UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Explorando novas facetas da interação entre a Enzima Clorocatecol 1,2-dioxigenase e seus ligantes

Natasha Faiani Furtado

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Explorando novas facetas da interação entre a Enzima Clorocatecol 1,2-dioxigenase e seus ligantes

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Química e Física Biológica

Orientada: Natasha Faiani Furtado
Orientador: Prof. Dr. Antonio Jose da Costa Filho

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 17/10/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2014

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.

Furtado, Natasha Faiani

Explorando novas facetas da interação entre a Enzima Clorocatecol 1,2-dioxigenase e seus ligantes, Ribeirão Preto, 2014. 90p.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdae de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Quimica e Física Biológica.

Orientador: Costa Filho, Antonio José.

1.Biorremediação. 2.*Pseudomonas putida*. 3. Clorocatecol 1,2-dioxigenase. 4.Cinética

Folha de Aprovação

Natasha Faiani Furtado

Explorando novas facetas da interação entre a Enzima Clorocatecol 1,2-dioxigenase e seus ligantes.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Química e Física Biológica

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Dedico este trabalho aos meus pais, pela força em mais esta etapa de minha vida.
À minha família que sempre me apoiou.
Aos meus amigos que sempre me ajudaram.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que contribuíram de forma direta e indireta para a realização deste projeto. Em especial:

Ao meu orientador pela confiança de me receber em seu laboratório, pela paciência de me ensinar e me orientar.

Aos meus colegas de laboratório e amigos Assuero, Luis Felipe, Haroldo, Ana Helena, Mariana Pops, Priscila, Rafael, Bianca, Patricia, Raquel, Eduardo Lentilha e Militar, pela convivência, amizade e apoio, pela colaboração científica durante o desenvolvimento do meu projeto, sou grata por serem pessoas que participam do meu dia-a-dia e me fazem enxergar as coisas que sozinha não consigo ver,

Ao Assuero, em especial, por toda ajuda, ensinamentos, amizade, paciência, pelo carinho e apoio que me deu desde o inicio.

Ao Prof. Dr. Alex Smirnov e a Profa. Dra. Tatyana Smirnova por ter me recebido durante os dias que passei na Universidade Estadual da Carolina do Norte

Á minha família - meus pais Ivan e Fatima que se dedicaram ao meu aprendizado e sucesso, que sempre estiveram presente me fornecendo suporte e apoio para que desse continuidade aos meus estudos, aos meus irmãos (e família) Samantha e Ivan Jr. que também sempre me apoiaram e me incentivaram.

Ao meu namorado Leonardo, por estar ao meu lado em todos os momentos, sendo paciente e me apoiando,

Enfim, agradeço q todos que me ajudaram e contribuíram de alguma forma nesta caminhada.

à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto,

à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto,

à Fapesp e CAPES pelo apoio financeiro fundamental para realização do projeto.

"Vencer a si próprio é a maior das vitórias."

Platão

RESUMO

Furtado, N. F. **Explorando novas facetas da interação entre a enzima clorocatecol 1,2-dioxigenase e seus ligantes.** 2014. 90f. Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O uso intensivo de produtos organoclorados contendo estruturas aromáticas em sua composição tem crescido de forma rápida nos últimos anos em face de sua ampla utilização em vários setores da indústria moderna. A decomposição de tais compostos é lenta, dada sua grande estabilidade química, tornando-os poluentes recorrentes do meio-ambiente. Diferentes estratégias estão disponíveis para tentar solucionar este problema. Os chamados processos de bioremediação estão entre elas e vem ganhando espaço dentre as possíveis escolhas em face de sua maior eficiência e por estarem baseados no uso de moléculas como enzimas, que não afetam o ambiente, para realizar a tarefa de degradação de substâncias tóxicas. Neste contexto se coloca a enzima clorocatecol 1,2-dioxigenase de *Pseudomonas. putida*, alvo de estudos deste trabalho. Nosso grupo tem trabalhado no entendimento do mecanismo de ação da enzima clorocatecol 1,2-dioxigenase de *Pseudomonas. putida* há alguns anos já que acreditamos que a utilização de forma mais eficiente e efetiva possível da enzima clorocatecol 1,2-dioxigenase de *Pseudomonas. putida* passa necessariamente pelo conhecimento acerca de maneiras de controle da atividade enzimática. Com isso, os resultados obtidos consistiram na otimização dos processos de expressão e purificação que permitiram a obtenção da proteína pura e com bom rendimento, após mudança no vetor de expressão. Foram feitos ensaios de atividade enzimática com diferentes substratos e desenvolvimento de um protocolo de caracterização cinética, para assim avaliar a existência de mecanismos de inibição/modulação da reação pelo substrato e/ou produto. Análise da estrutura secundária por meio de dicroísmo circular e dicroísmo circular com radiação síncrotron para avaliar a integridade estrutural frente da nova construção. Também foram realizados testes para separação dos ligantes enzima clorocatecol 1,2-dioxigenase de *Pseudomonas putida* para análise em espectrômetro de massas afim de se identificar as moléculas anfipáticas que podem estar presentes em seu sítio hidrofóbico. Por fim, ensaios de interação proteína-lipídio utilizando calorimetria diferencial de varredura, ressonância paramagnética eletrônica e dicroísmo circular indicam uma provável interação com modelos de membrana, principalmente, quando na presença de PIP2 (fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato).

Palavras chave: Biorremediação, *Pseudomonas putida*, Clorocatecol 1,2-dioxigenase, cinética enzimática, interação com membranas.

Abstratct

Furtado, N. F. **Exploring new facets of the interaction between the enzyme chlorocatechol 1,2-dioxygenase and its ligands.** 2014. 90p. Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

The use of chlorinated compounds bearing aromatic structures in their chemical composition has quickly grown in the last few years due to their general presence in processes of modern industry. The degradation of such compounds is slow, due to their high chemical stability, thus making them frequent polutants of the environment. Different strategies to tackle this problem are available. The so-called bioremediation methods are among those strategies and have been gaining many applications because of their higher efficiency and due to the use of enzymes, which do not affect the environment, to perform the degradation task. Chlorocatechol 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas putida* is one of those enzymes and is the object of study of this project. Our group has been working on understanding the mechanism of action of Chlorocatechol 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas putida* since we believe that a more efficient use of Chlorocatechol 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas putida* necessarily involves knowledge about ways of controlling the enzymatic activity. Thus, our results consisted in the optimization of the expression and purification protocols that allow the production of pure protein in high yields after changing its expression vector. Assays of enzyme activity with different substrates and development of a protocol for kinetic characterization was also done to assess the existence of mechanisms of inhibition/modulation of the reaction by the substrate and/or product. Analysis of the secondary structure by circular dichroism and synchrotron radiation circular dichroism was also performed to assess the integrity of the new construction. Tests were also carried out to separate the amphipatic ligands present in the Chlorocatechol 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas putida* structure for analysis in a mass spectrometer in order to identify which kind of amphipathic molecule may be present in enzyme hydrophobic site. Finally, lipid-protein interactions were investigated by means of differential scanning calorimetry, electron paramagnetic resonance and circular dichroism. The results indicated a potential interaction with model membranes, especially in the presence of PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate).

Keywords: Bioremediation, *Pseudomonas putida,* chlorocatechol 1,2-dioxygenase enzyme kinetics, interaction with membranes.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FUNIL DE DEGRADAÇÃO BACTERIANA DE HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAPS). ADAPTADA DE BONALUMI [11]. 3

FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO DOS TRÊS MODOS DE CLIVAGEM DA CATECOL; (A) CLIVAGEM INTRADIOL, (B) CLIVAGEM EXTRADIOL PROXIMAL E (C) CLIVAGEM EXTRADIOL DISTAL. FIGURA ADAPTADA DA REFERÊNCIA [14]. 4

FIGURA 3 - ESQUEMA DE REAÇÕES CATALISADAS POR ENZIMAS DA FAMÍLIA DAS DIOXIGENASES INTRADIÓIS. FIGURA ADAPTADA DA REFERÊNCIA [14]. 5

FIGURA 4 - COORDENAÇÃO DE RESÍDUOS DO SITIO CATALÍTICO DE PP 1,2-CCD. O SITIO CATALÍTICO POSSUI UM NÚCLEO DE Fe^{3+} LIGADO A QUATRO RESÍDUOS: TYR-130, TYR-164, HIS-188, HIS-190. 6

FIGURA 5 - ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DE PP 1,2-CCD MOSTRANDO AS DUAS SUBUNIDADES QUE FORMAM O DÍMERO FUNCIONAL. AS ESFERAS ROSAS REPRESENTAM OS ÍONS FE(III) PRESENTES NOS SÍTIOS ATIVOS. NA REGIÃO CENTRAL DE HÉLICES ESTÃO REPRESENTADAS, AINDA, AS MOLÉCULAS DE FOSFOLIPÍDIOS DISCUTIDAS NO TEXTO. FONTE: PDB, CÓDIGO DE ACESSO 3TH1. 7

FIGURA 6 - SUPERFÍCIE DA ENZIMA PP 1,2-CCD, MOSTRANDO O TÚNEL HIDROFÓBICO ENTRE AS SUBUNIDADES DO DÍMERO, ONDE POSSIVELMENTE SE ENCONTRAM MOLÉCULAS DE FOSFOLIPÍDIO. FIGURA ADAPTADA DA REFERÊNCIA [3]. 8

FIGURA 7 - AMPLIFICAÇÃO DO GENE PP *1,2-CCD*. PRODUTOS DA PCR APÓS PURIFICAÇÃO - 1 CORRESPONDE AO PADRÃO EM PARES DE BASES GENERULER 1 KB DNA LADDER (PROMEGA) E 2 AO FRAGMENTO DE DNA AMPLIFICADO. 28

FIGURA 8 - RESULTADO DOS TESTES DE EXPRESSÃO DA PP 1,2-CCD VIASUALIZADOS POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA REFERENTE: 1 -MARCADOR DE MASSA MOLECULAR, 2 - ANTES DA ADIÇÃO DO AGENTE INDUTOR (IPTG), 3 - UMA HORA DE EXPRESSÃO, 4 - DUAS HORAS DE EXPRESSÃO, 5 - TRÊS HORAS DE EXPRESSÃO, 6 - QUATRO HORAS DE EXPRESSÃO, 7 - EXPRESSÃO 16 HORAS A 20°C COM AGITAÇÃO DE 220 RPM, SENDO A D.O. PARA CADA AMOSTRA IGUAL 0,9. 29

FIGURA 9 - RESULTADOS DA PURIFICAÇÃO DE PP 1,2-CCD VISUALIZADOS POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA; PURIFICAÇÃO PP 1,2-CCD EM RESINA DE QUITINA, RAIA 1 – MARCADOR DE MASSA MOLECULAR, 2 – ANTES DA ADIÇÃO DO AGENTE INDUTOR (IPTG), 3 – APÓS ADIÇÃO DO AGENTE INDUTOR (IPTG), 4 – PELLET (APÓS CENTRIFUGAÇÃO LISADO), 5 – SOBRENADANTE (LISADO), 6 – VOID (NÃO LIGADO), 7 – LAVAGEM COM TAMPÃO DE RESSUSPENSÃO (TAMPÃO 20 MM TRIS, 500 MM NACL E 0,5 MM PMSF), 8 – LAVAGEM COM TAMPÃO DE CLIVAGEM (TAMPÃO 20 MM TRIS, 50 MM NACL, 30 MM DTT E 20 µM PMSF) E 9 – ELUIÇÃO PROTEÍNA CLIVADA. 30

FIGURA 10 - RESULTADOS DA PURIFICAÇÃO DE PP 1,2-CCD VISUALIZADOS POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA: A) TESTE DE SOLUBILIDADE DA PP 1,2-CCD.RAIA 1 – MARCADOR DE MASSA MOLECULAR, 2 – FRAÇÃO INSOLÚVEL APÓS LISE CELULAR, 3 – FRAÇÃO SOLÚVEL; B) PURIFICAÇÃO DA PP 1,2-CCD EM RESINA DE NI-NTA. RAIA 1 – MARCADOR DE MASSA MOLECULAR, 2 – ELUIÇÃO COM 80 MM DE

IMIDAZOL, 3 - ELUIÇÃO COM 250 MM DE IMIDAZOL, 4 - ELUIÇÃO COM 1 M DE IMIDAZOL, 5 – AMOSTRA PROTEICA APÓS CLIVAGEM. 31

FIGURA 11 - A) PERFIL DE ELUIÇÃO DOS MARCADORES MOLECULARES OBTIDOS COM A CALIBRAÇÃO DA COLUNA SUPERDEX 75 (10/300) (GE), B) REGRESSÃO LINEAR PARA DETERMINAÇÃO DA FUNÇÃO QUE CORRELACIONA MASSA MOLECULAR COM VOLUME DE ELUIÇÃO DOS PADRÕES APLICADOS NA COLUNA SUPERDEX 75 (10/300). LOG (MM) = LOGARITMO DA MASSA MOLECULAR. $K_{AV} = (V_E – V_0)/(V_T – V_0)$, ONDE V_E É O VOLUME DE ELUIÇÃO, V_0 É O VOLUME DE EXCLUSÃO E V_T É O VOLUME TOTAL DA COLUNA.....32

FIGURA 12 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA PP 1,2-CCD EM COLUNA SUPERDEX 75 (10/300), EQUILIBRADA COM TAMPÃO TRIS 20 MM, NACL 150 MM EM PH 8,0 E GEL DE ELETROFORESE EM POLIACRILAMIDA NÃO DESNATURANTE MOSTRANDO A BANDA DA PROTEÍNA.....33

FIGURA 13 - ESPECTROS DE CD NO UV DISTANTE ASSOCIADOS A DIVERSOS TIPOS DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA. LINHA SÓLIDA A-HÉLICE; LINHA TRACEJADA, FOLHA-B ANTIPARALELA; VOLTAS B TIPO I; LINHA PONTILHADA, TIPO I; LINHA TRACEJADA CRUZADA, 3_1-HÉLICE; PEQUENA LINHA TRACEJADA, ESTRUTURA IRREGULAR. ADAPTADA DE KELLY ET AL (2005) [48].....34

FIGURA 14 - A) ESPECTRO DE CD DA PP 1,2-CCD NA REGIÃO DO UV DISTANTE. EM VERMELHO ESTÁ REPRESENTADO O ESPECTRO EXPERIMENTAL E EM PRETO O ESPECTRO APÓS A CORREÇÃO COM FFT; B) ESPECTROS REFERENTES AO DADO EXPERIMENTAL (PRETO) E OS DADOS TEÓRICOS OBTIDOS UTILIZANDO-SE OS PROGRAMAS SELCON3, CDSSTR E CONTINLL DO PACOTE CDPRO. O EXPERIMENTO DE CD FOI REALIZADO A 20ºC EM TAMPÃO FOSFATO DE SÓDIO 20 MM PH 8,0 NO COMPRIMENTO DE ONDA DE 198 A 250 NM. A CONCENTRAÇÃO PROTEICA UTILIZADA FOI DE 0,0075 MG/ML. 35

FIGURA 15 - A) ESPECTROS DE SRCD REFERENTES AO DESENOVELAMENTO TÉRMICO DA ENZIMA PP 1,2-CCD EM UM INTERVALO DE 20 A 85°C; B) ESPECTROS REFERENTES AOS DADOS EXPERIMENTAIS (PRETO) E TEÓRICOS (VERMELHO) A TEMPERATURA DE 20 °C. A CONCENTRAÇÃO PROTEICA UTILIZADA FOI DE 0,7 MG/ML. 37

FIGURA 16 - CURVA DE DESNATURAÇÃO CONSTRUÍDA A PARTIR DAS VARIAÇÕES NOS VALORES DE ΔE EM 222 NM EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA. A LINHA EM VERMELHO FOI OBTIDA A PARTIR DE UM AJUSTE DA CURVA DE DESNATURAÇÃO A UMA FUNÇÃO DO TIPO SIGMOIDAL. 37

FIGURA 17 - ENSAIO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA COMO DESCRITO NO ITEM 3.4 PARA VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DA PP 1,2-CCD FRENTE A DIFERENTES SUBSTRATOS ATRAVÉS DA ABSORÇÃO DE LUZ EM 260 NM DEVIDA À FORMAÇÃO DO PRODUTO DA REAÇÃO COM DIFERENTES SUBSTRATOS. 38

FIGURA 18 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS SUBSTRATOS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS DE CINÉTICA ENZIMÁTICA DA PP 1,2-CCD: A) CATECOL, B) 4CLOROCATECOL E C) 4-METILCATECOL. 39

FIGURA 19 - A) GRÁFICO V_I X [S] UTILIZANDO SUBSTRATO CATECOL - CONCENTRAÇÕES NO INTERVALO DE 23,7 □□ A 1000 μM , CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA 0,5 μM. REALIZADA EM TRIPLICATA COM 12 REPETIÇÕES A CADA 10 SEGUNDOS; B) GRÁFICO V_I X [S]

ajustado seguindo os modelos de Michaelis-Menten e de Inibição por Substrato. 41

Figura 20 - a) Gráfico Vi x [S] utilizando substrato 4-CLOROCATECOL - concentrações no intervalo de 23,7 □□ a1000 □□ , concentração de enzima 0,5 μM. Triplicata com 12 repetições a cada 10 segundos; b) Gráfico V_i x [S] ajustado seguindo os modelos de Michaelis-Menten e de Inibição por Substrato. 42

Figura 21 - a) Gráfico V_i x [S] utilizando substrato 4-METILCATECOL - concentrações no intervalo de 23,7 □□ a 1000 □□ , concentração de enzima 0,5 μM. Realizada em triplicata com 12 repetições a cada 10 segundos; b) Gráfico V_i x [S] ajustado seguindo os modelos de Michaelis-Menten e de Inibição por Substrato. 42

Figura 22 - Esquema representativo dos métodos utilizados inicialmente para preparo de amostra para análise por espectrometria de massas. 44

Figura 23 - Espectros resultantes da análise em espectrômetro de massas ESI/MS Eletrospray no modo positivo das amostras separadas da enzima Pp 1,2-CCD como descrito no texto. 45

Figura 24 - Estruturas químicas dos fosfolipídios (PIs) encontrados através da busca no banco de dados Lipidomics Gateway; massas aproximadas a) 613 Da e b) 657 Da. Adaptado de www.lipidmaps.org. 45

Figura 25 - Espectros de dicroísmo circular da enzima Pp 1,2-CCD na ausência (preto) e na presença de vesículas unilamelares dos lipídios: DPPC (vermelho), DPPC-PIP (azul), DPPG (rosa), DPPG-PIP (bege) e DPPC-DPPG-PIP (verde) realizados na proporção lipídio: proteína de 100:1. 47

Figura 26 - Espectros de SRCD da enzima Pp 1,2-CCD na ausência de lipídios (preto) e na presença de vesículas de: POPC (vermelho), POPG (azul) e POPC/POPG (verde) realizados na proporção lipídio: proteína de 100:1.....49

Figura 27 - Espectros de RPE do marcador: a) 5PCSL e b) 16PCSL em vesículas multilamelares de POPC na ausência (preto) e na presença de Pp 1,2-CCD. A razão molar lipídio/proteína foi de 47, contendo 0,5 mol% de marcador de spin. 50

Figura 28 - Espectros de RPE do marcador 7PCSL: a) vesículas unilamelares de DPPC na ausência (preto) e presença (vermelho) da proteína Pp 1,2-CCD e b) vesículas unilamelares de DPPC-PIP2 na ausência (preto) e presença (vermelho) da proteína CCD. A razão molar lipídio/proteína foi de 100, contendo 0,5 mol% de marcador de spin. 51

Figura 29 - Espectros de RPE do marcador 7PCSL: a) vesículas unilamelares de DPPG na ausência (preto) e presença (vermelho) da proteína Pp 1,2-CCD, b) vesículas unilamelares de DPPG-DPPC-PIP2 na ausência (preto) e presença (vermelho) da proteína Pp 1,2-CCD e c) vesículas unilamelares de DPPG-PIP2 na ausência (preto) e presença (vermelho) da proteína Pp 1,2-CCD. A

razão molar lipídio/proteína foi de 100, contendo 0,5 mol% de marcador de spin. 51

Figura 30 - Espectros de RPE do marcador DOPTC: a) vesículas unilamelares de DPPC na ausência (preto) e presença (vermelho) da proteína Pp 1,2-CCD, b) vesículas unilamelares de DPPC-PIP2 na ausência (preto) e presença (vermelho) da proteína Pp 1,2-CCD e c) vesículas unilamelares de DPPG-DPPC-PIP2 na ausência (preto) e presença (vermelho) da proteína Pp 1,2-CCD. A razão molar lipídio/proteína foi de 50, contendo 0,5 mol% de marcador de spin. 52

Figura 31 - Espectros de RPE do marcador DOPTC: a) vesículas unilamelares de DPPG na ausência (preto) e presença (vermelho) da proteína Pp 1,2-CCD e b) vesículas unilamelares de DPPG-PIP2 na ausência (preto) e presença (vermelho) da proteína Pp 1,2-CCD. A razão molar lipídio/proteína foi de 50, contendo 0,5 mol% de marcador de spin. 53

Figura 32 - Transição de fase determinada por DSC do lipídio DPPC na ausência (linha preta), na presença (linha vermelha) da proteína Pp 1,2-CCD e somente da proteína (linha azul). O intervalo de varredura foi de 15-80 ˚C, com taxa de aquecimento de 0,5 ˚C/min e pressão aplicada às celas de 3,00 ATM. A razão molar lipídio/proteína foi de 100.....56

Figura 33 - Termogramas normalizados: comparações de transições de fase de lipídios e da proteína em diferentes situações a)vesículas unilamelares de DPPC - 0,1% PIP2 na ausência (preto) e na presença (vermelho) da enzima Pp 1,2-CCD; b) vesículas unilamelares de DPPC – DPPG – 0,1% PIP2 na ausência (preto) e na presença (vermelho) da enzima Pp 1,2-CCD determinada por DSC. A velocidade de aquecimento foi 0,5 ˚C/min e a razão molar lipídio/proteína foi de 100.....56

Figura 34 - Termogramas normalizados: Comparações das transições de fase de lipídios e proteína em diferentes situações: a) vesículas unilamelares de DPPG na ausência (preto) e na presença (vermelho) da enzima Pp 1,2-CCD e b) vesículas unilamelares de DPPG – 1% PIP2 na ausência (preto) e na presença (vermelho) da enzima Pp 1,2-CCD determinada por DSC. A velocidade de aquecimento foi 0,5 ˚C/min e a razão molar lipídio/proteína foi de 100. 57

Lista de tabelas

TABELA 1 - PORCENTAGENS DE ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS CALCULADAS A PARTIR DA DESCONVOLUÇÃO DOS ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR DA PP 1,2-CCD MEDIDOS A 20 ^{o}C.....35

TABELA 2 - PORCENTAGENS DA DIFERENÇA DE ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS CALCULADAS A PARTIR DA DESCONVOLUÇÃO DOS ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR. 37

TABELA 3 - PORCENTAGENS DE ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS CALCULADAS A PARTIR DA DESCONVOLUÇÃO DOS ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR DA FIGURA 25.....47

TABELA 4 - PORCENTAGENS DE ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS CALCULADAS A PARTIR DA DESCONVOLUÇÃO DOS ESPECTROS DE SRCD. 49

TABELA 5 - VALORES REFERENTES ÀS MEDIDAS DE DSC DA PROTEÍNA NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE DIFERENTES LIPÍDIOS, PARÂMETROS CALCULADOS ATRAVÉS DO PROGRAMA CPCALC:.....57

Lista de abreviaturas e siglas

1,2-CCD	Enzimas pertencentes a família das Clorocatecol 1,2-dioxigenases do tipo intradiol
1,2-CTD	Enzimas pertencentes a família das Catecol 1,2-dioxigenases do tipo intradiol
3,4-PCD	Enzimas pertencentes a família das Protocatecoato 3,4-dioxigenases do tipo intradiol
ACB	Anidrase carbônica bovina
BSA	Albumina de soro bovino
CCD	Enzimas pertencentes a família das Clorocatecol dioxigenases
CIT-C	Citocromo C
CD	*Circular Dichroism*
DAG	Diacilglicerol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O.	Densidade óptica
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
DPPG	Dipalmitoilfosfatidilglicerol
DSC	*Differential scanning calorimetry*
DTT	Ditiotreitol

EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ESI/MS	*Electrospray ionization mass spectrometry*
FFT	*Fast Fourier Transform*
HAP	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
I.S.	Inibição por Substrato
ITS	Inibidor de tripsina de soja
LB	Meio de cultura Luria Bertani
MALDI	*Matrix-assisted laser desorption/ionization*
M.M.	*Michaelis-menten*
OVA	Ovalbumina
pb	Pares de bases
PCR	*Polymerase chain reaction*
PDB	*Protein Data Bank*
PI	Fosfatidilinositol
PIP_2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PI4P	Fosfatidilinositol 4-fosfato

PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
POPC	palmitoil-oleoil-phosphatidilcolina
POPG	palmitoil-oleoil-phosphatidilglicerol
Pp 1,2-CCD	Clorocatecol 1,2-dioxigenase de *Pseudomonas putida*
RNA	Ácido ribonucleico
RPE	Ressonancia Paramagnética Eletronica
RPM	Rotação por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
SRCD	*Synchrotron radiation circular dichroism*
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo

Sumário

1. INTRODUÇÃO 1
   1.1 Dioxigenases 3
2. OBJETIVOS 12
3. MATERIAIS E MÉTODOS 14
   3.1 Expressão 14
      3.1.1 Linhagens de *Escherichia coli* e plasmídeos utilizados para expressão proteica.... 14
      3.1.2 Subclonagem de Pp 1,2-CCD 14
      3.1.3 Subclonagem dos genes de interesse em vetor de expressão 15
      3.1.4 Expressão das proteínas recombinantes 16
   3.2 Purificação das proteínas recombinantes 17
      3.2.1 Lise celular e análise da solubidade de Pp 1,2-CCD 17
      3.2.2 Purificação de Pp 1,2-CCD 17
      3.2.3 Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) 18
      3.2.4 Determinação da concentração de Pp 1,2-CCD 18
   3.3 Estudos de Oligomerização de Pp 1,2-CCD 19
      3.3.1 Eletroforese em gel nativo 19
      3.3.2 Cromatografia de exclusão molecular 20
   3.4 Analise estrutural 20
      3.4.1 Obtenção dos espectros de CD para Pp 1,2-CCD 20
      3.4.2 Medidas de SRCD 21
   3.5 Medidas de absorção óptica 22
      3.5.1 Cinética enzimática 22
   3.6 Espectrometria de massas 22
   3.7 Medidas de RPE 23
      3.7.1 Preparo de micelas para experimento de RPE 23
      3.7.2 Experimento de RPE 24
   3.8 Preparo de micelas para os experimentos de Dicroísmo Circular (CD) e Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) 24
      3.8.1 Experimento de CD: medidas de interação com membranas biológicas 24
      3.8.2 Experimento de DSC 25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 27
      4.1 Clonagem de Pp 1,2-CCD 27
      4.2 Expressão da proteína recombinante 28
      4.3 Purificação de Pp 1,2-CCD 29

4.4 Estudo de Oligomerização de Pp 1,2-CCD 31
4.5 Caracterização estrutural de Pp 1,2-CCD 33
4.6 Ensaios de atividade e cinética enzimática de Pp 1,2-CCD 38
4.7 Espectrometria de massas 42
4.8 Experimentos de interação com membranas biológicas.....46
4.8.1 CD e SRCD.....46
4.8.2 Ensaios de Ressonância Paramagnética Eletrônica.....49
4.8.3 Ensaios de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....53
5. CONCLUSÕES.....59
6. REFERÊNCIAS.....62

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Compostos aromáticos halogenados são contaminantes ambientais resultantes do uso generalizado de solventes, herbicidas, inseticidas, fungicidas e plastificantes [1]. Muitos destes compostos persistem no ambiente devido à sua natureza recalcitrante. Atualmente há uma grande preocupação sobre os perigosos efeitos dos xenobióticos aromáticos no ecossistema natural, já que sua toxicidade pode causar grandes efeitos nos organismos vivos, incluindo os humanos, podendo levar a sérios distúrbios e efeitos mutagênicos para o desenvolvimento e reprodução [2]. Devido a isso, cresceu a busca por formas alternativas de descontaminação do meio ambiente através da eliminação de moléculas de difícil degradação.

Uma metodologia que tem assumido relevante papel para eliminação destes compostos é a bioremediação, uma técnica biotecnológica muito utilizada devido à sua eficiência na eliminação de contaminantes do ambiente, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), utilizando microrganismos, naturais ou geneticamente modificados [3]. Os HAPs são compostos químicos constituídos de carbono e hidrogênio, arranjados na forma de anéis aromáticos. Devido à sua lipossolubilidade celular, esses compostos podem ser absorvidos via inalação, exposição oral e dermal, assim ocorrendo acúmulo nos tecidos adiposos [4]. Mais especificamente, bioremediação é o processo nos quais organismos vivos capazes de metabolizar esses compostos são utilizados para remover ou diminuir a quantidade de poluentes em uma dada situação, transformando-os em substancias inertes [4, 5]. Apesar de existirem formas tradicionais de descontaminação, tais como a remoção, alteração e isolamento do composto, a escavação de solos contaminados e incineração, o processo biológico tem se mostrado como uma alternativa ecologicamente correta e eficaz [6]. Entre os microrganismos utilizados estão às bactérias dos gêneros *Pseudômonas, Aeromonas, Beijerinckia, Flavobacterium, Nocardia, Corynebacterium, Sphingomonas, Mycobacterium, Stenotrophomonas, Paracoccus, Burkholderia, Microbacterium, Gordonia,* dentre outras [5].

Para ter a energia necessária para seu crescimento e fazer uso desses compostos como fonte de carbono e, consequentemente, para que consigam

sobreviver nesses solos poluídos promovendo a sua descontaminação, é necessário que os microrganismos possuam enzimas que transformem as complexas moléculas de HAPs em intermediários comuns das suas rotas metabólicas. Dentre as vias metabólicas de degradação, umas das mais estudadas são as do metabolismo aeróbico realizado pelas bactérias e fungos [4].

Algumas bactérias aeróbicas possuem mecanismos catalíticos que permitem a degradação de cloroaromáticos através de uma via que tem o clorocatecol como intermediário central [7]. Como mencionado anteriormente, em cada um desses organismos enzimas são responsáveis pela cascata de reações, conhecida como funil metabólico (Figura 1), que culmina em um intermediário metabólico comum, finalmente degradado (ou processado). As enzimas dioxigenases fazem parte desse processo, sendo responsáveis pela degradação de metabólitos aromáticos [8]. Sua função e o potencial uso em aplicações biotecnológicas têm tornado as dioxigenases alvo de vários estudos que podem levar a um melhor entendimento e controle de sua atividade catalítica [9, 10].

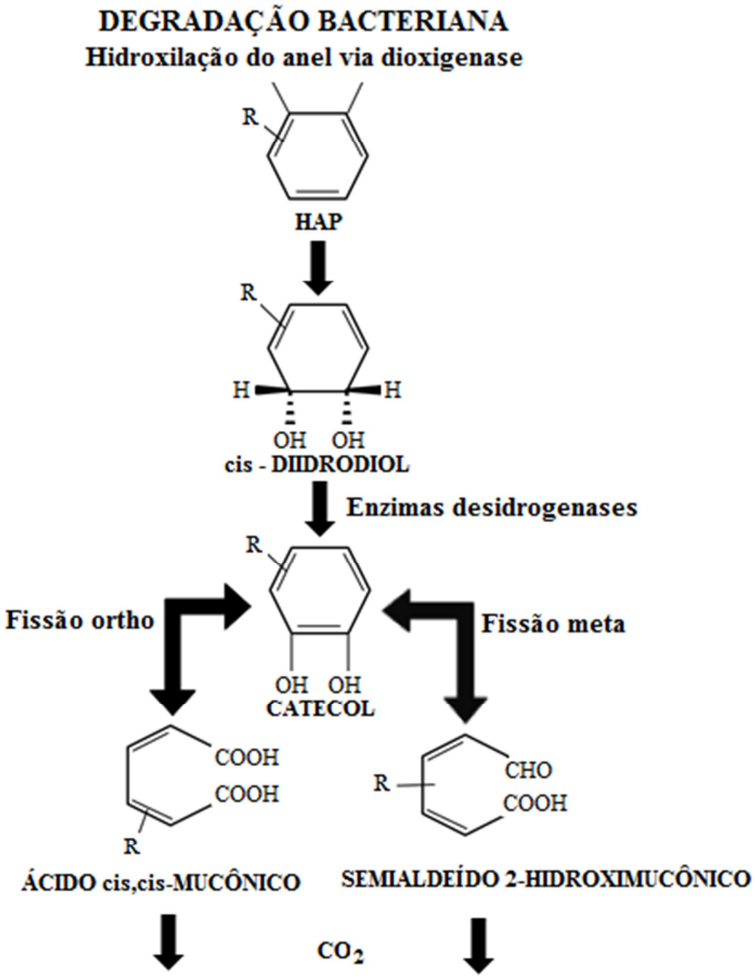

Figura 1 - Funil de degradação bacteriana de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs). Adaptada de Bonalumi [11].

1.1 Dioxigenases

O uso de enzimas microbianas para degradação de compostos tóxicos orgânicos como os HAPs tem apresentado excelentes resultados na limpeza de diferentes ambientes [12]. Dentre os microrganismos responsáveis pela biodegradação e decomposição de compostos, muito dos quais poluentes industriais, está à bactéria *Pseudomonas putida (*Pp*).* Esta é uma bactéria *Gram-negativa* capaz de crescer numa variedade de substratos orgânicos, podendo ser encontrada no solo e na água, apresentando uma grande diversidade metabólica. *P. putida* se utiliza de várias fontes de carbono, incluindo moléculas que poucos

organismos podem degradar o que torna esses organismos importantes para processos de biorremediação [13].

Dioxigenase é uma classe de enzimas dependentes de ferro não-heme que desenvolvem um papel central no chamado funil metabólico para degradação de compostos aromáticos que possuem um metabólito intermediário comum, o catecol ou um de seus derivados. As dioxigenases podem ser divididas em duas classes dependendo de como clivam a estrutura aromática. A diferença na especificidade de clivagem do anel é tipicamente usada para classificar as catecol dioxigenases em dois grupos: enzimas de clivagem intradiol ou extradiol, sendo que a clivagem extradiol pode ser dividida em extradiol distal e proximal (Figura 2).

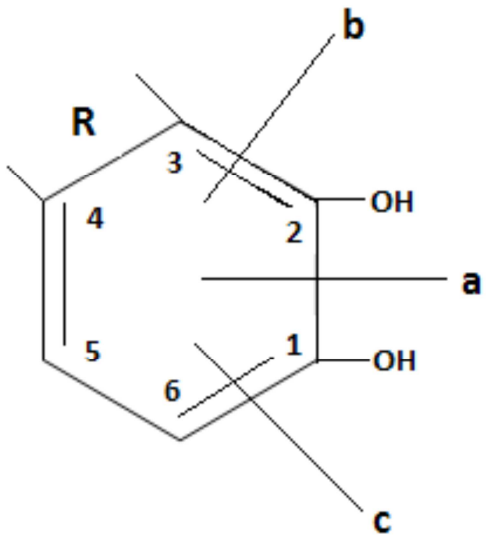

Figura 2 - Representação dos três modos de clivagem da catecol; (a) clivagem intradiol, (b) clivagem extradiol proximal e (c) clivagem extradiol distal. Figura adaptada da referência [14].

Em particular, clorocatecol dioxigenases (CCDs) são enzimas chave no metabolismo aeróbio intradiol da estrutura aromática da molécula de catecol (diidroxibenzeno) ou seus derivados como o clorocatecol e o metilcatecol. Clorocatecol dioxigenases catalisam a adição de um oxigênio molecular ao catecol e seus derivados, com a subsequente clivagem do anel aromático (Figura 2) [7]. No processo de abertura do anel do composto aromático, a enzima conta com a presença de um cofator, um íon ferro, sendo que nas dioxigenases intradióis o íon

está em seu estado Fe(III) e nas extradióis, Fe(II) [7]. Estas duas categorias de catecol dioxigenases apresentam diferenças fundamentais na composição de subunidades, estrutura tridimensional geral, coordenação de ferro e mecanismo de reação [15].

As dioxigenases intradióis podem, ainda, ser divididas em duas diferentes famílias estruturais: as enzimas catecol 1,2-dioxigenase (1,2-CTDs) e protocatecoato 3,4-dioxigenase (3,4-PCDs) [3, 16] (Figura 3). As 1,2-CTDs compreendem proteínas compostas por duas subunidades homólogas [α_2 Fe(III)], que são arranjadas em uma estrutura dimérica em que o íon de ferro encontra-se em uma simetria bipiramidal trigonal coordenado por duas tirosinas, duas histidinas e um grupamento hidróxido (Figura 4) (2Tyr, 2His, 1OH) [17-23].

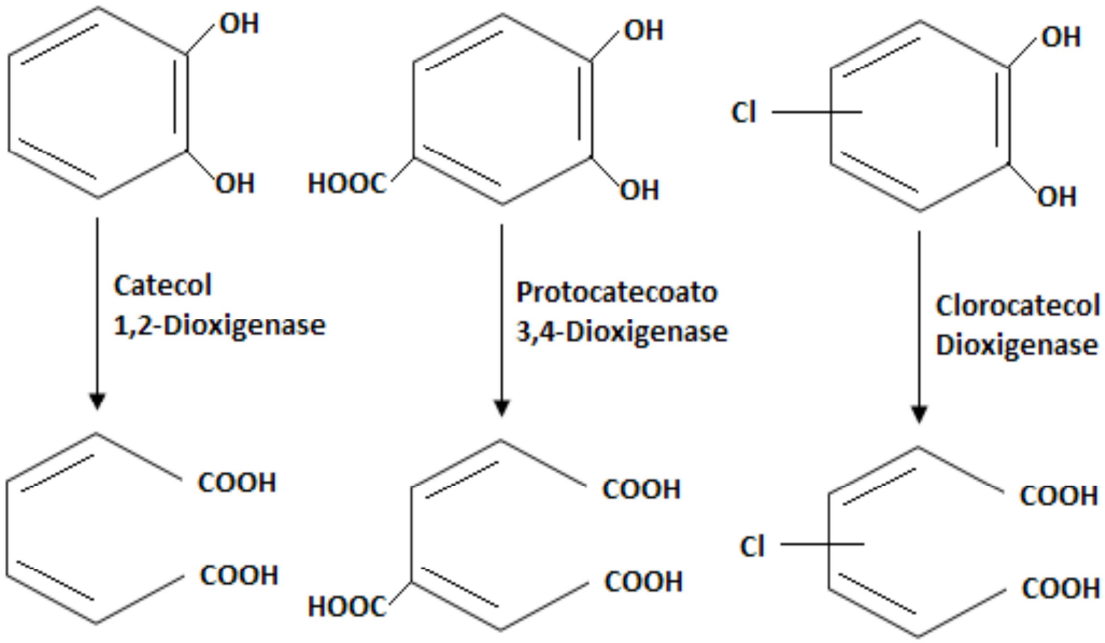

Figura 3 - Esquema de reações catalisadas por enzimas da família das dioxigenases intradióis. Figura adaptada da referência [14].

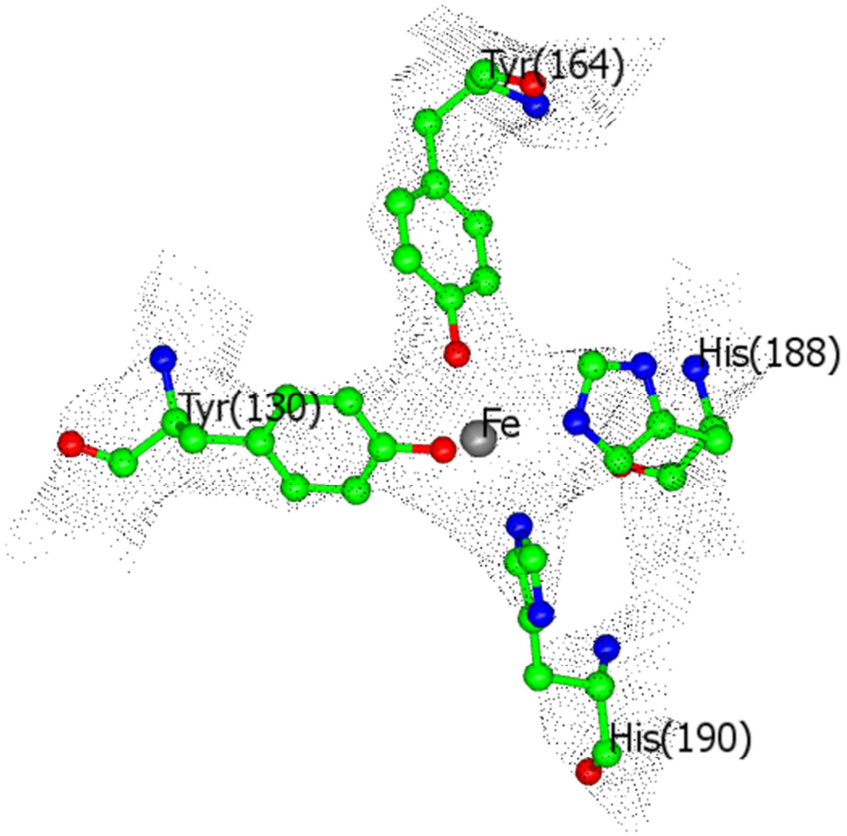

Figura 4 - Coordenação de resíduos do sitio catalítico de Pp 1,2-CCD. O sitio catalítico possui um núcleo de Fe^{3+} ligado a quatro resíduos: Tyr-130, Tyr-164, His-188, His-190.

Comparando-se as atividades catalíticas de clorocatecol 1,2-dioxigenase (1,2-CCD) e catecol 1,2-dioxigenase (1,2-CTD) verifica-se a diferença quanto à especificidade ao substrato, sendo a primeira enzima capaz de catalisar um intervalo maior de substratos do que a última [14, 23]. A intrigante diferença entre as propriedades catalíticas da CCD e as demais dioxigenases é resultado de uma mudança fundamental no sítio catalítico da CCD onde está localizado o íon Fe(III). O sítio de ligação do substrato das clorocatecol 1,2-dioxigenases apresenta características estéricas e eletrônicas compatíveis com a acomodação do átomo de Cl do substrato, indicando possuir tamanho suficiente para seu ajuste. Pode, assim, acomodar outros substituintes hidrofóbicos, como o grupo metil em metilcatecol. Já nas catecol 1,2-dioxigenases, o sítio catalítico não estaria seletivamente adaptado à ligação de Cl, sendo, portanto, mais compacto e inacessível aos substratos halogenados.

A estrutura cristalográfica da Pp 1,2-CCD foi recentemente determinada [24] e foi confirmado que a unidade funcionalmente ativa é um dímero que lembra o formato de um bumerangue (Figura 5) e em suas extremidades estão localizados os domínios catalíticos.

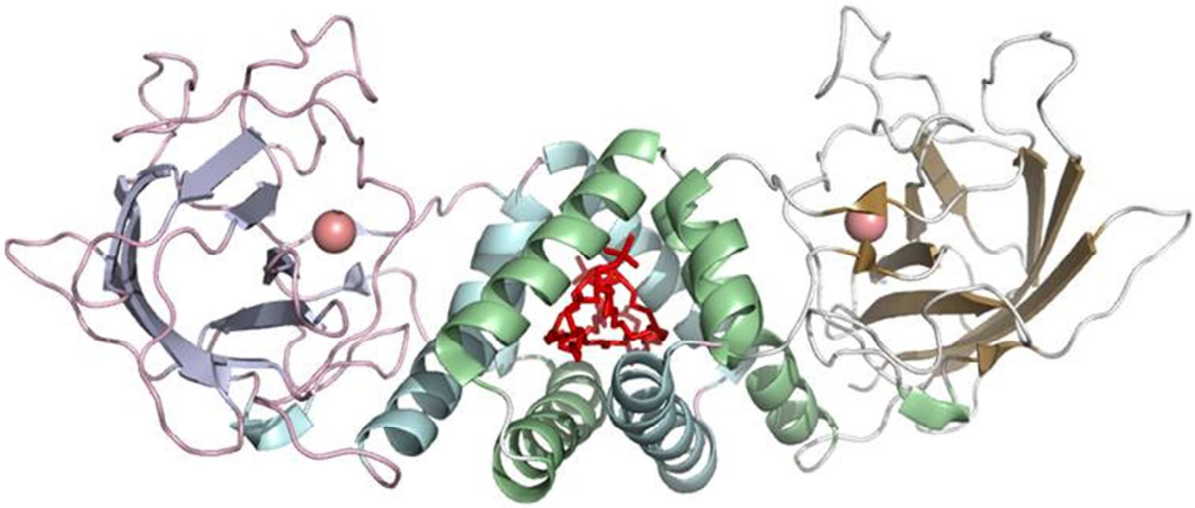

Figura 5 - Estrutura cristalográfica de Pp 1,2-CCD mostrando as duas subunidades que formam o dímero funcional. As esferas rosas representam os íons Fe(III) presentes nos sítios ativos. Na região central de hélices estão representadas, ainda, as moléculas de fosfolipídios discutidas no texto. Fonte: PDB, código de acesso 3TH1.

Ainda advindo de resultados estruturais, uma característica comum a todas as estruturas conhecidas até o momento de 1,2-CTDs e 1,2-CCDs é a presença de um túnel hidrofóbico entre as duas subunidades do dímero (Figura 6) [11, 25-28]. Neste túnel, se encontram ligadas moléculas que exibem características comuns de fosfolipídios e cuja composição e papel no processo catalítico ainda não estão bem determinados. Efeitos moduladores da atividade enzimática têm sido propostos como principal função das moléculas de fosfolipídios [29], mas tal observação ainda carece de mais resultados experimentais.

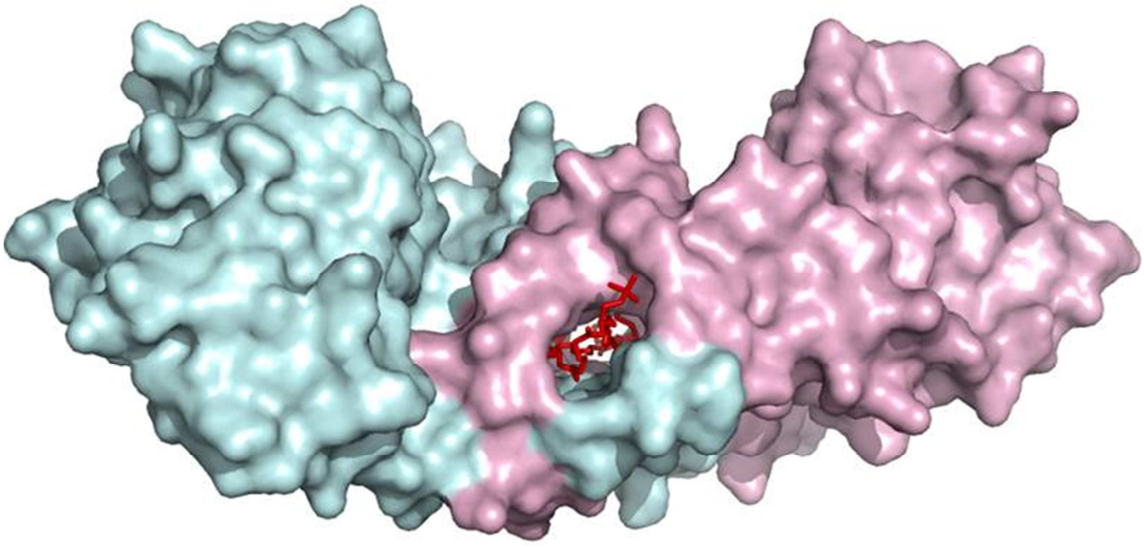

Figura 6 - Superfície da enzima Pp 1,2-CCD, mostrando o túnel hidrofóbico entre as subunidades do dímero, onde possivelmente se encontram moléculas de fosfolipídio. Figura adaptada da referência [3].

Proteínas que ligam fosfolipídios são um importante componente de sinalização, tráfico e metabolismo celular. É evidente que a disposição relativa das duas cadeias de lipídios e a orientação da cabeça do lipídio variam bastante, dependendo da configuração do bolsão de ligação [30]. Vetting e Ohlendorf 2000 [25] realizaram experimentos de espectrometria de massas da 1,2-CTD, por Eletrospray, que indicou que a proteína purificada possui massa molecular por monômero esperada de 34,341 kDa. Picos adicionais de 451,563 e 704 Da sugerem a possibilidade de diferentes fosfolipídios ligarem ao mesmo tempo.

Micalella e colaboradores [26] mostraram através de experimentos de espectrometria de massas MALDI-TOF que as moléculas anfipáticas extraídas do túnel hidrofóbico a partir da desnaturação da 1,2-CTD de *A. radioresistens* dão origem a um espectro cujo pico mais intenso pode ser atribuído a fosfatidilinositóis (PIs). Este é um resultado muito interessante já que PIs não são os fosfolipídios mais abundantes em membranas da célula, mas têm papel conhecido em vários processos celulares como: a produção de mensageiros secundários, por exemplo, na ativação do receptor mediado pela fosfolipase C que catalisa a hidrólise de PIP_2 para produção de mensageiros secundários tais como o DAG e o IP3 [31]; a interação com citoesqueleto, onde a diminuição do nível de PIP2 induz uma liberação do citoesqueleto da membrana [32]; a ativação de enzimas, por meio

principalmente da fosforilação de PI4P (Fosfatidilinisitol 4-fosfato), onde a PI4P 5-quinase (PIP quinase) produz PIP_2 [33, 34]; a participação na endocitose e exocitose.A respeito da exocitose, PIP_2 é encontrado em regiões “membranerafts”, junto aos grânulos de secreção [35]; e a respeito da endocitose, acredita-se que possa haver PIP_2 em regiões superficiais da membrana plasmática [36]; a segmentação de membranas, a membrana de ancoragem simplesmente facilita a interação do domínio catalítico de PLC (phospholipase C) com o substrato PIP_2 ligado à membrana [37, 38].

A descoberta de que 1,2-CTD liga fosfolipídio sugere que ele pode modular a atividade de 1,2-CTD ou que 1,2-CTD pode participar na alteração da bicamada fosfolipídica em resposta a níveis tóxicos de hidrocarbonetos aromáticos. Além disso, os complexos proporcionam informações importantes sobre quais resíduos particulares são importantes para as diferentes especificidades de substrato das enzimas da família 1,2-CTD [25].

Um maior entendimento do mecanismo catalítico de CCDs e de como promover maneiras de controlá-lo é, por conseguinte, altamente desejável. Dentro deste contexto, foi nosso objetivo no presente projeto investigar várias facetas da atividade enzimática da enzima clorocatecol 1,2-dioxigenase de *Pseudomonas putida* (Pp 1,2-CCD). Foi mostrado por nosso grupo em trabalhos anteriores, que a Pp 1,2-CCD é capaz de ligar tanto moléculas de ácido graxo quanto de fosfolipídio [29] e que tais moléculas parecem modular a atividade catalítica. Além disso, pudemos observar que tanto o produto da reação enzimática, o ácido cis-cis-mucônico, quanto o substrato catecol exercem papel inibitório da catálise [13]. Mais recentemente, nosso grupo submeteu a Pp 1,2-CCD a protocolos bem estabelecidos de delipidação para remoção das moléculas de fosfolipídio com subsequente medida da cinética enzimática frente ao substrato catecol [15]. Nossos resultados mostram que o perfil catalítico da enzima é alterado na ausência das moléculas anfipáticas e que isso pode ser potencialmente usado como mecanismo de controle da sua atividade.

Uma das possibilidades aventadas no passado e também sugerida por outros grupos é a de que a Pp 1,2-CCD poderia usar o processo de ligação a membranas como uma ação de modulação de sua atividade catalítica. Experimentos anteriores realizados em nosso grupo não mostraram sinais da existência de tais interações. Entretanto, isto poderia ser devido ao fato de estarmos utilizando modelos

lipossômicos com composição inadequada. Com a nova informação de que 1,2-CTDs possam ter preferência por PIs e juntamente com os resultados dos experimentos de espectrometria de massas, testaremos novas composições de lipossomos agora incluindo PIs ou outros fosfolipídios que sejam identificados. Os experimentos envolveram basicamente medidas de ressonância magnética eletrônica (RME), de calorimetria diferencial de varredura (DSC) e de dicroísmo circular (CD).

Objetivos

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do trabalho de dissertação foi dar continuidade aos estudos já realizados em nosso grupo de pesquisa sobre o papel dos ligantes da Pp 1,2-CCD sobre seu mecanismo de ação.

Os objetivos específicos foram:

1. Otimizar a produção heteróloga da enzima Pp 1,2-CCD;

2. Caracterizar o ligante natural da enzima Pp 1,2-CCD por espectrometria de massas;

3. Realizar estudos de cinética enzimática via medidas espectrofotométricas, utilizando diferentes substratos como o clorocatecol e metilcatecol no lugar do catecol e, assim, verificar se ha algum mecanismo de inibição também por estes substratos;

4. Investigar o processo de uma possível interação entre a Pp 1,2-CCD e modelos de membrana biológica.

Materiais e métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 **Expressão**

3.1.1 Linhagens de *Escherichia coli* e plasmídeos utilizados para expressão proteica

Foram utilizadas duas linhagens distintas de *E. coli.* A linhagem DH5α (Invitrogen) foi utilizada para a propagação e manutenção dos vetores plasmidiais. A linhagem BL21(DE3) (Novagen) foi utilizada para expressão das proteínas recombinantes. Esta linhagem além de ser deficiente nas proteases *lon* e *omp* T, fator que as torna adequadas para expressão de proteínas recombinantes [39], possui também uma cópia integrada do gene da RNA polimerase do bacteriófago T7, sob o controle do promotor *lac* UV5, induzível por IPTG. Para expressão da proteína de interesse o sistema pET (Novagen) foi escolhido, pois este sistema confere, em geral, uma alta eficiência na produção de proteínas recombinantes em *E. coli*.

3.1.2 Subclonagem de Pp 1,2-CCD

O gene clcA (7474 pb), foi clonado no vetor PTYB2 (New England Biolabs Inc.) resultando na construção denominada pTYBCLCA utilizada para expressão heteróloga da proteína clorocatecol 1,2-dioxigenase de *Pseudomonas putida* em *Escherichia coli,* construção esta, cedida pela Prof(a). Dr(a). Ana Paula Ulian de Araújo do Grupo de Biofísica Molecular Sérgio Mascarenhas do Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP). A sequência de Pp 1,2-CCD foi amplificada por PCR a partir dos plasmídeos recombinantes moldes. Para a reação de PCR foram utilizados 100

ng de DNA molde, juntamente com 10 µM dos oligonucleotídeos CCD_pETSUMO_EcoRI_Fw (5'GCGAATTCATGGATAAACGAGTTGCCGAGG) e CCD_pETSUMO_XhoI_Rev (5'GCCTCGAGTCATGCCACTGTCTCCGTAGC), 0,2 mM de dNTPs, 2,5 unidades de *Taq DNA polimerase recombinante* (Invitrogen), 5 µL de 10X *PCR Buffer* - $MgCl_2$ (Fermentas), 1,5 mM $MgCl_2$ e água para completar o volume final da reação, 50 µL. A reação de PCR foi realizada em um termociclador (*Mastercicler gradient* Eppendorf) e o ciclo da reação utilizado para amplificação foi: 2 minutos a 94ºC, seguidos por 30 ciclos de 30 segundos a 94ºC, 30 segundos a 55ºC e 60 segundos a 72ºC, finalizando com 10 minutos a 72ºC. O tamanho do produto de PCR amplificado (783pb) foi verificado por eletroforese em gel de agarose.

Após a eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE [1X], os produtos de PCR referentes à Pp 1,2-CCD foram purificados utilizando-se o *kit Wizard SV gel and PCR clean-up System* (Promega), segundo as recomendações do fabricante. Os produtos purificados foram inseridos no plasmídeo pGem (*InsT/Aclone*™ *PCR ProductCloning Kit*- Fermentas), que foi propagado em células de *E. coli* DH5α. As colônias transformantes foram cultivadas em meio LB-ágar contendo 0,5 mM de IPTG; 0,1 mg/mL de X-gal; 0,1 mg/mL de ampicilina, a 37^{o}C, por 16 horas. Das colônias selecionadas, identificadas visualmente pela coloração branca, o DNA plasmidial foi extraído por lise alcalina e submetido à análise do padrão de restrição com as enzimas *Xho*I e *Eco*RI. A confirmação dos clones positivos e análise da fidelidade das sequências foram validadas por sequenciamento, realizado em um sequenciador automático Genetic Analyzer 3130 (Lifetechnologies), segundo instruções do fabricante, realizado no Grupo de Biofísica Molecular Sérgio Mascarenhas do IFSC, USP.

3.1.3 Subclonagem dos genes de interesse em vetor de expressão

Confirmada a fidelidade da sequência, o gene que codifica a Pp 1,2-CCD foi subclonado no vetor de expressão pETSumo. O vetor de propagação contendo o DNA de interesse e o vetor de expressão pETSumo (*Novagen*) foram digeridos simultaneamente com as endonucleases de restrição XhoI e *Eco*RI, purificados por

eletroforese, seguida por extração em gel com o *kit Wizard SV gel and PCR clean-up system* (Promega). Após a purificação e quantificação, o inserto foi misturado com o plasmídeo linearizado (razão molar de vetor e inserto 1:5) para ligação utilizando a enzima T4 DNA *ligase* (Fermentas), por 12 horas a 4ºC. A propagação dos plasmídeos recombinantes foi realizada pela transformação de células de *E. coli* DH5α, competentes por cloreto de cálcio [40]. As colônias transformantes foram selecionadas pela resistência ao antibiótico específico (30 µg/mL de canamicina). Novamente, os clones positivos foram confirmados por sequenciamento.

3.1.4 Expressão das proteínas recombinantes

Os plasmídeos recombinantes produzidos a partir da inserção do DNA de interesse no vetor de expressão foram utilizados para a transformação de células de *E. coli* BL21(DE3), competentes por cloreto de cálcio [41]. Testes de expressão foram realizados a fim de se determinar as condições ideais de temperatura, concentração de agente indutor IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo) e tempo de indução para expressão de Pp 1,2-CCD. As condições otimizadas para expressão das proteínas recombinantes estão descritas a seguir. As colônias transformantes foram inoculadas em meio LB, contendo o antibiótico canamicina na concentração de 30 µg/mL, crescidas a 37^{o}C, sob agitação constante de 220 rpm por 16 horas. Este pre-inóculo foi utilizado para propagação celular em 1000 mL de meio LB líquido contendo 0,35 g/l de sulfato ferroso e o antibiótico específico, na proporção de 1:100. As células foram cultivadas até a cultura atingir uma densidade óptica (DO), medida em 600 nm, de 0,8. A seguir induziu-se a expressão das proteínas com 0,5 mM de IPTG e o crescimento foi mantido 16 horas à 37ºC. Ao final da indução, a cultura foi centrifugada a 7.000 *xg* em centrifuga SorvallLegendXT da ThermoScientific Rotor Fiber Lite F14-6X 250 LE durante 20 minutos a 6˚C, as células sedimentadas foram estocadas a -20 ºC ou usadas em sequência para o preparo do extrato proteico.

3.2 **Purificação das proteínas recombinantes**

3.2.1 Lise celular e análise da solubidade de Pp 1,2-CCD

As células foram ressuspensas em tampão contendo 20 mM de Tris pH 8, 250 mM de NaCl e 0,5 mM de PMSF, na proporção de 10 mL de tampão para células provenientes de 500 mL de cultura. A lise celular foi realizada em alíquotas de 10 mL por sonicação, *SonicDismembrator* modelo 500 (Fisher Scientific), operando em uma potência de 50%, por sete ciclos de 30 segundos com intervalos regulares de 30 segundos de repouso, em gelo. Todo o procedimento de descongelamento e lise celular foi realizado a baixa temperatura, mantendo-se os frascos em gelo. O extrato resultante foi centrifugado a 11.000 *xg* por 20 minutos, a 6˚C possibilitando a separação da fração insolúvel da fração solúvel. Alíquotas de ambos foram retiradas e submetidas à análise em SDS-PAGE 15%.

3.2.2 Purificação de Pp 1,2-CCD

A purificação de Pp 1,2-CCD empregada para a separação dos contaminantes consistiu de uma cromatografia por afinidade. A fase estacionária utilizada foi uma resina de níquel, tendo sido a coluna equilibrada com tampão de ressuspensão. A fração solúvel foi aplicada na coluna e deixada sob agitação branda em mesa agitadora por 1 hora para que se aumentasse a interação proteína-resina; o não ligado foi eluído e, em seguida, foram feitas as seguintes eluições: 1) 40 mL de tampão (20 mM tris e 250 mMNaCl pH 8,0) sem imidazol; 2) 40 mL de tampão com 20 mM de imidazol; 3) 20 mL de tampão com 40 mM de imidazol; 4) 20 mL de tampão com 60 mM de imidazol; 5) 10 mL de tampão com 80 mM de imidazol; 6) 10 mL de tampão com 250 mM de imidazol; 7) 20 mL de solução 1 M de imidazol.

Alíquotas para SDS-PAGE foram retiradas a cada eluição. Na amostra eluída com 250 mM de imidazol (proteína eluída), foram adicionados 2 mg de ULP-1 para clivagem e deixado por 16 horas a 8°C, fazendo-se troca do tampão (tris 20 mM pH 8 e NaCl 150 mM), troca feita por diálise utilizando membrana com poros de 10 KDa. Após diálise, a amostra foi recromatogradada em coluna de níquel pré-equilibrada com tampão contendo tris 20 mM e NaCl 150 mM pH 8, para retirada da ULP-1 e feito lavagens com tampão + 40 mM de imidazol e tampão + 500 mM de imidazol.

3.2.3 Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

Durante todas as etapas, desde a expressão até a fase final de purificação proteica, alíquotas foram reservadas e analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), utilizando-se um sistema vertical da DIGEL. As amostras proteicas foram ressuspensas em tampão de amostra para SDS-PAGE contendo corante (azul de bromofenol) e β-mercaptoetanol e fervidas por 5 minutos. A eletroforese foi realizada a 150 V até que o azul de bromofenol atingisse o limite inferior do gel (cerca de 2 h). A coloração das bandas proteicas foi feita por *Coomassie Blue* 0,2% (p/v) preparado em metanol 50% (v/v) e ácido acético 10% (v/v). Os marcadores de massa molecular (MM) utilizados foram: albumina de soro bovino, BSA (66 kDa), ovalbumina, OVA (45 kDa), anidrase carbônica bovina, ACB (30 kDa), inibidor de tripsina de soja, ITS (20,1 kDa) e citocromo C, CIT-C (12,4 kDa) e marcador comercial Broad Range Protein Molecular WeightMarkers (Promega) (massas moleculares 10, 15, 25, 35, 50, 75, 100, 150 e 225 kDa).

3.2.4 Determinação da concentração de Pp 1,2-CCD

A concentração das proteínas recombinantes foi determinada com base na absorção em comprimento de onda (λ) de 280 nm, medido em um NanoDrop 2000 da ThermoScientific utilizando-se o coeficiente de extinção molar teórico (ε)

calculado a partir da composição dos resíduos de aminoácidos de cada proteína [41]. O coeficiente de extinção calculado para o monômero de Pp 1,2-CCD foi ε_{280} = 1.190 $M^{-1}.cm^{-1}$. Este cálculo foi obtido através do programa ProtParam tool, disponível no servidor Expasy (**E**xpert **P**rotein **A**nalysis **Sy**stem, http://ca.expasy.org/tools/protparam.html) [42].

A lei de Beer-Lambert foi utilizada para realizar os cálculos da concentração proteica. Esta lei diz que quando uma luz de intensidade I_0 atinge a amostra e a atravessa, a intensidade *I* da luz após passar pela amostra está relacionada com a absorbância por

$$A = log_{10}(I_0/I) = \varepsilon \cdot c \cdot l \text{[2]}$$

onde *A* é a absorbância em 280 nm, ε é o coeficiente de extinção (M^{-1} cm^{-1}), *c* é a concentração (M) e *l* é o caminho ótico (cm).

3.3 **Estudos de Oligomerização de Pp 1,2-CCD**

3.3.1 Eletroforese em gel nativo

A separação de proteínas depende de vários fatores quando em condições nativas, como tamanho, forma e carga nativa. A diferença entre a eletroforese em gel nativo e SDS-PAGE convencional é que na nativa não há a adição de SDS e agentes redutores e nem necessita fervura.

Esta técnica foi utilizada para determinação do estado oligomérico da proteína. A proteína na concentração de 0,6 mg/ml foi aplicada em um gel nativo com concentração de poliacrilamida de 15%. A eletroforese foi realizada até que o azul de bromofenol atingisse o limite inferior do gel. A coloração das bandas proteicas foi feita por *Coomassie Blue* 0,2% (p/v) preparado em metanol 50% (v/v) e ácido acético 10% (v/v). O marcadore de massa molecular (MM) utilizado foi o marcador comercial Broad Range Protein Molecular WeightMarkers (Promega) (massas moleculares 10, 15, 25, 35, 50, 75, 100, 150 e 225 kDa).

3.3.2 Cromatografia de exclusão molecular

Cromatografia de exclusão molecular ou filtração em gel é uma técnica conhecida por: separar proteínas que diferem em massa, diferentes populações oligoméricas de uma proteína ou agregados proteicos.

A coluna de gel filtração Superdex 75 (10/300, GE Healthcare) foi utilizada para avaliar e comparar o estado oligomérico da proteína Pp 1,2-CCD. A coluna foi previamente equilibrada com tampão Tris 20 mM, NaCl 150 mM pH 8,0. A eluição da amostra foi isocrática com 1,5 volumes de coluna sob uma taxa de fluxo de 0,5 ml/min e o volume de amostra injetado foi de 1 ml. A concentração de proteína utilizada foi de 2 mg/ml.

A coluna foi equilibrada com o Kit de calibração de coluna gel filtração para baixo peso (*Gel Filtration Calibration Kits*, GE Healthcare). Os padrões: Conalbumina (75 KDa), Ovalbumina (44 KDa), BSA (66,5 KDa) e Ribonuclease A (13,7 KDa) foram preparados e aplicados separadamente na coluna. O *Blue Dextran* foi utilizado para determinação do volume morto da coluna. Com os valores dos volumes de eluição de cada proteína (V_e), foi possível calcular os valores de K_{av}, a partir de $K_{av}=(V_e - V_0)/(V_t - V_0)$, sendo que V_t é o volume total da coluna. Os valores de K_{av} foram utilizados para construção da curva de calibração, K_{av} x log (MM) (logaritmo da massa molecular de cada proteína), permitindo assim, calcular a massa molecular da proteína de interesse por regressão linear.

3.4 **Analise estrutural**

3.4.1 Obtenção dos espectros de CD para Pp 1,2-CCD

Os experimentos para análise da estrutura secundária de Pp 1,2-CCD foram realizados em um espectropolarímetro Jasco modelo J810 equipado com um

sistema de controle de temperatura do tipo *Peltier*. A concentração proteica utilizada foi 0,0075 mg/ml e o tampão utilizado foi tampão fosfato de sódio 20 mM pH 8,0. As medidas foram realizadas com uma média de 5 acumulações, velocidade de varredura igual a 50 $nm.min^{-1}$, em uma cubeta de quartzo retangular com caminho ótico de 1 cm. Os espectros originais passaram pelo processo de subtração das contribuições do solvente e também foram tratados pela aplicação do algoritmo Transformada Rápida de Fourier (*FFT — Fast Fourier Transform*) disponível no programa Origin 8.0, de modo a preservar as bandas típicas.

3.4.2 Medidas de SRCD

Para o experimento de espectroscopia de dicroísmo circular por radiação sincrotron (SRCD), a proteína foi purificada, dialisada contra um tampão tris 20 mM e NaCl 50 mM, liofilizada e enviada para Alemanha onde a Doutoranda Patricia Suemy Kumagai realizou as medidas. Foi realizado o desenovelamento térmico e medidas de interação com lipídios.

Os experimentos de SRCD foram realizados na linha UV-CD12 do laboratório de luz síncrotron do ANKA - KIT (Karlsruhe, Alemanha). Os espectros foram processados usando o software CDTools [43] incluindo subtração de linha de base e média dos espectros. A concentração da enzima utilizada para realização do *melting* foi 25 µM (0.7 mg/mL) solubilizada em tampão: 13.3 mM Tris, 33.3 mM NaCl, pH 8.00. Intervalo de temperatura 20 - 85℃, com variação 5℃ a cada 5 minutos e comprimento de onda variando 280 - 180 nm com intervalo de 0.5 nm, dwell time 1,5 s e 3 acumulações. As medidas foram realizadas em uma cela de quartzo desmontável (HellmaLtd, UK), caminho óptico 100 µm. A intensidade do pico em 222 nm foi utilizado para o cálculo de fração desnaturada (usando o programa Origin 8).

Experimento com lipídios: [CCD] = 0.5 mg/mL, razão proteína:lipídio 1:100, tampão: 13.3 mM Tris, 33.3 mM NaCl, pH 8.00, T = 20℃, comprimento de onda: 280 - 170 nm, intervalo: 0.5 nm, dwell time: 1.5 s, acumulações: 3, cela de CaF_2 desmontável (Hellma Ltd, UK), caminho óptico 10 µm. Vesículas grande unilamelares (LUVs) compostas por POPC, POPG ou POPC/POPG foram

preparadas no mesmo tampão. CCD foi adicionado em cada composição de lipídios na proporção proteína/lipídio de 1:100.

3.5 **Medidas de absorção óptica**

3.5.1 Cinética enzimática

O teste de atividade enzimática foi realizado em espectrofotômetro Ultroscopec 2100pro utilizando soluções de três diferentes substratos: catecol, 4-clorocatecol, e 4-metilcatecol na concentração 316,4 µM; 0,5 µg de proteína foram adicionados à cubeta Hellma de 10 mm contendo a solução do substrato, que foi homogeneizado e a degradação do substrato foi monitorada pela absorbância do produto da reação, em 260 nm, com 12 repetições para cada substrato nas diferentes concentrações, sendo que o intervalo de tempo para cada leitura foi de 10 segundos.

O experimento de cinética enzimática foi feito em triplicata utilizando os substratos já mencionados anteriormente nas concentrações 23,7, 31,6, 42,2, 56,3, 75,1, 100,1, 133,5, 178, 237,3, 316,4, 421,8, 562,5, 750 e 1000 µM, foi feito em 12 repetições com intervalo de 10 segundos. O programa utilizado para análise dos dados obtidos foi Origin 8.0 e GraphPad Prism 5.

3.6 **Espectrometria de massas**

Após a purificação enzimática, foi retirado o sal da amostra utilizando um concentrador de 10,000 MWCO da Millipore, deixando-a apenas em água milli-Q. A

enzima foi desnaturada por meio da adição de 0,1% de ácido fórmico e banho de gelo por 30 minutos. Para separar a proteína de seus ligantes (componentes de baixo peso), foi utilizado um concentrador de 3,000 MWCO da Millipore, a amostra foi coletada e dividida, uma parte foi evaporada em Speedvac Concentrator – Savant SPD121P – Thermo scientific por 3 horas e a outra parte já em agua foram levadas para analise no espectrômetro de massas Bruker amaZon SL ESI (ElectroSpray Injection Mass Spectrometry), com injeção direta, possuindo uma bomba Shimadzu LC-10AD, em modo de detecção positiva, localizado no Instituto de Química de Araraquara - UNESP, no Departamento Bioquímica e Tecnologia Química, sob supervisão e colaboração do Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli.

3.7 **Medidas de RPE**

3.7.1 Preparo de micelas para experimento de RPE

Uma alíquota de cada solução estoque dos lipídios DPPG preparado em clorofórmio:metanol (2:1) e do DPPC preparada somente em clorofórmio junto a marcadores de spin (DOPTC, 5, 7 e 16-PCSL) foi colocada em tubo de vidro e evaporada utilizando fluxo de gás nitrogênio para a formação do filme. Em seguida, foi colocada em ambiente de baixa pressão num SpeedVacConcentrator (ThermoScientific) por cerca de 2 horas para retirada de resquícios de solvente orgânico. Posteriormente, os filmes foram hidratados com 200 µL de tampão tris 20 mM e NaCl 150 mM pH 8,0, incubados por 3 minutos em banho com temperatura de 44 ºC, ressuspendidos utilizando vórtex e extrusados por meio do extrusor Avant Polar Lipids. As membranas utilizadas possuiam o tamanho de 0,1 µM – NucleoporeTrack-Etechmembrane da Whatman. A enzima Pp 1,2-CCD foi acrescentada às amostras de modo a se obter uma razão molar lipídio: proteína igual a 47 (marcadores 5 e 16-PCSL), 100 (marcador 7-PCSL) e 50 (marcador

DOPTC). As amostras foram preparadas em duplicata. Cada amostra foi homogeneizada e adicionada em um capilar utilizando uma seringa de vidro.

3.7.2 Experimento de RPE

Os experimentos de RPE foram realizados em banda X em um espectrômetro JEOL/JES-FA 200 à temperatura ambiente (~ 25ºC). As amostras em um volume final de 30 µL já adicionadas em capilar foram adicionadas em tubo de quartzo e colocadas na cavidade ressonante do espectrômetro. As medidas foram realizadas a uma potência de 10 mW.

3.8 **Preparo de micelas para os experimentos de Dicroísmo Circular (CD) e Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)**

Os filmes foram preparados segundo metodologia descrita no item 3.7.1. A enzima Pp 1,2-CCD foi acrescentada às amostras de modo a se obter uma razão molar lipídio: 100. Cada amostra foi homogeneizada e adicionada à cela do DSC.

3.8.1 Experimento de CD: medidas de interação com membranas biológicas

Cada amostra foi homogeneizada e adicionada à cubeta da marca Hellma e as medidas realizadas no espectropolarímetro Jasco modelo J810. A concentração proteica utilizada foi 0,2 mg/ml. As medidas foram realizadas com uma média de 5 acumulações, velocidade de varredura igual a 50 $nm.min^{-1}$, em uma cubeta de quartzo retangular com caminho ótico de 1 mm. Os espectros originais passaram pelo processo de subtração das contribuições do solvente e também foram tratados

pela aplicação do algoritmo Transformada Rápida de Fourier (*FFT — Fast Fourier Transform*) disponível no programa Origin 8.0, de modo a preservar as bandas típicas.

3.8.2 Experimento de DSC

Os experimentos de DSC foram realizados em um equipamento Nano-Differential Scanning Calorimeter II modelo 6100. As amostras foram dissolvidas em tampão 20 mM Tris-HCl, 50 mM de NaCl, pH 8,0). As varreduras foram realizadas no intervalo de 15-80 ˚C, com taxa de aquecimento de 0,5 ˚C/min e pressão aplicada em ambas às celas de 3,00 ATM. A quantidade de lipídio usada foi de 10 mM, enquanto que a quantidade de enzima utilizada foi de 100 µM. Para evitar formação de bolhas, a amostra foi degaseificada antes de serem injetadas na cela. Os dados foram analisados no programa Cpcalc e Origin 8.0.

Resultados

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 **Clonagem de Pp 1,2-CCD**

Para realizar a troca de vetor e clonagem do gene Pp 1,2-CCD foram utilizados dois oligonucleotídeos para amplificação do gene de interesse, o CCD_pETSUMO_EcoRI_Fw com sítio de reconhecimento para endonuclease de restrição EcoRI e o CCD_pETSUMO_XhoI_Rev para a endonuclease XhoI. O gene Pp 1,2-CCD foi amplificado por PCR a partir dos plasmídeos recombinantes. Os produtos amplificados, aproximadamente 783 pb, foram purificados por eletroforese em gel de agarose 1%. O gene codificante para Pp 1,2-CCD foi inserido no plasmídeo pGem-T e propagado em células de *E. coli* DH5α. Dentre as colônias transformantes, os clones positivos foram confirmados por análise do padrão de restrição como demonstrado por eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 7). A validação destes clones e a análise da fidelidade da sequência foram feitas por sequenciamento, confirmando assim o sucesso da clonagem.

Após a validação da identidade sequencial, um clone do gene foi selecionado para a subclonagem em vetor de expressão pET SUMO. Para isto, o plasmídeo recombinante foi digerido com as endonucleases de restrição (*Xho* I e *EcoR* I), afim de liberar o inserto (Pp *1,2-ccd*). O vetor pET SUMO foi linearizado com as mesmas enzimas de restrição (*Xho* I e *EcoR* I). O inserto Pp 1,2-CCD foi ligado no vetor de expressão pET SUMO previamente linearizado. Decorrido o tempo necessário para a ligação ocorrer, o plasmídeo recombinante foi utilizado para transformar células de *E. coli* DH5α, objetivando a propagação e manutenção dos plasmídeos recombinantes. Colônias transformantes foram selecionadas, seus plasmídeos extraídos e um novo sequenciamento confirmou a integridade das sequências de interesse. Um clone positivo de cada construção foi utilizado para transformar células competentes de *E. coli* BL21(DE3) com intuito de realizar a expressão das proteínas recombinantes.

A escolha do vetor de expressão pSUMO, que permite a expressão da proteína de interesse fusionada a uma proteína chamada pequeno modificador

relacionada a ubiquitina (small ubiquitin-related modifier), foi devido à sua capacidade de aumentar os níveis de expressão, tornando a proteína de interesse altamente solúvel e facilitando a clivagem pela alta especificidade da SUMO protease.

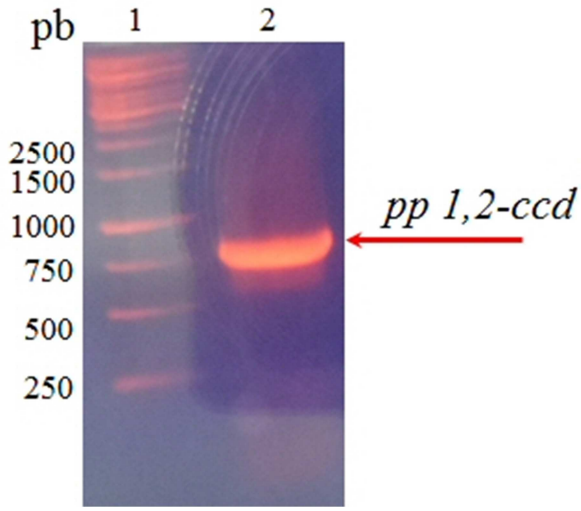

Figura 7 - Amplificação do gene Pp *1,2-ccd*. Produtos da PCR após purificação - 1 corresponde ao padrão em pares de bases GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Promega) e 2 ao fragmento de DNA amplificado.

4.2 **Expressão da proteína recombinante**

Sistemas de expressão bacterianos são comumente utilizados para produção de proteínas recombinantes tanto de origem eucarionte como procarionte, pois são relativamente de fácil manipulação, fácil crescimento e baixo custo [44]. Neste trabalho, para a produção da proteína recombinante utilizaram-se células de *E. coli* BL21(DE3). Esta linhagem traz em seu genótipo o lisógeno λDE3, cuja expressão da T7 RNA polimerase está sob o controle do promotor forte *lac*UV5. A adição do agente indutor IPTG, induz a expressão da T7 RNA polimerase que reconhece o promotor T7 e, consequentemente, permite a expressão do gene de interesse. Após a realização de diversos testes de expressão, a condição mais eficiente frente aos diversos parâmetros variados foi adição de 0,5 mM de IPTG, após a cultura atingir

uma densidade óptica em 600 nm de 0,8, sendo que a expressão proteica foi feita durante toda a noite (16 horas) a 20 ºC. A Figura 8 mostra o resultado de eletroforese em gel de poliacrilamida 15% referente ao teste de expressão de Pp 1,2-CCD. Observando a figura é nítido que o melhor tempo para expressão foi durante 16 horas (coluna 7), verifica-se uma banda mais intensa e de massa esperada para a Pp 1,2-CCD quando ainda ligada a Sumo, aproximadamente 45 KDa.

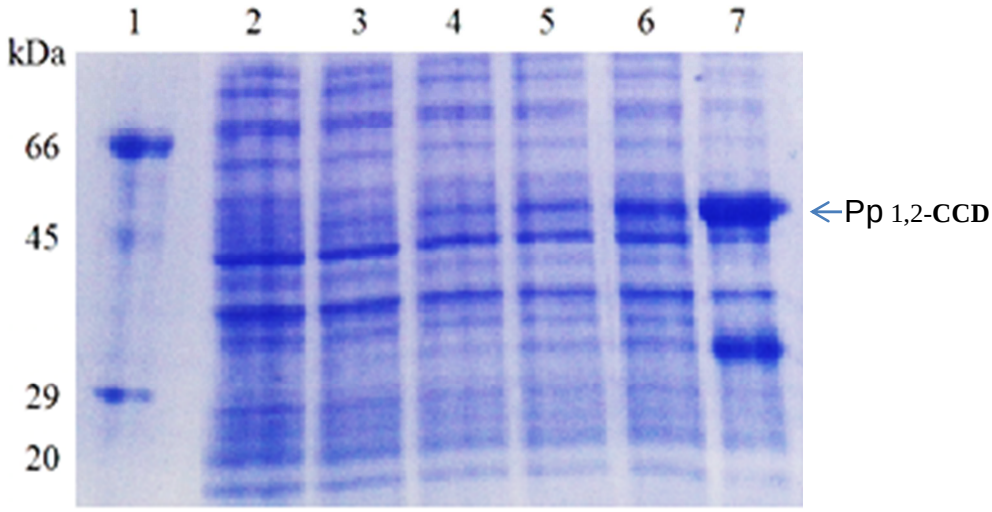

Figura 8 - Resultado dos testes de expressão da Pp 1,2-CCD viasualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida referente: 1 -marcador de massa molecular, 2 - antes da adição do agente indutor (IPTG), 3 - uma hora de expressão, 4 - duas horas de expressão, 5 - três horas de expressão, 6 - quatro horas de expressão, 7 - expressão 16 horas a 20°C com agitação de 220 rpm, sendo a D.O. para cada amostra igual 0,9.

4.3 **Purificação de Pp 1,2-CCD**

Anteriormente na construção da Pp 1,2-CCD o protocolo de purificação era extenso, laborioso e proporcionava baixo rendimento. Com a nova construção da Pp 1,2-CCD em pET SUMO, um novo protocolo de purificação foi estabelecido utilizando cromatografia de afinidade em resina de Ni-NTA, melhorando o tempo de purificação e o rendimento final que passou de 10 mg/L para 20 mg/L por litro de cultura. Após as eluições, verifica-se que a quantidade de proteína obtida ao final do

processo de purificação é satisfatória e suficiente para os estudos programados. Isto é, quando se compara a purificação antes da mudança do vetor de expressão (Figura 9) e a nova construção (Figura 10b) , verifica-se que a banda da proteína clivada não possuía o mesmo grau de pureza (anteriormente havia um contaminante que sempre estava presente) além de possuir um rendimento menor (banda com menor intensidade). Pelo gel de purificação apresentado na Figura 10, é possível notar que a proteína é solúvel (banda intensa na coluna 3 – sobrenadante) e que ao final de todo o processo de purificação a Pp 1,2-CCD apresenta um alto grau de pureza, condição fundamental para a realização de estudos cinéticos e de espectroscopia.

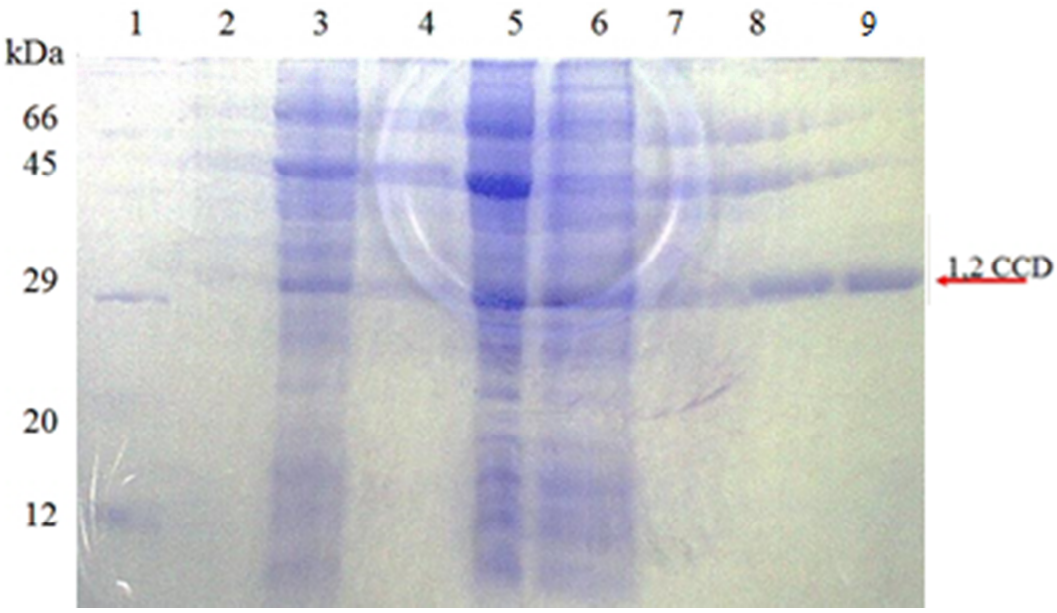

Figura 9 - Resultados da purificação de Pp 1,2-CCD visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida; purificação Pp 1,2-CCD em resina de quitina, Raia 1 – marcador de massa molecular, 2 – antes da adição do agente indutor (IPTG), 3 – após adição do agente indutor (IPTG), 4 – pellet (após centrifugação lisado), 5 – sobrenadante (lisado), 6 – void (não ligado), 7 – lavagem com tampão de ressuspensão (tampão 20 mM Tris, 500 mM NaCl e 0,5 mM PMSF), 8 – lavagem com tampão de clivagem (tampão 20 mM Tris, 50 mM NaCl, 30 mM DTT e 20 µM PMSF) e 9 – eluição proteína clivada.

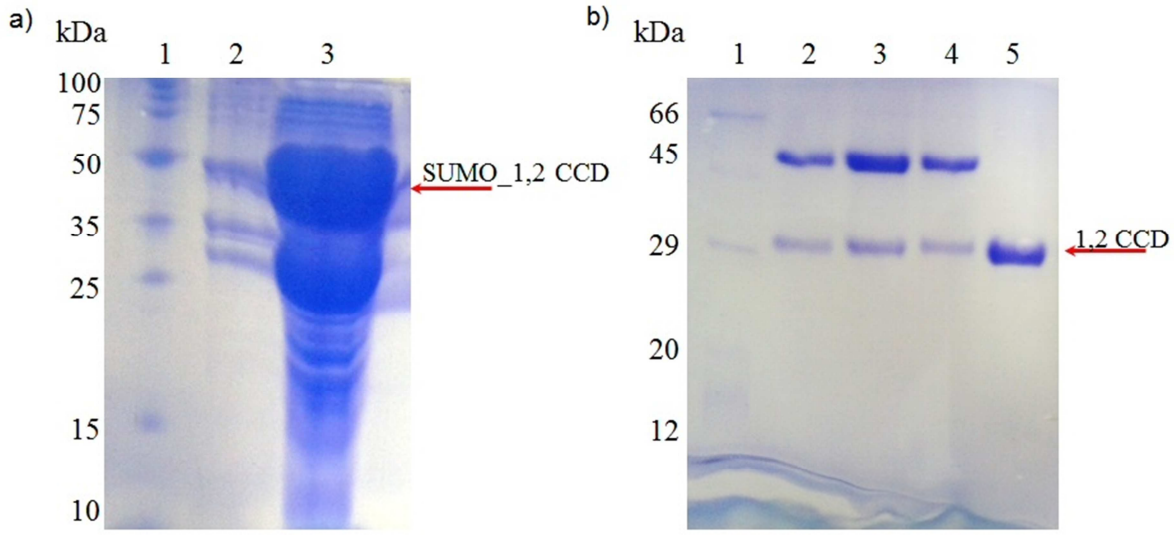

Figura 10 - Resultados da purificação de Pp 1,2-CCD visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida: a) Teste de solubilidade da Pp 1,2-CCD.Raia 1 – marcador de massa molecular, 2 – fração insolúvel após lise celular, 3 – fração solúvel; b) Purificação da Pp 1,2-CCD em resina de Ni-NTA. Raia 1 – marcador de massa molecular, 2 – eluição com 80 mM de imidazol, 3 - eluição com 250 mM de imidazol, 4 - eluição com 1 M de imidazol, 5 – amostra proteica após clivagem.

4.4 **Estudo de Oligomerização de Pp 1,2-CCD**

A estrutura cristalográfica de Pp 1,2-CCD determinada por Bonalumi 2011 [11] revelou que a estrutura quaternária de 1,2-CCD é composta por duas subunidades monoméricas formando um dímero de massa molecular em torno de 60 kDa. O experimento de eletroforese em condições não desnaturantes foi realizado em um gel com uma concentração de poliacrilamida fixa de 15 % (Figura 12). De acordo com ele, a proteína é dimérica, como esperado, também em solução.

A cromatografia de exclusão molecular também foi utilizada para avaliar o estado oligomérico de Pp 1,2-CCD por meio do cálculo de sua massa molecular. Para determinação da massa molecular aparente e consequente determinação do estado oligomérico da 1,2-CCD, utilizaram-se proteínas que possuem massas moleculares conhecidas.

A massa molecular aparente de Pp 1,2-CCD foi obtida pela construção de uma curva de calibração usando o coeficiente de partição (K_{av}) versus o logaritmo da massa molecular de cada proteína padrão. A Figura 11 mostra, respectivamente, os perfis de eluição (a) e a curva de calibração (b) de cada proteína padrão e, na Figura 12, se vê o perfil de eluição de Pp 1,2-CCD. O valor de massa molecular aparente

determinado foi de 67,6 kDa. A diferença entre o valor experimental e teórico foi de 11%, diferença aceitável e que está dentro do erro esperado para esta técnica, pois cromatografia de exclusão molecular é uma técnica de baixa resolução. A cromatografia de exclusão molecular pode, geralmente, apresentar uma diferença de 10 a 20% no tamanho esperado. [45]

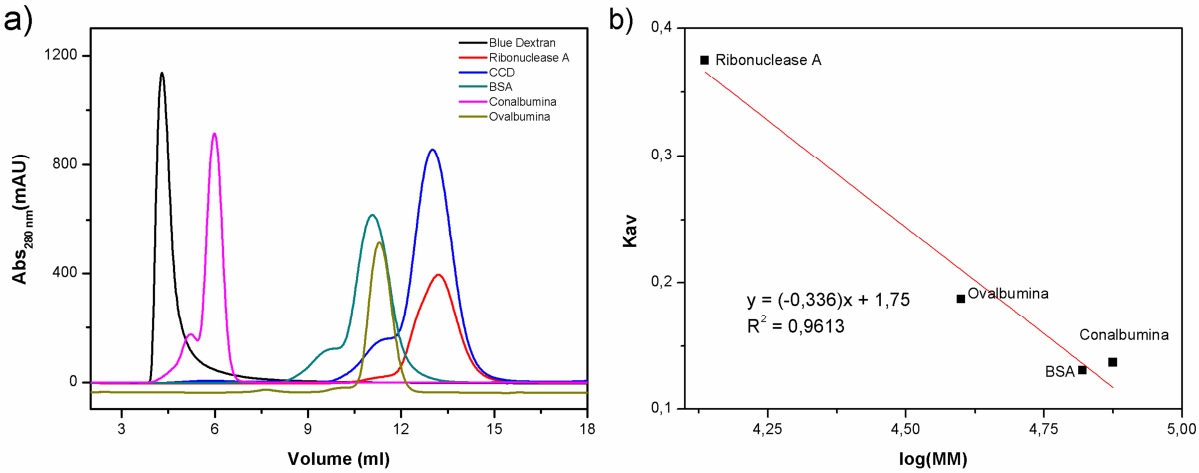

Figura 11 - a) Perfil de eluição dos marcadores moleculares obtidos com a calibração da coluna Superdex 75 (10/300) (GE), b) Regressão linear para determinação da função que correlaciona massa molecular com volume de eluição dos padrões aplicados na coluna Superdex 75 (10/300). Log (MM) = logaritmo da massa molecular. $K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$, onde V_e é o volume de eluição, V_0 é o volume de exclusão e V_t é o volume total da coluna.

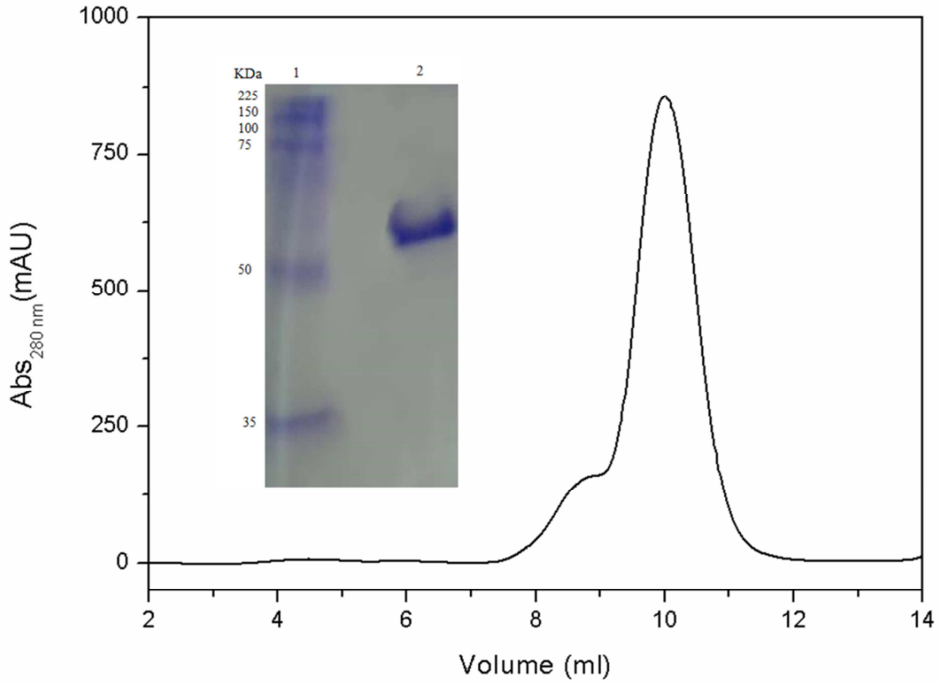

Figura 12 - Perfil de eluição da Pp 1,2-CCD em coluna Superdex 75 (10/300), equilibrada com tampão Tris 20 mM, NaCl 150 mM em pH 8,0 e gel de eletroforese em poliacrilamida não desnaturante mostrando a banda da proteína.

4.5 **Caracterização estrutural de Pp 1,2-CCD**

Uma análise conformacional da estrutura da Pp 1,2-CCD foi feita utilizando-se a espectroscopia de dicroísmo circular (CD). CD é uma técnica espectroscópica que utiliza a interação diferencial de moléculas com a luz circularmente polarizada, fenômeno este que consiste na absorção diferencial da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita por uma molécula quiral (opticamente ativa) [46]. É uma técnica que permite determinar e monitorar mudanças estruturais de biomoléculas, que são repletas de centros quirais. Uma das vantagens desta técnica é que, em solução, vários aspectos da estrutura proteica podem ser medidos e o conteúdo total de estrutura secundária de proteínas pode ser avaliado quantitativamente [46]. Esta técnica é muito utilizada para estudo das mudanças conformacionais, vizinhanças locais, interações de ligantes com a proteína, desnaturação e renaturação de proteínas e também em estimativas do conteúdo das frações de estruturas secundárias [47].

Em proteínas, os cromóforos de interesse incluem a ligação peptídica (absorção abaixo de 240 nm), as cadeias laterais de aminoácidos aromáticos (de absorção no intervalo de 260-320 nm) e as ligações dissulfeto (bandas de absorção fracas centradas em torno de 260 nm) [48]. O espectro UV distante de uma proteína com estruturas em α-hélice é caracterizado por três bandas: uma banda negativa em ~222 nm atribuída à transição n→ π* do momento de dipolo associado à ligação peptídica; outra banda negativa de intensidade similar em ~208 nm e uma forte banda positiva em ~192 nm, que são atribuídas à transição π→π* paralela e perpendicular ao eixo da hélice, respectivamente. Os diferentes tipos de estrutura secundária regular encontrados em proteínas dão origem a espectros de CD no UV distante (Figura 13). As estimativas de conteúdo de estrutura secundária são significativamente mais confiáveis se os dados de CD forem obtidos na região do UV distante (170 nm e abaixo), dados estes que podem ser obtidos através do uso de radiação sincrotron em experimentos de CD (SRCD) [48].

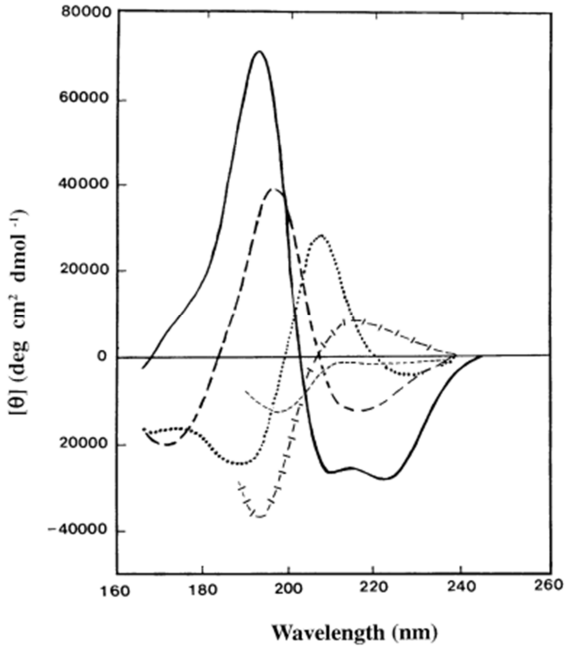

Figura 13 - Espectros de CD no UV distante associados a diversos tipos de estrutura secundária. Linha sólida α-hélice; linha tracejada, folha-β antiparalela; voltas β tipo I; linha pontilhada, tipo I; linha tracejada cruzada, 3_1-hélice; pequena linha tracejada, estrutura irregular. Adaptada de Kelly et al (2005) [48].

As análises de dicroísmo circular da Pp 1,2-CCD, como já descrito anteriormente em Materiais e Métodos, foram realizadas em tampão fosfato de sódio

20 mM pH 8,0. Observando a Figura 14, verifica-se um espectro característico de proteínas com presença significativa de estruturas em α-hélice com mínimos típicos em 208 e 222 nm, resultado que pode ser confirmado através dos dados de desconvolução obtidos utilizando-se os programas Selcon3 e ContinLL do CDPRO [49] e que apresentam os valores percentuais de α-hélice maiores que de folhas β (Tabela 1).

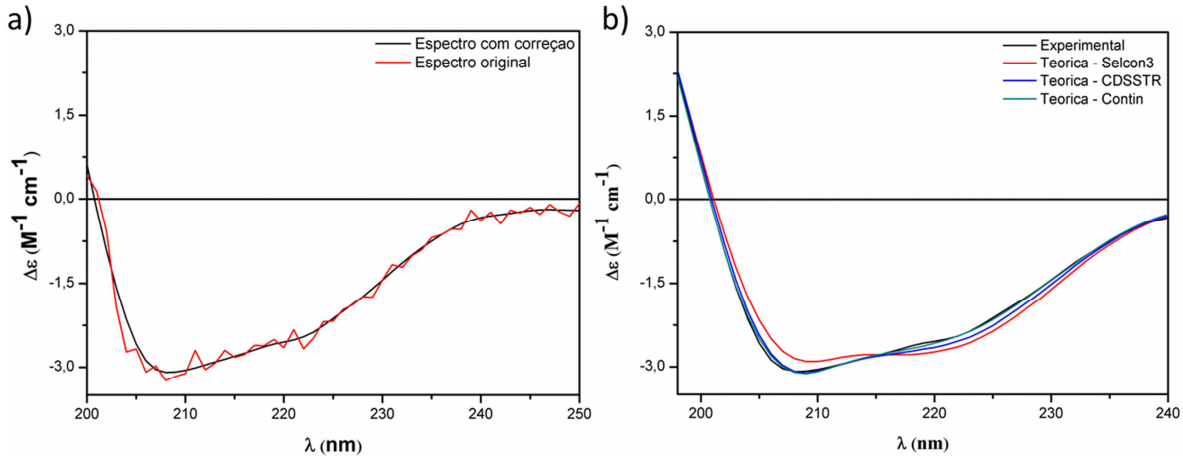

Figura 14 - a) Espectro de CD da Pp 1,2-CCD na região do UV distante. Em vermelho está representado o espectro experimental e em preto o espectro após a correção com FFT; b) Espectros referentes ao dado experimental (preto) e os dados teóricos obtidos utilizando-se os programas Selcon3, CDSSTR e ContinLL do pacote CDPRO. O experimento de CD foi realizado a 20ºC em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 8,0 no comprimento de onda de 198 a 250 nm. A concentração proteica utilizada foi de 0,0075 mg/mL.

Tabela 1 - Porcentagens de estruturas secundárias calculadas a partir da desconvolução dos espectros de dicroísmo circular da Pp 1,2-CCD medidos a 20 ^{o}C.

CCD	α-hélice (%)	Folhas β (%)	Turns (%)	Desordem (%)
Selcon3	28,0	22,5	21,5	26,4
Continll	28,2	23,2	21,1	27,5
CDSSTR	30,8	21,9	18,4	28,5

Os experimentos de desnaturação térmica e de interação com os modelos de membranas biológicas constituídos pelos fosfolipídios POPC e POPG foram realizados utilizando-se dicroísmo circular com radiação síncrotron (SRCD). Os resultados de avaliação da estabilidade térmica da Pp 1,2-CCD através das medidas de SRCD estão apresentados na Figura 15, onde são mostrados os espectros em

diferentes temperaturas, e, na Figura 16, onde se vê a variação da elipticidade molar medida em 222 nm à medida em que se aumenta a temperatura (curva de desnaturação). Como discutido anteriormente, Pp 1,2-CCD possui um espectro característico de proteínas com significativo conteúdo de α-hélice, o que confere ao espectro um aspecto mais característico desse tipo de estrutura secundária. Entretanto, vê-se que a menor definição da banda em 222 nm (comparado a um espectro oriundo de estrutura em α–hélice pura, Figura 13) indica a mistura do espectro associado a estruturas em hélice com contribuições advindas de outros elementos de estrutura secundária como folhas β.

Analisando os espectros de SRCD ao longo da rampa de aquecimento nota-se que os conteúdos de estrutura secundária começam a sofrer perturbação a partir de 50 ˚C, sendo que a partir de 56 ^{o}C (T_m=56,7), aproximadamente, 50% da proteína está desnaturada. Resultado este que difere em aproximadamente 6% do T_m obtido por Mesquita *et al* (T_m=53,2) [3]. Ao final do experimento a proteína foi resfriada a 20 ^{o}C e seu conteúdo de estrutura secundária avaliado por CD, o que demonstrou que a reação de desnaturação da Pp 1,2-CCD é um processo irreversível já que os espectros medidos no início e ao final do processo eram diferentes.

O processo de desnaturação também foi avaliado calculando-se a quantidade de estruturas secundárias através do programa DichroWeb [50] resultados que podem ser visualizados na Tabela 2, onde se verifica uma diminuição no conteúdo de α-hélices. A mudança de estruturas em hélice para estruturas do tipo folha em altas temperaturas deve ser vista como uma indicação de que a Pp 1,2-CCD é capaz de manter elementos ordenados de estrutura secundária mesmo em mais alta temperatura. Tal manutenção, entretanto, não parece ser acompanhada pela preservação da atividade catalítica como previamente observado em estudos de medida da atividade em função da temperatura [51]. Este resultado mostra que a Pp 1,2-CCD não pode ser utilizada em processos de bioremediação que requeiram catálise de compostos aromáticos em temperaturas maiores do que T_m.

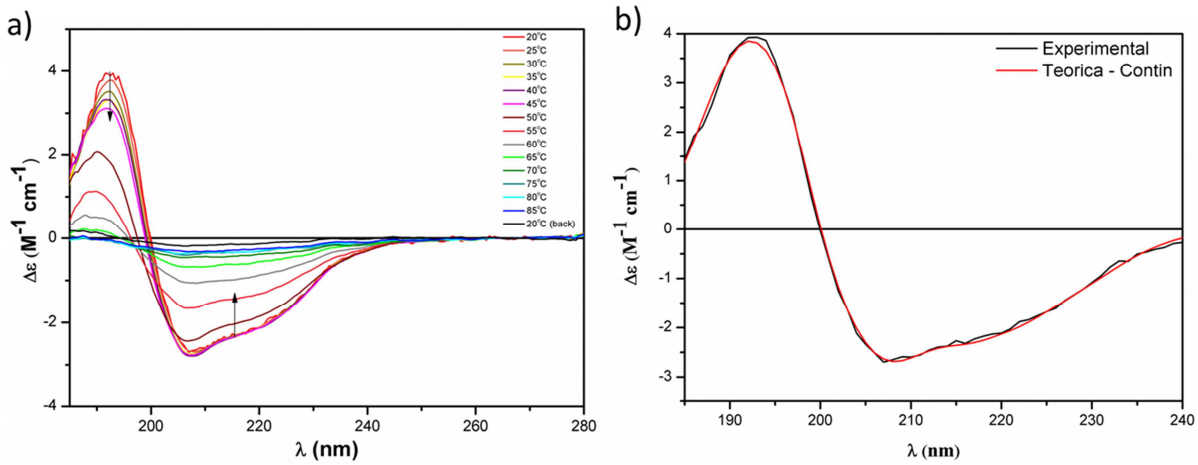

Figura 15 - a) Espectros de SRCD referentes ao desenovelamento térmico da enzima Pp 1,2-CCD em um intervalo de 20 a 85°C; b) Espectros referentes aos dados experimentais (preto) e teóricos (vermelho) a temperatura de 20 °C. A concentração proteica utilizada foi de 0,7 mg/mL.

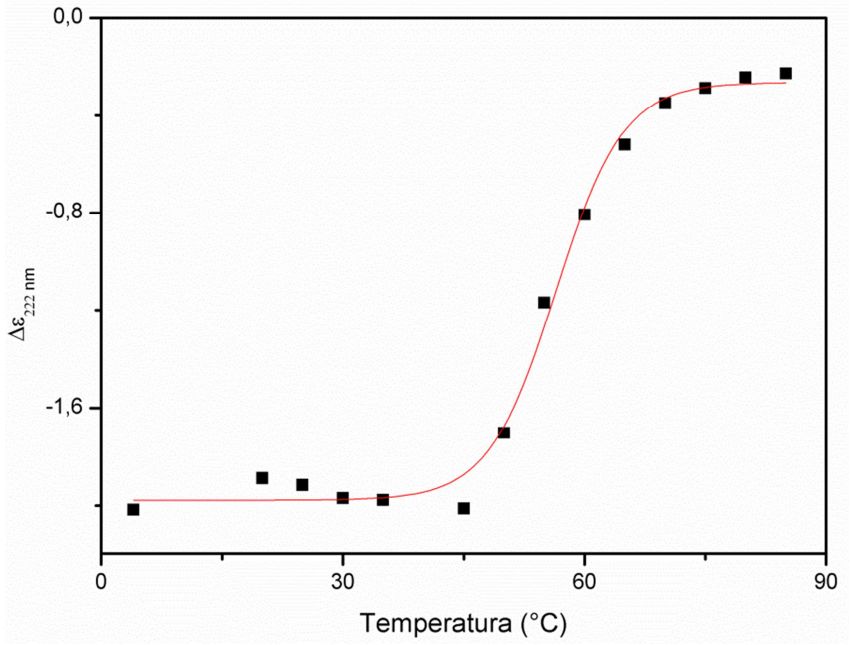

Figura 16 - Curva de desnaturação construída a partir das variações nos valores de Δε em 222 nm em função da temperatura. A linha em vermelho foi obtida a partir de um ajuste da curva de desnaturação a uma função do tipo sigmoidal.

Tabela 2 - Porcentagens da diferença de estruturas secundárias calculadas a partir da desconvolução dos espectros de dicroísmo circular.

CCD ContinII	α-hélice (%)	Folhas β (%)	Turns (%)	Desordem (%)
20˚C	22,6	28,0	21,6	28,0
40 ˚C	20,5	27,4	22,2	29,9
85 ˚C	4,0	42,4	21,7	32,0

4.6 **Ensaios de atividade e cinética enzimática de Pp 1,2-CCD**

Os ensaios de atividade enzimática foram realizados em espectrofotômetro como descrito no item 3.5. A enzima foi adicionada à solução tampão contendo o substrato, homogeneizada rapidamente e colocada no equipamento para medir a formação do produto da reação que absorve luz em 260 nm. As curvas indicando a formação do produto resultante podem ser visualizadas na Figura 17 e pode ser observado que a enzima possui atividade frente aos diferentes substratos testados. Neste primeiro teste de atividade, constatou-se que a enzima quando com o substrato 4-metilcatecol possui atividade mais acelerada quando comparada aos demais (o substrato é consumido mais rapidamente). Estes testes preliminares não foram utilizados como parâmetros para cinética enzimática, pois houve uma diminuição da velocidade com o aumento na concentração do substrato, já que nestes experimentos a concentração de substrato utilizada foi relativamente alta (~400 µM), mostrando que provavelmente o produto ou o substrato, neste caso, estão agindo como inibidores da atividade da CCD, fato anteriormente percebido por Melo e colaboradores [13].

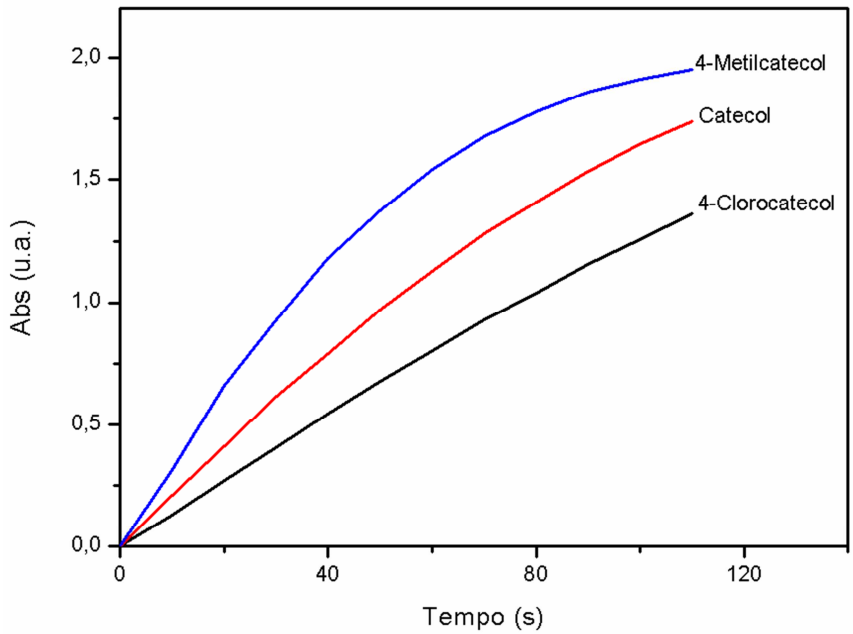

Figura 17 - Ensaio de atividade enzimática como descrito no item 3.4 para verificação da atividade da Pp 1,2-CCD frente a diferentes substratos através da absorção de luz em 260 nm devida à formação do produto da reação com diferentes substratos.

Em trabalho anterior, Melo e colaboradores [13] levantaram a hipótese de haver inibição da reação pelo substrato catecol, o que poderia ser entendido como um posicionamento do referido substrato de forma inadequada para sua catálise já que o sítio catalítico da Pp 1,2-CCD apresenta maior espaço e, assim, comporta também substratos maiores estruturalmente do que o catecol. O uso de substratos maiores deveria, portanto, produzir um esquema cinético típico de Michaelis-Menten sem a mencionada inibição caso tal hipótese fosse acertada. Sendo assim, para investigarmos como a cinética da reação catalisada pela Pp 1,2-CCD se comporta frente a diferentes substratos, realizamos o experimento de cinética enzimática utilizando os substratos catecol, 4-clorocatecol e 4-metilcatecol (Figura 18).

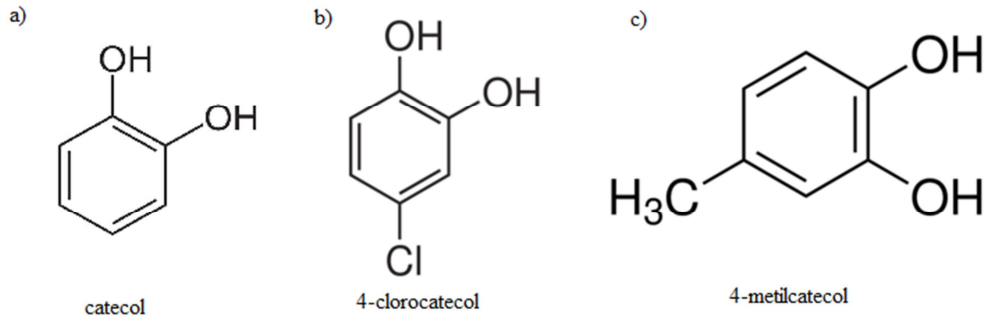

Figura 18 – Estruturas químicas dos substratos utilizados nos experimentos de cinética enzimática da Pp 1,2-CCD: a) catecol, b) 4clorocatecol e c) 4-metilcatecol.

Para entender os mecanismos de uma reação enzimática, pode-se determinar a velocidade inicial de reação e, com mudancas nos parâmetros experimentais, verificar como essa velocidade varia [23]. Um importante fator que influencia na taxa da reação enzimatica é a concentração de substrato [S]. Em concentrações baixas, a velocidade aumenta quase que linearmente e em concentrações mais altas de substrato, a velocidade tende a um patamar constante quando a enzima segue o esquema tradicional descrito por Michaelis-Menten [14].

Das curvas de absorção em função do tempo, os valores referentes a parte linear da curva foram selecionados e, a partir de um ajuste usando a equação de uma reta, o coeficiente angular de cada medida (correspondente à velocidade inicial V_i da reação) foi determinado e utilizado para montar uma curva de V_i x [S] (Figura 19a, Figura 20a e Figura 21a). Nestes gráficos, verifica-se a formação de uma curva cinética com características distintas daquelas observadas numa tradicional cinética

de Michaelis-Menten. O formato dessas curvas indica que a Pp 1,2-CCD possui uma função catalítica com alta eficiência para faixa de concentração de substrato entre cerca de 23 e 400 µM. A partir desta concentração (400 µM), começa a haver uma diminuição na velocidade da reação, sugerindo, como já relatado anteriormente por Melo e colaboradores [13] para o substrato catecol, que pode estar havendo inibição pelo substrato e/ou pelo produto da reação. Melo propõe que o mecanismo de inibição pelo substrato é inibição competitiva, pois tanto o substrato como o produto podem se ligar ao sítio catalítico e quando o produto se liga, impede que haja a formação de novos produtos, diminuindo assim a velocidade da reação. Devido a esse comportamento, a possibilidade de que a reação siga o modelo proposto por Michaelis-Menten em todo o intervalo de concentração do substrato deve ser descartada.

A cinética de Michaelis-Menten é também chamada de cinética do estado estacionário, isto é, a reação atinge um estado estacionário quando o substrato é adicionado a uma enzima e a velocidade de formação do complexo intermediário ES é compensada pela velocidade que ES se decompõe, mantendo, assim, a concentração de ES constante. A atividade do estado estacionário aumenta de maneira hiperbólica até se aproximar de uma velocidade máxima característica quando a uma quantidade fixa de enzima são adicionadas concentrações progressivas de substrato. A constante de Michaelis é característica para cada enzima e cada substrato e corresponde à concentração de substrato em que a velocidade de reação é igual à metade da velocidade máxima [52].

Utilizando um ajuste teórico dos dados experimentais assumindo cinética de Michaelis-Menten (M.M.), os parâmetros obtidos para o substrato catecol foram K_m=10,88±2,1 µM, $V_{máx}$=15,32±0,35 µM.s^{-1} e Kcat=30,6±0,7 s^{-1}, para o 4-clorocatecol K_m=9,9±3,1 µM, $V_{máx}$=12,69±0,4 µM.s^{-1} e Kcat=25,4±1 s^{-1} e para o 4-metilcatecol K_m=85,86±25,3 µM, $V_{máx}$=14,41±1,2 µM.s^{-1} e Kcat=28±2,5 s^{-1}.

Porém, devido à diminuição da velocidade da reação após elevada concentração de substrato (400 µM), foi utilizado também um ajuste dos dados para caso de Inibição por substrato (I.S.) e os valores de $V_{máx}$, K_m e K_i encontrados foram para o substrato catecol K_m=21,57±3,2 µM, $V_{máx}$=18,54±0,7 µM.s^{-1}, K_i=2332±504 µM e Kcat=37 s^{-1}, para o 4-clorocatecol K_m=22,68±5,7 µM, $V_{máx}$=16,17±1,2 µM.s^{-1}, K_i=1688±529 µM e Kcat=32,3 s^{-1} e para o 4-metilcatecol K_m=11794 µM, $V_{máx}$=1089 µM.s^{-1}, K_i=8,24 µM e Kcat=2178 s^{-1}. Tais ajustes foram realizados utilizando-se o

programa Graphpad Prism (Figura 19, Figura 20 e Figura 21). Analisando os resultados aqui obtidos verificamos que o valor de Km para o substrato catecol esta em concordancia com o valor encontrado por Melo et. al.[13] o que já não se observa quando comparado aos valores obtidos por Broderick et. al. [1].

Vemos que para todos os substratos utilizados, o esquema com inibição por substrato leva a ajustes melhores do que aquele utilizando-se a cinética de MM. Isto parece, então, ser uma característica geral da Pp 1,2-CCD frente a seus substratos e que pode ter implicações fisiológicas na bactéria. Por exemplo, mecanismos de inibição pelo produto da reação podem constituir a base para um processo de inibição do tipo *feedback,* fazendo com que a atividade da enzima seja regulada pela presença excessiva do produto da reação que, no caso da Pp 1,2-CCD, pode ser tóxico para a célula. Além disso, a informação de que há tal efeito inibitório para os três substratos testados é relevante quando se pensa em aplicações biotecnológicas já que quanto maior o conhecimento sobre formas de regular a atividade da enzima de interesse, maiores as possibilidades de seu uso em aplicações de bioremediação.

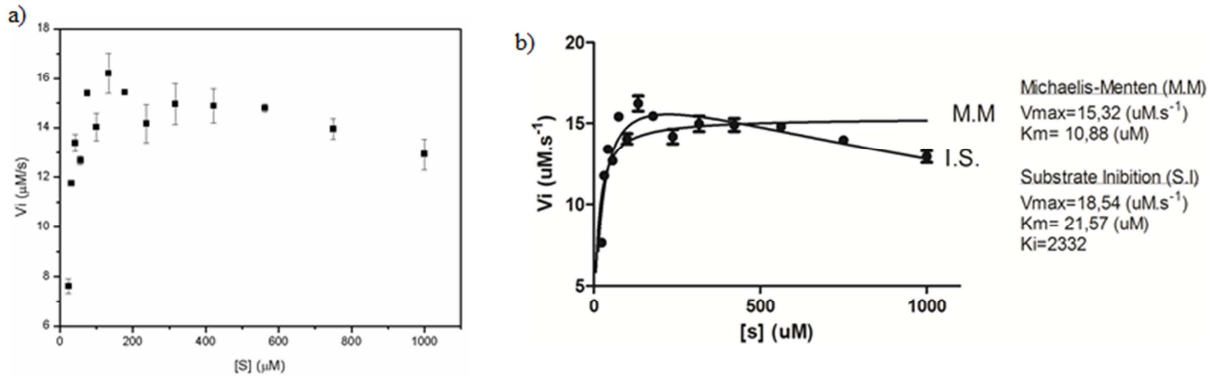

Figura 19 - a) Gráfico V_i x [S] utilizando substrato CATECOL - concentrações no intervalo de 23,7 µM a 1000 µM , concentração de enzima 0,5 µM. Realizada em triplicata com 12 repetições a cada 10 segundos; b) Gráfico V_i x [S] ajustado seguindo os modelos de Michaelis-Menten e de Inibição por Substrato.

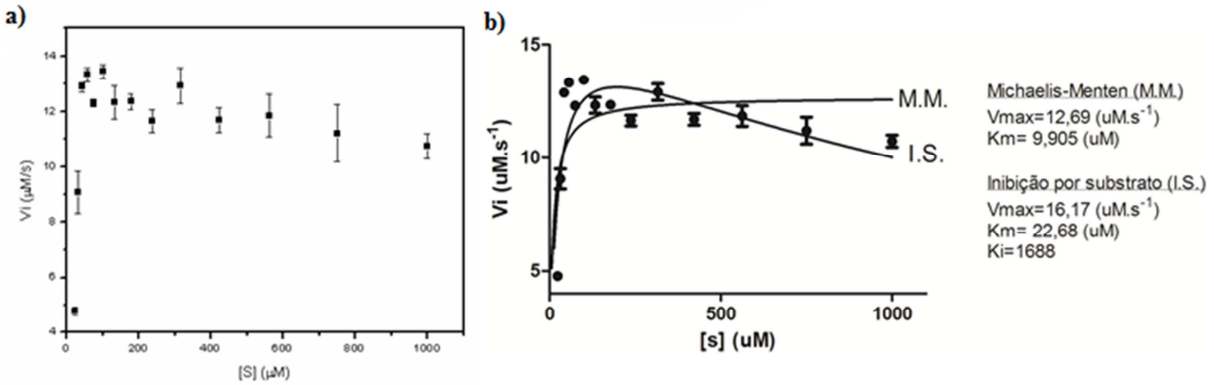

Figura 20 - a) Gráfico Vi x [S] utilizando substrato 4-CLOROCATECOL - concentrações no intervalo de 23,7 µM a1000 µM , concentração de enzima 0,5 µM. Triplicata com 12 repetições a cada 10 segundos; b) Gráfico V_i x [S] ajustado seguindo os modelos de Michaelis-Menten e de Inibição por Substrato.

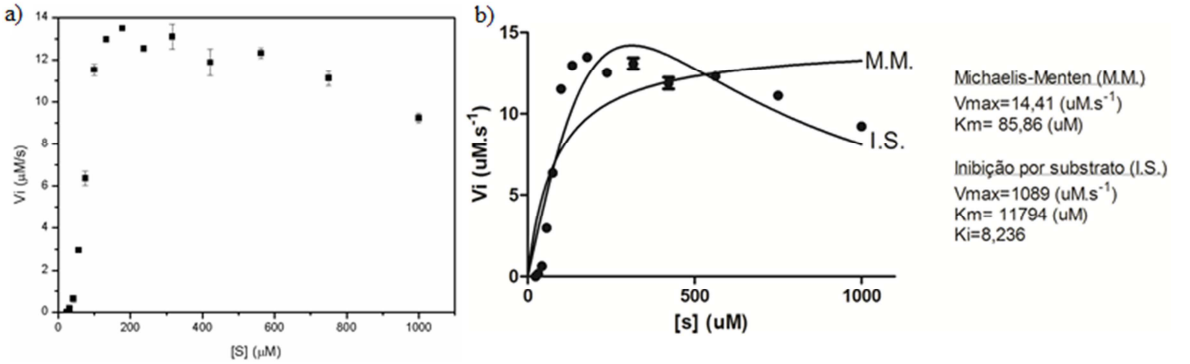

Figura 21 - a) Gráfico V_i x [S] utilizando substrato 4-METILCATECOL - concentrações no intervalo de 23,7 µM a 1000 µM , concentração de enzima 0,5 µM. Realizada em triplicata com 12 repetições a cada 10 segundos; b) Gráfico V_i x [S] ajustado seguindo os modelos de Michaelis-Menten e de Inibição por Substrato.

4.7 **Espectrometria de massas**

A espectrometria de massas é uma técnica analítica utilizada para se obter informação sobre a massa molecular e sobre as características estruturais de uma dada amostra. É uma importante ferramenta analítica já que é capaz de fornecer informação sobre: a composição elementar de amostras, a estrutura molecular, a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas, a estrutura e a composição de superfícies sólidas e as proporções isotópicas de átomos em amostras [53].

O espectrômetro de massas consiste de uma fonte de íons, um analisador de massas que mede a relação massa/carga (m/z) do analito ionizado e um detector

que registra o número de íons de cada valor m/z. Ionização por Eletrospray (ESI) e Ionização por matriz assistida (Maldi) são as duas técnicas mais utilizadas para volatilização e ionização de amostras proteicas para analises de espectrometria de massas [54].

Em nosso caso, utilizamos a espectrometria de massas na tentativa de identificar o ligante anfipático previamente encontrado na catecol 1,2-dioxigenase de *Acinetobacter radioresistens* [26]. Para tanto, a proteína foi preparada e submetida a um processo de desnaturação com subsequente tentativa de separação de seus ligantes (seção 3.6), porém, inicialmente, as tentativas foram falhas. Dentre os métodos utilizados, foram feitos: (1) a desnaturação através do aumento da temperatura e separação por centrifugação e (2) desnaturação com ácido fórmico e separação por centrifugação e ultracentrifugação (Figura 22). Nos dois métodos, alíquotas foram retiradas do sobrenadante e pellet para análise em gel de poliacrilamida, onde verificou-se que a separação (proteína-ligante) não havia sido eficiente, pois havia grande quantidade de proteína na “solução do ligante”. Mesmo assim, as amostras foram secas por speedvac e ressuspendidas para análise em espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF, experimento este realizado no Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos – NPPNS – FCFRP. No entanto, houve, além das dificuldades anteriores, também problemas para ressuspensão da amostra para análise, não obtendo assim sucesso com essas técnicas.

Um protocolo eficiente de separação foi, então, estabelecido utilizando-se o método de desnaturação por acido fórmico e separação através do uso de um concentrador Millipore com membranas de 3kDa.

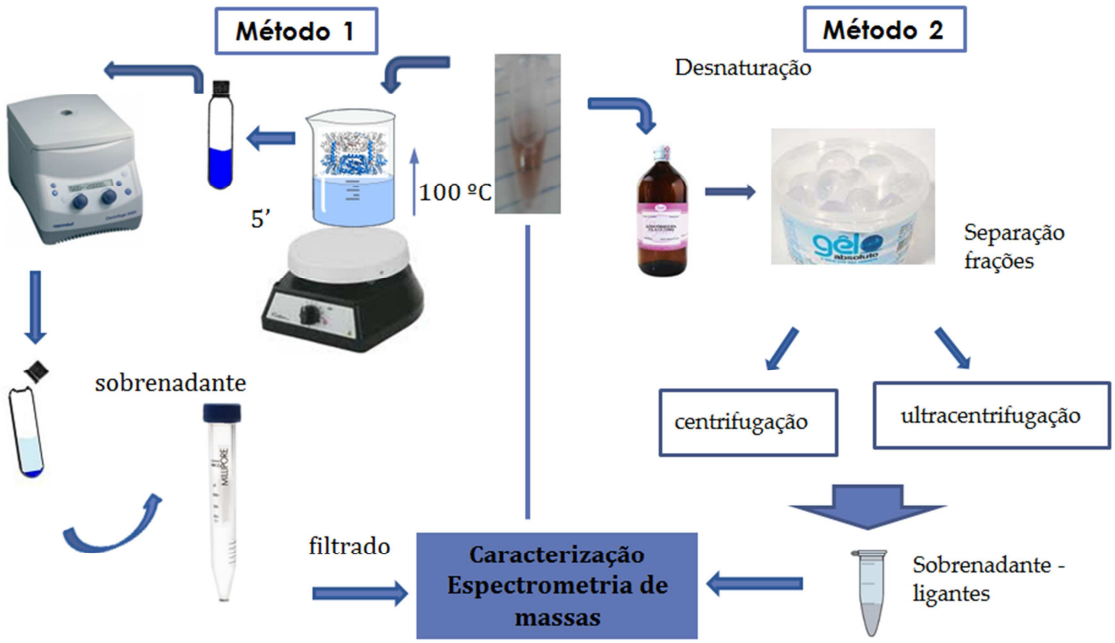

Figura 22 - Esquema representativo dos métodos utilizados inicialmente para preparo de amostra para análise por espectrometria de massas.

Como pode ser visualizado na Figura 23, verifica-se a presença de picos majoritários na região de 613 e 657 Da, indicando, através da busca no banco de dados Lipidomics Gateway (www.lipidmaps.org/), a possível presença de fosfoinositol (PI), classe dos Glicerofosfoinositol e subclasse Monoacilglicerofosfoinositols (Figura 24). Com a hidrólise de PIP2, catalisada pela fosfolipase C, ocorre a produção dos mensageiros secundários DAG (diacylglycerol) e o IP3 (inositol 1,4,5-trisphosphate). Os resultados encontrados a partir das diferentes análises realizadas no Eletrospray, após pesquisa no banco de dados Lipidomics Gateway, foram de moléculas com tamanho de DAG e PI.

Micalella e colaboradores [26] reportaram, também a partir de experimentos de espectrometria de massas, que as moléculas extraídas com a desnaturação da enzima 1,2-CTD de *A. radioresistens* podem ser associadas a fosfaditilinositóis (PIs), o que sugere, conjuntamente com nossos resultados, que a presença desse tipo de moléculas e/ou seus derivados seja uma propriedade mais geral das enzimas CTDs e CCDs. O papel de PIs (ou derivados) no mecanismo funcional de CCDs requer ainda mais investigações. Os resultados obtidos até o momento levam a vários questionamentos interessantes, principalmente em face do envolvimento de PIs em processos celulares muito específicos, como a produção de mensageiros secundários, e sua presença em domínios estruturais conhecidos como “membrane

rafts". Até o momento, nosso grupo se preocupou em acrescentar PIP2 a modelos de membrana biológica utilizados em nossos experimentos (v. Seções posteriores).

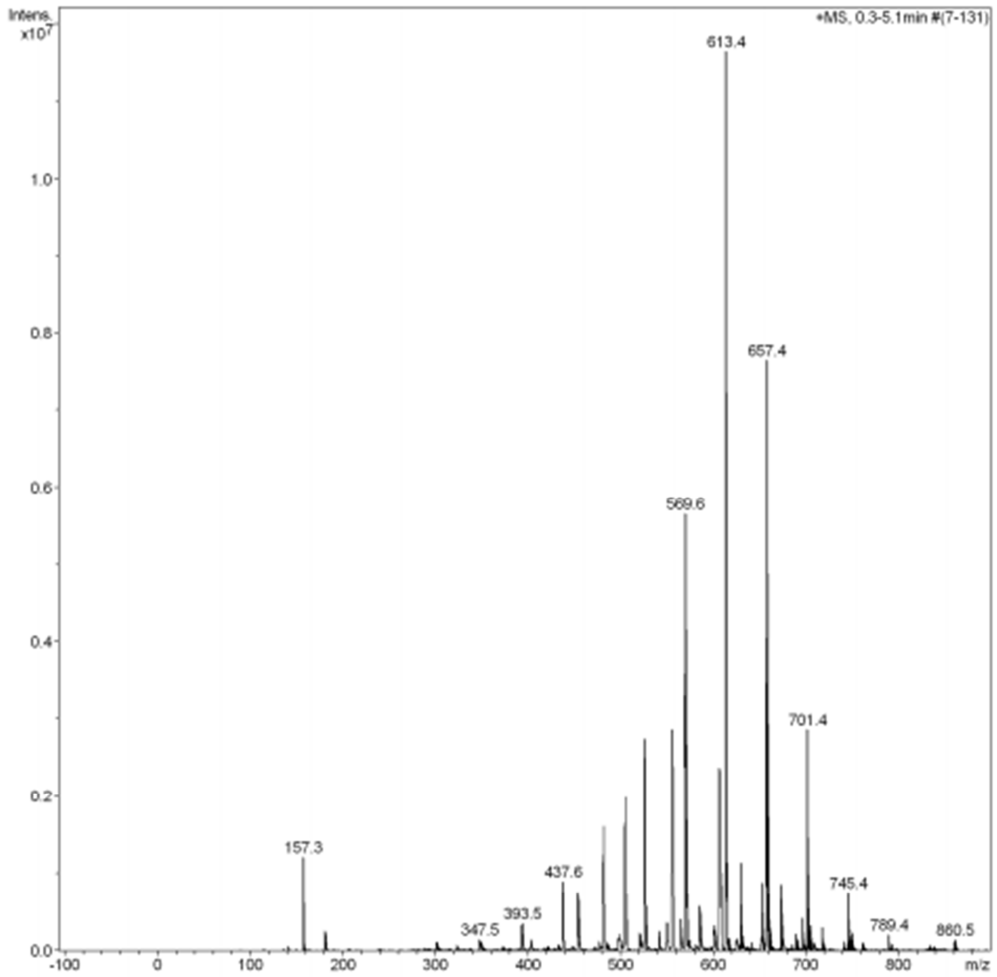

Figura 23 - Espectros resultantes da análise em espectrômetro de massas ESI/MS Eletrospray no modo positivo das amostras separadas da enzima Pp 1,2-CCD como descrito no texto.

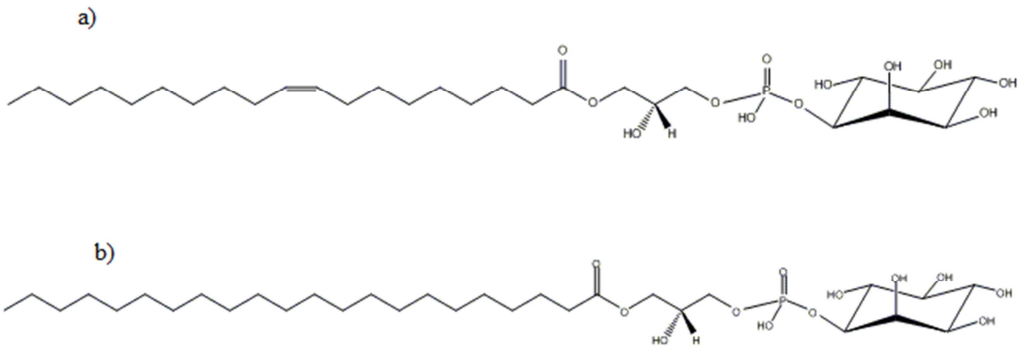

Figura 24 - Estruturas químicas dos fosfolipídios (PIs) encontrados através da busca no banco de dados Lipidomics Gateway; massas aproximadas a) 613 Da e b) 657 Da. Adaptado de www.lipidmaps.org.

4.8 **Experimentos de interação com membranas biológicas.**

4.8.1 CD e SRCD

Os experimentos de CD e SRCD foram realizados a fim de se investigar uma provável interação da enzima Pp 1,2-CCD com modelos de membrana biológica. O CD convencional foi realizado utilizando-se lipossomos constituídos por combinações dos fosfolipídios DPPC, DPPG e PIP2 e os resultados podem ser visualizados na Figura 25. A escolha desses fosfolipídios foi tal que pudesse ser observada a influência de aspectos como carga superficial da vesícula e/ou a presença de um análogo da molécula identificada através dos experimentos de espectrometria de massas.

Os resultados mostram que há alterações do espectro quando a enzima se encontra na presença de todos os miméticos de membrana. Pode-se dividir os espectros em três grupos. O primeiro grupo contém os espectros da Pp 1,2-CCD na presença de lipossomos com carga superficial negativa devido à presença de DPPG. Nos casos de vesículas de DPPG e DPPG/PIP (curvas rosa e bege na Figura 25), observam-se alterações de intensidade em relação ao espectro controle da enzima em tampão apenas. Na sequência, vesículas de DPPC e DPPC/PIP (curvas vermelha e azul na Figura 25) causam mudanças associadas ao segundo grupo e mostram que, mesmo na ausência de carga superficial, ainda podem ser observadas mudanças na forma e intensidades dos espectros. Por fim, o terceiro grupo é composto pelo espectro da enzima na presença de lipossomos em que estão presentes todos os fatores em investigação (carga e PIP), o que leva às maiores alterações qualitativas nos espectros. Este resultado indica que a combinação carga superficial e presença de PIP deva ser responsável por uma maior mudança conformacional na estrutura da Pp 1,2-CCD e, portanto, maior determinante na interação da enzima com a membrana.

Uma avaliação mais quantitativa das alterações discutidas acima pode ser alcançada utilizando-se o método de desconvolução dos espectros de CD. Os resultados podem ser observados na Tabela 3 e mostram que em todas as amostras, principalmente naquela contendo DPPC-DPPG-PIP2 (curva azul clara na

figura) há perda de estruturas α-hélice. Esta perda de estrutura em hélice pode ser, ainda, interpretada como uma reorientação desfavorável das hélices que compõem a estrutura da enzima quando na presença dos miméticos de membrana. Os espectros de CD típicos de regiões em hélice podem ter sua intensidade diminuída tanto pela desestruturação de tais hélices quanto por uma mudança conformacional que leve a uma situação de menor alinhamento paralelo das hélices. Esta segunda possibilidade pode ser a razão da diminuição observada na Figura 25.

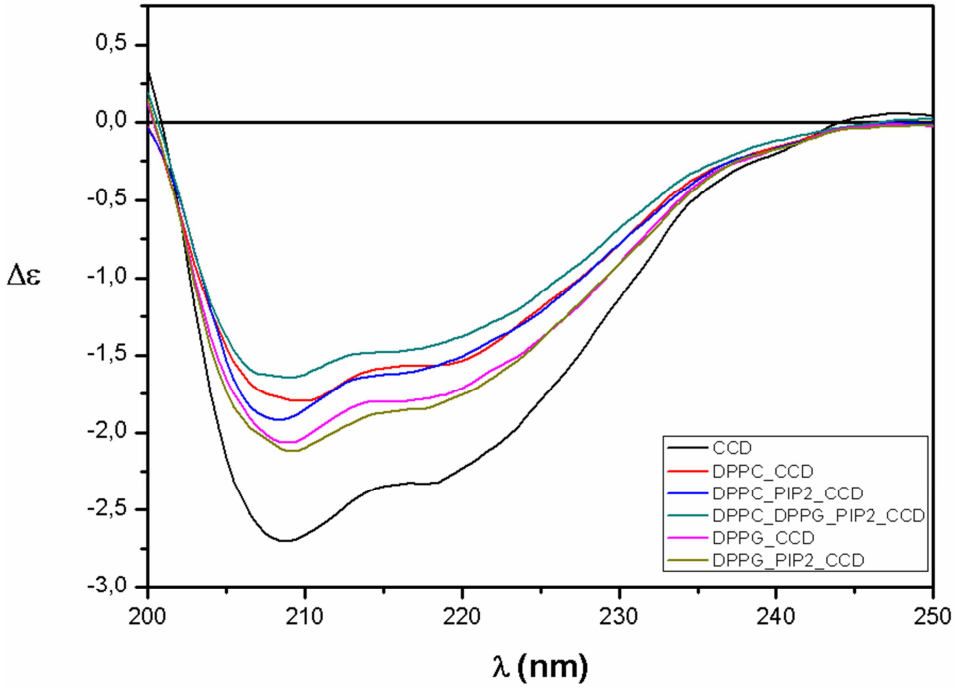

Figura 25 - Espectros de dicroísmo circular da enzima Pp 1,2-CCD na ausência (preto) e na presença de vesículas unilamelares dos lipídios: DPPC (vermelho), DPPC-PIP (azul), DPPG (rosa), DPPG-PIP (bege) e DPPC-DPPG-PIP (verde) realizados na proporção lipídio: proteína de 100:1.

Tabela 3 - Porcentagens de estruturas secundárias calculadas a partir da desconvolução dos espectros de dicroísmo circular da Figura 25.

Programa / Amostras	CONTINLL.exe			
	α-helice (%)	Folhas β (%)	Turns (%)	Desordenada (%)
CCD	24,3	25,5	19,7	30,5
DPPC	15,5	31,2	21,5	31,9
DPPC_ PIP	17,4	30,6	20,5	31,5
DPPG	17,9	29,7	20,8	31,5
DPPG_ PIP	17,9	29,7	21,1	31,1
DPPC_ DPPG_ PIP	14,8	33,2	20,9	31,1

Com o intuito de buscar melhor resolução espectral de mudanças conformacionais, a espectroscopia de SRCD foi também realizada utilizando-se vesículas constituídas pelos fosfolipídios POPC e POPG e os espectros medidos nas diferentes condições estão mostrados na Figura 26. Verifica-se que em todas as condições houve mudanças estruturais consideráveis, fato que pode ser confirmado através da Tabela 4, onde se vê mais uma vez uma diminuição na porcentagem de estruturas secundarias α-hélice, principalmente na presença de lipossomos de POPC e POPG. Verifica-se que, diferente dos experimentos anteriores, em que foi utilizado o PIP em diversas combinações, aqui foram obtidas menores alterações.

Com base nos dados mostrados nas Tabela 3 e Tabela 4, vemos que em qualquer das situações investigadas, ocorre uma diminuição do conteúdo de hélices na presença dos miméticos de membrana. A região de interface entre os monômeros da Pp 1,2-CCD, região mais rica em α-hélices, deve ser, portanto, aquela mais suscetível às mudanças conformacionais induzidas pela interação com os lipossomos. Ocorre que essa região é também aquela em que se encontram os sítios de ligação das moléculas anfipáticas na estrutura da Pp 1,2-CCD. Mesquita e colaboradores [6] já haviam observado uma mudança no perfil cinético da Pp 1,2-CCD quando submetida a protocolos de delipidação que removiam as moléculas anfipáticas, evidenciando, assim, a influência destas moléculas sobre a catálise enzimática. A enzima passa de uma cinética com características de cooperatividade para uma cinética tradicional do tipo Michaelis-Menten na presença de moléculas anfipáticas, o que sugere mudanças conformacionais em regiões da estrutura proteica. Os resultados de CD e SRCD aqui apresentados indicam que a interface entre os monômeros da Pp 1,2-CCD deva ser tal região, que pode, portanto, constituir excelente escolha quando se quer propor maneiras de se controlar a atividade enzimática.

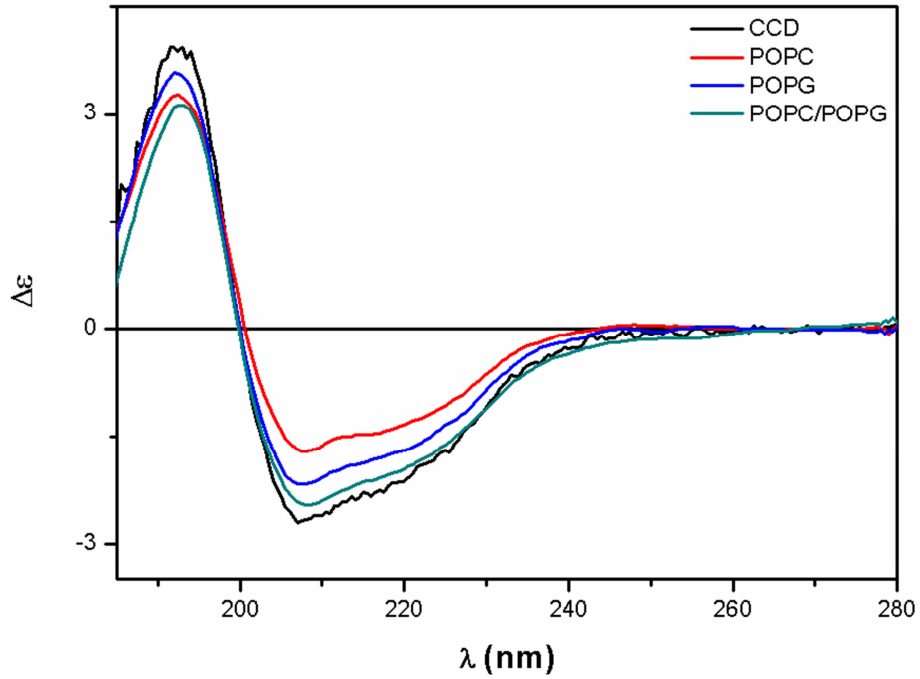

Figura 26 - Espectros de SRCD da enzima Pp 1,2-CCD na ausência de lipídios (preto) e na presença de vesículas de: POPC (vermelho), POPG (azul) e POPC/POPG (verde) realizados na proporção lipídio: proteína de 100:1.

Tabela 4 - Porcentagens de estruturas secundárias calculadas a partir da desconvolução dos espectros de SRCD.

Programa / Amostras	CONTINLL.exe			
	α-helice (%)	Folhas β (%)	Turns (%)	Desordenada (%)
CCD	21,7	28,0	21,4	29,0
POPC	15,5	32,6	20,3	31,5
POPG	18,0	30,4	20,9	30,6
POPC_ POPG	20,4	27,9	22,2	29,5

4.8.2 Ensaios de Ressonância Paramagnética Eletrônica

A Ressonância Paramagnética Eletrônica [5] ou Ressonância do Spin Eletrônico é uma técnica espectroscópica sensível a elétrons desemparelhados, geralmente um radical livre ou um íon de um metal de transição. Os espectros de um radical nitróxido são caracterizados pela presença de três linhas de ressonância

associadas a transições eletrônicas entre os níveis de energia resultado da interação hiperfina entre o momento magnético eletrônico e o momento magnético nuclear. O resultado do espectro de amostras em solução depende do grau de movimento da molécula e da magnitude das interações magnéticas [14].

Neste trabalho, a técnica de RPE aliada ao uso de sondas magnéticas colocadas em moléculas de fosfolipídios foi utilizada para monitorar outro aspecto de potencial relevância para a atividade catalítica da Pp 1,2-CCD, qual seja o papel da molécula de fosfolipídio encontrada ligada à estrutura proteica e uma eventual interação com membranas biológicas durante o ciclo funcional da enzima. Para tanto, espectros da sonda 5-PCSL e 16-PCSL (derivado do fosfolipídio PC) incorporadas a modelos de membrana biológica constituídos pelo fosfolipídio POPC na ausência e na presença da Pp 1,2-CCD foram medidos. Como pode ser visualizado na Figura 27 (a e b), em que os espectros de RPE contendo lipídio-marcador-enzima (linha vermelha) foram sobrepostos ao espectro contendo apenas lipídio-marcador-tampão (linha preta), verifica-se que não houve mudanças significativas no sinal, o que também ocorre quando do uso do marcador 7-PCSL (Figura 28 e Figura 29) aos lipídios DPPC e DPPG, mostrando que provavelmente a interação não deve ter afetado o empacotamento da bicamada e consequentemente o ambiente do marcador. Tais resultados sugerem, portanto, que ainda não atingimos uma condição experimental que evidencie tal interação por RPE. Um passo crucial neste tipo de investigação está na determinação dos parâmetros experimentais que irão levar a alterações espectrais detectáveis.

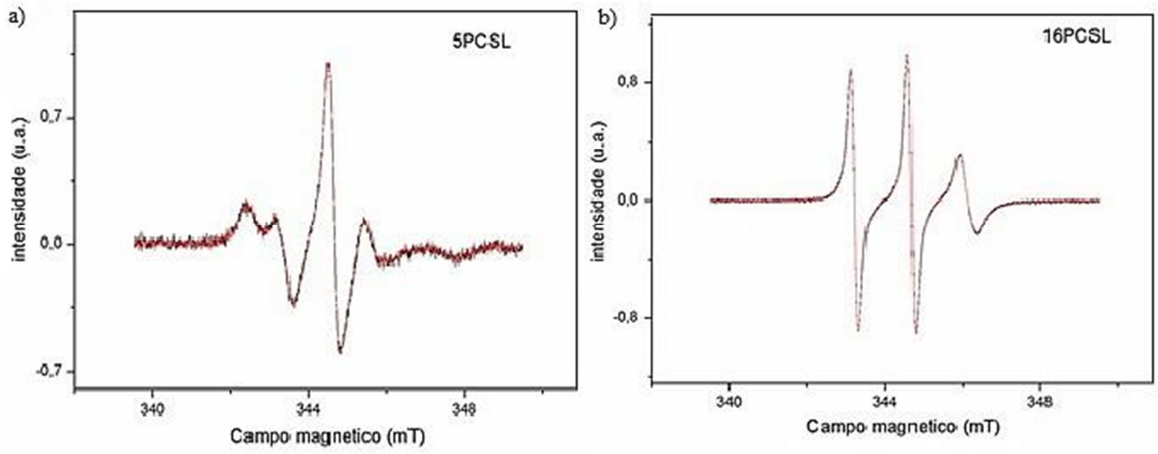

Figura 27 - Espectros de RPE do marcador: a) 5PCSL e b) 16PCSL em vesículas multilamelares de POPC na ausência (preto) e na presença de Pp 1,2-CCD. A razão molar lipídio/proteína foi de 47, contendo 0,5 mol% de marcador de spin.

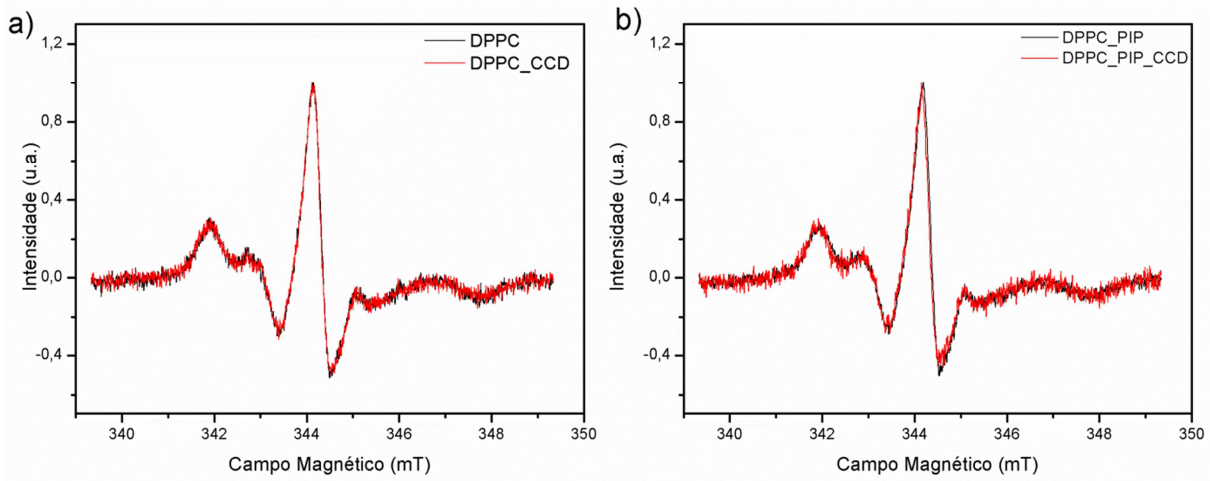

Figura 28 - Espectros de RPE do marcador 7PCSL: a) vesículas unilamelares de DPPC na ausência (preto) e presença (vermelho) da proteína Pp 1,2-CCD e b) vesículas unilamelares de DPPC-PIP2 na ausência (preto) e presença (vermelho) da proteína CCD. A razão molar lipídio/proteína foi de 100, contendo 0,5 mol% de marcador de spin.

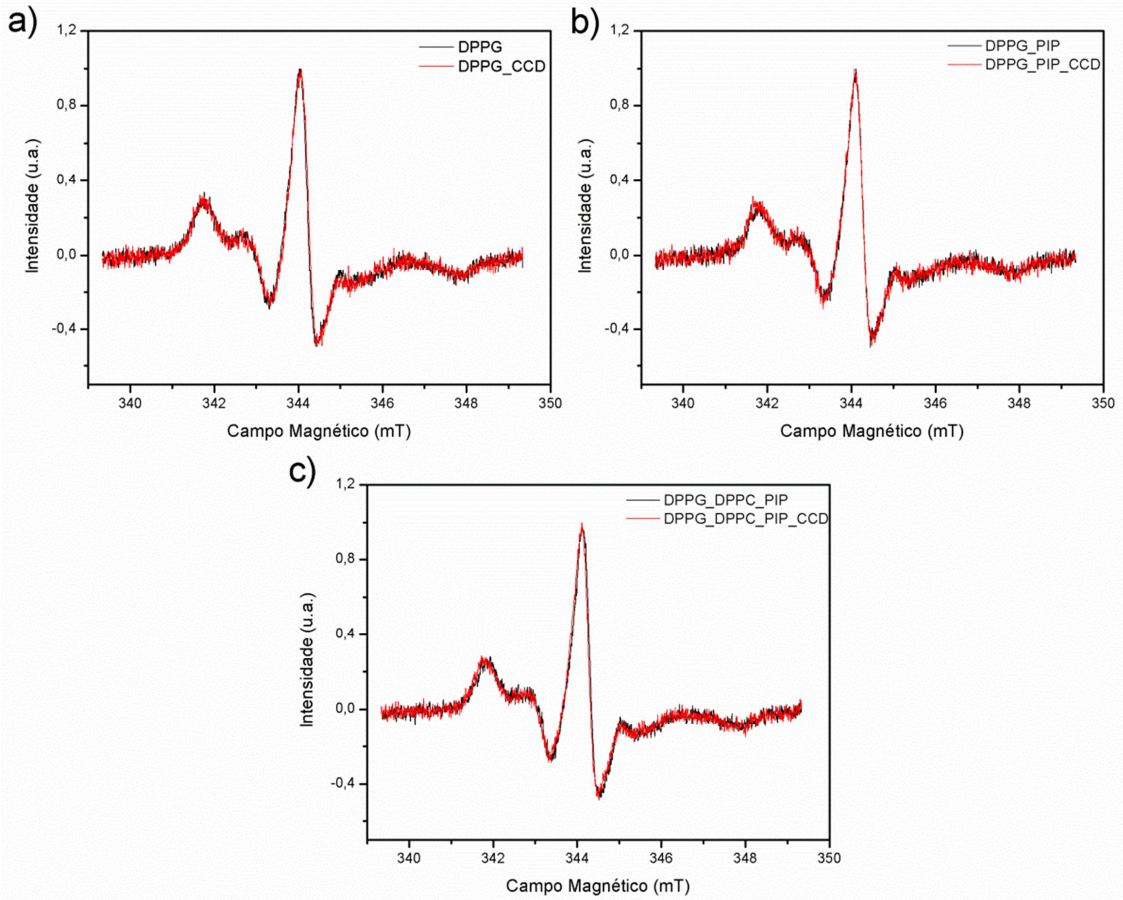

Figura 29 - Espectros de RPE do marcador 7PCSL: a) vesículas unilamelares de DPPG na ausência (preto) e presença (vermelho) da proteína Pp 1,2-CCD, b) vesículas unilamelares de DPPG-DPPC-PIP2 na ausência (preto) e presença (vermelho) da proteína Pp 1,2-CCD e c) vesículas unilamelares de DPPG-PIP2 na ausência (preto) e presença (vermelho) da proteína Pp 1,2-CCD. A razão molar lipídio/proteína foi de 100, contendo 0,5 mol% de marcador de spin.

Para tentar resolver o problema de não observação de alterações espectrais, optamos por utilizar os lipídios DPPC, DPPG e PIP2, na proporção lipídio:proteína 50:1, com o marcador DOPTC, que monitora a região da cabeça do fosfolipídio – região superficial. Na Figura 30 e Figura 31 podem ser visualizadas pequenas alterações no espectro referente ao lipídio DPPC com e sem proteína e DPPG com e sem proteína, indicando que de alguma forma esteja ocorrendo interação.

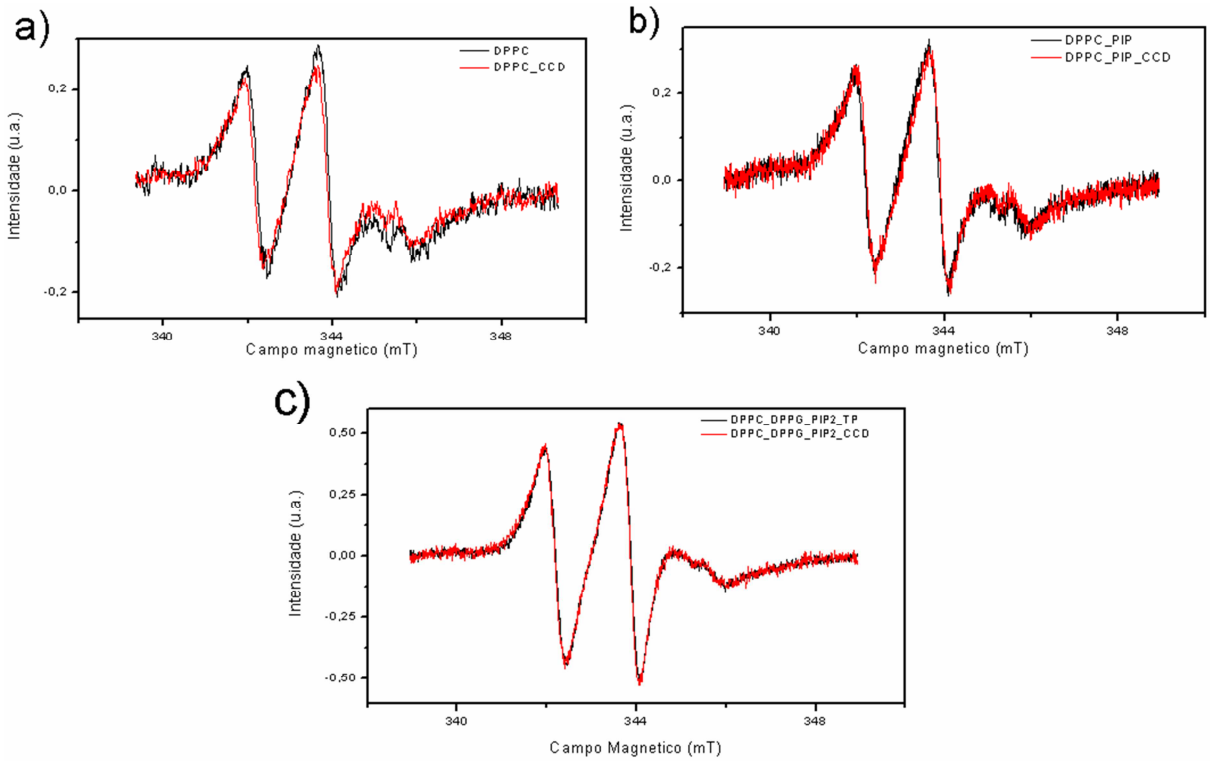

Figura 30 - Espectros de RPE do marcador DOPTC: a) vesículas unilamelares de DPPC na ausência (preto) e presença (vermelho) da proteína Pp 1,2-CCD, b) vesículas unilamelares de DPPC-PIP2 na ausência (preto) e presença (vermelho) da proteína Pp 1,2-CCD e c) vesículas unilamelares de DPPG-DPPC-PIP2 na ausência (preto) e presença (vermelho) da proteína Pp 1,2-CCD. A razão molar lipídio/proteína foi de 50, contendo 0,5 mol% de marcador de spin.

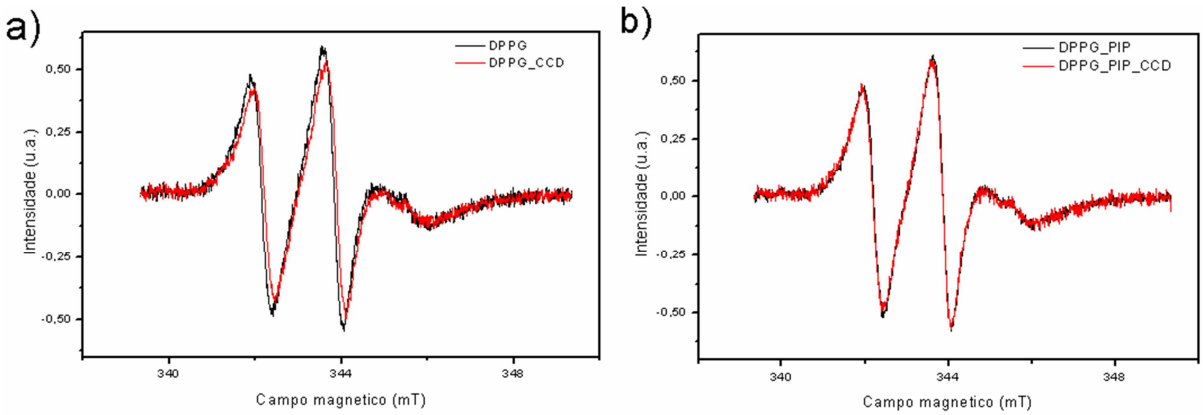

Figura 31 - Espectros de RPE do marcador DOPTC: a) vesículas unilamelares de DPPG na ausência (preto) e presença (vermelho) da proteína Pp 1,2-CCD e b) vesículas unilamelares de DPPG-PIP2 na ausência (preto) e presença (vermelho) da proteína Pp 1,2-CCD. A razão molar lipídio/proteína foi de 50, contendo 0,5 mol% de marcador de spin.

4.8.3 Ensaios de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A Calorimetria Diferencial de Varredura é uma técnica utilizada para se medir o calor absorvido ou transferido de uma amostra a pressão constante durante uma mudança física ou química. O termo diferencial refere-se à comparação entre o comportamento de uma amostra de interesse e uma referência (que durante o experimento não sofre mudanças químicas ou físicas significativas). Ambas as amostras são submetidas a uma variação sistemática de temperatura em um intervalo pré-determinado, devido a isso o termo varredura. Estruturas altamente cooperativas como as proteínas são estabilizadas pela contribuição de vários fatores como ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e efeito hidrofóbico e, assim, sofre uma transição de fase como resultado de mudanças conformacionais, de fusão, hidratação ou desidratação, agregação e desagregação, ou a combinação destes [55]. Através dessa técnica é possível se determinar grandezas termodinâmicas absolutas durante uma transição termicamente induzida, sendo frequentemente utilizada para se estudar o desenovelamento e reenovelamento de proteínas, estabilidade térmica na presença de ligantes, transições lipídicas, interações de proteínas com fosfolipídios, interação entre proteínas, detecção de domínios de membrana [55, 56].

O equipamento de DSC para o estudo de biomoléculas consiste de dois compartimentos, chamados de celas, idênticos que são aquecidos eletricamente por aquecedores em uma faixa constante. Uma das celas é preenchida com a amostra de interesse e a outra é preenchida com o tampão usado para solubilizar a amostra. As celas são mantidas sob pressão atmosférica ou pressão de gás inerte, para inibir a formação de bolhas durante o aquecimento [56, 57].

Neste trabalho, a técnica de DSC foi utilizada para monitorar outro ponto importante para a atividade catalítica da Pp 1,2-CCD, o papel da molécula de fosfolipídio encontrada ligada à estrutura proteica e uma possível interação com membranas biológicas. Como foi encontrado em um trabalho de Micalella (2011) e em nossos resultados de espectrometria de massas e de dicroísmo circular, a presença de um fosfolipídio ligado à proteína, o PIP2, parece ter papel funcional. Sendo assim tal componente foi utilizado junto aos fosfolipídios DPPG e DPPC para o estudo dessa possível interação durante o ciclo funcional da enzima.

Na Figura 32, é mostrado o termograma referente à desnaturação térmica da enzima Pp 1,2-CCD (linha azul) e vê-se o pico da transição enovelada-desonvelada associado à Pp 1,2-CCD em torno de 50^{o}C, resultado condizente com aquele obtido a partir dos experimentos de CD. Ainda na Figura 32, vê-se o comportamento termotrópico de vesículas unilamelares de DPPC (em preto) com um pico em torno de 41^{o}C atribuído à transição principal (fase gel para fase fluida) desse fosfolipídio. Com a mistura enzima mais vesículas de DPPC (linha vermelha) percebe-se alterações nos picos do termograma, o que indica que a presença conjunta das moléculas afeta o seu comportamento térmico. Mais especificamente, observa-se que o pico associado à transição térmica da Pp 1,2-CCD é deslocado para menores temperaturas quando da presença de vesículas de DPPC, o que sugere que tais vesículas levam a algum tipo de desestruturação proteica que faz com que a enzima se desenovele com menores temperaturas. A forma e a área do pico não se alteram significativamente, indicando que a cooperativade e a variação de entalpia da transição proteica não são afetados. Já a transição térmica do DPPC não tem sua temperatura muito afetada, mas sua forma e largura o são. Isto sugere que a transição se torna mais cooperativa na presença da enzima pois se observa um estreitamento do pico a ela associado. Este resultado poderia ser interpretado como um estruturação dos fosfolipídios induzidas pela presença da Pp 1,2-CCD de forma que a unidade cooperativa lipídica que sofre a transição térmica seja aumentada.

Na Figura 33 e na Figura 34, estão apresentados os resultados dos experimentos utilizando vesículas lipídicas de composições diversas, incluindo um fosfolipídio com carga líquida negativa (DPPG) e o PIP2 identificado em nossos experimentos de espectrometria de massas e também por Micalella e colaboradores (2011). A Tabela 5 mostra os parâmetros termodinâmicos extraídos dos termogramas e verificam-se alterações de tais parâmetros de Pp 1,2-CCD em todas as combinações. Na Figura 33a verifica-se uma alteração mais considerável, nela pode ser observada a presença de um ombro no pico do lipídio quando adicionada proteína à mistura. Essas alterações que ocorreram evidenciam uma possível interação lipídio-proteína, provavelmente na superfície dos lipossomos já que as características estruturais da Pp 1,2-CCD, como a ausência de extensas regiões hidrofóbicas em sua estrutura que pudessem se inserir no mimético de membrana, não favoreceriam uma penetração acentuada na vesícula lipídica.

Os termogramas de DSC analisados de forma conjunta indicam que há interações entre a Pp 1,2-CCD e todos os modelos de membrana investigados evidenciada tanto por mudanças nos picos associados aos fosfolipídios quanto no pico de desenovelamento da Pp 1,2-CCD. Entretanto, ainda não está claro o papel da combinação carga superficial e presença de PIP2. Percebe-se que a alteração mais notável ocorre na presença de DPPC-PIP2 (Figura 33a) com o aparecimento de um ombro significativo no pico da transição principal do DPPC, indicando uma nova transição provavelmente associada a grupos de fosfolipídios que reconheceram a presença da enzima. A formação/segregação de domínios lipídicos quando da adição da Pp 1,2-CCD poderia ser uma explicação plausível, mas que carece de maiores investigações para ser confirmada. Por outro lado, a presença de carga superficial (casos em que há a presença de DPPG) leva a alterações mais sutis, exceto pelo forte aparecimento de um pico que parece ser aquele associado à pré-transição do DPPG na Figura 34a. Alterações na pré-transição podem, normalmente, estar associadas com perturbação do arranjo estrutural das cadeias acila dos lipídios, o que indicaria algum grau de penetração da enzima no *core* hidrofóbico das vesículas, o que, em princípio, parecia pouco favorável. O mesmo efeito sobre a pré-transição pode ser também observado, mas em menor intensidade, para os casos que se usou lipossomos de DPPC (Figura 32) e DPPC-PIP2 (Figura 33a).

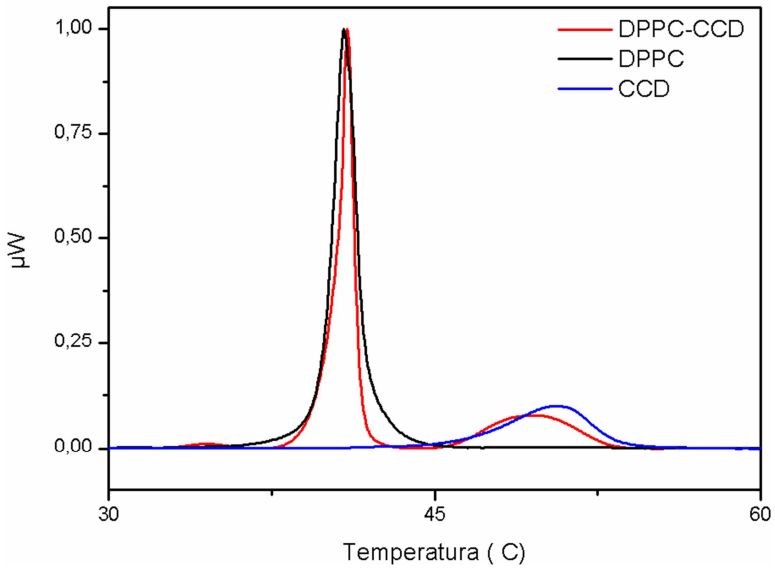

Figura 32 - Transição de fase determinada por DSC do lipídio DPPC na ausência (linha preta), na presença (linha vermelha) da proteína Pp 1,2-CCD e somente da proteína (linha azul). O intervalo de varredura foi de 15-80 ˚C, com taxa de aquecimento de 0,5 ˚C/min e pressão aplicada às celas de 3,00 ATM. A razão molar lipídio/proteína foi de 100.

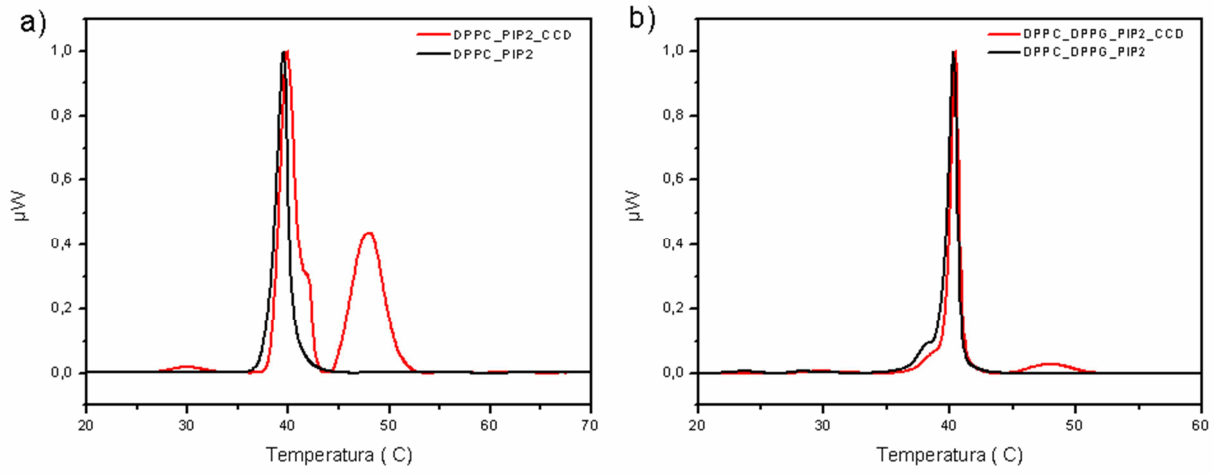

Figura 33 - Termogramas normalizados: comparações de transições de fase de lipídios e da proteína em diferentes situações a)vesículas unilamelares de DPPC - 0,1% PIP2 na ausência (preto) e na presença (vermelho) da enzima Pp 1,2-CCD; b) vesículas unilamelares de DPPC – DPPG – 0,1% PIP2 na ausência (preto) e na presença (vermelho) da enzima Pp 1,2-CCD determinada por DSC. A velocidade de aquecimento foi 0,5 ˚C/min e a razão molar lipídio/proteína foi de 100.

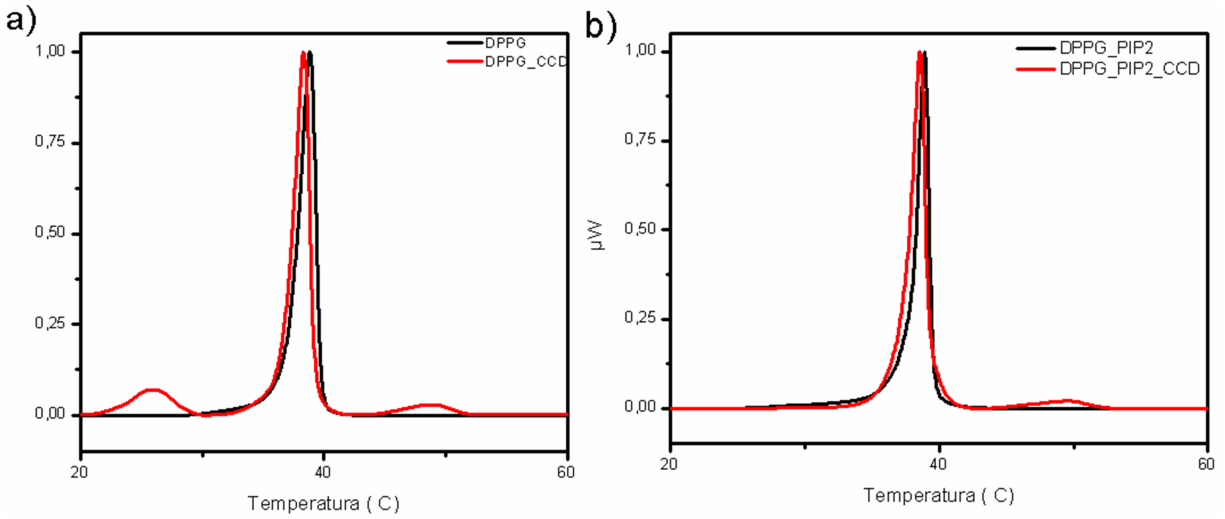

Figura 34 - Termogramas normalizados: Comparações das transições de fase de lipídios e proteína em diferentes situações: a) vesículas unilamelares de DPPG na ausência (preto) e na presença (vermelho) da enzima Pp 1,2-CCD e b) vesículas unilamelares de DPPG – 1% PIP2 na ausência (preto) e na presença (vermelho) da enzima Pp 1,2-CCD determinada por DSC. A velocidade de aquecimento foi 0,5 ˚C/min e a razão molar lipídio/proteína foi de 100.

Tabela 5 - Valores referentes às medidas de DSC da proteína na ausência e na presença de diferentes lipídios, parâmetros calculados através do programa Cpcalc:

Amostra	ΔH (kcal/mol)	ΔS (kcal/K mol)	Tt ˚C
CCD	115,58	0,36	50,6
DPPC_CCD	90,75	0,28	49,4
DPPG_CCD	43,30	0,13	49,0
DPPC_PIP_CCD	50,84	0,16	48,2
DPPG_PIP_CCD	37,51	0,12	49,6
DPPC_DPPG_PIP_CCD	47,20	0,15	48,2

Conclusões

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho, Pp 1,2-CCD, enzima que possui grande potencial para aplicação em processos de biorremediação, foi estudada com o intuito de um maior entendimento de seu mecanismo catalítico, de como promover maneiras de controlá-lo e estudar a influência de moléculas de fosfolipídio na funcionalidade da enzima, ou seja, investigar as várias facetas de sua atividade.

Com isso, a proteína foi produzida de forma recombinante em *E. coli,* foi realizada a troca do vetor de expressão de pTYB2 para pET-Sumo e foi purificada para análises biofísicas. Com a troca do vetor, foram observadas melhorias no rendimento final da enzima, maior grau de pureza, diminuição do tempo de purificação e através de experimentos de CD, a enzima mostrou ter mantido sua estrutura secundária.

Através da caracterização, pudemos observar que a enzima de estudo mostrou-se ativa. Pôde ser observado por SRCD grandes perdas de estrutura secundária com a variação da temperatura, com um valor de T_m em torno de 56 ˚C, resultado este cerca de 5% diferente dos obtidos por Mesquita (2012) [3]. Através da atividade enzimática da Pp 1,2-CCD, observa-se que apresentou com o mesmo perfil cinético visualizado por MELO [14], com uma aparente inibição. Para esses estudos a enzima se mostrou ativa frente aos diferentes substratos: catecol, 4-clorocatecol e 4-metilcatecol, possuindo uma atividade mais acelerada quando em 4-metilcatecol. A cinética enzimática mostrou não seguir as regras de Michaelis-menten e sim, seguir o modelo de inibição por substrato.

Estudos de espectrometria de massas foram realizados afim de identificar o ligante hidrofóbico encontrado entre o dímero de sua estrutura, foram identificados picos de massa equivalentes ao fosfoinositol e diacilglicerol (mensageiro secundário), compostos resultantes da hidrólise de PIP2, catalisada pela fosfolipase C. Devido a isto e a resultados obtidos anteriormente [26], foram realizados experimentos de CD, SRCD, DSC e RPE para avaliar a se há interação da enzima com modelos de membranas biológicas constituídos por combinações dos fosfolipídios DPPC, DPPG, PIP_2, POPC e POPG. A partir dos resultados obtidos, verifica-se pequenas alterações espectrais nos espectros de RPE, indicando que,

provavelmente, esteja ocorrendo uma interação superficial. Os dados de CD e SRCD sugerem mudanças conformacionais nas regiões em hélice da enzima, regiões estas que abrangem a interface entre os monômeros de Pp 1,2-CCD, exatamente onde se localizam os sítios de ligação das moléculas anfipáticas. A interação monômero-monômero deve, portanto, ter papel significativo no controle da atividade biológica. Os resultados de DSC indicam, mais uma vez, que a enzima é capaz de alterar os termogramas associado não apenas à sua própria transição térmica, mas também aquelas referentes aos fosfolipídios presentes no mimético de membrana. O papel independente da carga superficial e da presença de PIP2 ainda não está totalmente claro, mas é certo que a presença de PIP2 na vesícula leva ao aparecimento de uma nova transição térmica.

Como perspectivas futuras, os estudos com a enzima Pp 1,2-CCD para o entendimento do mecanismo funcional e de como controlá-lo terão prosseguimento em nosso grupo de pesquisa. A investigação da interação com modelos de membrana biológica com diferentes composições será realizada levando-se em conta os resultados apresentados nesta dissertação e a análise do comportamento da enzima quando inseridas em substratos nanoestruturados, fruto de uma colaboração recém-estabelecida entre nosso grupo e os grupos dos Profs. Alex Smirnov (North Carolina State Unviersity, EUA) e Alan Dalton (University of Surrey, UK), também será conduzida.

Referências

6. REFERÊNCIAS

1. Broderick, J.B.O., T. V. , *Overproduction, Purification, and Characterization of Chlorocatechol Dioxygenase, a nonheme iron dioxygenase with broad substrate tolerance.* Biochemistry, 1991. **30**(29).

2. Ferraroni, M., et al., *X-ray structures of 4-chlorocatechol 1,2-dioxygenase adducts with substituted catechols: new perspectives in the molecular basis of intradiol ring cleaving dioxygenases specificity.* J Struct Biol, 2013. **181**(3): p. 274-82.

3. Mesquita, N.C.d.M.R., *Estudos da correlação estrutura-função da enzima Clorocatecol 1,2-Dioxigenase de Pseudomonas putida.*, in *Tese (Mestrado em Ciências)*2012: Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. p. 124.

4. Jacques, R.J.S., et al., *Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.* Ciência Rural, 2007. **37**(4).

5. Lang, G.H., et al., *Two kinds of chlorocatechol 1,2-dioxygenase from 2,4-dichlorophenoxyacetate-degrading Sphingomonas sp. strain TFD44.* Biochem Biophys Res Commun, 2005. **332**(4).

6. Mesquita, N.C., et al., *Amphipatic molecules affect the kinetic profile of Pseudomonas putida chlorocatechol 1,2-dioxygenase.* Eur Biophys J, 2013. **42**(8): p. 655-60.

7. Schlomann, M., *Evolution of chlorocatechol catabolic pathways: Conclusions to be drawn from comparisons of lactone hydrolases.* Kluwer Academic Publishers, 1994. **5**(Biodegradation).

8. Broderick, J.B., *Catechol dioxygenases, Essays In Biochemistry.*, 1999. p. 189.

9. Knackmuss, H.J.H., M., *UTILIZATION AND COOXIDATION OF CHLORINATED PHENOLS BY PSEUDOMONAS-SP B-13.* Archives of Microbiology 1978.

10. Caglio, R.V., F.; Caposio, P.; Gribaudo, G.; Pessione, E.; Giunta, C., *Fine-Tuning of Catalytic Properties of Catechol 1,2-Dioxygenase by Active Site Tailoring.*, in *Chembiochem*2009. p. 1024.

11. Bonalumi, J.K.R., *Estudos cristalograficos da enzima Clorocatecol 1,2-dioxigenase de Pseudomonas putida.*, in *Dissertação de mestrado*2010: Faculdade de Ciencias Farmaceuticas de Ribeirao Preto - USP. p. 122.

12. SILVA, A.S.e.a., *Enzymatic activity of catechol 1,2-dioxygenase and catechol 2,3-dioxygenase produced by Gordonia polyisoprenivorans.* , in *Quím. Nova*2012.

13. Melo, F.A., A.P. Araujo, and A.J. Costa-Filho, *Role of cis-cis muconic acid in the catalysis of Pseudomonas putida chlorocatechol 1,2-dioxygenase.* Int J Biol Macromol, 2010. **47**(2).

14. MELO, F.A., *Interações moleculares no mecanismo de ação de clorocatecol 1,2-dioxigenase e da tirosina quinase*, 2010, Tese (Doutorado em Ciências - Física Biomolecular) p. 175.

15. Vaillacourt, F.H., Bolin, J. T., Eltis, L. D., *The ins and outs of ring-cleaving dioxygenases.*, in *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol* 2006. p. 267.

16. Bull, C.B., D. P., *Purification and properties of protocatechuate 3,4-dioxygenase from pseudomonas-putida – a new iron to subunit stoichiometry.* Journal of Biological Chemistry, 1981. **256**.

17. Lipscomb J.D., W.J.W., Arciero D.M., Orville A.M. and Wolgel S.A., *Mechanisms of catecholic dioxygenases.*, in *Harwood Academic Publishers*1988: NY. p. 282.

18. Ohlendorf DH, L.J., Weber PC., *Structure and assembly of protocatechuate 3,4-dioxygenase.* Nature, 1988. **336**.

19. Douglas H. Ohlendorf, A.M.O., John D. Lipscomb, *Structure of Protocatechuate 3,4-Dioxygenase from Pseudomonas aeruginosa at 2.15 Å Resolution.* Journal of Molecular Biology, 1994. **244**(5).

20. Vetting, M.W.D.A., D. A.; Ornston, L. N.; Ohlendorf, D. H., *Structure of Acinetobacter strain ADP1 protocatechuate 3,4-dioxygenase at 2.2 angstrom resolution: Implications for the mechanism of an intradiol dioxygenase. .* Biochemistry, 2000. **39**(27).

21. Whittaker, J.W.L., J. D.; Kent, T. A.; Munck, E., *Brevibacterium-fuscum protocatechuate 3,4-dioxygenase - purification, crystallization, and characterization.* Journal of Biological Chemistry, 1984. **259**(7).

22. True, A.E.O., A. M.; Pearce, L. L.; Lipscomb, J. D.; Que, L., *An exafs study of the interaction of substrate with the ferric active-site of protocatechuate 3,4-dioxygenase.* Biochemistry 1990. **29**(48).

23. Pau, M.Y.M.D., M. I.; Orville, A. M.; Lipscomb, J. D.; Solomon, E. I., *Spectroscopic and electronic structure study of the enzyme-substrate complex of intradiol dioxygenases: Substrate activation by a high-spin ferric non-heme iron site. .* Journal of the American Chemical Society 2007. **129**(7).

24. Rustiguel, J.K., et al., *Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of recombinant chlorocatechol 1,2-dioxygenase from Pseudomonas putida.* Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2011. **67**(Pt 4).

25. Vetting, M.W.O., D. H., *The 1.8 Å crystal structure of catechol 1,2-dioxygenase reveals a novel hydrophobic helical zipper as a subunit linker.* Elsevier Science Ltd., 2000. **8**(4): p. 12.

26. Micalella, C., et al., *X-ray crystallography, mass spectrometry and single crystal microspectrophotometry: a multidisciplinary characterization of catechol 1,2 dioxygenase.* Biochim Biophys Acta, 2011. **1814**(6).

27. Ferraroni, M., et al., *Crystal structure of 4-chlorocatechol 1,2-dioxygenase from the chlorophenol-utilizing gram-positive Rhodococcus opacus 1CP.* J Biol Chem, 2004. **279**(26): p. 27646-55.

28. Ferraroni, M., et al., *Crystal structure of 3-chlorocatechol 1,2-dioxygenase key enzyme of a new modified ortho-pathway from the Gram-positive Rhodococcus opacus 1CP grown on 2-chlorophenol.* J Mol Biol, 2006. **360**(4).

29. Citadini, A.P., et al., *EPR studies of chlorocatechol 1,2-dioxygenase: evidences of iron reduction during catalysis and of the binding of amphipatic molecules.* Biophys J, 2005. **88**(5): p. 3502-8.

30. Marsh, D., *Lipid-binding proteins: structure of the phospholipid ligands.* Protein Sci, 2003. **12**(9): p. 2109-17.

31. Berridge MJ, I.R., *Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction.* Nature, 1984. **312**: p. 321.

32. Raucher D, S.T., Chen W, Shen K, Guo S, et al., *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate functions as a second messenger that regulates cytoskeleton-plasma membrane adhesion.* Cell, 2000. **100**.

33. Anderson RA, B.I., Doughman SD, Kunz J, Loijens JC., *Phosphatidylinositol phosphate kinases, a multifaceted family of signaling enzymes.* J. Biol. Chem. , 1999. **274**.

34. Hinchliffe KA, C.A., Irvine RF. , *PIPkins1, their substrates and their products: new functions for old enzymes. .* Biochim Biophys Acta., 1998. **1436**.

35. TF., M., *PI(4,5)P2 regulation of surface membrane traffic.* Curr. Opin. Cell Biol. , 2001. **13**(4).

36. Gillooly DJ, S.H., *A lipid oils the endocytosis machine. .* Science 2001. **291**.

37. Rebecchi MJ, P.S., *Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C.* Physiol. Rev., 2000. **80**.

38. McLaughlin, S., et al., *PIP(2) and proteins: interactions, organization, and information flow.* Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2002. **31**: p. 151-75.

39. STUDIER, F.W.e.a., *Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. .* Methods in Enzymology, 1990. **185**.

40. GILL, S.C.V.H., P. H. , *Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data.* Analytical Biochemistry, 1989. **182**(2): p. 7.

41. AUSUBEL, F.M., *Short protocols in molecular biology : a compendium of methods from Current protocols in molecular biology.*, 2002: NY.

42. GASTEIGER, E.H., C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. , *Protein identification and analysis tools on the ExPASy server.* The Proteomics protocols handbook2005.

43. Lees, J.G., et al., *CDtool-an integrated software package for circular dichroism spectroscopic data processing, analysis, and archiving.* Anal Biochem, 2004. **332**(2): p. 285-9.

44. HIGGINS, S.J.H., B. D. , *Protein expression : a practical approach.*, in *Oxford: Oxford University Press*1999. p. 292.

45. Goetz, H., et al., *Comparison of selected analytical techniques for protein sizing, quantitation and molecular weight determination.* J Biochem Biophys Methods, 2004. **60**(3): p. 281-93.

46. Robert, R.W.B., N. e Nakanishi, K., *Circular Dichroism: Principles and Applications*, 1994, VCH Publishers

NY, USA.

47. Kelly, S.M.P., N. C. , *The application pf circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. .* Biophy. Acta. , 1997. **1338**: p. 24.

48. Kelly, S.M., T.J. Jess, and N.C. Price, *How to study proteins by circular dichroism.* Biochim Biophys Acta, 2005. **1751**(2): p. 119-39.

49. Sreerama, N. and R.W. Woody, *Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set.* Anal Biochem, 2000. **287**(2): p. 252-60.

50. Whitmore, L. and B.A. Wallace, *DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data.* Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Web Server issue): p. W668-73.

51. Costa Filho, A.J., *Estudos da enzima Clorocatecol 1,2-dioxigenase por EPR convencional e da estrutura dinâmica de biomembranas por EPR pulsada bidimensional.*, in *Tese (Doutorado em Ciencias - Fisica Basica)*2001: Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo.

52. Nelson, D.L.C., M. M.; , *Principios de Bioquimica de Lehningher*. Vol. Quinta edicao. 2011, Sarvier, USA.

53. Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. & Whitehouse, C. M. , *Electrospray ionization for the mass spectrometry of large biomolecules.* Science 1989. **246**: p. 7.

54. Ruedi Aebersold, R.M., M.; , *Review article Mass spectrometry-based proteomics.* Nature, 2003. **422**.

55. ATKINS, P.W.D.P., J., *Physical chemistry for the life sciences.*2006: Oxford: Oxford University Press. 699.

56. LADBURY, J.E.C., B. Z., *Biocalorimetry: applications of calorimetry in the biological sciences.*1998. 345.

57. HARDING, S.E.C., B. Z., *Protein-ligand interactions: a practical approach.*2001: Oxford: Oxford University Press.