U N I V E R S I D A D E D E S ã o P A U L O
I N S T I T U T O D E F Í S I C A D E S ã o C A R L O S

DÉBORA FERNANDA VIEIRA

Produção e caracterização de enzimas de *Streptomyces clavuligerus* relacionadas
com a síntese do ácido clavulânico

São Carlos

2012

DÉBORA FERNANDA VIEIRA

Produção e caracterização de enzimas de *Streptomyces clavuligerus* relacionadas
com a síntese do ácido clavulânico

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Física do Instituto de Física de
São Carlos da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientadora: Prof^ª.Dr^ª.Ana Paula Ulian. de
Araújo

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2012

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

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Vieira, Débora Fernanda
Produção e caracterização de enzimas de
Streptomyces clavuligerus relacionadas com a síntese
do ácido clavulânico / Débora Fernanda Vieira;
orientadora Ana Paula Ulian de Araújo - versão
corrigida -- São Carlos, 2012.
152 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física
de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2012.

1. *Streptomyces clavuligerus*. 2. ácido
clavulânico. 3. enzima. 4. estudos estruturais. 5.
atividade. I. Ulian de Araújo, Ana Paula, orient.
II. Título.

A meus pais pelo apoio e incentivo aos estudos durante toda a vida e por terem me proporcionado os devidos ensinamentos e condições de eu ser quem eu sou.

AGRADECIMENTOS

A Deus por essencialmente tudo.

A minha mãe, minha Tia Cida e meus irmãos pelo amor, pelo apoio emocional, físico, financeiro, etc e pela confiança e respeito em minhas escolhas de vida.

A Prof^a. Dr^a. Ana Paula U. Araújo pela orientação, confiança, paciência e oportunidade de desenvolver minha carreira científica em seu grupo.

Ao Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, por te me proporcionado realizar minha segunda graduação, meu mestrado e o doutorado nesta instituição.

Aos técnicos do grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas”: Bel, Andressa e Fer, pela excelente qualidade profissional e amor que tem pelo o que fazem. Em especial a Bel e a Drê pela disposição em nos ajudar, sempre nos socorrendo!

Aos técnicos do grupo de Cristalografia: Susana e Humberto, pelo auxílio prestado no desenvolvimento deste trabalho.

A Juliana Cheleski Wiggers pela colaboração nos experimentos e análises de ITC, pelas críticas construtivas na escrita da tese e principalmente por ter me incentivado tanto experimentalmente como pessoalmente no decorrer deste período de doutoramento.

Ao Helton Wiggers por estar sempre pronto a ajudar e explicar várias coisas sobre enzimas!

Ao Crusca pela colaboração nos experimentos de Espectrometria de Massas e pelas várias discussões e tentativas em resolver o problema de atividade das enzimas por massas.

Ao Prof. Dr. Gabriel Padilla pelas discussões a respeito de *S.clavuligerus* e pela disposição em nos ajudar a melhorar nossa pesquisa.

Ao Dr. Leandro S. Goto por ter iniciado o trabalho com as proteínas de *Streptomyces clavuligerus* neste grupo e pela colaboração neste trabalho.

Ao André, meu prof. de inglês, pelos ensinamentos, pelo incentivo e pela confiança que me ajudaram a seguir meu caminho.

Ao Prof. Dr. Carlos O. Hokka pela colaboração inicial no trabalho e pela ajuda no pedido de bolsa de doutorado.

A secretária do grupo, Éster, pela competência, atenção e pelo bom convívio.

A todos os Professores do grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas” e do grupo de Cristalografia pela participação em minha formação acadêmica.

Aos companheiros de grupo pela agradável convivência, em especial à “velha guarda”: meu querido Luis Argentino, Sussu, Julio, Ana Isabel, Zé Luiz, Joci, Fernando Melo, Fer Batista, Leandro, Thaty, Drê, Fábio e à molécula integrante da turma: Paty, Valerinha e Ana Eliza, pelos momentos inesquecíveis de descontração que tivemos, sejam em Brotas ou nos churrascos da biofísica. Vocês estão no meu coração!

As minha amigas de sempre, Lúcia e Drika, amo vocês!

Em especial ao meu amado Luis, pelo amor, paciência, e suporte na minha vida. De início, colega de laboratório, tornou-se hoje meu esposo!! Agradeço pelo amor e pelas felicidades que você me traz!

A FAPESP pela bolsa de doutorado e pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

VIEIRA, D. F. **Produção e caracterização de enzimas de *Streptomyces clavuligerus* relacionadas com a síntese do ácido clavulânico.** 2012. 152 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

Ácido clavulânico (AC) é um potente inibidor de β -lactamases, produzido por *Streptomyces clavuligerus*, usado clinicamente em combinação com antibióticos β -lactâmicos para tratar infecções bacterianas resistentes. Apesar da produção industrial de AC já ser bem estabelecida muitos aspectos importantes relacionados com sua biossíntese permanecem carentes de estudo. Sabe-se que a via de síntese do AC envolve no mínimo 8 passos enzimáticos sendo os primeiros passos mais abordados. Por exemplo, as enzimas N^2 -(2-carboxietil) arginina sintase (CEAS), β -lactama sintase (BLS) e proclavaminato amidino hidrolase (PAH) são as responsáveis pela primeira, segunda e quarta reações enzimáticas respectivamente. Estudos mutagênicos recentes em *S.clavuligerus* relacionaram cópias extras dos genes *ceas*, *bls* e *pah* (*ceas1*, *bls1* e *pah1*) com essa via porém nenhum ensaio enzimático foi relatado. Embora os passos finais da via ainda não estejam completamente estabelecidos, a ação de algumas enzimas putativas, como a codificada por *orf12*, mostraram ser essenciais a produção do AC. Assim, com o objetivo de aumentar a informação disponível sobre a biossíntese do AC estudamos quatro de seus membros: CEAS1, BLS1, PAH1 e a proteína putativa codificada pela *orf12*. Os genes foram isolados a partir do DNA genômico de *S. clavuligerus* por PCR e clonados em vetores para produção das proteínas recombinantes em *E.coli*. Os protocolos de expressão foram estabelecidos para CEAS1, PAH1 e ORF12 e as proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade por metal. BLS foi obtida de forma isolável. As proteínas solúveis foram caracterizadas por meio de técnicas bioquímicas e estruturais. As análises de CEAS1 e PAH1 foram comparadas com informações já obtidas para as isozimas CEAS2 e PAH2, respectivamente. Assim, as análises de oligomerização das proteínas resultaram em uma mistura de oligômeros (monômero, dímero e tetrâmero) para CEAS1, na forma hexamérica para PAH1 e na forma dimérica para ORF12, estando de acordo com as formas solúvel e cristalográfica de CEAS2 (dímero e tetrâmero) e PAH2 (hexâmero). Espectros de dicroísmo circular mostraram que CEAS1 e PAH1 possuem um enovelamento do tipo α/β sendo estáveis até 35°C e numa ampla faixa de pH. Os parâmetros termodinâmicos da interação entre CEAS1 e o cofator Mg^{+2} foram

determinados mostrando que é entropicamente dirigida, com uma estequiometria de ligação de 4 : 1, com uma constante de afinidade na ordem de micromolar ($K_D = 1,76 \pm 0.23 \mu\text{M}$). Análises realizadas com as técnicas de reação acoplada, de Cromatografia Líquida de Alta Pressão acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS) e de Calorimetria de Titulação Isotérmica mostraram que CEAS1, assim como CEAS2, apresenta atividade sob o substrato gliceraldeído-3-fosfato, porém sem a formação do produto final N^2 -(2-carboxietil)arginina. Por outro lado, a proteína recombinante PAH1 mostrou ser inativa sobre o substrato análogo, N- α -acetil-L-arginina. Assim, apesar das isozimas manterem um padrão estrutural, podem ter mecanismos de ação distintos. Em relação a ORF12 esta proteína foi classificada com uma β -lactamase com atividade esterase de acordo com nossos estudos realizados com os substratos cefalosporina C e p-nitrofenil acetato.

Palavras- chave: *Streptomyces clavuligerus*. Ácido clavulânico. Isozimas. *orf12*.

ABSTRACT

VIEIRA, D. F. **Production and characterization of *Streptomyces clavuligerus* enzymes related to the biosynthesis of clavulanic acid.** 2012. 152 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

Clavulanic acid (CA) is a potent inhibitor of β -lactamases, produced by *Streptomyces clavuligerus*, clinically used in combination with β -lactam antibiotics to treat resistant bacterial infections. Although CA industrial production is well-established, many important aspects related to its biosynthesis remains under study. It is known that CA pathway involves at least 8 enzymatic steps, being the earliest stages more addressed. For instance, *N*²-(2-carboxyethyl) arginine synthase (CEAS), β -lactam synthase (BLS) and proclavamate amidinohydrolase (PAH) are responsible for the first, second and fourth enzymatic reaction, respectively. Recent mutagenic studies in *S.clavuligerus* have related extra copies of *ceas*, *bls* and *pah* genes (*ceas1*, *bls1* and *pah1*) to this pathway but none enzymatic assay was further reported. Although later stages the pathway remain unclear, the action of some putative enzymes like the codified by *orf12* showed essential to CA production. Thus, aiming to increase the information available about CA biosynthesis we studied four of its members: CEAS1, BLS1, PAH1, and the putative protein codified by *orf12*. The genes were isolated from *S.clavuligerus* genomic DNA by PCR and further cloned into expression vectors in order to produce recombinant proteins in *E.coli*. Protocols of protein expression were established to CEAS1, PAH1 and ORF12 and recombinant proteins were purified by metal affinity chromatography. BLS was obtained as an insoluble form. Soluble proteins were characterized by means of biochemical and structural approaches. Analyses of CEAS1 and PAH1 were compared with information ever conducted to the isozymes CEAS2 and PAH2, respectively. Thus, oligomerization analysis of proteins resulted respectively in a mix of oligomers forms (monomer, dimer, tetramer) to CEAS1, hexameric form to PAH1 and dimeric form to ORF12, according to the soluble and crystallographic form of CEAS2 (dimer and tetramer) and PAH2 (hexamer). Circular Dichroism spectra showed that CEAS1 and PAH1 have an α - β conformation and were stable up to 35°C over a wide pH range. Thermodynamic parameters of CEAS1 cofactor (Mg^{+2}) binding were determined showing that is entropic driven, with a 4:1 binding stoichiometry, with a micro-molar affinity ($K_D = 1.76 \pm 0.23 \mu\text{M}$). Analyses by coupled assay, High Pressure Liquid Chromatography coupled to Mass

Spectroscopy (LC-MS) and Isothermal Titration Calorimetry showed that CEAS1, as well as the CEAS2, presents activity at the substrate glyceraldehyde-3-phosphate, however without formation of final product, N^2 -(2-carboxyethyl)arginine. Meanwhile recombinant PAH1 showed none activity at analogous substrate, N- α -acetyl-L-arginine. Thus despite isozymes maintain a structural pattern, they may have distinct action mechanism. Regards to ORF12, this protein was classified as a β -lactamase with an esterase activity according to our studies performed with the substrates cephalosporin C and p-nitrophenyl acetate.

Keywords: *Streptomyces clavuligerus*. Clavulanic acid. Isozymes. *Orf12*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA DO ANEL CLAVÂMICO.	26
FIGURA 2 - VIA DE SÍNTESE DO ÁCIDO CLAVULÂNICO E DAS CLAVAMAS 5S EM <i>S. CLAVULIGERUS</i>	29
FIGURA 3 - <i>CLUSTERS</i> GÊNICOS DE <i>S. CLAVULIGERUS</i> ENVOLVIDOS NA BIOSÍNTESE DE ÁCIDO CLAVULÂNICO E CLAVAMAS 5S.	31
FIGURA 4 - ESQUEMA DE REAÇÃO DE ENZIMA DEPENDENTE DE ThDP.	33
FIGURA 5 – DETALHES DO SÍTIO MÚLTIPLO DE CLONAGEM DOS VETORES DE EXPRESSÃO UTILIZADOS.	48
FIGURA 6 - EXEMPLO DE UM PERFIL DE ITC PARA A REAÇÃO CATALISADA PELA DIIDROOROTATO DESIDROGENASE DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	65
FIGURA 7 - ANÁLISE ELETROFORÉTICA DO DNA GENÔMICO DE <i>S. CLAVULIGERUS</i> E DOS PRODUTOS DE PCR.	72
FIGURA 8 - ANÁLISE ELETROFORÉTICA PARA CONFIRMAÇÃO DA SUBCLONAGEM POR RESTRIÇÃO DO DNA PLASMIDIAL.	72
FIGURA 9 - EXPRESSÃO DE CEAS1, PAH1 E BLS1 EM CÉLULAS <i>E. COLI</i>	74
FIGURA 10 - ANÁLISE DE SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS PAH1 E BLS1.	76
FIGURA 11 - ANÁLISE DA PURIFICAÇÃO DE PAH1-HIS EM RESINA Ni-NTA VISUALIZADA EM SDS-PAGE 15% ...	77
FIGURA 12 - PURIFICAÇÃO DE CEAS1-HIS (CONSTRUÇÕES EM PET TEV E PET SUMO) EM RESINA Ni-NTA.	77
FIGURA 13 - PURIFICAÇÃO DE ORF12-HIS (CONSTRUÇÕES EM PET TEV) EM RESINA Ni-NTA.	78
FIGURA 14 - ANÁLISE DA CLIVAGEM DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO DE PAH1-HIS-SUMO E CEAS1-HIS-SUMO EM RESINA Ni-NTA POR SDS-PAGE 15%	79
FIGURA 15 - ALINHAMENTO DAS ESTRUTURAS PRIMÁRIAS DE CEAS1 E CEAS2.	83
FIGURA 16 - ESPECTRO DE CD DE CEAS1-HIS.	85
FIGURA 17 - ESTABILIDADE TÉRMICA DE CEAS1-HIS.	86
FIGURA 18 - INFLUÊNCIA DO pH SOBRE A ESTRUTURA SECUNDÁRIA DE CEAS1-HIS.	87
FIGURA 19 - DESNATURAÇÃO QUÍMICA DE CEAS1-HIS ANALISADA POR CD.	88
FIGURA 20 - GEL NATIVO DE CEAS1-HIS E CEAS1.	89
FIGURA 21 - ANÁLISE DO GRAU DE OLIGOMERIZAÇÃO DE CEAS1-HIS.	91
FIGURA 22 - CRISTAIS DE CEAS-HIS OBSERVADOS ATRAVÉS DE LUPA.	93
FIGURA 23 - ESTRUTURA DE CEAS1 CONSTRUÍDA A PARTIR DE MODELAGEM POR HOMOLOGIA	95
FIGURA 24 - SÍTIO ATIVO EM CEAS1.	96
FIGURA 25 - ISOTERMA DE LIGAÇÃO DE Mg^{+2} A CEAS1, A 25°C	98
FIGURA 26 - REPRESENTAÇÃO DO SÍTIO DE INTERAÇÃO DE Mg^{+2} COM CEAS2 E POSIÇÕES DOS ÍONS NO TETRÂMERO, SENDO 1 POR MONÔMERO.	101
FIGURA 27 - ESQUEMA DA REAÇÃO DE CEAS2, MOSTRANDO AS ESTRUTURAS DOS SUBSTRATOS E DO PRODUTO (CEA).	102
FIGURA 28 - MECANISMO DE AÇÃO PROPOSTO PARA CEAS2.	103
FIGURA 29 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DA REAÇÃO DE CEAS1 EM COLUNA PACK DIOL-60-SEC.	105
FIGURA 30 - ESPECTROS DE MASSAS (LC-MS) DA REAÇÃO DE CEAS1.	108
FIGURA 31 - ESPECTROS DE MASSAS (LC-MS) DO CONTROLE NEGATIVO.	109

FIGURA 32 - POTÊNCIA TÉRMICA EM FUNÇÃO DO TEMPO ($\mu\text{CAL.S}^{-1}$) DA REAÇÃO DE CEAS1-HIS.	111
FIGURA 33 - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS PRIMÁRIAS DE PAH1 E PAH2 DE <i>S. CLAVULIGERUS</i> E PAH3 E PAH4 DE <i>S. ANTIBIOTICUS</i>	115
FIGURA 34 - ESPECTRO DE CD NO UV DISTANTE DE PAH1-HIS	117
FIGURA 35 - ANÁLISE POR CD-UV DISTANTE DA ESTABILIDADE TÉRMICA (A) E AO pH (B) DA PROTEÍNA PAH1- His.	118
FIGURA 36 - ANÁLISE DO GRAU DE OLIGOMERIZAÇÃO DE PAH1-HIS.	120
FIGURA 37 - ESPECTROS DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DE PAH1-HIS.	122
FIGURA 38 - ESTRUTURA QUATERNÁRIA DE PAH1 OBTIDA POR MODELAGEM MOLECULAR.	123
FIGURA 39 - SUBSTRATO DE PAH: ÁCIDO GUANIDINOPROCLAVAMÍNICO.	124
FIGURA 40 - ESQUEMA DA REAÇÃO DE PAH	125
FIGURA 41 - TERMOGRAMA DA TITULAÇÃO DE N-AA EM PAH1	127
FIGURA 42 - ESTRUTURAS DOS SUBSTRATOS DE B-LACTAMASES	129
FIGURA 43 - ANÁLISE DO GRAU DE OLIGOMERIZAÇÃO DE ORF12-HIS.	130
FIGURA 44 - ESTRUTURAS DOS SUBSTRATOS TESTADOS NA REAÇÃO COM ORF12	131
FIGURA 45 - ATIVIDADE DE ORF12-HIS SOBRE O SUBSTRATO P-NFA	132
FIGURA 46 - CURVA DA CONVERSÃO DE P-NITROFENIL ACETATO EM P-NITROFENOL POR ORF12-HIS EM DIVERSOS pHs.	133
FIGURA 47 - REAÇÃO EM VARIADAS CONCENTRAÇÕES DE ORF12-HIS.	134
FIGURA 48 - CURVA DA HIDRÓLISE DE CEFALOSPORINA C POR ORF12-HIS	136
FIGURA 49 - ESTRUTURA QUATERNÁRIA DE ORF12.	137
FIGURA 50 - REPRESENTAÇÃO DAS INTERAÇÕES DE ÁCIDO CLAVULÂNICO NA ESTRUTURA DE ORF12	137
FIGURA 51 - SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA CODIFICADA POR <i>orf12</i>	138
FIGURA 52 - ROTA DA BIOSÍNTESE DE CEFAMICINA C.	140

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - SEQUÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO.....	44
TABELA 2 - CICLOS DE AMPLIFICAÇÃO DOS GENES/ <i>ORF</i>	44
TABELA 3 - CONDIÇÕES TAMPONANTES UTILIZADAS NA ANÁLISE DE CEAS1 EM SEC.	55
TABELA 4 - PARÂMETROS TEÓRICOS DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES NAS DIFERENTES CONSTRUÇÕES..	75
TABELA 5 - RESULTADO DO <i>BLASTP</i> REALIZADO COM A SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE CEAS1.	81
TABELA 6 - CONDIÇÕES DE CRISTALIZAÇÃO DE CEAS1.	93
TABELA 7 - PARÂMETROS TERMODINÂMICOS DA LIGAÇÃO DE MAGNÉSIO EM CEAS1, A 25°C.	98
TABELA 8 - ESTRUTURAS E CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DOS INTERMEDIÁRIOS DA REAÇÃO DE CEAS E DO PRODUTO.	106
TABELA 9 - RESULTADO DO <i>BLASTP</i> REALIZADO COM A SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE PAH1.....	114

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BTB	azul de bromotimol
CAS	clavaminato sintetase
CD	dicroísmo circular
CEAS	carboxietil-arginina sintetase
CefC	cefamicina C
CPC	cefalosporina C
DMSO	dimetil sulfóxido
dNTP	desoxinucleotídeo trifosfato
DO	densidade óptica
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
G3P	gliceraldeído-3-fosfato
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazine etano sulfônico
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
IPTG	isopropil- β -tio-galactopiranosídeo
ISP2	meio de cultivo <i>International Streptomyces Project 2</i>
ITC	calorimetria de titulação isotérmica
Meio LB	meio de cultura Luria-Bertani
Meio TB	meio de cultura <i>Terrific Broth</i>
N-AA	N _{α} -acetil-L-arginina
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Ni-NTA	<i>Nickel-Nitrilotriacetic Acid</i>
<i>Orf</i>	<i>open reading frame</i> , fase aberta de leitura
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
PAH	proclavaminato amidino hidrolase
PBS	tampão fosfato-salino
PCR	reação em cadeia da polimerase
PEG	polietileno glicol
p-NPA	p-nitrofenil acetato
RMSD	desvio da raiz quadrada média

SDS	dodecil sulfato de sódio	
TAE	tampão tris, ácido acético, EDTA	
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetrametil-etano-1,2-diamine	
TEV protease	domínio catalítico da proteína NIa (<i>Nuclear Inclusion a</i>) pelo vírus do tabaco (<i>tobacco etch virus</i> -TEV).	codificada
TFA	ácido trifluoracético	
TPP ou ThDP	tiamina pirofosfato	
Tris-HCl	tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto	
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galctopiranosideo	

LISTA DE AMINOÁCIDOS

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

LISTA DE SÍMBOLOS

λ	comprimento de onda
M	molar
kDa	kilodaltons
$[\theta]$	elipticidade molar
dQ	variação de calor
dH	variação da entalpia
ΔH	entalpia
ΔH_{app}	entalpia molar aparente
K_m	constante de Michaelis-Menten
k_{cat}	constante catalítica
rpm	rotações por minuto
ΔG	energia livre de Gibbs
ΔS	entropia
K_a	constante de associação
K_d	constante de dissociação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 <i>CLUSTERS</i> GÊNICOS EM <i>S. CLAVULIGERUS</i>	29
1.2 <i>N</i> ² -(2-CARBOXIETIL) ARGININA SINTASE (CEAS)	31
1.2.1 ISOFORMA DE CEAS	34
1.3 B-LACTAMA SINTASE (BLS)	35
1.3.1 ISOFORMA DE BLS	35
1.4 PROCLAVAMINATO AMIDINO HIDROLASE (PAH)	36
1.4.1 ISOFORMA DE PAH	37
1.5 <i>ORF12</i>	38
2 OBJETIVOS	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 MATERIAIS	41
3.2 MÉTODOS	42
3.2.1 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	42
3.2.2 OBTENÇÃO DOS GENES	43
3.2.3 CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DO DNA	45
3.2.4 SUBCLONAGEM EM VETORES DE EXPRESSÃO	46
3.2.5 EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM CÉLULAS <i>E. COLI</i>	49
3.2.6 ANÁLISE DA SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	50
3.2.7 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	50
3.2.8 QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS PROTÉICAS	53
3.2.9 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR E GEL NATIVO	54
3.2.10 TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS	55
3.2.11 FERRAMENTAS PARA ALINHAMENTO E ANÁLISE DAS ESTRUTURAS	58
3.2.12 MODELAGEM DAS ESTRUTURAS	59
3.2.13 TESTES DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA	59
3.2.14 CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA NO ESTUDO DE INTERAÇÃO LIGANTE - PROTEÍNA	67

3.2.15 CRISTALIZAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	68
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
4.1 CLONAGEM DOS GENES DE INTERESSE.....	71
4.2 EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM CÉLULAS <i>E. COLI</i> E TESTE DE SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS	73
4.3 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	76
4.3.1 SISTEMAS DE EXPRESSÃO PET TEV E PET SUMO	77
4.3.2 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS SEM TAG (CONSTRUÇÕES NO PET29B)	79
4.4 ESTUDOS BIOQUÍMICOS E BIOFÍSICOS DA N²-(2-CARBOXIETIL) ARGININA SINTASE 1 (CEAS1).....	80
4.4.1 ESTRUTURA PRIMÁRIA	80
4.4.2 ESTRUTURA SECUNDÁRIA	84
4.4.2.1 ANÁLISES DE DICROÍSMO CIRCULAR DE CEAS1	84
4.4.3- ESTRUTURAS TERCIÁRIA E QUATERNÁRIA	88
4.4.3.1 Análises da oligomerização de CEAS1	88
4.4.3.2 Testes de Cristalização de CEAS1	92
4.4.3.3 Modelagem da estrutura de CEAS1	93
4.4.3.4 Interação enzima-cofator.....	97
4.4.4 TESTES DE ATIVIDADE	101
4.5 ESTUDOS BIOQUÍMICOS E BIOFÍSICOS DA PROCLAVAMINATO AMIDINO HIDROLASE 1 (PAH1).....	113
4.5.1 ESTRUTURA PRIMÁRIA	113
4.5.2 ESTRUTURA SECUNDÁRIA	116
4.5.3 ESTRUTURAS TERCIÁRIA E QUATERNÁRIA	119
4.5.3.1 Oligomerização de PAH1.....	119
4.5.3.2 Espectroscopia de Emissão de Fluorescência.....	121
4.5.3.3 Modelagem da estrutura de PAH1 por homologia	122
4.5.4 TESTES DE ATIVIDADE DE PAH1	125
4.6 ESTUDOS COM A PROTEÍNA CODIFICADA PELA ORF12.....	128
4.6.1 ATIVIDADE ENZIMÁTICA	131
4.6.2 ANÁLISE DA ESTRUTURA.....	136
5 CONCLUSÕES.....	141
REFERÊNCIAS.....	143

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Streptomyces* inclui bactérias gram-positivas filamentosas, encontradas em diversos ambientes, tais como solo, água doce e salgada, pertencentes à ordem dos Actinomicetos (Filo Actinobacteria, Classe Actinobacteria, Ordem Actinomycetales). Estes organismos tem recebido atenção especial por sua aplicação industrial e por sua capacidade de causar doenças em humanos.¹ Além disso, são produtores de diversos metabólitos perfazendo dois terços dos antibióticos mais utilizados clinicamente e muitos outros antitumorais, antifúngicos e imunossupressores.²

Acredita-se que a produção de metabólitos secundários esteja relacionada com respostas químicas manifestadas durante as interações entre esses microorganismos e seu ambiente³, principalmente no processo de competição por nutrientes com outros organismos.^{1, 4} Por outro lado, sugere-se que também esteja associada com mudanças morfológicas das células durante o processo de esporulação.⁵ A diferenciação morfológica em *Streptomyces* envolve a formação de uma hifa aérea na superfície da colônia que se diferencia para formar esporos, processo único entre as bactérias gram-positivas, coordenado por um metabolismo especializado e complexo.⁶ Assim, *Streptomyces* é uma fonte rica de metabólitos secundários onde intermediários comuns dentro da célula (aminoácidos, açúcares, ácidos graxos, terpenos, etc) são condensados em estruturas mais complexas por vias bioquímicas definidas.

O gênero *Streptomyces* conta com mais de 500 espécies, sendo o *S. clavuligerus*⁷ produtor de uma variedade de compostos β -lactâmicos como os antibióticos envolvidos na rota biossintética da cefalosporina C (penicilina N, desacetocefalosporina C e cefamicina C) e várias clavamas, entre as quais se destaca o ácido clavulânico.

Os antibióticos β -lactâmicos, particularmente penicilinas e cefalosporinas, representam os produtos biotecnológicos mais vendidos no mundo, correspondendo a 65% dos antibióticos mais vendidos mundialmente.⁸ Dentre as penicilinas temos como exemplos de antibióticos comerciais a amoxicilina, a ampicilina, a penicilina G, entre outros. Dentre as clavamas inibidoras de β -lactamases estão o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam.

O mecanismo predominante de resistência bacteriana a antibióticos β -lactâmicos envolve enzimas β -lactamases, produzidas pelas bactérias gram-positivas e gram-negativas, que catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico para gerar irreversivelmente produtos estáveis e

biologicamente inativos.⁹ Assim, o inibidor de β -lactamases mais amplamente usado em escala industrial é o ácido clavulânico,¹⁰ primeiro exemplo natural (não-sintético) de um sistema de anel β -lactâmico bicíclico não tradicional (fig. 1).¹¹ Ele age como um inibidor suicida ligando-se diretamente ao sítio ativo e inativando um amplo espectro de β -lactamases do tipo 2, tais como penicilases e cefalosporinases.¹²

S. clavuligerus também produz outros componentes com estrutura de clavamas (Figura 1) que diferem do ácido clavulânico pela perda de um grupo carboxil no C-3 e pela estereoquímica 5*S*, sendo assim conhecidas como clavamas 5*S* do *S. clavuligerus*.¹³ O ácido clavulânico, por sua vez, possuindo a estereoquímica 3*R*5*R*, é o único capaz de inibir as β -lactamases. Visando a ação do ácido clavulânico em combater a resistência das bactérias aos antibióticos, este tem sido utilizado em aplicações clínicas junto com a amoxicilina, sendo denominado Augmentin™, um dos antibióticos mais vendidos no mundo.¹⁴

Figura 1 - Estrutura do anel clavâmico. Acima, sistema de anel das clavamas. Abaixo à esquerda, exemplo de clavama produzida pelo *S. clavuligerus* mostrando a estereoquímica 5*S*, e à direita está representado o ácido clavulânico, com estereoquímica 5*R*. A numeração é baseada no sistema do anel clavâmico.^{11,13}

As vias biossintéticas de penicilinas, cefalosporinas e cefamicinas já estão bem caracterizadas genética e bioquimicamente, sendo inclusive utilizada a engenharia genética para aumentar a produção de certas moléculas de interesse ao mercado.

Já as vias de biossíntese de ácido clavulânico e de clavamas 5*S* são parcialmente compartilhadas em *S. clavuligerus* e somente os passos iniciais já foram bem caracterizados. A maior parte dos estudos a respeito dessa via é relacionada aos genes envolvidos tanto na regulação quanto na produção de enzimas essenciais neste processo metabólico. Alguns dos genes já foram descritos, mas os detalhes das reações permanecem obscuros. Além disso,

nenhuma das reações envolvidas nos passos finais da biossíntese de clavamas 5S foi ainda elucidada.¹⁵

A biotecnologia tem auxiliado o desenvolvimento desses e de novos medicamentos trazendo um melhor entendimento da biossíntese de β -lactâmicos, a fim de aumentar a produção de antibióticos através de melhoramento genético de *S. clavuligerus* ATCC 27064. Porém, tais moléculas têm um alto custo de produção, uma vez que o processo se dá por cultivo da bactéria em biorreator. O aumento do conhecimento dos *clusters* gênicos envolvidos na biossíntese e possível transferência de genes entre eficientes organismos produtores de β -lactâmicos podem levar a técnicas mais racionais para produção de novos e melhores produtos β -lactâmicos.⁸ Por outro lado, sendo a síntese química do ácido clavulânico e de seus análogos para o uso na medicina impraticável, torna-se de considerável interesse melhorar o processo de biossíntese de clavamas isoladas diretamente do caldo de cultivo de *S. clavuligerus*, uma vez que a produção apresenta alguns problemas. Dentre eles estão: a instabilidade do produto final, pois o ácido clavulânico é degradado rapidamente em temperaturas acima de 30°C e em pH maiores que 7,5 ou menores que 4,5, e também o seu baixo rendimento (de mg/mL) comparado a outros compostos β -lactâmicos, como penicilinas e cefalosporinas, de 20 a 50 g/L.^{8,16}

Os genes conhecidos podem oferecer novas possibilidades para modificação da via tanto para aumentar a quantidade de produtos desejados quanto para obter novas moléculas com estrutura de clavama. Alguns genes de outras vias já vêm sendo modificados para produzir enzimas híbridas capazes de sintetizar uma série de novas moléculas análogas (por exemplo, derivados de eritromicina).³ A clonagem de genes das vias de biossíntese de *Streptomyces*, por exemplo, pode ser transferida para outros produtores para ajudar a descobrir novas séries de compostos. Essa técnica de biossíntese combinatória vem sendo utilizada para produzir epirrubicina, uma antraciclina com atividade antitumoral e usada em quimioterapia.³

A sugestão da rota metabólica responsável pela produção de ácido clavulânico e parcialmente compartilhada pela via de síntese das clavamas 5S é um resultado da combinação de estudos bioquímicos e estudos dos genes que codificam estas enzimas. O passo inicial desta via (fig. 2) se dá pela reação de condensação de L-arginina e D-gliceraldeído-3-fosfato (DG3P) catalisada pela carboxietil-arginina sintetase (CEAS) com a formação de *N*²-(2-carboxietil) arginina (CEA).¹⁷ CEA sofre o fechamento intramolecular do anel β -lactâmico para formar o intermediário deoxiguanidinoproclavaminato (DGPC), reação mediada pela ação da β -lactama sintetase (BLS).¹⁸ Logo após, o DGPC é hidroxilado na

primeira das três reações catalisadas pela clavaminato sintetase (CAS) para formar guanidinoproclavaminato (GPC).¹⁹ Este então é convertido em ácido proclavamínico pela remoção do grupo guanidino em uma reação catalisada pela proclavaminato amidino hidrolase (PAH).²⁰ No próximo passo, CAS age na formação do núcleo bicíclico do ácido clavulânico e das clavamas 5S em uma reação de dois passos envolvendo ciclização oxidativa, seguida por dessaturação para formar ácido clavamínico.²¹ O ácido clavamínico parece ser o ponto de ramificação da via biossintética que leva ao ácido clavulânico ou a clavamas 5S. A conversão do ácido clavamínico em ácido clavulânico implica várias reações enzimáticas incluindo desde modificações na cadeia lateral (posição 2 do anel clavâmico) assim como a inversão da estereoquímica do anel, sendo que estas modificações estereoquímicas são as responsáveis pela aquisição da atividade anti- β -lactamásica a qual atribui ao ácido clavulânico sua grande importância terapêutica e comercial.¹³ Porém as enzimas responsáveis pela conversão de ácido clavamínico a clavaldeído²² ainda não são conhecidas. O clavaldeído tem a mesma estereoquímica que o ácido clavulânico (3*R*, 5*R*) e também mostra atividade inibitória de β -lactamases. Posteriormente na via, o clavaldeído é reduzido a ácido clavulânico pela ação da ácido clavulânico desidrogenase (CAD).²² Além disso, ainda não está completamente estabelecido os passos para formar as clavamas 5S a partir de ácido clavamínico.¹¹

Figura 2 - Via de síntese do ácido clavulânico e das clavamas 5S em *S. clavuligerus*. Sobre cada seta está indicada a enzima e sua *orf* correspondente e, abaixo da seta, seus cofatores envolvidos em cada passo enzimático (adaptada da ref.²³).

1.1 Clusters gênicos em *S. clavuligerus*

Streptomyces possui um cromossomo grande e linear (8,5 -9 Mb), com um alto conteúdo de G+C (mais de 70%), sendo 5% do genoma destinado a produção de metabólitos secundários. Frequentemente, além do cromossomo principal, também apresentam plasmídeos lineares.²⁴

No caso de *S. clavuligerus*, esta espécie possui um megaplasmídeo linear de 1,8Mb, que é densamente empacotado com 25 *clusters* gênicos de metabólitos secundários putativos, em adição ao cromossomo de 6,8 Mb que também contém 23 desses *clusters*, constituindo um total de 8,6 Mb com 72% de conteúdo G+C, com 48 *clusters* de metabólitos secundários.²⁴

Mais precisamente, os genes envolvidos na síntese de ácido clavulânico e clavamas 5S residem em três localizações no cromossomo (fig. 3): o *cluster* gênico das clavamas, o *cluster*

gênico do ácido clavulânico e o *cluster* dos genes parálogos.¹⁵ Os dois primeiros *clusters* estão localizados no cromossomo principal e o *cluster* dos parálogos, localizado no megaplasmídeo, tendo este surgido por duplicação gênica.²⁴

No primeiro *cluster* estão localizados os genes responsáveis exclusivamente pela produção de clavamas 5S. O segundo *cluster* compreende os genes diretamente relacionados com a síntese de ácido clavulânico, como *ceaS2*, *bls2*, *pah2*, *cas2* e *oat2*, contribuindo também na produção de clavamas 5S (uma vez que esta via é compartilhada). Este *cluster* se encontra imediatamente adjacente ao *cluster* do gene da cefamicina C (CefC).²⁵ Apesar das rotas biosintéticas de ácido clavulânico e CefC serem independentes, a produção destes compostos é regulada pelo gene regulador *ccaR* (*cephamycin and clavulanic acid Regulator*), localizado no *cluster* do gene da CefC.²⁶⁻²⁷

Alguns genes parecem estar presentes em duas cópias²⁸⁻³¹, como é o caso do gene *cas2* que possui um parálogo (o gene *cas1*) presente no *cluster* das clavamas. Já os genes parálogos de *ceaS2*, *bls2*, *pah2*, e *oat2* (chamados de *ceaS1*, *bls1*, *pah1* e *oat1*), estão localizados no *cluster* de genes parálogos, mapeados em uma região gênica fisicamente distinta do *cluster* do ácido clavulânico em um plasmídeo linear gigante.^{15,24} Isso sugere que as clavamas e o ácido clavulânico tenham diferentes mecanismos regulatórios.

Ainda não estão claras as razões de *S.clavuligerus* possuir dois sítios de genes, um do ácido clavulânico e outro dos parálogos, envolvidos na síntese de ácido clavulânico e de clavamas 5S. Uma explicação seria para aumentar a quantidade de precursores (como por exemplo, o clavaminato) e o fluxo de metabólitos das vias compartilhadas pelo aumento da dosagem gênica. Uma segunda possibilidade seria que dois grupos de parálogos tivessem surgido em separado (vias biossintéticas paralelas), uma levando a produção de ácido clavulânico e a outra, a produção de clavamas 5S. Como as duas vias possuem passos iniciais em comum há um compartilhamento de intermediários biossintéticos, sendo as duas vias possivelmente reguladas distintamente.³⁰

Figura 3 - *Clusters* gênicos de *S.clavuligerus* envolvidos na biossíntese de ácido clavulânico e clavamas 5S. (adaptado).¹⁵

Este trabalho teve foco no estudo de quatro enzimas provavelmente envolvidas nesta via de síntese. Uma delas é o produto gênico de uma *orf* (portanto uma proteína putativa) e as outras três são preditas como isoformas das enzimas CEAS, BLS e PAH e serão descritas a seguir com mais detalhes.

1.2 N^2 -(2-Carboxietil) arginina sintase (CEAS)

CEAS é a enzima codificada pelo primeiro gene do *cluster* do ácido clavulânico (Figura 3), *orf2*, inicialmente denominado *pyc* (conversor de piruvato) por possuir um domínio reconhecedor de piruvato. Ela tem 29,9% de similaridade com as acetohidroxiácido sintases (AHAs) e apresenta um motivo conservado de ligação a tiamina difosfato (ThDP), mostrando-se assim tratar-se de uma enzima dependente de ThDP, como as AHAs.³² CEAS catalisa o primeiro passo da via de síntese do ácido clavulânico e de clavamas 5S (Figura 2). Na presença de seu cofator, Mg^{+2} , ocorre a condensação de L-arginina com um precursor de três carbonos para gerar N^2 -(2-carboxietil)arginina (CEA). Esse precursor foi identificado como D-gliceraldeído-trifosfato (DG3P)¹⁷ e não o piruvato como se havia previsto. Sendo assim o gene *pyc* foi renomeado *ceaS*.

Adicionalmente ao seu papel na biossíntese das clavamas, CEAS é uma enzima de interesse, pois, diferentemente das usuais enzimas dependentes de ThDP que catalisam a

formação de uma ligação C-C, ela age na formação de uma ligação N-C. Nas reações típicas de enzimas dependentes de ThDP, o cofator é ativado no C-2 do anel tiazol (fig. 4A) sendo capaz de agir sobre um grupo carbonil, através de um ataque nucleofílico, e assim gerar um carbânion. Isso acontece, por exemplo, na descarboxilação catalisada pela piruvato descarboxilase ou pela acetohidroxiácido sintase, enzimas dependentes de ThDP bem estudadas.³³ Similarmente para CEAS (fig. 4B), o ThDP ativado (agora um dipolo neutro) reage com o grupo aldeído do DG3P, porém segue um mecanismo difere daqueles já caracterizados para outras enzimas ThDP dependentes. O mecanismo proposto para CEAS envolve a geração de um α -carbânion, seguida da eliminação de grupos β -hidroxil e γ -fosfatos levando a formação do intermediário acrilóil-ThDP α - β -insaturado.³⁴ A reação de Michael de L-arginina seguida por hidrólise gera o N^2 -(2-carboxietil) arginina (CEA). Estudos cristalográficos sugerem um papel central para o grupo 4'-amino de ThDP como um ácido/base geral em vários estágios da reação, incluindo a formação de α -carbânion.²³

Figura 4 - Esquema de reação de enzima dependente de ThDP. **(A) Ativação de ThDP.** O anel tiazol do ThDP é o centro da catálise, sendo o aceptor de elétrons, enquanto que seu anel 4'-aminopirimidina age como um ácido/base geral. Quem doa elétrons ao anel tiazol é o aminoácido Glu 57³⁴. **(B) Mecanismo de reação proposto para CEAS.** Acontece o ataque nucleofílico do anel tiazol ativado sobre o substrato carbonil do DG3P, gerando um carbânion (carga negativa recai sobre o átomo de carbono C α), estabilizado pelo anel tiazol do ThDP. Segue-se com a eliminação dos grupos β -hidroxil e γ -fosfatos levando a ligação de ThDP com o grupo acrilóil, resultando na formação de acrilóil-ThDP. A L-arginina então reage com o grupo acrilóil através da reação de Michael, seguida por hidrólise, para enfim gerar N^2 -(2-carboxietil)arginina (CEA) (figura adaptada).³⁵

Pela análise das estruturas cristalográficas já descritas de enzimas dependentes de ThDP, reporta-se a presença de uma região conservada responsável pela ligação ao íon Mg^{+2} o que possibilita a ligação da cadeia lateral do difosfato antecedendo a ligação ao ThDP.³³

Caines e Elkins²³ obtiveram a estrutura cristalográfica de CEAS2 complexada com ThDP e Mg^{+2} , mostrando que a enzima se apresenta como um tetrâmero (dímero de dímeros). Além disso, os cofatores ThDP e Mg^{+2} estão no sítio ativo numa conformação em “V”, como encontrado em outras enzimas dependentes de ThDP. Um ânion sulfato também foi observado no sítio ativo, numa localização proposta como sendo um sítio ligante do grupo fosfato do DG3P.

O mecanismo de reação de CEAS proposto pelos estudos atuais ^{23,34,36} demonstraram que os substratos da reação, DG3P e L-arginina, não se ligam simultaneamente ao sítio ativo de CEAS. Propõe-se que o DG3P se ligue primeiro, gerando um intermediário acrilil-ThDP, que ocorra a liberação do fosfato e, então, que a L-arginina se ligue no sítio ativo, na mesma posição do DG3P, para reagir com o intermediário acrilil-ThDP e finalmente forme o produto CEA.

1.2.1 Isoforma de CEAS

Estudos sobre a relação de *ceaS* na produção de ácido clavulânico mostraram que a inativação desse gene leva a incapacidade de produção de ácido clavulânico em meio complexo, mas em meio GSPG (glicerol, sacarose, ácido glutâmico e prolina), a produção é restabelecida em função do glicerol como fonte de carbono.³² Foi proposto que esse mecanismo alternativo de produção de ácido clavulânico envolveria a presença de uma enzima alternativa codificada por um gene parálogo, então denominado de *ceaS1*.³⁰⁻³¹ Este gene se localiza no *cluster* gênico dos parálogos (fig. 3) e demonstra 73% de identidade com *ceaS2* (denominação dada ao gene originalmente descrito localizado no *cluster* do ácido clavulânico). Quando *ceaS1* foi inativado houve diminuição na produção de ácido clavulânico. No entanto o duplo mutante *ceaS1/ceaS2* não foi capaz de produzir nem ácido clavulânico nem clavamas 5S.³⁰⁻³¹

A massa molecular da proteína esperada (CEAS1) é de 59078 Da, apresentando 66% de identidade e 77% de similaridade em estrutura primária de CEAS2.³¹ Isso sugere que as duas enzimas atuem da mesma forma, na mesma reação, mas ainda não há dados experimentais que confirmem isso.

Apesar da estrutura cristalográfica de CEAS2 já estar resolvida ^{23,34} não há dados bioquímicos a respeito da isozima CEAS1. Sabe-se que há homologia entre os aminoácidos que formam o sítio ativo de CEAS2 e de AHAs ³² e que também são conservados em CEAS1. O motivo de ligação aos cofatores também se conservam nas duas isozimas.³¹

1.3 β -lactama sintase (BLS)

BLS é a segunda enzima da via de síntese (Figura 2), responsável pela formação do anel β -lactâmico das clavamas, quando presentes os cofatores ATP e Mg^{+2} . Ela catalisa a condensação intramolecular do β -aminoácido (CEA) para um β -lactâmico monocíclico (DGPC), acoplando esse processo à hidrólise de ATP.

Codificada pela *orf3*, localizada no *cluster* gênico do ácido clavulânico, a proteína apresenta uma massa molecular de 54,5 kDa. A análise da sequência de aminoácidos mostra 33% de identidade e 49% de similaridade com uma classe de amido transferases conhecidas como asparagina sintetases de classe B, que convertem ácido aspártico em asparagina na presença de Mg^{+2} e ATP.¹⁸

Baseado em dados cinéticos, sugeriu-se que BLS esteja envolvida na adenilação de CEA seguida por β -lactamização intramolecular.³⁷ Isso foi comprovado pela análise das estruturas cristalográficas de BLS nas formas complexada com ATP- Mg^{+2} , complexada com ATP- Mg^{+2} e com o inibidor *N*²-(carboximetil)-L-arginina (CMA), e complexada com os produtos DGPC, AMP e PPi- Mg^{+2} . Em resumo, a reação catalisada por BLS ocorre inicialmente com a ligação de ATP e 2 íons magnésio à sua forma livre. Em seguida, o substrato CEA se liga, sendo o passo de adenilação facilitado pelo Mg^{+2} . O próximo passo é a formação do anel β -lactâmico, sendo os íons magnésio cruciais neste processo por neutralizar a carga negativa de PPi e de AMP nascente. Por fim são liberados DGPC, AMP e PPi.³⁷⁻³⁸

1.3.1 Isoforma de BLS

Em 2004, Tahlan *et al.*³¹ isolaram uma segunda cópia do gene codificador de β -lactama sintetase. Este gene, localizado no *cluster* dos parálogos, foi denominado *bls1* e exibe 60% de identidade com o gene *bls2* (gene *bls* originalmente descrito, localizado no *cluster* do ácido clavulânico). A proteína codificada por *bls1*, a BLS1, apresenta massa molecular de 55042 Da, mostrando 49% de identidade e 59% de similaridade com os aminoácidos da proteína BLS2.

Foram construídos mutantes deficientes em *bls* e analisados quanto à capacidade de produzir ácido clavulânico e clavamas 5S. O mutante *bls1* bloqueado produziu mais que a linhagem selvagem em meio amido asparagina (AS) e em meio soja, enquanto que o duplo mutante (bloqueados *bls1* e *bls2*) não produziu em nenhum dos meios.³⁰ Isso mostra que o gene *bls2* pode ser substituído por seu parálogo, *bls1*, possibilitando ainda assim a produção de ácido clavulânico.

Estudos cristalográficos de BLS2 identificaram os resíduos de aminoácidos que estão envolvidos na ligação com o substrato e na catálise³⁸⁻³⁹ e estes resíduos também estão conservados na isoforma BLS1.³¹ BLS1 também mostra similaridade com as asparagina sintetases de diferentes organismos, porém tanto BLS1 quanto BLS2 não possuem um resíduo de Cys que é conservado na extremidade N-terminal das AS-B sendo essencial a sua atividade.^{31, 37} No caso de BLS2 essa ausência é consistente com sua função tanto na biossíntese do ácido clavulânico quanto das clavamas.^{18, 40}

1.4 Proclavaminato amidino hidrolase (PAH)

PAH atua na via convertendo o ácido guanidinoproclavamínico em ácido proclavamínico (fig. 2) na presença de íons Mn^{2+} .¹³ A posição de PAH na via de biossíntese do ácido clavulânico foi estabelecida inicialmente por Elson *et al.*²⁰, que purificaram essa enzima diretamente de *S. clavuligerus* e também foi isolada por Aidoo *et al.*⁴¹, mas como um contaminante protéico durante a purificação de uma enzima envolvida na biossíntese da penicilina. Experimentos envolvendo a interrupção do gene *pah* mostraram completa perda da produção de ácido clavulânico, refletindo sua necessidade absoluta na biossíntese deste composto.

O gene *pah* mostra similaridade sequencial com as agmatinases que hidrolisam uréia e outras arginases,⁴² então a proteína PAH foi classificada como um membro da família arginase que divergiu evolucionariamente, e que tenha mais envolvimento em aceitar os β -lactâmicos como substratos do que a arginina que é o típico substrato de arginases.⁴³

PAH recombinante já vem sendo estudada^{42, 44} apresentando um peso molecular de 34 kDa e atividade de arginase. Ela não apresentou atividade sobre arginina, por outro lado foi

registrada uma atividade ótima em pH 9,0, a 37°C, sob o substrato N-acetil-L-arginina (N-AA), sendo obtidos valores das constantes cinéticas. Também foram estudados os efeitos de vários íons metálicos na atividade catalítica de PAH, mostrando que Mn^{2+} , Co^{+2} e Ni^{2+} sejam os cofatores desta enzima.⁴⁴ De acordo com sua estrutura cristalográfica PAH possui um sítio de ligação a Mn^{+2} como apresentado para outras duas arginases com estruturas cristalográficas resolvidas: a arginase tipo I de fígado de rato⁴⁵ e a arginase de *Bacillus caldovelox*.⁴⁶ Além disso, a estrutura de cada monômero de PAH compreende um núcleo de folhas β paralelas, compostas por 9 fitas, ligado por α -hélices, que formam um único domínio α/β em uma estrutura globular. Oito das fitas β correspondem àquelas de outras arginases, mas uma fita adicional está presente na região N-terminal de PAH.⁴⁴ Além disso, a estrutura mostra que o sítio ativo possui um sítio di- Mn^{+2} , onde o ataque hidrolítico do carbono do grupo guanidino é facilitado pela ligação entre o di- Mn^{+2} e a água.

1.4.1 Isoforma de PAH

O parálogo do gene *pah* foi denominado *pah1* enquanto que o gene original, de *pah2*.²⁸ O alinhamento de sequências gênicas desses parálogos mostra uma identidade sequencial de 72% entre os genes, e a proteína correspondente (PAH1) mostra 81% de similaridade e 71% de identidade com a sequência de aminoácidos de PAH2. Foi investigado também seu papel na produção de ácido clavulânico e de clavamas 5S.²⁸ Para isso, o gene *pah1* foi interrompido e isso não alterou significativamente a produção de ácido clavulânico mas diminuiu a produção de clavamas 5S, sugerindo que o gene *pah2* é capaz de suprir PAH suficiente no mutante interrompido em *pah1*. Um duplo mutante suprimido de *pah1* e *pah2* foi incapaz de produzir tanto ácido clavulânico como clavamas 5S.³⁰ Yeon e colaboradores⁴³ estudaram o efeito de múltiplas cópias do gene *pah2* na produção de ácido clavulânico mostrando retardo no crescimento celular e redução na produção de ácido clavulânico relacionado aos possíveis efeitos deletérios do plasmídeo multicópias. Porém quando somente mais uma cópia de *pah2* foi inserida no cromossomo de *S. clavuligerus* houve aumento na produção de ácido clavulânico e aumento nos níveis de transcritos de *pah2*.

Apesar das informações obtidas até hoje sobre o gene *pah1* nenhuma informação a respeito da proteína PAH1 foi descrita restando questões a ser respondidas a respeito da ação

desta proteína, seja na via de síntese em *S.clavuligerus*, seja como uma nova enzima com características de arginases.

1.5 Orf12

A *orf12* foi inicialmente identificado por Li e colaboradores ⁴⁷ sendo localizada no *cluster* gênico do ácido clavulânico. A proteína codificada por essa *orf* mostrou alguma similaridade com β -lactamases de classe A. ⁴⁷⁻⁴⁸ É interessante notar que a formação do anel β -lactâmico em todos os metabólitos clavâmicos resulta da ação da β -lactama sintase (BLS) na reação, que é um efeito contrário da atividade β -lactamásica. Entretanto como ORF12 não possui 3 dos 4 motivos altamente conservados associados a atividade β -lactamásica, talvez sua ação não esteja envolvida na abertura do anel β -lactâmico. ⁴⁹

Apesar de seu papel ainda não estar esclarecido, estudos sobre interrupção gênica mostraram que este gene é essencial para a síntese de ácido clavulânico. ²⁸ Sugere-se que o passo enzimático respectivo à formação de clavaldeído (fig. 2) na via de síntese seja realizado por mais de uma enzima ¹³ e que uma delas seja esta proteína com características de β -lactamase. Porém, não há estudos a respeito da proteína codificada pela *orf12*. Mais genes responsáveis pela síntese do AC devem ser necessários, e assim, a produção heteróloga das proteínas codificadas por genes putativos descritos ^{13,48} certamente contribuirá na compreensão desta via de síntese.

Assim, de acordo com os dados presentes até o momento, um estudo a respeito das proteínas codificadas pelos genes cópias de *ceas1*, *bls1* e *pah1* e pelo gene putativo *orf12* é de interesse para que possam ser esclarecidos seus papéis na via de síntese de ácido clavulânico, uma vez que a expressão destes genes em *Streptomyces clavuligerus* mostrou uma alteração na produção deste metabólito.

2 OBJETIVOS

Visando o aprimoramento da tecnologia de produção de ácido clavulânico pelo cultivo de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, o objetivo geral do trabalho foi contribuir com informações a respeito de algumas das proteínas ainda não estudadas e que possam estar envolvidas na síntese de ácido clavulânico e outras clavamas. Para isso, os objetivos específicos foram:

- Isolar os genes e produzir heterologicamente as isoenzimas CEAS1, PAH1 e BLS1 e a proteína codificada pela *orf12*;
- Estabelecer protocolos de expressão e purificação das proteínas;
- Estudar as proteínas, usando algumas técnicas biofísicas, para determinar suas características estruturais tais como grau de oligomerização, estabilidade em diferentes temperaturas e pHs, interação com cofatores;
- Realizar ensaios de atividade;
- Realizar ensaios de cristalização das proteínas;
- Comparar os dados obtidos para as isoenzimas 1 com informações das isoenzimas 2 já descritas na literatura;
- Fornecer informações que auxiliem na compreensão do papel dessas enzimas na via de síntese de ácido clavulânico e clavamas 5S.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes, enzimas, linhagens bacterianas e vetores.

Os reagentes químicos utilizados e listados a seguir foram de grau de pureza analítico e comprados da Sigma-Aldrich Chemical: azul de bromofenol, DMSO, Tris-HCl, CaCl₂, β-mercaptoetanol, NaCl, KCl, IPTG, SDS, MgCl₂, PEG, acrilamida, bis-acrilamida, NaOH, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, sulfato de amônio, EDTA, glicerol, imidazol, ácido acético glacial, ácido clorídrico, acetato de sódio, borato de sódio, etanol, metanol, TEMED, persulfato de amônio, *Comassie Brilliant Blue R-250*, HEPES, L-D-gliceraldeído-3-fosfato, L-arginina, tiamina pirofosfato, agarose, p-nitrofenil acetato.

Os antibióticos ampicilina e canamicina foram obtidos da Fluka e Gibco BRL, respectivamente, cloranfenicol e cefalosporina C, da Sigma e penicilina G e amoxicilina foram doadas pelo Depto de Engenharia Química da UFSCAR. O reagente X-Gal foi obtido da Gibco BRL.

Os reagentes para PCR e a polimerase *Taq High Fidelity* foram obtidos da Fermentas. Os oligonucleotídeos específicos (iniciadores ou *primers*) foram sintetizados pela IDT (*Integrated DNA Technologies* - <http://www.idtdna.com>). As enzimas *NdeI*, *XhoI*, *BamHI*, *EcoRI*, T4 DNA ligase e seus respectivos tampões foram adquiridos da Promega (Promega Corporate Headquarters, Madison, WI).

O vetor de clonagem pTZ57R/T foi obtido da Fermentas, o pCR2.1, da Invitrogen e o pGEM-T-Easy, da Promega. Os vetores de expressão pET29b e pET28aTEV (pET28a modificado) foram adquiridos da Novagen e o vetor pET SUMO foi gentilmente cedido pelo prof. Dr. Marcos V.A. Navarro, do IFSC.

Células de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 foram compradas (*American Type Culture Collection*) e armazenadas a -80° C em glicerol 40% v/v. As linhagens de *Escherichia coli* (*E.coli*) utilizadas foram: DH5α, obtidas da Promega e Rosetta (DE3),

Origami, BL21(DE3), obtidas da Novagen, ER2566 foi obtida da New England-BioLabs. O meio de cultura LB foi obtido de Sigma.

Os kits *Wizard Genomic DNA*, *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* e *Wizard[®] Plus SV Miniprep DNA Purification Systems* foram obtidos da Promega.

A resina *Ni-NTA superflow* foi adquirida da Qiagen. Lisozima foi adquirida da Sigma. As colunas empacotadas *Superdex 200*, *MonoQ*, *Hiprep Phenyl Sepharose FF (low sub)* foram obtidas da GE Healthcare. As colunas YMC-Pack Diol 60, YMC-C18 e YMC-C4 foram adquiridas da Waters.

3.2 Métodos

3.2.1 Extração do DNA genômico

Para se obter uma quantidade de células adequada à extração de DNA genômico, *S. clavuligerus* ATCC 27064 foi cultivado por 72 h à 28°C, sob agitação de 200 rpm, em meio ISP2 líquido (1% (p/v) extrato de malte, 0,4% (p/v) glicose, 0,4% (p/v) extrato de levedura, pH 7,0). Estas células foram recuperadas por centrifugação, lavadas com tampão PBS (50 mM fosfato pH 7,4, 150 mM NaCl) e cerca de 200 mg (peso úmido) foram utilizados para a extração do DNA genômico através do kit *Wizard Genomic DNA*, seguindo o protocolo do fabricante. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro UV-Vis (Hitachi U-2800) medindo-se a absorbância do material em 260 nm ($1 \text{ D.O.}_{260\text{nm}} = 50 \mu\text{g}/\mu\text{L}^{50}$).

3.2.2 Obtenção dos genes

A partir do DNA genômico, os genes parálogos *ceas1*, *bls1* e *pah1* e a *orf12* foram isolados e amplificados pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*). Para isso, foram sintetizados pares de oligonucleotídeos baseando-se nas sequências de nucleotídeos depositadas no banco de dados do *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), sob número de acesso AY426768 (para os genes parálogos) e AY258009 (para a *orf12*).

A fim de subclonar esses genes em vetores de expressão pET, os oligonucleotídeos foram desenhados de forma a incorporarem sítios de restrição em suas extremidades. Os pares de oligonucleotídeos utilizados neste trabalho estão descritos na Tabela 1. Os oligonucleotídeos sensores (FW) incorporam um sítio de restrição por *Nde* I ou *Eco*RI ou *Bam*HI, assinalados em verde, e que incluem o códon iniciador ATG, codificando uma metionina. Para o gene *pah1* que é iniciado por outro códon, uma mutação foi induzida pelo oligonucleotídeo senso a fim de mudá-lo para ATG, e está indicado em vermelho. Para os oligonucleotídeos reversos (RV), um sítio de restrição por *Xho* I (amarelo) foi adicionado adjacente aos códons de terminação dos genes (sublinhados).

As amplificações por PCR foram realizadas utilizando 500 ng de DNA genômico de *S. clavuligerus*, 0,2 mM dNTPs e 100 pmol de cada par de oligonucleotídeos (senso e reverso, anotados FW e RV) específicos para cada gene. Em cada reação de 50 µl ainda foi utilizado um mix de DNA polimerase com atividade “*proof-reading*” (*Taq-HiFi*), conforme protocolo do fabricante (Fermentas), e adicionou-se 5% de DMSO.

As condições das reações de amplificação foram conduzidas em um termociclador *Mastercycler* (Eppendorf) programado para realizar um *hot start* inicial e ciclos (Tabela 2) que consistiam de: desnaturação do DNA, hibridização (ou anelamento) dos oligonucleotídeos no DNA molde e extensão do fragmento.

Tabela 1 - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

Para amplifica ção do gene:	Vetor de expressão a ser subclonado	Nome do oligonucleotídeo	Sequencia do oligonucleotídeo Sequencia N-terminal da proteína codificada pelo gene
<i>ceas1</i>	pET TEV	CEAS1_NdeI_FW	5' CAGC CATATG GCCACCACGACCGCGAAAGCC 3'
	e 29b		M A T T T A K A
	pET SUMO	CEAS1_BamHI_FW	5' GC GGATCC ATGGCCACCACGACCGCGAAA 3'
			M A T T T A K
	pET TEV, 29b e SUMO	CEAS1_XhoI_RV	5' G CTCGAG TCAGATGGCCAGGGCGGCGAAACC 3'
<i>bls1</i>	pET TEV	BLS1_NdeI_FW	5' GCAGC CATATG CCCGGCCCCGACCTCGTGTACGGATTCC3'
	e 29b		M P G P D L V Y G F
	pET SUMO	BLS1_EcoRI_FW	5' GT GAATTC ATGCCCGCCCCGACCTCGTGTACGGATTCCG3'
			M P G P D L V Y G F
	pET TEV, 29b e SUMO	BLS1_XhoI_RV	5' GTGGTG CTCGAG TCATACGACCACCCGGCCCTGGAGCCTGAG3'
<i>pah1</i>	pET TEV	PAH1_NdeI_FW	5' GCAGC CATATG TCCACCGCCGTCTCCCCGCGCTACGCCCAAC3'
	e 29b		M S T A V S P R Y A Q
	pET SUMO	PAH1_BamHI_FW	5' GCAG GGATCC ATGTCCACCGCCGTCTCCCCGCGCTACGCC 3'
			M S T A V S P R Y A
	pET TEV, 29b e SUMO	PAH1_XhoI_RV	5' GTGGTG CTCGAG CTACCCCCACCGCTGCCCCGGCGAAGTCCAC3'
Orf12	pET TEV	Orf12_NdeI_FW	5' GCAGC CATATG ATGAAGAAAGCTGATTCCGTCCTCGACC3'
			M M K K A D S V P T
	pET TEV	Orf12_XhoI_RV	5' GTGGTG CTCGAG TCATCGCCGGGCGGCTTCTCCGGCGCTCGC3'

Tabela 2 - Ciclos de amplificação dos genes/*orf*.

	<i>ceas1</i>	<i>bls1</i> e <i>orf12</i>	<i>pah1</i>
Desnaturação inicial	98°C – 7 min (*)	94°C – 7 min (*)	98°C – 7min (*)
x 40 {	Desnaturação	94°C – 30 s	94°C – 30 s
	Anelamento	65° C – 1 min	75° C – 1 min
	Extensão	68° C – 2 min	72° C – 2,5 min
	Extensão final	68° C – 10 min	72° C – 10 min

(*) a DNA polimerase foi adicionada após este passo..

A análise de 3 µL do produto de cada reação foi realizada por eletroforese horizontal em um gel de agarose 0,8% contendo 30µg de brometo de etídio, em tampão TAE (80 mM Tris-HCl, 40mM ácido acético glacial, 2,5 mM EDTA, pH 8,3), submetido a uma tensão de 110V por 1h, sendo visualizado sob luz ultravioleta. O padrão utilizado foi o *Gene Ruler*™ 1 Kb DNA Ladder (Fermentas).

3.2.3 Clonagem e Sequenciamento do DNA

Uma vez confirmado o tamanho, os fragmentos amplificados por PCR foram submetidos a um gel de agarose preparativo, excisados deste e purificados pelo kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*, segundo o protocolo do fabricante. Em seguida, estes fragmentos foram clonados nos vetores pTZ57R/T, pGEM-T-Easy ou pCR2.1 de acordo com os protocolos convencionais de ligação, utilizando-se T4 DNA ligase ou sistema DNA topoisomerase, respectivamente (relação molar inserto/vetor = 3/1).

Dois µL dessa mistura de ligação foram utilizados na transformação de células *E. coli* linhagem DH5α competentes por CaCl₂.⁵⁰ As células foram plaqueadas em meio Lúria-Bertani (LB) contendo X-gal (0,1 mg/mL), IPTG (0,45 mM) e ampicilina (50 µg/mL), a fim de selecionar as colônias positivas (brancas) das negativas (azuis). As placas foram incubadas a 37°C por 16h. Após o crescimento, as colônias brancas foram selecionadas a fim de realizar a extração dos seus DNAs plasmidiais. Para isso, elas foram repicadas individualmente, em tubos estéreis contendo 5 mL de meio LB suplementado com ampicilina (pré-inóculo) e cultivadas a 37°C por 16h, sob agitação (250 rpm).

Estas células então foram submetidas à extração de DNA plasmidial pelo kit *Wizard Plus Miniprep DNA Purification Systems* e os clones positivos foram confirmados por análise de restrição, que consistiu na dupla digestão do DNA plasmidial com as enzimas de restrição correspondentes a cada construção (Tabela 1). Após 4h de incubação a 37°C, o produto da reação de digestão foi analisado em gel de agarose 0,8% visualizado sob luz UV. Os clones confirmados foram submetidos ao sequenciamento de DNA pelo método do dideoxinucleotídeo marcado⁵¹ num sequenciador automático *ABI Prism 377* (Perkin Elmer), segundo o protocolo do fabricante.

3.2.4 Subclonagem em vetores de expressão

Cerca de 10 µg de DNA plasmidial dos clones positivos foram submetidos a uma dupla digestão com as enzimas correspondentes a cada construção e submetidos à eletroforese em gel de agarose para posterior purificação dos fragmentos através do kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*. Os fragmentos purificados foram então subclonados por reação convencional de ligação (T4 DNA ligase) em vetores pET previamente digeridos com as mesmas enzimas.

A partir das reações de ligação (gene ligado ao vetor de expressão), células de *E. coli* DH5α competentes por CaCl₂ foram transformadas por choque térmico, para fins de propagação e extração de DNA plasmidial. As células transformadas foram plaqueadas em meio LB contendo 50 µg/mL de canamicina e cultivadas a 37°C por 16h. As colônias crescidas nas placas foram então inoculadas individualmente, em tubos estéreis contendo 5mL de meio LB suplementado com 50 µg/mL canamicina (pré-inóculo) e cultivadas a 37°C por 16h, sob agitação (250 rpm). O DNA plasmidial destas células foram extraídos pelo kit *Wizard Plus Miniprep DNA Purification Systems* e os clones positivos foram confirmados por digestão do DNA plasmidial com as enzimas de restrição adequadas. Após 4h de incubação a 37°C, o produto da reação de digestão foi analisado em gel de agarose 0,8%, visualizado sob luz UV.

O DNA de um clone positivo então foi usado na transformação de células *E. coli* Rosetta (DE3) competentes por cloreto de cálcio⁵⁰. Os transformantes foram selecionados por resistência a canamicina (50 µg/mL) e à cloranfenicol (34 µg/mL) e utilizados em testes de expressão. Outras linhagens de *E. coli* também foram testadas na expressão do gene *bls1*: BL21(DE3), ER2566 e Origami.

3.2.4.1 Vetores de expressão pET

Neste trabalho foram utilizados os vetores: pET TEV, pET SUMO e pET29b (Figura 5). Tanto o pET TEV quanto o pET Sumo são versões modificadas do pET28a. Resumidamente, em pET TEV ocorre uma substituição do sítio de reconhecimento da

trombina por um sítio de clivagem reconhecido pela enzima TEV. Em pET Sumo foi inserida, após o sítio de reconhecimento da trombina, a sequência gênica correspondente à proteína Sumo e um sítio de clivagem reconhecido pela enzima ULP-1 (conhecida como SUMO protease).

A escolha dos sítios de restrição *NdeI* e *XhoI* em pET TEV resultará na expressão da proteína de interesse fusionada, em sua porção N-terminal, a um polipeptídeo de 6 histidinas mais um sítio de clivagem, reconhecido pela protease TEV. Subclonando o fragmento de interesse nos sítios *NdeI* e *XhoI* do vetor pET29b, a proteína recombinante será expressa integralmente, sem nenhum polipeptídeo ou proteína de fusão. Já a subclonagem em pET Sumo entre os sítios de *BamHI* / *EcoRI* e *XhoI*, resultará na expressão da proteína de interesse fusionada, em sua porção N-terminal, a: um polipeptídeo de 6 histidinas, um sítio de clivagem reconhecido pela protease trombina, mais a proteína SUMO seguida do sítio de clivagem da SUMO protease ULP-1 (fig. 5C).

Assim, nas construções em pET TEV ou pET SUMO, o processo de purificação da proteína é facilitado pela presença da cauda de His, usando-se para isso a cromatografia de afinidade em coluna de níquel (Ni-NTA). Para a construção em pET Sumo, posteriormente é possível retirar esta cauda (junto a todo o peptídeo adicionado) pela ação da SUMO protease (ULP-1), resultando na proteína recombinante sem peptídeos adicionais.

Figura 5 – Detalhes do sítio múltiplo de clonagem dos vetores de expressão utilizados. (A) pET TEV. (B) pET 29b. (C) pET SUMO. Em destaque, os peptídeos de fusão: cauda de His (amarelo), sítio de reconhecimento da trombina (verde), substituído pelo sítio de reconhecimento da enzima TEV (azul, em A), a proteína SUMO (vermelho, em C), sítio de clivagem pela SUMO protease ULP-1 (roxo, em C). Os círculos alaranjados mostram os sítios de restrição escolhidos para a subclonagem dos genes neste trabalho (Ilustrações modificadas da Novagen).

3.2.5 Expressão heteróloga em células *E.coli*

Para os genes *ceas1*, *bls1* e *pahl* as construções em pET TEV, pET Sumo e pET29b em células *E. coli* Rosetta (DE3) foram usadas em um teste de expressão. A construção de Orf12 em pET TEV em células *E. coli* Rosetta (DE3) também foi testada.

Colônias de transformantes crescidas em placas de meio LB sólido foram puncionadas e utilizadas em pré-inóculos de 5 mL, os quais foram incubados a 37°C, *overnight*, sob agitação (250 rpm). Estas culturas então foram diluídas na proporção de 1:100 em meio LB líquido, suplementado com canamicina (50 µg/ml). As células foram crescidas a 37°C até atingir uma absorbância em 600 nm de aproximadamente 0,6. Uma vez atingida tal densidade, correspondente ao início da fase exponencial de crescimento populacional bacteriano, testes para a expressão da proteína recombinante foram realizados variando a concentração do indutor (IPTG), sob diferentes temperaturas (18°C, 20°C ou 37°C), por tempos determinados, sob agitação (250 rpm). Aliquotas de 200 µL das culturas foram coletadas antes e após a indução. Estas amostras foram centrifugadas por 1 min. em microcentrífuga, em velocidade máxima, descartando os sobrenadantes e ressuspendendo os precipitados em 30 µL de água MilliQ. Foram adicionados 15 µL de tampão de amostra contendo β-mercaptoetanol e tais amostras foram fervidas por 5 min. Estas alíquotas foram posteriormente submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE), segundo Laemmli⁵². Os marcadores de massa molecular (Sigma) utilizados foram: albumina sérica bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica bovina (29 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) e citocromo C (12,4 kDa). Os géis foram corados com azul de Comassie.

No caso do gene *bls1* foram realizadas diversas tentativas de expressão a fim de obter a proteína BLS1 de forma solúvel. Para isso, várias linhagens de *E.coli* (Origami (DE3), BL21 (DE3), Rosetta (DE3) e ER2566 foram transformadas com o clone *bls1*_pET TEV e induzidas a expressar a proteína de interesse sob diversas condições. As células foram crescidas em meio LB suplementado com canamicina (50µg/mL) (e tetraciclina (15µg/mL) no caso de células Origami (DE3)) a 37°C até atingir uma absorbância em 600 nm de aproximadamente 0,6. Os testes de expressão utilizando estas células foram realizados variando a concentração do indutor (0,025mM a 2mM de IPTG), à 18°C e 37°C, de 4h a 6h,

sob agitação (250 rpm). Também foi testado utilizar o meio de cultura TB. Alíquotas das culturas foram coletadas antes e após a indução e analisadas em SDS-PAGE 15%.

3.2.6 Análise da solubilidade das proteínas recombinantes

As células induzidas, provenientes de 500 mL de cultura foram centrifugadas numa centrífuga SORVALL® RC 5C *Plus* a 4000 g, por 10 min, a 4°C. O precipitado de células foi separado da porção sobrenadante (meio de cultura) e ressuspensão em 30 mL de tampão (para CEAS1: 50 mM Hepes, 300 mM NaCl, pH8,0, para PAH1: 25 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl pH 8,0 e para ORF12: 25 mM Tris-HCl, 25 mM NaCl pH 8,0). A essa suspensão celular foram adicionados 25 mg de lisozima, sendo então incubada em gelo por 30 min, a fim de auxiliar a lise celular. Após essa incubação, as células foram mantidas em gelo e lisadas por sonicação (pulsos de 30 segundos de ultra-som, com intervalos de 30 segundos entre um pulso e outro, repetidos por 15 vezes no sonicador *Sonic Dismembrator Model 500* Fisher Scientific International). O lisado foi clarificado por centrifugação a 17000 g durante 15 min, a 4°C. Alíquotas do sobrenadante e do precipitado foram submetidas à análise por SDS-PAGE 15%, segundo Laemmli⁵², para checar a solubilidade das proteínas recombinantes.

Assim, a fração utilizada na etapa de purificação foi sempre o sobrenadante, obtido após a centrifugação das células lisadas, o qual será referido como extrato celular.

3.2.7 Purificação das proteínas recombinantes

3.2.7.1 Sistema de expressão pET TEV e pET SUMO

Devido a escolha das construções em sistema pET TEV e pET SUMO a purificação das proteínas recombinantes foi realizada pela técnica de cromatografia por afinidade em resina de níquel *Ni-NTA Superflow*.

Para isso, uma coluna cromatográfica (Bio-Rad) foi empacotada com 5 mL da resina Ni-NTA, por decantação. Inicialmente, a resina foi lavada com 10 volumes de água e depois, equilibrada com cinco volumes do tampão (para CEAS1, 50 mM Hepes, 300 mM NaCl, pH 8,0; para PAH1, 25 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl pH 8,0 e para ORF12, 25 mM Tris-HCl, 25 mM NaCl pH 8,0).

O extrato celular, previamente filtrado em papel de filtro, foi aplicado na coluna pré equilibrada e o extrato não-ligado foi todo coletado. Prosseguiu-se com a lavagem da resina com três volumes de tampão e então, o extrato coletado foi reaplicado. Após a reaplicação do extrato, foi feita uma lavagem final com 10 volumes de coluna com tampão de equilíbrio da coluna. Finalmente, a proteína foi eluída utilizando-se um gradiente de imidazol de 5 mM a 500 mM em tampão.

Para avaliar a funcionalidade do sistema de purificação e o grau de pureza das proteínas, alíquotas de 20 µL das frações das lavagens e eluições foram submetidas a um SDS-PAGE 15%, segundo Laemmli.⁵²

As frações eluídas da coluna de Ni-NTA contendo as proteínas puras foram reunidas e dialisadas contra um tampão de interesse, em concentrador *Amicon* (Millipore) utilizando a centrífuga refrigerada *Eppendorf 5804R* ou em sacos de diálise. Após a mudança de tampão, as amostras foram quantificadas e submetidas aos próximos experimentos.

3.2.7.1.1 Clivagem da proteína de fusão com SUMO

A utilização do sistema de expressão usando pET SUMO permite a clivagem da cauda fusionada a proteína de interesse utilizando a enzima ULP1. Esta enzima foi obtida pela expressão heteróloga de seu gene que foi cedido gentilmente pelo prof. Dr. Marcos V.A. Navarro, do IFSC. A expressão foi realizada em células *E.coli* BL21DE3, induzidas com 0,1mM IPTG, cultivadas a 18°C, *overnight*, seguindo o mesmo protocolo utilizado na expressão dos genes já descrito acima. A lise celular e a purificação da proteína em coluna de níquel foram realizadas da mesma forma descrita acima, utilizando em tampão 25 mM Tris, 300 mM NaCl, 10% glicerol, pH 8,0. Assim, após a confirmação da purificação em SDS-PAGE a proteína foi quantificada pelo método de Bradford.

Desta maneira, após a confirmação da purificação da proteína de interesse, esta foi incubada com ULP1 na proporção de 1 mg para 50 mg de fusão com His, na geladeira, de 1h a 3h. Em seguida, essa amostra foi aplicada numa coluna de Ni-NTA pré-equilibrada com tampão de purificação. Foi feita uma lavagem da resina de cinco volumes de coluna com o mesmo tampão e depois lavagens com concentrações crescentes de imidazol. As frações foram analisadas em um SDS PAGE 15%.

Um método alternativo na purificação da proteína usando o sistema pET SUMO foi realizar a clivagem da fusão durante a etapa de purificação em coluna de Ni-NTA. Para isso, a enzima ULP-1 (2 mg) foi incubada à proteína de interesse que estava imobilizada no Ni-NTA (antes das lavagens com um gradiente de imidazol) por no mínimo 1h na geladeira. O passo seguinte foi aplicar cinco volumes de tampão na coluna com concentrações crescentes de imidazol, sendo as frações analisadas em um SDS PAGE 15%. As frações eluídas da coluna de Ni-NTA contendo a proteína pura foram reunidas, dialisadas em tampão de interesse e quantificadas.

3.2.7.2 Sistema de expressão pET29b

Para a construção em sistema pET 29b que resulta em proteínas recombinantes sem fusão foram realizados diversos testes de purificação. Assim, a partir do lisado das células induzidas foi realizado um teste com precipitação por sulfato de amônio ⁵³. Foram distribuídos 1mL do lisado em tubos eppendorfs previamente já preenchidos com NH₄SO₄ em determinada concentração deste sal (de 5% a 75%). Então, foram incubados sob leve agitação por 1h, à temperatura ambiente (~22°C), e centrifugados a 13000 rpm por 15min, para separar a porção sobrenadante da precipitada, a qual foi ressuspendida em 1mL de tampão PBS. Alíquotas de ambas as porções foram submetidas a SDS-PAGE 15% para analisar as frações que continham as proteínas de forma mais pura.

Escolhida a condição de precipitação com NH₄SO₄, a próxima etapa da purificação das proteínas foi a cromatografia de troca iônica utilizando a coluna MonoQ 5/5 HR (*Pharmacia Biotech*). O extrato celular solúvel resultante de 500 mL de cultura, precipitado com NH₄SO₄, foi dialisado contra tampão 50 mM tris-HCl pH8,0 (com 1 mM de DTT ou sem DTT) ou 50 mM borato de sódio pH 9,0 e aplicado na coluna MonoQ equilibrada com o

mesmo tampão. O tampão de eluição foi o mesmo inicial adicionado com 1M NaCl. Foram testados diversos gradientes de sal para eluir as proteínas e estas coletadas em frações de 1mL que posteriormente foram aplicadas num SDS-PAGE 15% para analisar as mais puras.

Outra estratégia escolhida após a precipitação com NH_4SO_4 foi a cromatografia de interação hidrofóbica, utilizando a coluna *Hiprep Phenyl Sepharose FF (low sub)* (GE Healthcare Biosciences). O extrato celular solúvel resultante de 500 mL de cultura, precipitado com NH_4SO_4 , foi dialisado contra tampão 50 mM tris-HCl pH8,0 (com 1mM DTT ou sem DTT) com 2M NH_4SO_4 ou 50mM borato de sódio pH 9,0 com 1M NaCl e aplicado na coluna equilibrada com o mesmo tampão. O tampão de eluição foi o mesmo que o tampão anterior sem o sal, sendo aplicado um gradiente de 0 até 100% deste tampão, de 4 a 10 volumes de coluna. As frações coletadas foram analisadas por SDS-PAGE 15%.

3.2.8 Quantificação das amostras protéicas

As concentrações das proteínas recombinantes foram determinadas por espectroscopia medindo-se a absorbância em 280 nm e relacionando essa absorbância com o coeficiente de extinção de cada proteína. Esses coeficientes foram obtidos a partir da análise da sequência de aminoácidos indexada ao programa *ProtParam tool* (<http://ca.expasy.org/tools/protparam.html>) do servidor *ExPASy* (Expert Protein Analysis System) ⁵⁴ o qual retornou alguns parâmetros da proteína, tais como: pI teórico, peso molecular, coeficiente de extinção molar, porcentagem de cada aminoácido na proteína, entre outros.

O cálculo da concentração foi realizado usando a Lei de Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

onde A é a absorbância da amostra; ε é o coeficiente de extinção molar ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$); c é a concentração da amostra (M) e l é o caminho ótico (cm).

Assim temos a concentração da amostra em μM :

$$[\mu\text{M}] = \frac{Abs_{280nm}}{\varepsilon \times 1} \times 10^{-6}$$

3.2.9 Cromatografia de Exclusão Molecular e Gel Nativo

A determinação do grau de oligomerização das proteínas recombinantes CEAS1, PAH1 e ORF12 foi realizada por cromatografia de exclusão molecular (SEC) e por eletroforese sob condições nativas.

A cromatografia de exclusão molecular permite a obtenção da massa molecular aparente das proteínas, cuja eluição é comparada com um padrão de proteínas globulares de massas moleculares conhecidas.

Na SEC uma amostra da proteína purificada foi aplicada em uma coluna analítica *Superdex 200 16/60* (GE Healthcare), acoplada a um sistema HPLC (ÄKTA™ Purifier 10 GE Healthcare Biosciences). As cromatografias foram feitas em tampão 20 mM fosfato de sódio pH 8,0, 10 mM NaCl (para PAH1), tampão 25 mM tris-HCl, 25 mM NaCl, pH8,0 (para ORF12), e nas condições expostas na Tabela 3 para CEAS1, com fluxo de 0,5 mL/min, monitorada por absorbância em 280nm, sendo o as frações coletadas de 1 mL. Para a calibração, foram utilizados os padrões (GE Healthcare Biosciences): ferritina (440 kDa), aldolase (158 kDa), conalbumina (75 kDa), ovalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), ribonuclease A (13,7 kDa) e aprotinina (6,5 kDa), e o *blue dextran 2000* cromatografados sob as mesmas condições descritas para a amostra. Os volumes de eluição dos padrões e das proteínas de interesse foram determinados e utilizados para o cálculo de K_{av} usando a equação:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_c - V_o}$$

onde: V_e corresponde ao volume de eluição da proteína, V_o , o volume de exclusão da coluna, e V_c , o volume total da coluna. Os dados foram representados num gráfico K_{av} x logMM (Massa Molecular).

Tabela 3 - Condições tamponantes utilizadas na análise de CEAS1 em SEC.

Tampão	[NaCl]	pH	Agente redutor	Glicerol	MgCl₂	EDTA
Tris-HCl 20 mM	10 mM	8,0				
	0 mM	8,0				
	20 mM	8,0				
	150 mM	8,0				
	500 mM	8,0				
	150 mM	8,0	1 mM DTT			
Tris-HCl 50 mM	150 mM	8,0			10 mM	
	150 mM	8,0	5 mM β -ME	10%		
	300 mM	8,0	5 mM β -ME	10%		
	500 mM	8,0	5 mM β -ME	10%		
	300 mM	7,4	5 mM β -ME	10%		
	500 mM	7,4	5 mM β -ME	10%		
Fosfato de sódio 20 mM	100 mM	8,0				
	100 mM	8,0		10%		
	300 mM	8,0				
Hepes 50 mM	300 mM	8,0				
	300 mM	8,0	1 mM β -ME			
	300 mM	8,0	1 mM β -ME			5 mM

Para a eletroforese nativa, uma amostra da proteína pura foi submetida a um gel de poliacrilamida 9% não desnaturante, segundo Laemmli⁵², ou ao protocolo *Phast System* (GE Healthcare Biosciences). Os padrões de eletroforese utilizados foram: albumina (67 kDa), lactato desidrogenase (140 kDa), catalase (232 kDa), ferritina (440 kDa) e tireoglobulina (669 kDa) (GE Healthcare Biosciences).

3.2.10 Técnicas espectroscópicas

3.2.10.1 Dicroísmo Circular (CD)

A espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) é uma ferramenta muito utilizada para estudos estruturais de proteínas ou de polipeptídeos em solução devido à sua capacidade de discriminar a proporção de estruturas secundárias como α -hélice, folha β , volta β e desordenada. O CD também é um método muito útil na monitoração de alterações conformacionais das proteínas em função de solventes, pH, temperatura, força iônica e ligações específicas e não específicas.⁵⁵

Para estimar o conteúdo de frações de estruturas secundárias são usados programas que utilizam métodos de desconvolução extraíndo as componentes comuns dos espectros experimentais de CD, permitindo a obtenção de suas curvas puras (α -hélice, folha β antiparalela, volta β e/ou folha β paralela e estrutura desordenada, contribuições de resíduos aromáticos e/ou pontes de dissulfeto) e as porcentagens que as mesmas representam no espectro.

Neste trabalho, a técnica de CD foi empregada a fim de se analisar o conteúdo de estruturas secundárias das proteínas recombinantes CEAS1 e PAH1 e as possíveis mudanças nessas estruturas frente a soluções com diferentes pHs, em diferentes temperaturas e em concentrações crescentes de agente desnaturante.

As medidas de CD foram realizadas num espectropolarímetro Jasco J-815 (*Jasco Corporation*, Japão) em cubeta de quartzo de 1 mm de caminho óptico, na faixa de 195 nm a 250 nm (UV distante), sendo que cada medida representa uma média de 8 varreduras consecutivas através das amostras. As contribuições dos tampões obtidas sob condições idênticas foram subtraídas e todos os espectros de CD foram filtrados pela aplicação do algoritmo Transformada Rápida de Fourier, disponível no Programa *Origin 8*, preservando-se as bandas típicas de cada espectro. A desconvolução dos espectros foi feita utilizando-se o pacote de programas *CDPro* (Selcon3, Contill, CDSSTR)⁵⁶ utilizando-se o maior banco de dados disponível no pacote. Os dados de CD estão apresentados em termos de elipticidade (θ) dada em mgraus. Quando necessário, os dados foram normalizados para elipticidade molar ($[\theta]$) de acordo com a equação abaixo:

$$[\theta] = \frac{(\theta_{obs} . MMR . 0,1)}{l . c}$$

Onde: $[\theta]$ é a elipticidade molar ($\text{grau.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$),

θ_{obs} é a elipticidade (mgraus),

MMR é a massa molecular média por resíduo (115 g/mol)

l é o caminho óptico (cm)

c é a concentração da amostra (mg/ml)

Amostras protéicas de CEAS1-His e PAH1-His concentradas a 0,3 mg/mL em tampão 20 mM fosfato de sódio pH 8,0 contendo 100 mM NaCl foram utilizadas para se obter o

espectro de CD, a fim de analisar seus conteúdos de estruturas secundárias. Todas as amostras foram centrifugadas por 2 min a 13400g, e o sobrenadante foi usado para a medida de CD. Cada amostra nas mesmas condições foi utilizada num experimento de estabilidade térmica (10° a 100°C), sendo a proteína incubada por 5 min em cada temperatura (utilizando-se um *Peltier* acoplado ao equipamento de CD) antes de ser feita a leitura de CD.

Em um experimento para verificar a estabilidade das proteínas quando se varia o pH, amostras foram diluídas para 0,2 mg/mL e incubadas por 30 min em tampões 25mM acetato-fosfato-borato de diferentes pHs (de 2,0 a 12), centrifugadas por 2 min a 13400 g, e a porção sobrenadante foi usada para fazer a medida de CD .

Para monitorar as alterações conformacionais de CEAS-His na presença de agente desnaturante (uréia) uma amostra da proteína a 0,2 mg/mL em tampão 50 mM tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8,0 foi incubada em várias soluções de uréia (0,5M, 1M, 1,5M, 2M, 3M, 4M, 5M e 6M) tamponadas em 50 mM tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8,0. Cada amostra permaneceu em temperatura ambiente por 1h, e depois foi feita a medida de CD. A análise da fração de proteína desnaturada foi feita plotando o valor de elipticidade em 220nm de cada espectro pela concentração de uréia.

3.2.10.2 Espectroscopia de Emissão de Fluorescência

Foi utilizada a técnica de espectroscopia de emissão de fluorescência para monitorar o microambiente do triptofano (W) para analisar possíveis mudanças conformacionais da proteína PAH1. A amostra da proteína utilizada nestes experimentos foi obtida por cromatografia de afinidade (em coluna de Ni-NTA) seguida de exclusão molecular em tampão 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8,0.

As medidas foram feitas em um fluorímetro K2 (ISS, *Fluorescence, Analytical and Biomedical Instrumentation* – Illinois/USA) a 25°C, em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. O comprimento de onda de excitação foi de 280 nm e de 295 nm e a emissão monitorada em 305 nm a 450 nm. Para minimizar o efeito do espalhamento de luz foi utilizado um filtro de 305 nm e de cada amostra foi subtraído o espectro do tampão correspondente.

Amostras PAH1 concentradas em tampão 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8,0 foram diluídas para 0,04 mg/mL, referente a uma $DO_{280nm} = 0,03$ e incubadas por 30 min em tampão 20 mM acetato-fosfato-borato pH 9,0 e em tampão 20 mM fosfato de sódio pH 8,0 antes de se fazer as medidas.

3.2.11 Ferramentas para alinhamento e análise das estruturas

Para a obtenção da sequência gênica e da estrutura primária das proteínas estudadas foi utilizado o banco de dados *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Para os genes parálogos o número de acesso foi o AY426768 e para a *orf12*, o AY258009. A ferramenta de BLAST foi utilizada nesta plataforma para procurar sequências nucleicas e protéicas com similaridade às sequências de estudo. A partir desta análise foram realizados alinhamentos das estruturas primárias que apresentaram maior identidade entre si. Isso foi feito através da ferramenta *ClustalW* do *European Bioinformatics Institute* (EMBL-EBI, <http://www.ebi.ac.uk/>).

Para análise e comparação de estruturas secundárias, terciárias e quaternárias foram utilizados dados provenientes do *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) e da base de dados *PDBSum* do EMBL-EBI. Os códigos de acesso utilizados foram: 2IHT, 2IHU, 2IHV (para CEAS2), 1GQ6, 1GQ7 (para PAH2), 2XEP e 2XF3 (para ORF12).

Para a classificação e comparação de CEAS1 entre os integrantes de sua família de proteínas foi utilizado o banco de dados *Thiamine diphosphate dependent Enzyme Engineering Database* (TEED)⁵⁷ disponível em <http://www.teed.uni-stuttgart.de/>.

Informações a respeito das enzimas foram acessadas utilizando o banco de dados *Brenda* (<http://www.brenda-enzymes.org/>).

3.2.12 Modelagem das estruturas

A modelagem das estruturas de CEAS1 e de PAH1 foi realizada em colaboração com a Dr^a Juliana Cheleski do Grupo de Biofísica Molecular (IFSC-USP). A partir das estruturas primárias de CEAS1 e PAH1 foi utilizada a ferramenta *Swiss-Model Workspace* (<http://swissmodel.expasy.org/>)⁵⁸⁻⁶⁰ para fazer a modelagem por homologia da estrutura das proteínas.

A construção de um modelo por homologia compreende quatro passos principais: a identificação do(s) molde(s) estrutural(is), alinhamento da sequência alvo com a(s) estrutura(s) molde(s), construção do modelo e avaliação da qualidade do modelo. Cada um desses passos requer *softwares* especializados e acesso a banco de dados estruturais atualizados (<http://swissmodel.expasy.org/> acesso em 13 de julho de 2012). A partir da construção do modelo é obtido um *QMEAN4 score* que é um valor composto de uma combinação de termos estatísticos que dá a confiabilidade do modelo estimado (entre 0-1). A ferramenta utiliza de dados obtidos de estruturas de tamanho similar com estruturas de alta resolução resolvidas por cristalografia de raios X⁶¹. Assim, através da ferramenta *Swiss-Model Workspace*⁵⁸⁻⁶⁰ foram obtidos os dados da modelagem das proteínas de interesse.

3.2.13 Testes de atividade enzimática

Partindo de amostras puras de CEAS1 e PAH1 (construções com e sem cauda de His) e de ORF12-His, foram realizados ensaios de atividade com as proteínas e seus respectivos substratos. As técnicas utilizadas aqui foram: a espectrofotometria por análise de absorbância, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), a Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC), e HPLC acoplado a Espectrometria de Massas (LC-MS).

3.2.13.1 Análise de absorbância em espectrofotômetro

A atividade de CEAS1 foi testada por reação acoplada utilizando-se o kit comercial *EnzChek[®] Phosphate Assay (Molecular Probes)*, conforme as instruções do fabricante. Basicamente, este é um método espectrofotométrico utilizado para quantificar fosfato inorgânico (Pi) na solução.⁶² CEAS1-His (1 μ M) foi incubada com 10 μ M de ThDP, 10 μ M de $MgCl_2$, em tampão 50 mM tris-HCl pH 8,0. Essa amostra então foi misturada com os reagentes do kit (substrato, tampão e enzima) e a reação iniciada pela adição de 100 μ M dos substratos L-arginina e L-D-Gliceraldeído-3-Fosfato (G3P), sendo imediatamente monitorada em 360 nm durante 40 min. Experimentos controles também foram feitos, sendo eles: A) reação controle sem enzima, B) reação controle sem substrato (G3P) e C) reação controle sem enzima e sem substratos (G3P e L-arginina). Os valores das absorbâncias dos controles foram subtraídos do valor da absorbância da reação. As medidas foram realizadas a temperatura ambiente usando uma cubeta de quartzo de 500 μ l, com 1 cm de caminho óptico num espectrofotômetro Hitachi U-2800 UV-Vis.

A atividade de PAH1 também foi testada por reação acoplada utilizando-se o kit comercial *Uréia CE (Labtest)*. Basicamente, é um método enzimático-colorimétrico para determinação da uréia. O protocolo foi seguido conforme as instruções do fabricante. Numa reação de 10 μ L foram adicionados PAH1-His (10 a 25 μ M), $MnCl_2$ (10 a 25 μ M), N α -Acetil-L-Arginina (N-AA) (1-10 mM) e tampão 50 mM borato de sódio, pH 9,0. Essa reação foi misturada com os reagentes do kit seguindo o procedimento descrito no manual e a reação foi monitorada em 600 nm. Medidas dos controles de tampão, substrato e enzima também foram feitas. Os valores das absorbâncias dos controles foram subtraídos do valor da absorbância da reação. As medidas foram feitas utilizando uma cubeta de quartzo de 1000 μ l, com 1 cm de caminho óptico.

No estudo da reação de ORF12 foram testados dois substratos: cefalosporina C (CPC) e p-nitrofenil acetato (p-NPA).

Na reação de clivagem da CPC por ORF12 os produtos gerados são deacetilcefalosporina C e ácido acético. Assim, para análise dessa reação foi monitorada a formação de ácido acético utilizado um método colorimétrico com o indicador de pH, azul de bromotimol (BTB). A leitura da reação foi feita em 616 nm, com base nos dados publicados para outras enzimas da mesma família.⁶³⁻⁶⁴ A reação foi ensaiada em tampão 5 mM Tris, 25

mM NaCl, pH8,0 contendo 0,01% BTB, sendo todos os reagentes da reação preparados nesta solução e seu pH posteriormente aferido para 8,0.

Na reação de ORF12 sobre o substrato p-NPA, este é convertido a p-nitrofenol o qual apresenta absorvância em 405 nm, sendo então a reação monitorada neste comprimento de onda. O p-NFA é um substrato pouco solúvel em água e necessita ser preparado em solvente orgânico, sendo que no caso foi escolhido o DMSO por mostrar baixa interferência na absorção. Nesta reação foi utilizado o tampão 50 mM fosfato de sódio pH7,3 contendo 1% DMSO, sendo todos os reagentes da reação preparados nesta solução.

Os ensaios de atividade de ORF12 foram feitos em placas de 96 poços com capacidade de 200 µL/poço. Foram realizadas diluições consecutivas de 2x de uma solução concentrada de substrato (2 mM de p-NPA ou 53,5 mM de CPC). A reação foi iniciada pela adição de 100 µL de ORF12-His (concentrada a 6µM no teste com CPC e a 1 µM no teste com p-NFA) em cada poço com o auxílio de uma pipeta multicanal. A leitura das placas foi feita em 405 nm durante 30 min (para o ensaio com p-NPA) ou em 616 nm durante 1h (para o ensaio com CPC), a temperatura ambiente, em um espectrofotômetro *Spectra Max M3 (Molecular Devices)*. Os ensaios foram realizados em triplicatas. Controles da enzima e do substrato (em todas as concentrações usadas na reação) foram conduzidos simultaneamente e os valores destes foram descontados dos valores da média das triplicatas para análise dos resultados. As absorvâncias obtidas no decorrer do tempo para cada concentração de substrato foram plotadas (Abs x tempo) e a partir daí foi calculada a velocidade da reação (correspondente à inclinação da curva, dA/dt).

Ainda no estudo da reação com p-NFA também foram realizados dois experimentos seguindo a mesma metodologia descrita acima, um variando a concentração da enzima (de 0,1 nM a 1250 nM) e mantendo 0,2 mM de p-NFA (0,08% DMSO), e outro variando o pH da reação (de 6,5 a 9,0) mantendo 0,5 mM de p-NFA (0,1% DMSO) e 1250 nM de enzima. Ambos os ensaios foram realizados em tampão 50 mM fosfato de sódio pH 7,3, a temperatura ambiente.

3.2.13.2 Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC)

Com o intuito de separar com alta resolução os componentes da reação de CEAS1 e com isso analisar se houve formação dos produtos de tal reação, foi empregada a técnica de HPLC utilizando a coluna YMC-Pack Diol 60 (SEC) (*Waters*), que é uma coluna cromatográfica de exclusão molecular com base de sílica em gel utilizada para separar peptídeos de oligossacarídeos com massas moleculares de 10000 ou menos.

Para a análise da atividade de CEAS1, foi montada a reação com 1 mM de G3P, 1 mM L-arginina, 0,5 mM $MgCl_2$, 0,5 mM ThDP e de 0,3 a 10 μM de CEAS1-His, em tampão 50 mM tris, 300 mM NaCl, 10% glicerol, 5 mM β -mercaptoetanol, pH8,0, sendo incubada à 37°C por 1h. Como controle negativo o mesmo procedimento foi feito, porém sem colocar CEAS1-his. Após a incubação, as amostras foram fervidas por 5 min e centrifugadas por 10 min a 12000 rpm. A partir daí, uma amostra de 20 μL do sobrenadante foi aplicado na coluna YMC-Pack Diol 60 (5 μm , 8,0 x 500 mm) acoplada a um HPLC (Akta). Como solvente foi utilizada a solução: 0,1M fosfato de potássio pH 7,0 / Acetonitrila (80/20). O fluxo utilizado foi de 0,5 mL/min, com a detecção de comprimento de onda em 280 nm, 220 nm e 205 nm. A amostra do controle negativo foi analisada nas mesmas condições assim como todos os reagentes da reação em separado (também tratados com o mesmo protocolo da reação). Como padrão, a molécula NATA (N-acetil-L-triptofanamida) em concentração correspondente a DO_{280nm} de 0,5 foi cromatografada sob as mesmas condições da reação. Seu perfil de eluição foi comparado com o cromatograma da reação, uma vez que sua massa molecular é de 245, nos indicando qual seria o volume de eluição de produto CEA (massa: 246).

3.2.13.3 Espectrometria de Massas

A técnica de espectrometria de massas foi realizada em colaboração com o Dr. Edson Crusca do Grupo de Biofísica Molecular (IFSC-USP), a fim de identificar possíveis intermediários e o produto final da reação de CEAS1.

As medidas foram realizadas num espectrômetro de massas *MicroTOF-QII* (Bruker), sob fonte de ionização por *electrospray* (método ESI/MS), sob os modos de ionização positivo e negativo.

Duas metodologias foram utilizadas com esta técnica: a injeção direta e a LC-MS. Na primeira, amostras advindas da reação analisada em coluna Pack Diol 60 foram aplicadas em uma coluna C4 (YMC-C4-AMP (Waters), 5 μ m, 4,6 x 250 mm) e eluídas com 5 % metanol, sob fluxo de 0,5 mL/min e detecção em 205 nm e 220 nm. As frações desta coluna foram aplicadas no MS por injeção direta. Para o LC-MS a reação de CEAS1 foi preparada como descrita anteriormente e 50 μ L da amostra foi aplicada nas colunas: C18 (*Symetry 300* (Waters), 3,5 μ m, 2,1 x 150 mm), C4 (YMC-C4-AMP (Waters), 5 μ m, 4,6 x 250 mm) e YMC-Pack Diol 60 (Waters) 5 μ m, 6,0 x 300 mm), acoplada em sistema HPLC (Waters) – *MicroTOF-QII* (Bruker). Para C18 e C4 foi utilizado o método descrito por Caines e colaboradores³⁴, sendo a eluição feita por método de gradiente de 5 % metanol e 0,05% ácido fórmico. Para Pack Diol 60, o eluente utilizado foi 100 mM acetato de amônio pH7,0 / acetonitrila (80/20). O fluxo utilizado foi de 0,2 mL/min e a detecção de comprimento de onda fixado para 205 nm e 220 nm. As cromatografias foram realizadas no equipamento HPLC Waters diretamente acoplado ao espectrômetro de massas.

Com o intuito de obter padrões de massa, uma amostra de ThDP e L-arg puros dissolvidos em 50 mM acetato de amônio pH6,0 também foram aplicadas no espectrômetro por injeção direta.

3.2.13.4 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

A técnica de ITC foi realizada em colaboração com a Dr^a Juliana Cheleski do Grupo de Biofísica Molecular (IFSC-USP).

As principais aplicações da ITC são no estudo de interações não-covalentes entre cadeias poliméricas, equilíbrios de dissociação de aminoácidos em diferentes estados de protonação, estudos termodinâmicos de detergentes e a formação de micelas, interações entre macromoléculas e ligantes e estudos cinético enzimáticos.⁶⁵

Este método consiste na adição do titulante, através de uma micro-pipeta automática, sobre o titulado que se encontra em uma célula de amostra. Em um experimento típico de

cinética enzimática, a enzima é colocada na célula de amostra e titulada com o substrato. A maioria dos calorímetros mede os efeitos diferenciais do calor entre a cela de referência e a cela de amostra, baseado no sistema de compensação de calor.⁶⁶

O princípio geral na técnica de ITC é a medição do fluxo de calor associado a uma dada reação química. Como praticamente todas as reações envolvem liberação ou absorção de calor, a atividade enzimática pode ser monitorada em tempo real sem a necessidade de sondas, substratos análogos ou reação acoplada sendo útil principalmente naqueles sistemas onde não existe um método direto para obter informações sobre a velocidade.⁶⁶

A técnica de ITC tem sido aplicada para monitorar quantitativamente as reações enzimáticas pela obtenção das constantes cinéticas de uma enzima e da entalpia molar aparente (ΔH_{app}) de uma reação catalítica, já que a mudança de calor no decorrer da catálise é proporcional a velocidade da reação⁶⁷.

Através da ITC é possível acompanhar a velocidade de reação em sistemas enzimáticos.^{65-66,68-69} Todd e Gomez⁶⁶ demonstraram que a quantidade de energia ou potência térmica (E) produzida pela reação é proporcional ao calor (Q) trocado pelo sistema em função do tempo (dt), seja exotérmico ou endotérmico:

$$Potência = \frac{dQ}{dt} \quad (1)$$

A quantidade de calor envolvida na conversão de n moles de substrato em produto é dada por:

$$Q = n \cdot \Delta H_{app} = [P]_{total} \cdot V \cdot \Delta H_{app} \quad (2)$$

onde ΔH_{app} é a entalpia molar total da reação (determinada experimentalmente), P é a concentração do produto gerado e V é o volume da solução da reação (o volume da cela). Assim, medindo-se a potência térmica gerada por uma enzima na conversão do substrato tem-se a medida da velocidade da reação, pois:

$$Potência = \frac{dQ}{dt} = \frac{d[P]}{dt} \cdot V \cdot \Delta H_{app} \quad (3)$$

onde $d[P]/dt$ é igual a taxa de formação do produto, isto é a velocidade da reação:

$$Velocidade = \frac{1}{V \cdot \Delta H_{app}} \cdot \frac{dQ}{dt} \quad (4)$$

Assim, para determinarmos a velocidade de uma catálise enzimática devemos obter 2 parâmetros: (1) a variação de calor medida no tempo (dQ/dt) e (2) a entalpia molar total (ΔH_{app}), que é determinada experimentalmente utilizando-se na cela uma quantidade de enzima suficiente para converter todo o substrato injetado em produto, em um dado período

de tempo. Esse experimento origina picos onde a resposta da linha de base após a injeção de substrato retorna ao mesmo encontrado antes da injeção (Figura 6). O calor total então é obtido integrando-se a área sob a curva (termograma). Dividindo-se esse calor total pela quantidade de substrato convertido, teremos a entalpia molar total.

Figura 6 - Exemplo de um perfil de ITC para a reação catalisada pela diidroorotato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*. A cela do calorímetro foi preenchida com uma solução contendo a enzima (300 nM) e o substrato fumarato (1,6 mM). A seringa foi preenchida com o segundo substrato (orotato) sendo 10 μ l deste substrato (3 mM) injetado, como indicado pela seta. A potência em função do tempo foi medida pela completa conversão do substrato orotato em produto para se obter o valor de ΔH da reação. A curva azul representa o calor de diluição do substrato (na ausência da enzima) sob as mesmas condições feitas para a determinação do calor da reação (curva em preto). Integrando-se a área sob a curva obtem-se o calor da reação o qual é dividido pela quantidade de substrato convertido para se determinar a entalpia molar total.⁶⁸

As relações mostradas nas equações acima permitem que os parâmetros cinéticos, a velocidade máxima ($V_{\max}$), a constante catalítica aparente (k_{cat}) e a constante de Michaelis (K_m) sejam determinadas a partir de um único experimento de ITC.

No intuito de analisar o calor da reação de CEAS1 e PAH1 inicialmente foram realizados ensaios para se determinar calorimetricamente a entalpia da reação (ΔH_{app}). As medidas foram realizadas em microcalorímetro VP-ITC (*Microcal*).

O equipamento foi lavado previamente à realização das medidas e uma titulação teste de água em água foi feita a fim de se verificar a presença de possíveis contaminantes na cela ou na seringa. Tomou-se o cuidado de diluir tanto a enzima quanto os outros reagentes da reação numa mesma solução tampão. Todas elas foram desgaseificadas previamente por 10 a 20 min através da bomba de vácuo contida no aparelho *Thermo Vac*, para evitar a formação

de bolhas de ar durante as medidas. A cela de referência foi preenchida com água destilada desgasificada.

Os parâmetros experimentais foram ajustados no programa de controle do VP-ITC segundo os dados: temperatura: 25°C, agitação: 300 rpm, tempo de pré-titulação: 60 s, referência: 15 μ cal/s.

As entalpias molares aparentes (ΔH_{app}) foram determinadas a partir do experimento de injeção única. Nestes experimentos 15 μ L de substrato (5 mM nos experimentos com CEAS1 e 10 mM nos experimentos com PAH1) foram injetados (duração de 30s) na cela, seguida da coleta de dados até garantir o retorno da potência térmica a linha de base inicial (20-30 min), ou seja até que o substrato fosse completamente consumido.

Nos experimentos com CEAS1 (amostra sem e com cauda de His) foi utilizado o tampão 50 mM hepes, 150 mM NaCl, 1mM β -mercaptoetanol (β -ME), pH 8,0. Para os experimentos com PAH1 (amostra sem e com cauda de His) foi utilizado o tampão 50 mM borato sódio, 50 mM NaCl, pH 9,0. A cela foi preenchida com 300 nM da enzima e seu correspondente cofator (1,5 mM de $MgCl_2$ e 1,5 mM ThDP no caso de CEAS1 e 450 nM de $MnCl_2$ no caso de PAH1) e a seringa foi preenchida com 5 mM de D-L-G3P ou 45,5 mM de L-arginina (no caso de CEAS1), ou 10 mM de N-AA (no caso de PAH1). Além destas concentrações foram testadas várias outras concentrações de enzima (na faixa de 100 nM a 10 μ M) e de substratos (de 1 a 10 mM), sempre mantendo a concentração de substrato na seringa em excesso em relação a enzima, na cela. Como a reação enzimática de CEAS é dependente de dois substratos, o ensaio foi feito usando excesso de um dos substratos na cela e titulando-se o outro (condição de pseudo primeira ordem). Para CEAS1 foi mantida a concentração de 1,5 mM de cofatores ($MgCl_2$ e ThDP) na cela e, para PAH1 foi mantida a relação de 1,5x mais cofator ($MnCl_2$) que enzima na cela.

No experimento para se determinar a entalpia da formação do(s) intermediário(s) da reação de CEAS1 também foram titulados 15 μ L de D-L-G3P (5mM) na cela contendo 300 nM de enzima e 1,5mM cofatores.

Os experimentos foram realizados em duplicatas e medidas para se determinar o calor de diluição de cada substrato foram realizadas preenchendo a cela com tampão e a seringa com o substrato nas mesmas condições feitas para a reação. Esse calor de diluição foi subtraído do calor da reação para análise dos dados.

Após a coleta de dados o *software* do ITC (Origin 7.0) automaticamente analisou os dados. O ΔH_{app} foi determinado pela integração da área sob a curva dividida pela quantidade de substrato consumido:

$$\Delta H = \frac{\int_0^t P dt}{[S]_{t=0} V} \quad (5)$$

Onde $[S]_{t=0}$ é a concentração de substrato inicial.

3.2.14 Calorimetria de titulação isotérmica no estudo de interação ligante -proteína

Os estudos termodinâmicos de um sistema biológico levam em conta o equilíbrio do processo de reconhecimento molecular e de estabilidade macromolecular, que revelam a natureza das forças energéticas que dirigem a formação do complexo ou a manutenção da estrutura tridimensional.⁷⁰

Em um experimento típico, o calor liberado pela interação proteína/proteína ou proteína/pequena molécula, permite a medida direta de parâmetros termodinâmicos (ΔS e ΔH) e constantes de afinidade. A determinação da energia livre (ΔG) de um processo, a uma dada temperatura, pode ser calculada usando a relação termodinâmica mostrada na equação (6):

$$\Delta G = -RT \ln K_a \quad (6)$$

onde T é a temperatura absoluta em Kelvin e R (8,31 J/mol.K) é a constante dos gases. K_a é o recíproco da constante de equilíbrio de dissociação (K_d), $K_a = 1/ K_d$.

Medindo-se a entalpia (ΔH) é possível quantificar as exatas contribuições entálpica e entrópica (ΔS) para a energia livre total usando a equação (7);

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (7)$$

Um entendimento detalhado da interação entre macromolécula e ligante pode ser obtido pela análise dessas diferentes contribuições energéticas para a energia livre total, relacionando isso com a estrutura/função da proteína.

A técnica de ITC foi utilizada no intuito de se determinar os parâmetros termodinâmicos da ligação do cofator com CEAS1. Essa técnica foi realizada em colaboração com a Dr^a Juliana Cheleski do Grupo de Biofísica Molecular (IFSC-USP).

Os experimentos foram realizados em microcalorímetro VP-ITC (*Microcal*). A cela de referência foi preenchida com água Milli Q e a cela da amostra (1,417mL) foi preenchida com

10 μM CEAS1 (construção pET SUMO). Para cada ensaio de ligação a seringa foi preenchida com 0,8 mM MgCl_2 em 50 mM Hepes pH 8,0, 300 mM NaCl, 1 mM β -mercaptoetanol. As isotermas de ligação foram medidas por titulação direta, isto é, ligante na proteína. CEAS1 foi primeiramente dialisada contra 50 mM Hepes, 300 mM NaCl, 1 mM β -mercaptoetanol, pH 8,0 contendo 5 mM EDTA e depois foi dialisada contra o mesmo tampão sem EDTA. Esse tampão foi usado no preparo da solução de ligante e na diluição da proteína para o ensaio. O experimento foi conduzido a 25°C, com velocidade de agitação de 300 rpm, modo de resposta alto, equilíbrio rápida e automática. A primeira injeção de 2 μL , a qual foi descartada para a análise dos dados, foi seguida por 39 injeções de 5 μL cada em intervalos de 150 s. Titulações controles (ligante em tampão) foram realizadas para subtrair o calor de diluição dos experimentos para análise dos dados. Os dados, depois da integração dos picos da isoterma, gerados pelo ITC, foram subtraídos dos dados da titulação controle e a concentração foi normalizada (calor normalizado para razão molar). O ajuste não linear dos dados foi feito em modelos de “sítios idênticos e independentes” (*One set of sites*), pelo programa *Origin* (versão 7, *Origin Lab*, integrado ao *software* do calorímetro). Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados obtidos são a média da triplicata.

3.2.15 Cristalização de proteínas

A fim de estudar a estrutura tridimensional das proteínas CEAS1 e PAH1 ensaios de cristalização foram realizados. A partir de amostras com alto grau de pureza e concentradas em algumas miligramas/mL de CEAS1 e PAH1 foram realizados os ensaios de cristalização. Eles foram realizados utilizando a metodologia de difusão de vapor em gota suspensa⁷¹. Uma gota contendo a proteína em solução e um volume igual da solução precipitante foi depositada sobre uma lamínula siliconizada, a qual foi invertida e selada com graxa de vácuo sobre a solução do reservatório (poço). O sistema fechado atingiu o equilíbrio pela difusão da água da gota para o reservatório. O estado de supersaturação é assim atingido, podendo levar à cristalização da macromolécula. A observação dos cristais foi monitorada através de lupa.

Para os ensaios preliminares de cristalização foram utilizadas soluções do tipo Fatorial, obtidas comercialmente. Conforme ocorre a formação de cristais, as condições da solução de cristalização são modificadas: quantidade de sal, pH do tampão, concentração do

agente precipitante. Foi utilizado 1 μL de uma solução de proteína (concentrada de 3,5 a 10 mg/mL) misturado com uma gota de 1 μL da solução de cristalização (cada uma do Fatorial), sob uma lamínula. Em cada reservatório foram colocados 1000 μL da solução de cristalização correspondente. Os experimentos foram realizados à 18°C.

Os cristais resultantes dos ensaios foram testados no difratômetro de raios X do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) – Campinas/SP, com a colaboração do Dr. Humberto D'Muniz Pereira (Grupo de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos-USP)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Clonagem dos genes de interesse

Com o objetivo de obter as proteínas codificadas pelos genes *ceas1*, *bls1*, *pah1* e pela *orf12*, os DNAs de interesse foram amplificados e subclonados em vetores de expressão para posterior expressão em células de *E.coli*. A etapa inicial do trabalho foi proposta dentro do projeto de pós-doutoramento do Dr. Leandro S. Goto.

A partir do DNA genômico de *S. clavuligerus*, extraído de uma cultura da linhagem ATCC 27064, os genes *ceas1*, *bls1* e *pah1* e a *orf12* foram isolados pela técnica de PCR. A figura 7 mostra os resultados da extração do DNA genômico de *S. clavuligerus* e dos produtos de PCR, quando analisados após eletroforese em gel de agarose 0,8%. O DNA genômico apresentou-se íntegro, sendo visualizado majoritariamente acima de 10 kpb (Figura 7A). Os genes amplificados a partir do DNA genômico apresentaram bandas eletroforéticas de tamanhos esperados: *bls1* (1581 pb), *ceas1* (1665 pb), *pah1* (1050 pb) e *orf12* (1374 pb) (fig. 7B e C).

Os produtos de PCR obtidos foram purificados em gel de agarose e utilizados na ligação com os plasmídeos de clonagem pTZ57R/T, pGEM-Teasy ou pCR2.1. A presença dos respectivos insertos nos vetores foi confirmada por análise de restrição. Os clones positivos foram submetidos ao sequenciamento de DNA e as sequências confirmaram a identidade com os dados depositados no *GenBank* (códigos de acesso AY426768 e AY258009).

Com o propósito de subclonar esses genes em vetores de expressão, estes foram liberados do plasmídeo de clonagem por digestão com as endonucleases de restrição adequadas e então inseridos nos plasmídeos de expressão: pET29b, pET TEV ou pET SUMO. A confirmação da subclonagem nesses vetores foi realizada por análise de restrição dos clones. Na Figura 8 são mostrados dois exemplos de análise de restrição de um clone positivo, no caso *pah1* subclonado no vetor pET29b, e de clones positivo e negativo, no caso de *bls1* subclonado em pET SUMO. Análises equivalentes foram realizadas para a confirmação das etapas de subclonagens de todos os genes propostos.

Figura 7 - Análise eletroforética do DNA genômico de *S. clavuligerus* e dos produtos de PCR. Aliquotas (3 μ l) do DNA genômico de *S. clavuligerus* e dos produtos de amplificação por PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo e transiluminado sob luz ultravioleta. (M) Padrão de massa molecular *Gene Ruler*™ 1 Kb DNA Ladder (Fermentas). (A) DNA genômico. (B) produtos de amplificação por PCR: 1) *bls1* (1581 pb), 2) *ceas1* (1665 pb) e 3) *pah1* (1050 pb). (C) produtos de amplificação por PCR: 1) *bls1*, 2) controle negativo, 3) *orf12* (1374 pb) e 4) controle negativo da amplificação (água ao invés de DNA).

Figura 8 - Análise eletroforética para confirmação da subclonagem por restrição do DNA plasmidial. (M) Padrão de massa molecular. (A) 1) DNA plasmidial (pET29b_*pah1*), 2) digestão desse DNA plasmidial com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*. (B) Digestão de DNA plasmidial pETSUMO_*bls1*: 1) clone positivo, 2) clone negativo. Vetor pET29b possui tamanho aproximado de 5300 pb, enquanto pET SUMO, de 6000 pb. O gene *pah1* apresenta 1064 pb e *bls1*, 1676 pb.

4.2 Expressão heteróloga em células *E.coli* e teste de solubilidade das proteínas

As construções dos genes de interesse subclonados nos vetores pET TEV , pET29b e pET SUMO foram denominados: *ceas1_pETTEV*, *ceas1_pET29b*, *ceas1_pET SUMO*, *bls1_pETTEV*, *bls1_pET29b*, *bls1_pET SUMO*, *pah1_pETTEV*, *pah1_pET29b*, *pah1_pET SUMO*, e *orf12_pETTEV*. Cada um desses plasmídeos foi utilizado para transformar células *E. coli* Rosetta (DE3) as quais foram cultivadas em meio LB para expressão das proteínas de interesse. Alíquotas das células coletadas antes e após a indução da expressão foram analisadas em SDS-PAGE (fig. 9).

A análise da expressão das proteínas recombinantes mostrou que os genes *ceas1* e *pah1* (construções em pET TEV, pET29b e pET SUMO) e *orf12* (construção em pET TEV) foram expressos em células *E.coli* Rosetta (DE3) induzidas com 0,1mM IPTG, a 18°C por 16 h a 18h. Um teste com um menor tempo de indução (6,5h) também foi feito conforme apresentado na figura 9.

Para o gene *bls1* foram realizados testes de expressão com as construções *bls1_pET8TEV* e *bls1_pET29b* em células *E.coli* BL21 (DE3) induzidas com 2 mM IPTG a 37°C por 6h, havendo pequena produção de proteína recombinante, sendo que a maior parte dela se encontrava na porção insolúvel (fig. 9C). Outros testes de indução foram realizados abaixando-se a temperatura de expressão para 20°C e para 18°C, reduzindo-se a quantidade de IPTG para 0,2 mM tanto em células *E.coli* BL21 (DE3) quanto da linhagem Rosetta (DE3). Porém, o resultado foi o mesmo. Também foram testadas as linhagens Origami (DE3) e ER2566 induzidas com variadas concentrações de IPTG, à 18°C e à 37°C. Entretanto, em todos os casos, a proteína foi produzida de forma insolúvel. Finalmente testes de expressão do gene *bls1* na construção em pET SUMO em células Rosetta (DE3) também mostraram que a proteína é expressa, mas ainda na forma insolúvel (fig. 9D).

Pela análise em SDS-PAGE (fig. 9), notam-se as bandas relativas as massas das proteínas codificadas: CEAS1 apresentando aproximadamente 61 kDa, PAH1, 39 kDa, e BLS1, 57 kDa. Nestas massas já estão considerados os 2 kDa adicionais referente a cauda de histidinas na porção N-terminal das proteínas recombinantes. Pela análise da Figura 9D notam-se as bandas relativas a 72 kDa para CEAS1, 69 kDa para BLS1 e 50 kDa para PAH1.

Estes valores são referentes às massas das proteínas de fusão (proteínas de interesse acrescidas da proteína carreadora SUMO e da cauda de His). Os dados das massas foram obtidos a partir da submissão das estruturas primárias ao programa *ProtParam* que além desses dados, calcularam o pI teórico e o coeficiente de extinção molar das proteínas recombinantes (tab. 4).

Figura 9 - Expressão de *ceas1*, *pah1* e *bls1* em células *E. coli*. SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie. M, marcador de massa molecular. (A) **Expressão de *ceas1***. Proteínas totais de *E. coli* Rosetta (DE3)*ceas1*_pET29b (1) antes da indução com IPTG, (2) após 6,5h de indução com IPTG à 18°C. (B) **Expressão de *ceas1* e de *pah1***. Proteínas totais de *E. coli* Rosetta (DE3)*ceas1*_pET28aTEV (1) antes da indução com IPTG, (2) após 16h de indução com IPTG à 18°C; Proteínas totais de *E. coli* Rosetta (DE3)*pah1*_pET28aTEV (3) antes da indução com IPTG, (4) após 16h de indução com IPTG à 18°C. (C) **Expressão de *bls1*** em células *E. coli* BL21(DE3) a 37°C. Proteínas totais de BL21(DE3)*bls1*_pET29b (1) antes da indução com IPTG, (2) após 6h de indução com IPTG; (3) fração solúvel após sonicação e centrifugação das células, (4) fração insolúvel, (5) proteínas totais de BL21(DE3)*bls1*_pET28aTEV antes da indução com IPTG, e (6) após 6h de indução, (7) fração solúvel, e (8) fração insolúvel. (D) **Expressão de *ceas1*, *bls1* e *pah1***. Proteínas totais de Rosetta (DE3)*ceas1*_pETSUMO, Rosetta(DE3)*bls1*_pETSUMO e Rosetta(DE3)*pah1*_pETSUMO: (T₀) antes da indução e (T_{18h}) após indução com IPTG por 18h, à 18°C.

Tabela 4 - Parâmetros teóricos das proteínas recombinantes nas diferentes construções. Coeficientes de extinção molares ($M^{-1} cm^{-1}$) teóricos em λ de 280 nm e absorvância correspondente, equivalente a uma solução 1mg/mL.

Proteína	Construção	Massa Molecular (kDa)	Ponto Isoelétrico teórico	Coeficiente de extinção molar em 280nm ($M^{-1} cm^{-1}$)*	Abs _{280 nm} 0,1% (=1 g/l)
CEAS1-His	pET TEV	61,25	5,0	33350	0,544
CEAS1	pET 29b	59,13	4,8	31860	0,539
CEAS1-His	pET Sumo	72,77	5,1	33350	0,458
CEAS1	pET Sumo	59,13	4,8	31860	0,539
PAH1-His	pET TEV	39,22	5,6	28880	0,736
PAH1	pET 29b	37,14	5,2	27390	0,737
PAH1-His	pET Sumo	50,93	5,5	28880	0,567
PAH1	pET Sumo	37,14	5,2	27390	0,737
Orf12-His	pET TEV	52,13	5,7	68410	1,315
BLS1-His	pET TEV	57,21	6,9	73910	1,292
BLS1	pET 29b	55,40	6,7	72420	1,307
BLS1-His	pET Sumo	69,10	6,4	73910	1,070
BLS1	pET Sumo	55,40	6,7	72420	1,307

(*) assumindo todos resíduos de cisteína reduzidos, não participando de pontes dissulfeto.

As células que expressaram os genes de interesse foram então coletadas por centrifugação, lisadas e tiveram seus conteúdos solúveis e insolúveis analisados em SDS-PAGE. As proteínas recombinantes PAH1, CEAS1 e ORF12 em todas as construções, mostraram-se presentes em ambas as frações, solúvel e insolúvel. Na figura 10 é mostrado o SDS-PAGE da análise da solubilidade de PAH1 e BLS1 (construção em pET SUMO). Por BLS1 apresentar-se insolúvel, a caracterização desta proteína se tornou inviável. A partir daí, a porção solúvel das frações de CEAS1, PAH1 e ORF12 foram utilizadas para fins de purificação das proteínas.

Figura 10 - Análise de solubilidade das proteínas PAH1 e BLS1. SDS-PAGE 15% corado com azul de Comassie. M, marcador de massa molecular. Células **Rosetta(DE3)pah1_pETSUMO** lisadas e centrifugadas: (1) fração solúvel e (2) fração insolúvel. Células **Rosetta(DE3)bls1_pETSUMO** lisadas e centrifugadas: (3) fração solúvel e (4) fração insolúvel.

4.3 Purificação das proteínas recombinantes

O vetor de expressão inicialmente escolhido foi o pET TEV por expressar a proteína de interesse fusionada a uma cauda de 6xHis, facilitando a purificação da proteína recombinante. Visando eliminar qualquer interferência da cauda de His na atividade das enzimas do estudo, optamos também em trabalhar noutras construções. O vetor pET 29b foi escolhido por garantir uma boa expressão da proteína de interesse, sem qualquer cauda adicional. Porém, dado o baixo rendimento final da proteína pura e trabalhoso protocolo de purificação, mais um vetor alternativo foi utilizado: o pET SUMO. Este vetor mostrou-se o mais conveniente para o trabalho em termos de rendimento e facilidade de purificação, já que une as vantagens da cauda de His à SUMO além da facilidade de clivagem com a SUMO protease.

4.3.1 Sistemas de expressão pET TEV e pET SUMO

As proteínas CEAS1, PAH1 e ORF12 expressas de forma solúvel e fusionadas a cauda de histidinas (construções em pET TEV e pET SUMO) foram purificadas com sucesso utilizando-se a cromatografia de afinidade em coluna de níquel (Figuras 11, 12 e 13), apresentando massas de acordo com o previsto. PAH1-His começou a ser eluída com 75 mM de imidazol (pET TEV) e 40 mM de imidazol (pET SUMO), enquanto CEAS1-His eluiu com 25 mM imidazol (pET TEV) ou com maior pureza com 50mM imidazol quando na construção em pET SUMO. Já a ORF12 foi eluída a partir de 10 mM imidazol. As amostras com maior grau de pureza foram reunidas, dialisadas contra tampão apropriado e concentradas para realização de experimentos de caracterização.

Figura 11 - Análise da purificação de PAH1-His em resina Ni-NTA visualizada em SDS-PAGE 15%. M, marcador de massa molecular. À esquerda, purificação do extrato solúvel de células Rosetta(DE3)pah1_pET TEV: (1) eluato da resina, (2) lavagem da resina com tampão, lavagens da resina com: (3) 25mM, (4) 50mM, (5) 75mM, (6) 100mM, (7) 150mM, (8) 250mM e (9) 500mM de imidazol. À direita, purificação do extrato solúvel de células Rosetta(DE3)pah1_pET Sumo: (1) fração solúvel após sonicação e centrifugação das células, (2) fração insolúvel, (3) eluato da resina; lavagens da resina com: (4) 40mM, (5) 50mM, (6) 75mM e (7) 500mM de imidazol.

Figura 12 - Purificação de CEAS1-His (construções em pET TEV e pET SUMO) em resina Ni-NTA. SDS- PAGE 15% corado com azul de Coomassie. M, marcador de massa molecular. À esquerda: (1) fração insolúvel após sonicação e centrifugação das células Rosetta(DE3)ceas1_pET TEV induzidas, (2) fração solúvel após sonicação e centrifugação das células induzidas, (3) eluato da resina; lavagens da resina com: (4) 5mM, (5) 25mM, (6) 50mM, (7) 75mM, (8) 100mM e (9) 250mM de imidazol. À direita: (1) fração solúvel após sonicação e centrifugação das células Rosetta(DE3)ceas1_pET SUMO induzidas, (2) fração insolúvel; lavagem da resina com imidazol: (3) 30mM, (4) 50mM, (5) 100mM, (6) 500mM e (7) eluato da resina.

Figura 13 - Purificação de ORF12-His (construções em pET TEV) em resina Ni-NTA. SDS-PAGE 15% corado com azul de Comassie. M, marcador de massa molecular. À esquerda: (1) fração solúvel após sonicação e centrifugação das células Rosetta(DE3)orf12_pET TEV induzidas, (2) fração insolúvel, (3) eluato da resina; lavagens da resina com: (4) 5mM, (5) 10mM, (6) 20mM, (7) 50mM, (8) 100mM e (9) 250mM de imidazol.

4.3.1.1 Clivagem da proteína de fusão com SUMO

As amostras com maior grau de pureza eluídas da Ni-NTA foram reunidas, dialisadas contra tampão de purificação e testadas com SUMO protease (ULP-1) para retirada da proteína SUMO no N-terminal. Como mostrado na Figura 14, PAH1-His-Sumo e CEAS1-His-Sumo foram totalmente clivadas após 3h de incubação com SUMO protease ULP-1. Assim, pode-se observar a redução da massa molecular de PAH1 de 50 kDa para 37 kDa e de CEAS1 de 72 kDa para 59 kDa (fig. 14 – canaletas 1 e 2, 6 e 7 do gel), além da banda de aproximadamente 13 kDa (fig. 14 – canaleta 2 e 7 do gel) referente à proteína carreadora SUMO + His tag. Essa amostra clivada foi recromatografada na coluna de afinidade (Ni-NTA), confirmando a clivagem da cauda, já que as proteínas PAH1 e CEAS1 sem cauda não mais interagiram com a resina (fig. 14 - canaletas 3 e 4, 8 e 9 do gel).

Figura 14 - Análise da clivagem das proteínas de fusão de PAH1-His-SUMO e CEAS1-His-SUMO em resina Ni-NTA por SDS-PAGE 15%. M, marcador de massa molecular. (1) PAH1-His-SUMO, (2) após incubação com sumo protease, *overnight*, na geladeira, (3) eluato da resina, (4) lavagem da resina com tampão (20 mM tris, 100 mM NaCl, pH8,0), (5) lavagem da resina com 500 mM imidazol em tampão, (6) CEAS1-His-SUMO, (7) após incubação com sumo protease, *overnight*, na geladeira, (8) eluato da resina e (9) lavagem da resina com tampão (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM β-ME, pH8,0).

4.3.2 Purificação das proteínas sem *tag* (construções no pET29b)

Resumidamente, a estratégia utilizada para purificar CEAS1 e PAH1 sem cauda, no sistema de expressão pET29b se deu em 2 passos: precipitação por sulfato de amônio (com 40% NH₄SO₄ as proteínas começam a precipitar) seguida pela cromatografia de troca iônica ou pela cromatografia de interação hidrofóbica (testadas em várias condições de tampões e gradientes de eluição). Na cromatografia de troca iônica percebemos que as proteínas começaram a eluir a partir de 200 mM sal e não mostraram um pico de eluição definido, sugerindo que a amostra estivesse interagindo com a resina ou que existissem várias conformações na proteína interagindo com diferentes graus de forças eletrostáticas. Na cromatografia de interação hidrofóbica, tanto CEAS1 quanto PAH1 foram eluídas no final da corrida (com 0% de NH₄SO₄) mostrando que elas são fortemente hidrofóbicas. No entanto, notou-se que as proteínas eram eluídas ainda junto com contaminantes. Particularmente, em relação a eluição de CEAS1, comparando os resultados desta cromatografia na presença ou ausência de DTT, na presença do agente redutor a proteína começava a eluir com 130 mM de NH₄SO₄, sendo que sem DTT eluia mais tardiamente, após o final do gradiente de NH₄SO₄. Assim, pudemos notar que a cromatografia de troca iônica apresenta um melhor resultado que

a de interação hidrofóbica, em relação a pureza da proteína eluída. Dado o baixo rendimento obtido e a presença ainda de contaminantes as proteínas provenientes dessas construções não foram utilizadas para os estudos.

4.4 Estudos bioquímicos e biofísicos da N^2 -(2-carboxietil) arginina sintase 1 (CEAS1)

Neste trabalho foi focada a análise da estrutura de CEAS1 e do mecanismo de ação desta enzima com base nos dados obtidos, comparando-os e relacionando-os com os dados já disponíveis da isoforma CEAS2. Para tanto, foi feito um alinhamento das estruturas primárias onde foi possível identificar os aminoácidos do sítio ativo, os de ligação aos cofatores e aos substratos e a porcentagem de identidade entre as isoformas. Em relação à estrutura secundária foi utilizada a técnica de CD para identificá-la e quantificá-la sendo os dados também comparados aos da isoforma 2, obtidos checando-se informações disponíveis no pdb (código PDB: 2UPA, 2IHV e 2IHU). Para as análises das estruturas terciária e quaternária foi estudada a oligomerização de CEAS1 por diversas técnicas, além da realização da modelagem estrutural por homologia. Ademais, foram realizados os primeiros estudos sobre a atividade de CEAS1 com os substratos putativos G3P e L-arginina, e sobre a afinidade dos cofatores a CEAS1.

4.4.1 Estrutura primária

Com a descoberta da existência dos genes parálogos *ceas1* e *ceas2* em *S.clavuligerus*³¹ foi identificada alta identidade sequencial de 73%. Por conseguinte a identidade entre as proteínas codificadas por tais genes, chamadas de CEAS1 e CEAS2, também se apresentou alta (66% de identidade na sequência de aminoácidos).

Uma vez que o estudo da proteína CEAS1 ainda não havia sido descrito até agora, demos início a um estudo comparativo de sua sequência de aminoácidos com as sequências depositadas no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Neste trabalho a sequência de aminoácidos de CEAS1 foi submetida ao *blastp* o qual retornou maiores identidades com proteínas de *Saccharomonospora viridis* DSM 43017, *Streptomyces antibioticus*, *Streptomyces flavogriseus* ATCC 33331 e *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 (Tabela 5). Tais proteínas têm em comum o fato de todas apresentarem o domínio de ligação ao ThDP.

Tabela 5 - Resultado do *blastp* realizado com a sequência de aminoácidos de CEAS1.

Proteína	Atributo da proteína	Organismo	% identidade sequencial
Proteína dependente de tiamina pirofosfato (possível carboligase ou descarboxilase)	¹ Deduzida por homologia	<i>Saccharomonospora viridis</i> DSM 43017	70
Carboxietilarginina sintase 3 (<i>ceas3</i>)	² Proteína predita	<i>Streptomyces antibioticus</i>	69
Proteína contendo domínio de ligação a tiamina pirofosfato	¹ Deduzida por homologia	<i>Streptomyces flavogriseus</i> ATCC 33331	70
Carboxietilarginina sintase 2 (CEAS2)	³ Evidência em nível protéico	<i>Streptomyces clavuligerus</i> ATCC 27064	68

¹ indica que a existência da proteína é provável por causa de ortólogos existentes nas espécies relacionadas

² não há evidências da proteína, de transcrito ou níveis de homologia.

³ evidências da existência da proteína a partir da estrutura cristalográfica.

Apesar das altas identidades (70%) apresentadas com prováveis proteínas dependentes de ThDP de duas espécies distintas, *Saccharomonospora viridis* e *Streptomyces flavogriseus*, não podemos afirmar que existam proteínas do tipo CEAS. Isso porque estas sequências foram deduzidas a partir do genoma destas espécies, ainda necessitando de comprovação da existência das proteínas e seu papel no organismo. Apesar de essas espécies serem representantes de actinomicetos produtores de metabólitos secundários, para nenhuma delas ainda foi comprovada a capacidade de produção de ácido clavulânico ou de clavamas 5S. Assim, estas proteínas podem estar relacionadas com outras vias, e talvez sejam enzimas dependentes de ThDP de família distinta de CEAS.

É interessante notar que *S. antibioticus* que apresenta uma cópia do gene *ceas* (denominado *ceas3*) apresente 69% de identidade com CEAS1 de *S. clavuligerus*. Esta espécie também possui uma via de síntese de clavamas, assim como *S. clavuligerus*, e as duas espécies possuem os genes iniciais dessa via de síntese comuns, ou seja, *ceas*, *bls*, *cas* e *pah*,

sendo 1 cópia de cada encontrada em *S. antibioticus* e 2 cópias em *S. clavuligerus*.⁷²⁻⁷³ Assim, a via de síntese de clavamas para as duas espécies é comum até ácido clavamínico, e, portanto *S. antibioticus* não é capaz de produzir ácido clavulânico, somente clavamas distintas das produzidas por *S. clavuligerus*. Por haver cópias de um gene em duas espécies diferentes, o *cluster* chamado de parálogos em *S. clavuligerus* atualmente seria mais corretamente chamado de *cluster* dos genes ortólogos.⁴⁹ Devido a essa identidade com um organismo que não produz ácido clavulânico e sim clavamas 5S sugere-se que CEAS1 esteja mais envolvida na produção de clavamas, como foi visto nos estudos de *knock-out* gênico.³⁰

Como já havido sido observado³⁰ CEAS1 apresenta 68% de identidade sequencial com CEAS2.

Levando-se em conta o grau de parentesco e por já haver estudos protéicos realizados, as proteínas CEAS1 e CEAS2 foram alinhadas e comparadas. Na Figura 15 tem-se o resultado do alinhamento estando identificados os 555 aminoácidos de CEAS1 e os 573 aminoácidos de CEAS2. Ambas apresentam três resíduos de triptofano conservados e três, das seis cisteínas CEAS2 são conservadas em CEAS1.

As carboxietilarginina sintases (CEAS) são classificadas como transferases (E.C. 2.5.1.66), mas ainda não possuem número E.C. Seu nome sistemático é gliceraldeído-3-fosfato:L-arginina *N*²-(2-hidroxi-3-oxopropil) transferase formadora de (2-carboxietil). CEAS transfere o grupo 2-hidroxi-3-oxo do D-G3P e o isomeriza para formar o grupo 2-carboxietil.

Elas são classificadas como proteínas dependentes de ThDP e possuem o motivo de ligação ThDP-Mg⁺² conservado (resíduos sublinhados na Figura 15), inclusive os resíduos GDG-X₂₆-NN (marcados em rosa-zul) essenciais na ligação aos cofatores. Em especial, o resíduo de Glu, que é o ativador de ThDP, se conserva nessas enzimas, o mesmo ocorrendo com os demais aminoácidos (marcados em rosa na Figura 15) constituintes do sítio ativo: em CEAS2, ⁵⁷E, ¹²¹Q, ⁴⁶²G, ⁴⁹⁰N e ⁴⁹⁴G e em CEAS1, ⁴⁸E, ¹¹²Q, ⁴⁴⁴G, ⁴⁷²N e ⁴⁷⁶G. Vários estudos já mostraram que a mutação neste resíduo de Glu elimina totalmente a atividade enzimática de enzimas ThDP-dependentes.⁷⁴

Em relação ao sítio de ligação aos substratos, Caines e colaboradores²³⁻³⁴ propuseram, por estudos cristalográficos de CEAS2, que os resíduos ³⁰¹Asp e ³⁰³Arg (indicados em amarelo) são importantes no reconhecimento de L-arg, e que os resíduos ²⁷¹Tyr e ⁴¹⁴Arg (marcados em verde) interajam com o substrato análogo não-reativo de L-arg, GVA, e ao mesmo tempo com o fosfato de D-G3P. Nota-se que todos os aminoácidos citados se

conservam em CEAS1. A partir dessa informação, sugere-se que no mecanismo de ação de CEAS, os dois substratos não possam ocupar o sítio ativo simultaneamente e propõe que D-G3P se ligue primeiro, seu fosfato seja liberado, para então seguir a ligação de L-arg, numa posição para reagir com um intermediário (mecanismo catalítico *ping pong*).

Análises no banco de dados TEED (*Thiamine diphosphate dependent Enzyme Engineering Database*),⁵⁷ que organiza e classifica as proteínas ThDP-dependentes com estruturas já resolvidas em 5 famílias (POX-piruvato oxidase ou DC-descarboxilase, TK-transcetolase, OR-oxidoreductase, K1 e K2), indicaram que CEAS2 pertence a família DC (descarboxilase). As proteínas desta família apresentam estrutura com três domínios de tamanhos similares: o domínio Pyr (região marcada pelos aminoácidos em verde na Figura 15) interage com o anel pirimidina do cofator, contém o resíduo Glu conservado essencial para a ativação de ThDP; o domínio PP (em preto na fig. 15) se liga a cauda do difosfato de ThDP, contém o motivo conservado GDG-X₂₅₋₃₀-NN que ancora ao ThDP via cauda difosfato e um íon metálico divalente coordenado; e o domínio do meio (em laranja na fig. 15) que interliga os dois domínios mencionados.⁷⁵ Levando em consideração que CEAS1 possui os mesmos aminoácidos que CEAS2 nos respectivos motivos de interação de ThDP e por sua alta identidade, consideramos que CEAS1 também se encaixe na família DC.

4.4.2 Estrutura secundária

4.4.2.1 Análises de dicroísmo circular de CEAS1

A caracterização das estruturas secundárias de CEAS1 foi feita com base num estudo de dicroísmo circular na região UV distante (250-190nm) em diversas condições. Este estudo foi feito pela análise da proteína recombinante com cauda de histidinas, CEAS1-His. A predição do tipo e quantidade de estruturas secundárias foi feita utilizando os programas ContinLL, SELCON3 e CDSSTR.^{56, 76}

O espectro obtido (fig. 16) foi caracterizado pela presença de dois mínimos negativos em torno de 222 nm e 208 nm e um máximo positivo em torno de 196 nm indicando uma

estrutura secundária contendo elementos do tipo α -hélice. Um achatamento na região de α -hélices entre as duas bandas negativas implica na existência de estruturas do tipo folha β também. Este perfil é típico para proteínas tipo α/β , o que era esperado para essa proteína, se levarmos em conta a semelhança com a isoforma CEAS2.

O cálculo das frações de estruturas secundárias das proteínas resultou em 29,9% de α -hélices, 18,2% de folhas- β , 30% de estruturas desordenadas e 21,9% de voltas. Os valores dos três programas variaram em torno de 1%. Os dados da desconvolução são consistentes com o fato do espectro de CD observado experimentalmente ser dominado por α -hélices, da mesma forma que foi observado para CEAS2 na estrutura cristalográfica (PDB: 2IHU) ²³. Os valores encontrados aqui são compatíveis com os valores da literatura para CEAS2 a qual apresenta em torno de 41% de α -hélices e 16% de folhas- β .

Figura 16 - Espectro de CD de CEAS1-His. A amostra (0,3 mg/mL) foi analisada à temperatura ambiente, em tampão 20 mM fosfato de sódio pH 8,0 com 10 mM NaCl, com uma média de 8 varreduras, numa cubeta de caminho óptico de 1 mm.

A influência da temperatura e do pH na conformação de CEAS1-His foi avaliada por dicroísmo circular conforme apresentado nas Figuras 17 e 18. Os dados em relação a temperatura (fig. 17) mostram que entre 10°C e 30°C a estrutura se mantém estável conservando os dois mínimos negativos, 208 nm e 220 nm (sendo o de 208 nm mais pronunciado) e uma banda positiva em torno de 196 nm. A partir de 40°C o espectro começa

a mudar. De 60°C a 100°C as bandas de 220 nm e de 196 nm desaparecem, havendo um deslocamento para região de 202 nm, típico de estrutura desordenada. Apesar disso, mesmo em temperaturas mais altas os espectros mostram que a proteína ainda não atinge o desenovelamento completo.

Figura 17 - Estabilidade térmica de CEAS1-His. Espectros de CD no UV distante da proteína recombinante CEAS1 incubada em diferentes temperaturas. Inseto: Fração de proteína desnaturada em relação à temperatura. Os valores de elipticidade em 220nm de cada espectro foram relacionados com a temperatura da medida e plotados num gráfico, cuja curva foi fitada com a equação de Boltzmann pelo programa *OriginPro8*. As amostras (0,3 mg/mL) de CEAS-His foram analisadas em tampão 20 mM fosfato de sódio pH 8,0 com 100 mM NaCl, com uma média de 8 varreduras, numa cubeta de caminho óptico de 1 mm, permanecendo 5 min em cada temperatura antes de se fazer a leitura.

Em relação à influência do pH (fig. 18) foi observado que na faixa de pH 3,5 a 4,5 a proteína precipita, pois essa é sua faixa de pI. Estes valores estão um pouco abaixo do pI teórico (tab. 4). Nos espectros obtidos nos demais pHs, mesmo nos mais ácidos, a proteína parece manter a mesma estrutura secundária, com os mínimos negativos (208 nm e 220 nm) e uma banda positiva (196 nm). Uma pequena alteração nos espectros é observada apenas nos pHs mais básicos (de 9,5 a 12) onde ocorre deslocamento das bandas negativas. No pH 12, em

especial, ocorre um deslocamento maior na região de 190 nm a 210 nm. Ainda assim, de modo geral pode-se considerar que CEAS1 seja estável numa ampla faixa de pH.

Figura 18 - Influência do pH sobre a estrutura secundária de CEAS1-His. Espectros de CD no UV distante de CEAS1-His (0,2 mg/mL) incubada em 25 mM tampão acetato-fosfato-borato por 30 min em cada pH, à temperatura ambiente, antes de se fazer a medida. Nos pHs 3,5, 4,0 e 4,5, referente a faixa de pI da proteína, houve precipitação.

De modo geral, os dados de CD sugerem que CEAS1 é relativamente estável numa ampla faixa de pHs e temperaturas. A conformação adotada por CEAS1 entre as temperaturas mais baixas (até aproximadamente 30°C) e numa ampla faixa de pH (de 5 a 10) parece ser a mais próxima da proteína nativa, visto que os genes da via de síntese do ácido clavulânico e das clavamas 5S em *S.clavuligerus* são expressos em temperatura de 28°C a 30°C e em pH 6,8 a 7,0 (condições de cultivo usado na produção do ácido clavulânico).^{43,77}

Dando continuidade ao estudo de estabilidade de CEAS1, essa foi avaliada também por CD sob condições desnaturantes. A figura 19 mostra o resultado dos espectros obtidos quando a proteína foi incubada com 0 a 6 M de uréia. O espectro típico de CEAS sem uréia é caracterizado pela presença de dois mínimos negativos em torno de 220 nm e 208 nm e um máximo positivo em torno de 196 nm. Conforme a concentração de uréia aumenta, nota-se que estes picos se deslocam até a perda total do espectro. Embora o processo de desnaturação não seja reversível, os dados obtidos sugerem um modelo de desnaturação de dois estados onde há basicamente duas populações distintas, moléculas nativas e moléculas desnaturadas,

sendo a concentração crítica de uréia, isto é, o ponto onde a proteína começa a perder estrutura, de 1,5M e a concentração de uréia média na qual metade das proteínas está estruturada e metade está desnaturada de 2,8 M.

Figura 19 - Desnaturação química de CEAS1-His analisada por CD. As amostras de CEAS1-His a 0,2 mg/mL foram incubadas em tampão 50 mM Tris-HCl, 100mM NaCl, pH 8,0, contendo diferentes concentrações de uréia (0 a 6M). As medidas foram feitas em cubeta de quartzo, de caminho óptico de 1 mm, com uma média de 8 varreduras (Largura da banda: 1nm, resposta: 0,5s, frequência dos dados: 0,2nm, velocidade de varredura: 100nm/min). Inserto: Fração de proteína desnaturada em relação à concentração de uréia (dados obtidos da elipticidade de cada espectro em 220nm).

4.4.3- Estruturas terciária e quaternária

4.4.3.1 Análises da oligomerização de CEAS1

Amostras da proteína CEAS1 foram analisadas pelas técnicas de eletroforese em gel nativo e cromatografia de exclusão molecular (SEC) a fim de caracterizar sua estrutura quaternária, de acordo com seu grau de oligomerização. Após serem purificadas, tanto

amostras de CEAS1-His quanto de CEAS1 sem cauda foram analisadas inicialmente em gel nativo. A Figura 19 mostra os resultados obtidos dessas amostras, onde se nota a presença de várias bandas. A massa molecular calculada do monômero de CEAS1-His foi de 61 kDa (construção em pET TEV) e de CEAS1 sem cauda foi de 59 kDa (tab. 4). Sendo assim, os valores de seus respectivos dímeros seriam 122 kDa e 118 kDa, dos trímeros, 177 kDa e 183 kDa, e dos tetrâmeros, 236 kDa e 244 kDa. A análise do gel (fig. 20) indicou que as amostras apresentam-se com diferentes formas oligoméricas, desde monômeros até tetrâmeros.

Figura 20 - Gel nativo de CEAS1-His e CEAS1. Amostras purificadas em coluna de afinidade Ni-NTA em (A) tampão 20 mM Tris, 10 mM NaCl, pH8,0 e (B) tampão 50 mM Hepes, 300 mM NaCl, pH8,0. (M) marcador de massa molecular, (1) amostra concentrada eluída de Ni-NTA.

Uma vez que amostras da proteína purificada apresentaram uma mistura de oligômeros, estas foram agora analisadas por cromatografia de exclusão molecular a fim de separar os oligômeros. Usando uma coluna *Superdex 200*, diversas condições tamponantes foram testadas para comparar o comportamento oligomérico da proteína. Foram testados: tampões Hepes, Tris-HCl e fosfato de sódio, pHs 8,0 e 7,4, quantidade de sal em concentração de 10 mM a 500 mM (NaCl), adição de 1 mM e 5 mM de agente redutor (DTT ou β -mercaptoetanol), adição de 10% de glicerol, adição do cofator $MgCl_2$, e adição de agente quelante (EDTA) nos tampões testados. A Figura 21A mostra o perfil cromatográfico de uma destas condições (em tampão 50 mM tris-HCl, 150 mM NaCl, pH8,0 com 10% glicerol e 5 mM β -mercaptoetanol), sendo a proteína eluída em um único pico, largo, entre 12 mL a 16 mL. Este perfil cromatográfico manteve o mesmo para todas as condições tamponantes testadas. Conforme é observado na Figura 21A, CEAS1 foi eluída em um volume equivalente

a uma massa molecular entre 440 kDa e 158 kDa, de acordo com os padrões cromatografados da mesma maneira que a amostra. A partir da construção da curva de calibração (inserida na fig. 21A) a massa molecular aparente da proteína calculada foi de 223,8 kDa, ou seja 3,8 vezes maior que a massa de um monômero (59 kDa), sugerindo tratar-se de tetrâmero. Porém, quando as frações foram analisadas em gel nativo (fig. 21B), notamos que apesar da eluição em pico único a amostra continua apresentando uma mistura de oligômeros compostos por dímeros, trímeros e tetrâmeros, sendo a porção de dímeros, aparentemente, em maior quantidade. Além disso, notamos que não é raro a presença de agregados solúveis eluídos nas primeiras frações da cromatografia (entre 7-10 mL).

Em relação as diferentes construções de CEAS1 (em pET TEV, em pET 29b ou em pET SUMO), todas elas mantiveram o mesmo perfil cromatográfico e comportamento em gel nativo, como apresentado.

Com esses resultados, podemos inferir que a amostra purificada por Ni-NTA apresenta heterogeneidade em termos conformacionais e que, por cromatografia de exclusão molecular estas formas não puderam ser fracionadas.

Figura 21 - Análise do grau de oligomerização de CEAS1-His. **(A) Cromatografia de exclusão molecular.** As frações eluídas de Ni-NTA (com 50 a 500mM imidazol) foram aplicadas numa coluna *Superdex 200* (condições: tampão 50mM Tris-HCl, 300mM NaCl, 10% glicerol, 5mM β -mercaptoetanol, pH 7,4; fluxo de 0,5mL/min, absorbância monitorada em 280 nm, frações coletadas de 1mL). Em destaque, eluição do imidazol no final da corrida. O volume de eluição da amostra foi comparado com o dos padrões de blue dextran, ferritina (440kDa), aldolase (158kDa), conalbumina (75kDa), ovalbumina (43kDa), anidrase carbônica (29kDa), ribonuclease (13,7kDa) e aprotinina (6,5kDa). **Inserto** – curva de calibração de proteínas padrões e localização de CEAS1 após o cálculo da massa molecular aparente. **(B) Gel de eletroforese em condição nativa.** As frações eluídas da SEC foram aplicadas num gel nativo 9%, (M) padrão de massa molecular.

Como CEAS1 possui características que a classifica numa enzima dependente de ThDP comparamos nossos dados com informações da literatura sobre a oligomerização destas proteínas. No geral, enzimas dependentes de ThDP apresentam-se como homotetrâmeros em solução e na estrutura cristalográfica como 2 dímeros fortemente unidos constituindo o

tetrâmero. O mesmo acontece com a isoforma CEAS2, a não ser em solução que além de tetrâmero, também se apresenta como dímero existindo em quantidades aproximadamente iguais²³. A conformação dimérica está estreitamente relacionada com a ligação do cofator a enzima e é requerida para sua atividade enzimática.⁷⁵ No caso de CEAS1, como exposto, em solução apresenta-se como monômeros, dímeros, trímeros e tetrâmeros, estando a porção de dímeros, aparentemente em maior quantidade, além da presença de agregados solúveis quando a proteína está em concentrações altas. Por conseguinte, sugere-se que as conformações da proteína em solução estejam num equilíbrio dinâmico entre as formas citadas, o que dificulta a separação.

4.4.3.2 Testes de Cristalização de CEAS1

Um dos intuitos do trabalho também foi obter a estrutura tridimensional de CEAS1. Para isso, inicialmente, foram realizados diversos testes de cristalização tanto com CEAS1-His quanto CEAS1 sem cauda de His, na presença ou não dos cofatores (Mg^{+2} e ThDP). Houve crescimento de alguns pequenos cristais em várias condições quando usadas as soluções Fatoriais: *PEG II Suite* (Qiagen), *Classics I Suite* (Qiagen), *Classics II Suite* (Qiagen), *Salt RX* (HR2-136) (Hampton Research) e *AmSO4* (Qiagen). As condições (Tabela 6) foram refinadas e os ensaios foram repetidos com as novas soluções e com a proteína numa concentração maior (de 4 a 10 mg/mL), obtendo-se também o crescimento de cristais melhores (Figura 22). Estes então foram coletados em soluções contendo glicerol e imediatamente congelados com N_2 líquido, para serem testados em difratômetro de raios X. Porém, apresentaram baixa qualidade para este fim, não se conseguindo obter um mapa de difração.

Tabela 6 - Condições de cristalização de CEAS1.

Fatorial	Nº da solução	Composição da solução de cristalização	Modificações feitas na solução inicial
<i>Classic II Suite</i>	Solução 59	100mM hepes pH 7,5 20mM MgCl ₂ 22%(p/v) poliacrilato de sódio 5100	pH: 7,3, 7,4, 7,6 e 7,7 poliacrilato de sódio 5100: 20%, 21%, 23% e 24%
	Solução 70	100mM bis-tris pH5,5 200mM NaCl 25% PEG 3350	pH: 5,8, 6,0, 6,2, 6,4 e 6,6 PEG: 20%, 22%, 24%
<i>Salt RX</i>	Solução 60	100mM bis-tris-propano pH7,0 1M ácido succínico pH7,0	pH: 6,5, 6,8, 7,3, 7,5, 8,0 ácido succínico: 0,8M e 1,2M

Figura 22 - Cristais de CEAS-His observados através de lupa. Condições de cristalização: (1), solução 59 modificada: pH 7,6 e precipitante: 21%, (2) solução 59 modificada: pH 7,3 e precipitante: 23%, (3) solução 59 modificada: pH 7,4 e precipitante: 24%, (4) solução 70 modificada: pH 6,6 e precipitante: 20%, (5) solução 70 modificada: pH 6,6 e precipitante: 22%.

4.4.3.3 Modelagem da estrutura de CEAS1

O recurso de modelagem de estrutura por homologia foi utilizado para estudar, em nível de estrutura terciária, as características comuns de CEAS1 com proteínas cujas estruturas tridimensionais já são conhecidas. Para a modelagem, a sequência de aminoácidos de CEAS1 foi submetida ao programa *Swiss-Model Workspace* o qual retornou os dados computados e a estrutura do modelo na extensão pdb.

A construção do modelo foi baseado no molde PDB 1upaA (referente a uma das cadeias de CEAS2). A modelagem foi feita do 4º até o 554º resíduo do modelo, mostrando

68,28 % de identidade sequencial entre molde e modelo. O modelo foi construído como uma cadeia única. O *QMEAN score* foi de 0,674 demonstrando confiabilidade ao modelo.

Considerando a avaliação do alinhamento das sequências de CEAS1 e CEAS2 (Figura 15) na região constituinte do motivo de ligação Mg-ThDP, junto com os dados da modelagem foi demonstrado que todos os resíduos que interagem com o ligante são completamente conservados entre o modelo e o molde. O RMSD (medida da distância média entre os Ca depois da sobreposição das proteínas) entre os resíduos de interação do modelo e do molde foi de 0,06, sendo o modelo considerado acurado. Assim, extrapolamos nossa discussão a respeito de comparação de estruturas em nível terciário.

Uma das características distintas entre as isoenzimas 1 e 2 está no número de cisteínas presentes em cada uma delas. Se compararmos a posição dos resíduos de Cys em cada isoforma (Figura 15) e analisarmos em que tipo de estrutura secundária este resíduo participa em CEAS2 (PDB2UPA), vemos que as Cys de CEAS2 participam de folha β (Cys-77), uma região de estrutura desordenada (Cys-122) e uma curva (Cys-435). A posição de 3 das 6 Cys de CEAS1 (Cys-68, Cys-113 e Cys-417) são equivalentes em CEAS2, portanto participam das mesmas estruturas, como mostrado na Figura 23. As outras 3 Cys de CEAS1 estão nas posições correspondentes a Ile-114, a Val-528 e a Ser-390 em CEAS2, as quais respectivamente participam de estruturas desordenadas e α -hélice. No modelo de CEAS1 estas cisteínas correspondem a Cys-105, Cys-378 e Cys-510 que respectivamente participam de estrutura desordenada, hélice e um *loop*. Analisando a formação tetramérica de CEAS2 (PDB2UPA) podemos notar que a Cys-122 e a Ile-114 estão posicionadas na interface dimérica. Em CEAS1 as correspondentes Cys-113 e Cys-105 estão expostas podendo facilitar a interação entre os monômeros para formar o dímero.

Figura 23 - Estrutura de CEAS1 construída a partir de modelagem por homologia. Está representado o monômero de CEAS1, destacando-se as posições dos 6 resíduos de cisteína na molécula: Cys-68, Cys-113 e Cys-417 (equivalentes em CEAS2) e Cys-105, Cys-378 e Cys-510.

Nessa interface das duas subunidades, associando o dímero, está a região de ligação ao ThDP/Mg⁺² (GDG-X₂₅₋₃₀-NN), conformação essencial para compor o sítio ativo nas enzimas dependentes de ThDP. Essa conformação leva a formação do complexo Mg⁺²-ThDP-CEAS.

Na Figura 24 está representada a posição dos resíduos importantes na ativação e ligação de ThDP. O resíduo Glu-48, essencial para a ativação de ThDP, interage com o anel pirimidina do cofator. O motivo conservado GDG-X₂₅₋₃₀-NN ancora ao ThDP via cauda difosfato que coordena o íon metálico divalente Mg⁺². Como em CEAS2 e outras enzimas dependentes de ThDP (ex: em piruvato-ferredoxina oxiredutase), o cofator se localiza num longo e estreito túnel na proteína, isto é, o sítio ativo não está exposto ao solvente, como acontece em enzimas de outras famílias como as TK e POX ⁷⁸. Essa conformação parece estar

relacionada com o tamanho do 2º substrato da reação, que no caso de CEAS contem um grupo alifático longo (arginina). De acordo com a posição dos aminoácidos em CEAS1, esta conformação também se mantém.

Figura 24 - Sítio ativo em CEAS1. Os resíduos de aminoácidos que compõem o sítio ativo estão representados em amarelo: ⁴⁸E, ¹¹²Q, ⁴⁴⁴G, ⁴⁷²N e ⁴⁷⁶G. Também estão indicados os resíduos que compõem o motivo de ligação ao ThDP/Mg⁺²: ⁴⁴⁴G⁴⁴⁵D⁴⁴⁶G----⁴⁷¹N⁴⁷²N.

A ligação ao cofator nas enzimas dependentes de ThDP ocorre por ligações de hidrogênio e interações de van der Waals, além de coordenar um íon Mg⁺². Frank e colaboradores⁷⁸⁻⁷⁹ sugerem que exista um canal de prótons ligando os dois sítios ativos, formado por resíduos de aminoácidos ácidos, permitindo que os cofatores tenham um papel de ácido/base na catálise. Por isso, explica-se a condição essencial de no mínimo dímero para as propriedades cinéticas características das enzimas dependentes de ThDP. No caso de CEAS2 e CEAS1 a configuração deste “túnel ácido” comunicando o dímero está presente.⁷⁸

4.4.3.4 Interação enzima-cofator

A fim de entender os processos biológicos mais completamente é necessário combinar a estrutura tridimensional com um entendimento da termodinâmica e da cinética do processo. Com esse intuito, a interação entre Mg^{+2} e CEAS1 foi estudada pela técnica de ITC somado-se aos dados estruturais de modelagem de CEAS1.

Os ensaios de ITC foram realizados em triplicata e conduzidos titulando-se Mg^{+2} em CEAS1. As curvas foram analisadas e os parâmetros termodinâmicos da interação tais como ΔG , ΔH e ΔS , a constante de ligação (K_a) da proteína com seu ligante e a estequiometria do sistema (n), foram obtidos.

A figura 26 mostra os dados brutos de saída dos experimentos de ITC (painel superior) e o ajuste não linear dos dados usando o modelo de “sítios idênticos e independentes” (painel inferior). Os parâmetros termodinâmicos que governam a interação, calculados a partir da curva de ITC, são mostrados na tabela 7.

O termograma (fig. 25) mostra que a interação de Mg^{+2} a CEAS1 é um processo endotérmico. A curva de ligação ajustada mostra que o processo possui entalpia e entropia positivas (tab. 7), é uma reação espontânea e entropicamente dirigida. Essa característica termodinâmica pode estar relacionada com o efeito hidrofóbico. As contribuições entrópicas favoráveis advêm da dessolvatação do ligante as quais superam as contribuições desfavoráveis da perda de mobilidade da proteína e do ligante no processo de interação.

O processo de interação entre Mg^{+2} e CEAS1 apresentou uma constante de afinidade na ordem de micro molar (K_d de $1,77 \cdot 10^{-6} M$) e uma estequiometria de 4:1, ou seja, há uma relação média de 4 ligantes por proteína. Isso faz sentido se levarmos em conta que CEAS1 apresenta-se como um tetrâmero, sendo que cada monômero tem somente um sítio de ligação ao cofator. Pudemos notar uma variação no valor de n (tab. 7) nos experimentos (triplicata). Esta variação em análises por ITC é esperada por vários fatores. Dentre eles está a variação do grau de enovelamento correto da proteína, o que resulta na efetiva atividade da mesma, e também a acurácia na determinação da concentração da proteína e do ligante. Esses são os fatores que mais interferem na reprodutibilidade dos dados de ITC. No caso de CEAS1 a presença de várias formas oligoméricas pode ter sido o fator principal da variação observada.

Figura 25 - Isotherma de ligação de Mg^{+2} a CEAS1, a 25°C. Titulação de $MgCl_2$ (0,8mM) em 10 μ M CEAS1 ambos em tampão 50mM hepes, 300mM NaCl, pH 8,0 com 1mM β -ME. Foram feitas 40 injeções de 5 μ L cada sendo a primeira injeção de 2 μ L descartada para análise dos dados. A área sob a curva de cada injeção foi integrada e plotada na curva de ligação. A entalpia por mol de Mg^{+2} injetado foi plotada versus a razão molar Mg^{+2} /CEAS1. A linha sólida representa o ajuste não linear dos mínimos quadrados do calor da reação por injeção. A análise dos dados pelo modelo de um sítio resultou na determinação da constante de associação e da entalpia e entropia de ligação.

Tabela 7 - Parâmetros termodinâmicos da ligação de magnésio em CEAS1, a 25°C.

Parâmetros	
n	$4,23 \pm 1,37$
K_a (M^{-1})	$5,75 \pm 0,74 \times 10^5$
K_d (M)	$1,76 \pm 0,23 \times 10^{-6}$
ΔH (kcal/mol)	$3,83 \pm 0,11$
ΔS (kcal/K.mol)	$0,039 \pm 0,60$
$T\Delta S$ (kcal/mol)	$11,69 \pm 0,19$
ΔG (kcal/mol)	$-7,86 \pm 0,08$

Estequiometria, n ; constante de associação, K_a ; constante de dissociação, K_d ; variação de entalpia molar, ΔH ; variação de entropia molar, ΔS ; variação de energia livre de Gibbs, ΔG . Os valores dos erros são referentes aos dados das triplicatas.

A constante de ligação de Mg^{+2} a CEAS1 foi $K_a = 5,75 \times 10^5 M^{-1}$, valor com a mesma ordem de magnitude das constantes das enzimas que são ativadas por magnésio.⁸⁰ Estas enzimas apresentam altas variações estruturais e catalíticas que refletem na adaptabilidade do

magnésio a diversas estruturas. Por exemplo, enzimas como as das vias glicolítica ou do glicoxilato requerem no mínimo dois sítios de ligação ao metal, um alostérico regulatório modulando a estrutura ou a ligação, e outro atuando no papel catalítico. Em outras enzimas, o metal é essencial para ativá-las permitindo a ligação ao substrato (Ex: xilose, piruvato, etc) o qual não possui alta afinidade pelo Mg^{+2} (valores de K_d na ordem de mM). Outros exemplos de enzimas já mostram alta afinidade pelo metal (valores de K_d na ordem de μM), sendo o cofator importante na estabilidade de um intermediário da reação durante a catálise. Já em nucleases, a água é o ponto chave na hidrólise da ligação fosfodiéster e no desenho do sítio catalítico coordenado pelo cofator Mg^{+2} , sendo importante o estado de solvatação do metal na catálise.⁸⁰

Relacionando as informações sobre enzimas ligantes de magnésio e enzimas dependentes de ThDP com as análises de nossos dados podemos sugerir que o íon metálico seja importante tanto na ativação de CEAS1, juntamente com ThDP, quanto na afinidade pelo substrato DG3P e na estabilidade de um intermediário da reação durante a catálise.²³ Diferentemente de outras enzimas dependentes de magnésio, descartamos a hipótese de alosteria em CEAS1, uma vez que o modelo de “sítios idênticos e independentes” foi o mais indicado para descrever as curvas de ITC.

Apesar de ser um íon essencial para a atividade em proteínas dependentes de ThDP, poucos estudos tem relatado as características termodinâmicas no processo de interação. Isso deve ocorrer porque seus substratos são distintos e seus mecanismos de catálise também, apesar de possuírem o domínio de ligação ao ThDP conservado.⁷⁵ Dentre estas proteínas que fazem parte da mesma família onde se encontra CEAS, está a enzima MenD de *E.coli*.⁸¹ Ela também é uma sintase que participa da via de síntese da menaquinona (vitamina K_2) convertendo substratos distintos de CEAS. Por outro lado apresenta também um íon metálico (Mn^{+2}) como cofator interagindo diretamente com ThDP. Num estudo de cinética, foi demonstrado ⁷⁴ que a interação de Mn^{+2} é um processo cooperativo ($n=2$) com uma constante de dissociação K_d de 950.10^{-6} M. Isso demonstra que apesar de CEAS e MenD pertencerem a mesma família de proteínas seus perfis de interação ao cofator metálico são distintos e que isso esteja mais relacionado ao papel catalítico quanto a ligação ao ThDP.

Com o intuito de comparar o sítio de interação ao Mg^{+2} , analisamos as estruturas de CEAS1 e CEAS2. Na Figura 26 temos a representação da localização de Mg^{+2} em em CEAS2 (*PDBSum* 2iht), pois no modelo de CEAS1 não foi incluído tal íon. Mg^{+2} é coordenado de forma octaédrica por átomos das cadeias laterais de Asp-463 e Asn-490 (resíduos conservados no motivo de ligação GDG-X-NN), pelas carbonilas das cadeias principais de Thr-492 e de

Val-488, pelos 2 oxigênios difosfatados do ThDP, e por uma molécula de água. Para CEAS1 todos os aminoácidos são conservados, a não ser a Thr que muda para uma Arg. A mudança de um aminoácido neutro para um aminoácido maior e carregado positivamente, não causa impedimento da interação, uma vez que esta se dá pela carbonila da cadeia principal. Assim, o processo de interação de Mg^{+2} neste sítio parece ser o mesmo para as duas isoformas da proteína.

Essa conformação também já foi vista para outras proteínas dependentes de ThDP tais como a enzima MenD de *E.coli*.⁸¹ O cofator Mn^{+2} também é octaedricamente coordenado e interage com 2 moléculas de água, uma se ligando diretamente ao metal e a outra interagindo com o difosfato do ThDP e a proteína. Os resíduos de Asn e Asp também estão conservados assim como em CEAS.

Figura 26 - Representação do sítio de interação de Mg^{+2} com CEAS2 e posições dos íons no tetrâmero, sendo 1 por monômero. São mostrados que Asp e Asn, resíduos de aminoácidos constituintes do motivo conservado GDG-X₂₆-NN, interagem com o íon por suas carbonilas da cadeia lateral. A carbonila da cadeia principal de Thr também interage com o íon, bem como dois oxigênios difosfatados do ThDP e o oxigênio carbonil da Val-488 (não mostrada no desenho). Uma molécula de água também compõe a coordenação (figura produzida pelo *PDBSum* código de acesso: 2iht).

4.4.4 Testes de Atividade

Um dos grandes desafios deste estudo foi determinar a atividade de CEAS1, uma vez que ainda não há estudos sobre essa proteína e consequentemente, não está comprovada sua atividade embora se acredite que ela atue como sua isoforma, CEAS2.

Neste sentido, a reação catalisada por CEAS2 envolve a condensação de L-arginina e D-gliceraldeído-3-fosfato (DG3P) com a formação de *N*²-(2-carboxietil) arginina (CEA) ¹⁷ (Figura 27).

Figura 27 - Esquema da reação de CEAS2, mostrando as estruturas dos substratos e do produto (CEA). Sob a seta estão mostrados os cofatores da reação, tiamina difosfato e o íon magnésio.

De acordo com o proposto^{23,34}, o mecanismo de reação de CEAS2 é complexo, e dentre as enzimas dependentes de ThDP, ela possui a característica distinta de catalisar a formação de uma ligação N-C, via formação de um intermediário α - β -acil-ThDP-insaturado.

Caines e colaboradores^{23,34} mostraram que CEAS2 segue o mecanismo de ping-pong, típico de enzimas que possuem em seu sítio ativo a conformação dimérica (ou dímero de dímero),⁷⁸ como exposto na figura 28. Como primeiro passo é necessário que ocorra a ativação de ThDP. Neste passo é essencial que a cadeia lateral do ácido glutâmico 57 de CEAS2 (análogo Glu-48 em CEAS1) esteja posicionado a uma pequena distância do N1' do anel pirimidina do ThDP, a fim de formar uma ligação de hidrogênio, levando ao aumento da basicidade do grupo 4'-amino. Isso provoca a desprotonação do C-2 do anel tiazol de ThDP, produzindo um intermediário C2-carbânion de tempo de vida curto. A interação entre o glutamato e o N1' permite o grupo 4'-amino reagir no passo de translocação de próton do C-2, promovendo assim a atividade catalítica.⁸²

A geração de um carbânion então promove a ligação ao 1° substrato (DG3P) formando intermediários como o enol(ato)-ThDP. A eliminação de grupos β -hidroxil e fosfatos ($\text{HPO}_4^{-2} + \text{H}_2\text{O}$) leva a formação do intermediário acrilóil-ThDP α - β -insaturado.^{23,34} Neste processo de perda de fosfatos e rearranjos químicos, o acrilóil-ThDP é o último intermediário antes do ataque do 2° substrato, porém várias outras formas destes intermediários acontecem na reação.

A reação prossegue pela ligação da L-arginina, pela formação de uma ligação C-N, porém os detalhes desta reação e da transferência e eliminação de prótons ainda são incertos.^{23,34} Com a formação do produto, o N²-(2-carboxietil) arginina (CEA), ThDP é desativado e liberado.

Figura 28 - Mecanismo de ação proposto para CEAS2 (adaptado de ref.²³). Acima, na molécula de ThDP estão identificados o N1' e o grupo amino 4' do anel pirimidina e o C2 do anel tiazol. Em seguida, no primeiro passo é mostrada a ativação de ThDP levando a desprotonação do C2 anel tiazol e formação do carbânion. O C2-carbânion então interage com o substrato DG3P, formando o intermediário eno(ato)-ThDP e em seguida o acríloil-ThDP, com a liberação de fosfatos. A partir daí a L-arginina se liga para formar o produto da reação, o N2-(2-carboxietil) arginina (CEA), sendo este e o ThDP liberados para o meio.

Com base no mecanismo de reação proposto para CEAS2 e na metodologia utilizada nestes trabalhos para analisar sua atividade, propusemos estudar a reação de CEAS1 utilizando os substratos DG3P e L-arginina.

Ensaio de reação acoplada monitorando a liberação de fosfato inorgânico da reação foram realizados com o kit *EnzChek[®] Phosphate Assay (Molecular Probes)*. Os resultados obtidos por análise da absorbância não mostram a formação do intermediário acrilil-ThDP α - β -insaturado. Supondo que ThDP estivesse ativado em CEAS1 e portanto estivesse na forma de C2-carbânion promotor de atividade, o substrato DG3P poderia ser catalisado formando o intermediário da reação. Para CEAS2 foi visto que o intermediário acrilil-ThDP α - β -insaturado mostrou absorbância em 433 nm.^{36, 83} Para CEAS1 analisamos também esta região, porém não conseguimos visualizar essa banda de absorção. Isso, somado ao resultado da reação acoplada, nos leva a pensar que: (1) a reação está ocorrendo somente até a formação do intermediário enol(ato)-ThDP, pois não perde Pi, (2) a reação está ocorrendo até a formação do intermediário acrilil-ThDP α - β -insaturado porém com pouca quantidade para ser detectado (em 433 nm ou pela quantidade de Pi liberado), ou (3) a reação não está ocorrendo de fato.

Assim, outra estratégia foi testada para analisar a atividade de CEAS1 através da cromatografia em HPLC. A coluna YMC-Pack Diol 60, uma coluna de exclusão molecular, foi utilizada a fim de separar os componentes por tamanho para se determinar seus volumes de eluição. Tanto a reação quanto os reagentes em separado foram aplicados nesta coluna e os cromatogramas foram comparados. Como o produto da reação final, o carboxietil-arginina (CEA) não absorve nos comprimentos de onda monitorados (205 nm, 220 nm e 280 nm), foi utilizada a molécula NATA (N-acetil-L-triptofanamida) com massa molecular de 245, como padrão a fim de nos indicar qual seria o volume de eluição de produto.

A Figura 29 mostra os perfis cromatográficos dos reagentes em separado, do controle negativo (reagentes na ausência da enzima) e da reação. Observamos que não houve diferença entre os cromatogramas a não ser a fração de 14 mL que só aparece na reação. Esse pico indica que há um componente na reação com uma massa molecular maior que 460, já que o ThDP, o qual possui essa massa, é eluído depois em 15,5 mL (relembrando que as massas moleculares aproximadas dos reagentes são: Ceas1-his 61000, ThDP 460, CEA 246, L-arginina 174 e DG3P 170). Assim, foi suposto que esta fração representasse algum dos intermediários da reação. Porém, quando foi aplicada uma amostra da reação sem esta ser fervida, a fração (14 mL) foi detectada, sendo, portanto referente ao volume de eluição da

enzima. No entanto, não poderíamos descartar a hipótese da existência do produto uma vez que este não apresenta absorvância. O padrão NATA em 19 mL serviu de guia para rastrear a fração em que o produto de massa 246 poderia ser eluído.

Figura 29 - Perfil cromatográfico da reação de CEAS1 em coluna Pack Diol-60-SEC. Reação: 1 mM de substratos, 0,5 mM dos cofatores, 10 μ M de Ceas1-His incubados por 1h a 37°C. Após incubação, a reação foi fervida por 10 min e centrifugada. O sobrenadante foi aplicado na coluna. Controle: idem reação, mas sem Ceas1-His. Volume de amostra aplicada: 20 μ L. Fase móvel: 0,1M fosfato de potássio pH 7,0 / Acetonitrila (80/20). Fluxo: 0,5mL/min. Abs monitorada em 280 nm, 220 nm e 205 nm.

Assim, a fim de rastrear o produto e/ou intermediários, a próxima estratégia foi analisar a reação por espectrometria de massas acoplada a cromatografia em HPLC, técnica conhecida como LC-MS. As estruturas dos possíveis intermediários da reação e do produto foram construídas com o programa *ChemBioDraw* e serviram para identificar as massas moleculares na análise. Estas estruturas e suas características tais como massa molecular e porcentagens das possíveis formas massa/carga são expostas na tabela 8.

As amostras da reação e dos controles foram preparadas da mesma maneira que anteriormente e aplicadas em diversas colunas, C4, C18, Pack Diol 60, em soluções adequadas e compatíveis para o acoplamento ao espectrômetro de massas (metanol, acetonitrila ou acetato de amônio). Todo o volume de eluição foi analisado simultaneamente em MS.

Tabela 8 - Estruturas e características químicas dos intermediários da reação de CEAS e do produto. Acrilil-ThDP é mostrado com três configurações diferentes devido aos distintos estados de protonação dos difosfatos. Estruturas construídas através do programa *ChemBioDraw*

Estrutura	Formula química	Massa exata	Massa molecular	m/z
$C_{16}H_{28}N_4O_{13}P_3S$	609,06	609,40	609,06 (100%), 610,06 (20,4%), 611,05 (4,5%), 611,06 (3,1%), 611,07 (1,5%)
$C_{16}H_{26}N_4O_{12}P_3S^-$	591,05	591,38	591,05 (100%) 592,05 (20,3%) 593,04 (4,5%) 593,05 (4,3%)
$C_{15}H_{23}N_4O_{12}P_3S$	576,02	576,35	576,02 (100%) 577,03 (16,9%) 578,02 (4,8%) 578,03 (4%) 577,02 (2,3%)
Enol(ate)-ThDP
$C_{15}H_{21}N_4O_8P_2S^+$	479,05	479,36	479,06 (100%) 480,06 (16,8%) 481,05 (4,5%) 481,06 (3,3%) 480,05 (2,3%)
Acrilil-ThDP
$C_{15}H_{19}N_4O_8P_2S^-$	477,04	477,35	477,04 (100%) 478,04 (18,8%) 479,04 (6,6%) 479,05 (1,3%)
Acrilil-ThDP
$C_{15}H_{18}N_4O_8P_2S^{-2}$	476,03	476,34	476,03 (100%) 477,04 (16,7%) 478,03 (4,9%) 478,04 (3,0%) 477,03 (2,3%)
Acrilil-ThDP
$C_{21}H_{36}N_8O_{10}P_2S^{+2}$	654,17	654,57	654,18 (100%) 655,18 (23,5%) 656,18 (5,6%) 656,17 (4,6%) 655,17 (3,8%) 657,17 (1,2%)

continua

continuação

$C_{21}H_{35}N_8O_{10}P_2S^{+2}$	653,17	653,56	653,17 (100%)
				654,17 (24,3%)
				655,17 (5,5%)
				655,16 (4,6%)
				654,16 (3,0%)
				656,17 (1,7%)
CEA	$C_9H_{18}N_4O_4$	246,13	246,26	246,13 (100%)
				247,14 (10,1%)
				247,13 (1,13%)
				248,14 (1,3%)

Os espectros de MS das amostras advindas de cada coluna testada nos mostraram que, no modo positivo, há uma molécula de massa molecular de 477,62 e outra de 249,36, com alta intensidade (Figuras 31 e 32). Estes valores são compatíveis com a massa de um dos possíveis intermediários da reação (acrilil-ThDP: $C_{15}H_{18}N_4O_8P_2S^{-2}$) e com a massa do produto, CEA (tab. 8). No entanto, quando analisado o controle negativo, para todas as colunas testadas, os mesmos valores de massa foram apresentados.

Portanto, pela técnica LC-MS não foram obtidas moléculas com valores esperados de massa/carga relacionados com os intermediários da reação de CEAS e nem com o produto final CEA.

Figura 30 - Espectros de Massas (LC-MS) da reação de CEAS1. Análise feita em modo positivo, referente à amostra eluída da coluna Pack Diol-60. (A) Cromatograma de intensidade m/z durante o tempo da corrida, (B) espectro de massas no tempo 20 min de corrida, (C) espectro de massas no tempo 17 min de corrida.

Figura 31 - Espectros de Massas (LC-MS) do controle negativo. Análise feita em modo positivo, referente à amostra eluída da coluna Pack Diol-60. (A) Cromatograma de intensidade m/z durante o tempo da corrida, (B) espectro de massas no tempo 20 min de corrida, (C) espectro de massas no tempo 17 min de corrida. Uma molécula de massa molecular de 249,34 e outra de 477,57 aparecem tanto na reação quanto no controle.

Embora o resultado tenha sido negativo, outra estratégia utilizada para estudar a reação de CEAS1 foi realizada paralelamente, utilizando a técnica de Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC). O ITC foi utilizado para medir o calor gerado durante a atividade enzimática, técnica que vem sendo cada vez mais utilizada no estudo de enzimas.^{66,68,84-87}

Para iniciar o estudo de uma reação é necessário medir sua entalpia molar aparente (ΔH_{app}) a qual é determinada utilizando-se na cela do ITC uma quantidade de enzima suficiente para converter todo o substrato injetado em produto, em um dado período de tempo (as quantidades estão explicitadas na metodologia). Após a total conversão o que se tem é o

retorno da curva para a mesma linha de base encontrada antes da injeção. O calor total é obtido integrando-se a área sob a curva e a entalpia molar total é obtida dividindo-se esse calor total pela quantidade de substrato convertido. Para encontrarmos a entalpia molar aparente da reação de CEAS subtraímos do ΔH_{app} obtido da reação, o ΔH_{app} obtido pelo calor de diluição do reagente.

O primeiro ensaio realizado foi utilizando a enzima CEAS1-His (construção pET TEV) com seus cofatores, em tampão 50 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 8,0 com 1 mM β -mercaptoetanol, na cela e o substrato (ora G3P ora L-arginina), na seringa. Também foi feito um ensaio para se determinar a entalpia molar da etapa de formação do(s) intermediário(s) da reação de CEAS1. Para isso, foi quantificado o calor de G3P quando titulado numa solução contendo CEAS1-His, seus cofatores, sem a L-arginina. A Figura 33 representa os termogramas obtidos, sendo encontrados os correspondentes valores de entalpia quando titulados: (A) L-arginina na reação ($\Delta H_{app} = -36,25$ cal/mol), (B) G3P na reação ($\Delta H_{app} = -249,86$ cal/mol) e (C) G3P em CEAS1-Mg⁺²-ThDP ($\Delta H_{app} = -561,09$ cal/mol).

Figura 32 - Potência térmica em função do tempo ($\mu\text{cal.s}^{-1}$) da reação de CEAS1-His. Experimento realizado a 25°C, em tampão 50 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH8,0, com 1 mM β -mercaptoetanol. Foi feita uma única injeção do substrato para se determinar o ΔH_{app} da reação. (A) termograma referente a titulação de 15 μL de L-arg (45,5 mM) na reação e seu calor de diluição (duplicatas 1 e 2). Para a reação, a cela foi preenchida com 300 nM (1) ou 600 nM (2) de CEAS1-His, 1,5 mM cofatores, 5 mM G3P; para a diluição, a cela foi preenchida com tampão hepes. A partir das médias das duplicatas foi calculado o $\Delta H_{\text{app}} = \Delta H_{\text{reação}} - \Delta H_{\text{diluição}} = 48,86 - 85,11 = -36,25$ cal/mol. (B) termograma referente a titulação de 15 μL de G3P (2,5 mM) na reação e seu calor de diluição (duplicatas 1 e 2). Para a reação, a cela foi preenchida com 300 nM (1) ou 600 nM (2) de CEAS1-His, 1,5mM cofatores, 5 mM L-arg; para a diluição, a cela foi preenchida com tampão hepes. A partir das médias das duplicatas foi calculado o $\Delta H_{\text{app}} = \Delta H_{\text{reação}} - \Delta H_{\text{diluição}} = -345,80 - (-95,94) = -249,86$ cal/mol. (C) termograma referente a titulação de 15 μL de G3P (2,5 mM) em CEAS-Mg-ThDP e seu calor de diluição (duplicatas 1 e 2). Para a formação do(s) intermediário(s), a cela foi preenchida com 300 nM de CEAS1-His e 1,5mM cofatores; para a diluição, a cela foi preenchida com tampão hepes. A partir das médias das duplicatas foi calculado o $\Delta H_{\text{app}} = \Delta H_{\text{formação do intermediário}} - \Delta H_{\text{diluição}} = -820,78 \text{ cal/mol} - (-259,69 \text{ cal/mol}) = -561,09$ cal/mol.

Vários testes foram realizados modificando as quantidades de titulantes e da enzima na cela. De acordo com os termogramas o processo de ligação do G3P é exotérmico, seja na formação do(s) intermediário(s) da reação, seja na reação como um todo, isto é até a formação

do produto final. Não houve diferença quanto ao uso de CEAS1-His ou CEAS1 sem cauda nos experimentos, tendo a reação apresentado um valor médio de entalpia de -0,4 Kcal/mol, que é um valor baixo para uma reação. Além disso, os valores de calores obtidos sempre se apresentaram muito baixos, de $0,5 \mu\text{cal.s}^{-1}$ ou menores que isso, o que fica próximo ao limite de detecção do aparelho para a determinação de entalpia.⁶⁶ Em relação ao processo de titulação de L-arginina na reação, os resultados mostraram valores de entalpia próximos a zero, e portanto não há reação com este substrato.

Considerando todas as análises realizadas aqui para estudar a atividade de CEAS1 podemos concluir que: a enzima está inativa ou a reação está “parada” no intermediário enol(ato)-ThDP. Isso porque as análises de ITC mostram uma liberação de calor quando DG3P entra no sistema e, portanto há uma reação ocorrendo que pode ser a formação do intermediário ou a formação do produto, provavelmente em pequena quantidade ou de fraca ionização, pois não foi detectado por espectrometria de massas.

Ainda não foi possível estabelecer a velocidade de formação do(s) intermediário(s), uma vez que para ser determinada é necessário estabelecer o valor da entalpia molar total (ΔH_{app}).

Assim, podemos sugerir que: 1) há uma predominância de conformeros inativos na amostra (os oligômeros e agregados não são espécies reativas), sendo que a quantidade de enzima ativa, não é aquela quantificada, pois os valores de entalpia molar não se repetem; (2) as condições de pH (8,0) e/ou temperatura (25°C) não são as condições ótimas para esta enzima; (3) o isômero L-G3P pode estar inibindo a enzima; isto é possível uma vez que utilizamos como substrato comercial o D-L-G3P; (4) a troca de calor da reação é realmente muito baixa, não sendo adequadamente quantificada por ITC; (5) a proteína recombinante não é ativa *in vitro*.

Outra hipótese sobre o mecanismo de ação de CEAS1 seria que ela haja como um complexo enzimático, como algumas das enzimas ThDP estudadas (subunidade E1 da piruvato desidrogenase).⁸⁸ A hipótese de que as enzimas da via de síntese do ácido clavulânico e de clavamas atuem na forma de um complexo também já foi predita.^{30, 43} Yeon e colaboradores⁴³ analisando estudos de manipulação gênica de *S. clavuligerus* ATCC 27064, mostraram que diversos genes (regulatórios ou envolvidos na biossíntese) introduzidos em múltiplas cópias aumentavam a produção de ácido clavulânico, porém não conseguiram estabelecer o passo limitante, isto é, qual(is) gene(s) e quantas cópias são necessárias no controle da via de síntese. Eles sugerem que algumas interações entre os genes ou entre suas proteínas possam fazer esse controle da via do início ao fim. Levando isso em consideração,

podemos especular tal interpretação para nossos resultados em relação a atividade de CEAS1. Tahlan e colaboradores³⁰ também lançaram a ideia que as isoformas (1 comparada com 2) apresentariam diferenças nas atividades e propriedades cinéticas e que poderiam formar hetero-oligômeros e agir por um mecanismo diferente na modulação enzimática baseado no meio nutricional e na viabilidade dos precursores. Desta forma, CEAS1 seria ativa na presença de outras proteínas mas não sozinha, o que explicaria sua inatividade frente aos substratos.

4.5 Estudos bioquímicos e biofísicos da Proclavaminato amidino hidrolase 1 (PAH1)

Assim como para CEAS1, não há trabalhos publicados a respeito da enzima PAH1; assim o estudo de PAH1 foi focado na análise de sua estrutura e na atividade *in vitro*. Os dados obtidos foram comparados e relacionados a informações existentes relativas à isoforma PAH2.

A estratégia de estudo foi basicamente a mesma que foi realizada para CEAS1, sendo analisada desde a estrutura primária de PAH1, através de um alinhamento com outras proteínas, passando pelo estudo da estrutura secundária, pela técnica de CD até as estruturas terciária e quaternária por análises da fluorescência intrínseca, oligomerização e por modelagem da estrutura por homologia. Os dados obtidos foram comparados com dados da isoforma 2 pelas informações disponíveis no pdb (código PDB: 1GQ6 e 1GQ7).

4.5.1 Estrutura primária

A identidade sequencial entre as proteínas PAH1 e PAH2 foi revelada pela primeira vez quando seus respectivos genes foram sequenciados, mostrando que 71% dos aminoácidos eram idênticos nas duas isoformas.²⁸ PAH2 já havia sido estudada⁴⁴ e mostra homologia sequencial com arginases de metabolismo primário, as quais hidrolisam arginina a ornitina e

uréia, mas não aceitam arginina como substrato. Para analisar o nível de identidade de PAH1 com outras proteínas disponíveis em banco de dados, sua sequência de aminoácidos foi submetida ao *blastp*. Os maiores índices de identidade foram encontrados com as proteínas agmatinases de *Streptomyces flavogriseus* ATCC 33331 e de *Saccharomonospora viridis* DSM 43017, e proclavaminato amidino hidrolase de *Streptomyces antibioticus* e *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, como mostrado na tabela 9.

Tabela 9 - Resultado do *blastp* realizado com a sequência de aminoácidos de PAH1.

Proteína	Organismo	% identidade sequencial
agmatinase	<i>Streptomyces flavogriseus</i> ATCC 33331	72
proclavaminato amidino hidrolase 2 (PAH2)	<i>Streptomyces clavuligerus</i> ATCC 27064	71
proclavaminato amidino hidrolase 3 (PAH3)	<i>Streptomyces antibioticus</i>	73
agmatinase	<i>Saccharomonospora viridis</i> DSM 43017	70
proclavaminato amidino hidrolase 4 (PAH4)	<i>Streptomyces antibioticus</i>	58

As agmatinases (EC 3.5.3.11) hidrolisam agmatina e as proclavaminato amidino hidrolases (EC 3.5.3.22) agem sobre o amidinoproclavaminato, ambas produzindo uréia como produto em comum.

Como mostrado para CEAS1 aqui também para PAH1 nota-se sua alta identidade com proteínas de *Streptomyces flavogriseus* e *Saccharomonospora viridis*, actinomicetos não produtores de ácido clavulânico ou de clavamas 5S. Provavelmente, estas agmatinases podem estar relacionadas com vias do metabolismo primário ou de outra via de metabolismo secundário.

Novamente *S. antibioticus* apresenta duas cópias do mesmo gene que aparece em *S. clavuligerus*, denominados *pah3* e *pah4*, genes ortólogos. As proteínas codificadas por esses genes, respectivamente apresentaram 73% e 58% de identidade com PAH1.

Levando-se em conta o grau de parentesco e sua função no organismo, as proteínas PAH1, PAH2 de *S. clavuligerus* e PAH3 e PAH4 de *S. antibioticus* foram alinhadas (Figura 34) e comparadas. As proteínas têm massas moleculares parecidas, PAH1 possuindo 351 aminoácidos, PAH2, 313 aminoácidos, PAH3, 320 aminoácidos e PAH4, 304 aminoácidos

em suas sequências. É possível observar que PAH1 possui uma porção C-terminal com 41 aminoácidos a mais que PAH2.

As proclavamato amidino hidrolases (EC 3.5.3.22) são classificadas na família das hidrolases que catalisam a hidrólise de ligações carbono-nitrogênio (não peptídicas) numa amidina linear (R-C(=NH)-NH₂). Considerando PAH como membro da família arginase, analisamos o alinhamento das estruturas com base nas características desta família e nos dados existentes para PAH2, pois elas possuem identidade sequencial alta (71%). Nas quatro enzimas alinhadas, os aminoácidos que compõem o motivo conservado em arginases (marcados em vermelho na Figura 33) são conservados e mostram ser importantes por coordenar o íon Mn⁺², cofator dessas enzimas. Os aminoácidos que fazem a interação direta com Mn⁺² estão marcados em amarelo.

PAH1	-----MSTAVSPRYAQPATFMRLRHRPDPIGHDVVVVGAPYDGGTSYRPGARFAPRAI	53
PAH2	---MERIDSHVSPRYAQIPTFMRLPHDPQPRGYDVVIGAPYDGGTSYRPGARFGPQAI	56
PAH3Sa	MNDPGQRLDINVSPRYAQIPTFMRLPHDPSQPKDVVIGAPYDGGTSYRPGARFGPRAV	60
PAH4Sa	-----MEQNYAQNLTFMGIPRHASPRGRDLVVIGAPYDAGTSHRPGTQLGPRAI	49
	:. .*** ** : : . * * :*:*****.***:***:..*.*:	
PAH1	RHESLIHGVGIDRGPVFDRLDIDVVDGGDIDLSPFSDMLAMDTATVALTRLLERNDAFIM	113
PAH2	RSEGLIHGVGIDRGPFTDLINCVDAGDINLTPFDMNIAIDTAQSHLSGLLKANAFLM	116
PAH3Sa	RNESLIHGVGIDRGPFTDLIDCVDAAGDIDLTPFNMHIAMDTAQRRLELLADNAFLM	120
PAH4Sa	RQGSLLLTGTFGRGPAASDIIDCADAGDIDLGPCDARTVLEVAQRSLQSLLEHNDAFIM	109
	* * *: * *:***. * *: .*.***: * * . .:..* * * * *	
PAH1	LGGDSLSLAALRAVHARHGRVAVLHLDHSDTNPPVYGGTYHHGTFRWAIEEGLVDPE	173
PAH2	IGGDHSLTVAALRAVAEQHGPLAVVHLDHSDTNPAFYGGRYHHGTFRHGIDEKLIDPA	176
PAH3Sa	IGGDHSLTVAALRAVAEKHGPVAVLHLDHSDTNPAFYGGTYHHGTFRHAIIDEKLIDPQ	180
PAH4Sa	LGGDSALTVAALRAVRRHGMVAAVHLDHSDTNPPVYGGTYHHGTFRQAIEERLIDPR	169
	:***.***:***** :** :*:*****.***: * * *****. * *: * * *	
PAH1	RLVQVGIRGHNPREDSLDYARGHGVSIPTAADFTRRSPRGIAEQIRRTVGGGLPLYVSVDI	233
PAH2	AMVQIGIRGHNPKEPSLDYARGHGVVTTADEFGELGVGGTADLIREKVGQRPVYVSVDI	236
PAH3Sa	RMLQIGIRGHNPQPSLDYARGHGVIRMTSDEFCEGLGPQAATLVREHLGDAPVYVSVLV	240
PAH4Sa	RLVQIGVRGPRVEEDPDQDARRHGTRVITAADMVAVGPSATARLIREIIGDVPVYVSVGM	229
	:*:***. * *. * * * * :*: : : . . : * : * * :*****:	
PAH1	DVVDPAFAPGTGTAPAGGLSSREVLTLDDVVGQLRPVGFDMVEVSPAYDPSGITSLLAAE	293
PAH2	DVVDPAFAPGTGTAPAGGLSSREVLALLRCVGDLPVGFDMVEVSPLYDHGGITSILATE	296
PAH3Sa	DVVDPAFAPGTGTAPAGGLSSREVLALLRGVGDLPVGFDMVEVSPLYDHGGITSVLATE	300
PAH4Sa	DVVDPRFAPGTAAAPADGPSSLDVLEVLRCVGDLEPVGFDMVGCPPYDHGGVTSLLATE	289
	***** :***.***: * * * * : * : * :*****: * * * * :***:***:	
PAH1	IGAELLYQYARATTSPASAPVDSPLPPGAAADDAENAENAVDAVDAESAVDFAGQRMG	351
PAH2	IGAELLYQYARAHRTQL-----	313
PAH3Sa	IGAELLYQYARSTTRERQSS-----	320
PAH4Sa	VGAELLYQFARSRCR-----	304
	:*****:***:	

Figura 33 - Alinhamento das sequências primárias de PAH1 e PAH2 de *S. clavuligerus* e PAH3 e PAH4 de *S. antibioticus*. As sequências foram obtidas pelos resultados do *blastp*. A numeração à direita refere-se à sequência de aminoácidos de cada proteína; (*) resíduos de aminoácidos idênticos nas sequências; (:) substituições conservadas; (.) substituições semi conservadas; marcado em amarelo, os resíduos ligantes de Mn⁺² e em vermelho os aminoácidos que compõem o motivo conservado em arginases importante para coordenar o íon Mn⁺²; em cinza, os resíduos que reconhecem o grupo guanidino dos substratos; em verde estão marcados os aminoácidos ligantes da porção β-lactâmica do substrato; em azul estão marcados os resíduos Arg e Ser que fazem interação entre os monômeros para compor o oligômero, podendo estar envolvidos na catálise; em magenta estão marcados os resíduos de triptofano. As sequências foram alinhadas utilizando-se a ferramenta de bioinformática *ClustalW2*, do Instituto Europeu de Bioinformática (EMBL-EBI) disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>.

Os substratos de arginases, os quais possuem o grupo guanidino que interage diretamente na catálise, ligam-se aos resíduos Asp (Asp-145 em PAH1, marcado em amarelo, o mesmo aminoácido que se liga ao Mn^{+2}), His, Glu e Thr (marcados em cinza). Já a ligação do substrato pela porção β -lactâmica envolvem os aminoácidos marcados em verde (Pro e Asn). Dois outros resíduos, Arg e Ser (marcados em azul) parecem estar envolvidos na catálise e fazem interação entre os monômeros para compor o oligômero de PAH2. Todos esses resíduos são idênticos em PAH1, PAH2 e PAH3.

4.5.2 Estrutura secundária

A caracterização da estrutura secundária de PAH1 foi feita com base num estudo de dicróismo circular na região UV distante (250-190nm) em diversas condições. A predição do tipo e quantidade de estruturas secundárias foi feita utilizando os programas ContinLL, SELCON3 e CDSSTR.^{56,76}

O espectro foi caracterizado pela presença de dois mínimos negativos em torno de 222 nm e 208 nm e um máximo positivo em torno de 196 nm, indicando estrutura secundária contendo elementos do tipo α -hélice (fig. 34). Um achatamento na região de α -hélices entre as duas bandas negativas implica na existência de estrutura folha β também. Este perfil é típico para proteínas tipo α/β , o que era esperado para essa proteína, se levarmos em conta a semelhança com a isoforma PAH2.

O cálculo das frações de estruturas secundárias da proteína resultou em 26,1% de α -hélices, 21,9% de folhas- β , 21,4% de estruturas desordenadas e 30,6% de voltas. Os dados da desconvolução são consistentes com o espectro de CD observado experimentalmente, porém diferem particularmente no conteúdo de α -hélices que foi observado para PAH2 na estrutura cristalográfica (PDB: 1GQ6), a qual apresentou 39% de α -hélices e 19% de folhas- β .⁴⁴

Figura 34 - Espectro de CD no UV distante de PAH1-His. Amostra (0,3 mg/mL) analisada em tampão 20 mM fosfato de sódio pH 8,0 com 10 mM NaCl, com uma média de 8 varreduras, numa cubeta de caminho óptico de 1 mm.

A estabilidade térmica e ao pH também foram analisadas por CD conforme apresentados na Figura 35. Os dados em relação a temperatura mostraram que entre 10°C e 30°C a estrutura se mantém estável, mostrando os dois mínimos negativos, 208 nm e 220 nm (sendo o de 208 nm mais pronunciado) e uma banda positiva em torno de 196 nm. A partir de 40°C o espectro começa a mudar. De 50°C a 100°C as bandas de 220 nm e de 196 nm desaparecem, havendo um deslocamento para região de 202 nm, típico de estrutura não ordenada. Apesar disso, mesmo nas temperaturas mais altas os espectros mostraram que a proteína ainda não está completamente desenovelada (fig. 35A).

Em relação a influência do pH (fig. 35B) foi observado que na faixa de pH 3,0 a 5,0 a proteína precipita, pois nesta faixa encontra-se seu pI. Estes valores estão um pouco abaixo do pI teórico (tab. 4) que é 5,6 para PAH1-His. Nos espectros obtidos nos demais pHs, a proteína parece manter a mesma estrutura secundária, com os mínimos negativos em 208 nm e 220 nm e uma banda positiva em 196 nm. De modo geral, os dados de CD sugerem que mesmo em pHs extremos PAH1 não é completamente desnaturada, mostrando uma estrutura estável com relação a variação de pH e temperatura.

Figura 35 - Análise por CD-UV distante da estabilidade térmica (A) e ao pH (B) da proteína PAH1-His. Em (A) 0,3 mg/mL de PAH1-His foram analisadas em tampão 20 mM fosfato de sódio pH 8,0 , 10 mM NaCl, com uma média de 8 varreduras, numa cubeta de caminho óptico de 1 mm, permanecendo 5 min em cada temperatura antes de se fazer a leitura. Em (B) amostra de 0,2 mg/mL de PAH1-His foi incubada em tampão 20 mM acetato-fosfato-borato pH 2, 3, 4, 9, 10 11 e 12; tampão 20mM citrato de sódio pH 5, e tampão 20 mM fosfato de sódio pH 6, 7 e 8, por 30 min em cada pH, à temperatura ambiente, antes de se fazer a medida.

4.5.3 Estruturas terciária e quaternária

Para análise da estrutura quaternária de PAH1 foi realizado um estudo de oligomerização da proteína. A técnica de fluorescência também foi utilizada para avaliar possíveis alterações conformacionais na estrutura terciária da proteína. Além disso, foi realizada a modelagem da estrutura por homologia, uma vez que não foi possível obter a estrutura cristalográfica de PAH1 neste trabalho. A análise da estrutura gerada por modelagem foi feita baseada nos dados da estrutura cristalográfica de PAH2.⁴⁴

4.5.3.1 Oligomerização de PAH1

A proteína PAH1-His, purificada em resina Ni-NTA, foi analisada por SEC e gel nativo (Figura 36). O perfil cromatográfico de PAH1 (tanto proteína com caudade His quanto sem cauda) mostrou eluição em dois picos, um anterior ao padrão da ferritina (440 kDa) e o outro anterior ao da ovalbumina (43 kDa). As frações equivalentes a esses picos foram concentradas e aplicadas num gel nativo (Figura 36B), indicando que o primeiro pico equivale a uma porção agregada da proteína, devido a sua alta massa molecular (acima de 669 kDa) e uma porção em menor quantidade da proteína, provavelmente em sua forma hexamérica ($39 \text{ kDa} \times 6 = 234 \text{ kDa}$). O segundo pico apresentou apenas uma banda, referente à proteína na forma hexamérica. Uma alíquota da proteína eluída com 50 mM de imidazol em Ni-NTA também foi aplicada neste gel após ser dialisada contra tampão 20 mM fosfato de sódio pH 8,0 com 10mM NaCl. Nesta amostra a proteína estava diluída, em torno de 0,1 mg/mL, apresentado-se também como uma única população de forma hexamérica. Assim, os agregados solúveis da proteína talvez sejam formados durante o processo de concentração da mesma. Vários testes foram feitos mudando a força iônica do tampão a fim de analisar alguma mudança na fração agregada, porém o perfil cromatográfico se manteve o mesmo daquele usando apenas 10 mM NaCl no tampão.

Figura 36 - Análise do grau de oligomerização de PAH1-His. (A) SEC. A amostra foi aplicada numa coluna Superdex 200 (condições: tampão 20 mM fosfato de sódio pH 8,0 com 10 mM NaCl, fluxo de 0,5mL/min, absorbância monitorada em 280 nm, frações coletadas de 1mL) e seu volume de eluição foi comparado com os padrões de ferritina (440 kDa) e ovalbumina (43 kDa). (B) Gel 9% de eletroforese em condição nativa: (M) marcador de massa molecular, (1) amostra das frações 7-8 da SEC, provável forma agregada da proteína devido a alta massa molecular apresentada, (2) amostra das frações 10-11 da SEC, provável forma hexamérica da proteína devido a massa molecular de aproximadamente 234 kDa apresentada, (3) amostra de PAH1-His eluída com 50 mM imidazol em coluna de Ni-NTA, após diálise em tampão 20 mM fosfato de sódio pH 8,0 com 10 mM NaCl, (4) alíquota da amostra aplicada na Superdex 200.

Comparando os dados com aqueles estudados para a isoforma PAH2 podemos dizer que além de alta identidade (71%) sequencial, as duas isoformas também possuem alta similaridade na estrutura quaternária, uma vez que PAH2 cristaliza na forma hexamérica e, em solução, apresenta a maior parte na forma hexamérica e, em menor quantidade, na forma dodecamérica.⁴⁴

Esta conclusão também é baseada nos dados de modelagem da estrutura obtidos para PAH1, discutidos mais adiante.

4.5.3.2 Espectroscopia de Emissão de Fluorescência

Uma vez que resíduos de triptofano são sondas intrínsecas sítio-específicas da estrutura protéica, a técnica de espectroscopia de emissão de fluorescência foi aplicada para analisar possíveis alterações conformacionais na estrutura terciária de PAH1.⁸⁹ As mudanças na emissão de fluorescência do Trp revelam informações sobre a acessibilidade ao solvente e sobre a hidrofobicidade do meio no ambiente do triptofano.

De acordo com a análise de sua estrutura primária, PAH1 possui dois resíduos de triptofano, Trp-163 e Trp-350, diferentemente de sua isoforma PAH2 que não apresenta tal fluoróforo (fig. 33). O resíduo de aminoácido em PAH2 equivalente a posição de Trp-163 em PAH1 é uma histidina (His-166), a qual está localizada numa α -hélice. Já o Trp-350 em PAH1 aparece na porção C-terminal, ausente na isoforma PAH2.

Amostras de PAH1-His na forma hexamérica, provenientes de cromatografia de exclusão molecular foram usadas nas medidas de fluorescência. Foram feitas medidas excitando a amostra tanto em 280 nm, comprimento de onda no qual Tyr e Trp são excitados, assim como em 295 nm, comprimento de onda no qual somente Trp absorve.

Os espectros de fluorescência nas duas excitações foram equivalentes. Na Figura 37 estão expostos os espectros em 295 nm, em pHs 8,0 e 9,0. Tais valores de pHs foram escolhidos pois trata-se das condições de caracterização escolhidas para tal proteína neste trabalho. De acordo com os espectros, o máximo de emissão de fluorescência foi em 337 nm em ambos pHs, indicando que os triptofanos estão voltados para o interior da molécula, isto é, não expostos ao solvente, sugerindo que a proteína esteja enovelada. No entanto, o pico de emissão foi assimétrico, sugerindo que os ambientes dos dois triptofanos são diferentes, ou seja, um resíduo possa estar exposto a um ambiente mais polar que o outro na estrutura da molécula. Provavelmente o Trp-350 que se localiza no C-terminal de PAH1 esteja mais exposto ao solvente que o Trp-163, o qual está próximo ao sítio de ligação ao substrato. Isso foi analisado no modelo de PAH1, descrito em seguida.

Figura 37 - Espectros de emissão de fluorescência de PAH1-His. Análise de fluorescência intrínseca de Trp com excitação em 295 nm, nos pHs 8,0 e 9,0. O máximo de fluorescência foi analisado em 337 nm. A concentração utilizada da proteína foi de 1 μ M (0,04 mg/mL).

4.5.3.3 Modelagem da estrutura de PAH1 por homologia

O recurso de modelagem de estrutura por homologia foi utilizado para estudar, em nível de estrutura terciária, as características comuns de PAH1 com proteínas cujas estruturas tridimensionais já são conhecidas. Para a modelagem, a sequência de aminoácidos de PAH1 foi submetida ao programa *Swiss-Model Workspace* o qual retornou os dados computados e a estrutura do modelo na extensão pdb.

A construção do modelo foi baseada no molde PDB 1gq6B (referente a uma das cadeias de PAH2). A modelagem foi feita do 6° ao 305° resíduo do modelo, mostrando 72 % de identidade sequencial entre molde e modelo. O *QMEAN score* foi de 0,704 demonstrando confiabilidade ao modelo.

A estrutura quaternária do modelo foi assumida como idêntica ao molde, e para a construção do modelo, os PDBs 1gq6A e 1gq6C foram adicionados. Sendo assim o modelo foi construído como hexâmero (fig. 38).

Na estrutura quaternária hexamérica, os ligantes presentes no molde (Mn^{+2}) estão presentes igualmente em número de 12 no modelo, sendo que todos os resíduos que interagem com os ligantes são completamente conservados entre molde e modelo. O RMSD (medida da distância média entre os Ca depois da sobreposição das proteínas) entre os resíduos de interação do modelo e do molde foi de 0,05, sendo o modelo considerado acurado.

De acordo com o molde e o modelo, para cada monômero há dois Mn^{+2} , um deles ligado por interações monodentatas nas cadeias laterais de His-118, Asp-145, Asp-141 e Asp-232 e por moléculas de água. O outro Mn^{+2} também interage com a água, com Asp-234 através do oxigênio carboxílico, e com as cadeias laterais de Asp-141 e His-143 (numeração referente a PAH1).

Figura 38 - Estrutura quaternária de PAH1 obtida por modelagem molecular. Cada monômero está representado por uma cor e os íon Mn^{+2} (2 por monômero) estão representados por esferas azuis.

Sendo assim, extrapolamos nossa discussão a respeito de comparação das estruturas de PAH1 e PAH2 a nível terciário e quaternário.

Como já se sabe, cada unidade trimérica de PAH2 está ligada por interações no N-terminal do monômero precedido próximo ao sítio ativo. Essas associações inter-monômeros são estabilizadas por um grande número de interações hidrofóbicas e poucas ligações de hidrogênio. Os aminoácidos envolvidos nessas interações mostraram-se idênticos em PAH1 exceto pela Gly-287 e Leu-292 (numeração de PAH2) substituídas por Ser-284 e Ile-289 (numeração de PAH1), respectivamente. Isso mostra a alta conservação em manter a estrutura quaternária. A interação entre os trímeros também se dá por interações hidrofóbicas suficientes para estabilizar o hexâmero.

Em relação a ligação do substrato, cabe lembrar que sua estrutura (fig. 39) contém um grupamento guanidino, carboxilatos e uma porção do anel β -lactâmico. Pela análise da estrutura de PAH2 o grupo guanidino se liga aos resíduos His-160, Thr-249, Glu-279 e Asp-148, sendo este último um resíduo catalítico. Já a porção do anel β -lactâmico interage com a Pro-190 e a Asn-187. Mais dois outros resíduos, Arg-11 e Ser-44, parecem estar envolvidos na ligação dos grupos carboxílicos do substrato fazendo a interação entre os monômeros para compor o oligômero. Todos esses resíduos são idênticos em PAH1 e então se supõe que o sítio de interação do substrato-enzima tenha sua conformação mantida.

Figura 39 - Substrato de PAH: ácido guanidinoproclavamínico. Em destaque, o anel β -lactâmico.

Elkins e colaboradores⁴⁴ especulam que a ativação de PAH possa ser feita por outra proteína, por exemplo CAS, dada a íntima associação com PAH na via catalítica. CAS é a enzima que age nos passos anterior e posterior a PAH. Mesmo se não for CAS, essas enzimas são espacialmente orientadas *in vivo* para facilitar a transferência do substrato entre seus sítios ativos. Assim, é possível que a forma hexamérica de PAH seja importante para prover um

molde de oligomerização espacial, possivelmente como parte de um complexo enzimático como proposto para outras vias.

4.5.4 Testes de atividade de PAH1

Na reação catalisada por PAH (fig. 40A) o substrato ácido guanidinoproclavamínico é convertido em ácido proclavamínico pela remoção do grupo guanidino e, assim, liberando uréia. A prévia descrição da atividade da isoforma PAH2 já foi feita por monitoramento da formação de uréia por HPLC ⁴⁴, inclusive sendo estudada sob diferentes pHs e com diferentes cofatores, além do Mn^{+2} .

Partindo dessas informações, inicialmente testamos a atividade de PAH1 monitorando a formação do produto através de reação acoplada com o kit *Uréia CE* (Labtest). Como o substrato real de PAH é preparado através de uma dificultosa e elaborada síntese química, foi usado alternativamente um substrato análogo comercial, o N- α -acetil-L-arginina (N-AA), para estudar a ação de PAH1 (fig. 40B). Este substrato foi escolhido por já ter sido usado para atividade de PAH2. ^{42,44}

Figura 40 - Esquema da reação de PAH. (A) Reação de conversão de ácido guanidinoproclavamínico a ácido proclavamínico e uréia. (B) Reação de conversão do substrato análogo, N- α -acetil-L-arginina, catalisada por PAH, com a liberação de uréia. Sob a seta está mostrado seu cofator.

A reação contendo PAH1-His, seu cofator (Mn^{+2}) e o substrato N-AA em tampão pH 9,0 foram incubados com os reagentes do kit, sendo a liberação de uréia monitorada em 600 nm. Os controles deste experimento também foram feitos em paralelo à reação. Inicialmente, foram testados vários tampões (tris-HCl, Hepes, borato de sódio, PBS) a fim de avaliar sua influência no resultado, sendo escolhido o tampão borato de sódio pH 9,0 por este não apresentar absorção em 600 nm. O pH foi escolhido de acordo com os dados da literatura ⁴² mostrando que este é o pH ótimo de PAH2.

Em testes utilizando de 10 a 25 μM de PAH1, a mesma proporção do cofator e 1 mM de N-AA as absorbâncias obtidas foram de 0,003 a 0,008, valores muito baixos. Analisando os controles, também foi observado que a soma dos valores de absorbância destes era semelhante ao valor da reação, resultando numa absorbância final nula, isto é, o substrato e a própria enzima interferem no resultado. Em função disso, não se pode garantir, através desse kit, que a proteína esteja ativa.

Outra estratégia utilizada para o estudo da reação de PAH1 foi a Calorimetria de Titulação Isotérmica, a fim de se medir o calor gerado durante a atividade enzimática. Os experimentos foram realizados titulando-se o substrato em enzima para obtermos a entalpia molar aparente (ΔH_{app}) da reação.

Os resultados estão expostos na figura 41. Os termogramas mostraram que a entalpia da diluição de N-AA em tampão (-83,96 cal/mol) foi equivalente a entalpia da reação (-90,00 cal/mol), obtendo-se um ΔH_{app} de -6,05 cal/mol. O mesmo valor foi determinado tanto para PAH1-His quanto para PAH1 sem cauda (-1,03 cal/mol). Tanto os termogramas quanto os valores de entalpia mostram que a reação não foi mensurável.

Figura 41 - Termograma da titulação de N-AA em PAH1. Calor da reação de PAH1-His (à esquerda) e de PAH1 sem cauda (à direita). Condições experimentais: 25°C, agitação de 300 rpm, tempo de pré-titulação: 60s, tampão 50 mM borato sódio, 50 mM NaCl, pH9,0, concentração da enzima: 300 nM (na cela), concentração do substrato: 10 mM (na seringa), e concentração do cofator: 450 nM (na cela), injeção única de 15μL com duração de 30s. Comparando o calor de diluição de N-AA com o da reação nota-se que são idênticos, mostrando que na verdade, não está ocorrendo reação no sistema, comprovado pelo cálculo da entalpia (ΔH_{app}).

Apesar de PAH1 apresentar conservados todos os aminoácidos que compõem o sítio ativo e que participam da interação com o cofator, além de manter sua conformação como a de PAH2, ela não apresentou atividade nas condições testadas e pelas técnicas analisadas aqui.

Visto isso, sugerimos que a reação de PAH1 sobre o substrato N-AA não ocorra porque: 1) o substrato análogo não é reconhecido pela enzima, diferentemente de PAH2; 2) a proteína não é ativa *in vitro* necessitando de outros fatores para ser funcional. Esta hipótese juntamente como sugerido para CEAS1, leva em conta que as isoformas 1 envolvidas na síntese do ácido clavulânico e de clavamas não sejam ativas sozinhas e sim que atuem como um complexo enzimático, necessitando a presença de CEAS1, BLS1, CAS1 e PAH1 para agir na via de síntese até a formação do ácido clavamínico (precursor do ácido clavulânico e de clavamas 5S).

Com base nesta hipótese iniciamos um estudo de expressão dos genes iniciais da via, a fim de analisar se as proteínas expressas em conjunto formariam um complexo enzimático

ativo. Os genes *ceas1*, *bls1*, *pah1* em sequência como encontrados no *cluster* dos genes parálogos de *S.clavuligerus* foram clonados em vetor de expressão. Para isso, o *cluster* de genes de 4,3 kb foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico de *S.clavuligerus* e subclonado em vetor de expressão pET28a com sucesso. A região de ligação ao ribossomo (RBS) dos genes *bls1* e *pah1* foi mantida do próprio gene, e a região RBS de *ceas1* foi substituída por aquela do vetor de expressão. Os testes de expressão realizados a 37°C e a 18°C em células *E.coli* Rosetta (DE3) mostraram que *ceas1* é expresso em grande quantidade, porém, por SDS-PAGE não foi possível visualizar bandas referentes às massas moleculares de BLS1 ou PAH1.

Assim, por enquanto a hipótese ainda fica em aberto, porém ainda não descartada, pois as proteínas podem estar sendo expressas, porém em quantidades baixas. A montagem de vetores para co-expressão futuramente poderão trazer luz a esta questão.

4.6 Estudos com a proteína codificada pela *orf12*

Em estudos anteriores em nosso laboratório, realizados pelo pós-doc Leandro S. Gotto e pelo aluno de iniciação científica Bruno Yasui Matsuyama, foram obtidos resultados sobre a estabilidade protéica de ORF12 e de sua atividade sobre alguns substratos comumente utilizados para β -lactamases. Dados de CD e fluorescência mostraram que ORF12 se apresenta estável entre os pHs 8 a 11 e os dados de atividade indicaram que esta enzima age na hidrólise do ácido *m*-[[*(Fenilacetil)glicil*]*oxi*]benzóico e dos substratos CENTA e NITROCEFÍN, confirmando seu caráter β -lactamásico; ademais foi demonstrado que sua atividade era inibida na presença de ácido clavulânico.

É importante atentar que os substratos CENTA e NITROCEFÍN apresentam um anel β -lactâmico em sua estrutura e, portanto são cefâmicos, por outro lado, o substrato ácido *m*-[[*(Fenilacetil)glicil*]*oxi*]benzóico não possui tal anel (fig. 42). Porém foi sobre este substrato não cefâmico que ORF12 apresentou uma alta eficiência de hidrólise. Já para o NITROCEFÍN, além de ser uma reação lenta, foi encontrado que o ótimo para a atividade β -lactamásica ocorria em pH 11.

Figura 42 - Estruturas dos substratos de β -lactamases. CENTA e NITROCEFÍN apresentam o anel β -lactâmico em sua estrutura, ausente no ácido *m*-[[[(Fenilacetil)glicil]oxi]benzóico.

Este estudo preliminar sugeriu que as diferenças na atividade de ORF12 em relação a outras β -lactamases não eram somente relacionadas com sua baixa identidade sequencial. Como ORF12 apresentou características como pH de estabilidade e ótimo de catálise distintos de outras β -lactamases, provavelmente esta proteína pode ter uma estrutura e um mecanismo de ação distintos das β -lactamases conhecidas.

A fim de investigar suas características estruturais, neste trabalho foi dada continuidade aos estudos sobre ORF12. De forma complementar, analisamos o estado de oligomerização de ORF12 em solução utilizando SEC e eletroforese em condições nativas, como mostra a Figura 43. Uma amostra de ORF12-His foi aplicada em coluna Superdex 200 e seu perfil de eluição foi comparado a padrões (fig. 43A). O perfil de eluição mostra um único pico entre 14 e 16 mL. Esta amostra também foi aplicada em gel nativo e apresentou 2 bandas (fig. 43C). Pela curva de calibração, a massa molecular aparente de ORF12 foi calculada em 93 kDa (fig. 43B), ou seja, uma massa próxima com a de um dímero, uma vez que a massa de um monômero é de 52 kDa. Já a análise do gel nativo indicou uma mistura de dímeros e monômeros em solução.

Figura 43 - Análise do grau de oligomerização de ORF12-His. **(A) Cromatografia de exclusão molecular.** As frações eluídas de Ni-NTA foram aplicadas numa coluna *Superdex 200* (condições: tampão 25mM Tris, 25mM NaCl, pH 8,0; fluxo de 0,5mL/min, absorbância monitorada em 280 nm, frações coletadas de 1mL). Perfis cromatográficos de proteínas utilizadas como padrões de massa: ferritina (440 kDa), aldolase (158 kDa), conalbumina (75 kDa), e anidrase carbônica (29 kDa). O *blue dextran* foi utilizado para determinar o volume de exclusão da coluna. Em preto, o perfil cromatográfico de ORF12-His. **(B) Curva de calibração** de proteínas padrões e localização de ORF12-His após o cálculo da massa molecular aparente. **(C) Gel nativo de ORF12-His.**

4.6.1 Atividade enzimática

Durante o decorrer do projeto a estrutura cristalográfica de ORF12 foi resolvida e depositada no PDB (PDB 2XEP liberada em 06/2011 por Iqbala e colaboradores ⁹⁰), porém nenhum artigo descrevendo esta estrutura foi ainda publicado. A proteína apresentou-se como duas subunidades compondo um dímero, concordando com nossos resultados de exclusão molecular. Mais ainda, de acordo com os autores, ela foi classificada como uma cefalosporina C esterase (EC 3.1.1.41), ou seja, uma enzima que hidrolisa a ligação éster acetil na posição-10 da CPC, produzindo desacetil-CPC e acetato.

Levando-se em conta as informações referentes a estrutura de ORF12, podemos analisar nossos resultados com mais clareza. Sua classificação como uma cefalosporina esterase, catalisando a clivagem de uma ligação éster, concorda com os dados de atividade obtidos por nós sobre os substratos β -lactâmicos. ORF12 apresentou eficiente hidrólise sobre o substrato ácido *m*-[[[(Fenilacetil)glicil]oxi]benzoico, que apresenta uma estrutura de dois anéis (não β -lactâmicos) ligados por um éster (fig. 42), e já para os outros substratos, que possuíam anel β -lactâmico mas não a região equivalente a um éster de acetato, não apresentou atividade apreciável (mais lenta e em pH não fisiológico). Sendo assim, sua ação é mais evidente na clivagem de éster do que do anel β -lactâmico.

A partir desse dado, foi iniciado o estudo da atividade de ORF12 sobre os substratos cefalosporina C e *p*-nitrofenil acetato (*p*-NFA) (fig. 44), que são os encontrados na literatura como substratos de cefalosporina C esterases.

Figura 44 - Estruturas dos substratos testados na reação com ORF12. A flecha laranja indica a ligação clivada pelas cefalosporina C esterases.

4.6.1.1 Atividade sobre p-NFA

Os testes de atividade com p-NFA foram realizados em triplicatas e a formação do produto p-nitrofenol foi monitorada pela mudança da absorbância em 405 nm em função do tempo. Foram testadas várias concentrações de substrato, desde 15 μ M a 1 mM e também várias concentrações de enzima, de 0,1 nM a 1,25 μ M. A atividade foi também avaliada em diversos pHs, de 6,5 a 9,0, pois era conhecido que nesta faixa a proteína apresentava estabilidade estrutural.

A atividade sobre p-NFA foi comprovada como mostrado na Figura 45. Pela análise das curvas, nota-se que houve uma tendência de aumento na formação do produto conforme se aumenta a quantidade de substrato. As inclinações das curvas foram calculadas (dA/dt) e plotadas pela concentração de substrato ($[S]$) para a construção da curva da velocidade. A curva mostrou que nestas concentrações de substrato ainda não houve a saturação da enzima e ainda não podemos afirmar qual seria a velocidade máxima da reação e seus parâmetros cinéticos. Nossos dados preliminares mostraram uma tendência para o valor de K_m na faixa de mM o que vai de acordo com os valores encontrados para outras cefalosporinas C esterases.⁹¹

Figura 45 - Atividade de ORF12-His sobre o substrato p-NFA. Ensaio realizado em placa de 96 poços, através de diluição seriada do substrato (de 1mM a 15 μ M), em tampão 50mM fosfato de sódio pH 7,3, a temperatura ambiente. A reação foi iniciada pela adição de 500 nM ORF12-His em cada poço. A formação do produto p-nitrofenol foi monitorada por sua absorbância em 405 nm em função do tempo. Cada curva representa a reação numa concentração de substrato, sendo subtraídos os valores de absorbância dos controles.

A análise da reação em diversos pHs (fig. 46) mostrou que ORF12-His é ativa sobre p-NFA de pH 6,5 a pH 9,0. Nos pHs 6,5, 8,0, 8,5 e 9,0 a formação do produto se mostrou mais rápida do que nos pHs neutros (7,0 e 7,5). Isso mostra que a atividade está relacionada com a estabilidade estrutural da proteína, uma vez que as análises prévias por CD e fluorescência mostraram que ORF12 se mantém estável entre os pHs 8 e 11.

Figura 46 - Curva da conversão de p-nitrofenil acetato em p-nitrofenol por ORF12-His em diversos pHs. No gráfico estão indicadas as curvas da absorbância em 405 nm relativa a absorção do p-nitrofenol, durante os primeiros 20 min de reação, em cada pH. O ensaio foi realizado em triplicata e as curvas são referentes a média dos valores de Abs das triplicatas subtraindo os valores do controle do substrato. Concentração do substrato p-NFA: 0,5 mM (0,1% DMSO), concentração da enzima: 1,25 μ M, tampões: para pH 6,5 foi utilizado 25mM Bis-tris, 25mM NaCl; para pH 7,0 foi utilizado 100 mM fosfato de sódio; e para pH 8,0, 8,5 e 9,0 foi utilizado 25mM Tris-HCl, 300 mM NaCl. A reação foi iniciada com a adição da enzima.

A reação também foi analisada sob diferentes concentrações da enzima quando utilizado 0,2 mM de p-NFA (fig. 47). As curvas obtidas (fig. 47A) mostraram que em todas as concentrações utilizadas (de 0,1 nM a 1250 nM de enzima) a reação ocorreu, sendo que quanto maior a concentração da enzima, mais rápida a formação do produto. Uma vez que a inclinação da curva Abs x [E] corresponde a velocidade da reação (v), pois a variação da Abs (A) no tempo corresponde a taxa de formação do produto (P), foi construído o gráfico da velocidade x concentração de enzima (fig. 47B). Sendo assim, observamos que a velocidade

da reação é diretamente proporcional a concentração da enzima. Isso mostra que a enzima está ativa e a velocidade inicial da reação foi medida adequadamente.⁹²

Figura 47 - Reação em variadas concentrações de ORF12-His. (A) Curvas da absorbância em 405 nm relativa a absorção do p-nitrofenol, durante 28 min de reação, em cada concentração de enzima. (B) Taxa de formação do produto (velocidade da reação) pela concentração de enzima ($y = 0,094x + 3,23$). Condições do ensaio: 0,2 mM de p-NFA (0,08% DMSO), concentração da enzima: 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 500 nM e 1250 nM, tampão 50mM fosfato de sódio pH 7,3, temperatura ambiente. A reação foi iniciada com a adição do substrato. Controles da enzima e do substrato foram conduzidos simultaneamente e os valores destes foram descontados dos valores da reação para análise dos resultados.

4.6.1.2 Atividade sobre Cefalosporina C

Os testes de atividade de ORF12 sobre cefalosporina C foram conduzidos de acordo com Martínez-Martínez e colaboradores.⁶³ Levando-se em conta que a enzima foi classificada com uma cefalosporina esterase, ela deve atuar na catálise da ligação éster presente em CPC liberando ácido acético (fig. 44). Assim, a formação de ácido acético no decorrer do tempo foi monitorada pela mudança da absorbância em 616 nm, utilizando o indicador de pH azul de bromotimol (BTB).

Pelo fato da CPC ser comercialmente disponível como um sal de zinco, isso dificulta sua solubilização em tampão, o que foi possível somente em pH ácido. Como o ensaio justamente monitora a mudança de pH da reação, o pH do substrato por si só já estaria influenciando na Abs do teste. É válido ressaltar que os ensaios utilizando esta técnica mostraram que tanto o substrato quanto a enzima separadamente (controles) de fato influenciam na absorbância da reação. Então, através de diluições e aferições de pH feitas com muito cuidado, foi preparada uma solução estoque de 53,5 mM CPC pH 8 (no mesmo tampão da reação incluindo com o indicador de pH) para poder utilizá-la no ensaio. Assim, mesmo com a influência do substrato no teste, foi possível notar uma tendência da velocidade da reação. Subtraindo os valores dos controles dos valores encontrados para a reação, foram obtidas as curvas expostas na figura 48, indicando que a reação está ocorrendo.

Assim, a hidrólise dos substratos p-NFA e CPC comprovaram a atividade esterase de ORF12. A partir da metodologia traçada abrem-se possibilidades de se estudar o comportamento cinético desta enzima.

Figura 48 - Curva da hidrólise de Cefalosporina C por ORF12-His. O ensaio foi feito pela monitoração da Abs em 616nm, relativa à mudança de pH do sistema durante os primeiros 16 min, a temperatura ambiente. Foi realizada a diluição seriada do substrato CPC a partir do estoque de 53,5mM. As curvas são referente a hidrólise 1,65 mM de substrato. O tampão utilizado foi 5 mM Tris, 25mM NaCl pH8,0 com 0,01% BTB. A reação foi iniciada com a adição de 3 μ M da enzima, preparada no mesmo tampão. Controles da enzima e do substrato foram conduzidos simultaneamente e os valores destes foram descontados do valor da reação.

4.6.2 Análise da estrutura

Com os dados da estrutura cristalográfica de ORF12 que foi depositada, mas ainda não foi publicada, realizamos aqui um estudo na tentativa de relacionar sua estrutura com a atividade.

Analisando a estrutura resolvida (PDB 2XEP) foi observado que as duas subunidades que compõem o dímero (fig. 49) interagem através de contatos hidrofóbicos e algumas poucas ligações de hidrogênio. Interessantemente, em cada subunidade estão ligadas duas moléculas de ácido clavulânico. O primeiro interage com os aminoácidos: His-84, Trp-91, Val-93, Leu-362, Arg-418, Gly- 419 e Ala-422 e com 7 moléculas de água, através de ligações de hidrogênio; e o segundo interage com 5 moléculas de água por ligações de hidrogênio e com os resíduos: Lys-89, Ser-173, Thr-209, Ser-234, Tyr-359, Ala-376, Ser-378, Asp-413 e Arg418, por outro tipo de interação (fig. 50).

Figura 49 - Estrutura quaternária de ORF12. Em vermelho, cadeia A e em verde, cadeia B. Em cada cadeia há 2 moléculas de ácido clavulânico. Os pontos vermelhos representam as moléculas de água (imagem extraída do PDB 2xf3).

Figura 50 - Representação das interações de ácido clavulânico na estrutura de ORF12. Duas moléculas de ácido clavulânico (J01 600 e J01 500) se ligam a dois sítios diferentes em cada subunidade da proteína (indicada na figura como A). A molécula J01 500 interage com 5 moléculas de água por ligações de hidrogênio. (Extraído de *PDBSum* 2xf3).

A estrutura da proteína ORF12 apresentou um domínio comum da família de β -lactamases que incluem as penicilases e cefalosporinas inibidas por ácido clavulânico. Seu enovelamento é do tipo β -lactamases/transpeptidase, composto por um conjunto de hélices e

um α - β -*sandwich*. Estas enzimas pertencem a classe de serina β -lactamases do grupo 2 (correspondendo as classes A, C e D).⁹³ Uma característica comum a estas enzimas é a presença do motivo Ser-X-X-Lys, compondo o sítio ativo. Estas enzimas exibem um alto grau de variabilidade e somente um pequeno número de resíduos são conservados além da serina catalítica.⁹⁴

Na Figura 51 temos a sequência de aminoácidos da proteína destacando os resíduos que mostram similaridade com o motivo encontrado nas β -lactamases (em vermelho na fig. 51) e o motivo ¹⁷³SAYK¹⁷⁶ do sítio catalítico das serina β -lactamases do grupo 2 (em verde na fig. 51). É interessante notar que a ORF12 perde 3 dos 4 motivos altamente conservados para a atividade em β -lactamases, restando somente o motivo SDN (em amarelo na fig. 51).⁴⁹ Os resíduos catalíticos Ser-173 e Ser-234 também mostraram ser resíduos de interação com o ácido clavulânico. Isso faz sentido uma vez que o ácido clavulânico é inibidor deste tipo de enzima e sendo um inibidor suicida¹², ele tem a característica de se ligar diretamente ao sítio ativo das β -lactamases bacterianas (que é o sítio de ligação do substrato β -lactâmico).

10	20	30	40	50	60
MMKKADSVPT	PAEALAAQT	ALAADDSPMG	DAARWAMGLL	TSSGLPRPED	VAARFIPTFA
70	80	90	100	110	120
AAGNFAETVR	EWRSKGPFTV	RAYHPVAHKG	WVLSAPAGV	RYILSLTLD	SGLIRILTLK
130	140	150	160	170	180
PETVIPDMVT	WNDVEETLHT	PGVQHSVYAV	RLTPDGHEVL	HASAPERPMP	TG ¹⁷³ SAYK ¹⁷⁶ LYLM
190	200	210	220	230	240
RALVAEIEKG	TVGWDEILTL	TPELRS�PTG	DMQDLPDGTR	VTVRETAHKM	IALSDNTGAD
250	260	270	280	290	300
LVADRLGREV	VERSLAAAGH	HDPSLMRPFL	TSHEVFELGW	GDPERRAEWV	RQDEAGRREL
310	320	330	340	350	360
LEKMAGVMTV	RGSDLGATVH	QLGIDWHMDA	FDVVRVLEGL	LQDSGRDTSG	TVEEILTAYP
370	380	390	400	410	420
GLLIDEERWR	RVYFKAGSSP	GVMFVCWLLQ	DHAGISYVLV	LRQSADEQRL	IGDGLFLRGI
430	440	450	458		
GAKIIEAEAK	LLSSGERRGA	GTAAAGDDRA	SAGEAARR		

Figura 51 - Sequência de aminoácidos da proteína codificada por *orf12*. Em vermelho, os aminoácidos referentes ao domínio das β -lactamases; em destaque amarelo, o único motivo de β -lactamases conservado; e em verde os aminoácidos do sítio ativo Ser-X-X-Lys (a numeração está de acordo com dados do PDB 2XEP).

Portanto, a ORF12 apresentou identidade com as serina β -lactamases em relação ao domínio, ao enovelamento e a presença da Ser como resíduo catalítico sobre os substratos β -lactâmicos, mais precisamente sobre a cefalosporina C. Não houve similaridade com nenhum outro tipo de proteína. Assim, foi classificada como uma cefalosporina esterase, a qual possui dois sítios de ligação ao ácido clavulânico, seu potencial inibidor, sendo que um deles interage diretamente com a Ser-173 e Ser-234 catalíticas. Ainda não está claro porque duas moléculas de ácido clavulânico interagem em dois sítios diferentes, apesar de esses sítios estarem muito próximos um do outro, conforme visto na estrutura. Talvez a ligação dessas moléculas na proteína seja um processo cooperativo e a ligação de um possa de alguma forma, regular ou interferir na atividade cefalosporina esterase. Alguns sistemas já foram estudados a respeito da inibição de cefalosporinases por ácido clavulânico, que foi considerada fraca¹², porém os mecanismos diferem muito entre os sistemas estudados, carecendo ainda de mais dados para conclusões desse tema.

Baseado nessas análises e tendo com foco a via biossintética de ácido clavulânico sugerimos que a proteína ORF12 possa atuar em *S.clavuligerus* no controle da produção simultânea de ácido clavulânico e de cefamicina C, em algum tipo de resposta *feed-back*.

Uma vez que na via de síntese do ácido clavulânico não há nenhuma molécula com as características do substrato de ORF12 (a cefalosporina C) é possível que esta enzima não esteja atuando diretamente sobre esta via. Porém, se analisarmos a biossíntese de CefC, na Figura 52, podemos identificar que um dos seus precursores também é precursor de cefalosporina C (CPC). Nesta via a enzima DAC-acetiltransferase age sobre este precursor, convertendo-o a CPC. A enzima ORF12, que é uma desacetilase, agiria então no inverso desta reação, levando talvez a um aumento da produção de CefC, uma vez que haverá mais moléculas precursoras (desacetil cefalosporinaC). Assim, durante a produção de CefC, ORF12 seria capaz de hidrolisar CPC, sendo esta reação modulada pela presença de ácido clavulânico.

Quanto a relação de ORF12 com a produção de ácido clavulânico, ainda é difícil entender como se dá este controle. Alguns estudos tem mostrado que a regulação da produção de ácido clavulânico diretamente relacionada com a de CefC pela proteína reguladora CcaR.²⁶
²⁷ A tecnologia de substituição gênica usada para prevenir metabólitos indesejados vem sendo aplicada para aumentar a produção de ácido clavulânico enquanto previne a produção de CefC.¹⁴ Num estudo de Mellado e colaboradores⁹⁵ transformantes com múltiplas cópias de genes envolvidos na via de síntese do ácido clavulânico, incluindo *orf12*, mostraram aumento na produção de ácido clavulânico em mais de 100%, mas não na produção de CefC, o que vai

de acordo com nossa sugestão de controle via *feed-back*. De modo geral, parece haver uma complexa interregulação entre a produção de CefC e ácido clavulânico para que o organismo produtor tenha alguma vantagem, mas esse tema ainda está em aberto.

Figura 52 - Rota da biossíntese de cefamicina C. Nota-se que CefC e CPC possuem um precursor comum (destacado). A enzima DAC-acetiltransferase age no inverso da reação de ORF12 (em vermelho), inserida no esquema mostrando a hidrólise de cefalosporina C a desacetilcefalosporina C. (Extraído e modificado de ¹⁶).

5 CONCLUSÕES

O objetivo deste trabalho de tese foi caracterizar estrutural e funcionalmente enzimas envolvidas na via de síntese de ácido clavulânico e de clavamas 5S. Através de uma abordagem multidisciplinar que contou com clonagem e expressão heteróloga dos genes, técnicas cromatográficas, CD, ITC, Espectrometria de Massas, modelagem molecular por homologia e técnicas bioquímicas para ensaios enzimáticos, foi realizado o primeiro estudo das proteínas recombinantes CEAS1, PAH1 e da proteína codificada pela *orf12*, de *Streptomyces clavuligerus*.

Apesar do gene *bls1* ter sido isolado e clonado como os outros genes do estudo, a proteína recombinante BLS1 foi obtida na forma insolúvel, sem prosseguimento de sua caracterização estrutural.

Foram estabelecidos dois sistemas de expressão e purificação eficientes para CEAS1 e PAH1 e um para ORF12. Sob o ponto de vista do estado de oligomerização das proteínas foi identificado que CEAS1 apresenta-se em um equilíbrio dinâmico de conformações, ou seja, em solução há uma mistura de oligômeros não separáveis pela técnica de SEC. A proteína PAH1 apresenta-se como hexâmero e ORF12, como uma mistura de monômeros e dímeros.

No estudo sobre a interação do cofator magnésio com CEAS1 foi concluído que é um processo espontâneo, endotérmico e entropicamente dirigido, com uma constante de afinidade da ordem de grandeza encontrada para outras proteínas ligantes de Mg^{+2} .

A modelagem por homologia e a predição do conteúdo de estrutura secundária baseada na análise de CD mostram que CEAS1 e PAH1, assim como suas isoformas, são compostas de α -hélices e folhas- β e apresentam grande estabilidade térmica e a variação de pH. As isoformas 1 mostram alta identidade sequencial com as isoformas 2. Isto se estende tanto para a conservação dos aminoácidos envolvidos na interação com os cofatores e com os substratos, bem como na conservação da estrutura tridimensional (de acordo com análise de CD, modelagem e de oligomerização). Apesar disso, CEAS1 não mostrou a atividade prevista sobre os substratos D-G3P e L-arg convertendo-os em CEA, como mostra CEAS2, com as técnicas ensaiadas. Porém, foi possível observar que a interação com o primeiro substrato (o D-G3P) acontece provavelmente até o intermediário enol(ato)-ThDP, mas o mecanismo de catálise parece não prosseguir até a formação do produto final (o CEA).

Com relação à enzima PAH1, os ensaios de atividade até agora não demonstram que ela está ativa. Porém, este resultado pode não ser definitivo, uma vez que não foi testado seu substrato natural, mas sim um análogo, pelo qual sua isoforma demonstrou menor afinidade que pelo substrato natural.

Assim, apesar das isoformas 1 apresentarem tantas características estruturais em comum com as isoformas 2, seus mecanismos de ação podem ser diferentes. Existe também a possibilidade destas enzimas só serem ativas quando presentes num complexo enzimático formado entre as isoenzimas 1, e por isso não teriam atividade independentemente.

Em relação a proteína codificada pela *orf12* nossos estudos mostram que ela tem ação esterase sobre o substrato p-NFA e sobre a cefalosporinaC e também sobre dois substratos de β -lactamases cujas estruturas contém grupos esteres hidrolisáveis. Juntamente com a análise da estrutura cristalográfica depositada, esta proteína pode ser classificada como uma cefalosporina esterase pertencente a família das serina β -lactamases. De acordo com essa família e analisando a estrutura, ORF12 apresenta dois sítios de ligação ao ácido clavulânico (seu inibidor), sendo que a ligação de um ácido clavulânico pode de alguma forma, regular ou interferir na atividade cefalosporina esterase. Porém isso ainda não foi comprovado experimentalmente. Mais dados são necessários para que possamos explicar o papel de ORF12 na produção ácido clavulânico e seu provável papel na regulação da produção de CefC em *S.clavuligerus*.

Em conclusão, o presente trabalho trata-se do primeiro estudo feito e relatado com as proteínas CEAS1, PAH1 e ORF12, o qual poderá auxiliar no encaminhamento de futuras pesquisas relacionadas a *S.clavuligerus*.

REFERÊNCIAS

- 1 SANCHEZ, S. et al. Carbon source regulation of antibiotic production. **The Journal of Antibiotics**, v. 63, n. 8, p. 442-59, 2010.
- 2 BENTLEY, S.D. et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Nature**, v. 417, n. 6885, p. 141-147, 2002.
- 3 BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. **The Journal of antibiotics**, v. 58, n. 1, p. 1-26, 2005.
- 4 VAN WEZEL, G. P.; MCDOWALL, K. J. The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 7, p. 1311-1333, 2011.
- 5 GIUDICI, R.; PAMBOUKIAN, C. R.; FACCIOTTI, M. C. Morphologically structured model for antitumoral retamycin production during batch and fed-batch cultivations of *Streptomyces olindensis*. **Biotechnology Bioengineering**, v. 86, n. 4, p. 414-24, 2004.
- 6 OMURA, S. et al. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 21, p. 12215-12220, 2001.
- 7 HIGGENS, C. E.; KASTNER, R. E. *Streptomyces clavuligerus* sp. nov., a β -Lactam antibiotic producer. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 21, n. 4, p. 326-331, 1971.
- 8 ELANDER, R.P. Industrial production of beta-lactam antibiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, n. 5-6, p. 385-392, 2003.
- 9 MATAGNE, A. et al. The beta-lactamase cycle: a tale of selective pressure and bacterial ingenuity. **Natural Product Reports**, v. 16, n. 1, p. 1-19, 1999.
- 10 BROWN, A. G. et al. Naturally occurring β -lactamase inhibitors with antibacterial activity. **Journal of Antibiotics**, v. 29, n. 6, p. 668-669, 1976.

- 11 BAGGALEY, K. H.; BROWN, A. G.; SCHOFIELD, C. J. Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and other clavams. **Natural Product Reports**, v. 14, n. 4, p. 309-333, 1997.
- 12 SHAHID, M. et al. Beta-lactams and Beta-lactamase-inhibitors in current or potential clinical practice: a comprehensive update. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 81-108, 2009.
- 13 LIRAS, P.; RODRIGUEZ-GARCIA, A. Clavulanic acid, a beta-lactamase inhibitor: biosynthesis and molecular genetics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 4, p. 467-475, 2000.
- 14 SONG, J. Y.; JENSEN, S. E.; LEE, K. J. Clavulanic acid biosynthesis and genetic manipulation for its overproduction. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 88, n. 3, p. 659-669, 2010.
- 15 TAHLAN, K. et al. 5S clavam biosynthetic genes are located in both the clavam and paralog gene clusters in *Streptomyces clavuligerus*. **Chemistry & Biology**, v. 14, n. 2, p. 131-142, 2007.
- 16 OLIVEIRA, J. H. H. L. D. et al. Ácido clavulânico e cefamicina c: uma perspectiva da biossíntese, processos de isolamento e mecanismo de ação. **Química Nova**, v. 32, n. p. 2142-2150, 2009.
- 17 KHALEELI, N.; LI, R. F.; TOWNSEND, C. A. Origin of the beta-lactam carbons in clavulanic acid from an unusual thiamine pyrophosphate-mediated reaction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, n. 39, p. 9223-9224, 1999.
- 18 BACHMANN, B. O.; LI, R. F.; TOWNSEND, C. A. β -Lactam synthetase: a new biosynthetic enzyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 16, p. 9082-9086, 1998.
- 19 BALDWIN, J.E. et al. A substrate analog study on clavaminic acid synthase: possible clues to the biosynthetic origin of proclavamic acid. **Journal of the Chemical Society-Chemical Communications**, v. n. 6, p. 500-502, 1993.
- 20 ELSON, S. W. et al. The identification of three new biosynthetic intermediates and one further biosynthetic enzyme in the clavulanic acid pathway. **Journal of the Chemical Society - chemical communications**, v. n. 15, p. 1212-1214, 1993.

21 SALOWE, S. P. et al. Elucidation of the order of oxidations and identification of an intermediate in the multistep clavamate synthase reaction. **Biochemistry**, v. 30, n. 8, p. 2281-92, 1991.

22 NICHOLSON, N. H. et al. Evidence that the immediate biosynthetic precursor of clavulanic acid is its N-Aldehyde analog. **Journal of the Chemical Society**, chemical communications, n. 11, p. 1281-1282, 1994. DOI: 10.1039/C39940001281

23 CAINES, M. E. C. et al. Crystal structure and mechanistic implications of N-2-(2-carboxyethyl)arginine synthase, the first enzyme in the clavulanic acid biosynthesis pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 7, p. 5685-5692, 2004.

24 MEDEMA, M. H. et al. The sequence of a 1.8-Mb bacterial linear plasmid reveals a rich evolutionary reservoir of secondary metabolic pathways. **Genome Biology and Evolution**, v. 2, n. p. 212-224, 2010.

25 WARD, J. M.; HODGSON, J. E. The biosynthetic genes for clavulanic acid and cephamycin production occur as a super-cluster in 3 *Streptomyces*. **Fems Microbiology Letters**, v. 110, n. 2, p. 239-242, 1993.

26 ALEXANDER, D. C.; JENSEN, S. E. Investigation of the *Streptomyces clavuligerus* cephamycin C gene cluster and its regulation by the CcaR protein. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 16, p. 4068-4079, 1998.

27 BIGNELL, D. R. D. et al. Expression of ccaR, encoding the positive activator of cephamycin C and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*, is dependent on bldG. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1529-1541, 2005.

28 JENSEN, S. E. et al. *Streptomyces clavuligerus* has a second copy of the proclavamate amidinohydrolase gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 2, p. 514-520, 2004.

29 MARSH, E. N.; CHANG, M. D. T.; TOWNSEND, C. A. Two isozymes of clavamate synthase central to clavulanic acid formation: cloning and sequencing of both genes from *Streptomyces clavuligerus*. **Biochemistry**, v. 31, n. 50, p. 12648-12657, 1992.

30 TAHLAN, K.; ANDERS, C.; JENSEN, S. E. The paralogous pairs of genes involved in clavulanic acid and clavam metabolite biosynthesis are differently regulated in *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 18, p. 6286-6297, 2004.

- 31 TAHLAN, K. et al. Two sets of paralogous genes encode the enzymes involved in the early stages of clavulanic acid and clavam metabolite biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 930-939, 2004.
- 32 PEREZ-REDONDO, R. et al. Deletion of the *pyc* gene blocks clavulanic acid biosynthesis except in glycerol-containing medium: evidence for two different genes in formation of the C3 unit. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 22, p. 6922-8, 1999.
- 33 JORDAN, F. Current mechanistic understanding of thiamin diphosphate dependent enzymatic reactions. **Natural Product Reports**, v. 20, n. 2, p. 184-201, 2003.
- 34 CAINES, M. E. C.; SORENSEN, J. L.; SCHOFIELD, C. J. Structural and mechanistic studies on N-2-(2-carboxyethyl)arginine synthase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 385, n. 4, p. 512-517, 2009.
- 35 KERSHAW, N. J. et al. The enzymology of clavam and carbapenem biosynthesis. **Chemical Communications**, n. 34, p. 4251-4263, 2005. DOI: [10.1039/b505964j](https://doi.org/10.1039/b505964j)
- 36 MERSKI, M.; TOWNSEND, C. A. Observation of an acryloyl-thiamin diphosphate adduct in the first step of clavulanic acid biosynthesis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 51, p. 15750-15751, 2007.
- 37 BACHMANN, B. O.; TOWNSEND, C. A. Kinetic mechanism of the beta-lactam synthetase of *Streptomyces clavuligerus*. **Biochemistry**, v. 39, n. 37, p. 11187-11193, 2000.
- 38 MILLER, M. T. et al. The catalytic cycle of beta-lactam synthetase observed by x-ray crystallographic snapshots. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 23, p. 14752-14757, 2002.
- 39 MILLER, M. T. et al. Structure of beta-lactam synthetase reveals how to synthesize antibiotics instead of asparagine. **Nature Structural Biology**, v. 8, n. 8, p. 684-689, 2001.
- 40 MCNAUGHTON, H. J. et al. β -lactam synthetase: implications for β -lactamase evolution. **Chemical Communications**, v. n. 21, p. 2325-2326, 1998.
- 41 AIDOO, K. A. et al. Cloning, sequencing and disruption of a gene from *Streptomyces clavuligerus* involved in clavulanic acid biosynthesis. **Gene**, v. 147, n. 1, p. 41-46, 1994.

42 WU, T. K. et al. Identification, cloning, sequencing, and overexpression of the gene encoding proclavamate amidino hydrolase and characterization of protein function in clavulanic acid biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 13, p. 3714-3720, 1995.

43 YEON, S. J. et al. Functional effects of increased copy number of the gene encoding proclavamate amidino hydrolase on clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 417-426, 2008.

44 ELKINS, J. M. et al. Oligomeric structure of proclavaminic acid amidino hydrolase: evolution of a hydrolytic enzyme in clavulanic acid biosynthesis. **Biochemical Journal**, v. 366, pt. 2, p. 423-434, 2002.

45 KANYO, Z. F. et al. Structure of a unique binuclear manganese cluster in arginase. **Nature**, v. 383, n. 6600, p. 554-557, 1996.

46 BEWLEY, M. C. et al. Crystal structures of *Bacillus caldovelox* arginase in complex with substrate and inhibitors reveal new insights into activation, inhibition and catalysis in the arginase superfamily. **Structure with Folding & Design**, v. 7, n. 4, p. 435-448, 1999.

47 LI, R. F.; KHALEELI, N.; TOWNSEND, C. A. Expansion of the clavulanic acid gene cluster: identification and in vivo functional analysis of three new genes required for biosynthesis of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 14, p. 4087-4095, 2000.

48 JENSEN, S. E. et al. Five additional genes are involved in clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 192-202, 2004.

49 JENSEN, S. E. Biosynthesis of clavam metabolites. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 39, n. 10, p. 1407-1419, 2012.

50 SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989. 800 p.

51 SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463-7, 1977.

52 LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

53 GREEN, A. A.; HUGHES, W. L. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. **Methods in Enzymology**, v. 1, p. 67-90, 1955.

54 WILKINS, M. R. et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. **Methods in Molecular Biology**, v. 112, p. 531-52, 1999.

55 KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta**-proteins and proteomics, v. 1751, n. 2, p. 119-139, 2005.

56 SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. **Analytical Biochemistry**, v. 287, n. 2, p. 252-260, 2000.

57 WIDMANN, M.; RADLOFF, R.; PLEISS, J. The thiamine diphosphate dependent enzyme engineering database: a tool for the systematic analysis of sequence and structure relations. **BMC Biochemistry**, v. 11, n. 9, 2010. DOI:10.1186/1471-2091-11-9.

58 ARNOLD, K. et al. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**, v. 22, n. 2, p. 195-201, 2006.

59 GUEX, N.; PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, v. 18, n. 15, p. 2714-23, 1997.

60 SCHWEDE, T. et al. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3381-5, 2003.

61 BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics**, v. 27, n. 3, p. 343-350, 2011.

62 WEBB, M. R. A continuous spectrophotometric assay for inorganic phosphate and for measuring phosphate release kinetics in biological systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 11, p. 4884-4887, 1992.

63 MARTINEZ-MARTINEZ, I. et al. A colorimetric assay for the determination of acetyl xylan esterase or cephalosporin C acetyl esterase activities using 7-amino cephalosporanic acid, cephalosporin C, or acetylated xylan as substrate. **Analytical Biochemistry**, v. 369, n. 2, p. 210-217, 2007.

64 JOHN, G.T.; HEINZLE, E. Quantitative screening method for hydrolases in microplates using pH indicators: determination of kinetic parameters by dynamic pH monitoring. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 72, n. 6, p. 620-627, 2001.

65 ABABOU, A.; LADBURY, J. E. Survey of the year 2004: literature on applications of isothermal titration calorimetry. **Journal of Molecular Recognition**, v. 19, n. 1, p. 79-89, 2006.

66 TODD, M. J.; GOMEZ, J. Enzyme kinetics determined using calorimetry: a general assay for enzyme activity? **Analytical Biochemistry**, v. 296, n. 2, p. 179-187, 2001.

67 HAQ, I. **Calorimetry in the fast lane**: the use of ITC for obtaining enzyme kinetic constants. application note. Sheffield, UK, 2005. Disponível em: <http://www.microcalorimetry.com>>. Acesso em: 03 maio 2009.

68 CHELESKI, J. et al. Kinetic mechanism and catalysis of *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase enzyme evaluated by isothermal titration calorimetry. **Analytical Biochemistry**, v. 399, n. 1, p. 13-22, 2010.

69 WIGGERS, H. J. et al. Effects of organic solvents on the enzyme activity of *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in calorimetric assays. **Analytical Biochemistry**, v. 370, n. 1, p. 107-114, 2007.

70 LADBURY, J. E.; DOYLE, M. L. **Biocalorimetry 2**: applications of calorimetry in the biological sciences. Chichester ; Hoboken: Wiley, 2004. 259 p.

71 MCPHERSON, A. **Preparation and analysis of protein crystals**. New York: Wiley, 1982. 371 p. 0471085243.

72 NOBARY, S. G. **Investigating the clavam gene cluster in *Streptomyces antibioticus* Tü1718**. 2011. 156 f. Dissertação (Master of Science in Microbiology and Biotechnology) - Department of Biological Sciences, University of Alberta, Alberta, 2011.

73 NOBARY, S. G.; JENSEN, S. E. A comparison of the clavam biosynthetic gene clusters in *Streptomyces antibioticus* Tu1718 and *Streptomyces clavuligerus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 58, n. 4, p. 413-425, 2012.

74 BHASIN, M.; BILLINSKY, J. L.; PALMER, D. R. J. Steady-state kinetics and molecular evolution of *Escherichia coli* MenD [(1R,6R)-2-succinyl-6-hydroxy-2,4-cyclohexadiene-1-carboxylate synthase], an anomalous thiamin diphosphate-dependent decarboxylase-carboligase. **Biochemistry**, v. 42, n. 46, p. 13496-13504, 2003.

75 DUGGLEBY, R. G. Domain relationships in thiamine diphosphate-dependent enzymes. **Accounts of Chemical Research**, v. 39, n. 8, p. 550-557, 2006.

76 COMPTON, L. A.; JOHNSON, W. C. Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. **Analytical Biochemistry**, v. 155, n. 1, p. 155-167, 1986.

77 PARADKAR, A. S.; JENSEN, S. E. Functional analysis of the gene encoding the clavamate synthase-2 isoenzyme involved in clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 5, p. 1307-1314, 1995.

78 FRANK, R.; LEEPER, F.; LUISI, B. Structure, mechanism and catalytic duality of thiamine-dependent enzymes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 7, p. 892-905, 2007.

79 FRANK, R. A. W. et al. A molecular switch and proton wire synchronize the active sites in thiamine enzymes. **Science**, v. 306, n. 5697, p. 872-876, 2004.

80 COWAN, J. A. Structural and catalytic chemistry of magnesium-dependent enzymes. **Biometals**, v. 15, n. 3, p. 225-235, 2002.

81 DAWSON, A.; FYFE, P. K.; HUNTER, W. N. Specificity and reactivity in menaquinone biosynthesis: the structure of *Escherichia coli* MenD (2-Succinyl-5-Enolpyruvyl-6-Hydroxy-3-Cyclohexadiene-1-Carboxylate Synthase). **Journal of Molecular Biology**, v. 384, n. 5, p. 1353-1368, 2008.

82 KERN, D. et al. How thiamine diphosphate is activated in enzymes. **Science**, v. 275, n. 5296, p. 67-70, 1997.

83 RABER, M. L. **Mechanistic analyses on the early steps of clavulanic acid biosynthesis**. 2009. 204 f. Thesis (Doctor of Philosophy) - Johns Hopkins University, Baltimore, 2009.

84 BIANCONI, M. L. Calorimetry of enzyme-catalyzed reactions. **Biophysical Chemistry**, v. 126, n. 1-3, p. 59-64, 2007.

85 BIANCONI, M. L. Calorimetric determination of thermodynamic parameters of reaction reveals different enthalpic compensations of the yeast hexokinase isozymes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 21, p. 18709-18713, 2003.

86 LONHIENNE, T. et al. Enzyme activity determination on macromolecular substrates by isothermal titration calorimetry: application to mesophilic and psychrophilic chitinases. **Biochimica et Biophysica Acta-protein structure and molecular enzymology**, v. 1545, n. 1-2, p. 349-356, 2001.

87 MURPHY, L. et al. An enzymatic signal amplification system for calorimetric studies of cellobiohydrolases. **Analytical Biochemistry**, v. 404, n. 2, p. 140-148, 2010.

88 YI, J. Z. et al. Effect of substitutions in the thiamin diphosphate-magnesium fold on the activation of the pyruvate dehydrogenase complex from *Escherichia coli* by cofactors and substrate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 52, p. 33192-33200, 1996.

89 LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3rd ed. New York: Springer, 2006. 954 p.

90 IQBALA, A.; VALEGARD, K.; KERSHAW, N. J.; IVISON, D.; GENEREUX, C.; DUBUS, A.; ANDERSSON, I.; SCHOFIELD, C. J. **Research scientist structural and mechanistic studies on a cephalosporin esterase from the clavulanic acid biosynthesis pathway**. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2XEP>>. Acesso em: 20 out 2011.

91 TAKIMOTO, A. et al. Purification, characterization and partial amino acid sequences of a novel cephalosporin-C deacetylase from *Bacillus subtilis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 77, n. 1, p. 17-22, 1994.

92 COPELAND, R.A. **Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis**. 2nd ed. New York: Wiley, 2000. 397 p. 0471359297

93 BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211-1233, 1995.

94 SIGRIST, C. J. A. et al. PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. D161-D166, 2010.

95 MELLADO, E. et al. The clavulanic acid biosynthetic cluster of *Streptomyces clavuligerus*: genetic organization of the region upstream of the car gene. **Microbiology**, v. 148, p. 1427-1438, 2002.