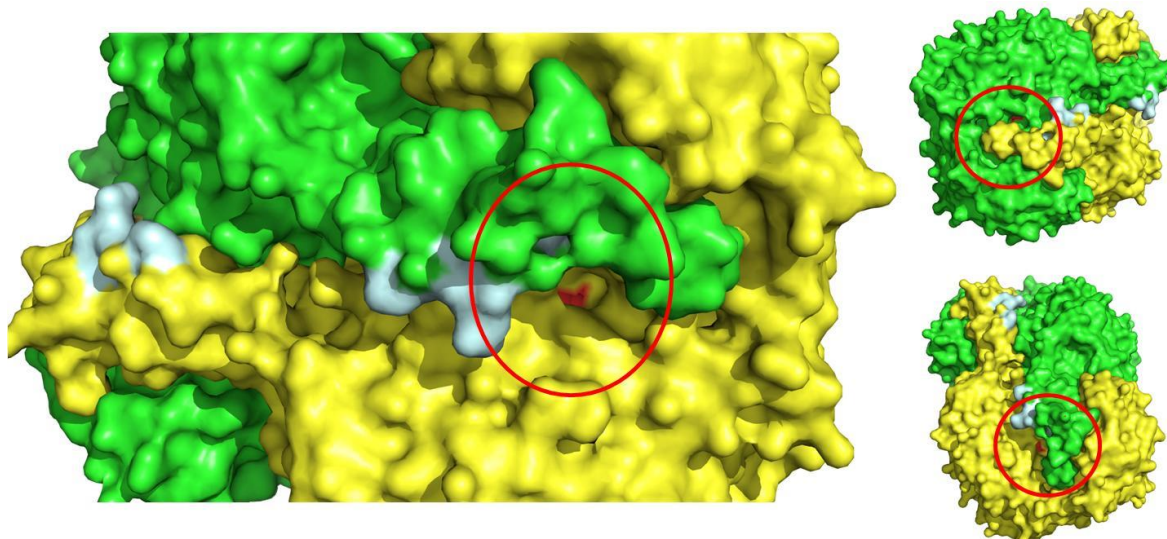


Figura 43. Região de oligomerização das subunidades do dímero de NahF. Observamos o bolsão catalítico com o salicilaldeído em vermelho. As subunidades do dímero estão representadas em amarelo e verde e a região 124-126 de NahFr está destacada em azul.

Aldeído desidrogenases dependentes de NAD(P) usualmente ligam a coenzima em seu domínio “*Rossmann-like*”. A estrutura da NahFr foi obtida pela difração de um cristal que cresceu na presença de salicilaldeído e não do cofator, NAD⁺, mas a conformação dos resíduos do domínio de ligação ao nucleotídeo é similar àquela observada em outras estruturas de ALDHs onde o NAD⁺ é observado. Além disso, como calculado pelo servidor CASTp (<http://sts-fw.bioengr.uic.edu/castp/calculation.php>; Dundas, Ouyang et al. 2006), esses resíduos criam um bolso de aproximadamente 1500 Å³ na estrutura da NahFr para a ligação do NAD⁺.

Comparando os resíduos que interagem com o cofator NAD em 1BXS com as posições equivalentes em NahFr, 3R64 e NahI, observamos uma grande correlação desses resíduos (Tabela 9). As posições de interação com o cofator NAD e os resíduos interagentes em 1BXS e os possíveis interagentes em NahFr estão mostrados na figura 44.

Tabela 9. Resíduos de aminoácidos que interagem com o cofator em 1BXS e seus equivalentes nas ALDHs estudadas.

1BXS	NahF	Nahl	3R64	1AD3
Ile166	Ile145	Ile151	Ile165	Ile110
Pro168	Pro147	Pro153	Pro167	Ala112
Trp169	Trp148	Trp154	Trp168	Trp113
Lys193	Lys172	Lys178	Lys192	Lys137
Glu196	Glu175	Glu181	Ser195	Glu140
Gly224	Ser303	Gly209	Gly224	Gly167
Gly246	Gly228	Gly232	Gly246	Gly187
Ser247	Ser229	Glu233	Ser247	Ser188
Val250	Val232	Thr236	Val250	Val191
Gln350	Ser332	His335	Gln351	His289
Lys353	Arg335	Lys338	Gly354	Arg292
Glu400	Glu379	Glu390	Glu398	Glu333
Phe402	Phe381	Phe392	Phe400	Phe335

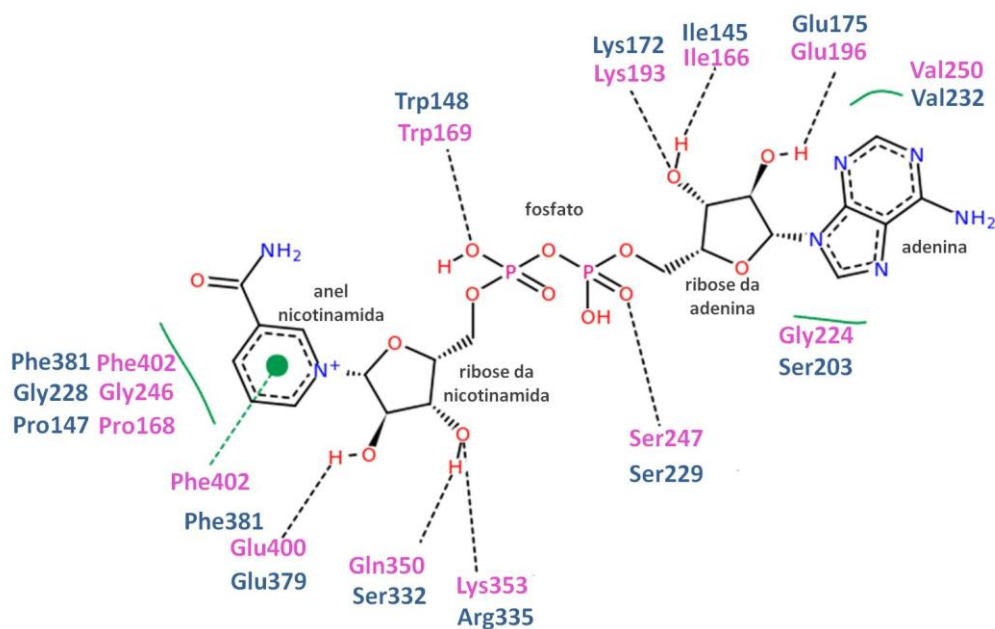


Figura 44. Interação dos resíduos de aminoácidos da enzima aldeído desidrogenase de *Ovis aries* (1BXS) com o cofator NAD. Também estão representados os resíduos de NahFr (azul) que correspondem aos resíduos de 1BXS (rosa) que interagem com 1BXS. Linhas tracejadas em preto: ligações de hidrogênio; Linhas contínuas em verde: interações hidrofóbicas e Linha tracejada em verde: interação π - π .

Na figura 45 está representada a estrutura da NahFr com o NAD de 1BXS onde verificamos, como exemplo, a interação do resíduo Glu175 com o o grupo –OH da ribose da adenina de NAD; o Trp148 com o grupo fosfato e a Phe381 interagindo com o anel nicotinamida.

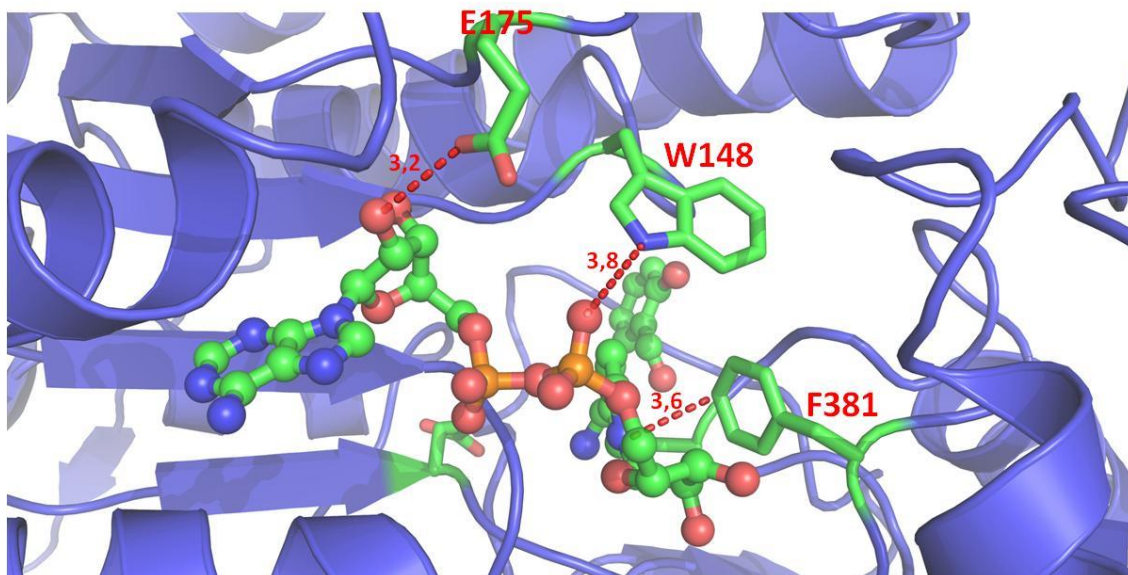


Figura 45. Região em NahFr que interage com a coenzima nicotinamida. Em destaque, os resíduos de Glu175, Trp148 e Phe381. A interação entre esses resíduos e a coenzima é mostrada pelas linhas pontilhadas com as distâncias dadas em Å.

A posição do resíduo Phe402 em 1BXS (Figura 46). é conservada não só em NahFr (Phe381), mas também em NahI (Phe392) e 3R64 (Phe400) sugerindo que essas posições devam desempenhar esse mesmo papel de interação com o cofator NAD (realizando interações hidrofóbicas e do tipo π - π com o anel nicotinamida).

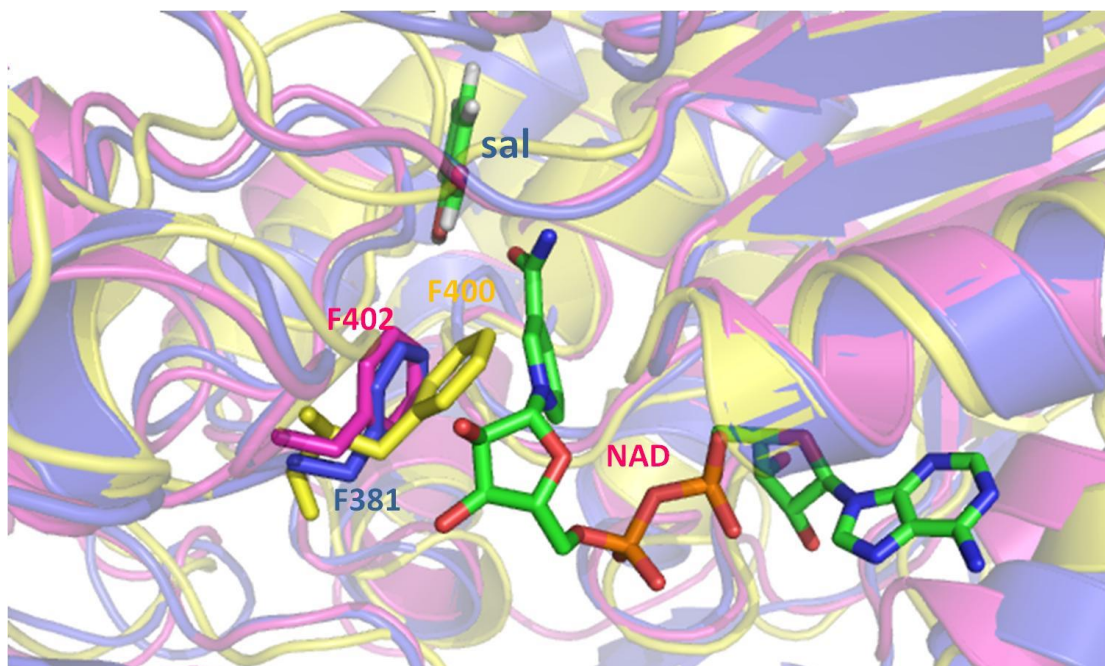


Figura 46. Alinhamento das estruturas das enzimas NahFr, 3R64 e 1BXS mostrando a região de ligação do cofator nicotinamida. Em destaque, os resíduos de Phe que devem interagir com o NAD em NahFr (azul), 3R64 (em amarelo) e 1BXS (em rosa).

Perozich, J. e colaboradores (Perozich 2000) estudaram o efeito de diversas mutações em alguns resíduos interagentes com o cofator NAD (Glu140, Lys137, Thr172 e Gly192) em uma ALDH classe 3 de *Rattus norvegicus* (código PDB 1AD3, (Liu et al. 1997)) para verificarem o efeito dessas mutações na preferência das ALDHs classe 3 por NAD ou NAD(P). Os resíduos que interagem com o NAD em 1BXS e seus equivalentes em 1AD3 também são apresentados na tabela 9.

O resíduo Glu140 de 1AD3 é conservado em 1BXS (Glu196) e em NahFr (Glu175). Esse resíduo liga na posição 2' da ribose da adenina, exatamente onde se diferencia NAD de NAD(P). Em NAD, essa posição é ocupada por um grupo –OH e em NAD(P), está o grupo fosfato. Perozich, J. e colaboradores (Perozich 2000) observaram que mutações nesse resíduo indicaram que ele contribui para uma ligação mais “forte” ao NAD evidenciada pelo maior valor de Km para NAD quando o Glu140 foi mutado. No entanto, os autores ressaltam que outros fatores devem contribuir para a habilidade da enzima em utilizar os cofatores já que nenhuma mutação foi capaz de abolir a utilização de NAD ou NAD(P).

Outro resíduo considerado importante para a ligação do cofator em ALDHs é a Lys137 em 1AD3 que é altamente conservada em NahFr (Lys172), 1BXS (Lys193), 3R64 (Lys183) e NahI (Lys178). Nos estudos de mutações realizados por Perozich, J. e colaboradores (Perozich 2000), foi demonstrado que a perda desse resíduo levou à inatividade dos mutantes tanto para NAD quanto para NAD(P). A ligação de hidrogênio realizada entre esse resíduo e o grupo -OH na posição 3' da ribose da adenina do NAD parece ser crítica para a manutenção da estrutura no local da interação do cofator à enzima.

Assim, apesar de não termos o cofator NAD ligado à enzima NahFr, vimos que os resíduos interagentes com esse cofator são bastante conservados, sugerindo que os mesmos podem desempenhar as mesmas funções em NahF. Mas isso não descarta a necessidade de obtermos a estrutura da enzima ligada ao cofator e outros estudos cinéticos já que ainda existem muitas dúvidas sobre a atividade e especificidade por NAD ou NAD(P) pelas ALDHs classe 3. Ainda segundo Perozich, J. e colaboradores (Perozich 2000), enzimas dependentes de nucleotídeos usualmente são estritas para NAD(H) ou NADP(H), já que NAD está mais envolvido em vias de degradação e NADPH, em vias de biossíntese. Porém, as ALDHs de classe 3, como a NahF, possuem a capacidade de utilizarem tanto NAD quando NAD(P) catalisando a mesma reação.

II.4 – Considerações finais

O objetivo principal da segunda parte dessa tese era a resolução da estrutura tridimensional da enzima NahF de *Pseudomonas putida*. Essa enzima pertence à família das aldeído desidrogenases. Essa família de proteínas apresenta um enovelamento muito característico com alta similaridade de sequência entre seus membros. A pergunta óbvia após essa afirmação seria porque estudar uma enzima tão similar a tantas outras.

Primeiro, existem muitas estruturas de ALDHs depositadas no PDB, mas estruturas de ALDHs com substratos aromáticos e com alta similaridade com NahF são raras. Em pesquisa inicial, só encontramos uma, a proteína 3R64 que não apresentou o substrato aldeído em sua estrutura e não apresenta estudos de atividade enzimática que possam garantir que essa proteína seja mesmo uma desidrogenase de aldeídos aromáticos. Segundo, o entendimento das particularidades estruturais da enzima NahF, que é especializada em uma função diferente de outras ALDHs, pode permitir entender como as enzimas da via de degradação do naftaleno se adaptaram à sua função em um período de tempo relativamente curto, dependendo das condições ambientais em que se encontram.

Mais ainda, com a estrutura da NahF poderemos acumular conhecimentos para desvendarmos os determinantes estruturais de sua especificidade por aldeídos aromáticos e permitir que suas características bioquímicas e cinéticas sejam melhoradas para uma possível aplicação biotecnológica.

Nesse trabalho, pela comparação com outras ALDHs, foi possível sugerir alguns resíduos de aminoácidos que devem ser importantes para a preferência da NahF por aldeídos aromáticos. Esses resíduos são:

- i) Arg157, que está muito próxima ao salicilaldeído: a posição equivalente em NahI, que é uma ALDH alifática, é um Trp163, um resíduo de aminoácido com cadeia lateral muito grande, o que poderia atrapalhar o posicionamento de um substrato aromático no sítio ativo;

- ii) Gly150, que também está bem próxima ao salicilaldeído e cujas posições equivalentes em Nahl e 1BXS, ambas ALDHs alifáticas, são Leu156 e Phe171, respectivamente. Ambos resíduos possuem cadeias laterais maiores que a Gly. Em 3R64, no entanto, a posição equivalente é uma Phe170, mesmo ela sendo referida como uma benzaldeído desidrogenase.
- iii) Trp96, que ocupa uma posição na entrada do bolsão catalítico. Em 1BXS, a presença de uma Asn117 e Phe171 leva a uma mudança na região em torno desses resíduos que quase fecha a entrada do bolsão catalítico.

Na estrutura da NahFr, o substrato aldeído estava presente em um bolso profundo na estrutura da NahF, formado por resíduos dos domínios catalítico e de ligação ao nucleotídeo. Nesse bolsão está presente a Cys284 catalítica e o outro resíduo catalítico, Glu250, que não está tão próximo ao substrato, deve participar da catálise após um ajuste induzido na estrutura pela ligação inicial do cofator nucleotídeo.

A estrutura da NahF também mostrou um sítio catalítico altamente hidrofóbico (resíduos Trp96, Phe99, Phe279, Val153, Leu154 e Ala103) que cria um ambiente favorável para uma interação hidrofóbica com o substrato (volume da cavidade de 565 \AA^3 sem o salicilaldeído). Este comportamento concorda com os dados cinéticos que mostraram uma preferência por aldeídos aromáticos e alifáticos de cadeia longa. Essa propriedade pode ser muito interessante se pensarmos em um futuro uso dessa enzima em processos de biorremediação em que a enzima poderia ser utilizada contra uma gama maior de poluentes.

Outro ponto importante desse trabalho é que o entendimento das características da enzima NahF que são responsáveis por sua atividade e especificidade e, também, suas diferenças para outras ALDHs de outros organismos pode abrir possibilidades para, por exemplo, o aumento da sua estabilidade e outras características por mutações sistemáticas, tornando possível o seu uso e o de outras enzimas relacionadas em processos biotecnológicos.

A biorremediação, como já discutido, é uma técnica alternativa para o tratamento de água e solo contaminados com petróleo e o naftaleno é seu componente mais tóxico e abundante, além de ser a molécula modelo para estudos de biorremediação. Assim, o entendimento dos microrganismos e de suas rotas metabólicas responsáveis pela degradação do naftaleno pode criar bases para o estabelecimento do uso mais comum da biorremediação em nossa realidade.

Além de processos de remoção da poluição causada pelos combustíveis fósseis, existe uma grande concentração de esforços para a busca de fontes alternativas de energia. E aqui também podemos ver uma aplicação para enzimas, principalmente ALDHs. Por exemplo, uma fonte alternativa de energia é a fermentação de biomassa lignocelulósica (Wyman 1994). Antes do processo fermentativo, a biomassa utilizada é normalmente pré-tratada para melhor liberação dos açúcares que serão fermentados pelos microrganismos. O pré-tratamento ácido é o processo mais comum, mas ele normalmente produz compostos tais como aldeídos furânicos, que inibem as hidrolases dos microrganismos que hidrolisam a (hemi)celulose para liberação dos açúcares para os microrganismos fermentadores (Wierckx, Koopman et al. 2011).

Já que a NahF mostrou uma ampla atividade para vários aldeídos, ela poderia ser utilizada para a conversão dos aldeídos furânicos em seus ácidos carboxílicos correspondentes e assim, ser utilizada como adjuvante no pré-tratamento ácido da biomassa lignocelulósica como fonte alternativa de energia.

Diante de todos os aspectos aqui discutidos, a obtenção da estrutura da NahF é apenas o início de diversos estudos posteriores que serão essenciais para sua real aplicação em processos biotecnológicos.

II.5. Conclusões

- 1- A proteína recombinante NahFr foi purificada por cromatografia de afinidade e gel filtração em grandes quantidades e com alto grau de pureza.
- 2- A NahFr está enovelada, apresenta uma temperatura de desnaturação (T_m) de 58,5 °C e a presença dos substratos salicilaldeído e o NAD^+ levam à estabilização térmica da enzima, elevando sua T_m para 60 e 61 °C, respectivamente.
- 3- A enzima teve seu máximo de atividade a 60 °C e pH 8,5 e manteve cerca de 60% dessa atividade mesmo após 4 horas de pré-incubação a 40 °C.
- 4- A atividade da NahFr parece não ser alterada na presença dos íons monovalentes Na^+ , K^+ e Rb^+ e divalentes, Mg^{2+} , Ca^{2+} ; Os íons NH_4^+ , Li^{2+} , Cs^+ , Zn^{2+} e Fe^{3+} e os agentes EDTA, DTT e SDS apresentaram um efeito inibitório na atividade e o íon Ni^{2+} elevou a atividade em quase 20%.
- 5- A enzima NahFr catalisa a oxidação do salicilaldeído à ácido salicílico utilizando NAD^+ como cofator. A enzima apresentou atividade sobre vários outros aldeídos com valores de k_{cat}/K_M próximos a $10^6 M^{-1}s^{-1}$ e, quando age sobre aldeídos alifáticos, a maior eficiência é por aqueles de cadeia longa.
- 6- A estrutura tridimensional da enzima NahFr foi resolvida e apresentou um enovelamento do tipo α/β com três domínios bem definidos: o domínio de oligomerização (responsável pela interação dos monômeros na unidade biológica dimérica); o domínio de ligação ao cofator nucleotídico (com um enovelamento tipo-Rossman) e o domínio catalítico.
- 7- Os resíduos Arg157, Gly150, Trp96, Trp99 e Phe279 parecem ser importantes na especificidade por aldeídos aromáticos como substratos.

II.6. Perspectivas

- 1- Mutações sitio dirigidas no gene *nahF* em resíduos de aminoácidos mais críticos para atividade e estabilidade;
- 2- Realizar estudos cinéticos desses mutantes, como determinação das constantes catalíticas, pH e temperatura ótimos, termoestabilidade, além da atividade para outros aldeídos;
- 3- Determinar a estrutura tridimensional desses mutantes;
- 4- Comparação da estrutura da NahF com outra ALDH da via, a NahI, que é específica para aldeídos alifáticos, assim que a estrutura da NahI estiver disponível.

3. Bibliografia

- ADAMS, P. D. AFONINE, P. V. BUNKOCZI, G. CHEN, V. B. DAVIS, I. W. ECHOLS, N. HEADD, J. J. HUNG, L. W. KAPRAL, G. J. GROSSE-KUNSTLEVE, R. W. MCCOY, A. J. MORIARTY, N. W. OEFFNER, R. READ, R. J. RICHARDSON, D. C. RICHARDSON, J. S. TERWILLIGER, T. C. & ZWART, P. H. (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**(Pt 2), 213-221.
- AHUJA, S. K. FERREIRA, G. M. & MOREIRA, A. R. (2004). Utilization of enzymes for environmental applications. *Crit Rev Biotechnol* **24**(2-3), 125-154.
- ALBUQUERQUE, C. F. DA SILVA, S. H. & CAMARGO, Z. P. (2005). Improvement of the specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* **43**(4), 1944-1946.
- ALCALDE, M. FERRER, M. PLOU, F. J. & BALLESTEROS, A. (2006). Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. *Trends Biotechnol* **24**(6), 281-287.
- BAGAGLI, E. THEODORO, R. C. BOSCO, S. M. & MCEWEN, J. G. (2008). Paracoccidioides brasiliensis: phylogenetic and ecological aspects. *Mycopathologia* **165**(4-5), 197-207.
- BAMFORTH, I. S. S. M. (2005). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **80**, 723-736.
- BASTOS, K. P. BAILAO, A. M. BORGES, C. L. FARIA, F. P. FELIPE, M. S. SILVA, M. G. MARTINS, W. S. FIUZA, R. B. PEREIRA, M. & SOARES, C. M. (2007). The transcriptome analysis of early morphogenesis in Paracoccidioides brasiliensis mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. *BMC Microbiol* **7**, 29.
- BATTYE, T. G. KONTOGIANNIS, L. JOHNSON, O. POWELL, H. R. & LESLIE, A. G. (2011). iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67**(Pt 4), 271-281.
- BEDINO, S. T., G.; OBERT, F. (1990). Initial characterization of aldehyde dehydrogenase from rat testis cytosol. *Biol. Chem.* **371**, 95-101.
- BERGFORS, T. M. (2009). *Protein crystallization*. International University Line.
- BEZALEL, L. H., Y.; CERNIGLIA, C.E. (1997). Enzymatic mechanisms involved in phenanthrene degradation by the white rot fungus Pleurotus ostreatus. *App Environ Microbiol.* **63**, 2495-2501.
- BIALEK, R. IBRICEVIC, A. FOTHERGILL, A. & BEGEROW, D. (2000). Small subunit ribosomal DNA sequence shows Paracoccidioides brasiliensis closely related to Blastomyces dermatitidis. *J Clin Microbiol* **38**(9), 3190-3193.
- BOOPATHY, R. (2000). Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology* **74**, 63-67.
- BORGES-WALMSLEY, M. I. CHEN, D. SHU, X. & WALMSLEY, A. R. (2002). The pathobiology of Paracoccidioides brasiliensis. *Trends Microbiol* **10**(2), 80-87.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- BRUMMER, E. CASTANEDA, E. & RESTREPO, A. (1993). Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* **6**(2), 89-117.
- BUDISA, N., KARNBROCK, W., STEINBACHER, S., HUMM, A., PRADE, L., NEUEFEIND, T., MORODER, L., HUBER, R. (1997). Bioincorporation of telluromethionine into proteins: a promising new approach for X-ray structure analysis of proteins. *J Mol Biol.* **270**(4), 616-623.
- CARNEIRO, F. R. SILVA, T. C. ALVES, A. C. HALINE-VAZ, T. GOZZO, F. C. & ZANCHIN, N. I. (2006). Spectroscopic characterization of the tumor antigen NY-REN-21 and identification of heterodimer formation with SCAND1. *Biochem Biophys Res Commun* **343**(1), 260-268.

CARRERO, L. L. NINO-VEGA, G. TEIXEIRA, M. M. CARVALHO, M. J. SOARES, C. M. PEREIRA, M. JESUINO, R. S. MCEWEN, J. G. MENDOZA, L. TAYLOR, J. W. FELIPE, M. S. & SAN-BLAS, G. (2008). New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. *Fungal Genet Biol* **45**(5), 605-612.

CEBOLLA, A. SOUSA, C. & DE LORENZO, V. (1997). Effector specificity mutants of the transcriptional activator NahR of naphthalene degrading *Pseudomonas* define protein sites involved in binding of aromatic inducers. *J Biol Chem* **272**(7), 3986-3992.

CERNIGLIA, C. E. (1984). Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Adv Appl Microbiol* **30**, 31-71.

CHAKRADEO, P. P. KAYAL, J. J. & BHIDE, S. V. (1993). Effect of benzo(a)pyrene and methyl(acetoxymethyl) nitrosamine on thymidine uptake and induction of aryl hydrocarbon hydroxylase activity in human fetal oesophageal cells in culture. *Cell Biol Int* **17**(7), 671-676.

CHEN, W. BRUHLMANN, F. RICHINS, R. D. & MULCHANDANI, A. (1999). Engineering of improved microbes and enzymes for bioremediation. *Curr Opin Biotechnol* **10**(2), 137-141.

CHEN, W. & MULCHANDANI, A. (1998). The use of live biocatalysts for pesticide detoxification. *Trends Biotechnol* **16**(2), 71-76.

CISALPINO, P. S. PUCCIA, R. YAMAUCHI, L. M. CANO, M. I. DA SILVEIRA, J. F. & TRAVASSOS, L. R. (1996). Cloning, characterization, and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Biol Chem* **271**(8), 4553-4560.

COITINHO, J. B. (2009). *Caracterização estrutural da forma recombinante da proteína Pb27 de Paracoccidioides brasiliensis*. Universidade Federal de Minas Gerais.

COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT NUMBER 4, C. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **50**(Pt 5), 760-763.

COLOMBO AL, Q.-T. F. (2007). *Paracoccidioidomycosis*. In: *Atlas of Fungal Infections*. Philadelphia: Springer.

CORPET, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.* **16**(22), 10881-10890.

CORREA, M. M. BEDOYA, A. M. GUERRERO, M. P. MENDEZ, J. RESTREPO, A. & MCEWEN, J. G. (2007). Diagnosis of paracoccidioidomycosis by a dot blot assay using a recombinant *Paracoccidioides brasiliensis* p27 protein. *Mycoses* **50**(1), 41-47.

CORREDOR, G. G. CASTANO, J. H. PERALTA, L. A. DIEZ, S. ARANGO, M. MCEWEN, J. & RESTREPO, A. (1999). Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. *Rev Iberoam Micol* **16**(4), 216-220.

COUTINHO, Z. F. SILVA, D. LAZERA, M. PETRI, V. OLIVEIRA, R. M. SABROZA, P. C. & WANKE, B. (2002). Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saude Publica* **18**(5), 1441-1454.

COWTAN, K. (2006). The Buccaneer software for automated model building. 1. Tracing protein chains. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**(Pt 9), 1002-1011.

DAVIES, J. I. & EVANS, W. C. (1964). Oxidative metabolism of naphthalene by soil pseudomonads. The ring-fission mechanism. *Biochem J* **91**(2), 251-261.

DESJARDINS CA, C. M., HOLDER JW, MUSZEWSKA A, GOLDBERG J, BAILÃO AM, BRIGIDO MM, FERREIRA ME, GARCIA AM, GRYNBERG M, GUJJA S, HEIMAN DI, HENN MR, KODIRA CD, LEÓN-NARVÁEZ H, LONGO LV, MA LJ, MALAVAZI I, MATSUO AL, MORAIS FV, PEREIRA M, RODRÍGUEZ-BRITO S, SAKTHIKUMAR S, SALEM-IZACC SM, SYKES SM, TEIXEIRA MM, VALLEJO MC, WALTER ME, YANDAVA C, YOUNG S, ZENG Q, ZUCKER J, FELIPE MS, GOLDMAN GH, HAAS BJ, MCEWEN JG, NINO-VEGA G, PUCCIA R, SAN-BLAS G, SOARES CM, BIRREN BW, CUOMO CA. (2011). Comparative genomic analysis of human fungal pathogens causing paracoccidioidomycosis. *PLoS Genet.* **7**(10), e1002345/1002341-1002316.

DIEZ, S. GARCIA, E. A. PINO, P. A. BOTERO, S. CORREDOR, G. G. PERALTA, L. A. CASTANO, J. H. RESTREPO, A. & MCEWEN, J. G. (1999). PCR with *Paracoccidioides brasiliensis* specific primers: potential use in ecological studies. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **41**(6), 351-358.

DIEZ, S. GOMEZ, B. L. MCEWEN, J. G. RESTREPO, A. HAY, R. J. & HAMILTON, A. J. (2003). Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant 27-kilodalton and purified 87-kilodalton antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* **41**(4), 1536-1542.

DUNKER, A. K., BROWN, C.J., LAWSON, J.D., IAKOUCHEVA, L.M., OBRADOVI, Z. (2002). Intrinsic Disorder and Protein Function. *Biochemistry* **41**, 6573–6582.

DYSON, H. J., WRIGHT, P.E. (2005). Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**, 197–208.

EMSLEY, P. LOHKAMP, B. SCOTT, W. G. & COWTAN, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**(Pt 4), 486-501.

EPA (2004). Toxicological review of naphthalene.

EVANS, P. (2006). Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**(Pt 1), 72-82.

FELIPE, M. S. ANDRADE, R. V. ARRAES, F. B. NICOLA, A. M. MARANHÃO, A. Q. TORRES, F. A. SILVA-PEREIRA, I. POCAS-FONSECA, M. J. CAMPOS, E. G. MORAES, L. M. ANDRADE, P. A. TAVARES, A. H. SILVA, S. S. KYAW, C. M. SOUZA, D. P. PEREIRA, M. JESUINO, R. S. ANDRADE, E. V. PARENTE, J. A. OLIVEIRA, G. S. BARBOSA, M. S. MARTINS, N. F. FACHIN, A. L. CARDOSO, R. S. PASSOS, G. A. ALMEIDA, N. F. WALTER, M. E. SOARES, C. M. CARVALHO, M. J. & BRIGIDO, M. M. (2005). Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J Biol Chem* **280**(26), 24706-24714.

FERNANDES, V. C. COITINHO, J. B. VELOSO, J. M. ARAUJO, S. A. PEDROSO, E. P. & GOES, A. M. (2011a). Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant rPb27 and rPb40 antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Immunol Methods.*

FERNANDES, V. C. MARTINS, E. M. BOELONI, J. N. COITINHO, J. B. SERAKIDES, R. & GOES, A. M. (2011b). Additive Effect of rPb27 Immunization and Chemotherapy in Experimental Paracoccidioidomycosis. *PLoS One* **6**(3), e17885.

FERNANDES, V. C. MARTINS, E. M. BOELONI, J. N. COITINHO, J. B. SERAKIDES, R. & GOES, A. M. (2011c). The combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb40 and Pb27 recombinant proteins enhances chemotherapy effects in experimental paracoccidioidomycosis. *Microbes and Infection.* **13**, 1062-1072.

FERRE-D'AMARE, A. R. & BURLEY, S. K. (1994). Use of dynamic light scattering to assess crystallizability of macromolecules and macromolecular assemblies. *Structure* **2**(5), 357-359.

FERREIRA, J. B. NAVARRO, I. T. FREIRE, R. L. OLIVEIRA, G. G. OMORI, A. M. BELITARDO, D. R. ITANO, E. N. CAMARGO, Z. P. & ONO, M. A. (2013). Evaluation of *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Dairy Goats. *Mycopathologia.*

FERREIRA, M. S. FREITAS, L. H. LACAZ CDA, S. DEL NEGRO, G. M. DE MELO, N. T. GARCIA, N. M. DE ASSIS, C. M. SALEBIAN, A. & HEINS-VACCARI, E. M. (1990). Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a dogfood probably contaminated with soil in Uberlandia, Brazil. *J Med Vet Mycol* **28**(3), 253-256.

FILLER, S. G. & SHEPPARD, D. C. (2006). Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. *PLoS Pathog* **2**(12), e129.

FINK, A. L. (2005). Natively unfolded proteins. *Curr Opin Struct Biol.* **15**, 35–41.

FONTANA, A. POLVERINO DE LAURETO, P. DE FILIPPIS, V. SCARAMELLA, E. & ZAMBONIN, M. (1997). Probing the partly folded states of proteins by limited proteolysis. *Fold Des* **2**(2), R17-26.

FONTANA, F. F., DOS SANTOS, C.T., ESTEVES, F.M., ROCHA, A., FERNANDES, G.F., DO AMARAL, C.C., DOMINGUES, M.A., DE CAMARGO, Z.P., SILVA-VERGARA, M.L. (2010). Seroepidemiological survey of paracoccidioidomycosis infection among urban and rural dogs from Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Mycopathologia* **169**(3), 159-165.

- FRANCO, M. MONTENEGRO, M. R. MENDES, R. P. MARQUES, S. A. DILLON, N. L. & MOTA, N. G. (1987). Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop* **20**(2), 129-132.
- GALLEGO J.R. , E. G.-R., A.I. PELAEZ, J. SANCHEZ, M.J. GARCIA-MARTINEZ, J.E. ORTIZ, T. TORRES, J.F. LLAMAS (2006). Natural attenuation and bioremediation of Prestige fuel oil along the Atlantic coast of Galicia (Spain). *Organic Geochemistry* **37**, 1869-1884.
- GAO, X. BAIN, K. BONANNO, J. B. BUCHANAN, M. HENDERSON, D. LORIMER, D. MARSH, C. REYNES, J. A. SAUDER, J. M. SCHWINN, K. THAI, C. & BURLEY, S. K. (2005). High-throughput limited proteolysis/mass spectrometry for protein domain elucidation. *J Struct Funct Genomics* **6**(2-3), 129-134.
- GARCIA BLANCO, S. MUNOZ, J. F. TORRES, I. DIEZ POSADA, S. GOMEZ, B. L. MCEWEN, J. G. RESTREPO, S. & GARCIA, A. M. (2011). Differential PbP27 expression in the yeast and mycelial forms of the Paracoccidioides brasiliensis species complex. *Fungal Genet Biol* **48**(12), 1087-1095.
- GIEBULTOWICZ, J. W., R.; SZTYBOR, A.; PIETRZAK, M.; WROCZYSKI, P.; WIERZCHOWSKI, J. (2009). Salivary aldehyde dehydrogenase: activity towards aromatic aldehydes and comparison with recombinant ALDH3A1. *Molecules* **14**, 2363-2372
- GOLDANI, L. Z. & SUGAR, A. M. (1998). Short report: use of the polymerase chain reaction to detect Paracoccidioides brasiliensis in murine paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* **58**(2), 152-153.
- GOMES, G. M. CISALPINO, P. S. TABORDA, C. P. & DE CAMARGO, Z. P. (2000). PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* **38**(9), 3478-3480.
- GRIMM, A. C. & HARWOOD, C. S. (1999). NahY, a catabolic plasmid-encoded receptor required for chemotaxis of Pseudomonas putida to the aromatic hydrocarbon naphthalene. *J Bacteriol* **181**(10), 3310-3316.
- GROSE, E., TAMSITT, J. R. (1965). Paracoccidioides brasiliensis recovered from the intestinal tract of three bats (Artibeus lituratus) in Colombia, S.A. *Sabouraudia* **4**(2), 124-125.
- HABE, H. & OMORI, T. (2003). Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem* **67**(2), 225-243.
- HARDING, S. E. (1994). Determination of diffusion coefficients of biological macromolecules by dynamic light scattering. *Methods Mol Biol* **22**, 97-108.
- HARDING, S. E. & JUMEL, K. (2001). Light scattering. *Curr Protoc Protein Sci* **Chapter 7**, Unit 7 8.
- HARITASH, A. K. & KAUSHIK, C. P. (2009). Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *J Hazard Mater* **169**(1-3), 1-15.
- HO, K. K. HURLEY, T. D. & WEINER, H. (2006). Selective alteration of the rate-limiting step in cytosolic aldehyde dehydrogenase through random mutagenesis. *Biochemistry* **45**(31), 9445-9453.
- HOLLIGER, C. GASPARD, S. GLOD, G. HEIJMAN, C. SCHUMACHER, W. SCHWARZENBACH, R. P. & VAZQUEZ, F. (1997). Contaminated environments in the subsurface and bioremediation: organic contaminants. *FEMS Microbiol Rev* **20**(3-4), 517-523.
- IARC (2002). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. IARC Press.
- JO, J. E. MOHAN RAJ, S. RATHNASINGH, C. SELVAKUMAR, E. JUNG, W. C. & PARK, S. (2008). Cloning, expression, and characterization of an aldehyde dehydrogenase from Escherichia coli K-12 that utilizes 3-Hydroxypropionaldehyde as a substrate. *Appl Microbiol Biotechnol* **81**(1), 51-60.
- KANALY, R. A. & HARAYAMA, S. (2000). Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J Bacteriol* **182**(8), 2059-2067.
- KANETSUNA, F. CARBONELL, L. M. AZUMA, I. & YAMAMURA, Y. (1972). Biochemical studies on the thermal dimorphism of Paracoccidioides brasiliensis. *J Bacteriol* **110**(1), 208-218.
- KELLEY, I. F., J.P.; EVANS, F.E.; CERNIGLIA, C.E. (1990). Identification of metabolites from degradation of naphthalene by a Mycobacterium sp. *Biodegradation*. **1**, 283-290.

LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259), 680-685.

LI, X. L., Y.; WEI, D.; LI, P.; WANG, L.; FENG, L. (2010). Characterization of a broad-range aldehyde dehydrogenase involved in alkane degradation in *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2. *Microbiol. Res.* **165** 706-712

LINDAHL, R. (1992). Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **27**(4-5), 283-335.

LIU, Z. J. SUN, Y. J. ROSE, J. CHUNG, Y. J. HSIAO, C. D. CHANG, W. R. KUO, I. PEROZICH, J. LINDAHL, R. HEMPEL, J. & WANG, B. C. (1997). The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold. *Nat Struct Biol* **4**(4), 317-326.

LIU, Z. J., SUN, Y. J., ROSE, J., CHUNG, Y. J., HSIAO, C. D., CHANG, W. R., KUO, I., PEROZICH, J., LINDAHL, R., HEMPEL, J., WANG, B. C. (1997). The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold. *Nat Struct Biol* **4**(4), 317-326.

LONDERO, A. T. (1986). Paracoccidioidomycose. I – Patogenia, formas clínicas, manifestações pulmonares e diagnóstico. *J Pneumol* **12**(1), 41-60.

LORBER, B. FISCHER, F. BAILLY, M. ROY, H. & KERN, D. (2012). Protein analysis by dynamic light scattering: methods and techniques for students. *Biochem Mol Biol Educ* **40**(6), 372-382.

LUTZ, A. (1908). Uma mycose pseudococcidica localisada na bocca e observada no Brazil. Contribuicao ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. *Bras-Med.* **22**, 121-124.

MADDOCKS, S. E. & OYSTON, P. C. (2008). Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* **154**(Pt 12), 3609-3623.

MARCHLER-BAUER, A. (2013). CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure. *Nucleic Acids Res.* **41**(D), 348-352.

MARQUES, S. A. (2012). Paracoccidioidomycosis. *Clinics in Dermatology* **30**, 610-615.

MATTE, A. C., M. (2007). Using Dynamic Light Scattering to Improve Protein Solution Behavior for Crystallization. *American Biotechnology Laboratory* **25**(7), 14-17.

MATTHEWS, B. W. (1968). Solvent content of protein crystals. *Journal of Molecular Biology* **33**(2), 491-497.

MATUTE, D. R. MCEWEN, J. G. PUCCIA, R. MONTES, B. A. SAN-BLAS, G. BAGAGLI, E. RAUSCHER, J. T. RESTREPO, A. MORAIS, F. NINO-VEGA, G. & TAYLOR, J. W. (2006). Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol* **23**(1), 65-73.

MCCOY, A. J. GROSSE-KUNSTLEVE, R. W. ADAMS, P. D. WINN, M. D. STORONI, L. C. & READ, R. J. (2007). Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* **40**(Pt 4), 658-674.

MCEWEN, J. G. ORTIZ, B. L. GARCIA, A. M. FLOREZ, A. M. BOTERO, S. & RESTREPO, A. (1996). Molecular cloning, nucleotide sequencing, and characterization of a 27-kDa antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol* **20**(2), 125-131.

MCGUFFIN, L. J., BRYSON, K., JONES, D.T. (2000). The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics.* **16**(4), 404-405.

MENDES-GIANNINI, M. J. HANNA, S. A. DA SILVA, J. L. ANDREOTTI, P. F. VINCENZI, L. R. BENARD, G. LENZI, H. L. & SOARES, C. P. (2004). Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides brasiliensis* leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. *Microbes Infect* **6**(10), 882-891.

MENDES-GIANNINI, M. J. SOARES, C. P. DA SILVA, J. L. & ANDREOTTI, P. F. (2005). Interaction of pathogenic fungi with host cells: Molecular and cellular approaches. *FEMS Immunol Med Microbiol* **45**(3), 383-394.

MOORE, S. A. BAKER, H. M. BLYTHE, T. J. KITSON, K. E. KITSON, T. M. & BAKER, E. N. (1998). Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase: the structure reveals the basis for the retinal specificity of class 1 aldehyde dehydrogenases. *Structure* **6**(12), 1541-1551.

MS (2012). Ministério da Saúde, Portal da Saúde - SUS.

MULCHANDANI, A. KANEVA, I. & CHEN, W. (1999). Detoxification of organophosphate nerve agents by immobilized *Escherichia coli* with surface-expressed organophosphorus hydrolase. *Biotechnol Bioeng* **63**(2), 216-223.

MURSHUDOV, G. N. VAGIN, A. A. & DODSON, E. J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **53**(Pt 3), 240-255.

NIESEN, F. H. BERGLUND, H. & VEDADI, M. (2007). The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat Protoc* **2**(9), 2212-2221.

NOSSAL, G. J. (1994). Differentiation of the secondary B-lymphocyte repertoire: the germinal center reaction. *Immunol Rev* **137**, 173-183.

ODDS, F. C. BROWN, A. J. & GOW, N. A. (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* **11**(6), 272-279.

OLIVEIRA, G. G. NAVARRO, I. T. FREIRE, R. L. BELITARDO, D. R. SILVEIRA, L. H. CAMARGO, Z. P. ITANO, E. N. & ONO, M. A. (2012). Serological survey of Paracoccidioidomycosis in sheep. *Mycopathologia* **173**(1), 63-68.

OLIVEIRA, G. G. SILVEIRA, L. H. ITANO, E. N. SOARES, R. M. FREIRE, R. L. WATANABE, M. A. CAMARGO, Z. P. & ONO, M. A. (2011). Serological evidence of Paracoccidioides brasiliensis infection in chickens from Parana and Mato Grosso do Sul States, Brazil. *Mycopathologia* **171**(3), 197-202.

ORTIZ, B. L. DIEZ, S. URAN, M. E. RIVAS, J. M. ROMERO, M. CAICEDO, V. RESTREPO, A. & MCEWEN, J. G. (1998). Use of the 27-kilodalton recombinant protein from Paracoccidioides brasiliensis in serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Clin Diagn Lab Immunol* **5**(6), 826-830.

OTWINOWSKI, Z., MINOR, W. (1997). Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. *Methods in Enzymology* **276**, 307-326.

PARK, S. Y. LEE, S. M. YE, S. K. YOON, S. H. CHUNG, M. H. & CHOI, J. (2006). Benzo[a]pyrene-induced DNA damage and p53 modulation in human hepatoma HepG2 cells for the identification of potential biomarkers for PAH monitoring and risk assessment. *Toxicol Lett* **167**(1), 27-33.

PARK, W. PADMANABHAN, P. PADMANABHAN, S. ZYLSTRA, G. J. & MADSEN, E. L. (2002). nahR, encoding a LysR-type transcriptional regulator, is highly conserved among naphthalene-degrading bacteria isolated from a coal tar waste-contaminated site and in extracted community DNA. *Microbiology* **148**(Pt 8), 2319-2329.

PEREZ-MILLER, S. J. & HURLEY, T. D. (2003). Coenzyme isomerization is integral to catalysis in aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry* **42**(23), 7100-7109.

PEROZICH, J., KUO, I., WANG, B. C., BOESCH, J. S., LINDAHL, R., HEMPEL, J. (2000). Shifting the NAD/NADP preference in class 3 aldehyde dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6197-6203.

PEROZICH, J. NICHOLAS, H. LINDAHL, R. & HEMPEL, J. (1999a). The big book of aldehyde dehydrogenase sequences. An overview of the extended family. *Adv Exp Med Biol* **463**, 1-7.

PEROZICH, J. NICHOLAS, H. WANG, B. C. LINDAHL, R. & HEMPEL, J. (1999b). Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family. *Protein Sci* **8**(1), 137-146.

PITARCH, A. NOMBELA, C. & GIL, C. (2008). Cell wall fractionation for yeast and fungal proteomics. *Methods Mol Biol* **425**, 217-239.

POLIKARPOV, I. PERLES, L. A. DE OLIVEIRA, R. T. OLIVA, G. CASTELLANO, E. E. GARRATT, R. C. & CRAIEVICH, A. (1998). Set-up and experimental parameters of the protein crystallography beamline at the Brazilian National Synchrotron Laboratory. *J Synchrotron Radiat* **5**(Pt 2), 72-76.

PRADO, M., SILVA, M.B., LAURENTI, R., TRAVASSOS, L.R., TABORDA, C.P. (2009). Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104**(3), 513-521.

PRIEFERT, H. RABENHORST, J. & STEINBUCHER, A. (1997). Molecular characterization of genes of *Pseudomonas* sp. strain HR199 involved in bioconversion of vanillin to protocatechuate. *J Bacteriol* **179**(8), 2595-2607.

- PUCCIA, R., SCHENKMAN, S., GORIN, P. A. J., TRAVASSO, L. R. (1986). Exocellular componentes of *Paracoccidioides brasiliensis*. Identification of a specific antigen. *Infect. Immun.* **53**, 199-206.
- RAJ, S. R., C.; JUNG, W.; SELVAKUMAR, E.; PARK, S. (2010). A novel NAD⁺-dependent aldehyde dehydrogenase encoded by the *puuC* gene of *Klebsiella pneumoniae* DSM 2026 that utilizes 3-hydroxypropionaldehyde as a substrate. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **15**, 131-138.
- REIS, B. S. FERNANDES, V. C. MARTINS, E. M. SERAKIDES, R. & GOES, A. M. (2008). Protective immunity induced by rPb27 of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Vaccine* **26**(43), 5461-5469.
- REZENDE, T. C. V., BORGES, C.L., MAGALHÃES, A.D., SOUSA, M.V., RICART, C.A.O., BAILÃO, A.M., SOARES, C.M.A. (2011). A quantitative view of the morphological phases of *Paracoccidioides brasiliensis* using proteomics *Journal of Proteomics* **75**, 572-587.
- RHODES, G. (2000). *Crystallography Made Crystal Clear: A Guide for Users of Macromolecular Models*. Academic Press.
- RODRIGUEZ-ZAVALA, J. S. O.-C., M.A.; MORENO-SANCHEZ, R. (2006). Characterization of an aldehyde dehydrogenase from *Euglena gracilis*. *Eukaryot. Microbiol.* **53**, 36-42.
- ROSSELLO-MORA, R. A. LALUCAT, J. & GARCIA-VALDES, E. (1994). Comparative biochemical and genetic analysis of naphthalene degradation among *Pseudomonas stutzeri* strains. *Appl Environ Microbiol* **60**(3), 966-972.
- SAEED, M. HIGGINBOTHAM, S. GAIKWAD, N. CHAKRAVARTI, D. ROGAN, E. & CAVALIERI, E. (2009). Depurinating naphthalene-DNA adducts in mouse skin related to cancer initiation. *Free Radic Biol Med* **47**(7), 1075-1081.
- SAMANTA, S. K. SINGH, O. V. & JAIN, R. K. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol* **20**(6), 243-248.
- SAMBROOK, J., FRITSCHI, E.F. AND MANIATIS, T. (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SAN-BLAS, G. (1985). *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall glucans, pathogenicity, and dimorphism. *Curr Top Med Mycol* **1**, 235-257.
- SAN-BLAS, G. & NINO-VEGA, G. (2008). *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. *Mycopathologia* **165**(4-5), 183-195.
- SAN-BLAS, G. NINO-VEGA, G. & ITURRIAGA, T. (2002). *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol* **40**(3), 225-242.
- SAN-BLAS, G., NINO-VEGA, G. (2001). *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. In *Fungal pathogenesis: principles and clinical applications* (Ed C. R. Cihlar RL), New York: Marcel Dekker.
- SAN-BLAS, G. & SAN-BLAS, F. (1977). *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. A review. *Mycopathologia* **62**(2), 77-86.
- SCHELL, M. A. (1993). Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* **47**, 597-626.
- SEO, J. S. KEUM, Y. S. & LI, Q. X. (2009). Bacterial degradation of aromatic compounds. *Int J Environ Res Public Health* **6**(1), 278-309.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A., QUEIROZ-TELLES, F., MENDES, R. P., COLOMBO, A. L., MORETTI, M. L. (2006). Consenso em Paracoccidioidomicose. *Rev Soc Bras Med Tropical* **39**, 297-310.
- SHOME, S. K., BATISTA, A. C. (1993). Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* in the soil of Recife, Brazil. *Rev Fac Med Univ Fed Ceara* **3**, 90-94.
- SILLETTI, R. P., GLEZEROV, V., SCHWARTZ, I. S. (1996). Pulmonary paracoccidioidomycosis misdiagnosed as *Pneumocystis pneumonia* in an immunocompromised host. *J Clin Microbiol.* **34**, 2328-2330.
- SILVEIRA, L. H., PAES, R.C., MEDEIROS, E.V., ITANO, E.N., CAMARGO, Z.P., ONO, M.A. (2008). Occurrence of Antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in dairy cattle from Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mycopathologia* **165**(6), 367-371.

SLABINSKI L, J. L., RYCHLEWSKI L, WILSON IA, LESLEY SA, GODZIK A. (2007). XtalPred: a web server for prediction of protein crystallizability. *Bioinformatics* **23**(24), 3403-3405.

SMITHGALL, T. E. HARVEY, R. G. & PENNING, T. M. (1988). Spectroscopic identification of ortho-quinones as the products of polycyclic aromatic trans-dihydrodiol oxidation catalyzed by dihydrodiol dehydrogenase. A potential route of proximate carcinogen metabolism. *J Biol Chem* **263**(4), 1814-1820.

SOPHOS, N. A. & VASILIOU, V. (2003). Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update. *Chem Biol Interact* **143-144**, 5-22.

SPINK, D. C. WU, S. J. SPINK, B. C. HUSSAIN, M. M. VAKHARIA, D. D. PENTECOST, B. T. & KAMINSKY, L. S. (2008). Induction of CYP1A1 and CYP1B1 by benzo(k)fluoranthene and benzo(a)pyrene in T-47D human breast cancer cells: roles of PAH interactions and PAH metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol* **226**(3), 213-224.

SREERAMA, N. & WOODY, R. W. (2004). Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. *Methods Enzymol* **383**, 318-351.

STRUB, M. P., HOH, F., SANCHEZ, J.F., STRUB, J.M., BOCK, A., AUMELAS, A., DUMAS, C. (2003). Selenomethionine and selenocysteine double labeling strategy for crystallographic phasing. *Structure* **11**(11), 1359-1367.

SUTHERLAND, J. B. R., F.; KHAN, A.A.; CERNIGLIA, C.E. (1995). Mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. In *Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals*. (Ed L. Y. C. Young, C.E.), pp. 269–306. New York: Wiley-Liss.

TEIXEIRA, M. M. THEODORO, R. C. DE CARVALHO, M. J. FERNANDES, L. PAES, H. C. HAHN, R. C. MENDOZA, L. BAGAGLI, E. SAN-BLAS, G. & FELIPE, M. S. (2009). Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the Paracoccidioides genus. *Mol Phylogenet Evol* **52**(2), 273-283.

THEODORO, R. C., TEIXEIRA MDE, M., FELIPE, M. S., PADUAN KDOS, S., RIBOLLA, P. M., SAN-BLAS, G., BAGAGLI, E. (2012). Genus paracoccidioides: Species recognition and biogeographic aspects. *PLoS One* **7**(5), e37694.

TIN, O. F. RYKUNOVA, A. I. MURANOVA, T. A. TOYODA, T. ITOA, K. SUZUKI, T. WATANABE, K. GARBER, M. B. & NAKAMURA, Y. (2000). Proteolytic fragmentation of polypeptide release factor 1 of *Thermus thermophilus* and crystallization of the stable fragments. *Biochimie* **82**(8), 765-772.

TOPINKA, J. MARVANNOVA, S. VONDRACEK, J. SEVASTYANOVA, O. NOVAKOVA, Z. KRČMAR, P. PENCIKOVA, K. & MACHALA, M. (2008). DNA adducts formation and induction of apoptosis in rat liver epithelial 'stem-like' cells exposed to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat Res* **638**(1-2), 122-132.

VASILIOU, V. & PAPPAS, A. (2000). Polymorphisms of human aldehyde dehydrogenases. Consequences for drug metabolism and disease. *Pharmacology* **61**(3), 192-198.

VASILIOU, V. PAPPAS, A. & PETERSEN, D. R. (2000). Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism. *Chem Biol Interact* **129**(1-2), 1-19.

VELASCO-GARCIA, R. VILLALOBOS, M. A. RAMIREZ-ROMERO, M. A. MUJICA-JIMENEZ, C. ITURRIAGA, G. & MUNOZ-CLARES, R. A. (2006). Betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*: cloning, over-expression in *Escherichia coli*, and regulation by choline and salt. *Arch Microbiol* **185**(1), 14-22.

VISBAL, G. SAN-BLAS, G. MURGICH, J. & FRANCO, H. (2005). Paracoccidioides brasiliensis, paracoccidioidomycosis, and antifungal antibiotics. *Curr Drug Targets Infect Disord* **5**(3), 211-226.

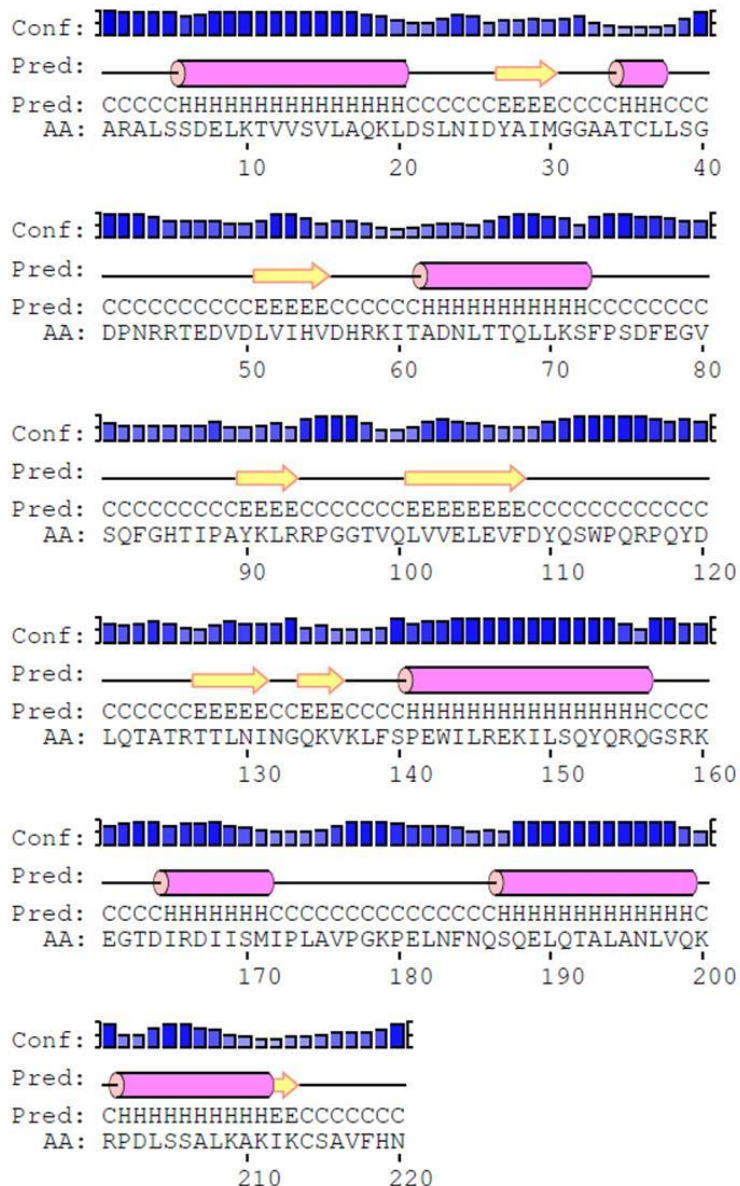
WALDEN, H. (2010). Selenium incorporation using recombinant techniques. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**(P4), 352-357.

WATERHOUSE, A. M. PROCTER, J. B. MARTIN, D. M. CLAMP, M. & BARTON, G. J. (2009). Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**(9), 1189-1191.




- WYMORE, T. HEMPEL, J. CHO, S. S. MACKERELL, A. D., JR. NICHOLAS, H. B., JR. & DEERFIELD, D. W., 2ND (2004). Molecular recognition of aldehydes by aldehyde dehydrogenase and mechanism of nucleophile activation. *Proteins* **57**(4), 758-771.
- YEN, K. M. & GUNSALUS, I. C. (1982). Plasmid gene organization: naphthalene/salicylate oxidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(3), 874-878.
- YEN, K. M. & GUNSALUS, I. C. (1985). Regulation of naphthalene catabolic genes of plasmid NAH7. *J Bacteriol* **162**(3), 1008-1013.
- YEUNG, C. K. YEP, A. KENYON, G. L. & MCLEISH, M. J. (2008). Physical, kinetic and spectrophotometric studies of a NAD(P)-dependent benzaldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida* ATCC 12633. *Biochim Biophys Acta* **1784**(9), 1248-1255.

Apêndice I – Estudos *in silico* da proteína Pb27

Predição de estrutura secundária pelo servidor PsiPred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>):

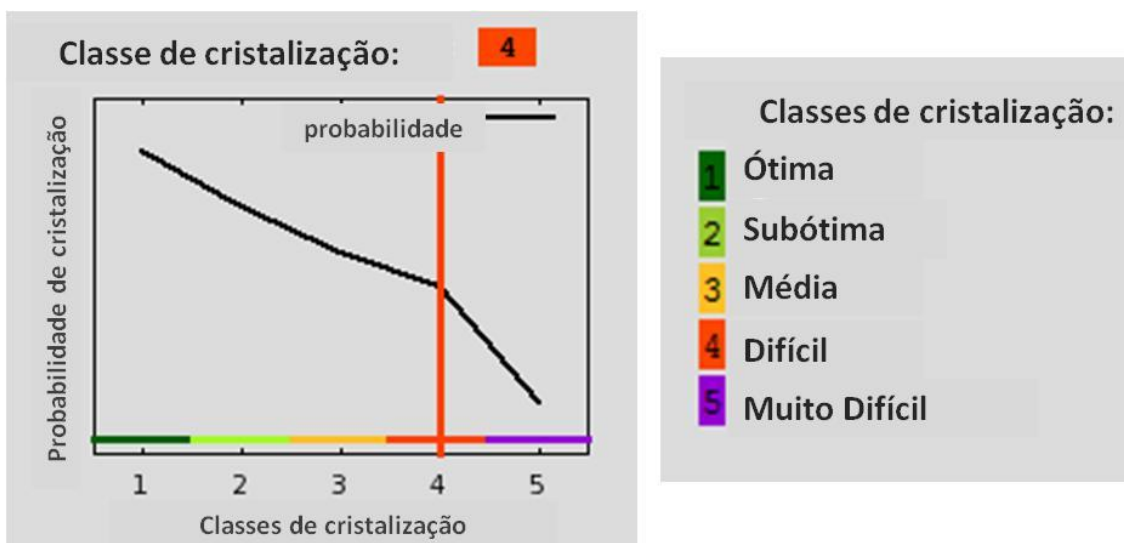


Legenda:

 =hélice Conf: }|}||{| confiança na predição
 =fita Pred: - + estrutura secundária predita
 =coil AA: sequencia alvo

Predição de probabilidade de cristalização pelo servidor XtalPred:

- 1- A proteína Pb27 pertence à classe de cristalização 4, sendo de difícil cristalização, segundo o XtalPred.



- 2- A proteína Pb27 apresenta 220 aminoácidos e uma massa molar de 24,6 kDa. Não apresenta regiões transmembrana nem peptídeo sinal. Essas características são apresentadas na forma de tabela e de figura, onde a sequência de aminoácidos é destacada.

Características da proteína	
Tamanho	220 aminoácidos
Massa molar	24619 Da
Ponto isoelétrico	8,84
Predições	
Hélices transmembrana	nenhuma
Peptídeo sinal	nenhum
"Coiled coil"	nenhum
Resíduos desordenados (%)	10
Resíduos "coil" (%)	45
Resíduos em α -hélice (%)	34
Resíduos em folhas- β (%)	20

Sequência da proteína Pb27 e suas características preditas pelo XtalPred.

```
1...*...10...*...20...*...30...*...40...*...50...*...60...*...70...*...80...*...90...*...100
ARALSSDELKTVVSVLAQKLDSLNIDYAIMGGAATCLLSGDPNRRTEDVDLVIHVDHRKITADNLTQLLKSFPSDFEGVSQFGHTIPAYKLRRPGGTVQ
...*...110...*...120...*...130...*...140...*...150...*...160...*...170...*...180...*...190...*...200
LVVELEVFDYQSWPQRPQYDLQTATRTILNINGQKVKLFSPEWILREKILSQYQRQGSRKEGTDIRDISMIPLAVPGKPELNFNQSQELQTALANLVQK
...*...210...*...220
RPDLSSALKAKIKCSAVFHN
```

Legenda:

LOOP	regiões de <i>loop</i> preditas pelo PsiPred (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/)
HÉLICE	regiões de hélices preditas pelo PsiPred (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/)
FITA	regiões de fitas- β preditas pelo PsiPred (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/)
DESORDENADO	regiões desordenadas preditas pelo DisoPred2 (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/disopred)
Baixa complexidade	regiões de baixa complexidade preditas pelo SEG (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7952898)
COILS	regiões de <i>coiled coil</i> preditas pelo COIL (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html)
Hélice transmembrana	regiões de hélices transmembrana preditas pelo THMM (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM)
Peptídeo sinal	regiões de peptídeo sinal preditas pelo RPSP (http://rpsp.bioinfo.pl/)

Apêndice II – Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene *pb27*

Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene *pb27* sequenciada e daquelas que apresentaram maior similaridade em pesquisa no BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). O alinhamento foi realizado no servidor Multalin (Corpet 1988) e visualizado no programa Jalview (Waterhouse et al. 2009).

U41503.1/ AAC49615.1 – “*Paracoccidioides brasiliensis* 27 kDa antigen mRNA, partial CDS”

DS572839.1/ EEH37678.1 – “*Paracoccidioides brasiliensis* Pb01 supercont 1.29 genomic scaffold, whole genome shotgun sequence”

DS544819.1/ EEH17245.1 – “*Paracoccidioides brasiliensis* Pb03 supercont 1.17 genomic scaffold, whole genome shotgun sequence”

XM_001541945.1/ XP_001541995.1 – “*Ajellomyces capsulatus* NAm1 conserved hypothetical protein (HCAG_02166) partial mRNA”

XM_002582220.1/ XP_002582266.1 – “*Uncinocarpus reesii* 1704 hypothetical protein, mRNA”

XM_002623624.1/ XP_002623670.1 – “*Ajellomyces dermatitidis* SLH14081 hypothetical protein, mRNA”

XM_001239067.1/ XP_001239068.1 – “*Coccidioides immitis* RS hypothetical protein (CIMG_10090) partial mRNA”

Ph 27r/1-708
 U41503.1/AAC49615.1/1-663
 DS572839.1/EEH37678./1-660
 DS544819.1/EEH17245./1-590
 XM_001541945.1/XP_001/1-597
 XM_002582220.1/XP_001/1-660
 XM_002623624.1/XP_001/1-409
 XM_001239067.1/XP_001/1-321

```

1 ATGGGCCATCATCATCATCAACACGAAAACCTGTATTTTCAGGCCCATATGGCGCC 56
1 -----GACACGAG-----C 8
1 -----ATGGCGCC 8
1 -----ATGGCGTC 8
1 -----ATGGTTAT 8
1 -----ATGGCGCC 8
  
```

Consensus
 -----CACGA-----ATGGCGCC

Ph 27r/1-708
 U41503.1/AAC49615.1/1-663
 DS572839.1/EEH37678./1-660
 DS544819.1/EEH17245./1-590
 XM_001541945.1/XP_001/1-597
 XM_002582220.1/XP_001/1-660
 XM_002623624.1/XP_001/1-409
 XM_001239067.1/XP_001/1-321

```

57 GCTCAGTTCGACGAGCTGAAAACTGTTGTTTCCGTCCCTTGCACAGAAACTTCGATT 112
9 GCTCAGTTCGACGAGCTGAAAACTGTTGTTTCCGTCCCTTGCACAGAAACTTCGATT 64
9 GCTCAGTTCGACGAGCTGAAAAATGTTGTTTCCGTCCCTGGCGCAGAAACTTCGATT 64
9 GCTCAGCCCTGATGAACCTGAGAACCTGTTGTTTCCGTCCCTGGCGCAGAAACTTCGATT 64
9 GCTCAGCCCAACCCCATTTGAGAACCTGTTGTTTCCGTCCCTTGCACAGAAACTTCGATT 64
9 GCTCAGCCCTGATGAACCTGAGAACCTGTTGTTTCCGTCCCTGGCGCAGAAACTTCGATT 64
  
```

Consensus
 GCTCAG++C+CGACGAGCTGA+AACTGTTGTTTCCG+CCTGGCGCAGAAACTTCGATT

Ph 27r/1-708
 U41503.1/AAC49615.1/1-663
 DS572839.1/EEH37678./1-660
 DS544819.1/EEH17245./1-590
 XM_001541945.1/XP_001/1-597
 XM_002582220.1/XP_001/1-660
 XM_002623624.1/XP_001/1-409
 XM_001239067.1/XP_001/1-321

```

113 CCTTAAATATCGACTATGCCATCATGGGGGGCGCTGCGACTTGTCTGCTGAGTGGGA 168
65 CCTTAAATATCGACTATGCCATCATGGGGGGCGCTGCGACTTGTCTGCTGAGTGGGA 120
65 CCTTAGATATCGACTATGCCATCATGGGGGGCGCTGCGACTTGTCTGCTGAGTGGGA 120
1 -----ATATCGACTATGCCATCATGGGGGGCGCTGCGACTTGTCTGCTGAGTGGGA 50
65 CATTGAACATTCGACTATGCCATCATGGGGGGCGCTGCCACCTGTCTGTTGATCCC 120
65 CCTTAGGATCGATTATGCCATCATGGGGGGCGCTGCGACTTGTCTGCTACTAGCCCTC 120
65 CATTGAACATCGACTATGCCATCATGGGGGGCGCTGCCACCTGTCTGTTGATCCC 120
  
```

Consensus
 CCTTAAATATCGACTATGCCATCATGGGGGGCGCTGCGACTTGTCTGCTGAGTGGGA

Ph 27r/1-708
 U41503.1/AAC49615.1/1-663
 DS572839.1/EEH37678./1-660
 DS544819.1/EEH17245./1-590
 XM_001541945.1/XP_001/1-597
 XM_002582220.1/XP_001/1-660
 XM_002623624.1/XP_001/1-409
 XM_001239067.1/XP_001/1-321

```

169 GACCCAAATCGAAGGACCGAAGACGTCGACCTCGTGATCCATGTTGACCACCGCAA 224
121 GACCCAAATAGAAAGGACCGAAGACGTCGACCTCGTGATCCATGTTGACCACCGCAA 176
121 GACCCAGATCGAAGGACCGAAGACGTCGACCTCGTGATCCATGTTGACCACCGCAA 176
51 GACCCAAATCGAAGGACCGAAGACGTCGACCTCGTGATCCATGTTGACCACCGCAA 106
121 GACCCCACTCGACGACCGAAGACGTTGATTTGGTCAATCAATGTTGATCAATGTAT 176
121 AACCCAAATCGAAAAACGGAAGACGTCGACCTTGTATTACGTTGATCAACGTAT 176
121 GACCCCACTCGCAGGACCGAAGACGTTGACTT----- 152
  
```

Consensus
 GACCCAAATCGAAGGACCGAAGACGTCGACCTCGTGATCCATGTTGACCACCGCAA

Ph 27r/1-708
 U41503.1/AAC49615.1/1-663
 DS572839.1/EEH37678./1-660
 DS544819.1/EEH17245./1-590
 XM_001541945.1/XP_001/1-597
 XM_002582220.1/XP_001/1-660
 XM_002623624.1/XP_001/1-409
 XM_001239067.1/XP_001/1-321

```

225 GATTACCGCAGACAACCTTACAACCTCAGCTTCTCAAATCCTTCCGCTCCGACTTTG 280
177 GATTACCGCAGACAACCTTACAACCTCAGCTTCTCAAATCCTTCCGCTCCGACTTTG 232
177 GATTACCGCAGACAACCTTACAACCTCAGCTTCTCAAATCCTTCCGCTCCGACTTTG 232
107 GATTACCGCAGACAACCTTACAACCTCAGCTTCTCAAATCCTTCCGCTCCGACTTTG 162
177 GATCACCAACGACTGCTTACAACCTCAGCTTCTCAAATCCTTCCAAACGATTTG 232
177 GATTACTGCAAGCAGCTGACCCAGCGACTTCTCAAATCCTTCCAAATGATTTG 232
153 -----GCTCCTCACATCCTTCCAAACCGATTTG 181
  
```

Consensus
 GATTACCGCAGACAACCTTACAACCTCAGCTTCTCAAATCCTTCCGCTCCGACTTTG

Ph 27r/1-708
 U41503.1/AAC49615.1/1-663
 DS572839.1/EEH37678./1-660
 DS544819.1/EEH17245./1-590
 XM_001541945.1/XP_001/1-597
 XM_002582220.1/XP_001/1-660
 XM_002623624.1/XP_001/1-409
 XM_001239067.1/XP_001/1-321

```

281 AAGGAGTCAGCCAATTTGGGCACACCATTCCCGCATACAAACTGCGCCGACCAGGA 336
233 AAGGAGTCAGCCAATTTGGGCACACCATTCCCGCATACAAACTGCGCCGACCAGGA 288
233 AAGGAGTCAGCCAATTTGGGCACACCATTCCCGCATACAAACTGCGCCGACCAGGA 288
263 AAGGAGTCAGCCAATTTGGGCACACCATTCCCGCATACAAACTGCGCCGACCAGGA 218
233 AAGGATTA----- 240
233 GTCCAGTTAGTCAATTTGGACACACAATCCCGGCATTCAAGCTCCAACCTGCCTGGA 288
182 AAGGAGTCAGCCAATTTGGGCACACCATTCCCGCATACAAACTGCGCCGACCAGGA 237
  
```

Consensus
 AAGGAGTCAGCCAATTTGGGCACACCATTCCCGCATACAAACTGCGCCGACCAGGA

Pb27r/1-708 337 GGTACCGTTCAGTTGGTGG --- AACTGGAAGTATTTGACTACCAAAGCTGGCCGCA 389
 U41503.1/AAC49615.1/1-663 289 GGTACCGTTCAGTTGGTGG TGGAACTGGAAGTATTTGACTACCAAAGCTGGCCGCA 344
 DS572839.1/EEH37678./1-660 289 GGTACCGTTCAGTTGGTGG --- AACTGGAAGTATTTGACTACCAAAGCTGGCCGCA 341
 DS544819.1/EEH17245./1-590 219 GGTACCGTTCAGTTGGTGG --- AACTAGAAGTATTTGACTACCAAAGCTGGCCGCA 271
 XM_001541945.1/XP_001-597 241 ----- G TGGAACTAGAAGTATTTGACTACCAAAGCTGGCCGCA 278
 XM_002582220.1/XP_001-660 289 GGTGTAGTACATCTAGTTG --- AGCTGGAAGTATTTGACTACCAAAGCTGGCCGCA 341
 XM_002623624.1/XP_001-409 238 GGTGCCGCCAGTTAGTTG --- AGCTAGAAGTATTTGACTACCAAAGCTGGCCGCA 290
 XM_001239067.1/XP_001-321 1 ----- A T G C T G G T G G A G A T C G A G A T T T T C G A T G T G C A A G C C T G G C C G G 44

Consensus GGTACCGTTCAGTTGGTGGAACTGGAAGTATTTGACTACCAAAGCTGGCCGCA
 GGT+CCGTTTCAGTTGGTGGTGGAACTGGAAGTATTTGACTACCAAAGCTGGCCGCA

Pb27r/1-708 390 ACGTCCCCAATACGATCTTCAGACTGC - - - - - TACACGGACGACGTTGAATATCA 439
 U41503.1/AAC49615.1/1-663 345 ACGTCCCCAATACGATCTTCAGACTGC - - - - - TACACGGACGACGTTGAATATCA 394
 DS572839.1/EEH37678./1-660 342 ACGTCCCTCAATATAATCTTCAGACTGC - - - - - TACACGGACGACGTTGAATATCA 391
 DS544819.1/EEH17245./1-590 272 ACGTCCCCAATACGATCTTCAGACTGC - - - - - TACACGGACGACGTTGAATATCA 321
 XM_001541945.1/XP_001-597 279 ACGTCCCCAGCAAAACATTCAGACTGC - - - - - CACACGGAAAGACGTTGAATATCA 328
 XM_002582220.1/XP_001-660 342 ACGCCCTCAATACAACATCCAACTGC - - - - - CTACGGACAACCATAAACATTCG 391
 XM_002623624.1/XP_001-409 291 ACGTCCCCAGTACAACATTCAGACTGC - - - - - CACACGGAAAGACGTTGAATATCA 340
 XM_001239067.1/XP_001-321 45 TCGGCCGCAATATAATTTAGAAAGCTGGCGGAA TACGCGCTGTCCAGTGGAGATTG 100

Consensus ACGTCCCAATAACAATCTTCAGACTGC - - - - - TACACGGACGACGTTGAATATCA
 ACGTCCCCAATACAATCTTCAGACTGC - - - - - TACACGGACGACGTTGAATATCA

Pb27r/1-708 440 ACGGTCAGAAGGTCAAACCTCTTCAGCCCTGAATGGATCCTGCGTGAAAAGATCCTCG 495
 U41503.1/AAC49615.1/1-663 395 ACGGTCAGAAGGTCAAACCTCTTCAGCCCTGAATGGATCCTGCGTGAAAAGATCCTCG 450
 DS572839.1/EEH37678./1-660 392 ACGGTCAAAAGGTCAAACCTCTTCAGCCCTGAATGGATCCTGCGTGAAAAGATCCTCG 447
 DS544819.1/EEH17245./1-590 322 ACGGTCAGAAGGTCAAACCTCTTCAGCCCTGAATGGATCCTGCGTGAAAAGATCCTCG 377
 XM_001541945.1/XP_001-597 329 ATGGTCGCGCAGTTAAATCTTTGGCCCTGAATGGATCCTGCGTGAAAAGATTTTG 384
 XM_002582220.1/XP_001-660 392 ATGGACAGGCAATAAATGTTGGCTCTGAATGGATCCTGCGTGAAAAGATCCTTA 447
 XM_002623624.1/XP_001-409 341 ATGGTCGCGCAGTTAAATCTTTGGCTCTGAATGGATCCTGCGTGAAAAGATTTTG 396
 XM_001239067.1/XP_001-321 101 A G G G G G T A A A T G T G C A G G T T A T G A G T G T G G C A T G G C T G T T G C G T G A A A A G A T A A C A 156

Consensus ACGGTCAGAAGGTCAAACCTCTTCAGCCCTGAATGGATCCTGCGTGAAAAGATCCTCG
 ACGGTCAGAAGGTCAAACCTCTTCAGCCCTGAATGGATCCTGCGTGAAAAGATCCTCG

Pb27r/1-708 496 TCCAGTATCAGCGCCAAGGTAGTTCGCAAAGAAGGAACCGATATTCGTGATATCAT 551
 U41503.1/AAC49615.1/1-663 451 TCCAGTATCAGCGCCAAGGTAGTTCGCAAAGAAGGAACCGATATTCGTGATATCAT 506
 DS572839.1/EEH37678./1-660 448 TCCAGTATCAGCGCCAAGGTAGTTCGCAAAGAAGGAACCGATATTCGTGATATCAT 503
 DS544819.1/EEH17245./1-590 378 TCCAGTATCAGCGCCAAGGTAGTTCGCAAAGAAGGAACCGATATTCGTGATATCAT 433
 XM_001541945.1/XP_001-597 385 TCTCAGTATCAGCGCCAAGGTAGTTCCAAAGAAGGAACCGATATTCGGGATATCAC 540
 XM_002582220.1/XP_001-660 448 TCACAATATCAACGCCAAGGTAGTTCGCAAAGAAGGAAGTTGATGTCCTGACATTTTC 503
 XM_002623624.1/XP_001-409 397 TCTCAGTATCAGC - - - - - TCCAGTATCAGCGCCAAGGTAGTTCGCAAAGAAGGAAGTTGATGTCCTGACATTTTC 409
 XM_001239067.1/XP_001-321 157 TCACAAGCTCAAAGGGAAGGGAGTCCGAGAGAGCATAGTGTATATTTTCAGATATCGC 212

Consensus TCCAGTATCAGCGCCAAGGTAGTTCGCAAAGAAGGAACCGATATTCGTGATATCAT
 TCCAGTATCAGCGCCAAGGTAGTTCGCAAAGAAGGAACCGATATTCGTGATATCAT

Pb27r/1-708 552 TAGTATGATCCCTTTGGCTGTGCCGGGCAAACCAGAGCTCAACTTCAACCAAAGCC 607
 U41503.1/AAC49615.1/1-663 507 TAGTATGATCCCTTTGGCTGTGCCGGGCAAACCAGAGCTCAACTTCAACCAAAGCC 562
 DS572839.1/EEH37678./1-660 504 TAGTATGATCCCTTTGGCTGTGCCGGGCAAACCAGAGCTCAACTTCAACCAAAGCC 559
 DS544819.1/EEH17245./1-590 434 TAGTATGATCCCTTTGGCTGTGCCGGGCAAACCAGAGCTCAACTTCAACCAAAGCC 489
 XM_001541945.1/XP_001-597 441 TAAATATGATCCCTTTGGCAGTGCAGGCAGACCCAGAGCTCGACTTCAATCAAAGCC 496
 XM_002582220.1/XP_001-660 504 GAATTTGATCCCTTTGGCAGTTCGCGCAAAGCCAGAACTTGATTTCAACCAAAGCC 559
 XM_002623624.1/XP_001-409 213 G T G C C T G G C A A C G A T T G C T G C G G A T G C G G A G C T G G - - - - - T C T G T G A G A T A G 259
 XM_001239067.1/XP_001-321

Consensus TAGTATGATCCCTTTGGCTGTGCCGGGCAAACCAGAGCTCAACTTCAACCAAAGCC
 TAGTATGATCCCTTTGGCTGTGCCGGGCAAACCAGAGCTCAACTTCAACCAAAGCC

Pb27r/1-708 608 AAGAGTTGCAAACCTGCATTGGCAAATCTTGTGCAAAAAGAGGCCAGATTTGAGTTCA 663
 U41503.1/AAC49615.1/1-663 563 AAGAGTTGCAAACCTGCATTGGCAAATCTTGTGCAAAAAGAGGCCAGATTTGAGTTCA 618
 DS572839.1/EEH37678./1-660 560 AAGAGTTGCAAACCTGCATTGGCAAATCTTGTGCAAAAAGAGGCCAGATTTGAGTTCA 615
 DS544819.1/EEH17245./1-590 490 AAGAGTTGCAAACCTGCATTGGCAAATCTTGTGCAAAAAGAGGCCAGATTTGAGTTCA 545
 XM_001541945.1/XP_001-597 497 AAGAGTTGCAAACCTGCATTGGCAAATCTTGTGCAAAAAGAGGCCAGATTTGAGTTCA 552
 XM_002582220.1/XP_001-660 560 AAGAGTTGCAAACCTGCATTGGCAAATCTTGTGCAAAAAGAGGCCAGATTTGAGTTCA 615
 XM_002623624.1/XP_001-409 260 AAGAGTTTGTGGGGGCCCTTTCGACGGTTGTTGGAAAAGAGGCCAGATGAAGAGG 315
 XM_001239067.1/XP_001-321

Consensus AAGAGTTGCAAACCTGCATTGGCAAATCTTGTGCAAAAAGAGGCCAGATTTGAGTTCA
 AAGAGTTGCAAACCTGCATTGGCAAATCTTGTGCAAAAAGAGGCCAGATTTGAGTTCA

Pb27r/1-708 664 GCTTTGAAGGCCAAGATCAAATGCAGCGCTGTCTTCCACAACCTAG 708
 U41503.1/AAC49615.1/1-663 619 GCTTTGAAGGCCAAGATCAAATGCAGCGCTGTCTTCCACAACCTAG 663
 DS572839.1/EEH37678./1-660 616 TCTTTGAAGGTCGAAGATCAAATGCAGCGCTGTCTTCCACAACCTAG 660
 DS544819.1/EEH17245./1-590 546 GCTTTGAAGGCCAAGATCAAATGCAGCGCTGTCTTCCACAACCTAG 590
 XM_001541945.1/XP_001-597 553 TCTTTGAAGGCCAAGATCAAATGCAGCGCTGTCTTCCACAACCTAG 597
 XM_002582220.1/XP_001-660 616 GCTTTGAAGGCCAAGATCAAATGCAGCGCTGTCTTCCACAACCTAG 660
 XM_002623624.1/XP_001-409 316 G T T T G A - - - - - 321
 XM_001239067.1/XP_001-321

Consensus GCTTTGAAGGCCAAGATCAAATGCAGCGCTGTCTTCCACAACCTAG
 GCTTTGAAGGCCAAGATCAAATGCAGCGCTGTCTTCCACAACCTAG

Apêndice III – Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene *nahF* e de aminoácidos da proteína NahFr

- 1- Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene *nahF* sequenciada nesse trabalho (NahFr) e aquela que apresentou maior similaridade em pesquisa no BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>): Acesso NC_007926.1, Região 34222-35673 do plasmídeo NAH7 de *Pseudomonas putida*.

O alinhamento foi realizado no servidor Multalin (Corpet 1988) e visualizado no programa Jalview (Waterhouse et al. 2009).

NahFr/1-1500 1 **ATGGGCCATCATCATCATCACGAAAACCTGTATTTTCAGGGCCATATGAAGACAAAAC T** 62
Região/1-1452 1 -----ATGAAGACAAAAC T 14
Consensus -----ATGAAGACAAAAC T

NahFr/1-1500 63 **GTTTATCAACAACGCCTGGATCGATTCCAGTGACCAGCAGACCTTCGAGCGCAAGCACCCCG** 124
Região/1-1452 15 **GTTTATCAACAACGCCTGGATCGATTCCAGTGACCAGCAGACCTTCGAGCGCAAGCACCCCG** 76
Consensus **GTTTATCAACAACGCCTGGATCGATTCCAGTGACCAGCAGACCTTCGAGCGCAAGCACCCCG**
 GTTTATCAACAACGCCTGGATCGATTCCAGTGACCAGCAGACCTTCGAGCGCAAGCACCCCG

NahFr/1-1500 125 **TCAGCAGCGAGGTGATGACTGAGAGCGCAAACGCCACGGTGACGGACGCGATAAAGGCGGCG** 186
Região/1-1452 77 **TCAGCAGCGAGGTGATGACTGAGAGCGCAAACGCCACGGTGACGGACGCGATAAAGGCGGCG** 138
Consensus **TCAGCAGCGAGGTGATGACTGAGAGCGCAAACGCCACGGTGACGGACGCGATAAAGGCGGCG**
 TCAGCAGCGAGGTGATGACTGAGAGCGCAAACGCCACGGTGACGGACGCGATAAAGGCGGCG

NahFr/1-1500 187 **CAAGCGGCCGAGGAGGCATTCAAGACCTGGAAGGACGTCGGACCTTCGGAGCGTCGCCGCC T** 248
Região/1-1452 139 **CAAGCGGCCGAGGAGGCATTCAAGACCTGGAAGGACGTCGGACCTTCGGAGCGTCGCCGCC T** 200
Consensus **CAAGCGGCCGAGGAGGCATTCAAGACCTGGAAGGACGTCGGACCTTCGGAGCGTCGCCGCC T**
 CAAGCGGCCGAGGAGGCATTCAAGACCTGGAAGGACGTCGGACCTTCGGAGCGTCGCCGCC T

NahFr/1-1500 249 **TCTCCTGAAGGTCGCCGATGTCATGGAAAGTAAAACACCGAAGTTCATCGAAGTGATGGCCA** 310
Região/1-1452 201 **TCTCCTGAAGGTCGCCGATGTCATGGAAAGTAAAACACCGAAGTTCATCGAAGTGATGGCCA** 262
Consensus **TCTCCTGAAGGTCGCCGATGTCATGGAAAGTAAAACACCGAAGTTCATCGAAGTGATGGCCA**
 TCTCCTGAAGGTCGCCGATGTCATGGAAAGTAAAACACCGAAGTTCATCGAAGTGATGGCCA

NahFr/1-1500 311 **TGGAGGTGGGAGCTTCCGCCCTTTGGGCCGGATTCAACGTCCATGCGTCTGCCAATGTGTT C** 372
Região/1-1452 263 **TGGAGGTGGGAGCTTCCGCCCTTTGGGCCGGATTCAACGTCCATGCGTCTGCCAATGTGTT C** 324
Consensus **TGGAGGTGGGAGCTTCCGCCCTTTGGGCCGGATTCAACGTCCATGCGTCTGCCAATGTGTT C**
 TGGAGGTGGGAGCTTCCGCCCTTTGGGCCGGATTCAACGTCCATGCGTCTGCCAATGTGTT C

NahFr/1-1500 373 **CGGGAGGCTGCCTCGCTGGCCACCCAAATTCAGGGTGAAACCATCCCAACGGACAAAAGCCGA** 434
Região/1-1452 325 **CGGGAGGCTGCCTCGCTGGCCACCCAAATTCAGGGTGAAACCATCCCAACGGACAAAAGCCGA** 386
Consensus **CGGGAGGCTGCCTCGCTGGCCACCCAAATTCAGGGTGAAACCATCCCAACGGACAAAAGCCGA**
 CGGGAGGCTGCCTCGCTGGCCACCCAAATTCAGGGTGAAACCATCCCAACGGACAAAAGCCGA

NahFr/1-1500 435 **AACGCTCTCAATGACCCACGTCAGCCGGTCGGTCCGATCCTAAGCATCGTTCCATGGAACG** 496
Região/1-1452 387 **AACGCTCTCAATGACCCACGTCAGCCGGTCGGTCCGATCCTAAGCATCGTTCCATGGAACG** 448
Consensus **AACGCTCTCAATGACCCACGTCAGCCGGTCGGTCCGATCCTAAGCATCGTTCCATGGAACG**
 AACGCTCTCAATGACCCACGTCAGCCGGTCGGTCCGATCCTAAGCATCGTTCCATGGAACG

NahFr/1-1500 497 **GCACCCG**CAGT**GCTGGC**GGC**CACG**AGCC**ATCG**CTT**ATCCG**CTGGT**CTGT**GGCA**ACAC**GGT**AGTG** 558
Região/1-1452 449 **GCACCCG**CAGT**GCTGGC**GGC**CACG**AGCC**ATCG**CTT**ATCCG**CTGGT**CTGT**GGCA**ACAC**GGT**AGTG** 510
Consensus
GCACCCGCAGT**GCTGGC**GGC**CACG**AGCC**ATCG**CTT**ATCCG**CTGGT**CTGT**GGCA**ACAC**GGT**AGTG**
GCACCCG**CAGT**GCTGGC**GGC**CACG**AGCC**ATCGCTT**ATCCG**CTGGT**CTGT**GGCA**ACAC**GGT**AGTG**

NahFr/1-1500 559 **TTCAA**AGG**CTCTGA**ATTT**AGTCCC**GGC**ACG**CA**TGCC**CT**GATCAC**CC**AGTG**CGT**GCA**GG**AAAG**C 620
Região/1-1452 511 **TTCAA**AGG**CTCTGA**ATTT**AGTCCC**GGC**ACG**CA**TGCC**CT**GATCAC**CC**AGTG**CGT**GCA**GG**AAAG**C 572
Consensus
TTCAAAGG**CTCTGA**ATTT**AGTCCC**GGC**ACG**CA**TGCC**CT**GATCAC**CC**AGTG**CGT**GCA**GG**AAAG**C
TTCAAAGG**CTCTGA**ATTT**AGTCCC**GGC**ACG**CA**TGCC**CT**GATCAC**CC**AGTG**CGT**GCA**GG**AAAG**C

NahFr/1-1500 621 **CGGG**CT**GCCC**G**CTGG**CGT**GCTCA**ACT**ACCT**CA**ACTCTT**CG**CTGA**CC**GTTG**CC**CGA**AT**CG** 682
Região/1-1452 573 **CGGG**CT**GCCC**G**CTGG**CGT**GCTCA**ACT**ACCT**CA**ACTCTT**CG**CTGA**CC**GTTG**CC**CGA**AT**CG** 634
Consensus
CGGGCT**GCCC**G**CTGG**CGT**GCTCA**ACT**ACCT**CA**ACTCTT**CG**CTGA**CC**GTTG**CC**CGA**AT**CG**
CGGGCT**GCCC**G**CTGG**CGT**GCTCA**ACT**ACCT**CA**ACTCTT**CG**CTGA**CC**GTTG**CC**CGA**AT**CG**

NahFr/1-1500 683 **CCG**AG**CACT**GAT**CTCC**G**CCA**AGG**AGATCC**GGC**GCAT**CA**ACTT**CA**CGGG**TT**CA**CC**CG**CGT**G** 744
Região/1-1452 635 **CCG**AG**CACT**GAT**CTCC**G**CCA**AGG**AGATCC**GGC**GCAT**CA**ACTT**CA**CGGG**TT**CA**CC**CG**CGT**G** 696
Consensus
CCGAG**CACT**GAT**CTCC**G**CCA**AGG**AGATCC**GGC**GCAT**CA**ACTT**CA**CGGG**TT**CA**CC**CG**CGT**G**
CCGAG**CACT**GAT**CTCC**G**CCA**AGG**AGATCC**GGC**GCAT**CA**ACTT**CA**CGGG**TT**CA**CC**CG**CGT**G**

NahFr/1-1500 745 **GGC**AG**CATT**AT**CG**CG**CAGA**AGG**CCG**CG**CAAC**AC**CTCA**AG**CGCT**G**CC**TA**CTGG**AG**CTCG**GG**CGG** 806
Região/1-1452 697 **GGC**AG**CATT**AT**CG**CG**CAGA**AGG**CCG**CG**CAAC**AC**CTCA**AG**CGCT**G**CC**TA**CTGG**AG**CTCG**GG**CGG** 758
Consensus
GGCAG**CATT**AT**CG**CG**CAGA**AGG**CCG**CG**CAAC**AC**CTCA**AG**CGCT**G**CC**TA**CTGG**AG**CTCG**GG**CGG**
GGCAG**CATT**AT**CG**CG**CAGA**AGG**CCG**CG**CAAC**AC**CTCA**AG**CGCT**G**CC**TA**CTGG**AG**CTCG**GG**CGG**

NahFr/1-1500 807 **CAAG**T**CCCC**G**CTT**ATT**GTTTT**AGAT**GAC**GC**AGAC**AT**CAAC**GC**GGCG**GGT**AAA**GG**CAG**CGG**TGT** 868
Região/1-1452 759 **CAAG**T**CCCC**G**CTT**ATT**GTTTT**AGAT**GAC**GC**AGAC**AT**CAAC**GC**GGCG**GGT**AAA**GG**CAG**CGG**TGT** 820
Consensus
CAAGT**CCCC**G**CTT**ATT**GTTTT**AGAT**GAC**GC**AGAC**AT**CAAC**GC**GGCG**GGT**AAA**GG**CAG**CGG**TGT**
CAAGT**CCCC**G**CTT**ATT**GTTTT**AGAT**GAC**GC**AGAC**AT**CAAC**GC**GGCG**GGT**AAA**GG**CAG**CGG**TGT**

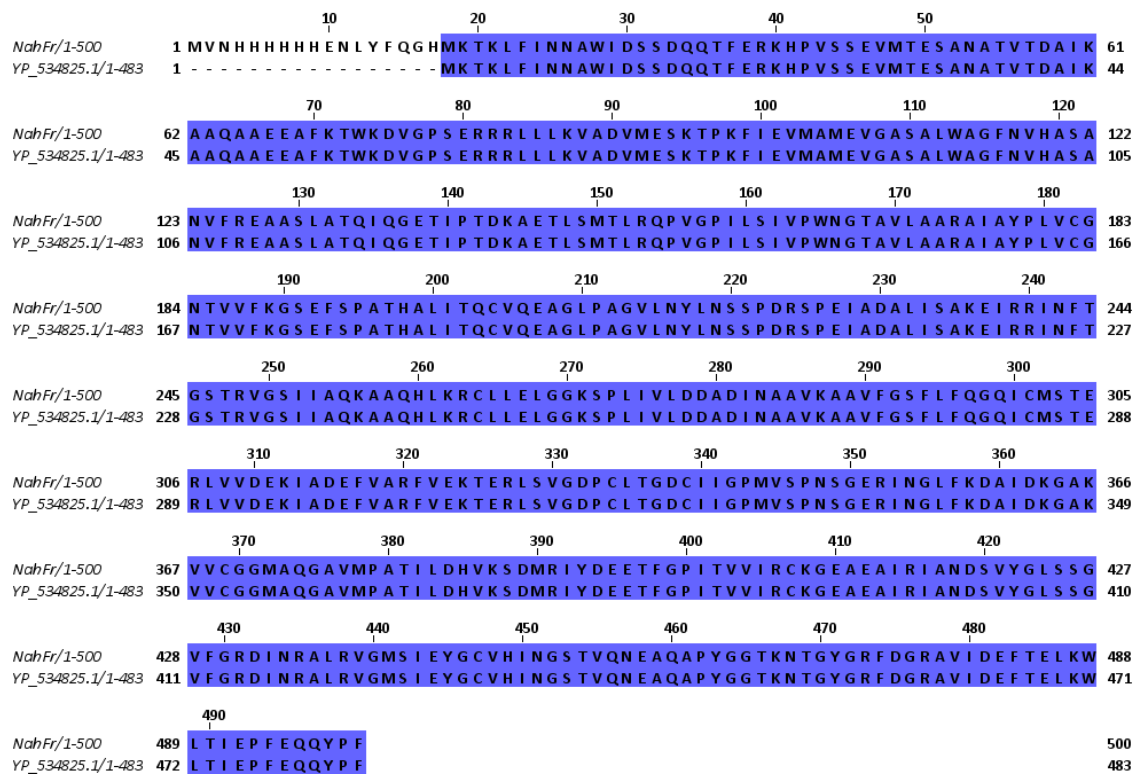
NahFr/1-1500 869 **TCGG**TAG**CTTT**CTATT**CCA**AGG**TCAG**AT**CTGC**AT**GTCCA**CT**GAG**CG**CTTGG**TGG**TTGAT**GAG 930
Região/1-1452 821 **TCGG**TAG**CTTT**CTATT**CCA**AGG**TCAG**AT**CTGC**AT**GTCCA**CT**GAG**CG**CTTGG**TGG**TTGAT**GAG 882
Consensus
TCGGTAG**CTTT**CTATT**CCA**AGG**TCAG**AT**CTGC**AT**GTCCA**CT**GAG**CG**CTTGG**TGG**TTGAT**GAG
TCGGT**AGCTTT**CTATT**CCA**AGG**TCAG**AT**CTGC**AT**GTCCA**CT**GAG**CG**CTTGG**TGG**TTGAT**GAG

NahFr/1-1500 931 **AA**GAT**CG**CG**ACGA**ATTT**GTCG**CT**AGG**TTT**GTCG**AAAA**AACTGA**GC**CTTG**AG**CGTGGG**CGA 992
Região/1-1452 883 **AA**GAT**CG**CG**ACGA**ATTT**GTCG**CT**AGG**TTT**GTCG**AAAA**AACTGA**GC**CTTG**AG**CGTGGG**CGA 944
Consensus
AAGAT**CG**CG**ACGA**ATTT**GTCG**CT**AGG**TTT**GTCG**AAAA**AACTGA**GC**CTTG**AG**CGTGGG**CGA
AAGAT**CG**CG**ACGA**ATTT**GTCG**CT**AGG**TTT**GTCG**AAAA**AACTGA**GC**CTTG**AG**CGTGGG**CGA

<i>NahFr/1-1500</i>	993	CCC GTG CCT AACTGGCGACTGCATCATCGGCCCGATGGTCTCGCCAAATTCGGGCGAGCGGA	1054
<i>Região/1-1452</i>	945	CCC GTG CCT AACTGGCGACTGCATCATCGGCCCGATGGTCTCGCCAAATTCGGGCGAGCGGA	1006
Consensus		CCC GTG CCT AACTGGCGACTGCATCATCGGCCCGATGGTCTCGCCAAATTCGGGCGAGCGGA CCC GTG CCT AACTGGCGACTGCATCATCGGCCCGATGGTCTCGCCAAATTCGGGCGAGCGGA	
<i>NahFr/1-1500</i>	1055	TCAATGGTTTGTTC AAGGACGCGATAGATAAAGGGGCCAAAGTTGTTTTCGGCGGCATGGCC	1116
<i>Região/1-1452</i>	1007	TCAATGGTTTGTTC AAGGACGCGATAGATAAAGGGGCCAAAGTTGTTTTCGGCGGCATGGCC	1068
Consensus		TCAATGGTTTGTTC AAGGACGCGATAGATAAAGGGGCCAAAGTTGTTTTCGGCGGCATGGCC TCAATGGTTTGTTC AAGGACGCGATAGATAAAGGGGCCAAAGTTGTTTTCGGCGGCATGGCC	
<i>NahFr/1-1500</i>	1117	CAGGGTGC GGTCATGCCGGCCACGATCCTGGATCACGTC AAATCTGACATGCGGATCTACGA	1178
<i>Região/1-1452</i>	1069	CAGGGTGC GGTCATGCCGGCCACGATCCTGGATCACGTC AAATCTGACATGCGGATCTACGA	1130
Consensus		CAGGGTGC GGTCATGCCGGCCACGATCCTGGATCACGTC AAATCTGACATGCGGATCTACGA CAGGGTGC GGTCATGCCGGCCACGATCCTGGATCACGTC AAATCTGACATGCGGATCTACGA	
<i>NahFr/1-1500</i>	1179	TGAGGAGACCTTTGGTCCCATCACCGTGGTGATCCGTTGCAAAGGCGAAGCAGAGGCCATCC	1240
<i>Região/1-1452</i>	1131	TGAGGAGACCTTTGGTCCCATCACCGTGGTGATCCGTTGCAAAGGCGAAGCAGAGGCCATCC	1192
Consensus		TGAGGAGACCTTTGGTCCCATCACCGTGGTGATCCGTTGCAAAGGCGAAGCAGAGGCCATCC TGAGGAGACCTTTGGTCCCATCACCGTGGTGATCCGTTGCAAAGGCGAAGCAGAGGCCATCC	
<i>NahFr/1-1500</i>	1241	GCAATTGCCAACGACAGCGTTTATGGTCTGTCTGTCGGGCGTGTTTGGCCGCGACATCAACCGT	1302
<i>Região/1-1452</i>	1193	GCAATTGCCAACGACAGCGTTTATGGTCTGTCTGTCGGGCGTGTTTGGCCGCGACATCAACCGT	1254
Consensus		GCAATTGCCAACGACAGCGTTTATGGTCTGTCTGTCGGGCGTGTTTGGCCGCGACATCAACCGT GCAATTGCCAACGACAGCGTTTATGGTCTGTCTGTCGGGCGTGTTTGGCCGCGACATCAACCGT	
<i>NahFr/1-1500</i>	1303	GCTCTGCGAGTGGGTATGTCCATCGAATATGGTTGCGTACACATCAACGGCTCGACCGTCCA	1364
<i>Região/1-1452</i>	1255	GCTCTGCGAGTGGGTATGTCCATCGAATATGGTTGCGTACACATCAACGGCTCGACCGTCCA	1316
Consensus		GCTCTGCGAGTGGGTATGTCCATCGAATATGGTTGCGTACACATCAACGGCTCGACCGTCCA GCTCTGCGAGTGGGTATGTCCATCGAATATGGTTGCGTACACATCAACGGCTCGACCGTCCA	
<i>NahFr/1-1500</i>	1365	GAAACGAGGCGCAGGCTCCTTACGGAGGTACCAAGAACAACCGGCTACGGGCGCTTCGACGGCC	1426
<i>Região/1-1452</i>	1317	GAAACGAGGCGCAGGCTCCTTACGGAGGTACCAAGAACAACCGGCTACGGGCGCTTCGACGGCC	1378
Consensus		GAAACGAGGCGCAGGCTCCTTACGGAGGTACCAAGAACAACCGGCTACGGGCGCTTCGACGGCC GAAACGAGGCGCAGGCTCCTTACGGAGGTACCAAGAACAACCGGCTACGGGCGCTTCGACGGCC	
<i>NahFr/1-1500</i>	1427	GTGCCGTGATCGACGAGTTCACAGAGCTCAAGTGGCTGACCATTGAACCATTCGAGCAGCAA	1488
<i>Região/1-1452</i>	1379	GTGCCGTGATCGACGAGTTCACAGAGCTCAAGTGGCTGACCATTGAACCATTCGAGCAGCAA	1440
Consensus		GTGCCGTGATCGACGAGTTCACAGAGCTCAAGTGGCTGACCATTGAACCATTCGAGCAGCAA GTGCCGTGATCGACGAGTTCACAGAGCTCAAGTGGCTGACCATTGAACCATTCGAGCAGCAA	
<i>NahFr/1-1500</i>	1489	TATCCCTTCTGA	1500
<i>Região/1-1452</i>	1441	TATCCCTTCTGA	1452
Consensus		TATCCCTTCTGA TATCCCTTCTGA	

2- Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína NahF sequenciada nesse trabalho (NahFr) e aquela que apresentou maior similaridade em pesquisa no BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>): Acesso YP_534825.1, salicilaldeído desidrogenase, NahF, de *Pseudomonas putida*.

O alinhamento foi realizado no servidor Multalin (Corpet 1988) e visualizado no programa Jalview (Waterhouse et al. 2009). O alinhamento foi colorido de acordo com a porcentagem de identidade entre as sequências, sendo que a quanto maior a identidade entre as sequências, mais escura é a cor aplicada.



Apêndice IV – Artigos publicados durante o período do Doutorado (2009 – 2013)

1. COITINHO, J. B., COSTA, D.M.A., GUIMARAES, S. L., GOES, A. M., NAGEM, R. A. P. Expression, purification and preliminary crystallographic studies of NahF, a salicylaldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida* G7 involved in naphthalene degradation. *Acta Crystallographica. Section F.*, v.68, p.93 - 97, 2012.
2. FERNANDES, V.C., MARTINS, E. M. N., BOELONI, J. N., COITINHO, J. B., SERAKIDES, R., GOES, A. M. Additive Effect of rPb27 Immunization and Chemotherapy in Experimental Paracoccidioidomycosis. *Plos One.*, v.6, p.e17885, 2011.
3. FERNANDES, V.C., COITINHO, J.B., VELOSO, J.M.R., ARAÚJO, S.A., PEDROSO, E.P., GOES, A.M. Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant rPb27 and rPb40 antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Journal of Immunological Methods.*, v.367, p.78 - 84, 2011.
4. FERNANDES, V. C., MARTINS, E. M. N., BOELONI, J. N., COITINHO, J. B., SERAKIDES, R., GOES, A. M. The combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb40 and Pb27 recombinant proteins enhances chemotherapy effects in experimental paracoccidioidomycosis. *Microbes and Infection.* , v.xx, p.1 -11, 2011.