

RESUMO

COSTA, D. M. A. **Clonagem do gene *nahB* de *Pseudomonas putida* G7 e expressão da enzima NahB envolvida na degradação de componente do petróleo para estudos estruturais.** 2010. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Bioquímica e Imunologia. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2010.

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) são compostos orgânicos formados por dois ou mais anéis aromáticos fundidos. A maioria deles é mutagênico e carcinogênico aos homens e animais. Os HAPs são liberados no meio ambiente principalmente por atividades antropogênicas, relacionadas à extração, ao transporte, ao refino, à transformação e ao uso do petróleo e seus derivados. A biorremediação é uma estratégia para a eliminação dos HAPs do meio ambiente, a qual utiliza enzimas ou microorganismos que possuem a capacidade de metabolizar esses compostos e transformá-los em substâncias inertes. O naftaleno é um dos HAPs mais comumente encontrado no ambiente. A degradação do naftaleno por *Pseudomonas sp.* é uma alternativa para a remediação de ambientes com esse poluente. Em *Pseudomonas putida* G7, os genes catabólicos são organizados em dois óperons no plasmídeo NAH7: um deles codifica as enzimas da via superior envolvidas na conversão do naftaleno a salicilato, o segundo codifica as enzimas da via inferior envolvidas na conversão do salicilato a intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico. O gene *nahB* é responsável pela codificação da proteína cis-1,2-dihidro-1,2-dihidroinaftaleno-1,2-desidrogenase (NahB), a qual é a segunda enzima da via superior. Nesse trabalho foi feita a clonagem do gene *nahB* em vetor pCR[®]2.1-TOPO e a subclonagem nos vetores de expressão pET-28a-GST-TEV e pET-28a-TEV. A expressão heteróloga da enzima NahB foi feita em Rosetta[™] (DE3) e ArticExpress[™] (DE3). O vetor de expressão pET-28a-GST-TEV-NahB, responsável pela codificação da enzima GST-NahB, foi sequenciado e a proteína recombinante está correta. Esta foi expressa na fração solúvel a baixas temperaturas, em Rosetta[™] (DE3) a 20°C e em ArticExpress[™] (DE3) a 12°C. A purificação foi feita por cromatografia de afinidade e cromatografia de troca aniônica. Após a purificação, foi realizada a clivagem com a protease TEV. A proteína NahB proveniente da GST-NahB, permanece com três resíduos de aminoácidos além da sequência nativa e foi denominada GGS-NahB. A massa molecular dessa enzima recombinante foi determinada por espectrometria de massa e o valor foi bem próximo do teórico. Características estruturais da enzima GGS-NahB foram determinadas por Espalhamento Dinâmico da Luz e por Dicroísmo

Circular. Pelo DLS, verificou-se que a proteína apresenta-se monodispersa e na forma tetramérica em solução. Os experimentos de CD evidenciaram uma enzima com aproximadamente 25% de α -hélice, 30% de fita- β paralela e antiparalela, 15 % de volta beta e 40% de estrutura randômica. Novas purificações estão sendo conduzidas para a realização de ensaios de cristalização. O vetor de expressão pET-28a-TEV-NahB, também foi seqüenciado e a proteína recombinante His-NahB apresenta, após a clivagem com a protease TEV, ao invés de dois resíduos de aminoácidos além da sequência nativa, 21 resíduos. O gene *nahB* será, novamente, subclonado no vetor pET-28a-TEV para expressão da enzima His-NahB.

Palavras chave: *Pseudomonas*, biorremediação, naftaleno.

Suporte financeiro: CAPES e FAPEMIG.