

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO
PRETO

**Clorocatecol 1,2-dioxigenase e Proteína Ligante de Acil-CoA:
caracterização estrutural e interações com ligantes**

Mariana Chaves Micheletto

Ribeirão Preto

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO

Clorocatecol 1,2-dioxigenase e Proteína Ligante de Acil-CoA:
caracterização estrutural e interações com ligantes

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Física aplicada a medicina e biologia para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biofísica Molecular

Orientanda: Mariana Chaves Micheletto

Orientador: Prof. Dr. Antonio José da Costa Filho

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Física Aplicada a Medicina e Biologia em 30/09/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

Ribeirão Preto

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha Catalográfica

Michelatto, Mariana Chaves

Clorocatecol 1,2-dioxigenase e Proteína Ligante de Acil-CoA: caracterização estrutural e interações com ligantes, Ribeirão Preto, 2016. 122 p.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biofísica Molecular

Orientador: Costa Filho, Antonio José.

1. clorocatecol 1,2-dioxigenase. 2.Biorremediação. 3.membranas biológicas. 4.proteína ligante de acil-CoA. 5.*Cryptococcus neoformans*.

Ficha de Aprovação

Mariana Chaves Micheletto

Clorocatecol 1,2-dioxigenase e Proteína Ligante de Acil-CoA: caracterização estrutural e interações com ligantes

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Física aplicada a medicina e biologia para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Comissão Julgadora

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura: _____

Dedico este trabalho a todas as mulheres da minha família, que são os maiores exemplos de força, fé e resiliência. Em especial minha mãe, Rozalina, e minha avó, Nilza.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos que contribuíram com a realização deste projeto, em especial ao Jabah, meu orientador, pela confiança e oportunidade de trabalhar ao seu lado desde a iniciação científica, pela paciência e dedicação à minha formação profissional e por todas as lições de vida que tive no seu convívio.

Aos meus pais por todos os sacrifícios que fizeram, sempre priorizando pela educação dos filhos, e por todos os ensinamentos ao longo da minha vida que possibilitaram as minhas conquistas.

À minha família por ser sempre um recanto onde posso recuperar forças quando preciso.

Aos meus irmãos, meus melhores amigos, por todo apoio e cumplicidade,

e a todas as outras amizades das quais a vida me presenteou, àquelas antigas que prevalecem ao distanciamento do tempo e se tornam melhores tanto quanto envelhecem. E àquelas amizades mais recentes, que acompanharam de perto as minhas dificuldades, se tornando meus anjos da guarda que me vigiaram ao longo do caminho e tiveram a paciência de conviver comigo no dia-a-dia.

Aos meninos da X turma que caminharam comigo nessa jornada, enfrentando desafios semelhantes. Não teria ido tão longe não fosse a consideração e o exemplo de vocês.

Aos meus amigos de laboratório, Assuero, Felipe, mTar, Paty, Natasha, Rafa, e a todo que estão e já passaram pelo grupo do Laboratório de Biofísica Molecular e contribuíram com a minha jornada científica, com ensinamentos, discussões e até broncas, mas também no âmbito pessoal, com incentivo, paciência e cumplicidade.

Ao Felipe novamente, pelo companheirismo, pela atenção especial que dignificou o meu trabalho e a minha vida e por estar sempre presente, e não me deixar desistir.

A todo o grupo da Biofísica em São Carlos, destaque para o mTar, que disponibilizou recursos para o nosso desfrute, o que permitiu em muito o engrandecimento deste projeto, e a todos os outros grupos dos quais fizemos colaborações.

À faculdade de Filosofia ciências e Letras de Ribeirão Preto.

E, por fim, às agências financiadoras tão fundamentais para o desenvolvimento deste projeto, CAPES, CNPq, FAPESP e Mãe.

“Vai ficar bonito =)”

Luis Felipe Santos Mendes

Resumo

MICHELETTO, M. C. **Clorocatecol 1,2-dioxigenase e Proteína Ligante de Acil-CoA: caracterização estrutural e interações com ligantes.** 2016. 126p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Neste trabalho foi utilizado um esquema multi-técnicas para estudar a base de interações moleculares protagonizadas por duas proteínas que possuem funções biológicas completamente distintas. A primeira delas, clorocatecol 1,2-dioxigenase (Pp 1,2-CCD), tem um apelo biotecnológico para área ambiental devido a sua capacidade de catalisar a degradação do composto clorocatecol, um intermediário comum no final da decomposição de diversos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Essa característica pode promover a descontaminação de solos e águas poluídos revelando um grande potencial para aplicações em mecanismos de biorremediação. Além disso, a presença de moléculas anfipáticas junto à interface de ligação dos monômeros da CCD levantou a questão em relação à capacidade dessa família de enzimas de se ligar a membranas biológicas. Esse tipo de informação amplia o conhecimento acerca de mecanismos básicos de ação da enzima, aumentando a possibilidade de parceiros de interação, podendo levar a outras formas de controle da atividade biológica para uso em aplicações biotecnológicas como desenvolvimento de biossensores. O estudo dessa enzima está, portanto, voltado para a compreensão de suas interações com miméticos de membrana e a tentativas de imobilização da proteína nestas estruturas. Para isto, fazemos uso de técnicas biofísicas como dicroísmo circular, calorimetria diferencial de varredura e espectroscopias ópticas, e biomoleculares como desenvolvimento de oligonucleotídeos, reações de cadeia polimerase e análise de restrição. A outra vertente desta dissertação, tem como foco de estudo a proteína ligante de acil-CoA de *Cryptococcus neoformans* (CnACBP) clonada pela primeira vez em nosso laboratório. Homólogos de ACBP foram encontrados em todos os organismos distribuídos nos quatro reinos eucariotos, com alta similaridade sequencial (~48%). A sua presença ao longo dos reinos e seu envolvimento em diversos mecanismos metabólicos essenciais relacionados ao éster acil-CoA levaram à conclusão de que se trata de uma *housekeeping protein*, e não uma proteína específica, confinada a um tipo especializado de célula. Este trabalho traz uma caracterização inicial da CnACBP que busca esclarecer questões ainda em aberto e também aprofundar o conhecimento ainda muito vago de como cargas e a presença do ligante podem influenciar estrutura, estabilidade e função através de técnicas termodinâmicas e espectroscópicas antes de um aprofundamento de seu papel no interior da célula e interações com outras proteínas.

Palavras Chave: clorocatecol 1,2-dioxigenase, biorremediação, membranas biológicas, proteína ligante de acil-CoA, *Cryptococcus neoformans*.

Abstract

MICHELETTO, M. C. **Clorocatecol 1,2-dioxigenase e Proteína Ligante de Acil-CoA: caracterização estrutural e interações com ligantes.** 2016. 126p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

In this study, we used a multi technique approach to understand the basic molecular interactions of two proteins that have quite different biological functions. The first, chlorocatechol 1,2-dioxygenase (Pp 1,2-CCD), has an environmental appeal due to its ability to catalyze the degradation of chlorocatechol, a common intermediate in the end of the decomposition of many polycyclic aromatic hydrocarbons. This characteristic of decontaminating polluted soils and waters suggests a great potential for applications in bioremediation mechanisms. Moreover, the presence of amphipathic molecules at the interface of the CCD monomers raised issues related to the ability of this enzyme family of binding to biological membranes. Such information broadens the knowledge of the basic mechanisms of enzyme action, increasing the possibility of interaction partners and may lead to other forms of control of the biological activity for use in biotechnological applications, such as biosensors development. The study of this enzyme is therefore, aimed at understanding their interactions with mimetic membrane and immobilization attempts of the protein in these structures. For this purpose, we make use of biophysical techniques such as circular dichroism, differential scanning calorimetry and optical spectroscopies and biomolecular techniques, such as development of primers, polymerase chain reaction and restriction analysis. The other aspect of this dissertation is focused on the study of acyl-CoA binding protein of *Cryptococcus neoformans* (CnACBP) cloned for first time in our laboratory. Homologues of ACBP were found in all organisms distributed in the four kingdoms of eukaryotes, with high sequence similarity (~ 48%). Its widespread presence and their involvement in several key metabolic pathways related to the acyl-CoA ester led to the conclusion that ACBP is a housekeeping protein and not a specific protein contained in a specialized cell type. Here we present an initial characterization of CnACBP that seeks to relevant issues regarding the protein's function. Our goal was to increase the still vague knowledge on how electrical charges and the presence of the binding partner may influence the structure, stability and function through thermodynamic and spectroscopic techniques. This is an initial step toward the full understanding of the role of protein in the cell.

Keywords: chlorocatechol 1,2-dioxygenase, bioremediation, biological membranes, acyl-CoA binding protein, *Cryptococcus neoformans*.

Lista de figuras

FIGURA 1: ESTRUTURAS QUÍMICAS DE ALGUNS HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS. FONTE: HTTPS://LOOKFORDIAGNOSIS.COM.	26
FIGURA 2: MODELO DE CLIVAGEM INTRADIOL (A) E EXTRADIOL (B) DO SUBSTRATO CATECOL POR ENZIMAS DIOXIGENASES. FONTE: ADAPTADA DA REFERÊNCIA	29
FIGURA 3: ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DA Pp 1,2 CCD (PDB: 3TH1), MOSTRANDO AS DUAS SUBUNIDADES QUE FORMAM O DÍMERO FUNCIONAL. AS ESFERAS ROSAS REPRESENTAM OS ÍONS Fe^{3+} PRESENTES NOS SÍTIOS ATIVOS. NA REGIÃO CENTRAL DE HÉLICES, ESTÃO REPRESENTADAS AS MOLÉCULAS DE FOSFOLIPÍDIOS EM VERMELHO. FONTE: IMAGEM ADAPTADA DA REFERÊNCIA 27.	31
FIGURA 4: SÍTIO DE LIGAÇÃO DO Fe^{3+} EM UMA ESTRUTURA BIPIRAMIDAL TRIGONAL. FONTE: REFERÊNCIA 20. ... 32	
FIGURA 5: ESQUEMA DE ALINHAMENTO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA FORMAR A SEQUÊNCIA GÊNICA DA HÉLICE AO FINAL DO DNA QUE CODIFICA A ENZIMA Pp 1,2-CCD. AS SETAS INDICAM A DIREÇÃO DO OLIGONUCLEOTÍDEO DO 5' PARA O 3'. FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.	35
FIGURA 6: RESULTADO DA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Pp 1,2-CCD VISUALISADO EM ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA. COLUNA 1 – MARCADOR DE MASSA MOLECULAR. COLUNA 2 E 3 – VAZIAS. COLUNA 4 – ELUIÇÃO EM TAMPÃO WASH1. COLUNA 5 – ELUIÇÃO EM TAMPÃO ELUTION. COLUNA 6 – ELUIÇÃO COM IMIDAZOL 1 M. COLUNA 7 – ELUIÇÃO EM TAMPÃO DIA APÓS CLIVAGEM COM ULP-1 E DIÁLISE POR 16 H. A BANDA DE PROTEÍNA UTILIZADA ESTÁ DESTACADA NO RETÂNGULO AMARELO. FONTE: ELABORADA PELA AUTORA	44
FIGURA 7: PERFIL DE ELUIÇÃO DA PROTEÍNA Pp 1,2-CCD NA COLUNA SUPERDEX 200 (10/300) EQUILIBRADA COM TAMPÃO DIA. FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.	45
FIGURA 8: ESPECTRO DE CD NO UV DISTANTE DA ENZIMA Pp 1,2-CCD. FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.	46
FIGURA 9: RESULTADO TÍPICO PARA O ENSAIO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA Pp 1,2-CCD ATRAVÉS DO MONITORAMENTO DA ABSORÇÃO EM 260 NM DEVIDO À FORMAÇÃO DE ÁCIDO CIS,CIS-MUCÔNICO A PARTIR DE 200 μM DO SUBSTRATO 4-CLOROCATECOL. FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.	48
FIGURA 10: CURVA CINÉTICA DA CATÁLISE DO 4-CLOROCATECOL EM ÁCIDO CIS,CIS-MICÔNICO REALIZADA PELA ENZIMA Pp 1,2-CCD. O AJUSTE DA CURVA FOI FEITO SEGUINDO-SE MODELO DE INIBIÇÃO, JÁ CONHECIDO PARA A Pp 1,2-CCD, UTILIZANDO-SE O PROGRAMA GRAPHPAD PRISM 6. FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.	49
FIGURA 11: ESPECTROS DE CD DA ENZIMA Pp 1,2-CCD NA REGIÃO DO UV DISTANTE NA PRESENÇA DOS LIPOSSOMOS COMPOSTOS UNICAMENTE DE A) POPC, B) POPG E C) MISTOS DE POPC/POPG (5/1) NOS TEMPOS DE INCUBAÇÃO DE 30 MINUTOS E 16 HORAS. A RAZÃO ENZIMA/FOSFOLIPÍDIO FOI MANTIDA EM 1/20. FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.	50
FIGURA 12: TERMOGRAMA DE DESNATURAÇÃO TÉRMICA DE 24 μM DE Pp 1,2-CCD NA PRESENÇA DE VESÍCULAS GRANDES DE POPC/POPG 5:1 MOL/MOL. A RAZÃO ENZIMA/LIPÍDIO É 1:20. FONTE: ELABORADA PELA AUTORA	52
FIGURA 13: ENSAIO COMPARATIVO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA Pp 1,2-CCD NA PRESENÇA DE LIPOSSOMOS DE POPC E POPG ATRAVÉS DO MONITORAMENTO DA ABSORÇÃO EM 260 NM DEVIDO À FORMAÇÃO DE ÁCIDO CIS,CIS- MUCÔNICO. FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.	53
FIGURA 14: DIAGRAMA DA PROJEÇÃO CIRCULAR DA HÉLICE FORMADA PELO PEPTÍDEO H AO LONGO DE SEU EIXO LONGITUDINAL NO SENTIDO N > C-TERMINAL. OS RESÍDUOS POLARES ESTÃO REPRESENTADOS EM CÍRCULOS NUMA GRADAÇÃO DE CORES INDO DO VERMELHO AO AMARELO, SENDO OS VERMELHOS OS MAIS POLARES E OS AMARELOS MENOS; OS RESÍDUOS HIDROFÓBICOS ESTÃO REPRESENTADOS NOS PARALELOGRAMOS; AQUELES POTENCIALMENTE CARREGADOS NEGATIVAMENTE SÃO OS TRIÂNGULOS E OS POTENCIALMENTE POSITIVOS SÃO OS PENTÁGONOS. O DIAGRAMA FOI CALCULADO PELO PROGRAMA HELICAL WHEEL PROJECTIONS, DISPONÍVEL NO SERVIDOR HTTP://RZLAB.UCR.EDU/SCRIPTS/WHEEL/WHEEL.CGI.	54

FIGURA 15: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1 % DO DNA RESULTANTE DA AMPLIFICAÇÃO DO GENE CODIFICANTE DA PROTEÍNA CCD-H. A PRIMEIRA COLUNA CORRESPONDE AO PADRÃO EM PARES DE BASES GENE RULER 1 KB DNA LADDER (PROMEGA), E AS COLUNAS SEGUINTE SÃO OS RESULTADOS DE REAÇÕES REALIZADAS EM DIFERENTES TUBOS DE ENSAIO. A CAIXA VERMELHA DESTACA AS BANDAS QUE FORAM SELECIONADAS PARA POSTERIOR PURIFICAÇÃO E EXTENSÃO. FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.	55
FIGURA 16: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1 % DO DNA RESULTANTE DA REAÇÃO DE EXTENSÃO DO GENE CODIFICANTE DA ENZIMA CCD-H. A PRIMEIRA COLUNA CORRESPONDE AO PADRÃO EM PARES DE BASES GENE RULER 1 KB DNA LADDER (PROMEGA) E AS DUAS COLUNAS CONSECUTIVAS SÃO OS RESULTADOS DE REAÇÕES DE EXTENSÃO. FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.	55
FIGURA 17: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1 % DO PRODUTO RESULTANTE DA DIGESTÃO DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE, pGEM-T, COM AS ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO EcoI e XhoI. A PRIMEIRA COLUNA CORRESPONDE AO PADRÃO EM PARES DE BASES GENE RULER 1 KB DNA LADDER (PROMEGA). A CAIXA VERMELHA DESTACA A SEQUÊNCIA GÊNICA DO INSERTO E AS BANDAS SUPERIORES CORRESPONDEM AO PLASMÍDEO LINEARIZADO. FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.	56
FIGURA 18: RESULTADO DA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA CCD-H EXPRESSA EM PÉT 28A, VERIFICADO EM ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA. COLUNA 1 – MARCADOR DE MASSA MOLECULAR. COLUNA 2 – PADRÃO DE CORRIDA DA Pp 1,2-CCD (DESTACADO NA CAIXA AMARELA). COLUNA 3 – FRAÇÃO NÃO LIGADA NA COLUNA DE NÍQUEL. COLUNA 4 – ELUIÇÃO EM TAMPÃO LISE. COLUNA 5 – ELUIÇÃO EM TAMPÃO WASH COM 10 mM DE IMIDAZOL. COLUNA 6 – ELUIÇÃO EM TAMPÃO WASH COM 60 mM DE IMIDAZOL. COLUNA 7 – ELUIÇÃO EM TAMPÃO ELUTION, FRAÇÃO DE CCD-H DESTACADA NA CAIXA AMARELA. COLUNA 8 – ELUIÇÃO EM 1 M DE IMIDAZOL. FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.	57
FIGURA 19: PERFIL DE ELUIÇÃO DA PROTEÍNA CCD-H NA COLUNA SUPERDEX 200 (10/300) EQUILIBRADA COM TAMPÃO DIA. FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.	58
FIGURA 20: COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS DE CD DAS PROTEÍNAS Pp 1,2-CCD (PRETO) E CCD-H (VERMELHO) NA REGIÃO DO UV DISTANTE. FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.	59
FIGURA 21: TERMOGRAMA DAS DESNATURAÇÕES TÉRMICAS DE 24 µM DE Pp 1,2-CCD E DE CCD-H. FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.	59
FIGURA 22: CURVA CINÉTICA DA CATÁLISE DO 4-CLOROCATECOL EM ÁCIDO CIS,CIS-MICÔNICO REALIZADA PELAS ENZIMAS Pp 1,2-CCD (PRETO) E CCD-H (VERMELHO). O AJUSTE DA CURVA FOI FEITO SEGUINDO MODELO DE INIBIÇÃO, JÁ CONHECIDO PARA A Pp 1,2-CCD, UTILIZANDO O PROGRAMA GRAPHPAD PRISM 6. FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.	61
FIGURA 23: ESPECTROS DE CD DA ENZIMA CCD-H NA REGIÃO U.V. DISTANTE NA PRESENÇA DOS LIPOSSOMOS COMPOSTOS UNICAMENTE DE A) POPC, B) POPG E C) MISTOS DE POPC/POPG (5/1) NOS TEMPOS DE INCUBAÇÃO DE 30 MINUTOS E 16 HORAS. A RAZÃO ENZIMA/FOSFOLIPÍDIO FOI MANTIDA EM 1/20. FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.	62
FIGURA 24: TERMOGRAMA DE DESNATURAÇÃO TÉRMICA DE 24 µM DE CCD-H NA PRESENÇA DE VESÍCULAS GRANDES UNILAMELARES DE POPC/POPG 5:1 MOL/MOL. A RAZÃO ENZIMA/LIPÍDIO É 1:20. FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.	63
FIGURA 25: PERFIS DE FLUORESCÊNCIA DO NBD-PE ASSOCIADO ÀS COMPOSIÇÕES DE VESÍCULA: A) POPC, B) POPG E C) POPC/POPG, ANTES Q APÓS A INCUBAÇÃO COM AS ENZIMAS Pp 1,2-CCD E CCD-H NAS RAZÕES FOSFOLIPÍDIO/PROTEÍNA 20:1 E 50:1 MOL/MOL. FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.	64
FIGURA 26: ESTRUTURA QUÍMICA DO PALMITOIL-CoA, UM ÉSTER DE ACIL-CoA COM DEZESEIS CARBONOS NA CADEIA ACILA. FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.	68
FIGURA 27: ALINHAMENTO MÚLTIPLO ENTRE ACBPs DE DIVERSOS ORGANISMOS. OS DIFERENTES BOXES SEPARAM REGIÕES DE ALTA CONSERVAÇÃO, EM QUE AS PROPRIEDADES SÃO MANTIDAS MESMO ALGUM RESÍDUO TENHA SIDO MUTADO. EM VERMELHO, OS RESÍDUOS QUE SÃO CONSERVADOS PARA TODAS AS ESPÉCIES.	70
FIGURA 28: A) REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA TERCIÁRIA DA ACBP BOVINA (PDB 2ABD). EM AZUL ESCURO ESTÁ DESTACADO O N-TERMINAL DA PROTEÍNA, EM AZUL ANIL AS HÉLICE A1, EM VERDE ÁGUA A HÉLICE A2, EM VERDE CLARO A HÉLICE A3, EM LARANJA A HÉLICE A4 E EM VERMELHO O C-TERMINAL. B) REPRESENTAÇÃO DAS SEIS INTERFACES HÉLICE-HÉLICE NORMALMENTE ENCONTRADAS EM ESTRUTURAS DE	

QUATRO HÉLICES. C) REPRESENTAÇÃO DAS QUATRO INTERFACES HÉLICE-HÉLICE ENCONTRADAS EM ACBPs. FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.....	72
FIGURA 29: REPRESENTAÇÕES DA ESTRUTURA DA ACBP BOVINA LIGADA AO PALMITOIL-COÁ EM DUAS PERSPECTIVAS DIFERENTES. O PALMITOIL-COÁ ESTÁ REPRESENTADO EM ROSA – GRUPAMENTO COENZIMA A EM ROSA CLARO E CADEIA HIDROFÓBIA EM PINK – E AS CORES DE CADA HÉLICE SÃO PRESERVADOS. À DIREITA ESTÃO DESTACADOS OS RESÍDUOS IMPORTANTES PARA A LIGAÇÃO (PDB 1ACA). FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.	73
FIGURA 30: REPRESENTAÇÃO DO MODELO DIMÉRICO DE LIGAÇÃO DO MIRISTOIL-COÁ NA ACBP DE FIGADO HUMANO (PDB 2CB8). FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.....	74
FIGURA 31: RESULTADO DA PURIFICAÇÃO DE CNACBP VISUALIZADO POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA APÓS AS DIFERENTES ETAPAS DE PURIFICAÇÃO. COLUNA 1 – MARCADOR DE MASSA MOLECULAR. COLUNA 2 – FRAÇÃO INSOLÚVEL. COLUNA 3 – FRAÇÃO SOLÚVEL. COLUNA 4 – FRAÇÃO NÃO LIGADA NA COLUNA DE NÍQUEL. COLUNA 5 – ELUIÇÃO EM TAMPÃO LISE. COLUNA 6 – ELUIÇÃO EM TAMPÃO WASH COM 10 mM DE IMIDAZOL. COLUNA 7 – ELUIÇÃO EM TAMPÃO WASH COM 50 mM DE IMIDAZOL. COLUNA 8 – ELUIÇÃO EM TAMPÃO ELUTION. COLUNA 9 – ELUIÇÃO EM 1 M DE IMIDAZOL. COLUNA 10 – AMOSTRA APÓS A CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR EM SUPEDEX 75 (10/300) E UTILIZADA PARA REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS. FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.....	85
FIGURA 32: ESPECTRO DE SRCD (LINHA PRETA) DA CNACBP E SUA RESPECTIVA DESCONVOLUÇÃO (LINHA VERMELHA). FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.	87
FIGURA 33: PERFIL CROMATOGRÁFICO DA CNACBP EM CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO MOLECULAR UTILIZANDO A COLUNA SUPERDEX 75 (10/300). FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.	88
FIGURA 34: REGRESSÃO LINEAR PARA A DETERMINAÇÃO DA FUNÇÃO QUE CORRELACIONA MASSA MOLECULAR E VOLUME DE ELUIÇÃO DOS MARCADORES MOLECULAR APLICADOS: CONALBUMINA (C), OVALBUMINA (O), ANIDRASE CARBÔNICA (CA), RIBONUCLEASE A (R) E APROTININA (APR) NA COLUNA SUPERDEX 75 (10/300). FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.....	89
FIGURA 35: COMPARAÇÃO ENTRE OS PERFIS DE ELUIÇÃO DA CNACBP NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DO LIGANTE OLEOIL-COÁ UTILIZANDO A COLUNA SUPERDEX 75 (10/300). FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.....	91
FIGURA 36: DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE EXTINÇÃO MOLAR EM 465 NM PARA O NBD-PALMITOIL-COÁ ATRAVÉS DE ENSAIO DE ABSORÇÃO ÓPTICA. FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.....	92
FIGURA 37: PERFIL DE ELUIÇÃO DA CNACBP MONITORANDO ABSORÇÃO EM 280 NM E DO NBD-PALMITOIL-COÁ MONITORANDO ABSORÇÃO EM 465 NM UTILIZANDO A COLUNA SUPERDEX 75 (10/300). FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.	93
FIGURA 38: ESPECTROS DE SRCD DA CNACBP. EM PRETO, ESTÁ REPRESENTADO O ESPECTRO DA PROTEÍNA ISOLADA E, EM VERMELHO, O ESPECTRO DA PROTEÍNA NA PRESENÇA DO LIGANTE OLEOIL-COÁ. FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.	94
FIGURA 39: DESNATURAÇÃO TÉRMICA DA PROTEÍNA CNACBP MONITORADA POR CD NA REGIÃO DO UV DISTANTE EM UM INTERVALO DE 15 °C A 95 °C. A) APO CNACBP B) CNACBP LIGADA AO OLEOIL-COÁ. AS SETAS INDICAM O AUMENTO DE TEMPERATURA. FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.	95
FIGURA 40: VARIAÇÃO DA FRAÇÃO DE PROTEÍNA DESENOVELADA (F _D) EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA ATRAVÉS DO MONITORAMENTO DA INTENSIDADE DA BANDA EM 222 NM NOS RESPECTIVOS ESPECTROS DE CD. FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.	96
FIGURA 41: DESNATURAÇÃO QUÍMICA DA PROTEÍNA CNACBP MONITORADA POR CD NA REGIÃO DO UV DISTANTE EM UM INTERVALO DE 0 M A 10,5 M DE UREIA. A) APO CNACBP B) CNACBP LIGADA AO OLEOIL-COÁ. FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.....	96
FIGURA 42: VARIAÇÃO DA FRAÇÃO DE PROTEÍNA DESENOVELADA (F _D) ATRAVÉS DO MONITORAMENTO DA BANDA EM 222 NM PARA CONCENTRAÇÕES DE UREIA VARIANDO DE 0 A 10,5 M. FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.	97
FIGURA 43: TERMOGRAMA DE DSC ILUSTRANDO O EFEITO DO LIGANTE DO OLEOIL-COÁ NA ESTABILIDADE TÉRMICA DA PROTEÍNA CNACBP. FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.	99
FIGURA 44: ESPECTROS DA CNACBP NA PRESENÇA DOS DETERGENTES SDS, DOTADO DE CARGA NEGATIVA, CTAB, DOTADO DE CARGA POSITIVA E CHAPSO, SEM CARGA. A) OS DETERGENTES SE ENCONTRAM NA	

CONCENTRAÇÃO 12, 4 μ M (1,5 VEZES A CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA); B) OS DETERGENTES SE ENCONTRAM NA CONCENTRAÇÃO DE 1 mM; C) A CONCENTRAÇÃO DE CADA DETERGENTE É DE 10 mM E D) COMPARAÇÃO ENTRE O EFEITO DO SDS PARA CADA CONCENTRAÇÃO EXPERIMENTADA. FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.	103
.....	
FIGURA 45: ESPECTROS DE CD DA PROTEÍNA CNACBP NA PRESENÇA DE DIFERENTES MIMÉTICOS DE MEMBRANA E SUAS RESPECTIVAS DESNATURAÇÕES TÉRMICAS. A) E B) EM POPC, C) E D) EM POPG, E) E F) EM POPC/POPG.	104
FIGURA 46: TERMOGRAMA DE DSC ILUSTRANDO OS EFEITOS DOS MIMÉTICOS DE MEMBRANA POPC, POPG E POPC/POPG NA PROTEÍNA CNACBP. A PROPORÇÃO UTILIZADA FOI DE 20 FOSFOLIPÍDIOS PARA UMA MOLÉCULA DE PROTEÍNA. FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.	105
FIGURA 47: TERMOGRAMAS DE DSC ILUSTRANDO OS EFEITOS DA PROTEÍNA CNACBP NO COMPORTAMENTO TERMOTRÓPICO DAS VESÍCULAS LIPÍDICAS UNILAMELARES DE A) DMPC, B) DMPG E C) DMPC/DMPG (5/1). FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.	108
FIGURA 48: PERFIS DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DO NBD-PE NAS DIFERENTES COMPOSIÇÕES DE FOSFOLIPÍDIOS: A) POPC, B) POPC/POPG E C) POPG, NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE PROTEÍNA COM AS PROPORÇÕES DE 20 E 50 MOLS DE FOSFOLIPÍDIO POR MOL DE CNACBP. FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.	111
.....	
FIGURA 49: ESPECTROS DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DO NBD-PALMITOIL-CoA ASSOCIADO ÀS COMPOSIÇÕES DE VESÍCULA: A) POPC, B) POPC/POPG E C) POPG, ANTES E APÓS A INCUBAÇÃO COM A PROTEÍNA CNACBP. FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.	113

Lista de tabelas

TABELA 1: OLIGONUCLEOTÍDEOS PLANEJADOS PARA A CONSTRUÇÃO DA HÉLICE ANFIPÁTICA NO C-TERMINAL DA Pp 1,2-CCD. AS REGIÕES QUE SE ANELAM ESTÃO DESTACADAS COM CORES SEMELHANTES. AS SIGLAS FW E REV INDICAM A DIREÇÃO FORWARD E REVERSE, RESPECTIVAMENTE. EM VERMELHO, NO PRIMER1 FW, A REGIÃO DE ANELAMENTO COM A SEQUÊNCIA DA ENZIMA; NO PRIMER 4 REV ESTÃO DESTACADOS O STOP CODON EM VERDE E O SÍTIO DE RESTRIÇÃO DA ENZIMA XOH I EM AZUL ESCURO.	35
TABELA 2: COEFICIENTES DE EXTINÇÃO DAS PROTEÍNAS CCD E CCD-H EM COMPRIMENTO DE ONDA 280 NM. ... 40	40
TABELA 3: PARÂMETROS CALCULADOS A PARTIR DO AJUSTE TEÓRICO DA CINÉTICA DE CATÁLISE DA Pp 1,2-CCD POR INIBIÇÃO DO PRODUTO ÁCIDO CIS,CIS-MUCÔNICO.	49
TABELA 4: PARÂMETROS TERMODINÂMICOS CALCULADOS A PARTIR DOS DADOS EXPERIMENTAIS DA DESNATURAÇÃO TÉRMICA DA Pp 1,2-CCD ISOLADA E NA PRESENÇA DE LIPOSSOMOS COMPOSTOS DE POPC/POPG.	51
TABELA 5: PARÂMETROS TERMODINÂMICOS CALCULADOS A PARTIR DOS DADOS EXPERIMENTAIS DA DESNATURAÇÃO TÉRMICA DA CCD-H.	60
TABELA 6: PARÂMETROS CALCULADOS A PARTIR DO AJUSTE TEÓRICO DA CINÉTICA DE CATÁLISE DA CCD-H POR INIBIÇÃO DO PRODUTO ÁCIDO CIS,CIS-MUCÔNICO.	60
TABELA 7: PARÂMETROS TERMODINÂMICOS CALCULADOS A PARTIR DOS DADOS EXPERIMENTAIS DA DESNATURAÇÃO TÉRMICA DA CCD-H NA PRESENÇA DE VESÍCULAS COMPOSTAS DE POPC/POPG (5/1).	62
TABELA 8: COEFICIENTE DE EXTINÇÃO A 280 NM (E_{280}) DA PROTEÍNA CNACBP.	80
TABELA 9: PARÂMETROS TERMODINÂMICOS OBTIDOS DA ANÁLISE DO TERMOGRAMA DE DSC DA TRANSIÇÃO DE FASE DA CNACBP NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO LIGANTE OLEOIL-COA	100
TABELA 10: PARÂMETROS TERMODINÂMICOS OBTIDOS ATRAVÉS DA ANÁLISE DOS DADOS EXPERIMENTAIS DA PROTEÍNA CNACBP NA PRESENÇA DOS MIMÉTICOS DE MEMBRANA POPC, POPG E POPC/POPG UTILIZANDO O MICROCAL ORIGIN SOFTWARE.	106
TABELA 11: PARÂMETROS TERMODINÂMICOS OBTIDOS ATRAVÉS DA ANÁLISE DOS TERMOGRAMAS DE DSC DA TRANSIÇÃO DE FASE DE VESÍCULAS CONSTITUÍDAS PELOS FOSFOLIPÍDIOS DMPC, DMPG, DMPC/DMPG NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DA PROTEÍNA CNACBP.	109

Lista de abreviaturas e siglas

ACBP	Acyl-CoA Binding Protein
ACBD	Acyl-CoA Binding Domains
a.u.	Arbitrary unit
CCD	Enzima Clorocatecol 1,2-dioxigenase
CCD-H	Enzima Clorocatecol 1,2-dioxigenase fusionada com o peptídeo H
CD	Circular dichroism
CMC	Concentração micelar crítica
CnACBP	ACBP do organism <i>Cryptococcus neoformans</i>
CoA	Coenzima A
DBI	Diazepam binding inhibitor
DMPC	1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DMPG	1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(1'- <i>rac</i> -glycerol)
DNA	Desoxyribonucleic acid
DO	Densidade óptica
DSC	Differential scanning calorimetry
FABP	Fatty Acid Binding Protein
GRASP	Golgi reassembly and stacking protein
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
LB	Luria Bertani
LCFA	Long chain fatty acid
LUV	Large unilamellar vesicle
NBD	7-nitrobenzene-2-oxa1,3-diazol-4-il
NBD-PE	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)
PAH	Polycyclic aromatic hydrocarbons

PCDDDB	Protein circular dichroism data bank
PCR	Polymerase chain reaction
PDB	Protein data base
POP	Poluente orgânico persistente
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
POPG	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(1'- <i>rac</i> -glycerol)
Pp 1,2-CCD	CCD do organismo <i>Pseudomonas putida</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
SASA	Solvent accessible surface area
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
SPC2	Sterol Carrier Protein 2
SRCD	Synchrotron radiation circular dichroism
SUMO	Small ubiquitin-related modifier
SUV	Small unilamellar vesicle
Tris	Tris(hidroximetil) aminometano
ULP-1	Ubiquitin-like-specific protease 1
UV	Ultra violeta

Sumário

I. Clorocatecol 1,2-Dioxigenase	25
1 Introdução	26
2 Objetivos	33
3 Materiais e Métodos	34
3.1 Planejamento da hélice anfipática (H) no C-terminal da CCD	34
3.1.1 Planejamento da sequência gênica do peptídeo H.....	34
3.1.2 Construção e propagação do DNA codificante da CCD-H	35
3.1.3 Subclonagem do gene de CCD-H	37
3.2 Proteínas recombinantes	37
3.2.1 Linhagem de <i>Escherichia coli</i> e plasmídeos utilizados para propagação de DNA e expressão proteica	37
3.2.2 Expressão	38
3.2.3 Purificação das proteínas recombinantes.....	38
3.2.4 Eletroforese em condições desnaturantes	40
3.2.5 Determinação da concentração proteica.....	40
3.3 Análise de estrutura e estabilidade	41
3.3.1 Dicroísmo Circular (CD).....	41
3.3.2 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	41
3.4 Medidas de atividade	42
3.4.1 Cinética enzimática da Pp 1,2-CCD e CCD-H.....	42
3.5 Miméticos de membrana	42
3.5.1 Preparação de vesículas.....	42
3.5.2 Medidas de fluorescência	43
4 Resultados e discussões	44
4.1 Pp 1,2-CCD	44
4.1.1 Expressão e purificação da CCD.....	44
4.1.2 Caracterização estrutural da CCD – Estrutura secundária.....	45
4.1.3 Atividade e cinética enzimática da Pp 1,2-CCD	47
4.1.4 Ensaios de interação com miméticos de membrana	49
4.2 CCD-H	53
4.2.1 Montagem de hélice anfipática no C-terminal da Pp 1,2-CCD	53

4.2.2	Expressão e purificação da CCD-H.....	57
4.2.3	Caracterização estrutural da CCD-H – Análise comparativa	58
4.2.4	Cinética enzimática da CCD-H	60
4.2.5	Ensaio de interação com miméticos de membrana	61
5	Conclusão	65
II.	<i>Proteína Ligante de Acil-CoA</i>	67
7	Objetivos	78
8	Materiais e Métodos	79
8.1	Proteínas recombinantes.....	79
8.1.1	Propagação de DNA e expressão proteica.....	79
8.1.2	Expressão	79
8.1.3	Purificação das proteínas recombinantes.....	79
8.1.4	Determinação da concentração proteica	80
8.1.5	Determinação do coeficiente de extinção do NBD-palmitoil-CoA.....	80
8.1.6	Cromatografia de exclusão molecular	81
8.2	Análise de estrutura e estabilidade	81
8.2.1	Dicroísmo Circular (CD).....	81
8.2.2	Dicroísmo circular por radiação síncrotron (SRCD).....	82
8.2.3	Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	82
8.3	Medidas de atividade	83
8.4	Preparo de vesículas.....	83
9	Resultados e discussões	85
9.1	Expressão e Purificação da CnACBP	85
9.2	Caracterização estrutural da CnACBP – Estrutura secundária	86
9.3	Estudos de oligomerização – Estrutura quaternária	87
9.4	Estudo de ligação da CnACBP com éster de acil-CoA	89
9.5	Caracterização da interação proteína–ligante.....	94
9.6	Experimentos de interação com miméticos de membrana biológica	100
9.7	Efeitos da CnACBP no comportamento de vesículas lipídicas.....	107
9.8	Mecanismos de captura do éster de acil-CoA	112
10	Conclusão	114
III.	<i>Bibliografia.....</i>	116

***I. Clorocatecol
1,2-Dioxigenase***

1 Introdução

A decomposição térmica incompleta de moléculas orgânicas em altas temperaturas (500–800 °C), ou a sua exposição a temperaturas relativamente menores (100–300 °C) por um intervalo de tempo prolongado, resulta na produção de compostos aromáticos com dois ou mais anéis de benzeno condensados (**Figura 1**). Tais compostos são chamados hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), que podem também ter alguns átomos de hidrogênio substituídos por halogênios, normalmente cloro ou bromo [1,2]. O acúmulo de PAHs no meio ambiente deve-se não somente à sua formação natural, como no caso de incêndios em pastos e florestas, atividades vulcânicas e secreção de plantas, mas principalmente a atividades antropogênicas como queima de combustíveis fósseis, alcatrão de carvão, incineração de resíduos sólidos e vazamentos de petróleo [3,4]. A contaminação ambiental por PAHs está, geralmente, relacionada à atividade industrial e seu uso como solventes, herbicidas, inseticidas fungicidas e plastificantes [3,5].

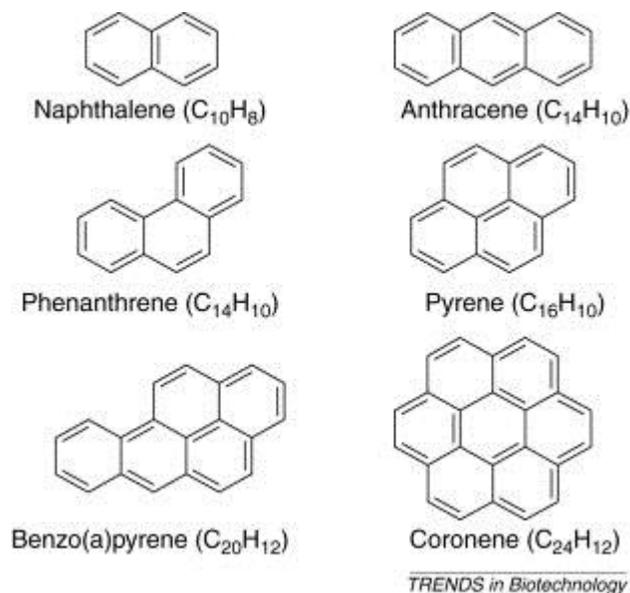


Figura 1: Estruturas químicas de alguns hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Fonte: <https://lookfordiagnosis.com>.

Os compostos PAHs não são facilmente degradados em condições naturais. O aumento da massa molecular dos PAHs contribui para o aumento de seu caráter apolar, levando a uma diminuição gradativa da sua solubilidade em água e também a alterações nas propriedades coligativas da solução. PAHs também são moléculas naturalmente recalcitrantes, o que leva à sua classificação como poluentes orgânicos persistentes (POPs) [1,2,6]. Estão presentes no ar, na água e no solo, sendo, no solo, o aumento mais elevado de sua concentração devido ao processo de sedimentação [3,7]. Em ambientes contaminados, afetam a fauna e a flora, acumulando-se ao longo da cadeia alimentar [8]. Por se tratarem de substâncias lipossolúveis, podem ser absorvidos pela pele, por via oral ou inalação quando em contato com organismos vivos, depositando-se no tecido adiposo e afetando os sistemas reprodutivo, imunológico e endócrino [9,10]. Estudos também mostraram que apresentam atividade carcinogênica [11].

A biorremediação é uma técnica baseada no uso de organismos vivos ou suas enzimas para reduzir ou eliminar produtos químicos tóxicos ou outros resíduos perigosos, que se mostrou eficiente na remoção de PAHs, transformando-os em substâncias inertes: CO₂ e água [2]. Porém, a recalcitrância dos PAHs à biodegradação também aumenta com a sua massa molecular [3]. Dentre os microrganismos capazes de degradar desde compostos aromáticos mais simples como naftaleno, a compostos como benzo(a)pireno (**Figura 1**), estão as bactérias do gênero *Pseudomonas*, que contribuem também na detoxificação por metais pesados acumulando-os no interior das células [3,12].

Pseudomonas spp são bactérias aeróbicas gram-negativas capazes de crescer em meio a uma ampla variedade de substratos orgânicos, encontrada no solo e na água, onde desempenham papéis importantes em processos como decomposição, biodegradação e ciclo do carbono e nitrogênio [13]. A sua capacidade de biorremediação está relacionada a enzimas que transformam

as complexas moléculas de PAHs em compostos intermediários comuns de suas rotas metabólicas para serem usados como uma extensa fonte de carbono e energia [14]. O funil metabólico de degradação dos PAHs se inicia com a oxidação de um dos anéis benzênicos por sistema de enzimas oxigenases, através da incorporação do oxigênio atmosférico, levando à formação de compostos *cis*-diidrodióis. A oxidação do anel inicial é, geralmente, o passo limitante da velocidade da reação de degradação dos PAHs. Em seguida, os *cis*-diidrodióis são rearomatizados por *cis*-diidrodiol desidrogenases para formar derivados de diidroxilato. As oxidações subsequentes levam à formação do intermediário comum, o catecol, ou seus derivados halogenados [3,13]

Os compostos de catecol podem sofrer clivagem extradiol pelas enzimas catecol 2,3-dioxigenases, que se classificam como extradiol proximal quando for rompida a ligação entre os carbonos 2 e 3, ou extradiol distal quando a ruptura acontecer entre os carbonos 1 e 6. Além disto, os compostos ainda podem sofrer clivagem intradiol, entre os carbonos 1 e 2, onde estão ligados os grupos hidroxilas, pelas enzimas catecol 1,2-dioxigenases (**Figura 2**) [15,16]. Estas enzimas catalisam a clivagem do anel aromático através da adição de dois átomos de oxigênio em seu substrato [17]. A clivagem intradiol tem como produto o ácido *cis,cis*-mucônico que quando hidrogenado resulta no ácido adípico, um importante composto industrial utilizado, por exemplo, na produção de nylon-6,6 livre de benzeno [18,19]. A enzima responsável pela fissão do anel aromático do catecol ocupa um papel crucial nos processos de biorremediação e da produção sustentável de ácido adípico e é o foco de estudo deste trabalho.

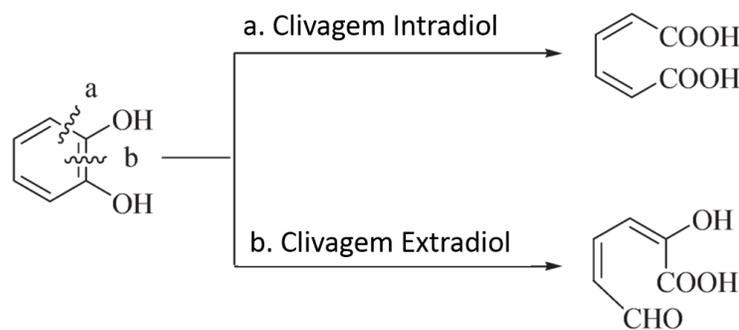


Figura 2: Modelo de clivagem intradiol (a) e extradiol (b) do substrato catecol por enzimas dioxigenases. Fonte: Adaptada da referência 20.

A enzima clorocatecol 1,2-dioxigenase de *Pseudomonas putida* (Pp 1,2-CCD) possui tolerância a uma maior diversidade de substratos que outras dioxigenases como as catecol 1,2-dioxigenase e protocatecuato 3,4-dioxigenase [21]. Além do próprio catecol, ela é capaz de clivar substratos halogenados e dialogenados tais como 3-clorocatecol, 4-clorocatecol, 4-fluorocatecol, 3,5-diclorocatecol, 3,5-dibromocatecol, tetraclorocatecol, protocatecuato, 3-metilcatecol, 4-metilcatecol, 3-metoxicatecol e 4-nitrocatecol [21]. Uma explicação para isso seria que o sítio de ligação da clorocatecol 1,2-dioxigenase apresenta características estéricas e eletrônicas compatíveis com a acomodação do átomo de cloro do substrato, podendo sofrer alguns ajustes para acomodar outros substituintes hidrofóbicos como o grupo metil do metilcatecol. Nas enzimas catecol 1,2-dioxigenases, o sítio ativo seria mais compacto por não estar seletivamente adaptado à ligação de Cl, se tornando inacessível a substratos maiores [21,22].

A estrutura da Pp 1,2-CCD (**Figura 3**) foi resolvida por Rustiguel e colaboradores [2]. Como em outros membros da mesma família, a sua unidade funcional é homodimérica e seu arranjo tem a forma de um *boomerang*, podendo ser dividida em três domínios: dois domínios catalíticos, que se encontram nas extremidades da estrutura, e um domínio helicoidal, ou de ligação, localizado no centro da molécula [2]. No centro deste domínio helicoidal, entre as duas subunidades do

dímero, existe um túnel hidrofóbico que atravessa a estrutura de uma face a outra e onde se encontra ligada uma molécula de fosfolipídio, provavelmente um fosfatidilinositol (PI) [2,23]. Resultados de nosso grupo já demonstraram que a presença dessa molécula exerce um controle alostérico sobre a atividade enzimática da proteína, diminuindo sua afinidade pelo substrato e aumentando a velocidade inicial máxima da reação [24]. O núcleo de cada domínio catalítico contém duas folhas- β que se arranjam formando uma estrutura do tipo sanduíche β . O sítio ativo, composto de várias estruturas do tipo *random coil*, está localizado entre a estrutura do tipo sanduíche β e o domínio helicoidal, além de possuir um íon Fe^{3+} coordenado por quatro resíduos: Tyr130, Tyr164, His188 e His 190 em uma geometria do tipo bipiramidal trigonal (**Figura 4**) [2]. Dois mecanismos já foram propostos para a migração de elétrons que causam a quebra do anel de catecol [25,26]. Em ambos, o Fe^{3+} reage diretamente com a molécula de oxigênio formando um peróxido intermediário que por diferentes vias resulta num anidrido. Durante esse processo, o íon Fe altera seu estado de valência de 3+ para 2+ [15] e, ao final da reação, o anidrido será hidrolisado para gerar o ácido *cis,cis*-mucônico.

No que diz respeito à cinética enzimática, nosso grupo também já demonstrou que Pp 1,2-CCD não se comporta segundo a cinética de Michaelis-Menten convencional [13]. Foi observado um caso de inibição competitiva, com o produto ligando-se no sítio catalítico da enzima. A inibição pelo produto deve estar relacionada a mecanismos de homeostase da célula para evitar a toxicidade associada a altas concentrações do ácido *cis,cis*-mucônico [13].

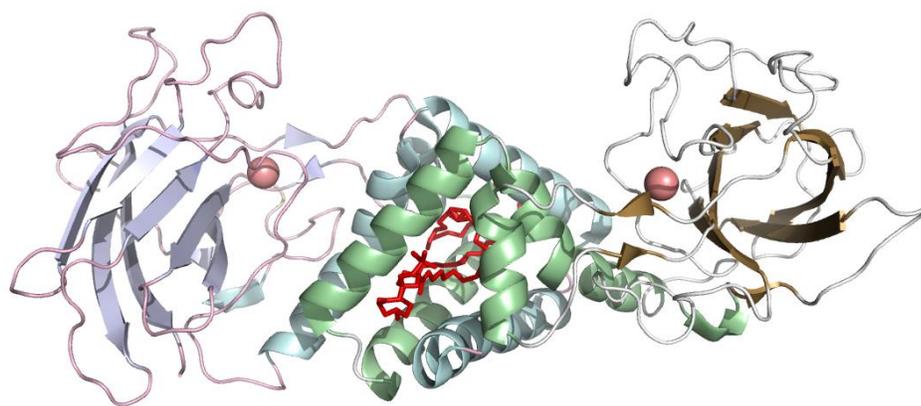


Figura 3: Estrutura cristalográfica da Pp 1,2 CCD (PDB: 3TH1), mostrando as duas subunidades que formam o dímero funcional. As esferas rosas representam os íons Fe^{3+} presentes nos sítios ativos. Na região central de hélices, estão representadas as moléculas de fosfolípídios em vermelho. Fonte: Imagem adaptada da referência 27.

A presença de moléculas anfipáticas junto à interface de ligação dos monômeros da CCD levantou a questão em relação à capacidade dessa família de enzimas de se ligar a membranas biológicas. Esse tipo de informação amplia o conhecimento acerca de mecanismos básicos de ação da enzima, aumentando a possibilidade de parceiros de interação, podendo levar a outras formas de controle da atividade biológica para uso potencial em aplicações biotecnológicas no processo de biorremediação. Estudos realizados previamente [13,27,28] já sugeriram alguma interação entre o domínio de ligação, região que abrange o túnel hidrofóbico, da Pp 1,2 CCD e miméticos de membrana, porém, mesmo que esse seja um mecanismo de regulação, não é determinante para a atividade catalítica nem é um mecanismo de adesão no qual a proteína fica imobilizada na membrana. No entanto, a imobilização da proteína seria interessante para o seu uso em escala industrial, permitindo o maior controle das condições ambientais. Enzimas livres em solução apresentam uma menor estabilidade, enquanto técnicas de imobilização são utilizadas para aumentar atividade, estabilidade, especificidade, seletividade e diminuir a inibição [29]. A

imobilização também permite a reutilização da enzima por um tempo maior e facilita a separação de catalizador e produto [30].

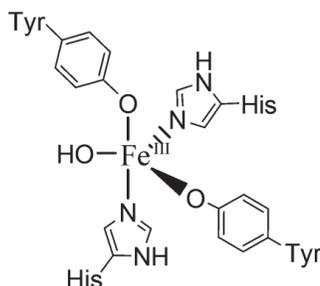


Figura 4: Sítio de ligação do Fe^{3+} em uma estrutura bipiramidal trigonal. Fonte: Referência 20.

A imobilização de enzimas tem sido um desafio na área de biotecnologia. Apesar de permitir um maior controle da reação, o processo de imobilização pode causar desnaturação ou mudanças na estrutura que levam à perda da atividade enzimática [30]. A utilização de compostos nanoestruturados como nanotubos de lipídios ou nanotubos de carbono tem a vantagem de oferecer uma grande superfície de contato que permite interações hidrofóbicas ou eletrostáticas para melhor estabilização da enzima no suporte e, além disso, são materiais biocompatíveis e com boa resistência mecânica [30]. A compatibilidade da Pp 1,2-CCD com uma ampla variedade de substratos é uma característica conveniente no que diz respeito a aplicações em biorremediação. Por outro lado, aumentar a durabilidade da enzima e evitar a inibição por produto são aspectos que deveriam ser contornados na busca por um biosensor eficiente [30].

Nesta parte do trabalho, temos como interesse principal a produção da enzima Pp 1,2-CCD modificada de tal forma que sua inserção/imobilização em membranas ou outros suportes nanoestruturados seja possível. Este é um estudo que explora a influência da adição de uma hélice anfipática no C-terminal da estrutura da Pp 1,2-CCD, sobre as propriedades estruturais cinéticas e capacidade de interação com o suporte.

2 Objetivos

Neste capítulo, utilizamos o protocolo já otimizado para produção heteróloga da proteína Pp 1,2-CCD e sua purificação, com o objetivo de estender nossas investigações sobre as interações desta proteína com modelos de membrana biológica e como essas interações interferem na catálise enzimática. Para tanto, faremos uso de uma variedade de técnicas experimentais disponíveis em nosso grupo e em colaborações que já foram utilizadas anteriormente para resolver problemas similares, tais como dicroísmo circular (CD), calorimetria diferencial de varredura (DSC), espectroscopia de fluorescência do estado estacionário e espectroscopia de absorção óptica. Esse estudo tem como finalidade a fixação da Pp 1,2-CCD nos miméticos de membrana para testar a eficiência enzimática quando imobilizada. Se atingido, esse feito tem como diferencial a possibilidade de imobilização da enzima em materiais nano estruturados, como nanotubos de carbono e nanotubos de lipídeos, afim de desenvolver dispositivos capazes de serem usados na degradação de compostos aromáticos despejados no meio ambiente.

3 Materiais e Métodos

3.1 Planejamento da hélice anfipática (H) no C-terminal da CCD

3.1.1 Planejamento da sequência gênica do peptídeo H

Foi planejado uma sequência peptídica para ser anexada ao C-terminal da enzima Pp 1,2-CCD. Esse peptídeo deve ter o formato de uma hélice anfipática que chamaremos de peptídeo H. A proteína com a hélice em anexo será chamada CCD-H.

A sequência da hélice foi montada com adaptações do peptídeo nano-1, desenvolvido por um de nossos colaboradores, que é capaz de revestir e solubilizar nanotubos de carbono (SWNTs) [31]. Essas propriedades seriam interessantes para proporcionar a fixação da enzima a suportes não solúveis em água. A anfifilicidade é atingida devido ao posicionamento adequado de resíduos de aminoácidos polares e apolares na sequência primária do peptídeo. O método utilizado foi a repetição de uma sequência de sete resíduos $(a,b,c,d,e,f,g)_n$, em que os resíduos a e d formam a face hidrofóbica e os resíduos b , c , e , f e g formam a face hidrofílica. Ao final temos um peptídeo formado pela seguinte sequência de 28 resíduos de aminoácidos:

VEAFQEKVAAFQSKVQSFEQKVEAFEHG

A sequência gênica para a expressão do respectivo peptídeo foi obtida por tradução reversa através do programa disponível no site http://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html. Em seguida, a sequência foi otimizada para expressão em *E. coli* utilizando-se o *Codon Optimization Tool* disponível no servidor <https://www.idtdna.com/CodonOpt>, a partir do qual obtivemos o seguinte código genético:

**GTGGAAGCATTTC AAGAAAAGGTGGCCGCGTTCCAGAGCAAAGTCCAGTCGTTTGAACAGAAGGTGG
AAGCGTTCGAACATGGG**

3.1.2 Construção e propagação do DNA codificante da CCD-H

Para construção da sequência gênica da hélice anfipática no C-terminal da Pp 1,2-CCD, a sequência do peptídeo H foi dividida em 4 partes, das quais foram construídos oligonucleotídeos (Tabela 1) capazes de se anelar como esquematizado na Figura 5.

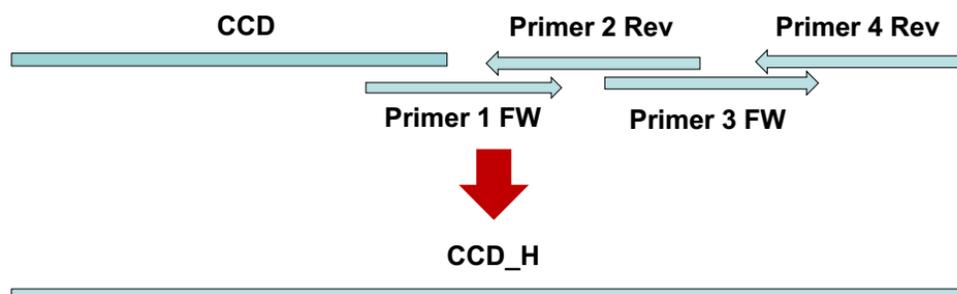


Figura 5: Esquema de alinhamento dos oligonucleotídeos para formar a sequência gênica da hélice ao final do DNA que codifica a enzima Pp 1,2-CCD. As setas indicam a direção do oligonucleotídeo do 5' para o 3'. Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 1: Oligonucleotídeos planejados para a construção da hélice anfipática no C-terminal da Pp 1,2-CCD. As regiões que se anelam estão destacadas com cores semelhantes. As siglas FW e Rev indicam a direção forward e reverse, respectivamente. Em vermelho, no Primer1 FW, a região de anelamento com a sequência da enzima; no Primer 4 Rev estão destacados o stop codon em verde e o sítio de restrição da enzima XohI em azul escuro.

Oligonucleotídeos	Sequência	Tm (°C)
Primer 1 FW	5' CGGAGACAGTGGCATG AGTGGA AGCATTCAAGAAAAGGTGGCC3'	69,0
Primer 2 Rev	5'CAAACGACTGGACTTTGCTCTGGA ACGCGGCCACCTTTCTTGAAATG3'	69.2
Primer 3 FW	5'GAGCAAAGTCCAGTCGTTTGA ACAGAAGGTGGAAGCGTTCG3'	67.5
Primer 4 Rev	5' CTCGAGCT ACCCATGTT CGA ACGCTTCCACC3'	66.2

O Tm de cada oligonucleotídeo foi calculado pelo programa OligoAnalyzer 3.1 disponível no servidor IDT (Integrated DNA Technologies - <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). Fonte: Elaborada pela autora.

As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas em T100TM Thermal cycler (Bio Rad) utilizando-se a enzima Phusion DNA Polymerase (Thermo Scientific). Na primeira

reação, foram colocados os quatro oligonucleotídeos. Uma segunda reação foi realizada no mesmo tubo de PCR adicionando-se mais 1 U da enzima e os Primers 1 FW e 4 Rev, para amplificação da sequência completa. Esse DNA foi separado em gel de agarose 1 % e purificado utilizando-se *Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega)*. Em seguida, o DNA foi submetido a outra reação de PCR para inserção da sequência que codifica a hélice no gene que codifica a Pp 1,2-CCD, utilizando-se os oligonucleotídeos CCD pSumoEcoRI_Fw (5'-GCGAATTCATGGATAAACGAGTTGCCGAGG-3'), que se anela ao início 5' da CCD, e Primer 4 Rev. Esse DNA foi novamente separado por eletroforese e purificado. Uma última PCR foi realizada com esses mesmos oligonucleotídeos para extensão do DNA, mas dessa vez, a enzima utilizada foi a *Taq DNA Polymerase (Sigma-Aldrich)* que promove a adenilação do DNA.

O produto da purificação foi inserido no plasmídeo pGem (InsT/Aclone™ PCR *ProductCloning Kit-Fermentas*) através da enzima T4 DNA Ligase, seguindo orientação do fabricante. Esse DNA sofreu transformação por choque térmico em célula de *E. coli* DH5- α (*Invitrogen*) e cultivado a 37 °C por 16 h em 20 ml de meio LB (Luria Bertani) *Broth (SIGMA Life Science)* sólido, ágar 1 %, contendo IPTG 0,5 mM, X-gal 0,1 mg/ml e ampicilina 0,1 mg/ml. As colônias foram selecionadas pela cor: as colônias positivas são brancas e as negativas azuis, para serem inoculadas em 5 ml de meio LB contendo 50 μ g/ml de ampicilina, a 37 °C sob agitação de 200 rpm. Ao final de 16 h as bactérias foram centrifugadas, lisadas e o DNA purificado utilizando-se o kit ZR Plasmid Miniprep™-Classic (*Zymo Research*).

O DNA foi submetido à análise de restrição com as enzimas EcoI e XhoI (*Thermo Scientific FastDigest*). A confirmação dos clones positivos e análise da fidelidade das sequências foram validadas por sequenciamento, realizado em sequenciador automático *Genetic Analyser 3130 (lifetechnologies)* no Grupo de Biofísica Molecular Sérgio Mascarenhas do IFSC, USP.

3.1.3 Subclonagem do gene de CCD-H

O vetor de propagação, pGem, contendo a sequência que codifica a CCD-H e os vetores de expressão, pET28a e pETSumo (*Novagen*), foram digeridos separadamente com as endonucleases de restrição EcoI e XhoI. As frações de interesse foram isoladas por eletroforese em gel de agarose 1 % e os DNAs purificados com o kit DNA Clean & ConcentratorTM-5 (*Zymo Research*). A ligação do inserto aos vetores linearizados foi feita utilizando-se a enzima T4 DNA ligase (*Thermo Scientific*) segundo orientações do fabricante.

3.2 Proteínas recombinantes

3.2.1 Linhagem de *Escherichia coli* e plasmídeos utilizados para propagação de DNA e expressão proteica

Para manutenção e propagação dos vetores plasmidiais, foi utilizada a linhagem DH5- α . A linhagem BL21 (DE3) foi utilizada para expressão das proteínas recombinantes. Devido a sua alta eficiência em expressão de proteínas em *E. coli*, o sistema de vetores escolhido foi o pET (*Novagen*). A construção utilizada para expressão heteróloga de Pp 1,2-CCD foi o vetor pET SUMO, capaz de melhorar a solubilidade da proteína a ser expressada através da fusão do *small ubiquitin-related modifier* (SUMO). Depois da expressão, esse motivo de 11 kDa pode ser clivado pela SUMO protease (ULP-1) de alta especificidade, resultando na proteína nativa.

Os vetores, com os respectivos insertos, foram transformados por choque térmico nas cepas de *E. coli* previamente preparadas em cloreto de cálcio. Essas bactérias foram cultivadas em meio LB sólido contendo ágar 1% e canamicina 50 $\mu\text{g/ml}$. As colônias transformantes em DH5 α foram inoculadas em 5 ml de meio LB contendo 50 $\mu\text{g/ml}$ de canamicina, a 37 °C sob agitação de 200

rpm. Após 16 h o DNA foi extraído novamente por lise alcalina. As soluções contendo os DNAs de interesse foram armazenadas a -20 °C.

3.2.2 Expressão

As colônias transformantes de BL21(DE3) foram previamente inoculadas em 5 ml de meio LB, contendo canamicina 50 µg/ml, por 16 h horas sob agitação de 200 rpm. Os pré-inóculos foram utilizados para propagação celular em 1 l de meio LB contendo antibiótico canamicina 50 µg/ml. Para expressão de Pp 1,2-CCD e CCD-H, foi acrescentado ao meio sulfato ferroso a uma concentração final de 0,35 g/l. As células foram cultivadas nas mesmas condições até que se atingisse a densidade óptica (DO) de 0,8 em 600 nm (aproximadamente 4 h). A seguir, baixamos a temperatura para 20 °C e a expressão de proteína foi induzida adicionando-se IPTG a uma concentração final de 0,5 mM. As condições foram mantidas por 18 h. Ao final da expressão, a cultura de células foi centrifugada em uma centrifuga Sorvall RC6+ da *ThermoScientific*, rotor FIBERLite® F14-6x250y durante 20 minutos a 7000×g. As células sedimentadas foram ressuspendidas em 20 ml de tampão Lise (Tris 20 mM, NaCl 250 mM, pH 8,0) e o volume foi dividido em dois e estocado a -80 °C.

3.2.3 Purificação das proteínas recombinantes

A lise celular foi realizada com as alíquotas de 10 ml utilizando-se um sonicador BRANSON *Digital Sonifire*®, *Soni-tech*, operando em uma amplitude de 15 % por sete ciclos de 20 s com intervalos regulares de 40 s. As amostras foram mantidas em gelo durante todo o

procedimento de descongelamento e lise celular. Na primeira etapa de purificação, as frações solúvel e insolúvel de cada amostra são separadas por centrifugação a 8 °C, 11.000×g por 20 min.

A etapa de purificação subsequente foi feita em cromatografia líquida, sendo a fase estacionária constituída de 2 ml de resina Ni-NTA Agarose (*Qiagen*). O extrato solúvel foi aplicado na coluna previamente equilibrada com tampão Lise e deixado sob agitação branda em mesa agitadora por 40 min. Em seguida, a coluna foi lavada com 40 ml de tampão Wash1 (Tris 20 mM, NaCl 250 mM, Imidazol 60 mM, pH 8,0) para eluição de eventuais contaminantes com afinidade (embora pequena) pela coluna. A eluição da proteína foi feita em 10 ml de tampão Elution (Tris 20 mM, NaCl 250 mM, Imidazol 250 mM, pH 8,0).

Foram adicionadas às amostras uma quantidade final de 2 mg de ULP-1 para clivagem do anexo SUMO enquanto eram submetidas a diálise em tampão Dia (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0) por 16 h a 8 °C. Essas amostras foram recromatografadas em coluna de níquel, onde a ULP-1 e a SUMO ficaram retidas e, em seguida, concentradas em Amicon® Ultra-15 (*Millipore*) até 1 ml. Alíquotas para SDS-PAGE foram coletadas durante cada etapa de purificação.

O último passo da purificação consiste na cromatografia de exclusão molecular, realizada no equipamento AKTA *purifier GE*, utilizando-se a coluna de exclusão molecular Superdex 200 10/300 (*GE Healthcare*), previamente equilibrada em tampão Dia. Este procedimento também permite avaliar o estado oligomérico das proteínas. O volume de amostra injetado foi de 1 ml e o fluxo de 0,5 ml/min.

3.2.4 Eletroforese em condições desnaturantes

As alíquotas coletadas durante as etapas de purificação foram diluídas em tampão da amostra para SDS-PAGE, que contém em sua composição SDS, Tris, corante azul de bromofenol e β -mercaptoetanol, e posteriormente aquecidas a 99 °C por 5 min. A eletroforese foi realizada em gel de Tricina [32] a 200 V, utilizando-se um sistema vertical DIGEL, até que o azul de bromofenol atingisse o limite inferior do gel (cerca de 45 min). A coloração das bandas proteicas foi realizada utilizando-se *Coomassie Blue* 0,2 % (p/v) preparado em metanol 50 % (v/v) e ácido acético 10 % (v/v).

3.2.5 Determinação da concentração proteica

Utilizando-se o valor de absorção óptica medido em 280 nm no equipamento NanoDrop 2000 da *ThermoScientific*, foram calculadas as concentrações de cada proteína seguindo-se a lei de Beer-Lambert. Os respectivos coeficientes de extinção (ϵ) encontram-se na **Tabela 2**. Os cálculos de ϵ foram feitos pelo programa *ProtParam tool*, disponível no servidor ExPASy (*Expert Protein Analysis System*, <http://web.expasy.org/protparam/>), considerando a composição de resíduos de aminoácidos de cada proteína.

Tabela 2: Coeficientes de extinção das proteínas CCD e CCD-H em comprimento de onda 280 nm.

Proteína	ϵ_{280} ($M^{-1}.cm^{-1}$)
CCD	34.505
CCD-H	34.505

Fonte: Elaborada pela autora.

3.3 Análise de estrutura e estabilidade

3.3.1 Dicroísmo Circular (CD)

Os experimentos de CD na região do UV distante (190–260 nm) foram realizados utilizando-se o equipamento Jasco J-810 CD Spectrometer (JASCO Corporation, Japan) equipado com controle de temperatura Peltier. Foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 mm. Os parâmetros experimentais foram: velocidade de varredura $50 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$, passo de 0,2 nm, e tempo de resposta de 0,5 s. O espectro final obtido é resultado da média entre 5 varreduras realizadas. Antes da realização das medidas, as proteínas foram diluídas em água para uma concentração de 0,1 mg/ml, a partir de uma solução estoque mais concentrada. As medidas foram realizadas a 25 °C, aguardando um tempo de 2 min para que as amostras atingissem o equilíbrio térmico.

Para as medidas feitas na presença de modelos de membrana (preparação no item 3.5.1), a razão fosfolipídio/proteína foi mantida em 20:1 mol/mol. Todas as misturas foram incubadas a 30 min (mínimo), tempo considerado suficiente para que se atingisse o equilíbrio do processo de ligação.

3.3.2 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Os experimentos de DSC foram realizados no calorímetro VP-DSC MicroCal MicroCalorimeter (Microcal, Northampton, MA, USA) com uma taxa de aquecimento de $63,6 \text{ °C/h}$ a partir da temperatura de 10 °C até 95 °C. Primeiramente foi medida a linha de base apenas com o tampão Dia. Os termogramas de DSC das proteínas começaram a ser registrados a partir da segunda medida e depois de 15 min para que a amostra atingisse o equilíbrio com a temperatura

inicial. A concentração utilizada para medir as curvas calorimétricas tanto da CCD, quanto da CCD-H, foi de 24 μM . Nos experimentos com os modelos de membrana POPC, POPG e POPC/POPG 5:1 mol/mol a razão molar fosfolipídio/proteína foi mantida 20:1 mol/mol. Subtração do tampão, correção da linha de base, integração das curvas calorimétricas e a desconvolução dos dados foram feitos utilizando Microcal Origin *software* para Origin 7.

3.4 Medidas de atividade

3.4.1 Cinética enzimática da Pp 1,2-CCD e CCD-H

Os testes de atividade enzimática foram realizados em espectrofotômetro Ultroscopec 2100pro, em cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm e o substrato utilizado foi o 4-clorocatecol, nas concentrações de 23,7; 31,6; 42,2; 56,3; 75,1; 100,1; 133,5; 178,0; 237,3; 316,4; 421,8; 562,5; 750,0 e 1000 μM . O substrato em cada uma dessas concentrações foi adicionado à cubeta contendo solução de 0,5 μg de proteína e a solução final homogeneizada. Foram, então, feitas 24 leituras com intervalos de 10 s entre cada leitura.

3.5 Miméticos de membrana

3.5.1 Preparação de vesículas

Os fosfolipídios utilizados se encontravam em solução estoque de clorofórmio (CHCl_3). Destes foram feitos filmes em tubos de ensaio de vidro, evaporando-se o clorofórmio com fluxo de N_2 . Os filmes tinham a composição de interesse e já na presença dos marcadores de fluorescência, quando necessário. Para eliminar qualquer resíduo de clorofórmio das amostras, elas ainda foram submetidas à ultracentrifugação sob vácuo em Savant SPD121P *SpeedVac Concentrator* (Thermo

Scientific) por 2 horas. A seguir, os filmes foram reidratados em tampão Dia e agitados em vórtex até a ressuspensão total. Ao final, as amostras foram extrusadas em filtros *NucleoporeTrack-Etechmembrane* (*Whatman*) de 100 nm por meio de extrusor *Avanti Polar Lipids* para a formação de vesículas unilamelares.

As composições de fosfolipídios utilizadas foram: somente POPC, somente POPG e mistas de POPC e POPG na proporção 5:1. O marcador fluorescente utilizado foi o NBD-PE. A concentração do marcador foi mantida em 0,5 mol %.

3.5.2 Medidas de fluorescência

A influência das enzimas na estruturação da bicamada foi avaliada por fluorescência em estado estacionário no equipamento Hitachi F-7000, equipado com *W xenon arc lamp*. A janela de excitação e emissão dos monocromadores foi fixada em 2,5 nm. As medidas foram feitas a 25°C, aguardando 3 min para que as amostras atingissem o equilíbrio térmico. Para se observar mudanças na solubilização do NBD-PE, a excitação foi realizada em 465 nm e o intervalo de emissão observado foi 480-640nm. As proteínas foram acrescentadas às amostras nas razões 50:1 e 20:1 mol/mol de fosfolipídio/proteína.

4 Resultados e discussões

4.1 Pp 1,2-CCD

4.1.1 Expressão e purificação da CCD

A expressão e purificação da Pp 1,2-CCD foi efetuada conforme descrito na seção 3.2. Este protocolo foi estabelecido por Furtado [27] e tem como resultado final uma proteína com maior grau de pureza e rendimento dobrado para 20 mg por litro de meio de cultura. Na **Figura 6** podemos observar o resultado da purificação após a cromatografia por afinidade em resina de níquel e verificar que a Pp 1,2-CCD é uma proteína solúvel, porém na presença de alguns contaminantes.

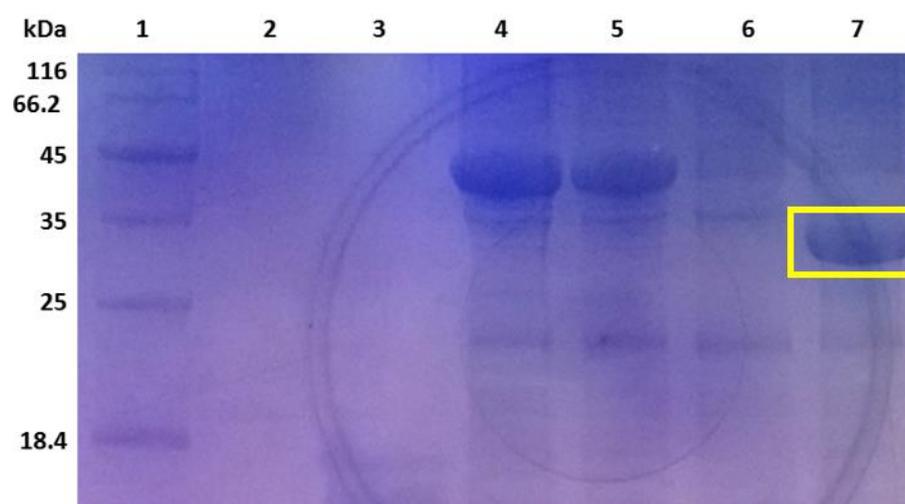


Figura 6: Resultado da purificação da proteína Pp 1,2-CCD visualizado em eletroforese em gel de poliacrilamida. Coluna 1 – marcador de massa molecular. Coluna 2 e 3 – vazias. Coluna 4 – eluição em tampão Wash1. Coluna 5 – eluição em tampão Elution. Coluna 6 – eluição com imidazol 1 M. Coluna 7 – eluição em tampão Dia após clivagem com ULP-1 e diálise por 16 h. A banda de proteína utilizada está destacada no retângulo amarelo. Fonte: Elaborada pela autora

No perfil de eluição em cromatografia por exclusão molecular (**Figura 7**) são verificados dois picos quase sobrepostos: o primeiro, de menor intensidade, talvez referente a algum contaminante e um segundo pico referente à eluição da Pp 1,2-CCD. Por isso concluímos que ela

não se encontra pura após a purificação em resina de níquel. O contaminante apresenta tamanho próximo suficiente do tamanho da Pp 1,2-CCD para não ser distinguido por eletroforese em gel de poliacrilamida. Esse perfil está de acordo com o estudo de oligomerização realizado na referência 27, no qual a proteína se encontra na forma dimérica.

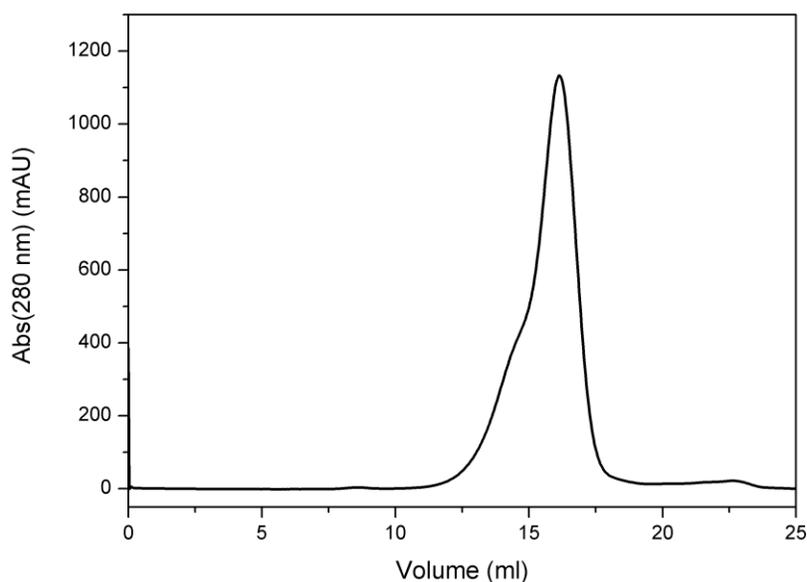


Figura 7: Perfil de eluição da proteína Pp 1,2-CCD na coluna superdex 200 (10/300) equilibrada com tampão Dia. Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.2 Caracterização estrutural da CCD – Estrutura secundária

Continuando a caracterização da Pp 1,2-CCD, estudamos a sua estrutura secundária pela técnica de CD na região do UV distante (240 nm a 190-180 nm) como descrito na seção 3.3.1. O dicroísmo circular é a diferença de absorção óptica da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita por moléculas opticamente ativas (aquelas que possuem centros quirais), propriedade esta

que dá nome à técnica [33]. O “*dichrograph*” é dado, portanto, pelo diferencial do coeficiente de absorção molar ($\Delta\epsilon$) dos dois feixes helicoidais, ou pela elipticidade (θ), em um dado comprimento de onda [33]. Na região do UV distante, o centro quiral absorvedor é a ligação peptídica, o que permite a quantificação do conteúdo de estrutura secundária de uma proteína. As transições observadas são: uma transição fraca e larga $n \rightarrow \pi^*$, em torno de 210 nm, e uma transição intensa $\pi \rightarrow \pi^*$ em 190 nm [34].

Os dados da atividade óptica da enzima Pp 1,2-CCD na região do UV distante estão mostrados na **Figura 8**, onde observamos um espectro condizente com a estrutura esperada para enzima trabalhada, em que há predominância de estruturas em α -hélice.

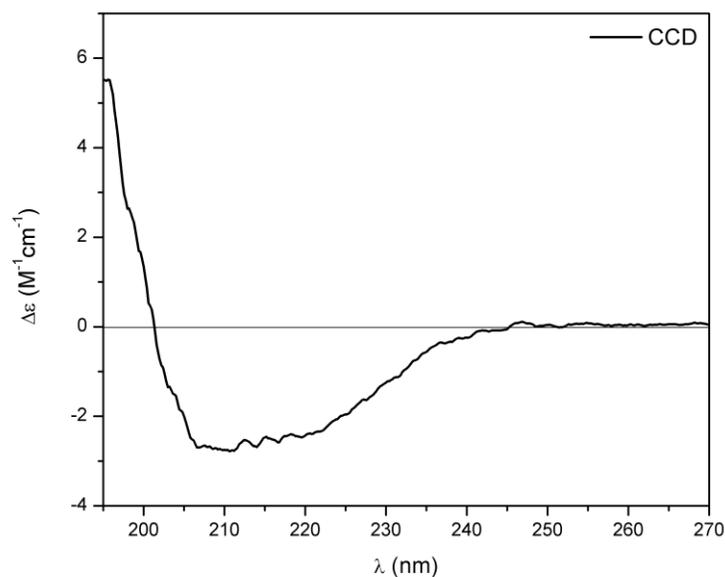


Figura 8: Espectro de CD no UV distante da enzima Pp 1,2-CCD. Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.3 Atividade e cinética enzimática da Pp 1,2-CCD

Uma vez de posse da proteína com grau de pureza adequado e estando enovelada, como mostram os resultados das seções anteriores, se fez necessário a verificação de sua atividade biológica. Em se tratando de uma enzima, os ensaios de atividade foram executados como descrito no item 3.4, monitorando-se a formação do produto da clivagem 4-clorocatecol, o ácido *cis,cis*-mucônico, pela sua absorção óptica em 260 nm ao longo do tempo. A **Figura 9** mostra o resultado da medida de atividade de 5 µg de enzima catalisando a quebra de 200 µM de substrato. A curva visualizada se aproxima de uma hipérbole seguindo a equação:

$$y = \frac{P_1 t}{P_2 + t}$$

onde y é a absorção óptica em 260 nm em um dado tempo t , e P_1 e P_2 são coeficientes que definirão a velocidade da reação. Neste caso, a velocidade inicial da reação é o ajuste linear do início da curva, quando t (o tempo de reação) se aproxima de zero, cujo coeficiente angular é dado pela razão P_1/P_2 . A reação aconteceu até que a completa conversão do 4-clorocatecol fosse alcançada, quando foi atingido o patamar no valor da absorção. Esse valor de absorção máximo acontece para tempos muito longos e é dado por P_1 .

Informações acerca da cinética enzimática são relevantes quando se visa um desenvolvimento para aplicações biotecnológicas. A fim de explorar mais este tema, foram calculadas as velocidades iniciais de reação para um gradiente de concentração de substrato especificado em 3.4.1. Estes valores de velocidade inicial em função da concentração de substrato foram usados para construir a **Figura 10**. Nesta, foi feito um ajuste da cinética de catálise do substrato, 4-clorocatecol, considerando o modelo de inibição por produto já estudado para Pp 1,2-CCD nas referências 13 e 27. Observamos um limite máximo da velocidade inicial de reação para

a concentração de 562,5 μM de substrato, concentração a partir da qual começa a haver inibição da enzima pelo produto e os parâmetros calculados encontram-se na **Tabela 3**.

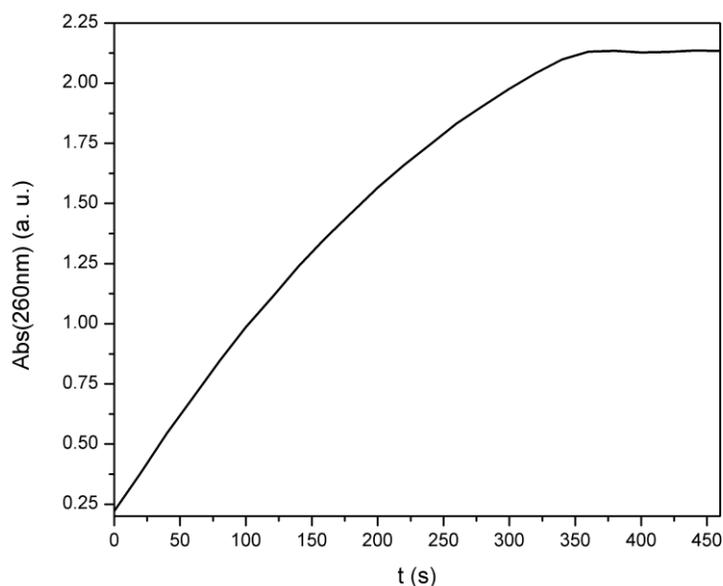


Figura 9: Resultado típico para o ensaio de atividade enzimática da Pp 1,2-CCD através do monitoramento da absorção em 260 nm devido à formação de ácido *cis,cis*-mucônico a partir de 200 μM do substrato 4-clorocatecol. Fonte: Elaborada pela autora.

Nossos resultados de medidas de atividade e cinética enzimática complementam os dados de caracterização estrutural e mostram que a Pp 1,2-CCD está corretamente enovelada e ativa, seguindo o mesmo padrão previamente reportado para sua atividade enzimática. Com isto, podemos seguir na investigação de suas interações com outros ligantes biologicamente relevantes.

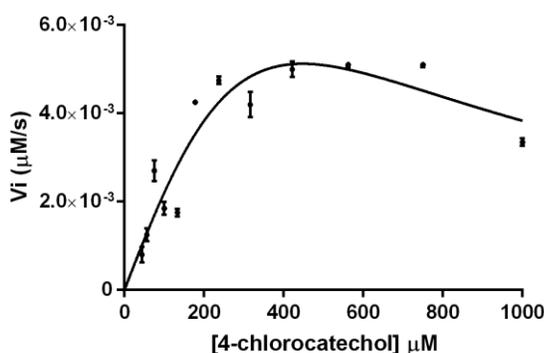


Figura 10: Curva cinética da catálise do 4-clorocatecol em ácido *cis,cis*-micônico realizada pela enzima Pp 1,2-CCD. O ajuste da curva foi feito seguindo-se modelo de inibição, já conhecido para a Pp 1,2-CCD, utilizando-se o programa Graphpad Prism 6. Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 3: Parâmetros calculados a partir do ajuste teórico da cinética de catálise da Pp 1,2-CCD por inibição do produto ácido *cis,cis*-mucônico.

Cinética por inibição Pp 1,2-CCD	
Vmax (μM/s)	0,40
Km (μM)	17087
Ki (μM)	11,73

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.4 Ensaios de interação com miméticos de membrana

Direcionando o estudo para a capacidade da enzima de interagir com um eventual suporte nanoestruturado, foram realizados experimentos que permitem observar mudanças estruturais, de estabilidade e cinética na presença de miméticos de membranas. Os lipossomos foram preparados segundo protocolo descrito em 3.5. A composição de cada sistema de vesículas testado visou

avaliar também a influência da carga superficial da membrana sobre as propriedades estruturais da enzima. Foram usados lipossomos de POPC (zwitteriônico), POPG (aniônico) e POPC/POPG.

Uma análise da estrutura secundária através de espectroscopia de dicroísmo circular (**Figura 11**) revelou que a enzima não sofre mudança conformacional na presença de nenhuma das composições lipídicas testadas mesmo para um período maior de incubação (16 h).

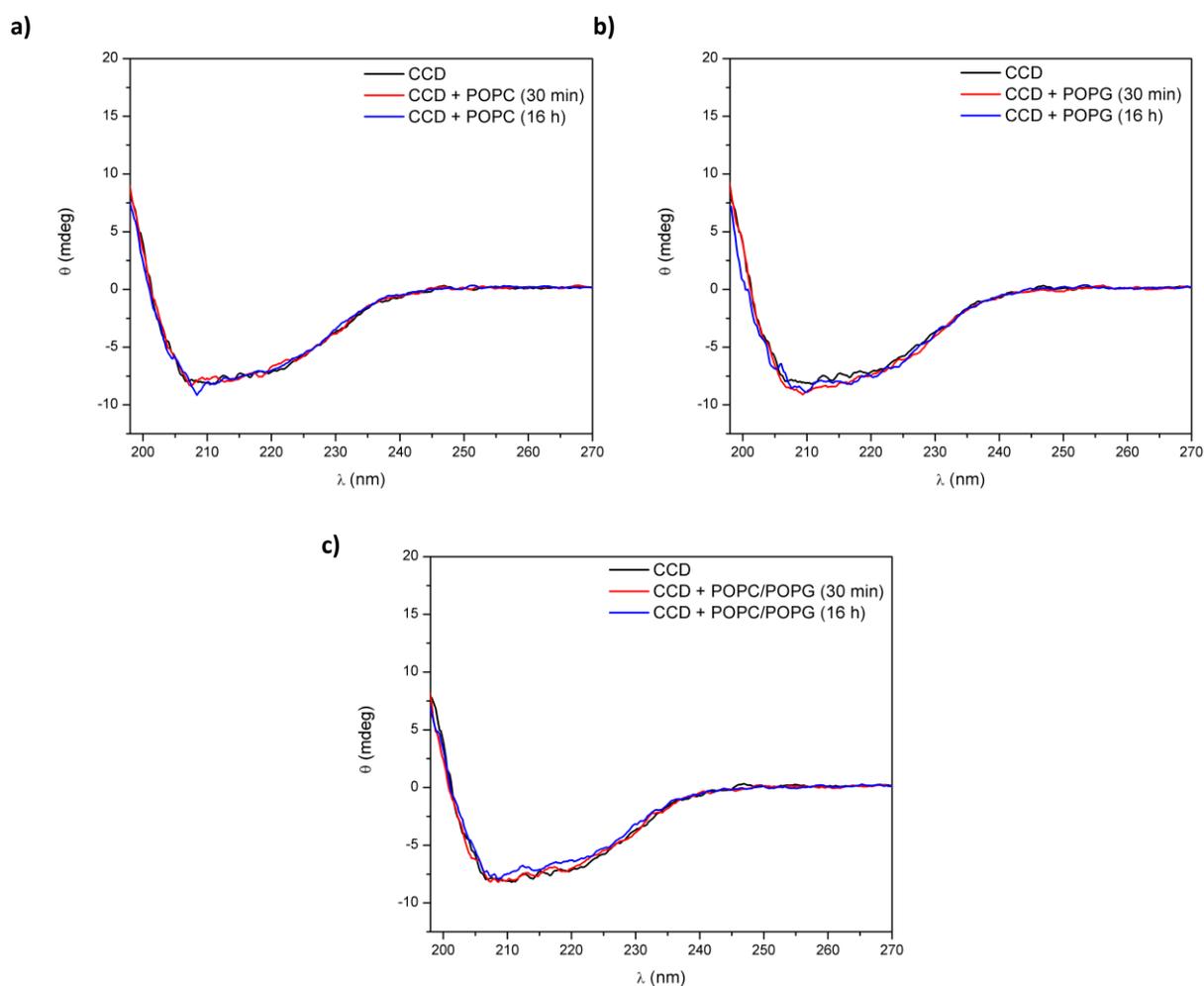


Figura 11: Espectros de CD da enzima Pp 1,2-CCD na região do UV distante na presença dos lipossomos compostos unicamente de a) POPC, b) POPG e c) mistos de POPC/POPG (5/1) nos tempos de incubação de 30 minutos e 16 horas. A razão enzima/fosfolípido foi mantida em 1/20. Fonte: Elaborada pela autora.

Após investigarmos os efeitos diretos da presença de lipossomos na estrutura secundária da proteína, decidimos investigar efeitos dessas vesículas também na estabilidade da Pp 1,2-CCD. Para isto, ensaios de desnaturação térmica foram realizados através da técnica de DSC, onde foram monitoradas as curvas de desenovelamento da enzima isolada e da enzima na presença de lipossomos de POPC/POPG 5:1 mol/mol (**Figura 12**). Como os experimentos de DSC são realizados isobaricamente, a integração da curva de calor específico vs. a temperatura fornece a variação de entalpia calorimétrica da transição [69].

$$\Delta H_{cal} = \int C_P(T) dT$$

As mudanças detectadas foram: uma pequena diminuição no valor da temperatura de *melting* (T_M), na entalpia, e na cooperatividade, esta última verificada pelo aumento no $\Delta T_{1/2}$ (**Tabela 4**), sugerindo uma interação coordenada por ligações fracas não covalentes. O valor de k , também na **Tabela 4**, se aproxima de 1, sugerindo que não há intermediários no processo de desnaturação.

Tabela 4: Parâmetros termodinâmicos calculados a partir dos dados experimentais da desnaturação térmica da Pp 1,2-CCD isolada e na presença de lipossomos compostos de POPC/POPG.

Amostra	T_{max} (°C)	C_{Pmax} (kcal/mol/ °C)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	ΔH_{cal} (kcal/mol)	ΔH_{vH} (kcal/mol)	$k =$ $\Delta H_{vH} / \Delta H_{cal}$
CCD	51,15	31,77	4,45	163,15	162,77	0,99
+ POPC/POPG	50,86	25,97	5,57	155,36	139,47	0,90

Fonte: Elaborada pela autora.

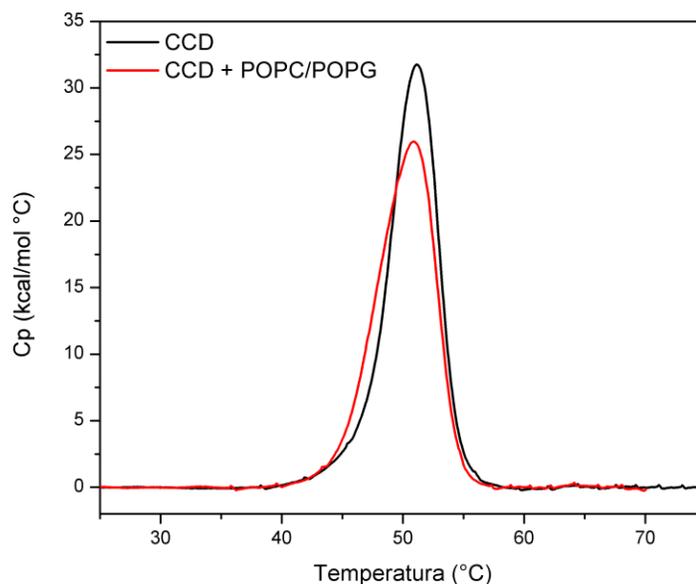


Figura 12: Termograma de desnaturação térmica de 24 μ M de Pp 1,2-CCD na presença de vesículas grandes de POPC/POPG 5:1 mol/mol. A razão enzima/lipídio é 1:20. Fonte: elaborada pela autora

Até o momento, a enzima Pp 1,2-CCD não tem se mostrado estruturalmente afetada pela presença de lipossomos, o que pode ser entendido como um aspecto positivo quando se pensa em imobilização da enzima em sistemas estruturados para aplicações biotecnológicas. No entanto um fator tão importante quanto a estabilidade estrutural da enzima é a manutenção de sua atividade biológica. Por isto, também foram realizados testes de atividade com o substrato 4-clorocatecol na presença de duas composições de vesículas: POPC e POPG. O experimento foi idêntico ao teste de atividade realizado anteriormente, com a ressalva de que a enzima foi previamente incubada nas soluções de lipossomos na razão fosfolipídio/proteína de 20:1 mol/mol. A partir do resultado mostrado na **Figura 13**, observamos uma redução na velocidade inicial de reação na presença das duas composições lipídicas. Mesquita e colaboradores [24] já haviam observado uma espécie de regulação alostérica realizada pela presença das moléculas de fosfolipídio no canal hidrofóbico da

Pp,12-CCD. Foi mostrado que a enzima sofria um aumento da atividade com a retirada do ligante. Aqui concluímos, mais uma vez, que a Pp 1,2-CCD tem a sua atividade reduzida na presença de moléculas anfipáticas, mesmo que agora não estejam diretamente ligadas a elas.

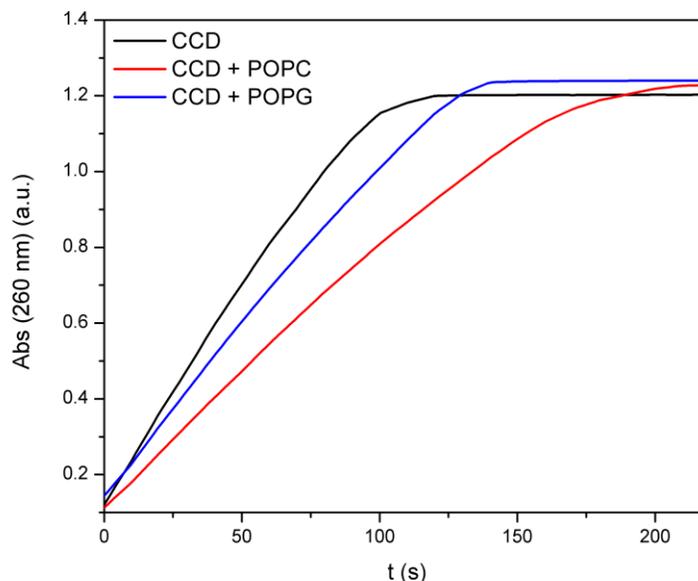


Figura 13: Ensaio comparativo de atividade enzimática da Pp 1,2-CCD na presença de lipossomos de POPC e POPG através do monitoramento da absorção em 260 nm devido à formação de ácido *cis,cis*-mucônico. Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 CCD-H

4.2.1 Montagem de hélice anfipática no C-terminal da Pp 1,2-CCD

Os resultados até aqui obtidos mostram que mudanças no ambiente em que a enzima se encontra provocam alterações na sua atividade, no entanto não tivemos evidências significativas de que a proteína se liga fortemente aos miméticos de membrana. Para tentar incrementar a ligação da enzima a um eventual suporte, planejamos uma hélice anfipática a ser anexada na região C-

terminal da proteína. Esta cadeia peptídica teria a função de fixação e de evitar o contato do sítio de ligação da Pp 1,2-CCD com o suporte, evitando, assim, alterações no comportamento cinético da enzima. A sequência de resíduos que constituiu o peptídeo H foi determinada como descrito em 3.1.1. Através da projeção circular da hélice em um diagrama do tipo Helical Wheel (**Figura 14**) é possível se observar uma superfície bastante hidrofóbica formada por fenilalaninas e outra superfície hidrofílica formada por resíduos carregados ou polares.

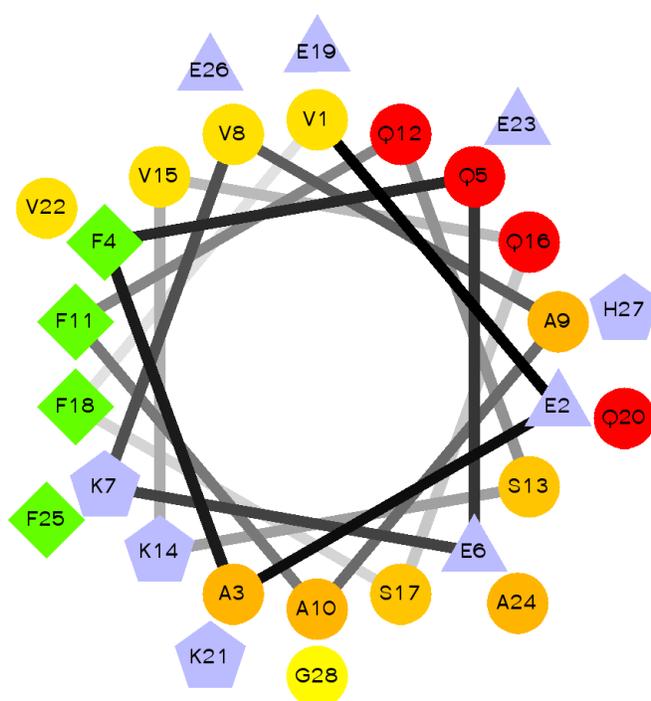


Figura 14: Diagrama da projeção circular da hélice formada pelo peptídeo H ao longo de seu eixo longitudinal no sentido N > C-terminal. Os resíduos polares estão representados em círculos numa gradação de cores indo do vermelho ao amarelo, sendo os vermelhos os mais polares e os amarelos menos; os resíduos hidrofóbicos estão representados nos paralelogramos; aqueles potencialmente carregados negativamente são os triângulos e os potencialmente positivos são os pentágonos. O diagrama foi calculado pelo programa Helical Wheel Projections, disponível no servidor <http://rzlab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi>.

Sabendo que a sequência de resíduos de aminoácidos planejada supre a necessidade de formar uma hélice anfifílica, a sequência gênica para codificá-la foi montada e anexada à sequência

codificante da Pp 1,2-CCD como descrito na seção 3.1.2. O resultado da primeira reação de união que formaria a proteína CCD-H foi verificado por eletroforese em gel de agarose 1 % e está mostrado na **Figura 15**.

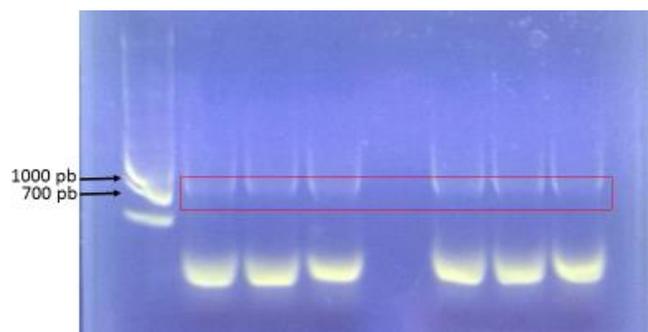


Figura 15: Eletroforese em gel de agarose 1 % do DNA resultante da amplificação do gene codificante da proteína CCD-H. A primeira coluna corresponde ao padrão em pares de bases GeneRule 1 kb DNA Lader (Promega), e as colunas seguintes são os resultados de reações realizadas em diferentes tubos de ensaio. A caixa vermelha destaca as bandas que foram selecionadas para posterior purificação e extensão. Fonte: elaborada pela autora.

Esse DNA foi purificado e submetido a uma reação de extensão e adenilação. O resultado desta reação está mostrado na **Figura 16**. O produto amplificado deve ter aproximadamente 800 pb, tamanho coerente com o encontrado na banda superior do gel de agarose 1 %. A banda inferior é devido ao excesso de oligonucleotídeos. O DNA foi novamente purificado e, desta vez, inserido no plasmídeo pGem-T e propagado em células de *E. coli* DH5- α .

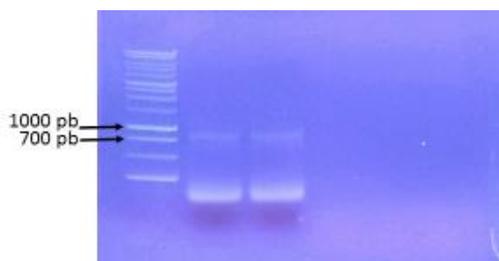


Figura 16: Eletroforese em gel de agarose 1 % do DNA resultante da reação de extensão do gene codificante da enzima CCD-H. A primeira coluna corresponde ao padrão em pares de bases GeneRule 1 kb DNA Lader (Promega) e as duas colunas consecutivas são os resultados de reações de extensão. Fonte: Elaborada pela autora.

Dentre as colônias transformantes, os clones positivos foram confirmados por análise do padrão de restrição realizado pelas enzimas EcoI e XhoI. Na **Figura 17** vemos o resultado da digestão. As bandas de interesse, destacadas pela caixa vermelha, foram selecionadas para subclonagem nos vetores de expressão pET SUMO e pET 28a. Para isto, assim como para a digestão do inserto, os plasmídeos também foram linearizados com as mesmas endonucleases de restrição.

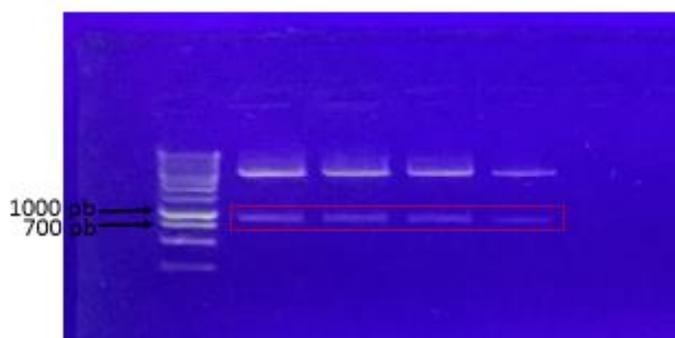


Figura 17: Eletroforese em gel de agarose 1 % do produto resultante da digestão do plasmídeo recombinante, pGem-T, com as endonucleases de restrição EcoI e XhoI. A primeira coluna corresponde ao padrão em pares de bases GeneRule 1 kb DNA Lader (Promega). A caixa vermelha destaca a sequência gênica do inserto e as bandas superiores correspondem ao plasmídeo linearizado. Fonte: Elaborada pela autora.

Os insertos CCD-H foram ligados nos vetores de expressão pET SUMO ou pET 28a linearizados e consecutivamente transformados em células de *E. coli* DH5- α para propagação e manutenção dos plasmídeos recombinantes. Estes plasmídeos foram extraídos das colônias transformantes e um clone positivo de cada construção foi utilizado para transformar células competentes de *E. coli* BL21(DE3) com o intuito de realizar a expressão das proteínas recombinantes.

4.2.2 Expressão e purificação da CCD-H

A expressão e purificação da proteína CCD-H em ambos os vetores decorreu seguindo-se o mesmo protocolo estabelecido para Pp 1,2-CCD (3.2), salvo que a proteína expressa do vetor pET 28a não vem fusionada à SUMO, por isso não passa pelo processo de clivagem pela ULP-1. Aquela ligada ao pET SUMO teve seu rendimento prejudicado, enquanto a proteína ligada ao pET 28a rendeu tanto quanto a Pp 1,2-CCD selvagem. Por SDS PAGE (**Figura 18**) verificamos que a CCD-H é uma proteína solúvel e que, ao final da purificação em resina de níquel, a proteína se encontra pura.

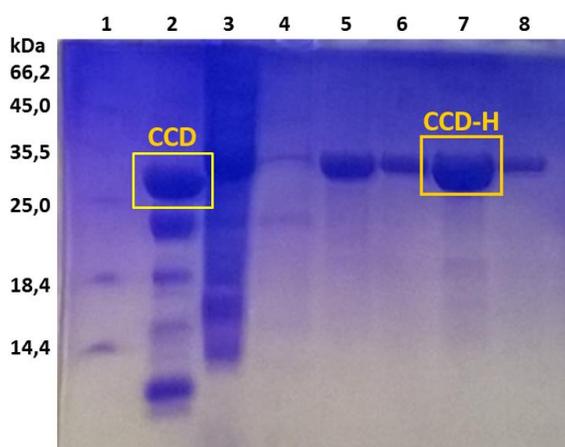


Figura 18: Resultado da purificação da proteína CCD-H expressa em pET 28a, verificado em eletroforese em gel de poliacrilamida. Coluna 1 – marcador de massa molecular. Coluna 2 – padrão de corrida da Pp 1,2-CCD (destacado na caixa amarela). Coluna 3 – fração não ligada na coluna de níquel. Coluna 4 – eluição em tampão Lise. Coluna 5 – eluição em tampão Wash com 10 mM de imidazol. Coluna 6 – eluição em tampão Wash com 60 mM de imidazol. Coluna 7 – eluição em tampão Elution, fração de CCD-H destacada na caixa amarela. Coluna 8 – eluição em 1 M de imidazol. Fonte: Elaborada pela autora

Observamos a manutenção do perfil de eluição por gel filtração da CCD-H em relação a Pp 1,2-CCD, com uma considerável diminuição da dispersão proteica (**Figura 19**).

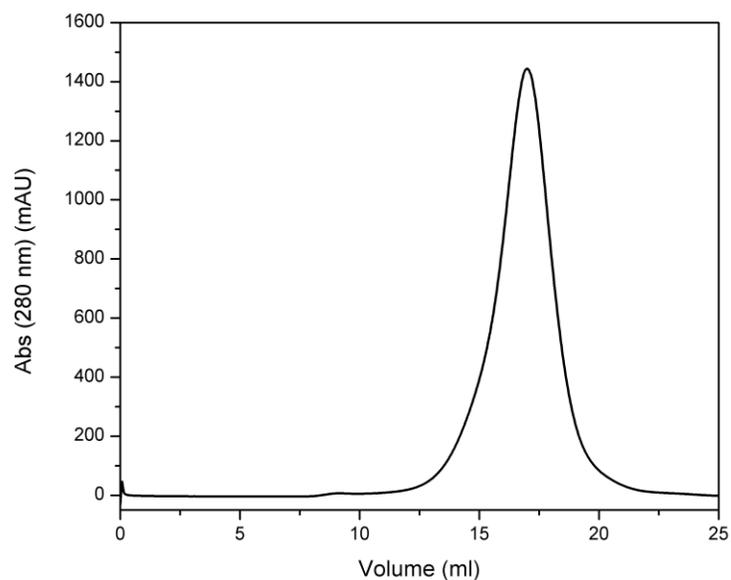


Figura 19: Perfil de eluição da proteína CCD-H na coluna superdex 200 (10/300) equilibrada com tampão Dia. Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.3 Caracterização estrutural da CCD-H – Análise comparativa

Uma análise comparativa entre os espectros de CD da Pp 1,2-CCD e da CCD-H, mostrados na **Figura 20**, nos leva a concluir que a presença da hélice anfipática não afetou a estrutura secundária da enzima. No entanto, a presença da hélice leva a uma mudança significativa na estabilidade térmica da estrutura proteica como se conclui a partir dos dados de DSC (**Figura 21**). A mudança percebida por DSC leva também a alterações nos parâmetros calculados (**Tabela 5**). A diminuição no valor de T_M para a CCD-H indica que a presença da hélice H na região do C-terminal, provavelmente, leva a uma dinâmica conformacional mais acentuada durante o processo de aquecimento da amostra, o que induz mais facilidade de desenovelamento.

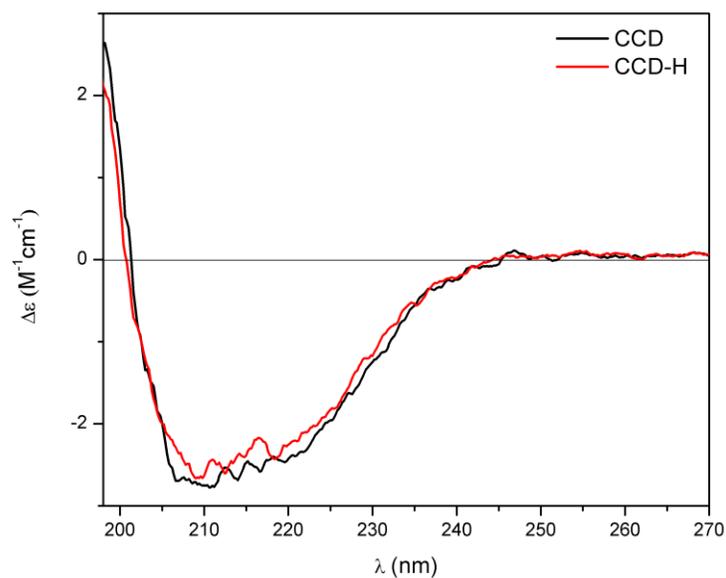


Figura 20: Comparação entre os espectros de CD das proteínas Pp 1,2-CCD (preto) e CCD-H (vermelho) na região do UV distante. Fonte: Elaborada pela autora.

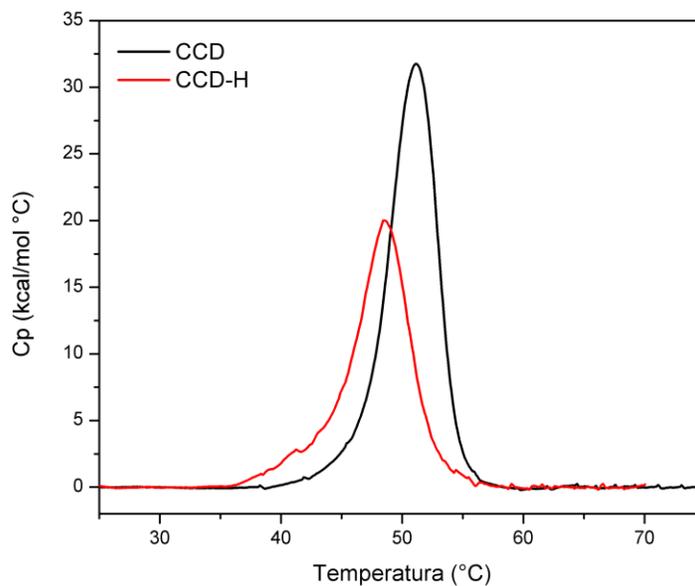


Figura 21: Termograma das desnaturações térmicas de 24 μM de Pp 1,2-CCD e de CCD-H. Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 5: Parâmetros termodinâmicos calculados a partir dos dados experimentais da desnaturação térmica da CCD-H.

Amostra	T_{\max} (°C)	$C_{P_{\max}}$ (kcal/mol/ °C)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	ΔH_{cal} (kcal/mol)	ΔH_{vH} (kcal/mol)	$k = \Delta H_{\text{vH}} / \Delta H_{\text{cal}}$
CCD-H	48,5	20,0	5,0	124,0	132,6	1,1

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.4 Cinética enzimática da CCD-H

A cinética enzimática da CCD-H foi monitorada utilizando-se as mesmas condições que a cinética da Pp 1,2-CCD descrita na seção 3.4.1. Da curva cinética mostrada na **Figura 22**, verificamos que o comportamento geral da curva é mantido quando comparado à Pp 1,2-CCD. Entretanto, há uma aparente redução na velocidade inicial máxima atingida. A dispersão dos pontos experimentais para maiores concentrações do substrato tanto para Pp 1,2-CCD quanto para CCD-H não permite estabelecer com total segurança o *plateau* de velocidade inicial máxima. Pode-se concluir que a hélice inserida na Pp 1,2-CCD leva a alguma alteração cinética na enzima, mas sem comprometer seu desempenho geral. Os parâmetros cinéticos estão calculados na **Tabela 6**.

Tabela 6: Parâmetros calculados a partir do ajuste teórico da cinética de catálise da CCD-H por inibição do produto ácido *cis,cis*-mucônico.

Cinética por inibição CCD-H	
V_{\max} ($\mu\text{M/s}$)	$7,4 \times 10^{-3}$
K_m (μM)	141,6
K_i (μM)	697,5

Fonte: Elaborada pela autora.

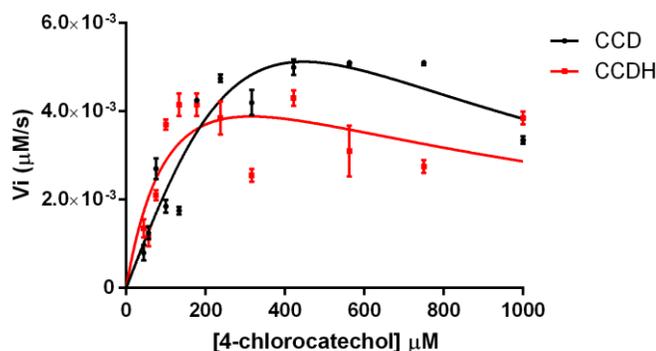


Figura 22: Curva cinética da catálise do 4-clorocatecol em ácido *cis,cis*-micônico realizada pelas enzimas Pp 1,2-CCD (preto) e CCD-H (vermelho). O ajuste da curva foi feito seguindo modelo de inibição, já conhecido para a Pp 1,2-CCD, utilizando o programa Graphpad Prism 6. Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.5 Ensaios de interação com miméticos de membrana

Sabendo que a enzima continua funcional mesmo que a adição da hélice tenha alterado seu perfil de estabilidade térmica, foram feitos testes de interação com membranas para verificar se o peptídeo H cumpre seu papel. Para isto, a estrutura secundária da CCD-H foi analisada através de espectroscopia de dicroísmo circular nas mesmas condições estabelecidas na seção 4.1.4. Esses experimentos não mostraram qualquer mudança conformacional na enzima devido à presença das diversas composições lipídicas. Os resultados estão de acordo com o esperado e podem ser observados na **Figura 23**.

O próximo passo consiste na verificação dos efeitos de lipossomos na estabilidade térmica da CCD-H. Este experimento é realizado em DSC nas mesmas condições que para a Pp 1,2-CCD. O termograma de desnaturação térmica está mostrado na **Figura 24** e os parâmetros calculados são verificados na **Tabela 7**. O resultado é semelhante àquele obtido para a Pp 1,2-CCD na presença do lipossomo, sugerindo que o peptídeo não altera o contato da enzima com as vesículas.

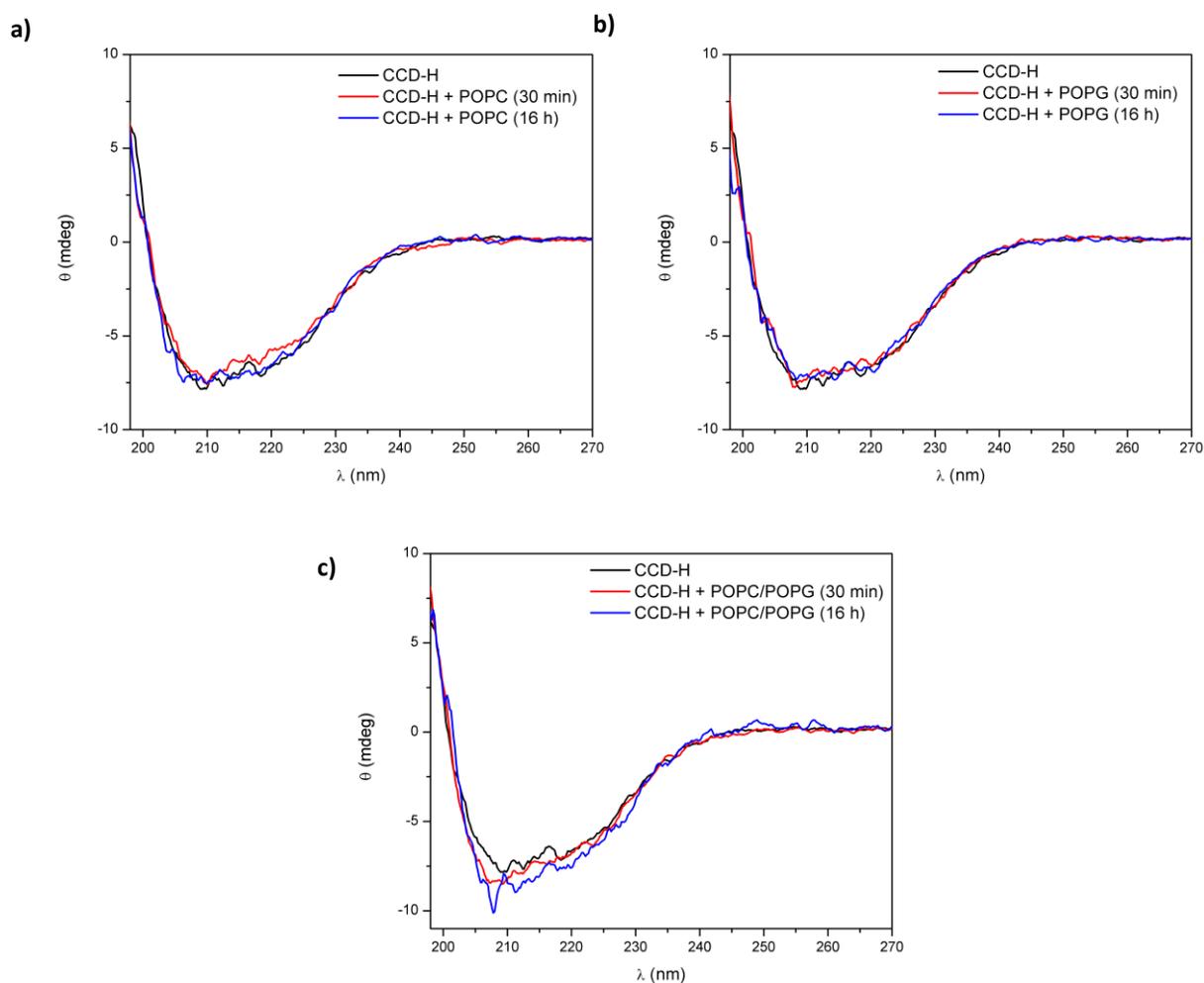


Figura 23: Espectros de CD da enzima CCD-H na região U.V. distante na presença dos lipossomos compostos unicamente de a) POPC, b) POPG e c) mistos de POPC/POPG (5/1) nos tempos de incubação de 30 minutos e 16 horas. A razão enzima/fosfolípido foi mantida em 1/20. Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 7: Parâmetros termodinâmicos calculados a partir dos dados experimentais da desnaturação térmica da CCD-H na presença de vesículas compostas de POPC/POPG (5/1).

Amostra	T_{\max} (°C)	$C_{P\max}$ (kcal/mol/ °C)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	ΔH_{cal} (kcal/mol)	ΔH_{vH} (kcal/mol)	$k =$ $\Delta H_{\text{vH}} / \Delta H_{\text{cal}}$
CCD-H + POPC/POPG	48,77	15,29	3,87	66,82	188,48	2,82

Fonte: Elaborada pela autora.

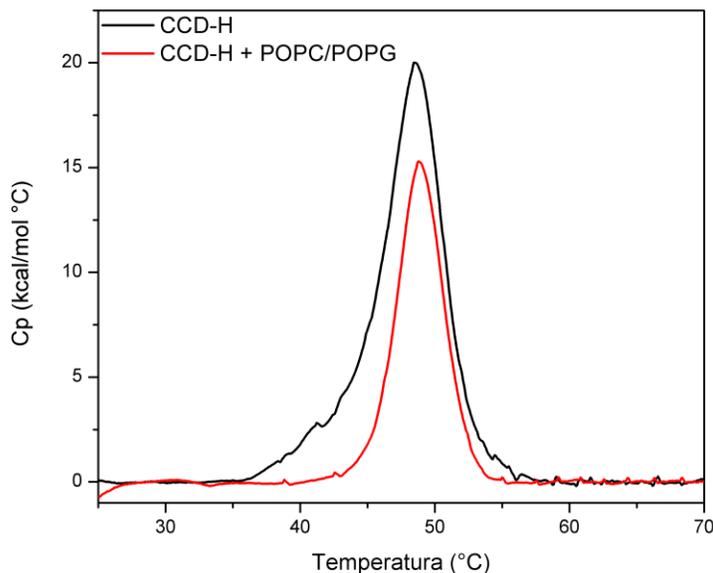


Figura 24: Termograma de desnaturação térmica de 24 μM de CCD-H na presença de vesículas grandes unilamelares de POPC/POPG 5:1 mol/mol. A razão enzima/lipídio é 1:20. Fonte: elaborada pela autora

Para finalizar, o efeito da CCD-H na superfície dos lipossomos foi examinado por espectroscopia de fluorescência como descrito no item 3.5.2, com vesículas grandes unilamelares compostas de POPC, POPG e mistas de POPC/POPG marcadas com a sonda fluorescente NBD-PE. Foram feitas medidas nas razões fosfolipídio/proteína 20:1 e 50:1 mol/mol. As interações foram distintas para as diversas condições experimentadas (**Figura 25**). Nas vesículas compostas pelo fosfolipídio zwitteriônico POPC, o NBD-PE teve sua fluorescência suprimida tanto na presença de Pp 1,2-CCD quanto de CCD-H. Para as vesículas de POPG, apenas foi observada interação com a CCD-H, sendo a interação mais intensa quando há maior densidade de proteína na superfície da bicamada (razão fosfolipídio/proteína de 20:1 mol/mol), hélice tem um papel importante quando há presença de cargas negativas na superfície das vesículas. E para as vesículas de composição mista, POPC/POPG, verificamos que a interação com a Pp 1,2-CCD acontece

apenas quando há uma razão menor de fosfolípido por proteína, mas não depende dessa proporção para a CCD-H. Para todos os casos de interação houve supressão de fluorescência, indicando que a interação das enzimas com a membrana aumenta a polaridade do meio, provavelmente devido a uma pequena desestabilização na bicamada.

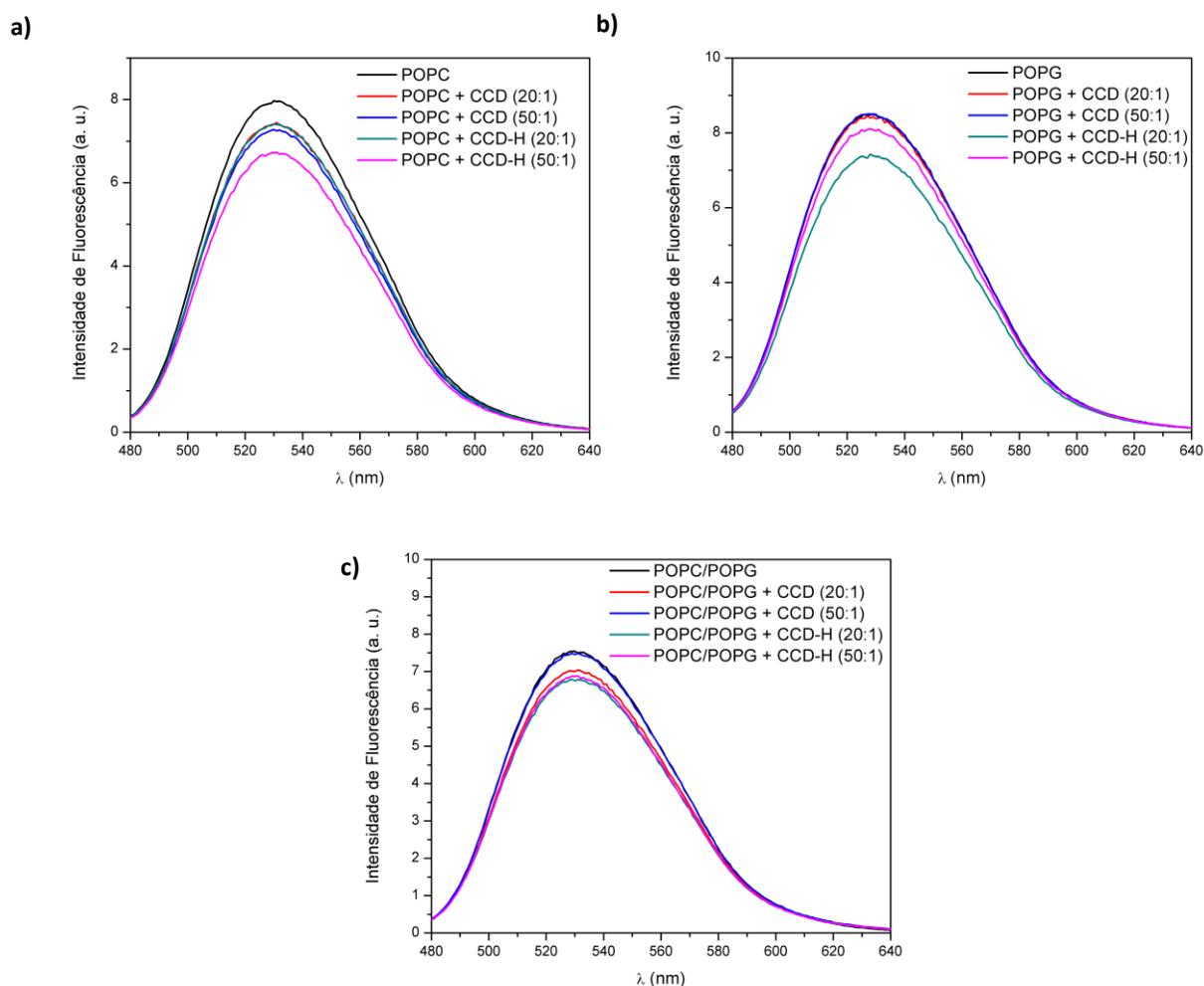


Figura 25: Perfis de fluorescência do NBD-PE associado às composições de vesícula: a) POPC, b) POPG e c) POPC/POPG, antes q após a incubação com as enzimas Pp 1,2-CCD e CCD-H nas razões fosfolípido/proteína 20:1 e 50:1 mol/mol. Fonte: Elaborada pela autora.

5 Conclusão

Este trabalho teve como foco o estudo da enzima Pp 1,2-CCD como potencial agente no processo de biorremediação voltado para o desenvolvimento de biossensores. Esta investigação aconteceu através de diversas técnicas biofísicas disponíveis em nosso grupo e em colaborações que são apresentadas ao longo desta dissertação. Os experimentos realizados buscaram explorar a interação da Pp 1,2-CCD com modelos de membrana biológica e como essa interação interfere na catálise enzimática, visando futura inserção/imobilização em membranas ou outros suportes nanoestruturados, como nanotubos de carbono.

Uma caracterização inicial mostrou que, ao final do processo de expressão e purificação, a enzima trabalhada encontrava-se pura, corretamente enovelada e ativa conforme previamente reportado na literatura [27]. O estudo de interação com miméticos de membrana, com potencial aplicação na imobilização da enzima, mostrou, através da técnica de CD, que a enzima não teve sua estrutura secundária afetada. Apesar disto, experimentos de DSC e espectroscopia de absorção óptica respectivamente mostraram que a Pp 1,2-CCD teve sua estabilidade térmica e atividade afetadas. A presença de diversos lipossomos causou uma redução na estabilidade térmica estrutural da enzima, evidenciada por uma redução da entalpia de transição, e uma diminuição na sua velocidade de reação.

A falta de evidências de que a Pp 1,2-CCD se liga fortemente a membranas biológicas somada aos resultados de que a enzima tem seu desempenho prejudicado na presença dessas estruturas, nos levou a buscar uma forma de imobilizar a proteína evitando seu contato direto com a bicamada. Foi montado um peptídeo anfifílico em forma de hélice, chamado de peptídeo H, para ser anexado na região do C-terminal da Pp 1,2-CCD. Este peptídeo deveria ser capaz de fixar a

proteína aos miméticos de membranas, servindo de interface entre bicamada e enzima, sem alterar significativamente propriedades como estrutura, estabilidade, solubilidade e atividade da nova proteína (CCD-H).

As sequências gênicas responsáveis pela codificação do peptídeo H e, subsequentemente, da proteína CCD-H foram montadas com sucesso. A expressão e purificação decorreu conforme protocolo estabelecido para a Pp 1,2-CCD sem necessidade de alteração. Ao final do processo, a CCD-H expressa no vetor pET 28a foi obtida com rendimento semelhante ao da proteína original. A proteína não teve sua estrutura secundária afetada devido à adição da hélice, mas teve sua temperatura de *melting* T_M reduzida em 2 °C. A adição do peptídeo H manteve o perfil cinético de inibição pelo produto, mas afetou a atividade da enzima reduzindo a velocidade inicial máxima da reação. Por fim, estudos de interação com membranas mostram efeitos semelhantes na estrutura e estabilidade das enzimas devido a presença dos lipossomos, mostrando que o peptídeo não desempenhou todas as funções designadas, mesmo que, ensaios de fluorescência tenham mostrado que a hélice facilita o contato com a bicamada.

II. Proteína Ligante de Acil-CoA

6 Introdução

Ésteres de acil-CoA são moléculas anfipáticas que contêm o grupamento Coenzima A (CoA), uma molécula complexa constituída por ácido pantoténico (vitamina B5), adenosina trifosfato e cisteamina, e a cadeia acila hidrofóbica (**Figura 26**). Essas moléculas detergentes formam micelas em solução aquosa com o grupo CoA exposto para a solução [35]. A concentração micelar crítica (CMC) varia com o comprimento da cadeia acila: 32 μM para o oleoil-CoA (18:1-CoA) e 42 μM para o palmitoil-CoA (16:0-CoA), mas é independente da cabeça polar [35]. A partição do acil-CoA em vesículas de fosfolípídios acontece pela inserção da cadeia apolar na bicamada [36]. O seu coeficiente de partição em membrana está entre 96 e 99 %, por isso, no interior da célula normalmente se encontra ligado à própria membrana ou a proteínas responsáveis pela manutenção das diversas funções fisiológicas nas quais está envolvido. Sua concentração solubilizada no citosol é muito reduzida para que haja auto-agregação [35,37].

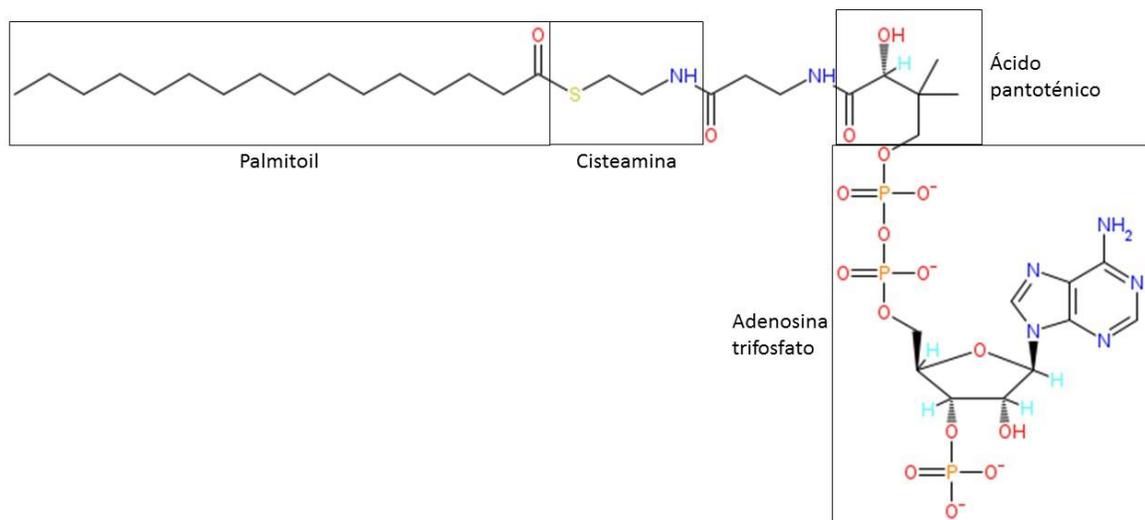


Figura 26: Estrutura química do palmitoil-CoA, um éster de acil-CoA com dezesseis carbonos na cadeia acila. Fonte: Elaborada pela Autora.

Também chamadas de Ácidos Graxos de Cadeia Longa-CoA (LCFA-CoA, da sigla em inglês), tais moléculas estão envolvidas em importantes funções fisiológicas no interior das células, tais como regulação da transcrição gênica, transdução de sinais, canais e bombas de íons, atividade de enzimas do metabolismo de lipídios e transporte de membranas [35,38]. Além disso, a adsorção dessas moléculas na membrana afeta a integridade da bicamada: vesículas de fosfatidilcolina são capazes de acomodar apenas 15 mol % de éster oleoil-CoA [36]. Por isto, torna-se evidente a necessidade de se controlar a concentração intracelular desses ésteres de acil-CoA para a manutenção do funcionamento normal da célula.

Muitas proteínas ligantes de ésteres acil-CoA já foram descobertas, como *Sterol Carrier Protein 2* (SCP2), *Fatty Acid Binding Protein* (FABP) e a *Acyl-CoA Binding Protein* (ACBP) [39]. Destas, apenas as ACBPs interagem exclusivamente com LCFA-CoA, sendo capazes de sequestrar, armazenar e prevenir a hidrólise de ésteres acil-CoA [37,38,39]. Estando diretamente relacionada ao transporte e metabolismo de LCFA-CoA, a ACBP é responsável por entregar ésteres acil-CoA para fosfolipídios, glicerolípidos e colesterol, e também para síntese de ceramidas. Através da captura do éster acil-Coa, é capaz também de impedir a inibição de sintetases de ácidos graxos e acetil-CoA carboxilases [40].

A ACBP é uma proteína codificada pelo mesmo gene que a proteína DBI (*diazepam binding inhibitor*), primeiramente identificada em 1983 por Guidotti *et al* [41], e purificada de cérebro de rato com base na sua habilidade de sequestrar o diazepam (fármaco utilizado como ansiolítico, anticonvulsivante, relaxante muscular e sedativo) do sítio de reconhecimento benzodiazepina no receptor GABA_A [42]. Posteriormente, ACBP e DBI foram independentemente isoladas e sequenciadas, quando se descobriu que eram proteínas idênticas [40, 42]. Desde então, homólogos de ACBP foram encontrados em todos os organismos distribuídos nos quatro reinos eucariotos,

com alta similaridade sequencial (~48%) (**Figura 27**) [43]. O nível de expressão varia para cada espécie, tecido e tipos de células [36,40,42]. A sua presença ao longo dos reinos e seu envolvimento em diversos mecanismos metabólicos essenciais relacionados ao éster acil-CoA levaram à conclusão de que se trata de uma *housekeeping protein*, e não uma proteína específica, confinada a um tipo especializado de célula [42, 44]. Mais recentemente foram identificadas outras proteínas capazes de ligar LCFA-CoA com exclusividade. São proteínas de maior massa molecular e que pertencem a famílias multigênicas que contêm ACBP como domínio, denominados, portanto, ACBDs (*Acyl-CoA Binding Domains*) [39].

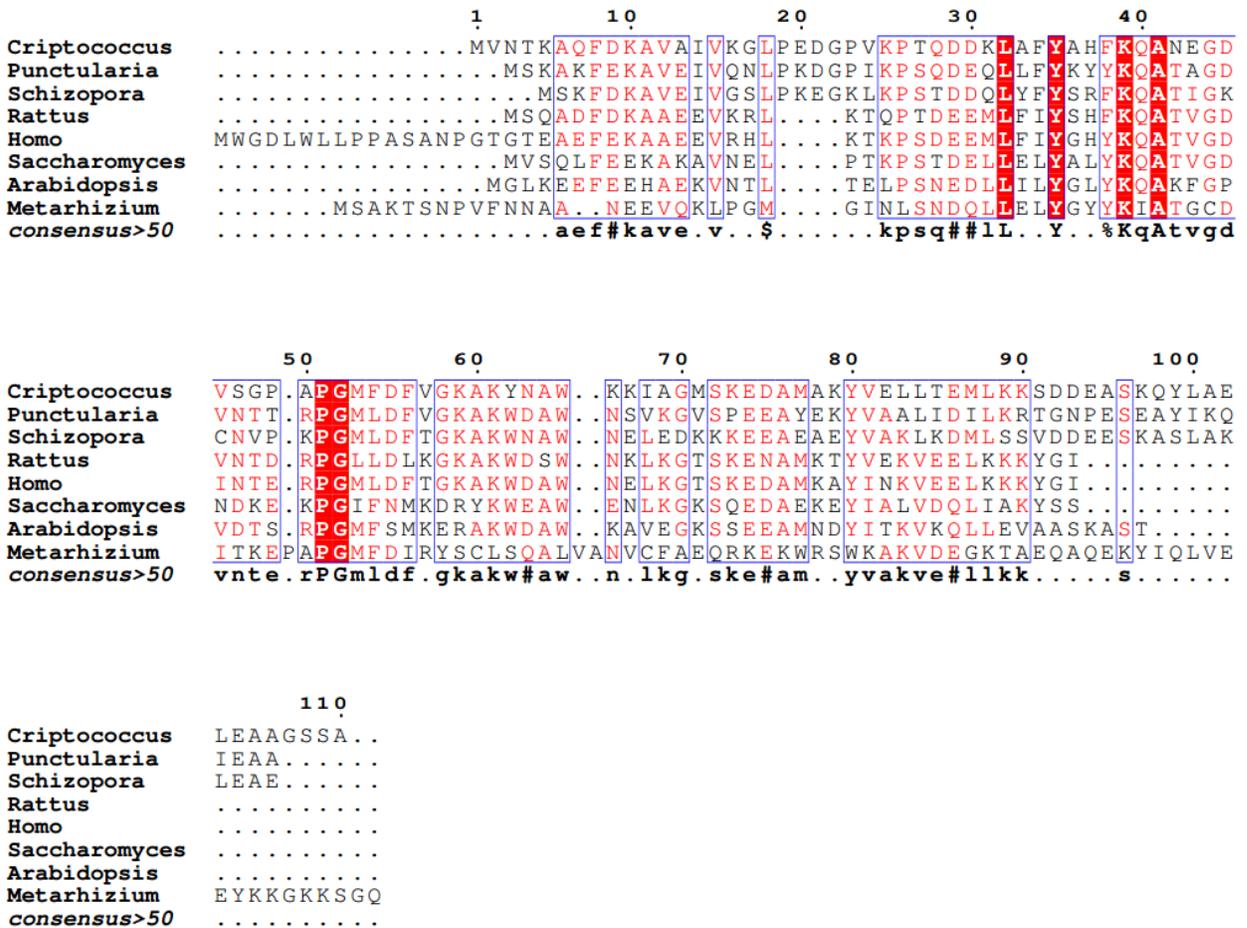


Figura 27: Alinhamento múltiplo entre ACBPs de diversos organismos. Os diferentes boxes separam regiões de alta conservação, em que as propriedades são mantidas mesmo algum resíduo tenha sido mutado. Em vermelho, os resíduos que são conservados para todas as espécies.

A ACBP é uma proteína citosólica de ~10 kDa que liga com alta afinidade (estequiometria de 1:1) ésteres acil-CoA com cadeias saturadas e insaturadas de comprimento entre 12 e 22 carbonos [39,45,46,47]. Por outro lado, ACBP liga-se a CoA livre com muito menor afinidade e não foi possível detectar qualquer interação com ácidos graxos não esterificados, indicando que ambas as interações, hidrofóbica e hidrofílica, são importantes na captura do éster acil-CoA [39,44,45,46]. A ligação da ACBP bovina com palmitoil-CoA foi estudada utilizando-se ressonância magnética nuclear (RMN) e não foi detectada mudança estrutural significativa na cadeia principal da proteína após a interação, mesmo o ligante tendo um décimo de sua massa molecular [48,49].

Constituídas por 86–92 resíduos em sua estrutura primária e livre de cisteínas, isoformas de ACBP possuem uma estrutura na qual suas 4 α -hélices (A1–A4) se acomodam com o sítio de ligação bastante exposto ao solvente, num arranjo estrutural do tipo *up-down-down-up* que se conserva nas diferentes espécies (**Figura 28 a**) [50]. Nesta conformação, a hélice A1 interage fortemente com a hélice A2, com a qual está conectada por uma pequena volta e as duas se dispõem na orientação antiparalela. As hélices A2 e A3 estão orientadas paralelamente e conectadas por um *overhand loop* de 13 resíduos [50, 51]. A hélice A3 encontra-se desarticulada das hélices A1 e A4, resultando em apenas quatro interfaces de interação hélice-hélice (**Figura 28 c**) e não seis, como é comumente encontrado em estruturas de quatro hélices (**Figura 28 b**). Essas características conferem à ACBP um enovelamento único entre as conformações conhecidas de 4 hélices [50, 51]: hélice A4 se dispõe paralela a A1 e antiparalela a A2, e está conectada a A3 por uma volta tipo II β . A hidrofobicidade desta volta é bastante conservada entre as espécies [39, 51]. As hélices A3 e A4 apresentam características anfipáticas com a face polar carregada positivamente [38]. Ao longo da evolução, os resíduos das interfaces hélice-hélice têm sido os mais conservados, sendo a interface

A1–A4 a mais conservada e a interface A2–A4 a menos conservada. As diferenças mais pronunciadas acontecem à margem das interfaces e, provavelmente, se devem à maior dinâmica estrutural [51].

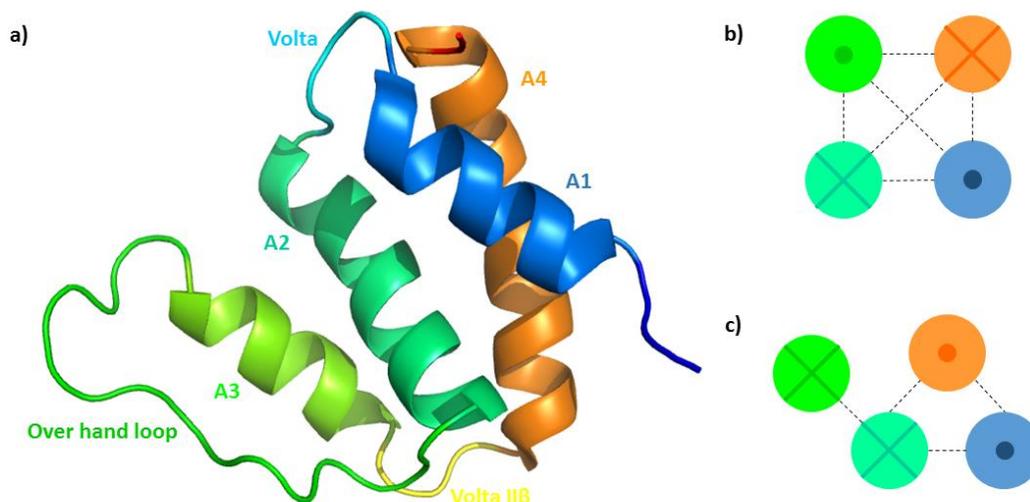


Figura 28: a) Representação da estrutura terciária da ACBP bovina (PDB 2ABD). Em azul escuro está destacado o N-terminal da proteína, em azul anil as hélice A1, em verde água a hélice A2, em verde claro a hélice A3, em laranja a hélice A4 e em vermelho o C-terminal. b) Representação das seis interfaces hélice-hélice normalmente encontradas em estruturas de quatro hélices. c) Representação das quatro interfaces hélice-hélice encontradas em ACBPs. Fonte: Elaborada pela autora.

Em se tratando de uma proteína de um único domínio com enovelamento reversível e transição de dois estados de forma cooperativa, é frequentemente utilizada como sistema modelo para estudo de dinâmica de proteína [50,52-55]. Mutações em resíduos conservados demonstraram que a interface hélice A1–A4 tem grande importância no processo de enovelamento da proteína. Esses resíduos são suscetíveis à formação de interações favoráveis ao enovelamento e suas substituições causam uma desaceleração dessa reação [51]. A diferença de energia livre entre os estados desnaturado e nativo calculada para a ACBP bovina foi de $\Delta G_{D-N} = 7,8 \pm 0,2 \text{ kcal.mol}^{-1}$ [54], e os resíduos que contribuem com o enovelamento são responsáveis pela formação de

interações hidrofóbicas entre as hélices A1, A2 e A4 e também entre A2 e A3 [54]. Por outro lado, a mutação de resíduos carregados não desestabiliza a estrutura significativamente [54].

O sítio de ligação é dividido em três subsítios classificados segundo a acomodação da estrutura do éster acil-CoA: um para o anel de adenina, um para o grupo 3'-fosfato e um para a cadeia carbônica [51]. Na mesma estrutura tridimensional da ACBP bovina em complexo com o palmitoil-CoA citada anteriormente, foi observado um bolsão hidrofóbico formado pelos anéis aromáticos da Tyr31, Tyr73 e Phe5 confinando o anel da adenina por ligações de hidrogênio entre seus prótons H1 e H6 e os átomos do grupo hidroxila fenólico da Tyr73. O resíduo Ala9 também faz ligação de hidrogênio com H6. O grupo 3'-fosfato interage fortemente com a ACBP formando ligações de hidrogênio e pontes salinas com os resíduos Tyr28, Lys32 e Lys54, contribuindo com 40% da energia total de ligação [49,51]. A cadeia acila se dobra, colapsando os seus grupamentos apolares e formando interações de van der Waals com o loop entre as hélices A2 e A3 torcendo-se

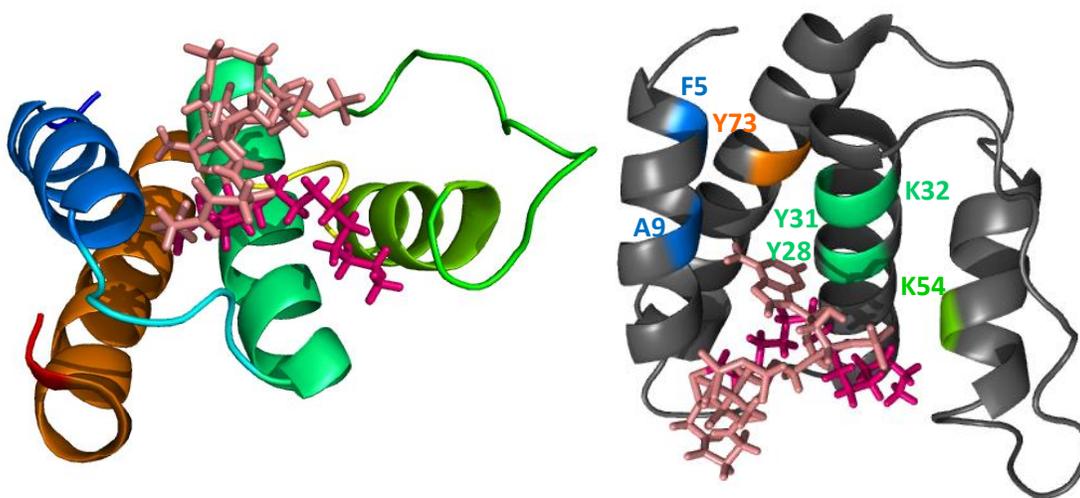


Figura 29: Representações da estrutura da ACBP bovina ligada ao palmitoil-CoA em duas perspectivas diferentes. O Palmitoil-CoA está representado em rosa – grupamento Coenzima A em rosa claro e cadeia hidrofóbia em pink – e as cores de cada hélice são preservadas. À direita estão destacados os resíduos importantes para a ligação (PDB 1ACA). Fonte: Elaborada pela autora.

perpendicularmente à A2 e tornando-se parte da plataforma de ligação hidrofóbica da unidade CoA (**Figura 29**) [39, 51].

Um outro modelo de ligação, além do complexo monomérico clássico, também foi proposto para a ACBP de fígado humano e miristoil-CoA (C14-CoA). O grupo 3'-fosfato se ancora na proteína com a cadeia acila apontada para fora do sítio de ligação e se ligando, em seguida, ao sítio hidrofóbico de outra proteína formando um dímero. Os espaços vazios de cada sítio de ligação são preenchidos com outra molécula de miristoil-CoA (**Figura 30**) [56].

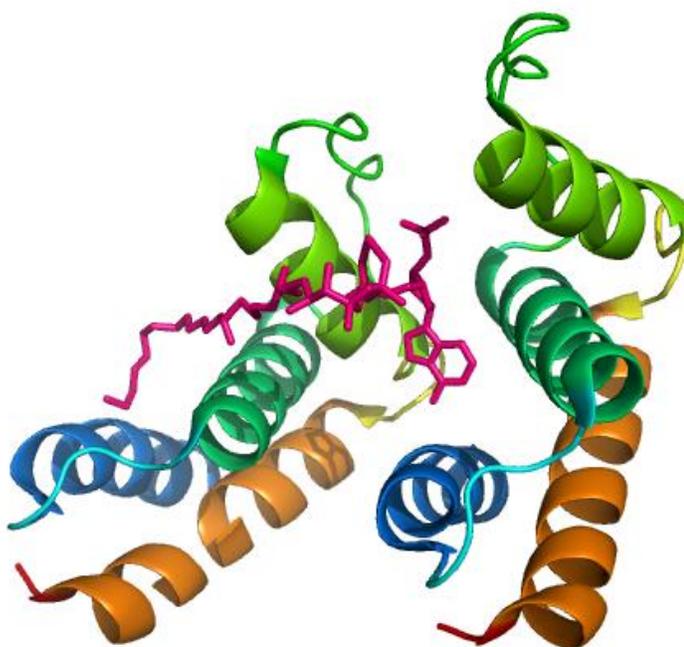


Figura 30: Representação do modelo dimérico de ligação do miristoil-CoA na ACBP de fígado humano (PDB 2CB8). Fonte: Elaborada pela autora.

Todos os resíduos envolvidos na interação com o ligante são conservados no conjunto de proteínas homólogas, e a maioria deles contém tanto um grupo funcional polar quanto um grupo hidrofóbico [54]. Os resíduos conservados cumprem o papel de otimizar simultaneamente uma gama de parâmetros que afetam o enovelamento, a estabilização e o sítio de ligação. Portanto, a

variação de um desses parâmetros afeta diretamente os outros [54]. Este fato, facilmente nos induziu à hipótese de que a interação com o ligante acarreta mudanças na dinâmica e estabilidade da proteína, que vem a ser parte do foco desse trabalho.

No que diz respeito à dinâmica de interação, as análises da variação de área de superfície acessível ao solvente (SASA) da proteína durante a reação de ligação mostram que a SASA total, polar e apolar, diminui primeiro com um rápido decréscimo e subsequente estabilização da SASA apolar [57]. Este resultado é consistente com a natureza anfipática do éster acil-CoA e, combinado com estudos termodinâmicos, também sugere que a inserção do ligante no sítio de ligação da proteína é dirigida por interações hidrofóbicas entre ambas as moléculas, através de uma compensação entálpica–entrópica [49,54,57]. Somado a isso, Vallejo *et al* também mostraram que as componentes coulombianas da energia de ligação não são as impulsionadoras da reação e sugeriram que a hidrofobicidade, além do papel essencial na captura do LCFA-CoA, pode estar relacionada com a adsorção da ACBP na membrana [57].

A afinidade da ACBP pelo éster acil-CoA é linearmente dependente do comprimento da cadeia carbônica para ligantes de até 18 carbonos na cadeia acila (C18) e a afinidade por ésteres de cadeia curta (C2–C8) é muito reduzida [46,49,58]. Esta redução de afinidade para cadeias menores provavelmente se deve à diminuição de contato do sítio hidrofóbico da proteína com os grupos metílicos no final da cadeia acila. Em estudo de ligação com o lauroil-CoA foi demonstrado que a afinidade provém majoritariamente das interações eletrostáticas entre ACBP e CoA [54]. Esse conjunto de resultados, além de evidenciar a importância da cadeia acila para a ligação, sugere que os ligantes naturais *in vivo* são LCFA-CoA [46]. Por outro lado, não há correlação entre o número de insaturação na cadeia acila e a constante de afinidade: ACBP é capaz de ligar moléculas com pouca ou nenhuma mobilidade na cadeia acila [46].

Apesar da ACBP mediar uma variedade de processos que envolvam membranas biológicas, quando se trata da interação proteína/membrana, ou da captura do éster acil-CoA da bicamada, os resultados ainda são um tanto controversos. Utilizando microscopia de força atômica (AFM), Simonsen *et al* [59] observaram que quando LCFA-CoA está adsorvido em membranas de DOPC, a ACBP se liga periféricamente à membrana. Por experimentos controle, concluíram que a associação acontece exclusivamente pelo acesso da proteína ao grupo CoA do LCFA-CoA, e não a uma eventual interação eletrostática com a membrana [59]. Também concluíram que a capacidade da proteína de capturar o éster acil-CoA está inversamente relacionada com a concentração do ligante na membrana [59]. No entanto, a AFM é uma técnica que tem a resolução comprometida pela elasticidade de amostras biológicas, além do mais sua capacidade de observar as variações na topologia não permite inferir diretamente a composição molecular da superfície [59, 60]. Contrariamente, Vallejo *et al* [61] concluíram, através de um trabalho de simulações de dinâmica molecular (MD), que há interação eletrostática entre ACBP e membrana zwitteriônica (DPPC), e que essa interação é mais forte conforme se aumenta a porcentagem de fosfolipídios negativamente carregados (DPPS) [61]. Nessa configuração, o mínimo de energia de interação acontece quando os aminoácidos carregados se aproximam da membrana e o loop entre as hélices A2 e A3 aponta para fora destas [61].

Chao *et al* [38], por sua vez, mostraram através de medidas de dicroísmo circular (CD) e fluorescência estática que a ACBP se liga especificamente a vesículas unilamelares pequenas (SUV) constituídas de fosfolipídios aniônicos, destacando a importância da carga elétrica e da curvatura para essa interação [38]. A capacidade de capturar ou doar o éster acil-CoA também estaria relacionada à composição e configuração da membrana. A ACBP preferencialmente doaria LCFA-CoA para vesículas unilamelares pequenas (SUVs) aniônicas, mas teria dificuldade de

retirá-lo dessa membrana. Por outro lado, a proteína estaria mais capacitada a extrair LCFA-CoA de superfícies neutras ou negativamente carregadas com baixa curvatura, como é o caso das vesículas unilamelares grandes (LUVs) [38]. As técnicas de dicroísmo circular (CD) e fluorescência utilizadas nesse estudo podem não ser conclusivas no estudo de interações: a primeira, CD, sendo capaz de monitorar apenas mudanças na estrutura secundária da proteína, e a segunda, fluorescência, observa mudanças no microambiente dos fluoróforos. Por isso, não se pode concluir, a partir de tais medidas, que não houve interação apenas porque não foi observada nenhuma mudança espectral. No entanto, seria possível chegar a conclusões mais aprofundadas buscando preencher essas lacunas deixadas pela literatura sobre mudanças de estrutura e estabilidade na proteína causadas pela interação com membranas neutras e carregadas utilizando essas mesmas técnicas em estudos de desnaturação proteica por exemplo. [62]

A proteína de estudo neste trabalho é a ACBP de *Cryptococcus neoformans* (CnACBP), que foi recentemente clonada e expressa pela primeira vez em nosso grupo. O interesse na ACBP surgiu da sua misteriosa relação com outra proteína estudada pelo Laboratório de Biofísica Molecular, a *Golgi reassembly and stacking protein* (GRASP), que estaria envolvida na secreção não convencional da ACBP [63]. Este trabalho traz uma caracterização inicial da CnACBP que busca esclarecer questões ainda em aberto e também aprofundar o conhecimento ainda muito vago de como cargas e a presença do ligante podem influenciar estrutura, estabilidade e função através de técnicas termodinâmicas e espectroscópicas antes de um aprofundamento de seu papel no interior da célula e interações com outras proteínas.

7 Objetivos

Nesta parte do trabalho temos como objetivos:

- Caracterização estrutural de uma proteína que teve a sua clonagem realizada pela primeira vez, a CnACBP;
- Validação de que a proteína se encontrava funcional, mostrando que ela era capaz de se ligar a ésteres de acil-CoA, seus ligantes naturais;
- Estudar mecanismos de ligação tais como mudanças estruturais, de estabilidade e influências de cargas elétricas;
- Investigar os processos de interação da proteína com modelos de membrana biológica;
- Procurar evidências de mecanismos de entrega e captura do ligante pela proteína em miméticos de membrana.

8 Materiais e Métodos

8.1 Proteínas recombinantes

8.1.1 Propagação de DNA e expressão proteica

A manutenção e propagação dos vetores plasmidiais foram realizadas em linhagens de *E.coli* DH5- α e a expressão das proteínas recombinantes em BL21 (DE3). A construção utilizada para expressão da ACBP foi o vetor pET28a que carrega uma His-Tag no N-terminal. A transformação do DNA foi realizada conforme descrito no item 3.2.1

8.1.2 Expressão

A expressão da proteína CnACBP aconteceu exatamente como descrito anteriormente para as colônias transformantes de BL21(DE3) em 3.2.2, sem a necessidade de adição de sulfato ferroso ao meio de cultura. Após a sedimentação, as células foram armazenadas a -80°C .

8.1.3 Purificação das proteínas recombinantes

A lise celular foi realizada como descrito na seção 3.2.3, e na etapa de purificação em cromatografia líquida em resina Ni-NTA Agarose (Qiagen) o extrato solúvel foi aplicado na coluna previamente equilibrada com tampão Lise e deixado sob agitação branda em mesa agitadora por 40 min. Em seguida, a coluna foi lavada com 40 ml de tampão Wash2 (Tris 20 mM, NaCl 250 mM, Imidazol 10 mM, pH 8,0) para eluição de eventuais contaminantes com afinidade pela coluna. A eluição da proteína foi feita em 10 ml de tampão Elution. A proteína purificada foi lavada com tampão Dia e concentrada para 1 ml utilizando um concentrador Amicon® Ultra-15 (Millipore).

Alíquotas para SDS-PAGE foram coletadas durante cada etapa de purificação para realização de procedimento descrito em 3.2.4.

8.1.4 Determinação da concentração proteica

Utilizando-se o valor de absorção óptica medido em 280 nm no equipamento NanoDrop 2000 da ThermoScientific, a concentração da proteína purificada foi determinada segundo a lei de Beer-Lambert, utilizando o coeficiente de extinção (ϵ) teórico baseado na sequencia primaria de aminoácidos obtido através do programa Protparam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>).

Tabela 8: Coeficiente de extinção a 280 nm (ϵ_{280}) da proteína CnACBP.

Proteína	ϵ_{280} ($M^{-1}.cm^{-1}$)
ACBP	11.460

Fonte: Elaborada pela autora.

8.1.5 Determinação do coeficiente de extinção do NBD-palmitoil-CoA

Para a determinação do coeficiente de extinção molar do NBD-palmitoil-CoA a 465 nm (ϵ_{465}) foram feitas diluições 20, 50, 100, 200 e 300 μM a partir de uma solução estoque de 1mM em tampão Dia. A absorbância de cada solução foi medida em equipamento NanoDrop 2000 da ThermoScientific e o coeficiente de extinção estimado considerando-se a lei de Beer-Lambert.

8.1.6 Cromatografia de exclusão molecular

A cromatografia de exclusão molecular foi realizada no equipamento AKTA *purifier* GE, utilizando-se a coluna de exclusão molecular Superdex 200 10/300 (GE Healthcare), previamente equilibrada em tampão Dia. O volume de amostra injetado foi de 1 ml e o fluxo de 0,5 ml/min., e foi utilizada não apenas como uma forma de purificação, mas também para estudo de oligomerização e funcionalidade da proteína. Para isso, a coluna foi calibrada com o kit de gel filtração de baixo peso (*Gel Filtration Calibration Kits*, GE Healthcare). Os padrões aplicados foram: Aprotinina (6,5 kDa), Ribonuclease A (13,7 kDa), Anidrase carbônica (29,0 kDa), Ovalbumina (44,0 kDa) e Conalbumina (75,0 kDa). O Blue Dextran foi utilizado para determinar o volume de exclusão da coluna (V_0). A massa molecular (MM) de cada proteína foi calculada por regressão linear a partir da curva de calibração $K_p \times \log (MM)$, sendo:

$$K_p = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$$

em que V_e é o volume de eluição de cada proteína e V_t , o volume total da coluna (24 ml).

Para estudo de oligomerização a CnACBP foi aplicada em suspensão de oleoil-CoA e para estudo de ligação, aplicada em suspensão de NBD-palmitoil-CoA. Neste último, foram monitoradas as absorbâncias em 280 nm e em 465 nm.

8.2 Análise de estrutura e estabilidade

8.2.1 Dicroísmo Circular (CD)

Os experimentos de CD na região do UV distante (190–260 nm) foram realizados como descrito na seção 3.3.1.

Para as medidas feitas na presença de modelos de membrana, a razão fosfolipídio/proteína foi mantida em 20:1 mol/mol. Nos experimentos com oleoil-CoA, a concentração do ligante foi mantida 1,5 vezes a concentração de ACBP. Todas as misturas foram incubadas por 30 min (mínimo), tempo considerado suficiente para que o processo de ligação atingisse o equilíbrio. A desnaturação química foi executada em gradiente de concentração de ureia e a concentração da proteína foi mantida constante para todas as soluções, com tempo de incubação de 16 h. Nos experimentos de desnaturação térmica, as proteínas foram submetidas a temperaturas de 20 °C a 95 °C, com taxa de aumento da temperatura de 1°C/min. Ao final da desnaturação, foram feitas novas medidas a 20 °C para análise da reversibilidade da proteína.

8.2.2 Dicroísmo circular por radiação síncrotron (SRCD)

Para as medidas de SRCD, a CnACBP foi purificada como descrito nos itens 8.1.3 e 8.1.6. Em seguida, dialofiltrada com tampão contendo fosfato de sódio monobásico (0,047 %) e fosfato de sódio dibásico (1,249 %), pH = 8,0. Esse tampão foi planejado para manter a força iônica de 50 mM. Então foram preparadas duas amostras de CnACBP na concentração de 30 µM e em uma delas foi adicionada a solução de oleoil-CoA a 45 µM. As duas amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e transportadas com gelo seco. As medidas foram feitas por Patricia Suemy Kumagai no laboratório de luz síncrotron do ANKA – KIT (Karlsruhe, Alemanha).

8.2.3 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Os experimentos de DSC foram realizados no mesmo equipamento e com as condições iniciais descritas em 3.3.2. A concentração de CnACBP foi fixada em 80 µM e as concentrações de

oleoil-CoA variaram de 0 a 120 μM . Como a CnACBP está sujeita a uma desnaturação térmica reversível, foram realizadas múltiplas varreduras para obtenção dos parâmetros termodinâmicos.

Tanto nos experimentos com os modelos de membrana POPC, POPG e POPC/POPG 5:1 mol/mol quanto nos modelos de membrana DMPC, DMPG e DMPC/DMPG 5:1 mol/mol a razão molar fosfolípido/proteína foi mantida em 20:1 mol/mol. A subtração da contribuição do tampão, correção da linha de base, integração das curvas calorimétricas e a desconvolução dos dados foram feitos utilizando-se Microcal Origin software para Origin 7.

8.3 Medidas de atividade

A capacidade da ACBP de se ligar ao ligante foi medida por fluorescência em estado estacionário no equipamento Hitachi F-7000, equipado com *W xenon arc lamp*. A janela de excitação e emissão dos monocromadores foi fixada em 5 nm para ensaios de ligação. As medidas foram feitas a 25°C, aguardando 3 min para que as amostras atingissem o equilíbrio térmico. Os substratos utilizados foram oleoil-CoA e o NBD-palmitoil-CoA. Para se observar mudanças na solubilização do NBD-palmitoil-CoA, a excitação foi realizada em 465 nm e o intervalo de emissão observado foi 490-600nm.

8.4 Preparo de vesículas

A preparação das vesículas decorreu conforme a seção 3.5.1. E as composições de fosfolípidios utilizadas foram: somente POPC, somente POPG, mistura POPC/POPG na proporção

5:1 mol/mol, somente DMPC, somente DMPG e mistura de DMPC/DMPG na proporção 5:1 mol/mol. O marcador fluorescente utilizado foi o NBD-PE na concentração de 0,5 mol %.

9 Resultados e discussões

9.1 Expressão e Purificação da CnACBP

A CnACBP teve seu gene clonado anteriormente em nosso grupo pelo aluno de doutorado Luís Felipe Mendes. Isto nos colocou em posição favorável para iniciarmos os estudos de caracterização do produto da codificação de tal gene. A expressão e purificação da CnACBP foi realizada com sucesso conforme descrito na seção 8.1. O rendimento final médio foi de 40 mg de proteína por litro de meio de cultura. É possível verificarmos, por análise em SDS-PAGE (**Figura 31**), que a proteína se encontra na fração solúvel e que, após as duas etapas de purificação por cromatografia, a amostra obtida está pura.

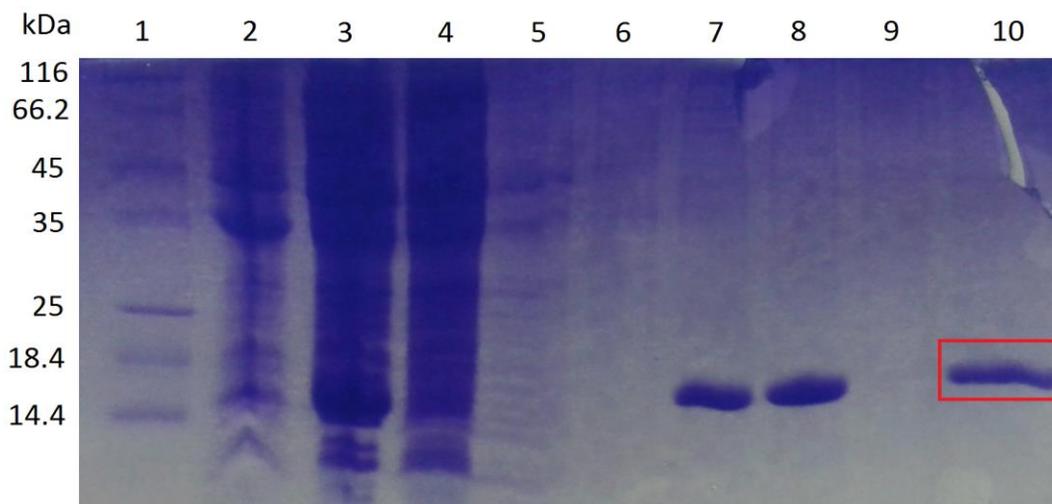


Figura 31: Resultado da purificação de CnACBP visualizado por eletroforese em gel de poliacrilamida após as diferentes etapas de purificação. Coluna 1 – marcador de massa molecular. Coluna 2 – fração insolúvel. Coluna 3 – fração solúvel. Coluna 4 – fração não ligada na coluna de níquel. Coluna 5 – eluição em tampão Lise. Coluna 6 – eluição em tampão Wash com 10 mM de imidazol. Coluna 7 – eluição em tampão Wash com 50 mM de imidazol. Coluna 8 – eluição em tampão Elution. Coluna 9 – eluição em 1 M de imidazol. Coluna 10 – amostra após a cromatografia de exclusão molecular em Supedex 75 (10/300) e utilizada para realização dos experimentos. Fonte: Elaborada pela autora.

No gel também é observado, através do padrão de migração da proteína, que ela apresenta uma massa aparente entre 15 e 16 kDa, condizentes com os 11,9 kDa calculados através do programa ProtParam acrescidos dos 2 kDa da cauda de histidina. Além do mais, alguns fatores como alta hidrofobicidade ou estado de redução podem causar uma variação de 2–4 kDa na massa aparente [64].

9.2 Caracterização estrutural da CnACBP – Estrutura secundária

Uma análise da estrutura secundária da CnACBP foi feita através da técnica de espectroscopia de SRCD descrita na seção 8.2.2. O espectro obtido (**Figura 32**) apresenta dois picos negativos de intensidade similar em 208 e 222 nm, e um pico positivo em 192 nm. Esse perfil espectral é característico de estruturas com predominância de α -hélices, como seria esperado para domínios ligantes de ésteres de acil-CoA (ACBDs). Infelizmente, nenhum espectro de ACBD foi encontrado no banco de dados de dicroísmo circular (PCDDDB - <http://pcddb.cryst.bbk.ac.uk/home.php>) para análises comparativas, mas a desconvolução do espectro, utilizando o método CDSSTR e o data set 5 (178–260 nm), confirma a análise qualitativa indicando que a CnACBP é composta de 52 % de α -hélices, 4 % de fitas- β , 26 % de estruturas do tipo volta e 17 % de outras estruturas ou desordenadas. Esses resultados mostram que a proteína clonada, expressa e purificada seguindo-se o protocolo acima está corretamente enovelada, como era esperado de uma proteína com estrutura predominantemente em α -hélice.

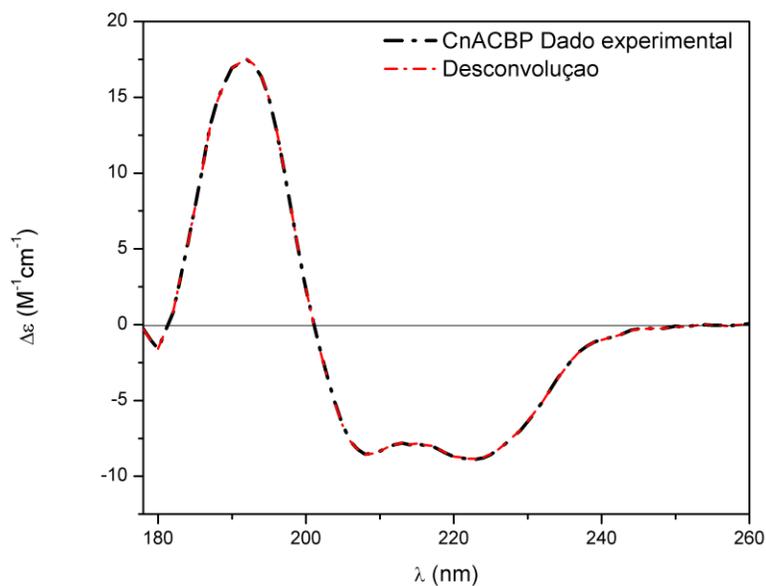


Figura 32: Espectro de SRCO (linha preta) da CnACBP e sua respectiva desconvolução (linha vermelha). Fonte: Elaborada pela autora.

9.3 Estudos de oligomerização – Estrutura quaternária

A cromatografia por exclusão molecular é uma etapa da purificação que nos permite avaliar, além da pureza, o estado oligomérico da proteína. A partir do perfil de eluição (**Figura 33**), verificamos um pico único e estreito de absorção em 280 nm, sugerindo que a amostra se encontra pura e monodispersa.

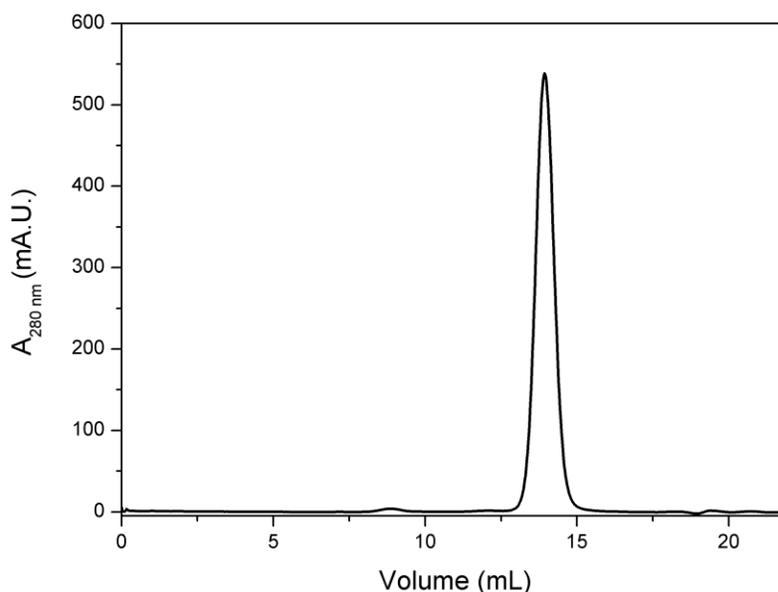


Figura 33: Perfil cromatográfico da CnACBP em cromatografia por exclusão molecular utilizando a coluna Superdex 75 (10/300). Fonte: Elaborada pela autora.

Com o intuito de seguirmos com a caracterização estrutural de CnACBP e dada a ausência de informações sobre sua estrutura tridimensional em alta resolução (quer por cristalografia ou por RMN), realizamos experimentos a fim de obtermos dados acerca do estado de oligomerização da proteína produzida ao fim de nosso protocolo. Para isso, o perfil de eluição da CnACBP foi comparado com o de outras proteínas de massa molecular conhecida, conforme descrito no item 8.1.6. A curva de calibração (**Figura 34**) da coluna foi obtida a partir da relação linear entre o coeficiente de partição de cada proteína de referência e o logaritmo da respectiva massa molecular.

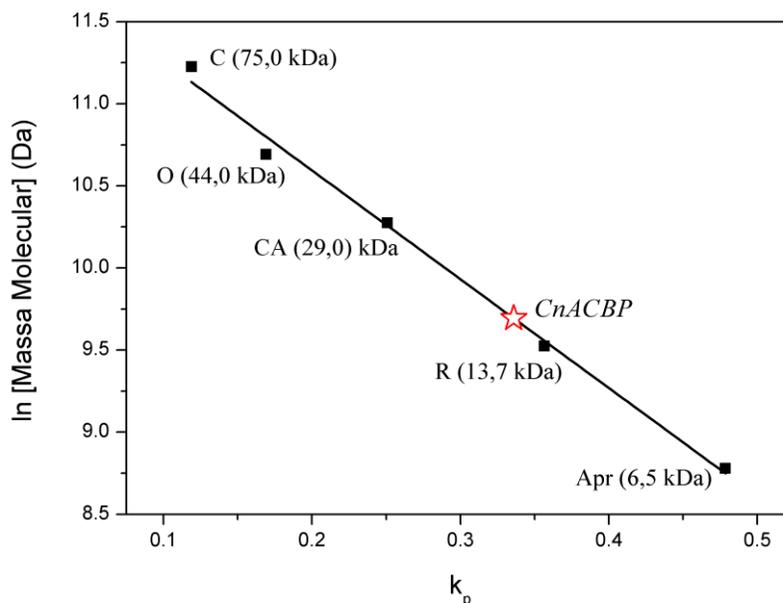


Figura 34: Regressão linear para a determinação da função que correlaciona massa molecular e volume de eluição dos marcadores molecular aplicados: Conalbumina (C), Ovalbumina (O), Anidrase carbônica (CA), Ribonuclease A (R) e Aprotinina (Apr) na coluna Superdex 75 (10/300). Fonte: Elaborada pela autora.

A massa molecular aparente encontrada para a CnACBP em solução foi de 16,2 kDa, o que é condizente com aquela observada no processo de eletroforese e sugere uma estrutura quaternária monomérica. Tais resultados, juntamente com os dados de SRCD e desconvolução, indicam que a proteína produzida se encontra corretamente enovelada e seu estado oligomérico é condizente com aquele esperado para proteínas da família ACBP.

9.4 Estudo de ligação da CnACBP com éster de acil-CoA

Além de uma confirmação de que a proteína se encontra em uma forma enovelada (**Figura 32**) e da caracterização de sua estrutura quaternária, era necessário sabermos se a proteína

trabalhada era também funcional (por funcional entende-se a capacidade da proteína de ligar éster de acil-CoA). Para isto, realizamos experimentos com a proteína na presença do ligante oleoil-CoA adicionado à solução de CnACBP numa concentração final de 1,5 vezes a concentração de proteína. Esta razão de concentrações foi escolhida com base na hipótese de que a CnACBP, em sendo monomérica como concluído a partir dos dados de cromatografia (**Figura 34**) e se comportando como outras ACBPs, deve se ligar ao éster de acil-CoA na proporção de uma proteína para uma molécula de ligante, neste caso, o ligante estaria em excesso garantindo que todas as proteínas estivessem ligadas. Preposição confirmada a partir dos dados de DSC que serão explorados ao longo do texto.

A primeira série investigativa acerca da ligação entre ACBP e um éster de acil-CoA foi feita utilizando-se novamente um método cromatográfico. Uma comparação entre os estados de oligomerização da proteína na presença e na ausência do ligante (**Figura 35**) revelou um pequeno deslocamento no pico de absorção para esta última condição, indicando um aumento da massa molecular que pode ser justificado pelo incremento devido à massa do ligante, o que não caracterizaria uma mudança no estado oligomérico. Portanto, a proteína produzida é capaz de se ligar ao éster de acil-CoA usado, indicando sua atividade funcional, e permanece na forma de monômero nas duas condições, refutando, assim, modelos mais complexos de ligação envolvendo CnACBP e oleoil-CoA em que se sugere a formação de dímeros e hexâmeros [56].

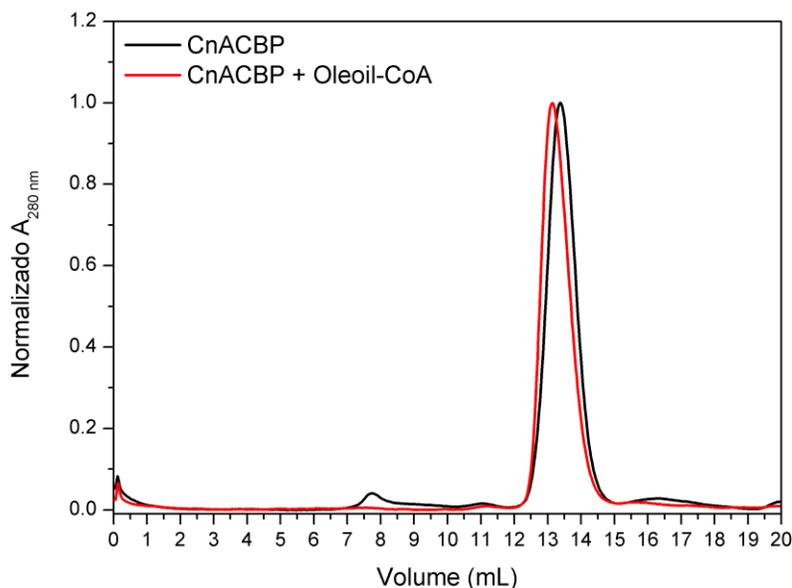


Figura 35: Comparação entre os perfis de eluição da CnACBP na presença e na ausência do ligante oleoil-CoA utilizando a coluna Superdex 75 (10/300). Fonte: Elaborada pela autora.

Ainda buscando esclarecer se a proteína estava mesmo ligando moléculas do tipo LCFA-CoA, foi realizado um experimento de cromatografia por exclusão molecular da CnACBP em solução com o ligante NBD-palmitoil-CoA. O uso do referido ligante com a sonda fluorescente NBD é adequado já que sua absorção óptica está centrada em 465 nm, o que permite monitoramento simultâneo das absorções da proteína e do ligante, pois estes ocorrem em comprimentos de onda distintos. O coeficiente de extinção molar do ligante foi calculado através de medidas de absorção óptica de diferentes diluições do NBD-palmitoil-CoA, diretamente no tampão Dia, em concentrações conhecidas. Este procedimento está descrito em 8.1.5. O valor obtido foi de $\epsilon_{465} = 18.850 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (**Figura 36**).

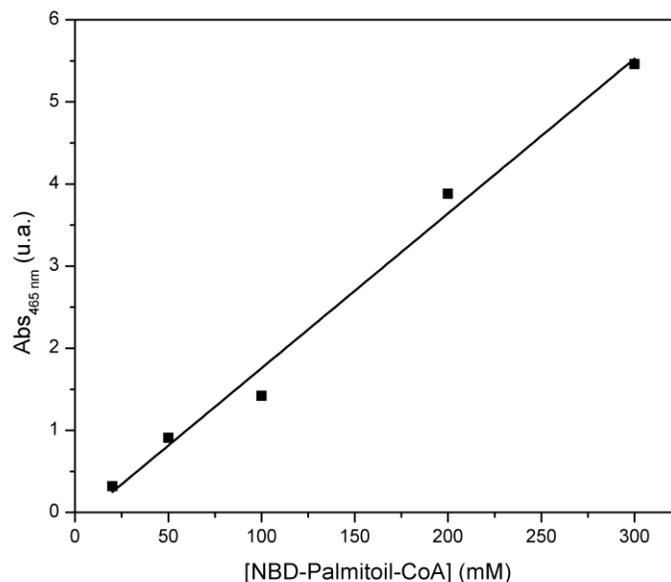


Figura 36: Determinação do coeficiente de extinção molar em 465 nm para o NBD-palmitoil-CoA através de ensaio de absorção óptica. Fonte: Elaborada pela autora.

Após a mistura das soluções de CnACBP e NBD-palmitoil-CoA, a solução final foi novamente submetida à cromatografia na mesma coluna de exclusão molecular, desta vez monitorando-se as absorções em 280 e 465 nm. O resultado é apresentado na **Figura 37**, onde observamos que as eluições da CnACBP e do NBD-palmitoil-CoA ocorreram de forma simultânea, o que não seria esperado para moléculas de tamanhos tão distintos, a não ser que estivessem ligadas uma à outra. Acrescente-se a isto o fato do perfil de ambas as curvas serem similares, ou seja, tanto proteína como ligante estão igualmente dispersos na solução. Portanto, podemos concluir que o NBD-palmitoil-CoA se ligou à proteína, evidenciando, assim, a capacidade desta última de ligar-se ao éster-CoA, o que indica sua atividade como uma ACBP.

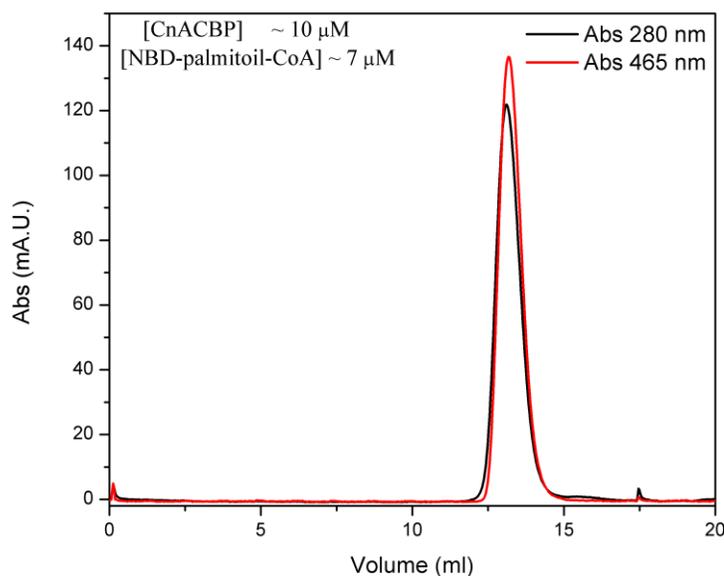


Figura 37: Perfil de eluição da CnACBP monitorando absorção em 280 nm e do NBD-palmitoil-CoA monitorando absorção em 465 nm utilizando a coluna Superdex 75 (10/300). Fonte: Elaborada pela autora.

Além disso, a partir do coeficiente de extinção da proteína e do ligante foram calculadas as respectivas concentrações. Os valores encontrados foram de aproximadamente 10 μM de CnACBP e 7 μM de NBD-palmitoil-CoA. A concentração de proteína é condizente com o valor aplicado à coluna e a concentração do ligante ligado a ela está condizente com a proporção estequiométrica esperada (1:1). Apesar disso, não foi possível monitorarmos a fração do LCFA-CoA não ligado, pois a concentração do ligante na solução inicial é maior que a sua concentração micelar crítica (CMC), o que provavelmente fez com que o éster de acil-CoA que não fosse solubilizado pela CnACBP permanecesse na forma micelar e ficasse retido no filtro da coluna. Ao lavarmos a coluna com etanol, as micelas se desfizeram e o restante do NBD-palmitoil-CoA foi eluído.

9.5 Caracterização da interação proteína–ligante

Para investigarmos os mecanismos de interação proteína-ligante foram realizados diversos experimentos utilizando-se as técnicas de CD e SRCD. O ligante em estudo foi o oleoil-CoA empregado sempre na concentração de 1,5 vezes maior do que a concentração de ACBP.

Dos espectros de SRCD observados na **Figura 38** é possível verificarmos que a presença do ligante não altera significativamente a estrutura secundária da proteína que passa a apresentar 69 % de α -hélices, 12 % de fitas- β e 18 % de estruturas do tipo loops e desordenadas. Estes dados corroboram resultados anteriores de RMN para ACBP bovina [48], em que o ligante não leva a rearranjos de estrutura secundária pronunciados na proteína.

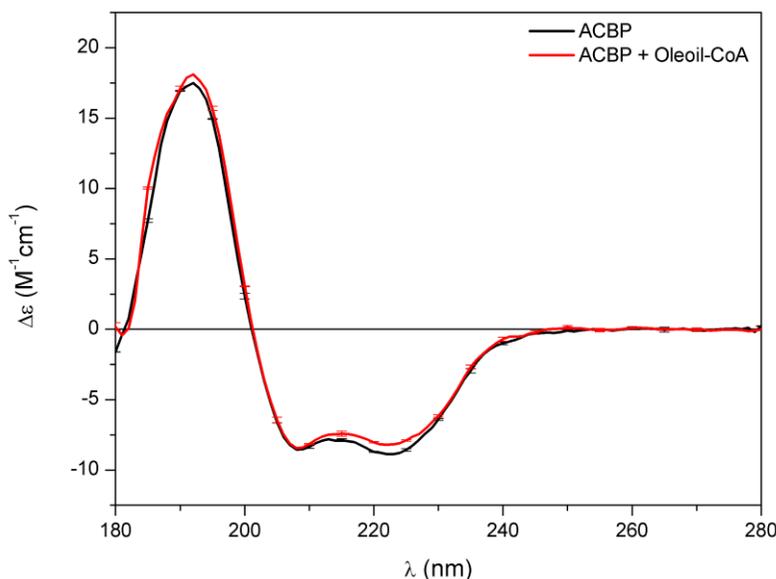


Figura 38: Espectros de SRCD da CnACBP. Em preto, está representado o espectro da proteína isolada e, em vermelho, o espectro da proteína na presença do ligante oleoil-CoA. Fonte: Elaborada pela autora.

Aprofundando os estudos da influência do ligante na estrutura e dinâmica da CnACBP, foi monitorada a variação da intensidade da banda de CD em 222 nm induzida pela mudança de temperatura nas amostras (**Figura 39**) com objetivo de avaliarmos a influência do ligante sobre o perfil de estabilidade térmica da proteína. Para estimarmos a fração de proteínas desenoveladas (F_D) em cada temperatura, consideramos que no menor valor da absorção em 222 nm (θ_E) a proteína estava completamente enovelada e no maior (θ_D), estava completamente desenovelada. Então, a normalização foi feita segundo a equação:

$$F_D = \frac{\theta_E - \theta}{\theta_E - \theta_D}$$

A mesma análise foi realizada em estudo de desnaturação química para concentrações de ureia variando de 0 a 10,5 M (**Figura 41**).

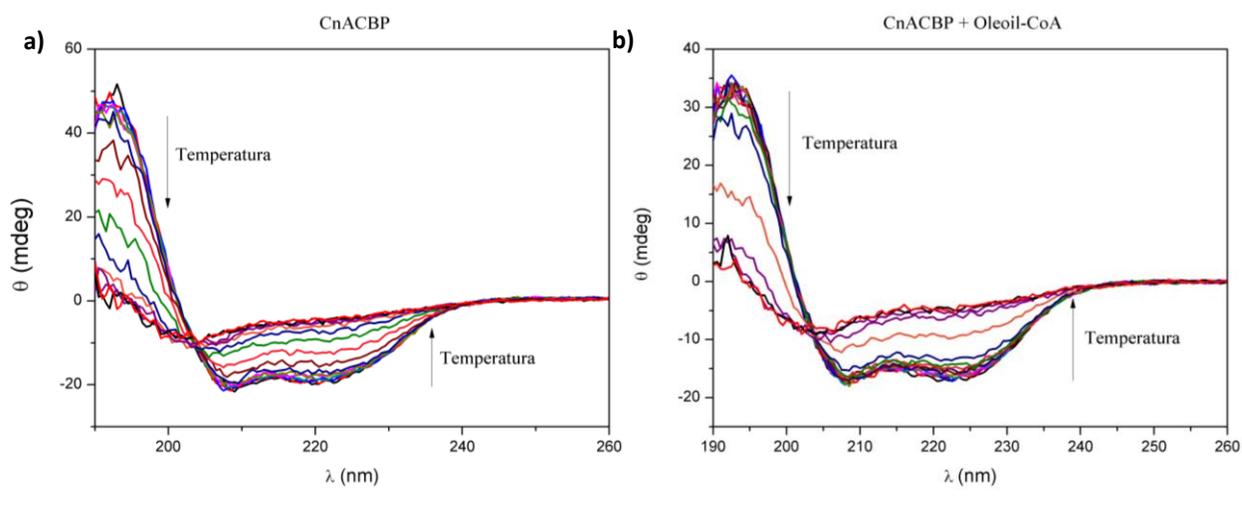


Figura 39: Desnaturação térmica da proteína CnACBP monitorada por CD na região do UV distante em um intervalo de 15 °C a 95 °C. a) Apo CnACBP b) CnACBP ligada ao oleoil-CoA. As setas indicam o aumento de temperatura. Fonte: Elaborada pela autora.

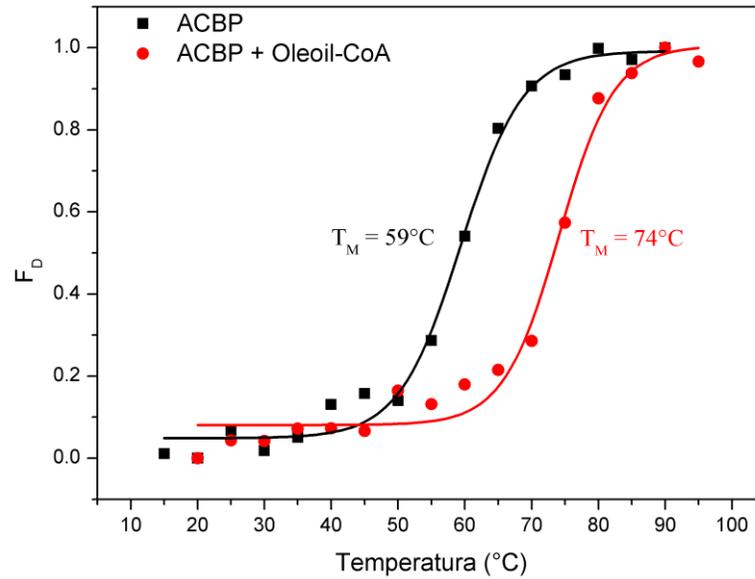


Figura 40: Variação da fração de proteína desovelada (F_D) em função da temperatura através do monitoramento da intensidade da banda em 222 nm nos respectivos espectros de CD. Fonte: Elaborada pela autora.

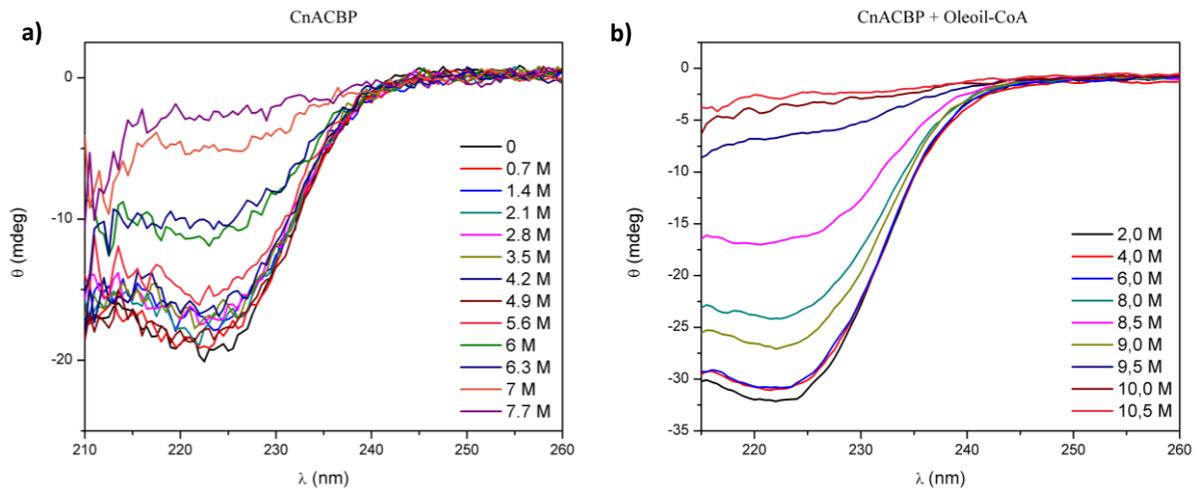


Figura 41: Desnaturação química da proteína CnACBP monitorada por CD na região do UV distante em um intervalo de 0 M a 10,5 M de ureia. a) Apo CnACBP b) CnACBP ligada ao oleoil-CoA. Fonte: Elaborada pela autora.

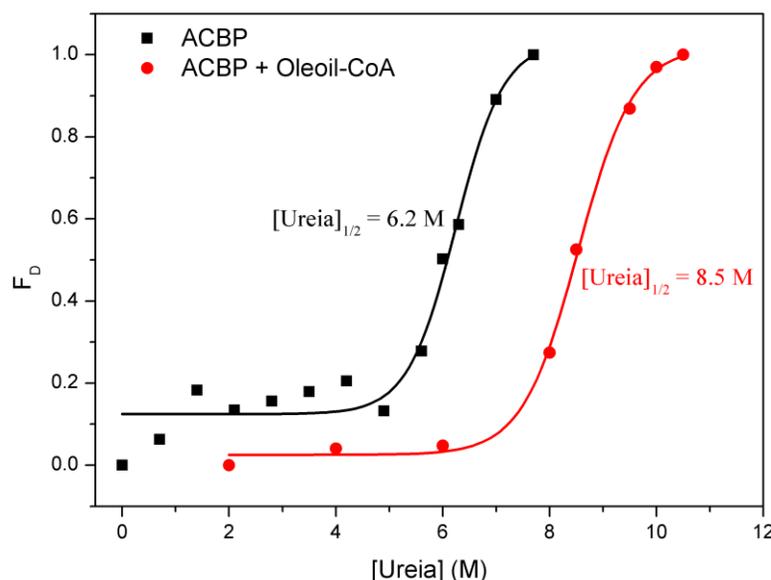


Figura 42: Variação da fração de proteína desenovelada (F_D) através do monitoramento da banda em 222 nm para concentrações de ureia variando de 0 a 10,5 M. Fonte: Elaborada pela autora.

Nas **Figura 40** e **Figura 42** verificamos que a CnACBP é uma proteína significativamente estável e que todas as amostras apresentam perfis de desnaturação similares a uma curva sigmoidal, típico de sistemas com transições cooperativas. O que impressiona nesses resultados é o impacto do éster de acil-CoA na estabilidade da proteína. Na desnaturação térmica, é observado um deslocamento de 15 °C na temperatura de *melting* (T_M) e a concentração de ureia necessária para desenovelar 50 % do total de CnACBP em solução aumenta em mais de 2 M. Estes resultados indicam que a presença do ligante estabiliza fortemente os bolsões hidrofóbicos, permitindo um aumento significativo na estabilidade estrutural, mesmo na presença de agentes caotrópicos.

Medidas de DSC foram realizadas conforme 8.2.3 e nos permitiram avaliar mais detalhadamente a mudança de estabilidade no comportamento termotrópico da CnACBP devido à presença do ligante. Na **Figura 43** temos os perfis calorimétricos da proteína sujeita a soluções

contendo diferentes concentrações do ligante oleoil-CoA. Observamos que o perfil de desnaturação da proteína sem o ligante não acontece em um evento único endotérmico, apresentando dois picos distintos: o primeiro bastante intenso centrado em $T_{\max,1} = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o segundo mais suave centrado em $T_{\max,2} = 74\text{ }^{\circ}\text{C}$ (**Tabela 9**). Conforme a razão proteína/ligante diminui, há um aumento da intensidade do segundo pico e uma diminuição da intensidade do primeiro até que, na condição de 1 mol de CnACBP para 1,5 mol de oleoil-CoA, já não são detectados dois eventos endotérmicos, mas apenas um com $T_{\max} = 70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Em experimentos de DSC, a manifestação mais óbvia dos efeitos do ligante na proteína é a mudança de T_M . Desta análise qualitativa simples, inferimos que o segundo evento observado no termograma da solução de proteína sem adição de ligante deve estar atribuído à CnACBPs que já vêm ligadas a LCFA-CoA presentes na *E. coli* e permaneceram ligadas após o processo de purificação. Portanto, os dois picos no perfil do termograma correspondem às desnaturações distintas da proteína na forma apo e ligada.

Segundo o princípio de Le Chatelier, quando qualquer ligante se ligar preferencialmente à proteína na sua forma nativa ou enovelada, esta interação irá estabilizar o estado enovelado e a desnaturação da proteína se tornará cada vez menos favorável conforme a concentração do ligante aumentar [65]. A partir de análises da **Figura 43** e **Tabela 9**, podemos concluir mais uma vez que o ligante estabiliza consideravelmente a estrutura da proteína deslocando o equilíbrio da reação de forma a desfavorecer a desnaturação, apesar do deslocamento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ na temperatura de *melting* ser menor que o obtido por desnaturação térmica em CD. Outra conclusão importante é que condição preestabelecida de 1,5 mol de ligante para um mol de proteína é suficiente para garantir que todas as proteínas se encontrem na forma ligada.

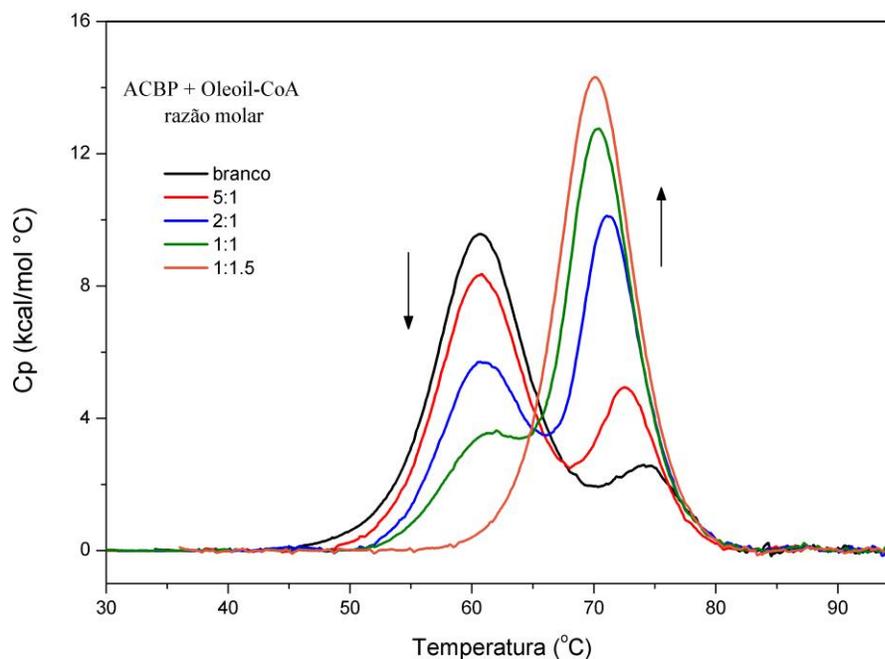


Figura 43: Termograma de DSC ilustrando o efeito do ligante do oleoil-CoA na estabilidade térmica da proteína CnACBP. Fonte: Elaborada pela autora.

Os parâmetros termodinâmicos envolvidos no desenovelamento da CnACBP estão calculados na **Tabela 9**. A entalpia de van't Hoff (ΔH_{vH}) é uma estimativa da entalpia de transição independente baseada num modelo de transição de dois estados e está relacionada com a dependência da constante de equilíbrio (K) com a temperatura [65]. Ela foi calculada apenas para a razão proteína/ligantes de 1:1,5 mol/mol, pois é a única condição que não envolve etapas intermediárias na transição de fase. O parâmetro ΔH_{vH} pode ser definido como a variação de entalpia por mol de unidade cooperativa e a sua comparação com o parâmetro obtido experimentalmente pode ser informativo [65]. Se o modelo escolhido estiver correto e envolver uma transição de dois estados, a razão $k = \Delta H_{vH}/\Delta H_{cal}$ estará relacionada com o estado oligomérico da proteína. A partir desta razão confirmamos que a proteína se mantém monomérica quando ligada.

Tabela 9: Parâmetros termodinâmicos obtidos da análise do termograma de DSC da transição de fase da CnACBP na presença de diferentes concentrações do ligante oleoil-CoA.

Amostra	T _{max,1} (°C)	T _{max,2} (°C)	C _{Pmax} (kcal/mol/ °C)	ΔT _{1/2} (°C)	ΔH _{cal} (kcal/mo l)	ΔH _{vH} (kcal/mo l)	k = ΔH _{vH} /ΔH _{cal}
ACBP (80 μM)	60,7	74,5	9,6	8,8	113,8		
ACBP / CoA 1:1.5 (80/120 μM)	–	70,1	14,3	7,2	115,5	116,0	1
ACBP / CoA 1:1 (80/80 μM)	61,4	70,4	12,8	6,5	119,5		
ACBP / CoA 2:1 (80/40 μM)	60,7	71,2	10,1	15,1	117,6		
ACBP / CoA 5:1 (80/16 μM)	60,7	72,5	8,3	8,5	109,3		

A entalpia de van't Hoff (ΔH_{vH}) foi calculada pela equação $\Delta H_{vH} = 4R(T_{max})^2 C_{Pmax} / \Delta H_{cal}$, em que R é a constantes dos gases ideais (1.987 cal K⁻¹ mol⁻¹) e T_{max} é a temperatura absoluta em C_{Pmax}. Fonte: Elaborada pela autora.

9.6 Experimentos de interação com miméticos de membrana biológica

Considerando a função da ACBP de solubilizar ésteres de acil-CoA contidos na membrana das células, surge o questionamento natural sobre a influência da bicamada lipídica no processo de captura. Trabalhos publicados por diferentes grupos até hoje neste tópico ainda são muito controversos e não apresentam uma análise dos fatores moleculares envolvidos na situação [38,59-61]. Buscando preencher essas lacunas, foi realizado um estudo do efeito de diferentes miméticos de membrana na estrutura e estabilidade da proteína.

Em uma primeira abordagem, foram monitoradas por CD as mudanças estruturais induzidas na CnACBP pela presença de moléculas anfipáticas com diferentes propriedades elétricas. Os

ensaios foram realizados para gradientes de concentração de SDS, um detergente carregado negativamente; CTAB, com carga positiva e CHAPSO, sem carga, sendo preparada uma solução de proteína para cada concentração de detergente. A exposição da CnACBP a meios com propriedades distintas tem como objetivo avaliar quais dessas propriedades podem influenciar no arranjo estrutural da proteína.

As três moléculas estudadas têm propriedades surfactantes como os ésteres de acil-CoA, mas cada uma delas apresenta uma composição de cargas específica. A primeira conclusão que podemos tirar dos perfis na **Figura 44** é que a estrutura da CnACBP não é afetada pela presença do detergente sem carga, CHAPSO, que não causou alteração no espectro para nenhuma das concentrações experimentadas (antes ou depois de atingida a sua CMC de 8,0 mM). Por outro lado, a proteína se mostrou sensível tanto à presença de carga positiva quanto negativa. Anteriormente, Andersen & Otzen [66] já haviam demonstrado que surfactantes não iônicos têm preferência por auto agregação a ligar-se a proteínas, mas que cadeias de sulfato de alquila têm maior afinidade pela ACBP do que por auto agregação.

O CTAB, detentor de cargas positivas, é o primeiro a afetar a estrutura da proteína. Esse fenômeno é observado mesmo na concentração de apenas 1,5 vezes a concentração proteica, a mesma utilizada nos experimentos com LCFA-CoA. Quando sujeita à variação de concentração do SDS, a ACBP apresenta uma mudança estrutural mais gradual. No entanto, a proteína é afetada apenas pelas moléculas em solução. Após a CMC dos respectivos detergentes ser atingida, 0,92 mM para o CTAB e 8,2 mM para o SDS, não é mais possível se observar mudança estrutural mesmo com o aumento da concentração total de detergente, como também já foi observado por Andersen *et al* [67]. A diferença de sensibilidade ao CTAB e ao SDS pode estar relacionada com o comprimento da sua cadeia carbônica visto que as interações hidrofóbicas estabilizam o contato

proteína–surfactante fazendo com que o poder desnaturante aumente com a cadeia alquila [66,67]. Considerando a distribuição de cargas da proteína, na qual existe uma predominância de resíduos com cargas positivas no sítio de ligação, enquanto o lado da proteína oposto ao sítio é repleto de cargas negativa [66], não seria estranho que a proteína reagisse de alguma forma a mudanças eletrostáticas do meio. Isto também sugere que o detergente aniônico (SDS) sofrerá interações eletrostáticas com o sítio de ligação, preferencialmente.

Seguindo uma gradação de complexidade, passamos de micelas de surfactantes para vesículas de fosfolipídios. Os lipossomos foram preparados conforme descrito na seção 8.4 e a adição de proteína à solução respeitou a proporção 20 fosfolipídios por proteína. Após essa mistura, foram realizadas medidas com dois tempos de incubação, 30 min e 16 h. Também foram realizadas desnaturações térmicas da proteína na presença das diferentes composições de mimético de membrana (**Figura 45**).

Dos perfis de CD observados na **Figura 45** e das respectivas desnaturações térmicas, verificamos novamente que a CnACBP é mais afetada por ambientes eletricamente carregados. Na presença de lipossomos sem carga líquida deve ter ocorrido a precipitação de uma parte da amostra evidenciado pela redução na intensidade do sinal após a incubação por 16 h. Não é possível observarmos mudanças na estrutura secundária devido à presença de lipossomos zwitteriônicos, ou mesmo compostos com 20 % de fosfolipídios carregados. Na presença de lipossomos de POPG (**Figura 45 e**), por outro lado, a mudança na forma do espectro sugere que as cargas negativas afetam a estrutura secundária de imediato.

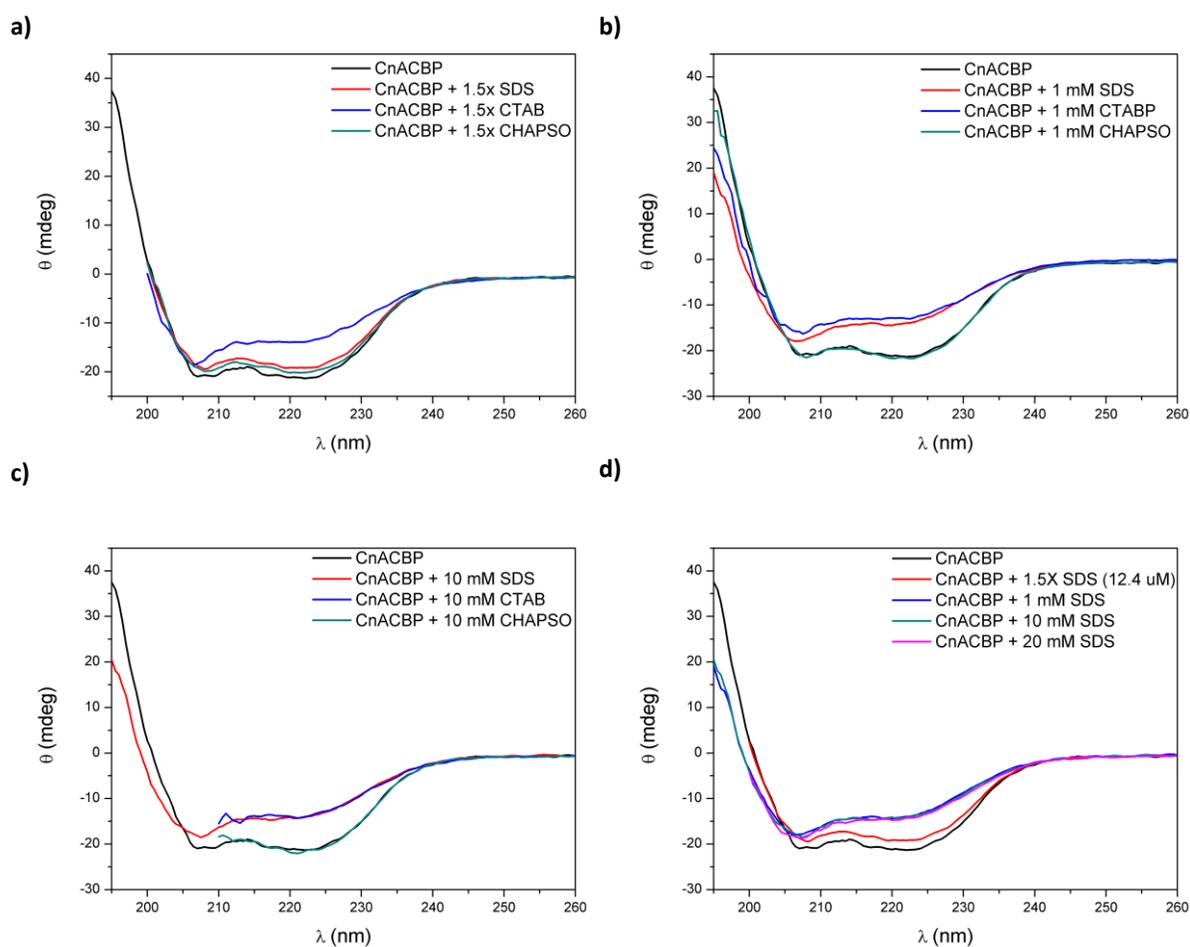


Figura 44: Espectros da CnACBP na presença dos detergentes SDS, dotado de carga negativa, CTAB, dotado de carga positiva e CHAPSO, sem carga. a) os detergentes se encontram na concentração 12,4 μM (1,5 vezes a concentração de proteína); b) os detergentes se encontram na concentração de 1 mM; c) a concentração de cada detergente é de 10 mM e d) comparação entre o efeito do SDS para cada concentração experimentalada. Fonte: Elaborada pela autora.

Do ponto de vista termodinâmico podemos constatar que as interações elétricas com a bicamada lipídica reduzem a estabilidade da proteína. Ainda na **Figura 45** observamos que as vesículas de POPC (b) e de POPC/POPG (d) não alteram em nada a transição do estado enovelado para o desenovelado, mantendo o valor de T_M em 60 °C. Por fim, as vesículas de POPG causam uma desestabilização da proteína reduzindo o valor de T_M em 20 °C.

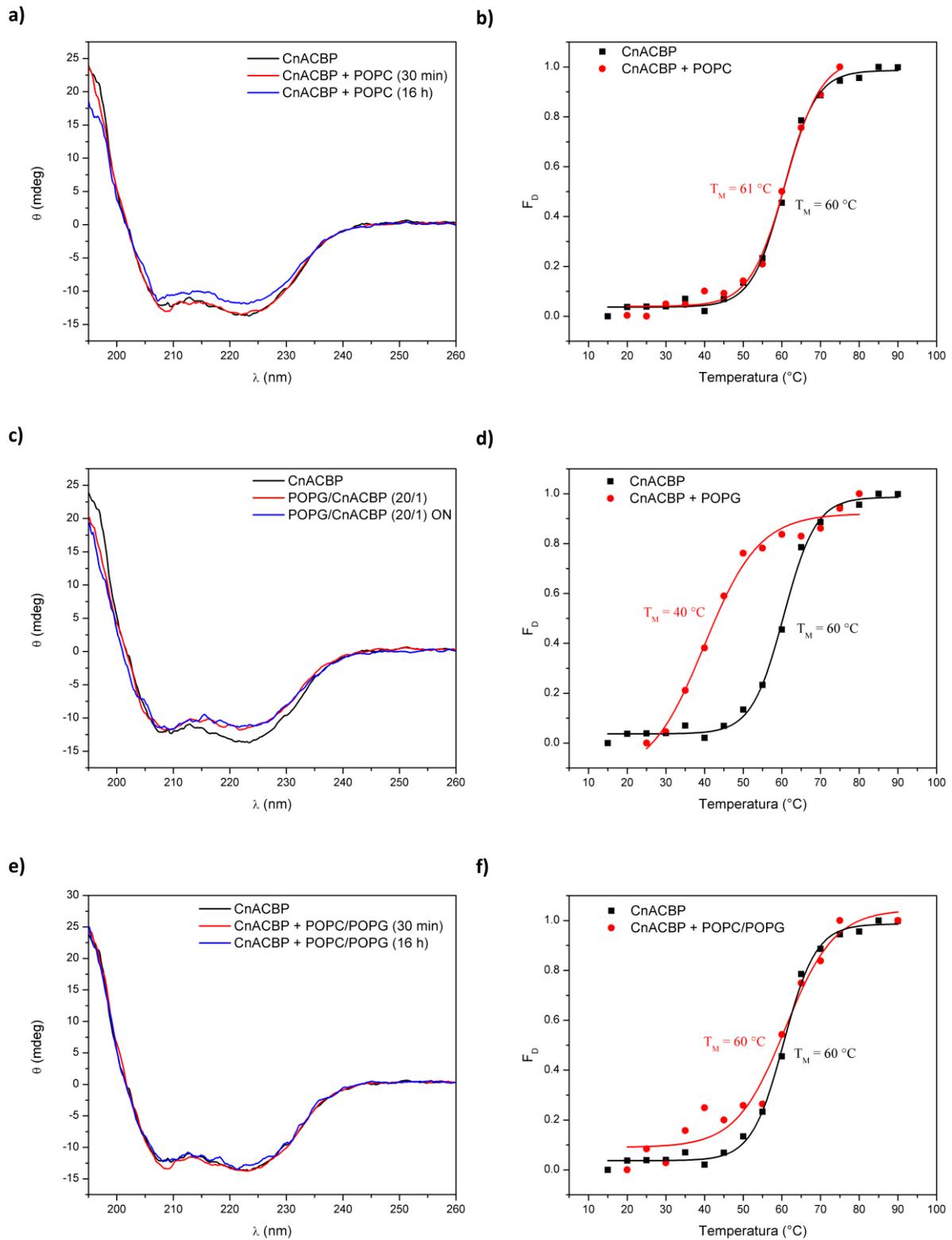


Figura 45: Espectros de CD da proteína CnACBP na presença de diferentes miméticos de membrana e suas respectivas desnaturações térmicas. a) e b) em POPC, c) e d) em POPG, e) e f) em POPC/POPG.

A importância da presença de cargas para a captura e entrega do LCFA-CoA já foi brevemente descrita por Chao *et al* [38], apesar de Simonsena *et al* [59] relatarem que não existiria interação eletrostática entre proteína e membrana. Nos espectros da **Figura 45** observamos claramente um rearranjo de estrutura secundária induzido pelas cargas de POPG (**Figura 45 c**). Essa deformação na estrutura proteica pode significar uma facilitação para a interação com o ligante causada pelas cargas da composição da própria Coenzima A, ou da membrana na qual estiver inserido.

Buscando corroborar os dados obtidos por CD, as desnaturações foram monitoradas também por DSC conforme descrito no item 8.2.3. O resultado dessas medidas está explicitado na **Figura 46** e os parâmetros termodinâmicos calculados na **Tabela 10**.

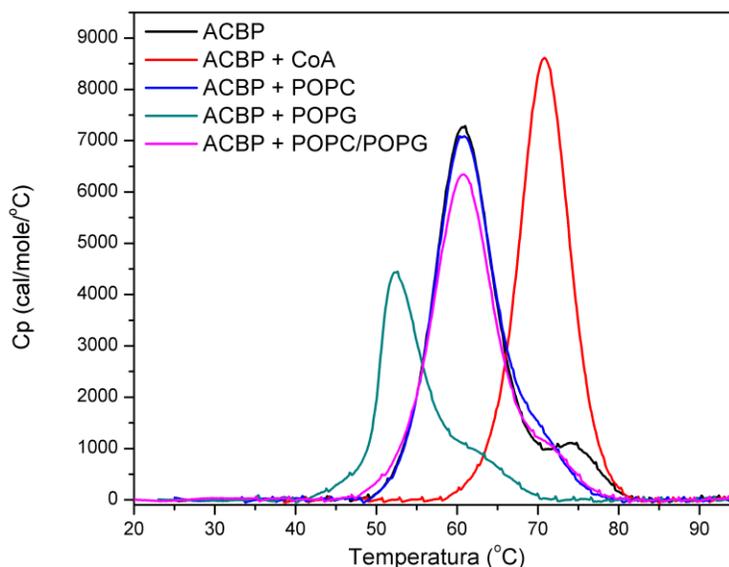


Figura 46: Termograma de DSC ilustrando os efeitos dos miméticos de membrana POPC, POPG e POPC/POPG na proteína CnACBP. A proporção utilizada foi de 20 fosfolípidios para uma molécula de proteína. Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 10: Parâmetros termodinâmicos obtidos através da análise dos dados experimentais da proteína CnACBP na presença dos miméticos de membrana POPC, POPG e POPC/POPG utilizando o MicroCal Origin software.

Amostra	T _{max} (°C)	C _{pmax} (kcal/mol/ °C)	ΔH _{cal} (kcal/mol)
CnACBP	60,6	7,3	76,4
+ Oleoil-CoA	70,9	8,6	69,1
+ POPC	60,9	7,1	73,7
+ POPG	52,4	4,4	38,5
+ POPC/POPG	60,9	6,3	68,2

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados de DSC corroboram aqueles obtidos por CD de que a presença de cargas negativas na superfície do lipossomo afeta a estabilidade da CnACBP. A variação de T_M menos pronunciada para as desnaturações em DSC do que para as desnaturações de CD pode estar relacionada a diversos fatores. Um deles seriam efeitos cinéticos devidos à taxa de aquecimento na qual as amostras são submetidas para cada um dos experimentos. Apesar da variação ser praticamente a mesma, no experimento de CD existe um intervalo para que a amostra atinja o equilíbrio, enquanto as amostras no DSC são aquecidas continuamente. Considerando que ambas as taxas são suficientemente lentas e que as transições são quase estáticas, o outro fator que poderia estar influenciando essa discrepância nos resultados é a concentração de proteína utilizada para cada experimento.

É curioso observar que na presença das vesículas de POPC e de POPC/POPG existe uma redução significativa do segundo pico, aquele que foi atribuído às proteínas que já vêm ligadas a

algum éster de acil-CoA desde a *E. coli*. Isto pode significar que a proteína não se encontre mais ligada a essas moléculas, dando indícios de um mecanismo de entrega que seria menos notável em LUV de POPG, como descrito na referência [38], devido a concorrências de cargas negativas dos ligantes e das vesículas.

9.7 Efeitos da CnACBP no comportamento de vesículas lipídicas

Informações sobre alterações na dinâmica dos modelos de membrana também podem ser relevantes para compreensão dos mecanismos de interação entre proteína e bicamada. Com objetivo de examinar esse fenômeno, iniciamos um estudo do comportamento termotrópico, através de DSC, de vesículas lipídicas compostas unicamente de DMPC e DMPG, e vesículas compostas da mistura DMPC/DMPG 5:1 mol/mol. Os resultados obtidos estão ilustrados na **Figura 47** e os parâmetros calculados na **Tabela 11**.

As vesículas apresentaram apenas um evento endotérmico no intervalo de temperatura estudado, associada à transição da fase gel lamelar para a fase lamelar líquido-cristalina (fluida) que acontece na temperatura (T_M) de 23 °C para vesículas de DMPC e de DMPC/DMPG e de 22 °C para DMPG (**Tabela 11**). Esses valores estão em concordância com a temperatura de transição de fase principal reportada na literatura [68] e são o motivo da escolha dessa composição lipídica, permitindo, assim, monitorar transições relativas às vesículas sem afetar a estabilidade da proteína.

Analisando a **Figura 47**, podemos observar que a adição da proteína altera drasticamente o perfil da capacidade calorífica dos lipossomos de DMPG, sem alterar as propriedades das vesículas de DMPC e DMPC/DMPG, realçando, mais uma vez, mecanismos diferentes de interação da proteína com vesículas zwitteriônicas ou negativas. Com o intuito de quantificar o efeito da proteína

no comportamento termotrópico dos lipossomos, os parâmetros termodinâmicos importantes que caracterizam a transição de fase foram calculados (**Tabela 11**).

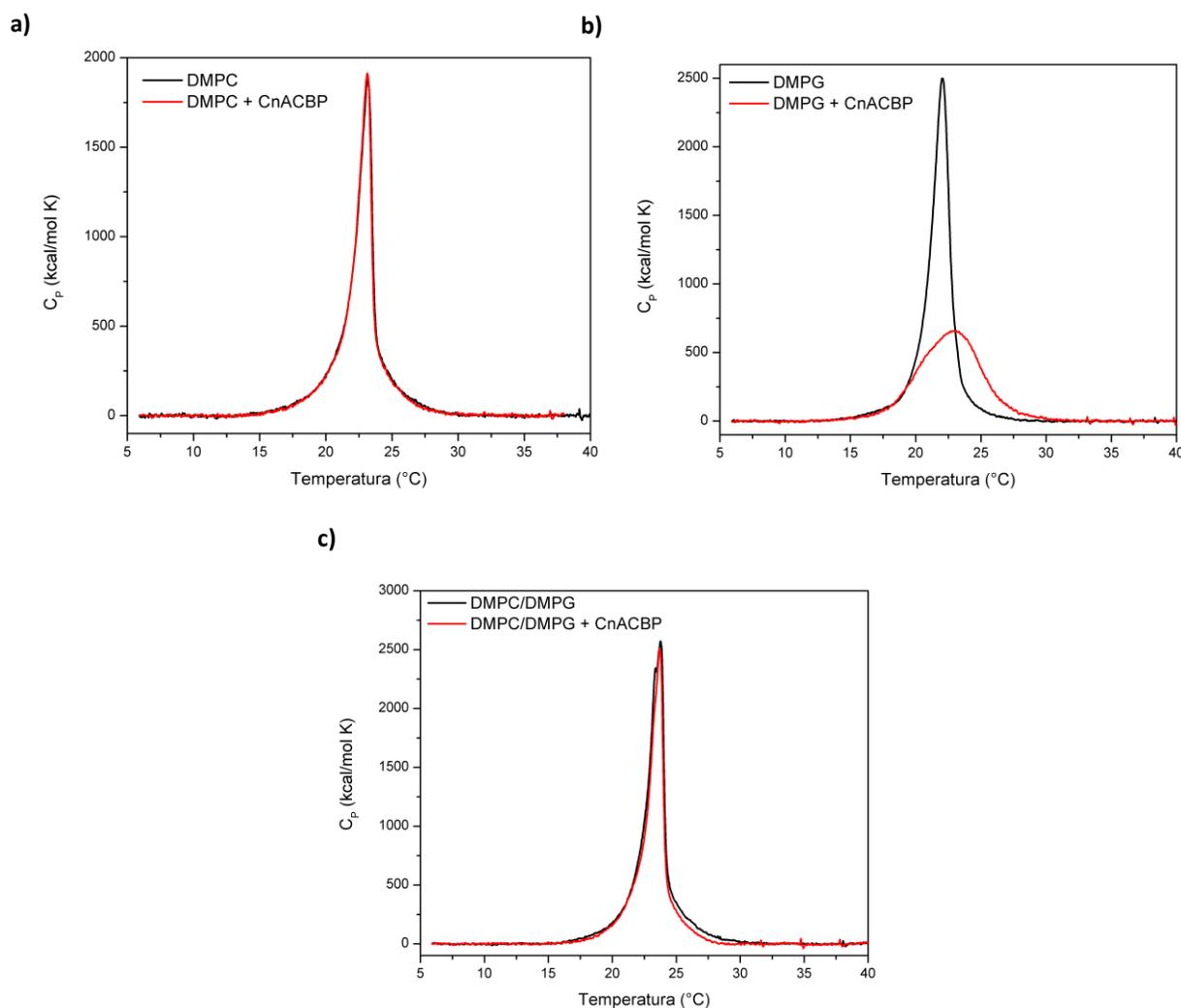


Figura 47: Termogramas de DSC ilustrando os efeitos da proteína CnACBP no comportamento termotrópico das vesículas lipídicas unilamelares de a) DMPC, b) DMPG e c) DMPC/DMPG (5/1). Fonte: Elaborada pela autora.

Em transições de primeira ordem, tal como a transição da fase gel para a líquido-cristalina, a variação da energia livre de Gibbs (ΔG) na temperatura de transição T_M é nula, portanto a mudança de entropia (ΔS) associada à transição pode ser calculada diretamente da equação seguinte [69]:

$$\Delta S = \frac{\Delta H}{T_M}$$

Tabela 11: Parâmetros termodinâmicos obtidos através da análise dos termogramas de DSC da transição de fase de vesículas constituídas pelos fosfolípidios DMPC, DMPG, DMPC/DMPG na ausência e na presença da proteína CnACBP.

Amostra	T _{max} (°C)	ΔT _{1/2} (°C)	ΔH _{cal} (kcal/mol)	ΔS (cal/mol K)
DMPC + CnACBP	23,2	1,3	4,26	14,4
	23,1	1,3	4,15	14,0
DMPG + CnACBP	22,1	1,6	5,47	18,5
	23,1	5,4	3,96	13,4
DMPC/DMPG + CnACBP	23,8	1,3	5,57	18,8
	23,7	1,2	4,73	15,6

Fonte: Elaborada pela autora.

Mudanças no empacotamento lipídico das bicamadas causadas por agentes externos, levam a alterações nos parâmetros termodinâmicos dos lipossomos [69]. Com base nos parâmetros calculados e apresentados na **Tabela 11**, averiguamos que o contato da CnACBP com as bicamadas lipídicas não modificou fortemente a temperatura de transição de fase, contudo as variações de entalpia das transições de fase começam a ser significativamente alteradas mesmo para os lipossomos de composição mista. As alterações observadas na variação da entalpia de transição (ΔH) (diminuição ~27 % em DMPG e ~15 % em DMPC/DMPG) conduzem à redução de entropia (ΔS) em ~27 % e ~17 % dos lipossomos de DMPG e DMPC/DMPG, respectivamente, sugerindo uma perturbação do ordenamento molecular microscópico de tal maneira a aumentar o empacotamento global da bicamada.

Em transições de fases, os fosfolipídios não transicionam independentemente uns dos outros, mas em forma de aglomerados lipídicos. O grau de cooperação intermolecular em uma vesícula durante a transição de fase pode ser indiretamente avaliado através da análise dos valores de $\Delta T_{1/2}$ (**Tabela 11**), sendo inversamente proporcional a este [69]. A proteína CnACBP não foi capaz de alterar, também, este parâmetro das vesículas de DMPC. E, apesar da mudança entrópica, não alterou a cooperatividade de vesículas de DMPC/DMPG. Em compensação, as vesículas de DMPG tiveram o seu $\Delta T_{1/2}$ aumentado de 1,6 para 5,4 °C, implicando numa diminuição da cooperatividade do sistema.

Para um estudo mais detalhado dos efeitos que a proteína causa no empacotamento da membrana, foram feitas medidas de fluorescência que permitem monitorar as mudanças de microambiente da sonda fluorescente ao longo da estrutura da bicamada.

As medidas de fluorescência foram realizadas segundo descrito na seção 8.3, buscando monitorar o sinal gerado pelo fluoróforo NBD presente nas composições lipídicas na proporção de 0,5 mol % e localizado nas superfícies polares da bicamada. Os lipossomos utilizados apresentavam a composição POPC, POPG e POPC/POPG, e as condições testadas são de 20 e 50 mols de fosfolipídios por mol de CnACBP. Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 48**.

Para todas as condições testadas é observada uma variação do rendimento quântico do NBD. Quando a proteína é adicionada à suspensão das vesículas zwitteriônicas de POPC, há uma supressão da fluorescência, portanto uma diminuição do rendimento quântico. Esse fenômeno está relacionado a uma exposição do fluoróforo a um ambiente mais hidrofílico, onde os processos não-radioativos tais com ligações de hidrogênio dos grupamentos NH e NO₂ da molécula de NBD com o átomo de oxigênio da cabeça polar dos fosfolipídios de POPC e com os átomos das moléculas de água da suspensão competem com a emissão de fluorescência [70]. Contrariamente, com a adição

da CnACBP à suspensão de lipossomos de composição mista, POPC/POPG, ou unicamente de POPG, observamos um aumento no rendimento quântico, significando uma mudança no microambiente do NBD para uma hidrofobicidade maior.

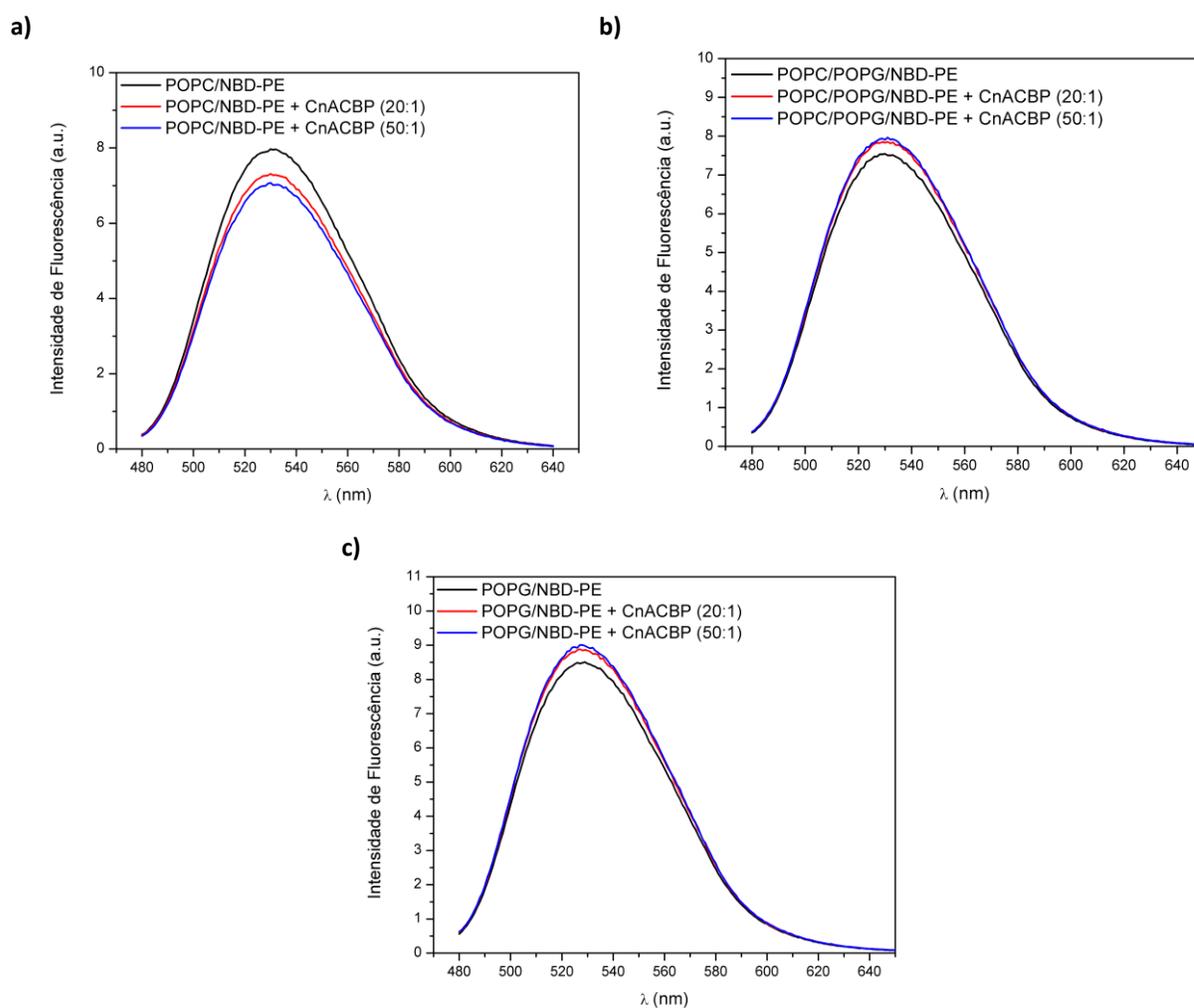


Figura 48: Perfis de emissão de fluorescência do NBD-PE nas diferentes composições de fosfolipídios: a) POPC, b) POPC/POPG e c) POPG, na ausência e na presença de proteína com as proporções de 20 e 50 mols de fosfolipídio por mol de CnACBP. Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados obtidos para as vesículas com maior presença de cargas negativas sugerem a adsorção da proteína à interface da bicamada, diminuindo a exposição do NBD ao solvente e

colocando-o em contato com a proteína. Esta conclusão está em concordância com aquela obtida a partir das medidas de DSC. No entanto, pela primeira vez foi possível se observar interação entre a CnACBP e lipossomos zwitteriônicos. Até o momento, dados de CD e DSC não acusaram mudanças estruturais ou de estabilidade tanto da proteína quanto dos lipossomos com balanço de cargas devido a efeitos recíprocos. A mudança no microambiente do NBD, causada pela presença da proteína na solução, não está associada a mudança no empacotamento da membrana, portanto, e ainda carece de estudos mais aprofundados.

9.8 Mecanismos de captura do éster de acil-CoA

Agora, buscando elucidar um eventual mecanismo de captura do éster de acil-CoA presente nas vesículas realizado pela ACBP, monitoramos a emissão da sonda fluorescente de NBD posicionada no final da cadeia acila do palmitoil-CoA. Desta vez, os lipossomos foram preparados com 0,5 mol % de NBD-palmitoil-CoA e a proteína foi posteriormente adicionada a suspensão. A fluorescência do NBD foi monitorada antes e depois da adição de CnACBP.

Na **Figura 49** estão os ensaios de fluorescência que buscam observar a captura do LCFA-CoA de miméticos de membranas. Nos espectros podemos observar uma supressão da fluorescência do NBD para todas as composições de bicamadas experimentadas. Esta mudança na intensidade de emissão está associada a uma maior exposição da sonda ao solvente, mostrando que a CnACBP foi capaz de sequestrar o NBD-palmitoil-CoA dos lipossomos zwitteriônicos e negativamente carregados, confirmando os resultados obtidos por Chao *et al* [38]. No entanto, esses são apenas resultados preliminares que merecem um estudo mais aprofundado dos mecanismos que levam a proteína a retirar o éster-CoA da membrana e incorporar na proteína livre em solução.

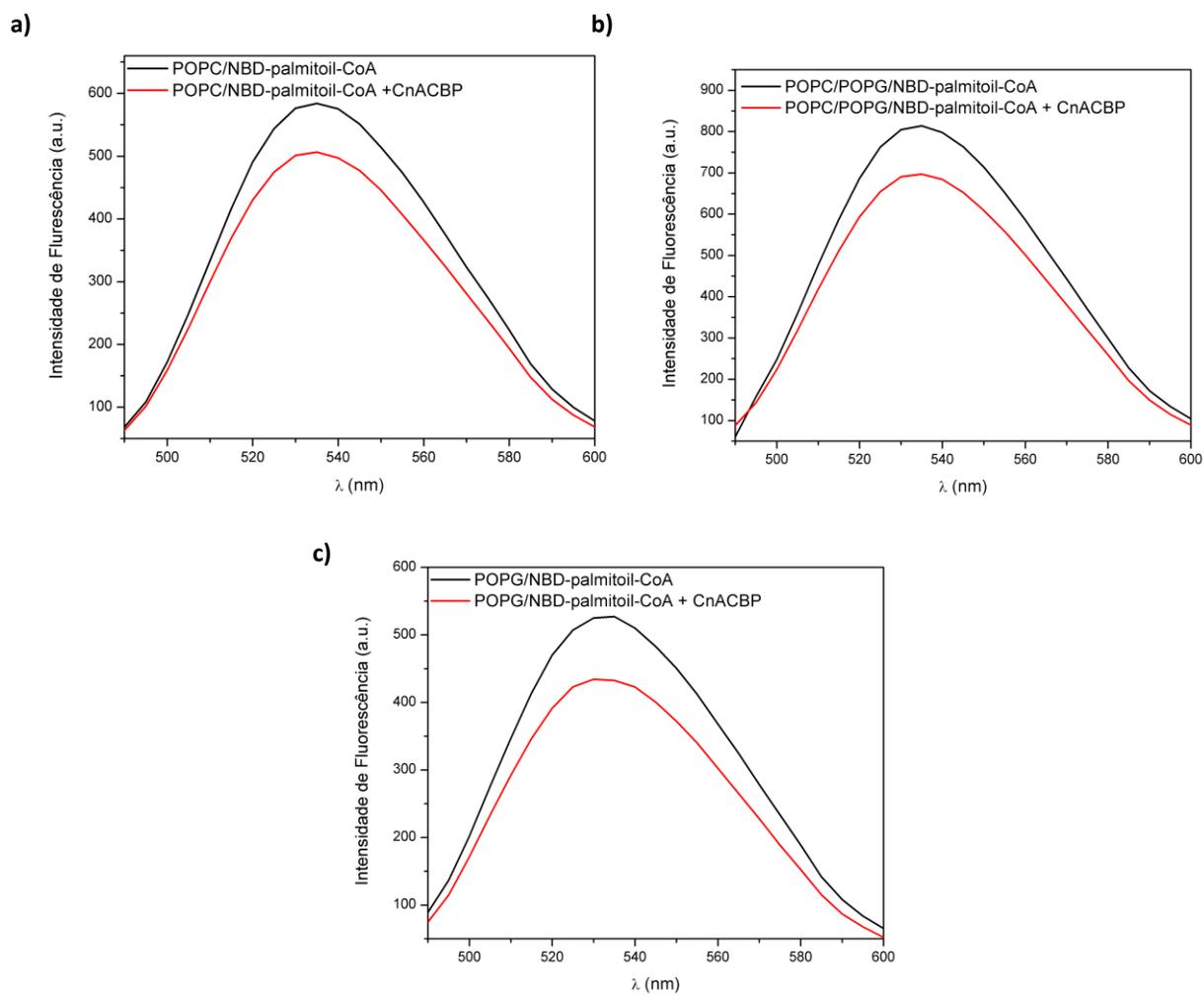


Figura 49: Espectros de emissão de fluorescência do NBD-palmitoil-CoA associado às composições de vesícula: a) POPC, b) POPC/POPG e c) POPG, antes e após a incubação com a proteína CnACBP. Fonte: Elaborada pela autora.

10 Conclusão

Nesta parte do trabalho, tivemos como interesse a caracterização inicial da proteína CnACBP e da sua interação com ligantes LCFA-CoA, além de explorar os mecanismos de contato da proteína com miméticos de membrana, estudando a influência de diferentes disposições de cargas na superfície dos lipossomos para essa interação. Este estudo é apenas a base para um entendimento mais profundo do papel da ACBP na interação com outras proteínas e no interior da célula.

A expressão da CnACBP foi bem sucedida e a purificação executada de forma eficaz. A proteína adquirida se mostrou estável, térmica e quimicamente, e o seu conteúdo de estrutura secundário foi condizente com aquele esperado para uma ACBP. Também foi mostrado que a proteína se encontrava na sua forma funcional, ou seja, era capaz de ligar éster de acil-CoA com alta afinidade. Após essa confirmação, foram feitos mais estudos de caracterização da CnACBP na presença do ligante. Pudemos concluir que a interação com LCFA-CoA não alterou o estado de oligomerização nem afetou o conteúdo de estrutura secundária da proteína drasticamente, mas causou uma estabilização na conformação proteica de até 15 °C na desnaturação térmica e 2 M de ureia na desnaturação química. Uma surpresa foi perceber que parte da proteína purificada já vinha ligada a ligantes presentes na *E. coli* desde o processo de purificação.

Para esclarecer questões sobre o processo que envolvem ACBP e membranas biológicas, foram feitos estudos de interação com miméticos de membrana com diferentes composições. Em modelos mais simples de micelas, ficou evidente a importância da presença de cargas nos efeitos estruturais. A proteína também se mostrou sensível apenas a moléculas detergentes livres em solução e não àquelas em estado micelar. Em modelos mais elaborados de vesículas grandes, foi

evidenciado, mais uma vez, o poder da presença de cargas de alterar e desestabilizar a estrutura proteica. Curiosamente, experimentos de DSC na presença dos lipossomos deram indícios de um mecanismo de entrega do ligante às vesículas zwitteriônicas.

Passando do monitoramento de alterações na estrutura proteica para análise de mudanças na bicamada causadas pela presença da CnACBP, concluímos, tanto por DSC quanto por espectroscopia de fluorescência, que a incidência de cargas negativas promove a adsorção da proteína na interface dos miméticos de membrana, aumentando o empacotamento das moléculas de fosfolípido que os compõem. Experimentos de fluorescência também deram evidências de mecanismos de captura pela CnACBP do LCFA-CoA presente em todas as composições de membrana estudadas.

III. Bibliografia

-
- 1 HARITASH, A. K.; KAUSHIK, C. P. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*. v.169, p.1-15, 2009.
 - 2 BOBALUMI, J. K. R. Estudo cristalográfico da enzima clorocatecol 1,2-dioxigenase de *Pseudomonas putida*. 2010. 122 p. Dissertação (Mestrado em física biológica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2010.
 - 3 JUHASZ, A. L.; NAIDU, R. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation*. v.45, p.57-88, 2000.
 - 4 International Agency for Research on Cancer (IARC) Benzo[a]pyrene, Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1, Chemical, Environmental and Experimental Data, v.32, Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, 1983, p.211-224.
 - 5 FERRARONI, M. et al. X-ray structures of 4-chlorocatechol 1,2-dioxygenase adducts with substituted catechol: New perspective in the molecular basis of intradiol ring cleaving dioxygenases specificity. *Journal of Structural Biology*. v.181, p.274-282, 2013.
 - 6 CERNIGLIA, C. E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*. v.3, p.351-368, 2009.
 - 7 JONES K. C. et al. Polynuclear aromatic hydrocarbons in an agricultural soil: long-term changes in profile distribution. *Environmental pollution*. v.56, p.337-351, 1989.
 - 8 SAMANTA, S. K.; SINGH, O. V.; JAIN R, K. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *TRENDS in Biotechnology*. v.20, n.6, p.243-248, 2002.
 - 9 NETTO, A. D. P. et al. Evaluation of human contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their nitrated derivatives (NHPAs): a review of methodology. *Química Nova*. v.23, n.6, p.765-773, 2000.
 - 10 ZHANG P.; SONG, J.; YUAN H. Persistent organic pollutant residues in the sediments and mollusks from the Bohai Sea coastal areas, North China: An overview. *Environment International*. v.35, p.632-646, 2009.
 - 11 MASTRANGELO, G.; FADDA, E.; MARZIA V. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Cancer in Man. *Environmental Health Perspectives*. v.104, n.11, p.1166-1170. 1996.
 - 12 WASI, S.; TABREZ, S.; AHMAD, M. Use of *Pseudomonas* spp. for the bioremediation of environmental pollutants: a review. *Environmental Monitoring Assessment*. v.185, p.8147-8155, 2013.
 - 13 MELO, F. A. Interações moleculares no mecanismo de ação de clorocatecol 1,2-dioxigenase e da tirosina quinase. 2010. 175 p. Tese (Doutorado em física aplicada) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos. 2010.

-
- 14 JACQUES, R. J. S. et al. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.37, n.4, p.1192-1201, 2007.
- 15 COSTA-FILHO, A. J. Estudo da enzima clorocatecol 1,2-dioxigenase por EPR convencional e da estrutura dinâmica de biomembranas por EPR pulsada bidimensional. 2001. 164 p. Tese (Doutorado em física básica) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos. 2001.
- 16 NOZAKI, M.; KOTANI, S.; ONO, K. Metapyrocatechase: III. Substrate specificity and mode of ring fission. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*. v.220, n.2, p.213-223, 1970.
- 17 HARAYAMA, S.; KOK, M. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annual Review Microbiology*. v.46, p.565-601, 1992.
- 18 SCHMIDT, E. and KNACKMUSS, H. J. Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. *Biochemical Journal*. v.192, p.339-347, 1980.
- 19 NIU, W.; DRATHS, K. M.; FROST, J. W. Benzene-Free Synthesis of Adipic Acid. *Biotechnology Progress*. v.18, p.201-211, 2002.
- 20 BALAMURUGAN, M.; VADIVELU, P.; PALANIANDAVAR, M. Iron(III) complexes of tripodal tetradentate 4N ligands as functional models for catechol dioxygenases: the electronic vs. steric effect on extradiol cleavage. *Dalton Transactions*. v.43, p.14653-14668, 2014.
- 21 BRODERICK, J. B.; O'HALLARON, T. V. Overproduction, Purification, and Characterization of Chlorocatechol Dioxygenase, a Non-Heme Iron Dioxygenase with Broad Substrate Tolerance. *Biochemistry*. v.30, p.7349-7358, 1991.
- 22 BHAT, M. A. et al. Purification of 3,5-dichlorocatechol 1,2-dioxigenase, a nonheme iron dioxygenase and a key enzyme in the biodegradation of herbicide, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), from *Pseudomonas cepacia* CSV90. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. v.300, n.2, p.738-746, 1993.
- 23 MICALELLA, C. et al. X-ray crystallography, mass spectrometry and single crystal microspectrophotometry: A multidisciplinary characterization of catechol 1,2 dioxygenase. *Biochimica et Biophysica Acta*. v.1814, p.817-823, 2011.
- 24 MESQUITA, N. C. Estudo da correlação estrutura função da enzima Clorocatecol 1,2-dioxigenase de *Pseudomonas Putida*. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2012.
- 25 JANG, H. G.; COX, D. D.; QUE, L. Jr. A highly reactive functional model for the catechol dioxygenases. Structure and properties of [Fe(TPA)DBC]BPh₄. *Journal of the American Chemical Society*. v.113, p.9200-9204, 1991.
- 26 ELEY, K. L.; CROWLEY, P. J.; BUGG T. D. H. A solvolytic C–C cleavage reaction of 6-acetoxy-cyclohexa-2,4-dienones: mechanistic implications for the intradiol catechol dioxygenases. *The Journal of Organic Chemistry*. v.66, p.2091-2097, 2001.

-
- 27 FURTADO, N. F. Explorando novas facetas da interação entre a Enzima Clorocatecol 1,2-dioxigenase e seus ligantes. 2014. 89 p. Dissertação (Mestrado em Química e Física Biológica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2014.
- 28 CITADINI, A. P. S. et al. EPR Studies of Chlorocatechol 1,2-Dioxygenase: Evidences of Iron Reduction during Catalysis and of the Binding of Amphipatic Molecules. *Biophysical Journal*. v.88, p.3502–3508, 2005.
- 29 IYER, P. V.; ANANTHANARAYAN, L. Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry*. v.43, p.1019-1032, 2008.
- 30 GUZIK, U.; HUPERT-KOCUREK, K.; WOJCIEZYNSKA, D. Immobilization as a Strategy for Improving Enzyme Properties-Application to Oxidoreductases. *Molecules*. v.19, p.8995-9018, 2014.
- 31 ZORBAS, V. et al. Importance of aromatic content for peptide/single-walled carbon nanotubes interaction. *Journal of the American Chemical Society*. v.127, p.12323-12328, 2005.
- 32 HERMANN, S. Tricine – SDS-PAGE. *Nature protocols*. V.1, n.1, p.16-22, 2006.
- 33 ROBERT, R. W. B. N.; NAKANOSHI, K. Circular Dichroism: Principles an aplications, New York, USA: VHC Publishers, 1994.
- 34 KELLY, S. M.; PRICE, N. C. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochimica et Biophysica Acta*. v.1338, p.161-185, 1997.
- 35 GREVENGOED, T. J.; KLETT, E. L.; COLEMAN, R. A. Acyl-CoA metabolism and partitioning. *Annual Review of Nutrition*. v.34, p.1-30, 2014.
- 36 FÆRGEMAN, N. J.; KNUDSEN, J. Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signaling. *Biochemical Journal*. v.323, p.1-12, 1997.
- 37 FROLOV, A.; SCHROEDER, F. Acyl Coenzyme A Binding Protein: conformational sensitivity to long chain fatty acyl-CoA. *The Journal of Biological Chemistry*. v.273, n.18, p.11049-11055, 1998.
- 38 CHAO, H. et al. Membrane Charge and Curvature Determine Interaction with Acyl-CoA Binding Protein (ACBP) and Fatty Acyl-CoA Targeting. *Biochemistry*. v.41, n.33, p.10540-1553, 2002.
- 39 NEESS, D. et al. Long-chain acyl-CoA esters in metabolism and signaling: Role of acyl-CoA binding proteins. *Progress in Lipid Research*. v.59, p.1-25, 2015.
- 40 BLOKSGAARD, M. et al. Acyl-CoA binding protein and epidermal barrier function. *Biochimica et Biophysica Acta*. v.1841, p.369-376, 2014.

-
- 41 GUIDOTTI, A.; CORDA, M. G.; COSTA, E. Strategies for the isolation and characterization of an endogenous effector of the benzodiazepine recognition sites. *Advances in Biochemical Pshichopharmacology*. v.38, p.95-103, 1983.
- 42 MANDRUPL, S. et al. Acyl-CoA-binding Protein/Diazepam-binding Inhibitor Gene and Pseudogenes. A Typical Housekeeping Gene Family. *Journal of Molecular Biology*. v.228, p.1011-1022, 199.
- 43 BURTON, M. el al. Evolution of the acyl-CoA binding protein (ACBP). *Biochemical Journal*. 392, 299–307, 2005.
- 44 RASMUSSEN J. T. et al. Acyl-CoA-binding protein (ACBP) can mediate intermembrane acyl-CoA transport and donate acyl-CoA for β -oxidation and glycerolipid synthesis. *Biochemical Journal*. v.299, p.165-170, 1994.
- 45 MIKKELSEN, J.; KNUDSEN, J. Acyl-CoA-binding protein from cow/Binding characteristics and cellular and tissue distribution. *Biochemical Journal*. v.248, p.709-714, 1987.
- 46 ROSENDAL, J., ERTBJERG, P.; KNUDSEN, J. Characterization of ligand binding to acylCoA-binding protein, *Biochemical Journal*. v.290, p.321-32, 1993.
- 47 ABO-HASHEMAN, K. A. H. et al. The interaction of acyl-CoA with acyl-CoA binding protein and carnitine palmitoyltransferase I. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. v.33, p.807-815, 2001.
- 48 KRAGELUND, B. B. et al. Three-dimensional structure of the complex between Acyl-Coenzyme A binding protein and Palmitoyl-Coenzyme A. *Journal of Molecular Biology*. v.230, p.1260-1277, 1993.
- 49 FÆRGEMAN, N. J. et al. Thermodynamics of ligand binding to acyl-coenzyme A binding protein studied by titration calorimetry. *Biochemistry*. v.35, p.14118-14126, 1996.
- 50 TEILUM, K. et al. Different Secondary Structure Elements as Scaffolds for Protein Folding Transition States of Two Homologous Four-Helix Bundles. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*. v.59, p.80-90, 2005.
- 51 KRAGELUND, B. B.; KNUDSEN, J.; POULSEN, F. M. Acyl-coenzyme A binding protein (ACBP). *Biochimica et Biophysica Acta*. v.1441, p.150-161, 1999.
- 52 VOELZ, V. A. et al. Slow Unfolded-State Structuring in Acyl-CoA Binding Protein Folding Revealed by Simulation and Experiment. *Journal of the American Chemical Society*. v.134, p.12565-12577, 2012.
- 53 KRAGELUND, B. B. et al. The formation of a native-like structure containing eight conserved hydrophobic residues is rate limiting in two-state protein folding of ACBP. *Nature structural biology*. v.6, n.6, p.594-602, 1999.

-
- 54 KRAGELUND, B. B. et al. Conserved Residues and Their Role in the Structure, Function, and Stability of Acyl-Coenzyme A Binding Protein. *Biochemistry*. v.38, n.8, p.2386-2394, 1999.
- 55 BRUUN, S. W. et al. Cooperative formation of native-like tertiary contacts in the ensemble of unfolded states of a four-helix protein. *PNAS*. v.107, n.30, p.13306-13311, 2010.
- 56 TASKINEN, J. P. et al. High Resolution Crystal Structures of Unliganded and Liganded Human Liver ACBP Reveal a New Mode of Binding for the Acyl-CoA Ligand. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*. v.66, p.229-238, 2007.
- 57 VALLEJO, D. F. V.; GRIGERA, J. R.; COSTABEL, M. D. A hydrophobic loop in acyl-CoA binding protein is functionally important for binding to palmitoyl-coenzyme A A molecular dynamics study. *International Journal of Biological Macromolecules*. v.42, p.271-277, 2008.
- 58 FÆRGEMAN, N. J. and KNUDSEN, J. Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signaling. *Biochemical Journal*. v.323, p.1-12, 1997.
- 59 SIMONSENA, A. C. et al. Acyl-coenzyme A organizes laterally in membranes and is recognized specifically by acyl-coenzyme A binding protein. *FEBS Letters*. v.552, p.253-258, 2003.
- 60 MEYER, E. Atomic force microscopy. *Progress in Surface Science*. v.41, p.3-49, 1992.
- 61 VALLEJO, D. F. et al. Prediction of the most favorable configuration in the ACBP–membrane interaction based on electrostatic calculations. *Biochimica et Biophysica Acta*. v.1788, p.696-700, 2009.
- 62 WALLACE, B. A.; JANES R. W. Modern Techniques for Circular Dichroism and Synchrotron Radiation Circular Dichroism Spectroscopy. USA. *IOS Press*, 2009.
- 63 KINSETH, M. A. et al. The Golgi-Associated Protein GRASP Is Required for Unconventional Protein Secretion during Development. *Cell*. v.130, p.524-534, 2007.
- 64 SCHÄGGER, H. Tricine–SDS–PAGE. *Natures Protocols*. v.1 n.1, 2006.
- 65 COOPER, A. Differential scanning microcalorimetry. Glasgow University, Glasgow G12 8QQ. 2000.
- 66 ANDERSEN, K. K.; OTZEN, D. E. How Chain Length and Charge Affect Surfactant Denaturation of Acyl Coenzyme A Binding Protein (ACBP). *The Journal of Physical Chemistry*. v.113, p.13942-13952, 2009.
- 67 ANDERSEN, K. K. et al. The Role of Decorated SDS Micelles in Sub-CMC Protein Denaturation and Association. *Journal of Molecular Biology*. v.391, p.207-226, 2009.
- 68 LEWIS, R. N. A. H.; MAK, N.; McELHANEY, R. N. A Differential Scanning Calorimetric Study of the Thermotropic Phase Behavior of Model Membranes Composed of

Phosphatidylcholines Containing Linear Saturated Fatty Acyl Chains. *Biochemistry*. v.26, p.6118-6126, 1987.

69 BASSO, L. G. M. Interações com membranas de peptídeos de fusão da glicoproteína S do SARS-Cov. 2014. 163 p. Tese (Doutorado em Física Básica) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos. 2014.

70 PAZIN, W. M. Anisotropia de fluorescência: aplicações em membranas modelos. 2012. 136 p. Dissertação (Mestrado em Física aplicada à medicina e biologia) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2012.