

LAURA ALEJANDRA RIVAS ARENAS

Biologia estrutural de enzimas relacionadas com a formação do grupo (S)-4-amino-2-hidroxitirato (AHBA) durante a biossíntese de butirato

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2020

LAURA ALEJANDRA RIVAS ARENAS

Biologia estrutural de enzimas relacionadas com a formação do grupo (S)-4-amino-2-hidroxitirato (AHBA) durante a biossíntese de butirato

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Marcio Vinícius Bertacine Dias

Versão corrigida

São Paulo

2020

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Rivas Arenas, Laura Alejandra

Biologia estrutural de enzimas relacionadas com a formação do grupo (S)-4-amino-2-hidroxi-butirato (AHBA) durante a biossíntese de butirosina. / Laura Alejandra Rivas Arenas; orientador Marcio Vinícius Bertacine Dias. -- São Paulo, 2020.

73 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Produtos naturais . 2. Aminoglicosídeos. 3. Butirosina. 4. AHBA. 5. Cristalografia. I. Bertacine Dias, Marcio Vinícius , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Laura Alejandra Rivas Arenas

Título da Dissertação: Biologia estrutural de enzimas relacionadas com a formação do grupo (S)-4- amino-2-hidroxi-butirato (AHBA) durante a biossíntese de butirósina

Orientador: Prof. Dr. Marcio Vinícius Bertacine Dias

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

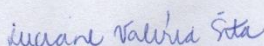


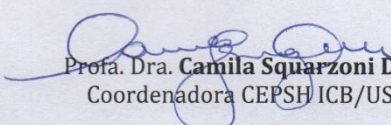
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **957/2018** referente ao projeto intitulado: "**Biologia estrutural de enzimas relacionadas com a formação do grupo (S)-4-amino-2-hidroxibutirato (AHBA) da biossíntese de butirósina**" sob a responsabilidade de **Laura Alejandra Rivas Arenas** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Márcio Vinicius Bertacini Dias**, do Departamento de Microbiologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466/2012.

São Paulo, 15 de maio de 2018.


Prof. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA ICB/USP


Prof. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
Coordenadora CEPSH ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pela companhia e apoio permanente. Apesar da distância física, as nossas mentes e corações permanecem sempre unidos. Por todo apoio desde criança, por alimentar constantemente a minha curiosidade e por cada palavra que me impulsou a ser uma mulher mais corajosa. Sem eles, nada disso seria possível.

Ao Paulo, meu grande companheiro, quem me acompanhou desde o começo deste processo. Agradeço todo o amor oferecido, além dos ensinamentos sobre o Português e sobre a vida. Agradeço também por ser um dos meus maiores suportes nos momentos mais difíceis e um grande parceiro nos reconfortantes triunfos. Amo muito você.

Ao Professor Marcio pela possibilidade de realizar este projeto e pela sua orientação no meu trabalho; a todos os professores que estiveram presentes e contribuíram na minha formação acadêmica; ao Prof. Peter Leadlay da Universidade de Cambridge e todo seu grupo colaborador, pelos plasmídeos gentilmente cedidos ao nosso grupo.

Aos meus colegas de trabalho do Laboratório de Biologia Estrutural Aplicada (LBEA), muitos deles meus grandes amigos; ao Gerardo, por ser meu mentor nas primeiras aproximações com o mundo das proteínas; à Fernanda quem, além de me oferecer todo seu conhecimento na área e me ajudar enormemente com este projeto, me brindou todo seu amor o que permitiu que construíssemos uma grande amizade; à Catharina, pela sua imensa harmonia em cada explicação subministrada e por todo seu conhecimento e experiência; ao Sair, quem sempre teve a melhor disposição para me apresentar os seus conhecimentos indispensáveis para este projeto; ao Bruno, que em pouco tempo, foi uma das companhias acadêmicas e emocionais mais sólidas; à Priscila pela sua disposição a me mostrar os seus conhecimentos na parte de resolução de estruturas; à Tábata, pelos ensinamentos em vários protocolos e pela sua companhia na bancada que ilumina o ambiente com a sua alegria; ao Nicolas, por se mostrar sempre disposto em comunicar os seus conhecimentos; à Andreza, pela sua presença em tantos momentos divertidos e por ser uma grande companheira neste processo acadêmico; à Paula e ao Gabriel por compartilhar momentos tão especiais no laboratório.

Aos companheiros do laboratório vizinho, Cindy Lee e ao Marcelo pelos nossos cafés filosóficos de cada tarde que nos permitiram pensar muito sobre a construção da ciência no

Brasil e na América Latina e pela ajuda no planejamento dos meus experimentos.

À grande companhia dos meus amigos de outros laboratórios do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), com quem compartilhei grandes ideias, cafés e momentos nos corredores do departamento, indispensáveis no meu desenvolvimento como cientista. Aos meus amigos fora do instituto, de quem recebi um grande suporte em todos os aspectos que permitiram que a minha estadia no Brasil fosse uma experiência maravilhosa. E não menos importante, aos meus amigos da Colômbia sempre atentos à evolução meu projeto.

À toda minha família pela preocupação pelo meu bem estar fora de casa, assim como pelas palavras de suporte em todo momento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela ajuda financeira (protocolo número 133838/2018-8).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro dos projetos do laboratório e do ICB.

À Universidade de São Paulo (USP) por fornecer a infraestrutura necessária para o desenvolvimento deste projeto, assim como todos os seus funcionários sempre prestativos para as necessidades dos estudantes.

Aos coordenadores e técnicos das linhas de luz MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) e da linha P13, PETRA III, *Deutsche Elektronen-Synchrotron (DESy)* na Alemanha.

“As nossas posturas, a nossa suposta auto-importância, a ilusão de termos qualquer posição de privilégio no Universo, são desafiadas por este pontinho de luz pálida. O nosso planeta é um grão solitário na imensa escuridão cósmica que nos cerca. Na nossa obscuridade, em toda esta vastidão, não há indícios de que vá chegar ajuda de outro lugar para nos salvar de nós próprios.”

Carl Edward Sagan

RESUMO

RIVAS L.A. **Biologia estrutural de enzimas relacionadas com a formação do grupo (S)-4-amino-2-hidroxi-butirato (AHBA) durante a biossíntese de butirosina.** 2020. 73 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A butirosina é um aminoglicosídeo produzido por *Bacillus circulans* que apresenta um grupo (S)-4-amino-2-hidroxi-butirato (AHBA) ligado à aglicona 2-deoxiestreptamina (2-DOS). A presença do grupo AHBA é capaz de diminuir a suscetibilidade do antibiótico às enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs) produzidas por bactérias patogênicas. Porém, a biossíntese do grupo AHBA é pouco compreendida. Com a intenção de entender a biossíntese desse grupo, estudamos estruturalmente duas enzimas desta via: a BtrJ que catalisa a ligação de uma molécula de L-glutamato com a *holo*-BtrI, uma proteína carreadora de peptidil (PCP); e a BtrK que descarboxila o intermediário da reação anterior. As enzimas foram super expressas em células competentes de *E. coli* e posteriormente purificadas por cromatografia de afinidade e exclusão molecular. Foram realizados ensaios de cristalização mediante as técnicas de difusão de vapor para as proteínas nativas e em presença do sus cofatores. Obtivemos cristais da BtrK e BtrJ que foram difratados em fonte de luz Síncrotron. Os cristais da BtrK pertencem ao grupo espacial P2₁2₁2. A estrutura da BtrK foi determinada mediante substituição molecular. Estruturalmente, a BtrK apresenta dois domínios: um barril TIM e um barril β sanduíche que interagem entre si. A dimerização acontece pela interação de domínios entre dois monómeros constituindo dois sítios ativos. Um resíduo de lisina Lys49 conservado forma uma base Schiff com o cofator piridoxal-5'-fosfato (PLP). O sítio ativo é altamente conservado quando comparado com enzimas homólogas, sendo principalmente hidrofóbico e com um potencial eletropositivo. De acordo com os ensaios de ancoragem molecular, o L-glutamato, substrato parcial da BtrK, não interage diretamente com o PLP, mas faz ligações com resíduos próximos que podem ajudar na sua estabilização no bolsão catalítico. Não foi possível detectar um sinal anômalo derivado da incorporação de metais pesados para a BtrJ, mas obtivemos cristais promissores com incorporação de selenometionina. Mediante ensaios de DSF, pudemos inferir a necessidade de *holo*-BtrI para a formação de um complexo estável com a BtrJ.

Palavras chave: Produtos naturais. Aminoglicosídeos. Butirosina. AHBA. Cristalografia.

ABSTRACT

RIVAS L.A. **Structural biology of enzymes involved in the (S)-4-amino-2-hydroxybutyrate (AHBA) biosynthesis from the aminoglycoside butirosin.** 2020. 73 p. Master thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Butirosin is an aminoglycoside produced by *Bacillus circulans* which has a (S)-4-amino-2-hydroxybutyrate (AHBA) moiety bonded to a 2-deoxystreptamine (2-DOS) aglycone. The presence of AHBA decreases the antibiotic susceptibility to aminoglycoside modifying enzymes (AMEs) produced by pathogenic bacteria. However, the several points of the biosynthesis of AHBA remain unclear. With the objective to understand the biosynthesis of this chemical group, herein we perform a structural study of two enzymes of this pathway: BtrJ which catalyses the bounding of a L-glutamate molecule with the *holo*-BtrI, a peptidyl carrier protein (PCP); and BtrK which decarboxylates the intermediary of BtrJ's reaction. The enzymes were overexpressed in *E. coli* competent cells and purified by affinity chromatography followed by size exclusion chromatography. Crystallization assays were performed through vapor diffusion technique for the proteins in their native conformations as well as in the presence of their cofactors. BtrK and BtrJ crystals were obtained and were exposed to X-ray to obtain diffraction data in the Synchrotron light source. BtrK protein crystals belong to P2₁2₁2 space group. Phasing was done by molecular replacement and two domains were identified: one TIM barrel and another β -sandwich interacting between themselves. Dimerization occurs with the interaction of the domains between two monomers that constitutes two active sites. A conserved lysine Lys49 residue forms a Schiff base with pyridoxal-5'-phosphate (PLP) cofactor. Active site is highly conserved when compared to homologous enzymes, being mostly hydrophobic and electropositive. According to the molecular docking assays, L-glutamate, partial BtrK's substrate, does not interact directly with the PLP, but bonds with nearby residues that can aid stabilize it in the catalytic pocket. It was not possible to identify an anomalous scattering from the heavy metal soaking for BtrJ crystals, however, we obtained promising crystals with selenomethionine incorporation. Through DSF experiments, we inferred the need for *holo*-BtrI for the formation of a stable complex with BtrJ.

Keywords: Natural products. Aminoglycosides. Butirosin. AHBA. Crystallography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais mecanismos de ação dos antimicrobianos.	19
Figura 2. Mecanismos de ação dos aminoglicosídeos.....	22
Figura 3. Classificação dos aminoglicosídeos de acordo com o aminociclitol.	24
Figura 4. Agrupamentos gênicos da família de aminoglicosídeos derivados da neomicina...	25
Figura 5. Biossíntese da estrutura comum da neamina da família dos AGs derivados da 2-DOS	26
Figura 6. Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs) mais representativas.....	27
Figura 7. Biossíntese da butirosina B em <i>Bacillus circulans</i>	30
Figura 8. Purificação por exclusão molecular da BtrK.	39
Figura 9. Experimento de DSF da proteína BtrK.	40
Figura 10. Cristais da BtrK em estado nativo.....	41
Figura 11. Estrutura monomérica da BtrK.	42
Figura 12. Estrutura dimérica da BtrK.	43
Figura 13. Superfícies de potencial eletrostático e hidrofobicidade da BtrK na sua conformação monomérica.	45
Figura 14. Diferenças na superfície eletrostática do homodímero da BtrK.	46
Figura 15. Representação do sítio ativo da BtrK.....	47
Figura 16. Densidade eletrônica do sítio ativo da BtrK.	48
Figura 17. Superposição da estrutura monomérica da BtrK e as DAPDC.....	49
Figura 18. Superposição do sítio ativo da BtrK e as DAPDC homólogas.	50
Figura 19. Alinhamento da sequência estrutural da BtrK e as DAPDC homólogas	52
Figura 20. Diferenças na superfície da proteína BtrK de acordo o grau de conservação dos aminoácidos.	53
Figura 21. Possível interação do L-glutamato com a BtrK.	54
Figura 22. Superfície eletrostática do homodímero da BtrK e a localização do seu substrato parcial L-glutamato.....	55
Figura 24. Purificação por exclusão molecular da BtrJ em estado nativo.....	57
Figura 23. Experimento de DSF da proteína BtrJ.	57
Figura 25. Purificação por exclusão molecular da BtrJ com incorporação de SeMet.....	58
Figura 26. Cristais da BtrJ.....	60
Figura 27. Purificação por exclusão molecular da <i>apo</i> -BtrI.....	62

Figura 28. Curva padrão de BSA para método de Bradford.	63
Figura 29. Ensaio de DSF para a interação entre a BtrJ e seu substrato e em presença da sua adjuvante BtrI.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados de difração raios X da proteína BtrK com o PLP. Estatísticas para a última camada de maior resolução são mostradas em parênteses.....	44
Tabela 2. Difração da BtrJ com Br.	61
Tabela 3. Temperatura de melting das enzimas BtrJ e BtrI assim como na presença do seu substrato.	64

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

°C	graus Celsius
μg	micrograma (10 ⁻⁶ g)
μL	microlitro (10 ⁻⁶ L)
μM	micromolar (10 ⁻⁶ M)
2-DOS	2-deoxiestreptamina
4'-PP	4'-fosfopanteteína
Å	Ångström
ACP	<i>Acyl Carrier Protein</i> (Proteína carreadora de acila)
ADP	Adenosina difosfato
AG	Aminoglicosídeo
AHBA	(S)-4-amino-2-hidroxitirato
ATP	Adenosina trifosfato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Albumina de soro bovino
CV	Volumen de columna
C α	Carbono α
DAP	Diaminopimelato
DAPDC	Descarboxilase de Diaminopimelato
DSF	<i>Differential Scanning Fluorimetry</i> (Fluorimetría Diferencial de Varredura)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
EMA	Enzima Modificadora de Aminoglicosídeo
FMN	Mononucleótido de Flavina

g	grama
GF	Filtração em gel/Cromatografia de exclusão molecular
h	hora
HEPES	(N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico)
IMAC	<i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i> (Cromatografia de afinidade por íons metálicos)
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
kDa	QuiloDalton (10^3 Dalton)
L	Litro
M	Molar (mol/L)
MAD	<i>Multi-wavelength anomalous dispersion</i>
MES	2-(N-morfolino) etanossulfônico monohidratado
mg	miligrama (10^{-3} g)
min	minuto
mL	mililitro (10^{-3} L)
mM	milimolar (10^{-3} M)
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
nm	nanômetro
OD ₆₀₀	Densidade ótica à 600 nm
p/v	peso por volume
PCP	<i>Peptidyl Carrier Protein</i> (Proteína carreadora de peptidil)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polietilenglicol
PLP	Piridoxal-5'-fosfato
PSMF	Fluoreto de fenilmetano sulfonilo

rpm	rotação por minuto
SAD	<i>Single-wavelength anomalous dispersion</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
seg	segundo
Se-Met	Selênio-Metionina
SO	<i>SYPRO</i>
Tm	Temperatura de melting
TSA	<i>Thermal Shift Assay</i> (Ensaio de deslocamento térmico)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	<i>Produtos naturais</i>	18
1.1.1	<u><i>Ferramentas de exploração de produtos naturais</i></u>	20
1.2	<i>Aminoglicosídeos (AGs)</i>	21
1.2.1	<u><i>Mecanismos de resistência e toxicidade</i></u>	25
1.3	<i>Butirosina</i>	29
2	OBJETIVOS	33
3	MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1	<i>Clonagem e expressão</i>	34
3.2	<i>Expressão com selenometionina</i>	34
3.3	<i>Purificação das enzimas</i>	35
3.4	<i>Confirmação da presença e quantificação da proteína</i>	35
3.5	<i>Fluorimetria diferencial de varredura (DSF)</i>	36
3.6	<i>Cristalização das proteínas</i>	37
3.7	<i>Coleta e processamento de dados de difração de Raios X</i>	37
3.8	<i>Resolução de estruturas e refinamento cristalográfico</i>	37
3.9	<i>Ancoragem molecular</i>	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39

4.1	<i>Expressão e purificação da BtrK</i>	39
4.2	<i>Cristalização e caracterização estrutural da BtrK</i>	41
4.2.1	<u><i>Sítio ativo e mecanismo de ação</i></u>	46
4.3	<i>Comparação da BtrK com homólogas</i>	49
4.4	<i>Possível reconhecimento do substrato da BtrK</i>	53
4.5	<i>Expressão e purificação da BtrJ</i>	56
4.6	<i>Cristalização da BtrJ e coleta de dados</i>	58
4.7	<i>Interação da BtrJ com L-glutamato</i>	61
5	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Produtos naturais*

Vários produtos naturais são agentes anticancerígenos e antibióticos importantes devido à sua diversidade e propriedades farmacológicas. Estes compostos bioativos são produtos do metabolismo secundário principalmente de plantas, fungos, actinomicetos e cianobactérias, capazes de interagir com alvos essenciais de diferentes organismos. Os efeitos destas moléculas incluem uma grande variedade de ações biológicas, incluindo a modulação do canal de sódio, inibição de proteases e inibição de vias biossintéticas (CLARDY; FISCHBACH; WALSH, 2006; HARVEY, 2008). Desta forma, produtos naturais também podem ser usados como agentes imunossupressores, hipocolesterolêmicos, antifúngicos, anti-inflamatórios, entre outras aplicações médicas e veterinárias.

Os produtos naturais apresentam grandes vantagens, entre elas a sua novidade e diversidade estrutural pois seus centros quirais, anéis e grupos funcionais são mais complexos do que compostos sintéticos (ZHANG; DEMAINE, 2005). Essas moléculas, também, têm evoluído para se ligar a novos alvos já que são selecionados pela natureza para interações específicas. Apesar dos produtos naturais serem amplamente inexplorados, podem direcionar o desenho de compostos sintéticos gerando análogos com melhores propriedades farmacológicas (HARVEY, 2008) e ainda podem apresentar novos mecanismos de ação não descobertos (ZHANG; DEMAINE, 2005).

Geralmente os genes responsáveis pela biossíntese de produtos naturais estão localizados em agrupamentos gênicos que levam à transcrição de diferentes classes de enzimas envolvidas em sua biossíntese, transporte e resistência (WRIGHT, 2014). Entre estas enzimas, é comum encontrar glicosiltransferases, aminotransferases e deoxiredutases que são capazes de transformar moléculas intermediárias da via glicolítica ou derivados de acetil-CoA, em compostos altamente funcionalizados, como os aminoglicosídeos e policetídeos.

A exploração dos produtos naturais permitiu o seu reconhecimento como uma fonte potencial de moléculas antibióticas. A maioria de antibióticos de uso clínico implementados nos últimos 70 anos, são produtos naturais sintetizados por diferentes microrganismos como uma resposta de adaptação ao seu ambiente. Isso acontece especificamente na fase estacionária,

quando os microrganismos precisam competir por espaço e nutrientes o que leva à ativação de genes que codificam enzimas capazes de produzir tais moléculas (WALSH, 2003; DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). Os antibióticos ou antimicrobianos podem ser classificados de acordo com o seu mecanismo de ação que interferem na: (1) biossíntese da parede celular como os β -lactâmicos; (2) biossíntese de proteínas como os aminoglicosídeos; (3) replicação do DNA e reparo como as quinolonas e (4) biossíntese de folato como as sulfonamidas (**Figura 1**) (WALSH, 2003).

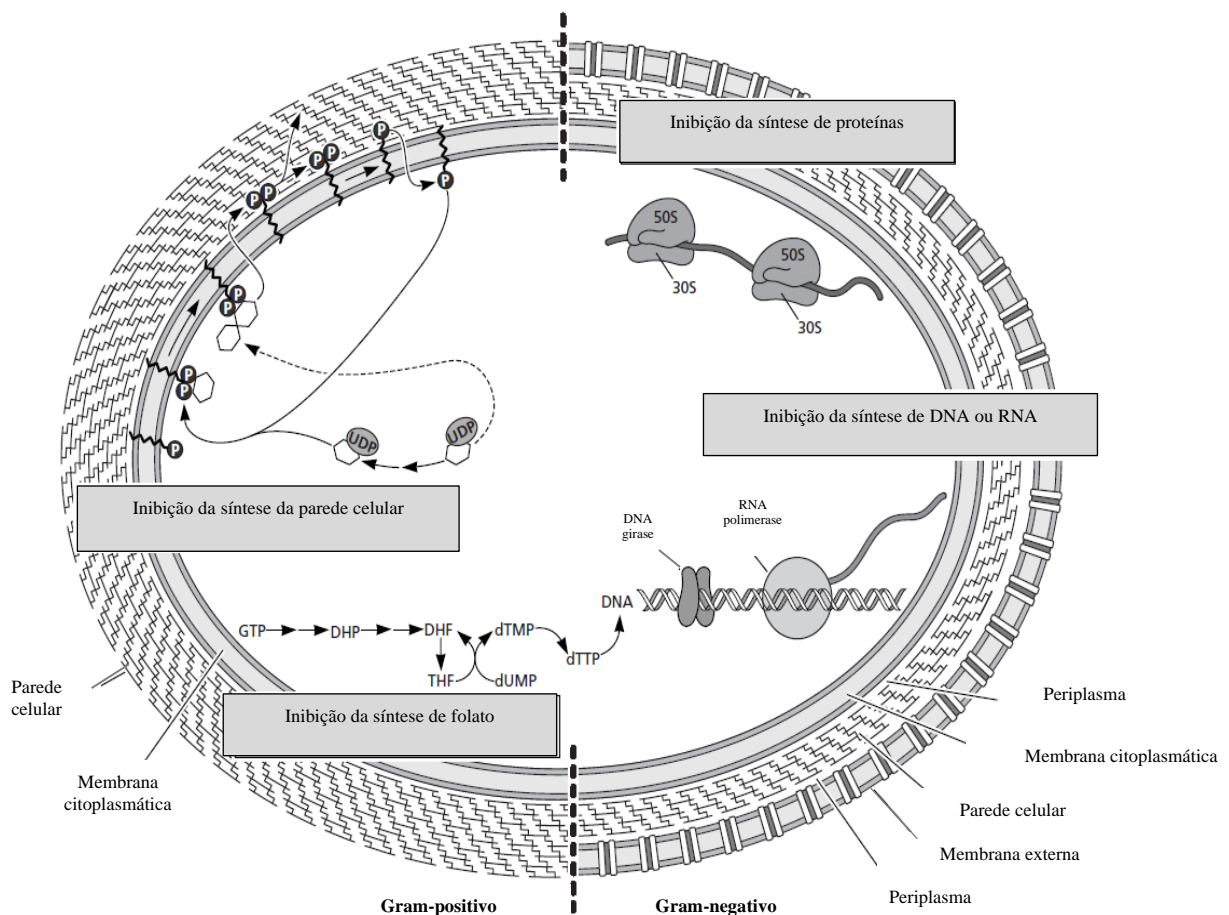


Figura 1. Principais mecanismos de ação dos antimicrobianos.

Os antimicrobianos atuam sobre diferentes organelas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas causando uma perda da estabilidade celular. Imagem adaptada de Walsh, 2003.

Clinicamente, entre os antibióticos mais utilizados encontram-se os policetídeos, peptídeos não ribossômicos e aminoglicosídeos (PHAM et al., 2019). Tanto os policetídeos como os peptídeos não ribossômicos são primariamente produzidos por megasintases que consistem em múltiplos domínios organizados em módulos que adicionam progressivamente unidades

extensoras ligadas na fosfopanteteína de uma proteína carreadora de acila (ACP do inglês *acyl carrier protein*) ou uma proteína carreadora de peptidil (PCP do inglês *peptidyl carrier protein*). A diversidade destas moléculas depende de enzimas como as cetossintases, que são capazes de incorporar uma ampla variedade de unidades extensoras naturais e não naturais e cetoreduases que reduzem estereoespecificamente as β -carbonilas (TIBREWAL; TANG, 2014).

Após a montagem da aglicona ou o antibiótico em maturação, podem acontecer mudanças que transformem a molécula em um composto ativo. Essa ação é coordenada por enzimas conhecidas como “alfaiates” (*tailoring enzymes* em inglês) que realizam a adição de diferentes grupos funcionais como grupos amino, amidos, acetil, açúcares e átomos de halogênio. Estes contribuem não só com a diversidade estrutural, mas também com o reconhecimento de novos alvos, com a solubilidade e com a estabilidade das moléculas (TIBREWAL; TANG, 2014). Além disso, as enzimas alfaiates podem ainda, realizar modificações dos grupos químicos nas cadeias policetílicas através de reduções ou oxidações (NGUYEN et al., 2013; TIBREWAL; TANG, 2014).

1.1.1 Ferramentas de exploração de produtos naturais

A descoberta de novos antibióticos tem se tornado essencial no combate às diferentes bactérias multi-resistentes, à aparição de novas doenças e à geração de moléculas menos tóxicas, criando uma necessidade para o estudo de novos alvos biológicos. Graças ao desenvolvimento de diferentes instrumentos e de plataformas como a triagem de alto desempenho (HTS do inglês *High-Throughput Screening*), hoje é possível realizar uma avaliação dos compostos de uma maneira mais rápida e econômica (ZHANG; DEMAIN, 2005). Porém, para a exploração dos produtos naturais como fonte farmacêutica, deve-se superar alguns desafios como o isolamento de microrganismos não cultiváveis, a caracterização de um volume grande de moléculas, a escassa produção do composto ativo e a redundância dos metabólitos estudados (WRIGHT, 2014).

Portanto, existem diferentes estratégias amplamente estudadas para superar esses problemas, como a exploração sistemática dos ecossistemas através de novas técnicas de coleta que permitem o crescimento e isolamento de espécies representativas de uma população (ZHANG; DEMAIN, 2005). Também tem sido implementada a expressão de DNA do ambiente em hospedeiros heterólogos que permite a inserção de novos agrupamentos gênicos e

consequentemente a produção heteróloga dos metabólitos desejados (ZHANG; DEMAIN, 2005; CLARDY; FISCHBACH; WALSH, 2006; HARVEY, 2008). Do mesmo modo, a manipulação e diversificação das condições fisiológicas dos microrganismos facilita a geração de diferentes compostos químicos. O uso de cepas geneticamente modificadas que produzem compostos microbianos ‘não naturais’ derivados de compostos naturais também tem permitido o desenvolvimento de várias novas moléculas bioativas. Isso ocorre graças a técnicas de biossíntese combinatorial onde há uma troca de genes presentes nos agrupamentos que geram vias biossintéticas híbridas permitindo a síntese de novas moléculas (HARVEY, 2008; PHAM et al., 2019). Igualmente, a implementação de técnicas como espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massas (MS), cromatografia líquida de alto desempenho (CLAD) permitem a comparação dos perfis de metabólitos em uma amostra que facilita a construção de bibliotecas de produtos naturais (ZHANG; DEMAIN, 2005).

Finalmente, o desenvolvimento e avanço da biologia estrutural tem permitido uma melhor exploração da engenharia de proteínas que auxilia na elucidação de mecanismos catalíticos (CLARDY; FISCHBACH; WALSH, 2006). Estudos estruturais permitem a visualização de modos de ligação de substratos facilitando o processo de descoberta de um novo candidato tanto na triagem inicial como nas etapas de otimização (CLARDY; FISCHBACH; WALSH, 2006). Ferramentas bioinformáticas também são utilizadas para prever quais microrganismos poderão produzir novos compostos químicos com base nas sequências de genes presentes nos agrupamentos gênicos ortólogos (HARVEY, 2008).

Assim, a integração da bioquímica e biologia estrutural tem contribuído enormemente na pesquisa e no desenvolvimento de novas moléculas naturais e sintéticas. Por exemplo, Bury et al., 2007 elucidou as bases estruturais do mecanismo de metilação de uma *N*- metiltransferase na biossíntese de gentamicina, bem como mostrou que essa enzima é promiscua para a interação com outros aminoglicosídeos gerando novos derivados de canamicina e tobramicina (BURY et al., 2017).

1.2 Aminoglicosídeos (AGs)

A exploração de pequenos compostos bioativos em microrganismos do solo permitiu a descoberta da estreptomicina, o primeiro aminoglicosídeo a ser caracterizado (ARYA, 2007). Isso conduziu à consolidação da indústria biofarmacêutica moderna e ao isolamento de diferentes moléculas de bactérias do solo e de outros ambientes com propriedades importantes

no tratamento de doenças, sejam elas infecciosas ou não (ARYA, 2007). A estreptomicina, isolada de *Streptomyces griseus*, foi introduzida para uso clínico em 1944 e nos anos posteriores foram implementados outros aminoglicosídeos como a canamicina, gentamicina, neomicina, netilmicina, tobramicina e ampicacina, isolados de diferentes espécies de *Streptomyces* e *Micromonospora* (KRAUSE et al., 2016).

Os AGs são antibióticos de amplo espectro altamente aaminados que se unem irreversivelmente à unidade ribossomal 30S interferindo na leitura do código genético e produzindo sequências proteicas erradas (**Figura 2A**). Também podem interferir na ligação do tRNA com o respectivo rRNA na tradução ou impedido a translocação do tRNA do sítio-A ao

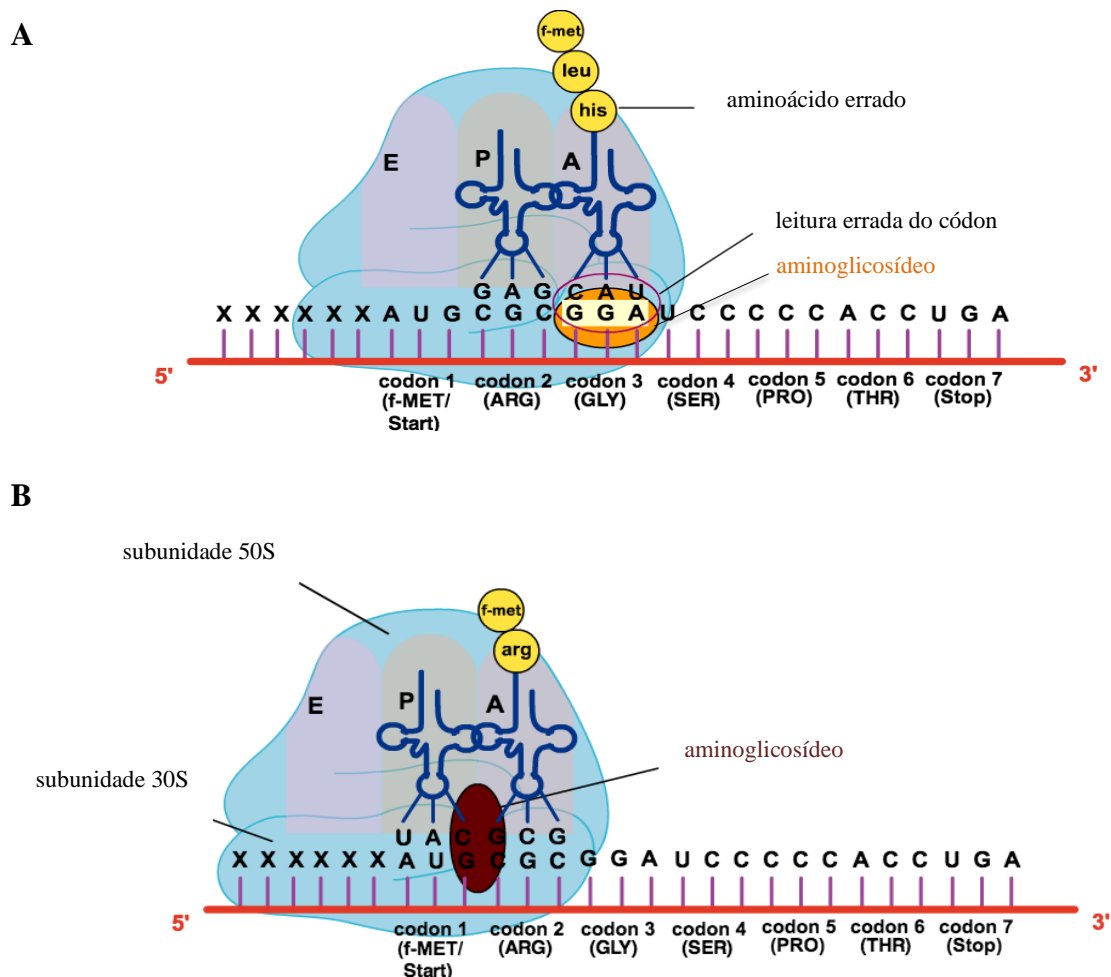


Figura 2. Mecanismos de ação dos aminoglicosídeos.

(A) O antibiótico se liga irreversivelmente à subunidade 30S do ribossomo causando a leitura errada do códon afetando a síntese da proteína. (B) O antibiótico interfere com a translocação do tRNA do sítio-A para o sítio-P. Imagem adaptada de Kaiser, Gary (Community College of Baltimore).

sítio-P (**Figura 2B**) (EDSON; TERRELL, 1999)(KOTRA; HADDAD; MOBASHERY, 2000).

Os AGs apresentam grupos amino que são carregados positivamente e interagem com os componentes da membrana bacteriana carregados negativamente (como fosfolipídios e ácidos teicóicos), deslocando íons de magnésio que levam à ruptura da membrana externa para facilitar a entrada do antibiótico (KRAUSE et al., 2016). Uma vez que o AG se encontra no citoplasma, acontece a inibição da síntese de proteínas ou a geração de proteínas erradas causando a morte celular (KUDO; EGUCHI, 2009a; KRAUSE et al., 2016).

Estes antibióticos geralmente são eficazes para o tratamento de infecções graves causadas por ambas bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, e são particularmente eficazes no combate às enterobactérias (KRAUSE et al., 2016). Também apresentam boa atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e contra *Mycobacterium* spp, sendo a estreptomicina o primeiro tratamento efetivo contra a tuberculose (EDSON; TERRELL, 1999; KOTRA; HADDAD; MOBASHERY, 2000; ARYA, 2007; KUDO; EGUCHI, 2009a; KRAUSE et al., 2016).

As estruturas dos AGs, apresentam ligações glicosídicas entre as posições 4 e 5 ou 4 e 6 de um ciclitol e diferentes aminoaçúcares, e são altamente funcionalizados por diversas enzimas que rendem estruturas químicas complexas. De acordo com o tipo de ciclitol ou aglicona que apresentam no centro da estrutura, os AGs podem ser classificados em aqueles derivados da 2-deoxiestreptamina (2-DOS) (**Figura 3A**) e os derivados do *mio*-inositol (**Figura 3B**) (KUDO; EGUCHI, 2009b). As duas estruturas são derivadas da glicose-6-fosfato, que mediante a ação de diferentes enzimas, geram os núcleos dos AGs.

Os genes responsáveis pela produção dos AGs estão organizados em agrupamentos gênicos, embora alguns genes de resistência tenham sido encontrados fora desta região (**Figura 4**). A descoberta dos genes *btr* da butirosina, impulsionou a exploração de agrupamentos gênicos da família de AGs derivados da 2-DOS (KUDO; EGUCHI, 2009b). Nesta família, é identificado um grupo de 7 enzimas conservadas (2DOI sintase, L-glutamina:2DOI aminotransferase, desidrogenase NAD-dependente, glicosiltransferase, deacetilase, desidrogenase FAD-dependente e uma aminotransferase) associadas à biossíntese da estrutura em comum da neamina, tanto dos AGs 4,5-disubstituídos (e.g. butirosina e neomicina) como dos 4,6-disubstituídos (e.g. canamicina, tobramicina e gentamicina) (ARYA, 2007; KUDO; EGUCHI, 2009a) (**Figura 4 e 5**).

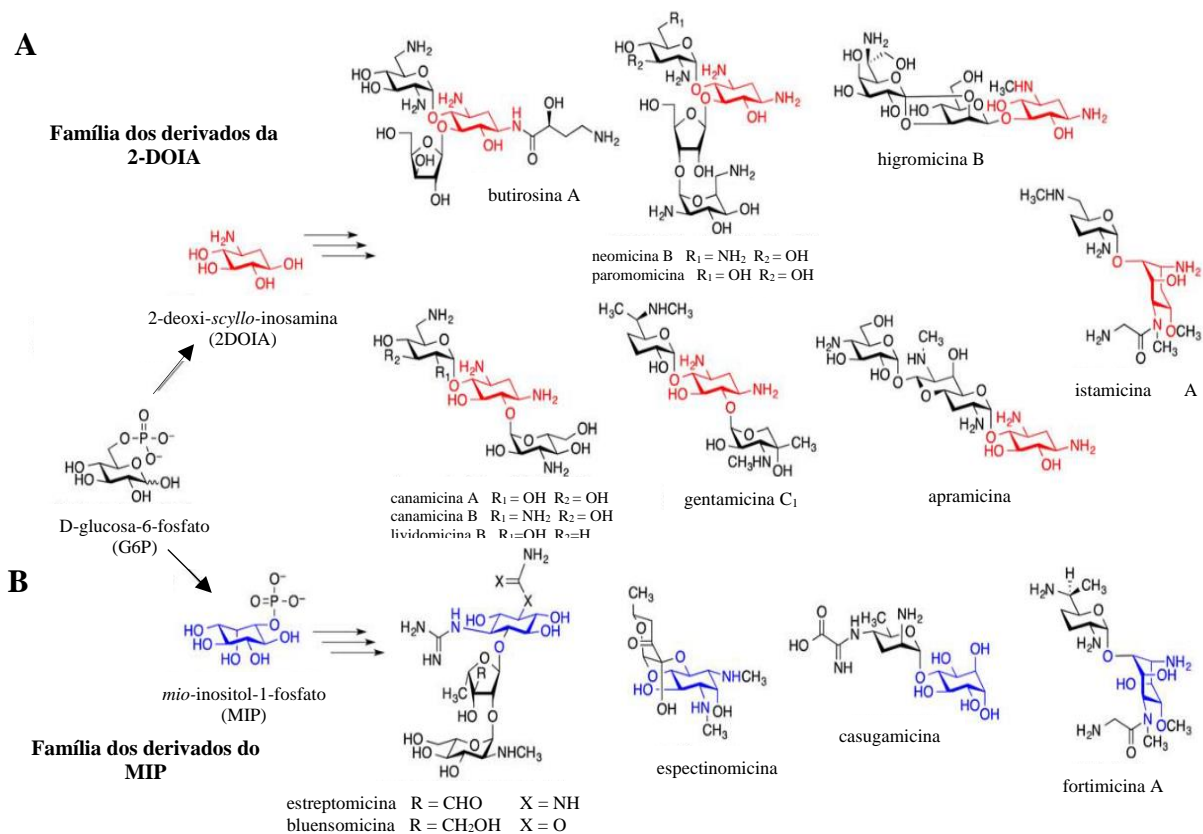


Figura 3. Classificação dos aminoglicosídeos de acordo com o aminociclitol.

(A) Família dos derivados da 2-deoxiestreptamina (2-DOS) identificada em vermelho que compreende a maioria dos AGs. (B) Família dos derivados do mio-inositol-1-fosfato (MIP) identificado em azul. Imagem adaptada de Kudo e Eguchi, 2016.

A 2-DOI sintase permite a formação do intermediário 2-deoxi-scilo-inososa (2DOI) a partir da glicose-6-fosfato, que posteriormente é convertido em 2-deoxi-scilo-inosamina (2DOIA) pela ação de uma aminotransferase (**Figura 5**). No agrupamento gênico para a butirosina, a aminotransferase é nomeada BtrR, uma enzima dimérica dependente de PLP que apresenta similaridade estrutural com outras aminotransferases de aspartato associadas ao metabolismo secundário (POPOVIC et al., 2006). Em seguida, uma desidrogenase dependente de NAD atua sobre o C-1 que gera o amino-DOI (KUDO et al., 2005). No caso da butirosina, a enzima responsável pela desidrogenação é a BtrN, uma radical SAM que pertence a um grupo de proteínas que catalisa uma grande diversidade de reações (WANG; FREY, 2007). Novamente, a 2-DOI aminotransferase ajuda na biossíntese do aminociclitol 2-DOS que posteriormente é glicosilado mediante uma glicosiltransferase estruturando o intermediário *N*-

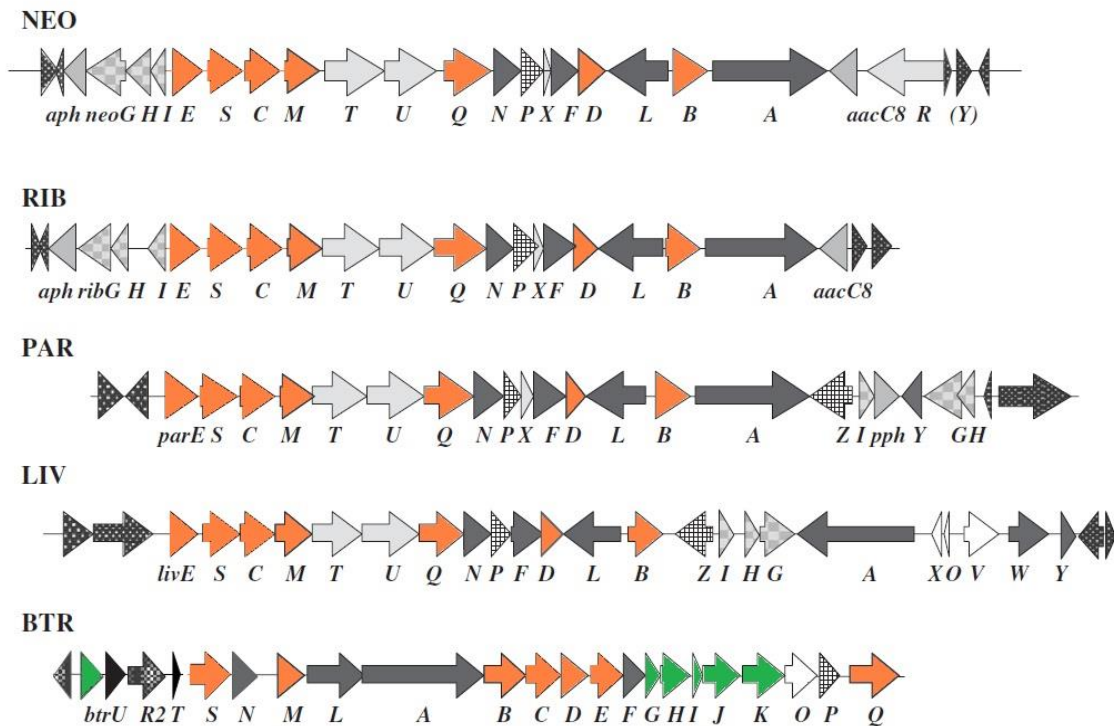


Figura 4. Agrupamentos gênicos da família de aminoglicosídeos derivados da neomicina.

NEO neomicina, RIB ribostamicina, PAR paramomicina, LIV livodomicina e BTR butirosina. Em laranja, os genes associados com a formação da neomicina. Em verde, os 7 genes responsáveis pela codificação das enzimas envolvidas na biossíntese do grupo AHBA. Imagem adaptada de Arya, 2007.

acetilparomamina com a adição de uma molécula de *N*-acetil-*D*-glucosamina (YOKOYAMA et al., 2008). A 2'-*N*-acetilparomamina deacetilase remove o grupo *N*-acetil produzindo a paromamina, sobre a qual atua uma desidrogenase que oxida o C-6' para finalmente formar a neamina graças à intervenção de outra aminotransferase. A neamina é convertida em ribostamicina pela intervenção de 2 enzimas, uma fosforibosiltransferase e fosforibostamicina fosfatase. Esta é a via em comum para a biossíntese de AGs derivados da via do 2-DOS, especificamente os ribosilados como a neomicina e a butirosina, cuja estrutura final vai depender de genes exclusivos para cada agrupamento gênico.

1.2.1 Mecanismos de resistência e toxicidade

Apesar dos aminoglicosídeos apresentarem excelentes características como agentes bactericidas de amplo espectro, a resistência microbiana tem reduzido o interesse nestas moléculas. A resistência pode acontecer por 3 mecanismos: (1) a modificação das proteínas ribossomais devido a mutações pontuais no rRNA 16S (ARYA, 2007); (2) o surgimento de cepas mutantes deficientes da cadeia transportadora de elétrons incapazes de internalizar o

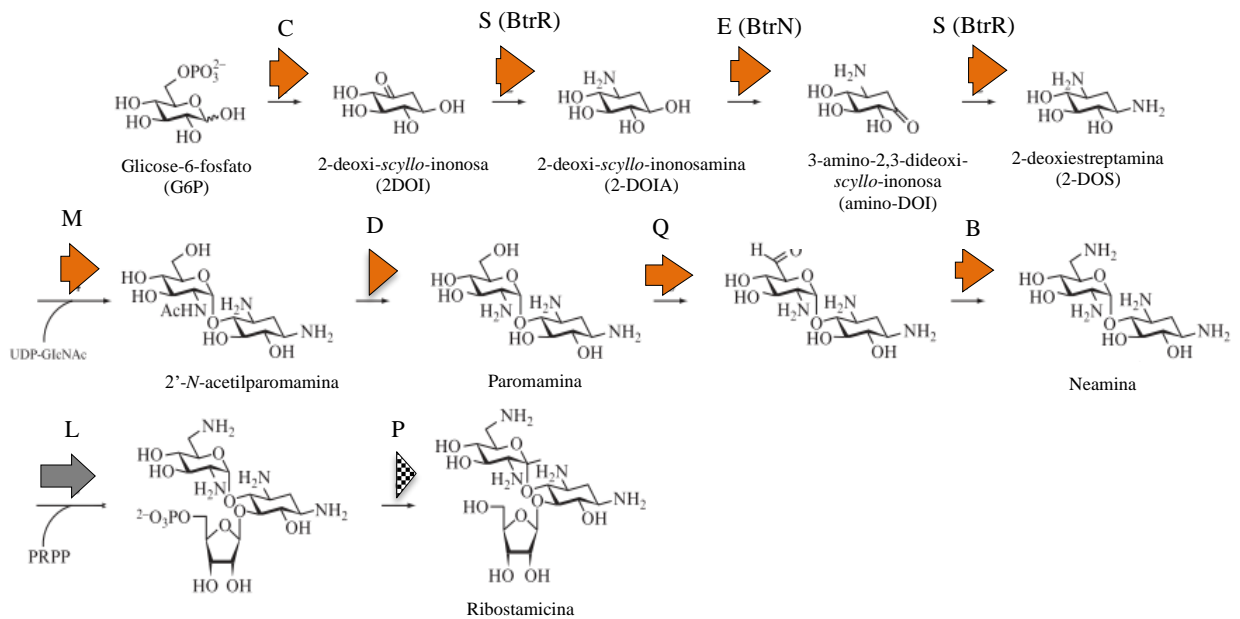


Figura 5. Biossíntese da estrutura comum da neamina da família dos AGs derivados da 2-DOS.

As enzimas estão identificadas em laranja de acordo com os genes da Figura 4. O nome das enzimas depende do aminoglicosídeo correspondente, por exemplo para a butirosina o prefixo é Btr. Posterior à ação da neamina, ilustra-se a ação de outras duas enzimas (L e P) encarregadas de estruturar a ribostamicina. Imagem adaptada de Kudo, Eguchi, 2009a.

aminoglicosídeo, assim como a presença de bombas de efluxo que liberam os antibióticos fora da célula (ARYA, 2007); e (3) a alteração do antibiótico devido às enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs) (KUDO; EGUCHI, 2016). Estas enzimas têm se espalhado pelas comunidades bacterianas, uma vez que muitos dos genes que as codificam são encontrados em elementos genéticos móveis como transposons e plasmídeos facilitando a geração de novas variantes enzimáticas capazes de aceitar novos aminoglicosídeos como substratos (RAMIREZ; TOLMASKY, 2010). As EMAs mais representativas estão identificadas na **Figura 6** e podem ser classificadas em 3 grupos principais:

- N-acetiltransferases (AACs): presentes em Gram-positivas e Gram-negativas com um amplo perfil de resistência aos aminoglicosídeos (ARYA, 2007). Dependendo do subgrupo, estas enzimas podem acetilar os grupos nas posições 1 (AAC(1')) e 3 (AAC(3')) do anel 2-DOS (KRAUSE et al., 2016). A ACC(1') é encontrada em *E. coli* e pode catalisar a acetilação de aminoglicosídeos como a butirosina e a diacetilação da ribostamicina e neomicina (RAMIREZ; TOLMASKY, 2010). As AAC(6') são as mais comuns e os seus genes foram reportados em plasmídeos, cromossomos e elementos genéticos móveis.

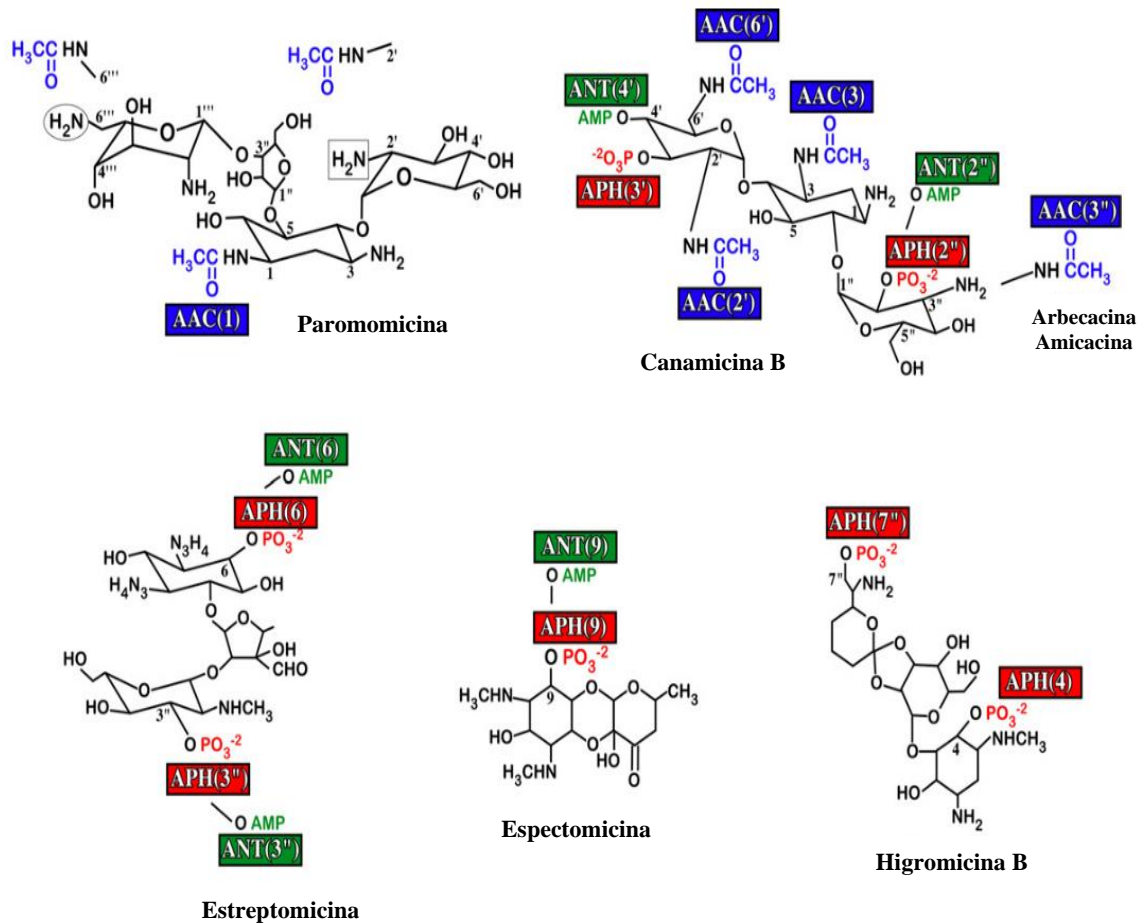


Figura 6. Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs) mais representativas.

Em azul as *N*-acetiltransferases (AACs) que catalisam a acetilação do antibiótico nas posições 1, 3, 2 ou 6'. Em verde as *O*-nucleotidiltransferases (ANTs) que catalisam a adenililação nas posições 6, 9, 4', 2'' ou 3''. Em vermelho as *O*-fosfotransferases (APHs) que transferem um grupo fosfato nas posições 4, 6, 9, 3', 2'', 3'' e 7''. Imagem tomada de Ramirez e Tomalsky, 2010.

- *O*-nucleotidiltransferases (ANTs): estas enzimas são dímeros obrigatórios na qual cada subunidade interage com o substrato formando um complexo Mg-ATP, seguido pela ligação ao aminoglicosídeo permitindo a transferência do grupo adenila. Assim, a molécula adenilada é liberada. As duas subunidades geram uma carga negativa na superfície da enzima que atrai o aminoglicosídeo carregado positivamente (ARYA, 2007). As ANT(3'') são as mais comuns e conferem resistência à espectomicina e estreptomicina (RAMIREZ; TOLMASKY, 2010).
- *O*-fosfotransferases (APHs): estão presentes em Gram-positivas e realizam uma fosforilação nos grupos hidroxilas dependente de ATP, perdendo a capacidade de formar pontes de hidrogênio com resíduos do rRNA (KRAUSE et al., 2016). Apresentam dois domínios: o N-terminal que é responsável pela ligação de ATP e o

C-terminal que fornece o sítio de reconhecimento do aminoglicosídeo onde acontece a transferência do fosfato (ARYA, 2007). Entre as APHs mais comuns, estão as APH(3') que evidenciaram ser efetivas na modificação de diversos AGs como canamicina, neomicina, butirosina, ribostamicina, etc (RAMIREZ; TOLMASKY, 2010).

Adicionalmente à resistência, as características nefrotóxicas e ototóxicas dos AGs têm reduzido drasticamente o interesse no uso destes antibióticos. Os AGs têm uma forte afinidade e seletividade com os fosfolípidios do rim causando uma forte absorção do medicamento. Também, podem estar envolvidos em mecanismos enzimáticos de espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem destruir células ciliadas no ouvido devido a quelação de íons metálicos que regulam as vias de morte celular (WALSH, 2003; ARYA, 2007). A ação tóxica deve-se às cargas positivas dos AGs em um pH fisiológico que os permite se ligar a uma variedade de componentes celulares carregados negativamente. Os efeitos adversos foram percebidos inicialmente com a introdução da estreptomicina, mas posteriormente foram constatados em outros AGs como a gentamicina, canamicina e amicacina. (KUDO; EGUCHI, 2009b, 2016).

Mesmo que os AGs apresentem numerosas adversidades, estes antibióticos ainda são a primeira escolha para o tratamento de diferentes doenças infecciosas, apresentando um amplo espectro de atividade que melhora quando atuam sinergicamente com outros antimicrobianos. Embora sejam numerosos e altamente eficazes, os mecanismos de resistência para os AGs são bem estudados o que facilita a pesquisa de estratégias para combatê-los. A combinação com β -lactâmicos é efetiva contra sepse severas e infecções nosocomiais e são importantes em terapia de combinação para infecções tuberculoso-resistentes (KRAUSE et al., 2016). Adicionalmente, a otimização da dosagem dos AGs pode contribuir para a redução da sua toxicidade mantendo a eficiência do antibiótico (KRAUSE et al., 2016).

O desenvolvimento de moléculas que evitem esses contratempos, especialmente os mecanismos de resistência, tem sido amplamente empregado para a geração de novos AGs. É o caso da plazomicina, um aminoglicosídeo que foi projetado a partir da sisomicina com uma modificação na posição N-1 pela adição de um grupo ácido hidroxilaminobutírico que impede a ação da AAC(3), ANT(2'') e APH (2'') e que conferem resistência à gentamicina e tobramicina (KRAUSE et al., 2016). Adicionalmente, a plazomicina não apresenta grupos hidroxila nas posições 3' e 4' protegendo-a da ANT(4') e a APH(3') (ELJAALY et al., 2019).

Também existem outros AGs como a arbecacina, um derivado da dibecacina que é efetiva contra as EMAs encontradas em *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA do inglês *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) e com boa atividade contra *P. aeruginosa* e *Acinobacter spp* (LABBY; GARNEAU-TSODIKOVA, 2013; KRAUSE et al., 2016; KUDO; EGUCHI, 2016). Desta forma, a biossíntese combinatorial dos aminoglicosídeos pode ser uma alternativa para resolver este problema permitindo o desenvolvimento de moléculas mais eficazes.

1.3 Butirosina

A butirosina é um AG obtido a partir de *Bacillus circulans*, com atividade contra bactérias Gram-positivas e algumas Gram-negativas, incluindo *Pseudomonas aeruginosa* (DION; WOO; WILLMER, 1972). A butirosina é um AG 4,5-disubstituído que, em lugar de apresentar uma unidade glicosídica adicional, tem um grupo (S)-4-amino-2-hidroxitirato (AHBA) acoplado ao C-1 do 2-DOS mediante uma ligação amida (**Figura 3**). Na evolução do agrupamento gênico da butirosina, a perda da capacidade de biossíntese da molécula de açúcar pode ter acontecido durante a transferência horizontal de um agrupamento para a neomicina de um actinomiceto para o filo dos firmicutes (ARYA, 2007).

A presença do grupo AHBA torna a butirosina um antibiótico bastante interessante pela evidência de causar insensibilidade frente a ação de algumas EMAs (LI et al., 2005). AHBA já foi inserido na posição C-1 da canamicina e dibecacina que derivou na amicacina e arbecacina. O C-1 é um alvo frequente das *N*-acetiltransferases e a adição do grupo AHBA evita a sua ação (LI et al., 2005; ARYA, 2007). Entre todos os AGs disponíveis, a amicacina é o que apresenta melhor capacidade de evitar os diferentes mecanismos das EMAs; porém já foi reportada resistência a este antibiótico em espécies como *Klebsiella pneumoniae* (RAMIREZ; TOLMASKY, 2017). Isso demonstra a importância das aproximações semissintéticas para a criação de AGs mais eficientes no combate aos diferentes mecanismos de resistência anteriormente mencionados.

A biossíntese do grupo AHBA ocorre a partir de uma molécula de L-glutamato e envolve a ação de enzimas codificadas por 7 genes (*btrI*, *btrK*, *btrG*, *btrH*, *btrO*, *btrJ* e *btrV*) que não são encontrados em nenhum outro agrupamento gênico (**Figura 4**) (LLEWELLYN; LI; SPENCER, 2007). O mecanismo de biossíntese acontece da seguinte maneira (**Figura 7**):

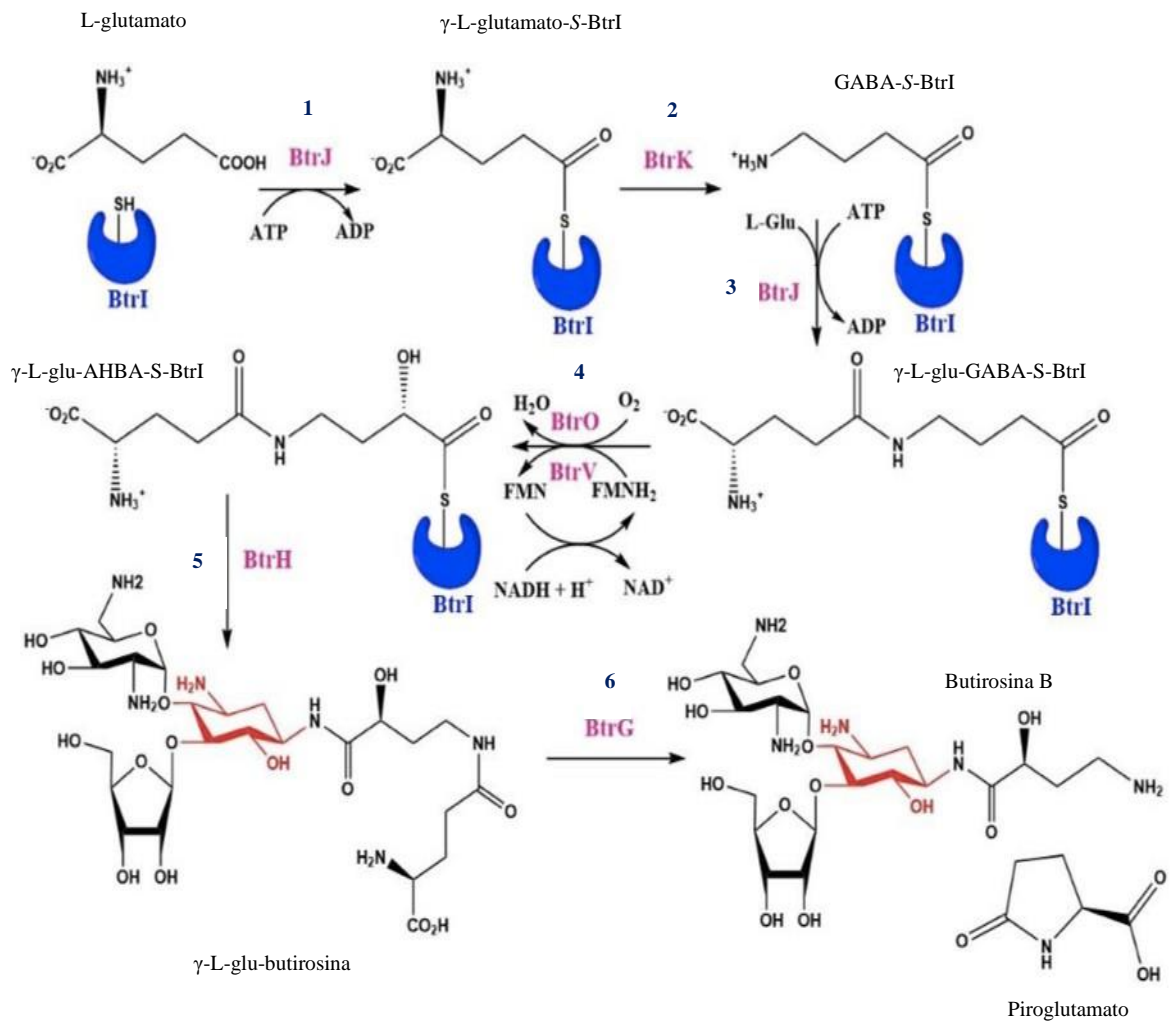


Figura 7. Biossíntese da butirosina B em *Bacillus circulans*.

Em rosa as enzimas encarregadas da biossíntese, em azul a BtrI, em vermelho o ciclitol 2-DOS. (1) Ligação entre o L-glutamato e a *holo*-BtrI mediada pela BtrJ. (2) Descarboxilação do γ -aminobutirato-S-BtrI pela BtrK. (3) Ligação de outra molécula de L-glutamato. (4) Hidroxilação do γ -L-glu-GABA-S-BtrI pelo sistema mono-oxigenase BtrO/BtrV. (5) Ligação do intermediário γ -L-glu-AHBA-S-BtrI à ribostamicina pela ação da BtrH. (6) Desproteção do γ -glutamil-AHBA pela BtrG gerando o produto butirosina B e piroglutamato. Imagem adaptada de Llewellyn et al., 2017 e Li et al., 2005.

1. Primeiramente ocorre a atuação de uma ligase dependente de ATP, BtrJ, que catalisa a ligação de uma molécula de L-glutamato à PCP BtrI, que está em sua conformação *holo*, ou seja, na presença do seu grupo prostético 4'-fosfopantetenina (4'PP) (derivado da coenzima A) (LAMBALOT; WALSH, 1995). O produto desta reação é o intermediário biossintético γ -L-glutamato-S-BtrI.
2. Posteriormente, acontece uma descarboxilação no carbono α ($C\alpha$) pela descarboxilase BtrK para produzir uma molécula de γ -aminobutirato-S-BtrI (GABA-S-BtrI).

3. Uma segunda molécula de L-glutamato é adicionada ao intermediário anterior, novamente pela BtrJ, para formar uma molécula de γ -L-glu-GABA-S-BtrI.
4. Uma posterior hidroxilação do C α é feito pelo sistema mono-oxigenase BtrO/BtrV. A BtrV catalisa a redução da flavina mononucleótido (FMN) usando NAD(P)H como doador de elétrons e a BtrO adiciona uma hidroxila no substrato na presença de FMNH₂ e O₂. Essa reação gera como produto o γ -L-glu-AHBA-S-BtrI.
5. A transferência do γ -L-glu-AHBA-S-BtrI para a ribostamicina é realizado pela aciltransferase BtrH.
6. Um último processo de desproteção do grupo γ -glutamil-AHBA é feito pela ciclotransferase BtrG que gera como produto a butirosina B e a liberação de uma molécula de piroglutamato.

Graças ao estudo do grupo de Li e colaboradores, 2005, foi possível esclarecer os mecanismos das diferentes enzimas para a biossíntese do grupo AHBA. Inicialmente, pensava-se que a BtrJ seria responsável pela ligação entre o grupo AHBA e a molécula de ribostamicina, mas quando esta foi incubada na presença de ATP e Mg⁺², não foi possível detectar a presença de butirosina. Assim, foi deduzido que a sua participação estava associada à ativação de um precursor carboxila e à transferência do acil-S-BtrI para a *holo*-BtrI. Uma posterior incubação da reação da BtrJ com a BtrK revelou um produto com maior massa do que o esperado, o que levou à hipótese que, após a descarboxilação mediada pela BtrK, acontece a ligação de uma segunda molécula de L-glutamato realizada pela BtrJ. Assim, o intermediário γ -L-glu-GABA-S-BtrI seria o verdadeiro substrato do sistema mono-oxigenase BtrO/BtrV e não GABA-S-BtrI como era pensado anteriormente. A BtrI tem um papel muito relevante, pois funciona como plataforma na qual acontecem as modificações do L-glutamato e dos diferentes intermediários.

Um segundo estudo de Llewellyn e colaboradores, 2007, permitiu esclarecer a segunda parte da biossíntese da butirosina, na qual acontece a transferência e desproteção do grupo AHBA. A enzima BtrH foi caracterizada *in vitro* e provou ser uma enzima com atividade 1-*N*-acetiltransferase catalisando a ligação do γ -L-Glu-AHBA ao 2-DOS da butirosina, enquanto a enzima BtrG realiza a desproteção do γ -L-Glu-AHBA para produzir butirosina B e piroglutamato. As enzimas BtrH e BtrG podem atuar sobre outros AGs 4,5-disubstituídos como a paromomicina e neomicina, mas não 4,6-disubstituídos como canamicinas e gentamicinas (LLEWELLYN; LI; SPENCER, 2007; LLEWELLYN; SPENCER, 2008), o que representa uma utilidade no uso destas enzimas para a produção de novos AGs.

Porém, não há informações sobre as características estruturais destas enzimas, apesar de estudos funcionais já terem sido realizados. Assim, um melhor entendimento estrutural delas poderia ajudar com a geração de moléculas de AGs modificadas que sejam mais efetivas frente a bactérias multi-resistentes. Embora a enzima BtrK já apresente uma estrutura resolvida no Protein Data Bank PDB (entrada 2J66) de 2006, não há qualquer relato de sua descrição estrutural na literatura. Um estudo detalhando da mesma ainda é necessário para entender os mecanismos de descarboxilação nos passos iniciais da biossíntese do grupo AHBA.

2 OBJETIVOS

O trabalho teve como objetivo realizar a caracterização das enzimas envolvidas nos primeiros passos na produção do grupo AHBA na biossíntese da butirósina.

- Realizar a determinação estrutural da enzima descarboxilase BtrK, tanto na sua forma de *holo*-enzima (na presença do piridoxal-5'-fosfato PLP), como na presença do substrato (γ -L-glutamato-S-BtrI).
- Realizar a determinação estrutural da enzima BtrJ, na sua forma *apo* assim como em presença de ATP, Mn^{+2} (cofator da enzima), L-glutamato (substrato) e ADP (produto).
- Avaliar possíveis interações entre a BtrJ e a BtrI, assim como com os intermediários das reações.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Clonagem e expressão

Os genes *btrK*, *btrJ* e *btrI* estudados neste trabalho foram clonados pelo grupo de pesquisa do Prof. Peter Leadlay, University of Cambridge-UK em sistema pET-28a(+) e foram gentilmente cedidos para nosso grupo de pesquisa. A transformação foi realizada em células competentes: inicialmente em *Escherichia coli* DH5 α para amplificação do plasmídeo; posteriormente em *E. coli* BL21(DE3) para a expressão da BtrJ e BtrI e *E. coli* Rosetta para a expressão da BtrK. A reação realizou-se com 50 μ L das células competentes e 1,5 μ L do produto de ligação e foi incubada no gelo por 30 seg. Posteriormente foi feito o choque térmico (1 min em banho Maria a 42°C seguido de 3 min no gelo) e foram adicionados 100 μ L de meio de cultura caldo lisogênico Luria Bertani (LB). A reação foi incubada em agitador rotatório a 37°C e 200 rpm por 1h. A suspensão celular plaqueou-se em LB ágar com adição do respectivo antibiótico 50 μ g/mL (canamicina para *E. coli* BL21(DE3) e canamicina+cloranfenicol para *E. coli* Rosetta) e a placa foi incubada a 37°C por 24 horas.

Para a expressão, uma colônia de cada constructo foi inoculada em 100 mL de meio LB para a preparação de um pré-inóculo, que foi crescido durante 24h a 37°C e 200 rpm. A partir deste, realizou-se a expressão em 4 litros de LB com adição do respectivo antibiótico (50 μ g/mL) mantidos a 37°C e 200 rpm. Uma vez que a cultura atingiu a OD₆₀₀ de 0,6, realizou-se a indução da expressão do gene de interesse pela adição de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) a uma concentração final de 0,2 mM por um tempo variável entre 14-18 horas a 16°C. Posteriormente, a cultura foi centrifugada a 6000 rpm por 20 min para recuperar o *pellet*.

3.2 Expressão com selenometionina

Para a resolução do problema de fase por dispersão anômala simples (SAD do inglês *Single-wavelength Anomalous Dispersion*), a expressão da BtrJ foi realizada com incorporação de selenometionina (SeMet) em meio mínimo M9 (VANDUYNE, 1993). A transformação das células foi realizada em *E. coli* BL21(DE3) mediante choque térmico como foi mencionado anteriormente. A suspensão celular plaqueou-se em ágar LB com canamicina 50 μ g/mL e após a incubação, uma única colônia foi selecionada para o pré-inóculo. A expressão foi realizada em 1L de meio M9 (200 ml do stock 5X: 30g Na₂HPO₄, 15g KH₂PO₄, 5g NH₄Cl, 2,5g NaCl;

1M MgSO₄; 10 mL 40% (p/v) glucose; 100 µL 0,5% (p/v) tiamina; 1 mL de Fe(II)SO₄; canamicina 50 µg/mL) a 37°C e 200 rpm. Uma vez que a cultura atingiu uma OD₆₀₀ de 0,6, foi suplementada com um coquetel de aminoácidos (L-lisina 100 mg/L; L-fenilalanina 100 mg/L; L-treonina 100 mg/L; L-isoleucina 50 mg/L; L-leucina 50 mg/L; L-valina 50 mg/L e L-selenometionina 50 mg/L). Após 20 min do suplemento, a cultura foi induzida com 1mM IPTG por 14-18 horas. Novamente, a cultura foi centrifugada a 6000 rpm por 20 min para recuperar o *pellet*.

3.3 Purificação das enzimas

Para a purificação, as células (*pellet* recuperado da cultura) foram suspensas em tampão de lise (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 5mM imidazol, 10% glicerol pH 7,9) com a adição de 0,1 mg/mL de DNAase, 1 mg/mL de lisozima e 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PSMF do inglês *phenylmethylsulfonyl fluoride*). Posteriormente, as células foram lisadas com auxílio de um sonicador ultrassônico por 30 min intercalando entre 30 seg de exposição e 50 seg de descanso a uma amplitude de 40%. Em seguida, a solução celular foi centrifugada para a separação das fases solúvel e insolúvel. Na purificação proteica inicial por cromatografia de afinidade, a fração solúvel foi aplicada numa coluna HisTrap IMAC 5mL (GE Healthcare) previamente carregada com 0,1M de NiSO₄. Para efetuar a remoção das proteínas não ligadas, a coluna foi lavada utilizando 5 volumes de coluna do tampão A (20 mM Tris-HCl pH 7,9, 500mM NaCl, 50mM imidazol e 10% glicerol) e a proteína alvo, ligada por cauda de histidina, foi eluída com um tampão B (20mM TrisHCl pH 7,9, 500mM NaCl, 500 mM de imidazol e 10% glicerol) através de um gradiente linear de 0 a 100% de tampão B, usando o sistema *Äkta Purifier*. Posteriormente, foi feita uma cromatografia de exclusão molecular ou filtração em gel (GF) usando uma coluna HiLoad 16/60 Superdex 200 ou 75 µg (GE Healthcare Life Sciences) com o respectivo tampão (50mM HEPES pH 7,8 e 2mM DTT para BtrK; 50 mM HEPES (pH 7,6) 50mM KCl, 5mM MgCl₂ para BtrJ; 50 mM HEPES (pH 7,0) 50 mM NaCl, 2mM DTT e 0,5mM EDTA para *apo*-BtrI).

3.4 Confirmação da presença e quantificação da proteína

Após a purificação das diferentes enzimas, a pureza e a presença das enzimas nas frações coletadas foram verificadas mediante eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Foram preparados géis com concentrações de 12% para as proteínas BtrK e BtrJ cuja massa molecular é de 47,81 kDa e 48,64 kDa respectivamente e 18% para a BtrI devido a seu menor tamanho

molecular de 9,78 kDa. A revelação das bandas foi realizada utilizando corante Coomassie Brilliant Blue. As proteínas foram concentradas em filtros de ultracentrifugação AmiconUltra-15 (Millipore) com tamanho de poro de acordo com a massa molecular de cada uma. A concentração das enzimas BtrK e BtrJ foi quantificada no BioDrop μ LITE (Biochrom) levando-se em consideração os respectivos coeficientes de extinção de 35,30 e 46,30. Em consequência do coeficiente de extinção equivalente a 0 da BtrI, a quantificação da mesma realizou-se mediante o método de Bradford. Para este método foi feita uma curva padrão de albumina bovina sérica (BSA) em concentrações entre 0 e 1000 μ g/mL. As reações foram feitas com 200 μ L de reagente de Bradford (LGC Biotecnologia) e 10 μ L do padrão ou da amostra, em triplicata.

3.5 *Fluorimetria diferencial de varredura (DSF)*

Para aumentar a estabilidade das proteínas, a fim de obter de cristais para BtrK e BtrJ, experimentos de fluorimetria diferencial de varredura (DSF do inglês *Differential Scanning Fluorimetry*), especificamente mediante a técnica de deslocamento térmico (TSA do inglês *Thermal Shift Assay*), foram realizados em placas de PCR de 96 poços (Bio-Rad) utilizando um termociclador para PCR em tempo real (Bio-Rad CFX Connect) com filtros de detecção da excitação variando entre 450-580 nm. Para isso seguiu-se um protocolo onde as amostras foram submetidas a um aumento de temperatura de 25 a 95°C com um incremento linear de 0,5°C por minuto. As proteínas (10 μ M) foram avaliadas em diferentes condições tamponantes. Para a obtenção do sinal foi adicionado em cada poço 5X de sonda fluorescente SYPRO Orange (SO) (Invitrogen) que interage com as regiões hidrofóbicas expostas da proteína, consequência da desnaturação química. Os resultados foram normalizados e realizou-se um ajuste sigmoide Boltzmann utilizando o programa Origin 2016.

Para avaliar algumas interações proteína-proteína ou proteína-ligante foram testadas as seguintes reações: *apo*-BtrI, BtrJ+ATP, BtrJ+L-glutamato+ATP, BtrJ+L-glutamato+ *apo*-BtrI. Nas reações com presença da BtrJ foi adicionado $MgCl_2$, já que o Mn^{+2} é o cofator da enzima. O volume final de cada reação foi 25 μ L, a concertação final das proteínas foi de 10 μ M (1:1) e a do ligante e cofator de 5mM. Todas as reações foram realizadas em triplicata.

3.6 *Cristalização das proteínas*

Para os ensaios iniciais de cristalização, foi executada a técnica de difusão de vapor por gota sentada em placas de 96 poços com diferentes kits de reagentes da Hampton Research e JENA Bioscience, utilizando um robô tipo Oryx 4 (Douglas Instruments). Foram escolhidas aquelas condições que apresentaram melhores cristais, caracterizados por ter uma forma definida e regular, serem volumosos e ter um crescimento individual. As condições foram otimizadas mediante gota suspensa mudando as concentrações do precipitante e o pH (DESSAU; MODIS, 2010). Os volumes da gota variaram-se entre 3-5 μL e as proporções entre a proteína e a condição de cristalização foram de 1:1, 1:2 e 2:1.

A cristalização da BtrK realizou-se no seu estado nativo assim como em complexo com L-glutamato e L-arginina (50mM) mediante ensaios de co-cristalização. Aquelas enzimas cuja fase necessitou ser determinada, foram incubadas com 0,2-0,4 μL de metais pesados (NaBr, NaI, KBr) por *soaking* testando diferentes tempos de exposição dependendo do tempo de vida do cristal. Por fim, as placas foram armazenadas a 16°C e observadas periodicamente mediante um microscópio estereoscópio.

3.7 *Coleta e processamento de dados de difração de Raios X*

A coleta de dados de difração de Raios X foi realizada no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron LNLS (Campinas) e DESy *Deutsches Elektronen-Synchrotron* (PETRAIII, Alemanha). O processamento dos dados de difração foi realizado pelo programa XDS (KABSCH, 2010). Os dados foram escalonados pelos programas AIMLESS (EVANS, 2006) presente no pacote de programas do CCP4 (WINN et al., 2011).

3.8 *Resolução de estruturas e refinamento cristalográfico*

As estruturas foram resolvidas por substituição molecular ou faseamento experimental com o programa MolRep (VAGIN; TEPLYAKOV, 2010) ou mediante SAD (*Single-wavelength Anomalous Dispersion*) (ADAMS et al., 2011). O refinamento cristalográfico das estruturas foi efetuado pelos programas REFMAC (MURSHUDOV et al., 2011) ou Phenix.refine (AFONINE et al., 2012). A inspeção e a construção dos modelos foram efetuados pelo programa Coot (EMSLEY; COWTAN, 2004) utilizando mapas de densidade eletrônica $2F_o - F_c$ e $F_o - F_c$. A análise cristalográfica foi realizada pelo acompanhamento dos valores de R_{factor} e R_{free} . A qualidade estereoquímica dos modelos finais foi aferida pelo programa

MolProbity (CHEN et al., 2010). As estruturas cristalográficas finais foram analisadas e visualizadas nos programas Coot. A análise e a produção de figuras de elementos de estrutura secundária e de interações no sítio ativo, bem como, de superfície eletrostática foram providenciadas pelos programas PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC).

3.9 Ancoragem molecular

Com a intenção de estudar a possível interação da proteína BtrK com o seu substrato (parcial) L-glutamato, ensaios de ancoragem molecular foram realizados. O ligante foi avaliado na estrutura da BtrK refinada. Para as simulações foi utilizado o software AutoDock Tools Vina (SEELIGER; DE GROOT, 2010) e o resultado foi analisado no PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC). As características da caixa para a localização do ligante foram definidas de acordo com a posição do PLP. As dimensões da caixa foram 28Å (x), 28Å (y) e 28Å (z) e as coordenadas 0,358(x), 270,172(y) e -36,176(z).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Expressão e purificação da BtrK

A BtrK foi purificada no tampão 50 mM HEPES pH 7,8 e 2 mM DTT, tendo em conta o seu ponto isoelétrico de 6,16. Porém foi detectado um pequeno precipitado depois de 2 horas. Durante a GF, a proteína foi observada com uma tonalidade amarela, o que confirma a sua co-eluição com o cofator PLP. O complexo elui em um volume de retenção entre 70 e 80 mL em uma coluna Superdex 16/600 200 pg (GE Healthcare Life Sciences) (**Figura 8A**). A expressão da proteína teve um rendimento baixo e a concentração final foi de 1,96mg/L. A pureza da BtrK foi confirmada mediante um gel de poliacrilamida SDS-PAGE onde observou-se uma única banda correspondente com o seu peso molecular de 47,8 kDa (**Figura 8B**).

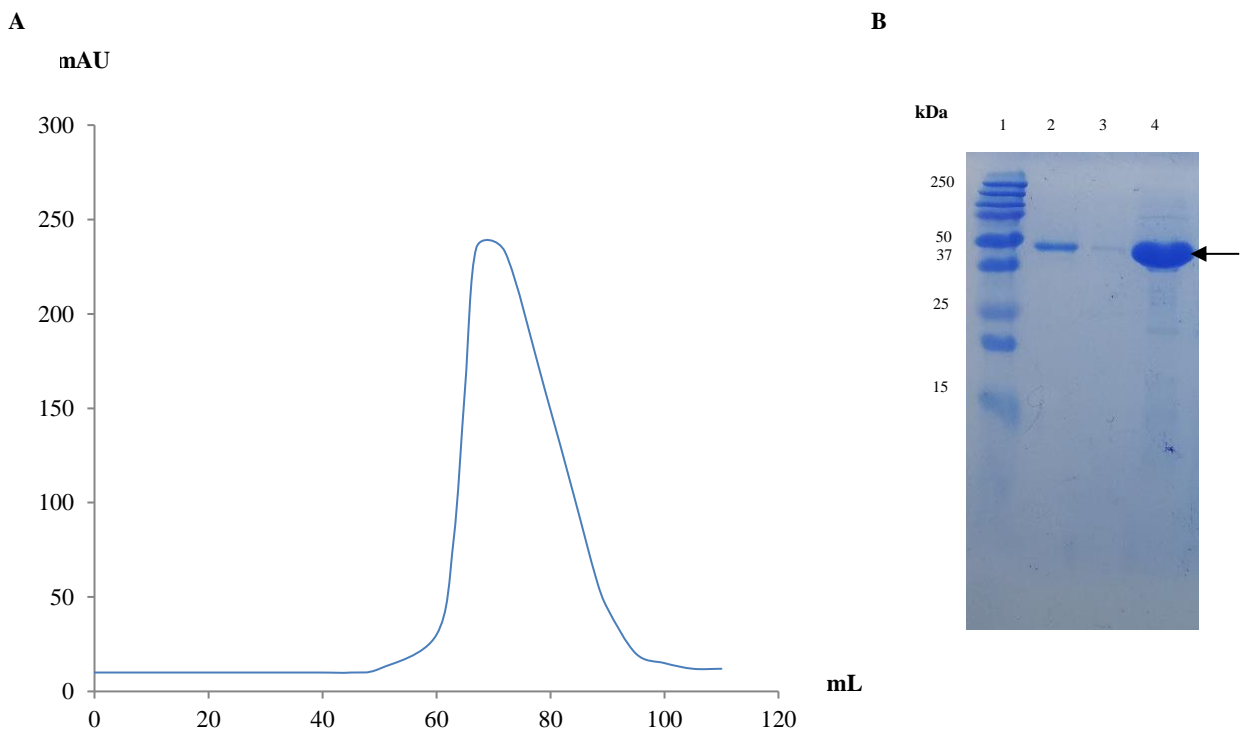


Figura 8. Purificação por exclusão molecular da BtrK.

(A) Cromatograma da purificação na qual apresenta-se a absorbância a 280 nm cujo sinal máximo está entre os 70 e 80 ml correspondente com o volume de eluição da enzima. (B) Gel de poliacrilamida 12% SDS-PAGE. A banda indicada pela seta preta corresponde à enzima purificada em aproximadamente 50 kDa. (1) Marcador, (2) Fração da purificação da BtrK por GF, (3) Vazio, (4) BtrK concentrada.

Para melhorar a estabilidade da enzima, foi realizado um experimento de DSF onde encontraram-se várias condições tamponantes que aumentaram a temperatura de desenovelamento (T_m) entre 4 e 5°C (**Figura 9**). A proteína no tampão 50 mM HEPES pH 7,8 que corresponde ao controle, evidenciou um comportamento sigmoide normal. Inicialmente não há emissão de fluorescência, mas conforme a temperatura aumenta, começa o desenovelamento deixando expostos os resíduos hidrofóbicos que interagem com o fluoróforo SYPRO (SO) aumentando proporcionalmente o seu sinal. Entretanto, o tampão 100 mM MOPS pH 7 e 5% de glicerol, permitiu que a enzima não desenovelasse tão rapidamente. De acordo com o gráfico, tanto o controle como os tampões que aumentaram a T_m da BtrK são adequados para a estabilidade da enzima. Isso sugere que, provavelmente, a precipitação não ocorreu devido ao tampão em que a proteína foi preparada inicialmente, mas sim devido à instabilidade intrínseca da enzima, cujo índice está calculado em 47,31 de acordo com o ProtParam. Esse

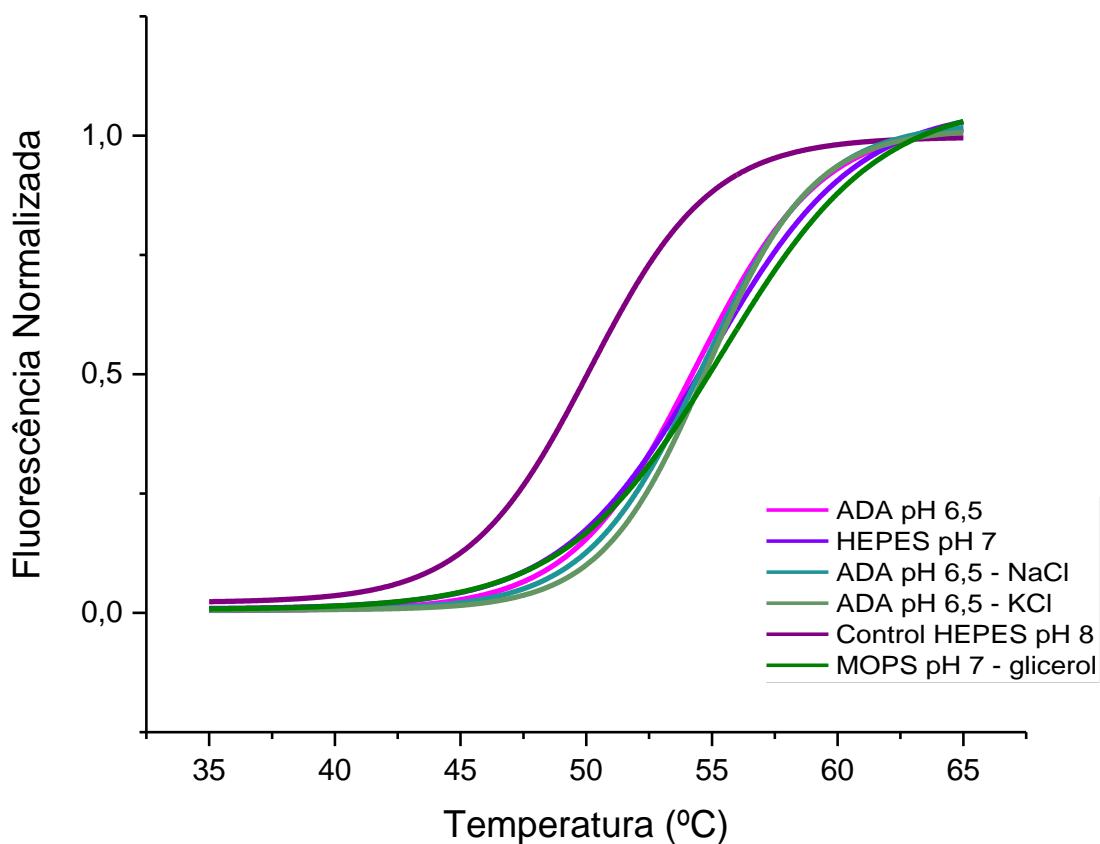


Figura 9. Experimento de DSF da proteína BtrK.

A linha roxa corresponde ao controle, sendo o buffer no qual a proteína estava inicialmente (50mM HEPES pH 7,8 e 2mM DTT) com uma T_m de 52°C. A linha verde corresponde ao buffer (MOPS pH 7 e 5% glicerol) no qual a BtrK se desenovela em uma temperatura maior (T_m de 57°C).

valor é estimado de acordo com a presença de uma combinação de dipeptídeos que estabilizam a proteína ou a deixam mais suscetível à degradação (GURUPRASAD; REDDY; PANDIT, 1990). As proteínas cujo índice de instabilidade é menor que 40 são consideradas estáveis e aquelas com valores superiores a 40, instáveis. Os autores também relacionam a presença de ligações dissulfeto com uma melhora significativa na estabilidade associada à presença de grupos cisteína. É importante lembrar que esse é um valor teórico e que a estabilidade de uma enzima pode ser afetada por outras variáveis que são avaliadas experimentalmente. Assim, a adição de glicerol é uma estratégia recomendável para a estabilidade, pois mantém a proteína em um estado mais compacto além de inibir a agregação durante o seu redobramento.

4.2 *Cristalização e caracterização estrutural da BtrK*

A proteína em uma concentração de 9,8 mg/mL foi submetida a ensaios de cristalização. Nos ensaios de gota sentada foram observados cristais da BtrK em estado nativo e em complexo em mais de 10 condições. Após a otimização por gota pendurada, a melhor solução de cristalização foi com 14% PEG 400, 100 mM MES e 200 mM MgCl₂ onde observaram-se cristais em forma prismática retangular e quadrada que cresceram entre as primeiras 24 e 48 horas a 18°C (**Figura 10**). Os cristais são pertencentes ao grupo espacial P2₁2₁2. A estrutura tridimensional da BtrK foi resolvida mediante substituição molecular tendo como modelo a estrutura da mesma enzima previamente depositada no PDB (PDB ID 2J66). Embora a BtrK

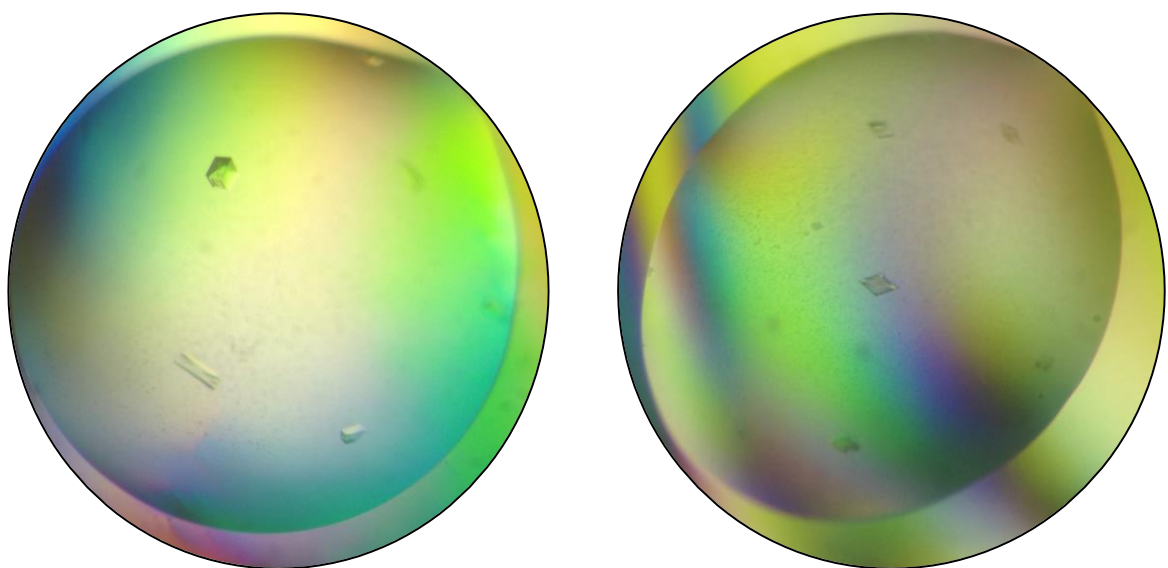


Figura 10. Cristais da BtrK em estado nativo.

Diferentes morfologias de cristais otimizados mediante gota suspensa, observados entre as primeiras 24 e 48 horas em solução 14% PEG 400, 100 mM MES e 200 mM MgCl₂.

esteja no banco de dados, não há uma descrição estrutural para esta enzima na literatura. Os valores estatísticos e a resolução da estrutura que conseguimos neste projeto foram otimizados (**Tabela 1**). A estrutura foi resolvida em uma resolução de 1,4Å comparada com o modelo 2J66 com resolução de 1,65Å. Adicionalmente, obtivemos um $R_{\text{factor}}/R_{\text{free}}$ de 0,183/0,201, a diferença dos valores de 0,213/0,224 da 2J66. Estes dados são indicadores de uma melhor qualidade dos nossos dados experimentais em relação à estrutura previamente resolvida. Porém, quando as duas estruturas foram sobrepostas, o rmsd foi de 0,147Å o que implica uma alta similaridade estrutural entre as distâncias dos átomos de uma com a outra (figura não mostrada).

Na estrutura da BtrK foram identificados dois domínios (**Figura 11**): o primeiro corresponde ao N-terminal, que apresenta 8 fitas β paralelas no interior e 8 α hélices no exterior formando um enovelamento tipo barril TIM. Em proteínas com esse tipo de dobra, o sítio ativo (local do PLP) está sempre localizado no final C-terminal das fitas β do barril TIM. Resíduos

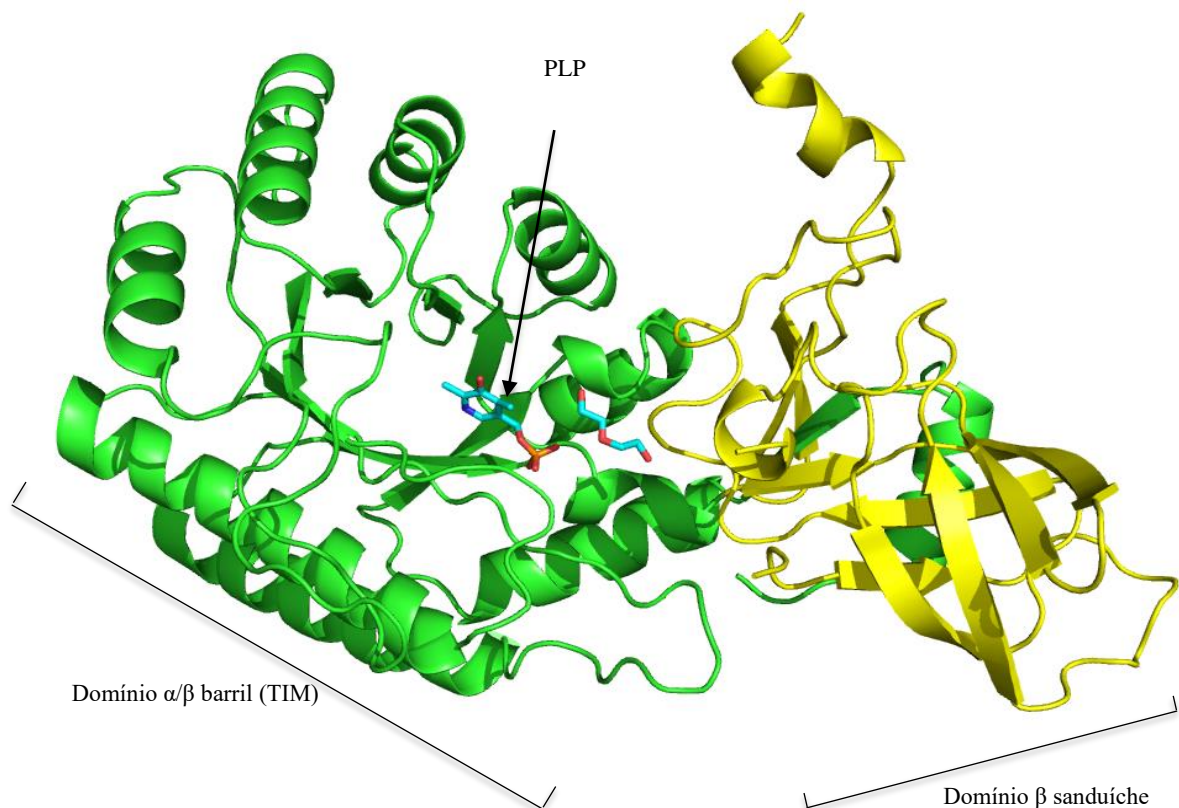


Figura 11. Estrutura monomérica da BtrK.

Os domínios N-terminal e C-terminal estão identificados em cores verde e amarelo respectivamente. O cofator PLP e o PEG estão representados em modelo palito codificados por cores de acordo com o átomo (N, azul; C, água marinha; O, vermelho; P, laranja).

das 8 alças próximas às fitas β contribuem com a geometria e interação do sítio ativo (WIERENGA, 2001). Um segundo domínio, o C-terminal, tem um enovelamento tipo β sanduíche formando um motivo de “chave grega”. Além do PLP, observa-se uma molécula de polietilenglicol (PEG) que pode corresponder à condição de cristalização.

A proteína BtrK pertence ao grupo III das enzimas dependentes de PLP, pelo qual são dímeros obrigatórios onde cada monômero contribui com resíduos para a formação dos dois sítios ativos. Utilizando operações de simetria no programa Coot obtivemos a estrutura dimérica e provavelmente funcional da BtrK, que apresenta uma área de interface de 3449,4Å calculada no PDBePISA (KRISSINEL; HENRICK, 2007). Assim, o barril TIM de um monômero interage com o β sanduíche do outro monômero (**Figura 12**).

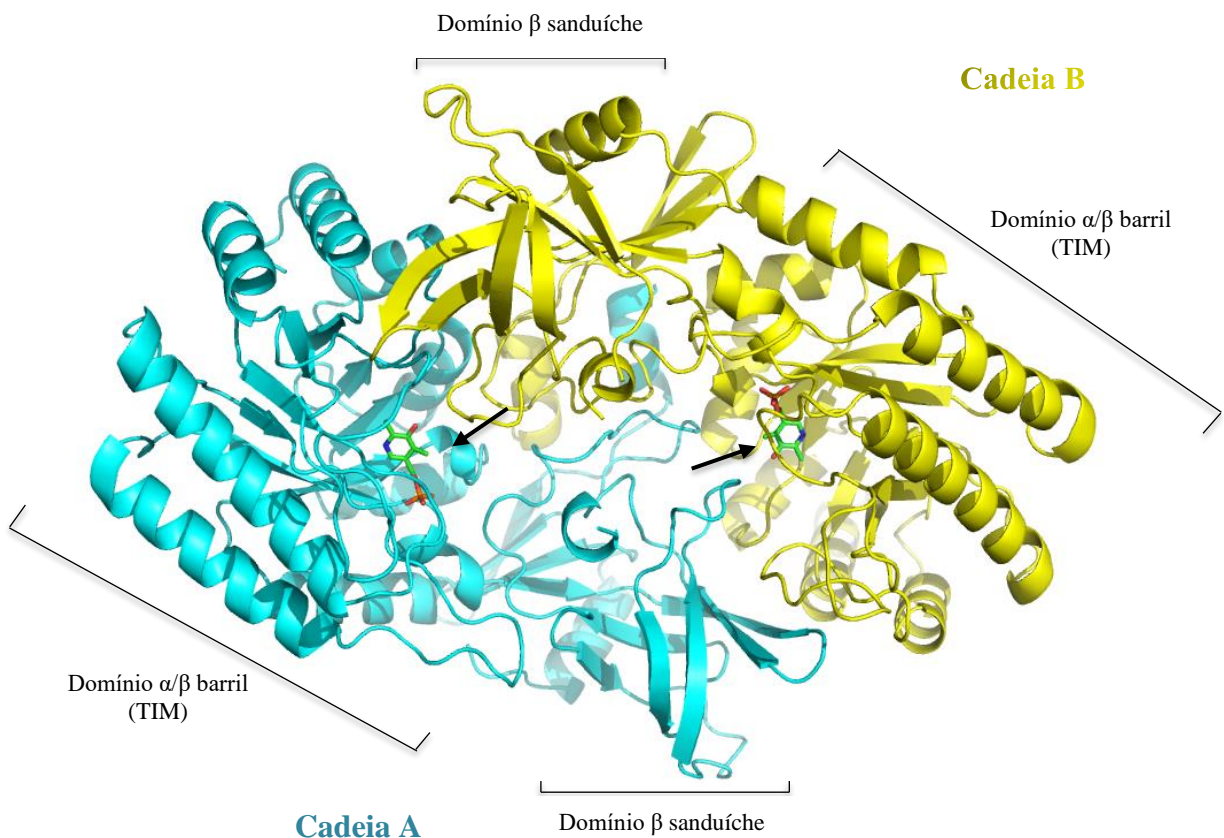


Figura 12. Estrutura dimérica da BtrK.

Cada monômero está representado em cartoon em cores amarelo e azul. O PLP de cada unidade monomérica está identificado em modelo palito identificado por cores de acordo com o átomo (N, azul; C, verde; O, vermelho; P, laranja).

Tabela 1. Dados de difração raios X da proteína BtrK com o PLP. Estatísticas para a última camada de maior resolução são mostradas em parênteses.

Cristal	BtrK
Faixa de resolução (Å)	48,16 – 1,6 (1,7 – 1,6)
Grupo espacial	P 2 ₁ 2 ₁ 2
a, b, c (Å)	72,06; 129,49; 45,76
α , β , γ (°)	90; 90; 90
Completeza	0,98 (0,97)
Média I/sigma (I)	16,45 (2,97)
R-merge	0,093 (0,68)
R-meas	0,101 (0,738)
CC1/2	0,997 (0,855)
CC*	0,999 (0,96)
Reflexões no refinamento	56314 (5445)
Reflexões usada para R-free	2871 (250)
R-work/R-free	0,183/0,201 (0,229/0,275)
CC(work)	0,953 (0,845)
CC(free)	0,955 (0,876)
Número de átomos não-hidrogênio	3512
macromoléculas	3217
ligantes	16
Resíduos de aminoácidos	409
RMS (ligações)	0,007
RMS (ângulos)	0,93
Ramachandran favorável (%)	98
Ramachandran permitido (%)	2,5
Ramachandran outliers (%)	0
Rotâmeros outliers (%)	0,29
<i>Clashscore</i>	4,04
Média fator-B	21,71
macromoléculas	20,53
ligantes	15,88
solvente	35,69
Número de grupos TLS	1

A cavidade do sítio ativo mantém um potencial eletropositivo (**Figura 13A**). Os barris com conformações α/β são topologicamente favoráveis para a formação de fendas no final C-terminal das fitas β as quais são usadas para a ligação de substratos carregados negativamente, como o caso do L-glutamato (RAYCHAUDHURI et al., 1997). Em proteínas com esse tipo de enovelamento, é comum achar o local do sítio ativo muito enterrado na enzima (**Figura 13 e Figura 14**). Na representação monomérica e dimérica é evidente a coexistência de cargas positivas e negativas. Porém, o substrato parece precisar atravessar canais cumpridos e carregados negativamente para ter acesso ao sítio ativo (**Figura 14**). As cadeias laterais do barril, também ajudam a ajustar o campo eletrostático para atrair o substrato específico para o sítio ativo (RAYCHAUDHURI et al., 1997).

A marcação de átomos hidrofóbicos e átomos carregados dos aminoácidos indica a capacidade dos mesmos para realizar interações entre proteínas ou ligantes (HAGEMANS et al., 2015). O sítio ativo da BtrK está perto de resíduos de lisina e arginina cujos átomos de nitrogênio estão representados em azul, criando um ambiente eletrostático favorável para a interação de substratos com carga negativa (**Figura 13B**). O centro da folha β do barril TIM é

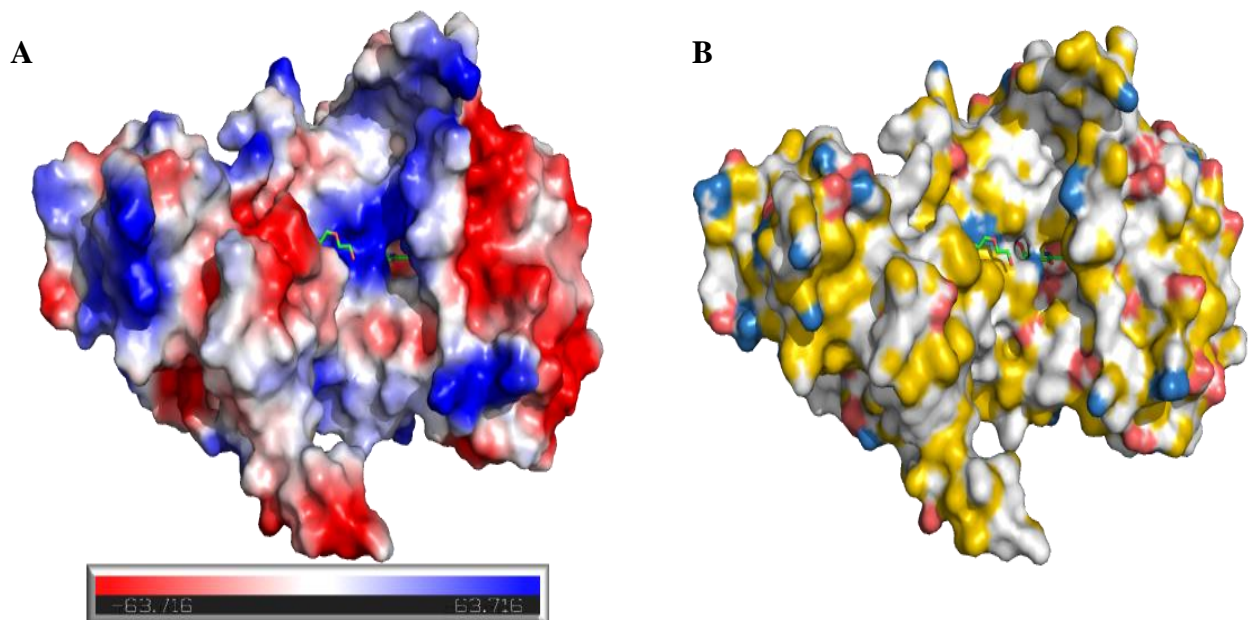


Figura 13. Superfícies de potencial eletrostático e hidrofobicidade da BtrK na sua conformação monomérica.

(A) Diferenças na superfície eletrostática. As regiões vermelhas são as mais eletonegativas, em azul as mais eletropositivas e em branco, neutras. (B) Diferenças na cargas dos diferentes átomos da enzima. Em amarelo estão representados os átomos de carbono com potencial para formar interações hidrofóbicas; em azul os átomos de nitrogênio dos resíduos de arginina e lisina; em vermelho átomos de oxigênio dos resíduos de glutamato e aspartato. No bolsão da enzima está representado o PLP e o PEG em modelo palito identificados por cores de acordo com o átomo (C, verde; O, vermelho; N, azul).

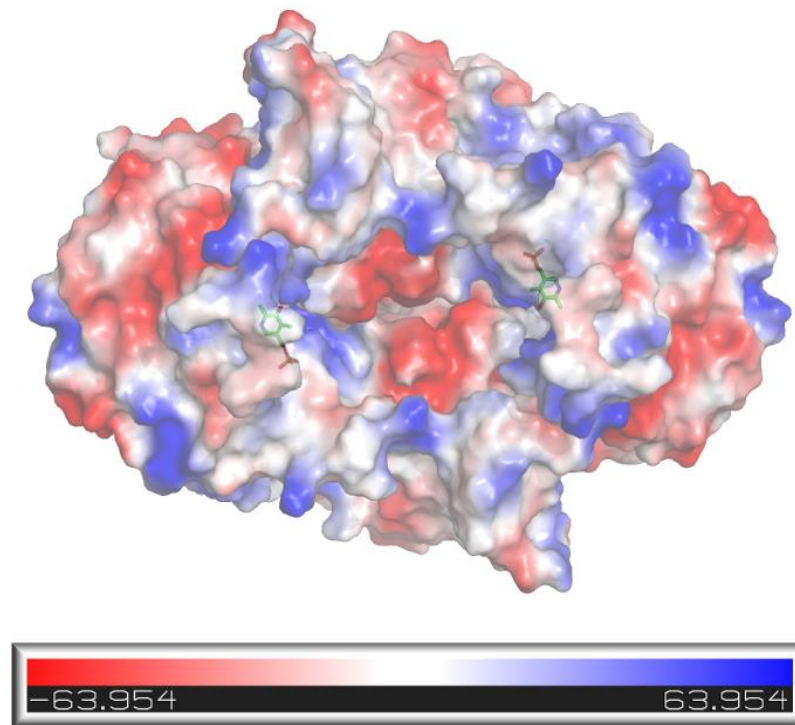


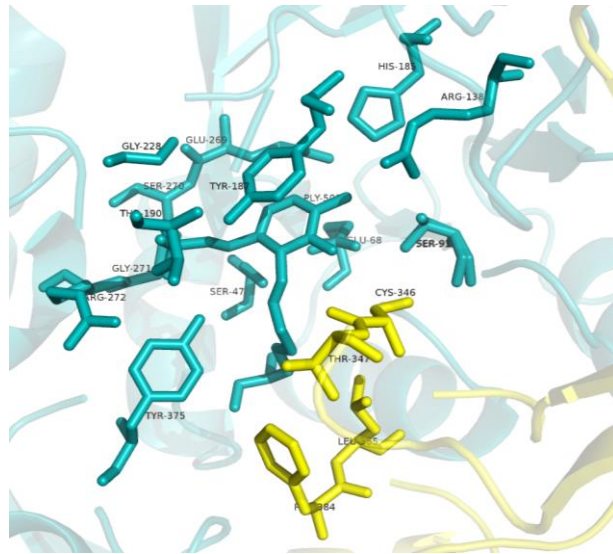
Figura 14. Diferenças na superfície eletrostática do homodímero da BtrK. Superfície identificada de acordo com as cargas: positiva, azul; negativa, vermelho e neutro, branco. O PLP ancorado em cada monômero está representado em modelo palito.

predominantemente hidrofóbico e os aminoácidos que a compõem estão bem compactos, impedindo acesso ao solvente (TIWARI; REUTER, 2016). Aqueles resíduos que estão mais expostos, apresentam certo grau de liberdade em solução, motivo pelo qual as suas cargas podem variar. Certamente, quando os barris TIM fazem parte de enzimas multi-domínio, mostram versatilidade para diversos tipos de reações e são capazes de acomodar estruturas secundárias adicionais ou domínios de outras proteínas (TIWARI; REUTER, 2016).

4.2.1 Sítio ativo e mecanismo de ação

O PLP faz uma ligação imina com um resíduo de lisina (Lys49) formando uma base Schiff (**Figura 15 e 16**), uma característica conservada em enzimas dependentes de PLP (ELIOT; KIRSCH, 2004). Resíduos tanto da cadeia A como da cadeia B estão envolvidos na formação do sítio ativo (**Figura 15A**). O grupo fosfato do PLP forma pontes de hidrogênio com os resíduos Arg272A (2,89 Å) e Gly271A (2,90 Å). O nitrogênio do anel pirimidínico também forma uma ponte de hidrogênio com a Glu269A (2,75 Å) (**Figura 15B**), aminoácido que participaria na retirada de elétrons do anel, aumentando a basicidade no nitrogênio (GRISHIN et al., 1999; SAGONG et al., 2016). A Tyr187(A) interage com o nitrogênio do anel

A



B

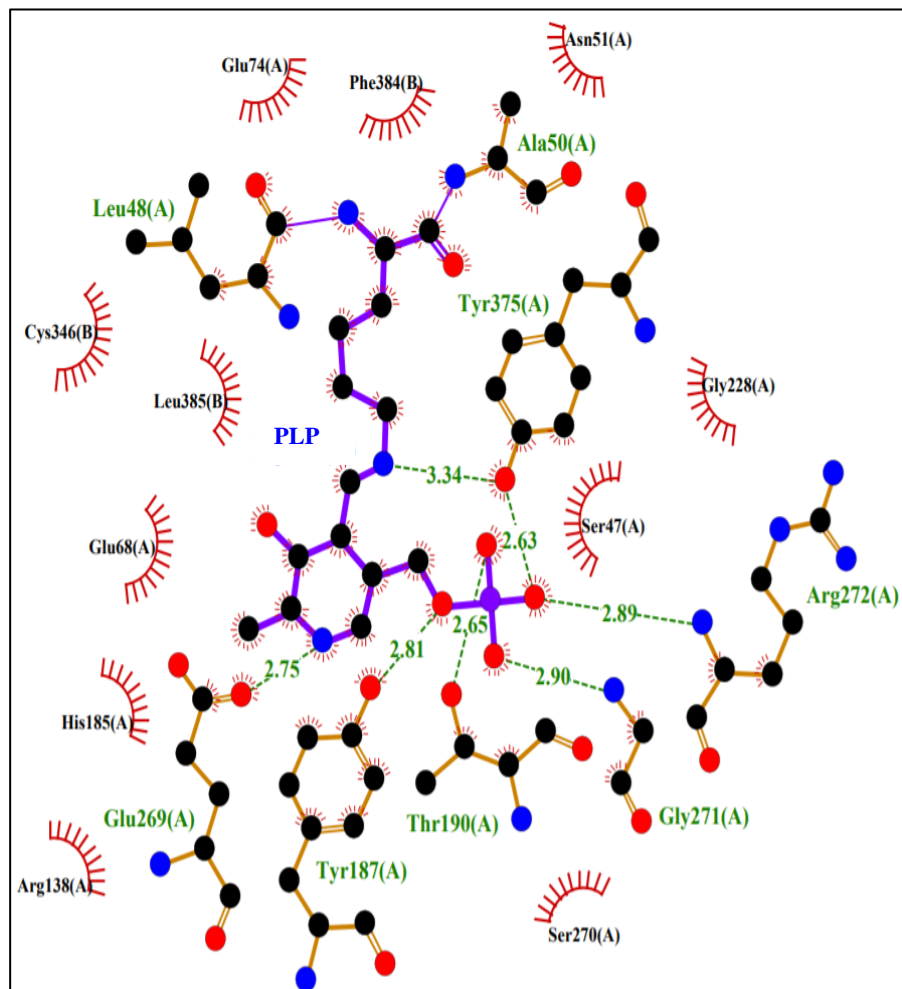


Figura 15. Representação do sítio ativo da BtrK.

(A) Proteína representada em modelo palito, onde resíduos tanto da cadeia A (verde marinho) como da cadeia B (amarelo) participam na formação do sítio ativo. (B) Representação plana apresentando as interações do PLP com os resíduos próximos e as suas respectivas distancias em Å. Os átomos estão codificados por cores: C preto, N azul, O vermelho, P roxo. Os resíduos que apresentam um desenho vermelho circular ao redor, indicam interação hidrofóbica pelos átomos mais próximos.

pirimidínico do PLP que favorece uma interação inter-atômica ou empilhamento π - π (**Figura 16**). O resíduo de tirosina tem um papel importante na descarboxilação, uma vez que estabiliza o PLP e favorece a orientação da ligação C α -C do substrato contribuindo para a clivagem desta (NI et al., 2019).

Inicialmente, o PLP está covalentemente ligado à enzima formando uma aldimina interna. Após a ligação do substrato, a lisina é trocada pelo grupo amino do substrato formando uma base Schiff com o PLP (aldimina externa). Uma das ligações ao C α da aldimina externa é quebrada permitindo a formação de um intermediário quinonoide, processo facilitado pelas propriedades eletrofílicas do cofator (SCHNEIDER; KÄCK; LINDQVIST, 2000). Depois, a lisina do sítio ativo permite a reprotonação do C α e a transaldiminação, que libera o produto e regenera a aldimina interna (DU; RYAN, 2019). Adicionalmente, o resíduo de His185 (conservado nas descarboxilases dependentes de PLP) pode ter um papel importante na protonação do C α que promove o deslocamento de elétrons do intermediário quinonoide e a formação de uma nova ligação dupla entre o átomo N e C4'. Logo, o intermediário sofre um processo de transaldiminação com o grupo ϵ -amino (amina primária) da lisina e regenera o complexo PLP-enzima (aldimina interna) (LIANG et al., 2019).

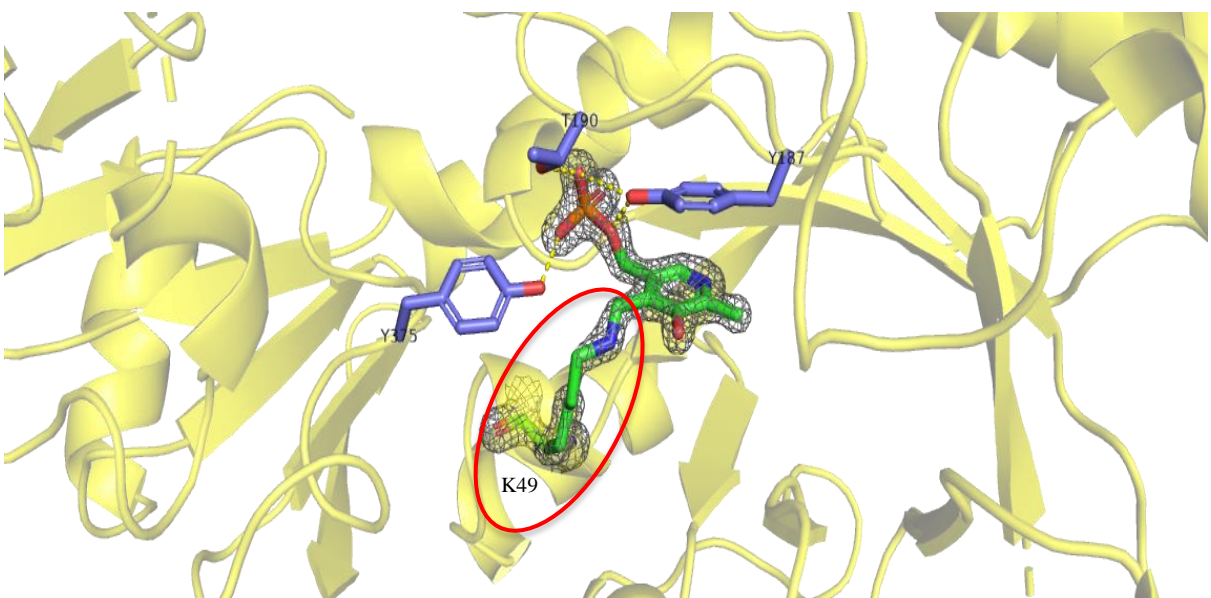


Figura 16. Densidade eletrônica do sítio ativo da BtrK.

O PLP assim como os resíduos adjacentes estão representados em modelo palito. No círculo vermelho está marcada a K49, que interage com o PLP através de uma ligação covalente. A Y187 e o PLP contribuem com a formação do empilhamento π - π .

4.3 Comparação da BtrK com homólogas

De acordo como o servidor Dali, a BtrK apresenta maior similaridade com descarboxilases de diaminopimelato (DAPDC) entre as quais foi realizada uma superposição e estão identificadas por cores (**Figura 17**): DAPDC de *Aquifex aeolicus* (PDB ID 2p3e, amarela, rmsd=1,240), DAPDC de *Staphylococcus aureus* (PDB ID 6kni, cinza, rmsd=1,337) e DAPDC de *Methanococcus jannaschii* (PDB ID 1twi, rosa, rmsd=1,316) com percentagens de identidade de 32%, 32% e 26% respectivamente. Em uma comparação geral, observou-se que as 4 descarboxilases apresentam um mesmo tipo de enovelamento, mas diferem em regiões de alças que são mais flexíveis. Por exemplo, a DAPDC de *M. jannaschii* (rosa) apresenta uma α hélice extra entre as posições $\alpha 6$ - $\beta 6$ do barril TIM que parece ter uma função de maior proteção do sítio ativo o que pode condicionar o substrato (**requadro Figura 17**). A orientação de algumas fitas do β -sanduíche difere levemente, o que pode estar associado às interações entre os protômeros das enzimas para formar as estruturas quaternárias.

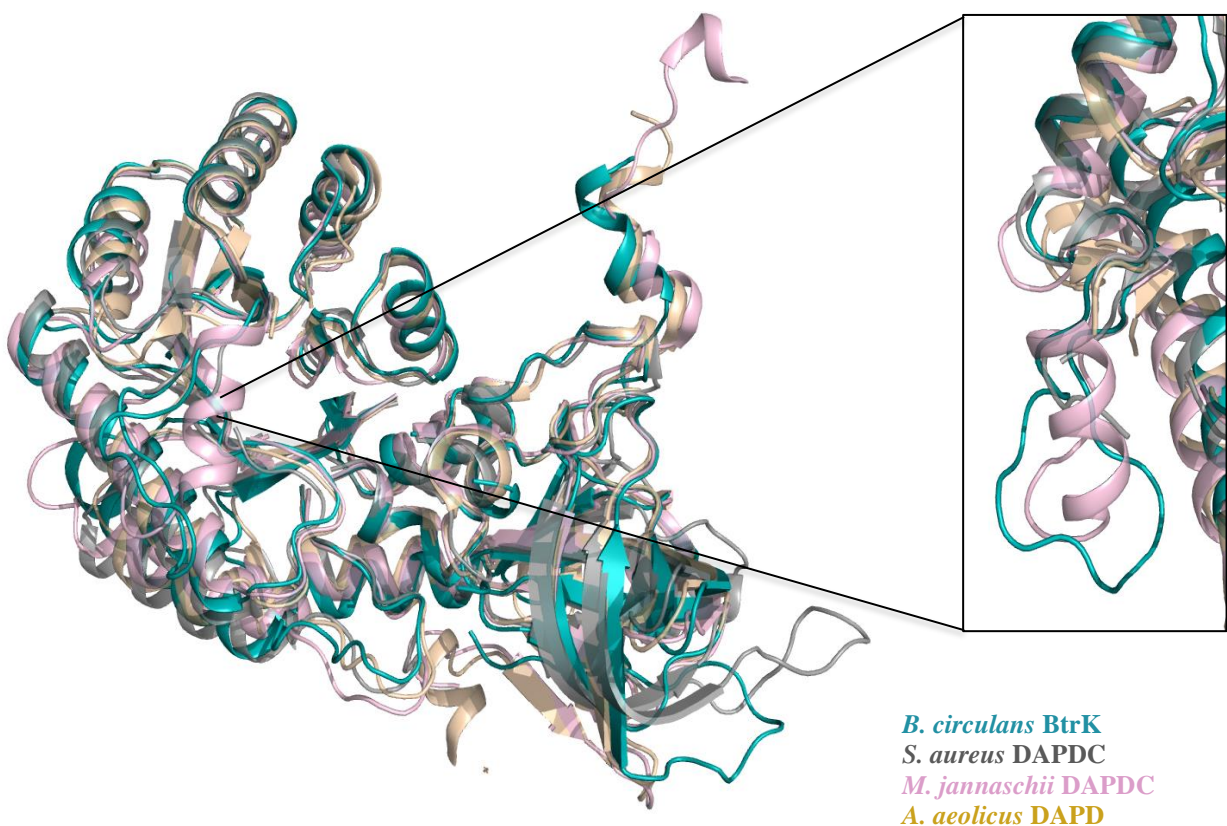


Figura 17. Superposição da estrutura monomérica da BtrK e as DAPDC.

B. circulans BtrK em verde marinho, *S. aureus* DAPDC (PDB ID 6kni) em cinza, *M. jannaschii* DAPDC (PDB ID 1twi) em rosa, *A. Aeolicus* DAPDC (PDB ID 2p3eB) em amarelo. No retângulo da direita, está ampliada a α hélice extra da *M. jannaschii* DAPDC, que na BtrK é equivalente a uma alça extensa.

Os sítios ativos também foram comparados (**Figura 18**) e observaram-se algumas diferenças em relação aos resíduos que interagem com o PLP. Nas DAPDC, o aminoácido aromático que realiza o empilhamento π com o PLP é uma histidina, enquanto na BtrK é feito pela Tyr187 (**Figura 18A**). Geralmente, resíduos de fenilalanina, tirosina e triptofano preferem as interações com anéis aromáticos de 6 membros em contraste com os resíduos de histidina

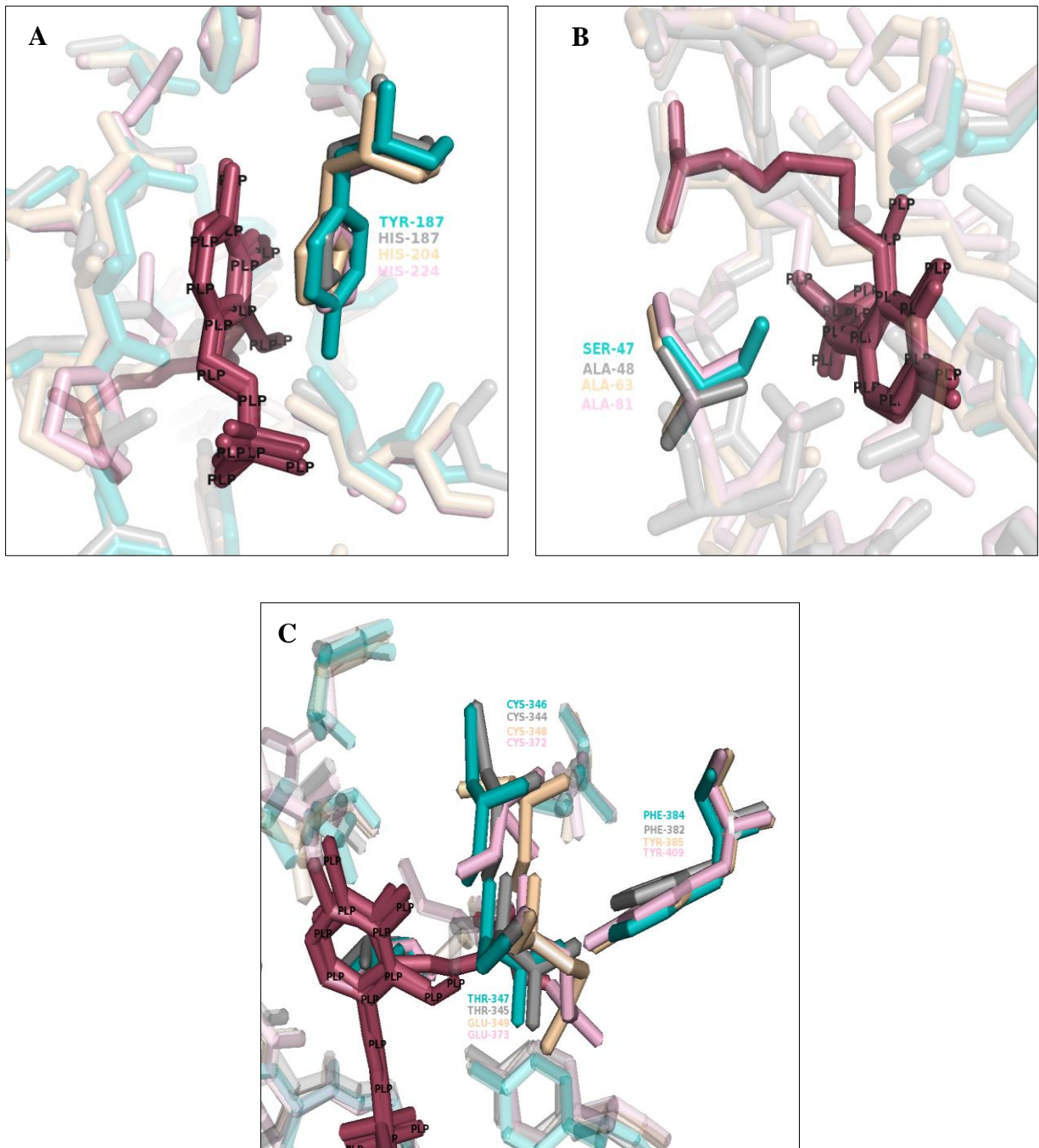


Figura 18. Superposição do sítio ativo da BtrK e as DAPDC homólogas.

(A) Resíduos com os quais o anel pirimidínico do PLP realiza o empilhamento π . (B) Resíduos que realizam interação hidrofóbica com o PLP. (C) Resíduos da cadeia B que interagem com o PLP.

que preferem interagir com anéis de 5 membros (BRYLINSKI, 2018). Essa diferença pode ter um papel importante na formação da aldimina externa e conseqüentemente, na velocidade e eficiência da reação de descarboxilação (NI et al., 2019). Um outro resíduo que contribui com interações hidrofóbicas é a Ser47, que em outras descarboxilases é feito através de uma alanina (**Figura 18B**). Resíduos de cisteína, fenilalanina e treonina da cadeia B que participam do sítio ativo são conservados entre as 4 descarboxilases (**Figura 18C**).

De acordo com o alinhamento das sequências entre a BtrK e as DAPDC (**Figura 19**), assim como os resíduos conservados da BtrK (**Figura 20**) evidencia-se que a região do barril TIM, principalmente onde está ancorado o PLP, é altamente conservada. Como foi mencionado anteriormente, é um enovelamento com características particulares como a organização paralela das fitas β internas cercadas pelo mesmo número de α hélices. O barril β interno é extremamente rígido já que as fitas estão estabilizadas por uma rede de pontes de hidrogênio. Além disso, a maioria dos resíduos do barril β , indicam uma baixa mobilidade. Pelo contrário, as α hélices são mais flexíveis e é esperado que os resíduos que as conformam sejam mais variáveis. A posição dos resíduos catalíticos também é conservada e a sua presença pode estar associada a um melhor acesso ao substrato sobre o qual as enzimas atuam. A estrutura do β sanduíche é parcialmente conservada cujos resíduos evidenciam uma maior diversidade, especialmente aqueles das alças entre as fitas β o que podem condicionar a localização dos domínios de uma forma diferente.

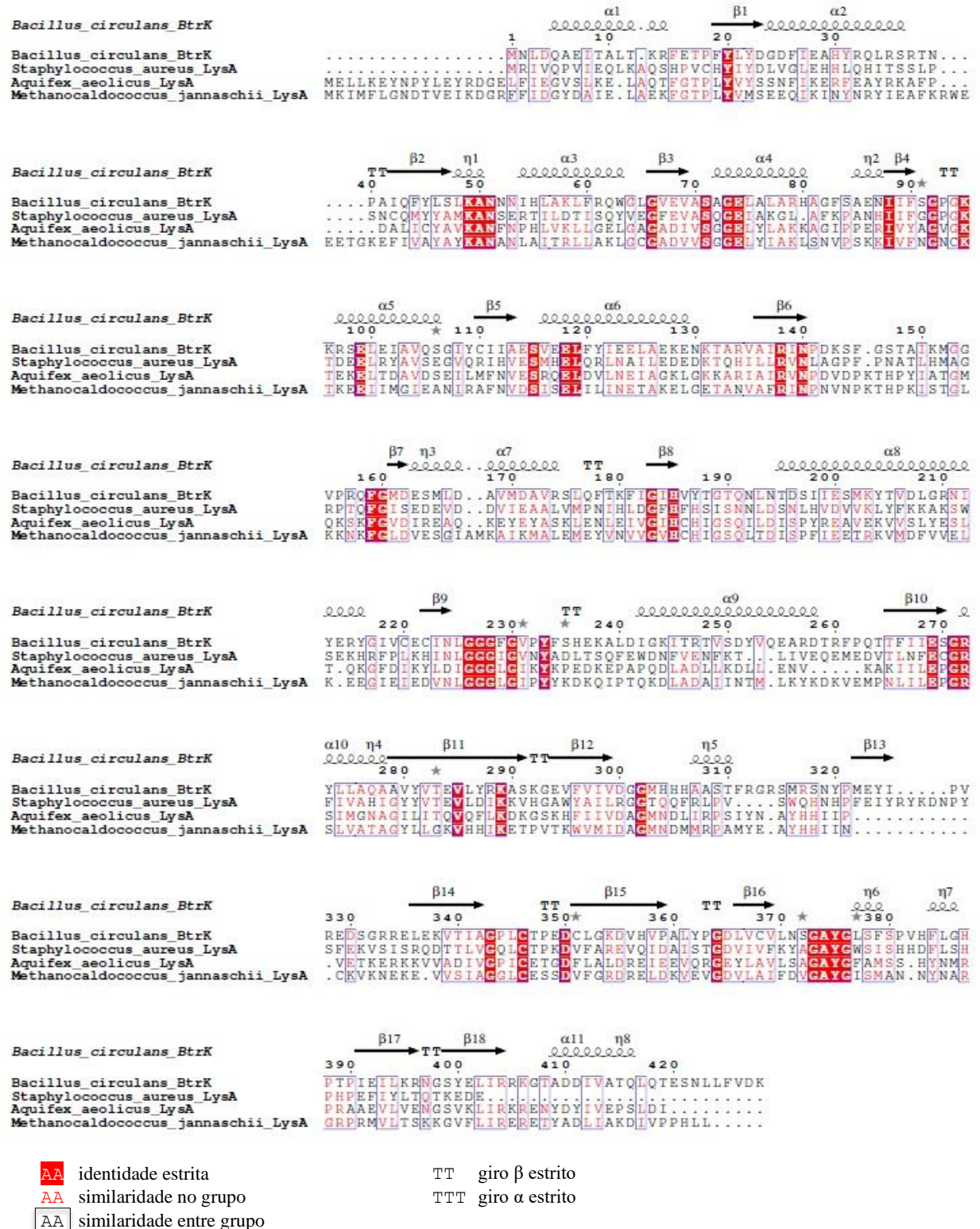


Figura 19. Alinhamento da sequência estrutural da BtrK e as DAPDC homólogas.

A representação da estrutura secundária está codificada por setas para as fitas β e por espirais para as hélices α.

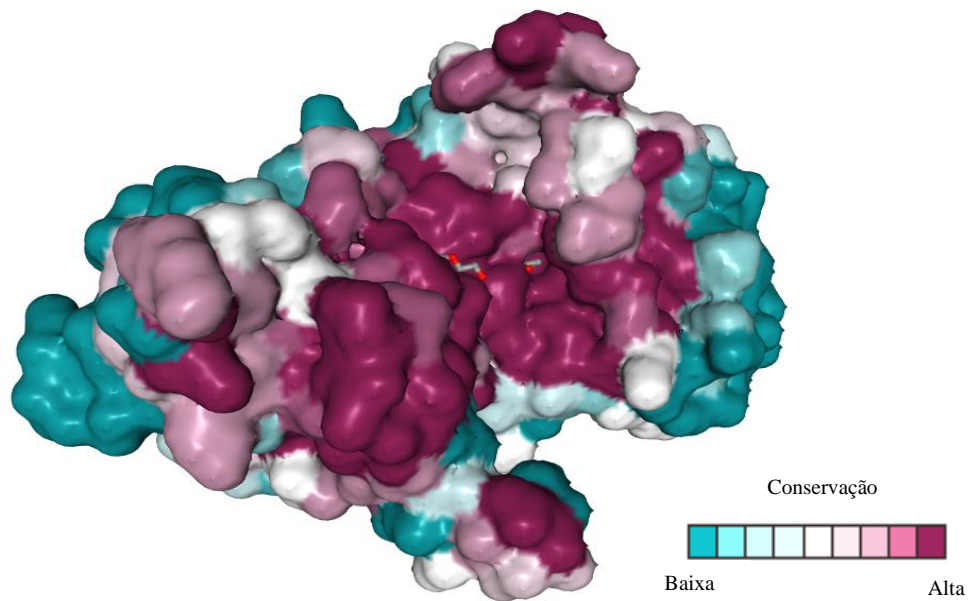


Figura 20. Diferenças na superfície da proteína BtrK de acordo o grau de conservação dos aminoácidos. Os resíduos mais conservados estão em cor roxo intenso e os menos conservados em cor azul intenso. O PLP e o PEG estão identificados em modelo palito.

4.4 Possível reconhecimento do substrato da BtrK

Embora os cristais da BtrK com o L-glutamato e a L-arginina tenham sido difratados, não observamos densidade eletrônica para esses L-aminoácidos no sítio ativo da enzima. De acordo com o reportado nos ensaios enzimáticos por Li e colaboradores (2005), a BtrK é capaz de descarboxilar L-ornitina, L-arginina, L-lisina, e diaminopimelato (DAP) na sua forma livre mas não L-glutamato nem nenhum aminoácido na conformação D. Além disso, a atividade de descarboxilação mostrou-se muito fraca, mesmo em concentrações superiores a 10mM e com um tempo de incubação superior a 12 horas (LI et al., 2005). Assim, os autores concluem que o substrato completo da BtrK é o produto da reação entre a BtrJ, L-glutamato, e a *holo*-BtrI, ou seja, o intermediário γ -L-glutamato-S-BtrI.

Tentativas de co-cristalização com a BtrI não foram realizadas devido à sua alta flexibilidade e possível ligação transitória com a BtrK, o que dificultaria a sua organização cristalina. Uma possibilidade seria inicialmente resolver a estrutura da PCP mediante ressonância magnética nuclear (RMN) na sua conformação *holo*. Para isso, foi realizada a expressão da BtrI em meio M9 com marcação de ^{15}N (LI; CORSON; SYKES, 2013); porém não foi possível dar continuidade aos experimentos devido à pandemia causada pela COVID-19.

Para compreender a possível interação do substrato parcial (L-glutamato) com a BtrK, realizou-se um ensaio de ancoragem molecular utilizando AutoDock Tools Vina (SEELIGER; DE GROOT, 2010). O ensaio *in silico* foi realizado com a estrutura homodimérica da BtrK como receptor e o L-glutamato como ligante. Foram geradas 9 possíveis poses do ligante com diferentes energias de interação. Para determinar a melhor posição em que o L-glutamato se encaixa, foram feitas comparações com a estrutura da DAPDC de *M. jannaschii* em complexo com ácido azaleico (PDB ID 1tuf). Essa proteína foi utilizada como referência para nosso estudo, uma vez que a BtrK e a DAPDC apresentam uma identidade de 32%, incluindo os resíduos do sítio ativo. Quando as estruturas foram sobrepostas, a melhor posição foi a primeira cuja energia de interação foi maior (-4,9 kcal/mol) comparada com a última (-4,2 kcal/mol). A sobreposição também foi realizada com a intenção de observar mudanças conformacionais nos resíduos que interagem com o substrato (**Figura 21**).

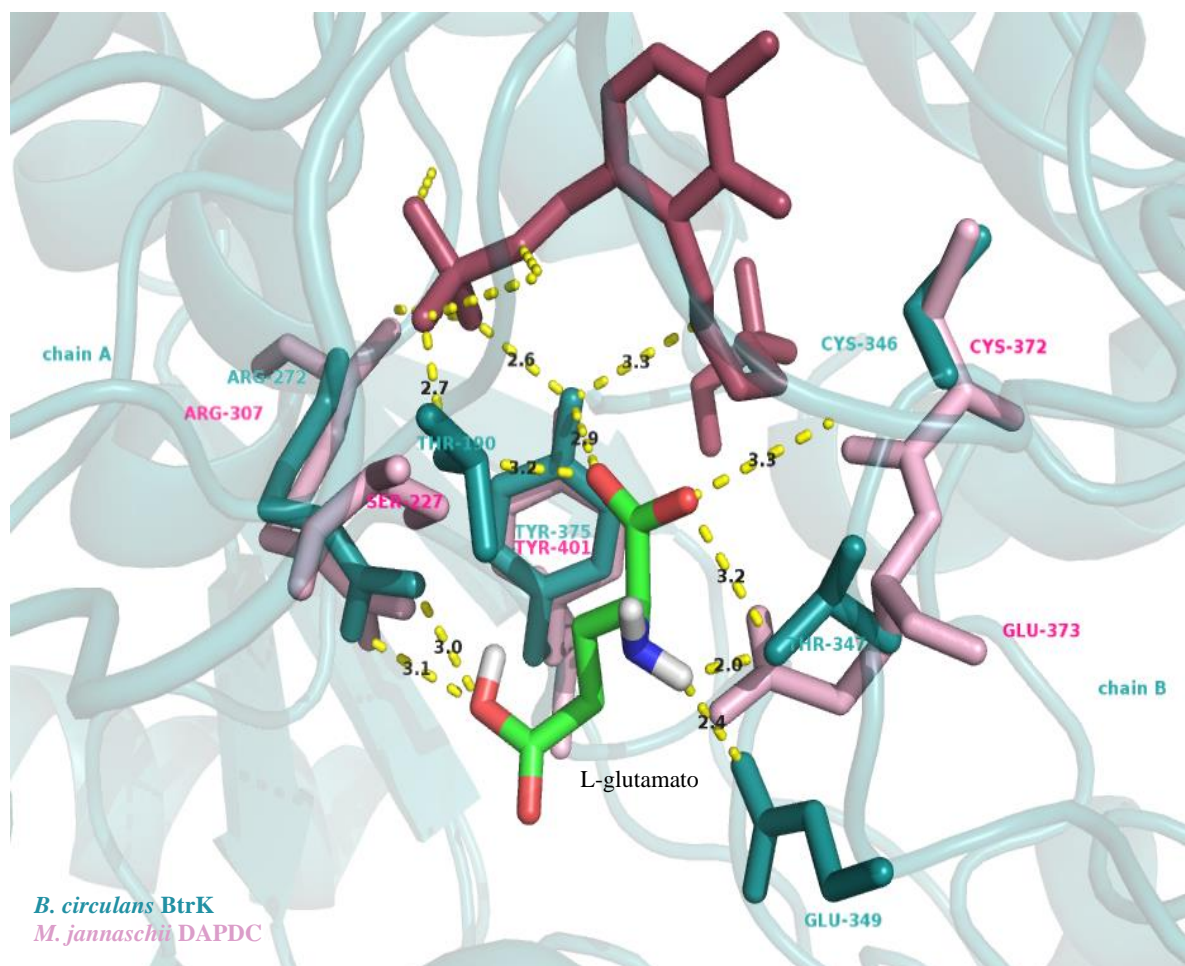


Figura 21. Possível interação do L-glutamato com a BtrK.

Os resíduos da BtrK que participam na interação com o substrato parcial (L-glutamato) estão em verde marinho. Realizou-se o alinhamento com a estrutura homóloga DAPDC de *M. jannaschii* representada em rosa em complexo com o substrato (não mostrado). O L-glutamato está codificado por cores de acordo como o átomo (C verde, O vermelho, N azul, H branco). As ligações estão representadas em amarelo com suas respectivas distancias em Å.

A molécula de L-glutamato não interage diretamente com o PLP. O grupo carboxila da molécula realiza ligações de hidrogênio com os resíduos Tyr375A e Thr190, que estabilizam a posição do substrato no bolsão catalítico e permitem a interação com o cofator. Na DAPDC, em lugar do resíduo de Thr190, aparece uma Ser227. O grupo L-amino está em contato com a Thr347 e Glu349, que na DAPDC é equivalente à Glu373. A mudança desse aminoácido pode representar a especificidade para reconhecer o L-estereocentro. Os mecanismos catalíticos das duas enzimas devem ser similares, mas a complexidade do reconhecimento do substrato pode ser diferente (RAY et al., 2003). Como foi mencionado anteriormente, o substrato precisa atravessar um campo eletrostático negativo para chegar ao sítio ativo onde será descarboxilado (**Figura 22**). O grupo carboxila exposto (**requadro da direita Figura 22**), deve ficar livre para ser posteriormente atacado pelo grupo tiol da 4'PP o que favorece a interação com a *holo*-BtrI.

Graças ao ensaio de ancoragem molecular foi possível ter uma visão de como aconteceria a interação entre o L-glutamato e a BtrK. Porém, uma vez o L-aminoácido esteja ligado ao grupo fosfopanteteína e esse pela sua vez com a *holo*-BtrI, pode que as posições de alguns resíduos ou átomos apresentem mudanças conformacionais. Adicionalmente, a BtrI também deve ter uma superfície de interação com a descarboxilase que pode favorecer a formação de um complexo proteico.

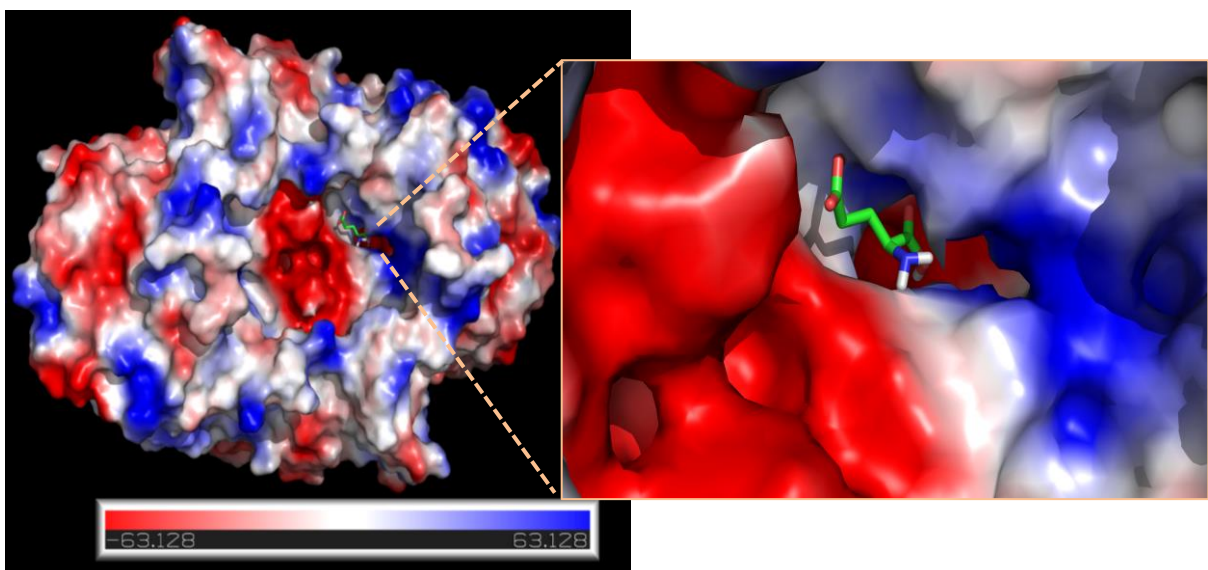


Figura 22. Superfície eletrostática do homodímero da BtrK e a localização do seu substrato parcial L-glutamato. O L-glutamato está representado em modelo palito codificado por cores de acordo com o átomo (C verde, O vermelho, N azul, H branco).

4.5 Expressão e purificação da BtrJ

A BtrJ foi purificada em tampão 50 mM HEPES pH 7,6; 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT e 0,5 mM EDTA considerando o seu ponto isoelétrico de 5,58. Porém, a proteína também evidenciou precipitação. De acordo com o experimento de DSF (**Figura 23**), o tampão prejudicou completamente o enovelamento da enzima evidenciado pelo comportamento lineal da fluorescência. De acordo com o ProtParam, a BtrJ é classificada como estável com um índice de 39,96, motivo pelo qual decidiu-se trocar a condição tamponante para melhorar a estabilidade da enzima. No ensaio de deslocamento térmico observou-se que o tampão com fosfato de sódio pH 6,1 foi melhor já que a T_m aumentou para 52°C. Porém, como os sais de fosfato cristalizam facilmente e podem interferir na precipitação da proteína, decidiu-se armazenar em tampão 60 mM ADA pH 6,5; 50 mM KCl, 5 mM DTT, 0,5 mM EDTA e 10% glicerol. Uma nova purificação por filtração em gel com o tampão ADA pH 6,5 mostrou um rendimento melhor. A proteína eluiu perto dos 78 mL (**Figura 24**), e não houve presença de agregados. A pureza foi confirmada mediante um gel SDS-PAGE com uma banda de aproximadamente 50 kDa.

A BtrJ não apresenta nenhuma sequência homóloga quando é analisada no servidor BLAST contra a base de dados do PDB. Isso implica que não é possível fazer a determinação da fase da enzima mediante substituição molecular, já que seria necessário um modelo com pelo menos 30% de identidade na sequência (SCAPIN, 2013). Assim, para resolver a estrutura da enzima, deve ser feito um faseamento experimental mediante diferenças isomorfas entre o cristal nativo e o cristal com a presença de um átomo pesado como o selênio, derivado da substituição das metioninas por selenometioninas (SeMet), capaz de criar um sinal anômalo. Pode realizar-se a coleta de um único conjunto de dados com o sinal anômalo otimizado (para determinação estrutural usando o método SAD) ou fazendo coleta de conjuntos de dados com diferentes comprimentos de onda (para determinação estrutural utilizando o método de MAD *Multi-wavelength anomalous dispersion*) de acordo com o máximo de energia do átomo de selênio (DESSAU; MODIS, 2010).

Assim, a BtrJ, foi expressa em meio mínimo M9 para a incorporação de selenometionina. Para a purificação foi usado o tampão ADA pH 6,5. A adição do DTT nesta etapa é vital para manter as SeMet reduzidas. Surpreendentemente, o rendimento foi melhor em meio mínimo (**Figura 25**).

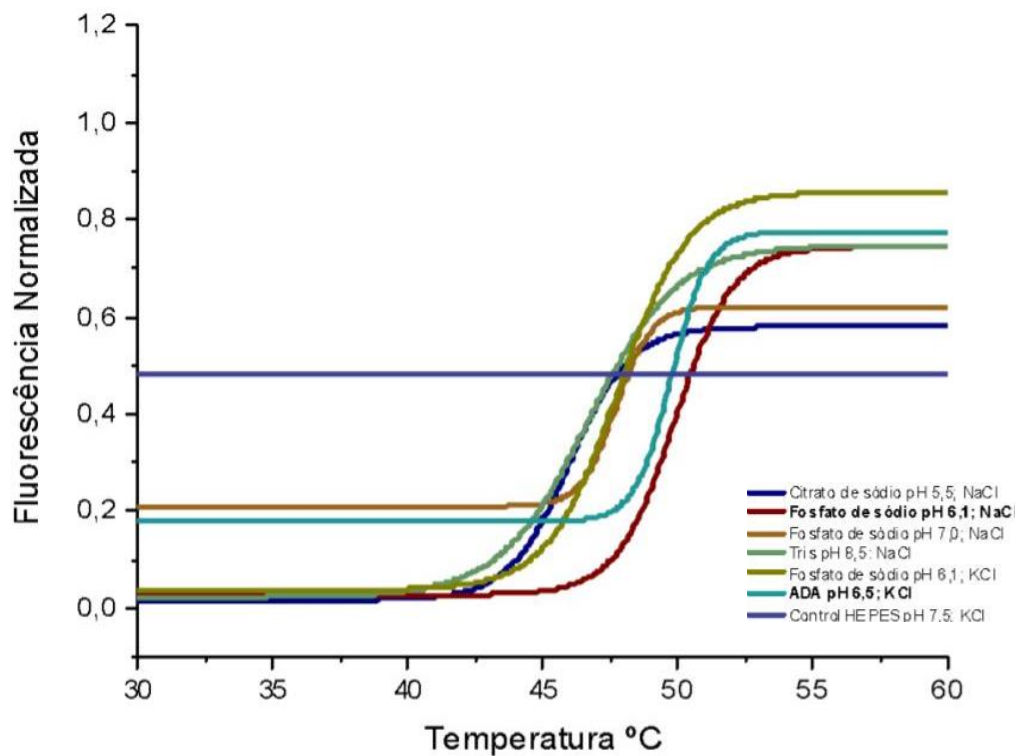


Figura 24. Experimento de DSF da proteína BtrJ.

O controle corresponde ao buffer no qual a proteína encontrava-se inicialmente (50 mM HEPES pH 7,6; 50 mM KCl; 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT e 0,5 mM EDTA). Os tampões que proporcionaram maior estabilidade apresentam um comportamento sigmoide e encontram-se identificados por cores.

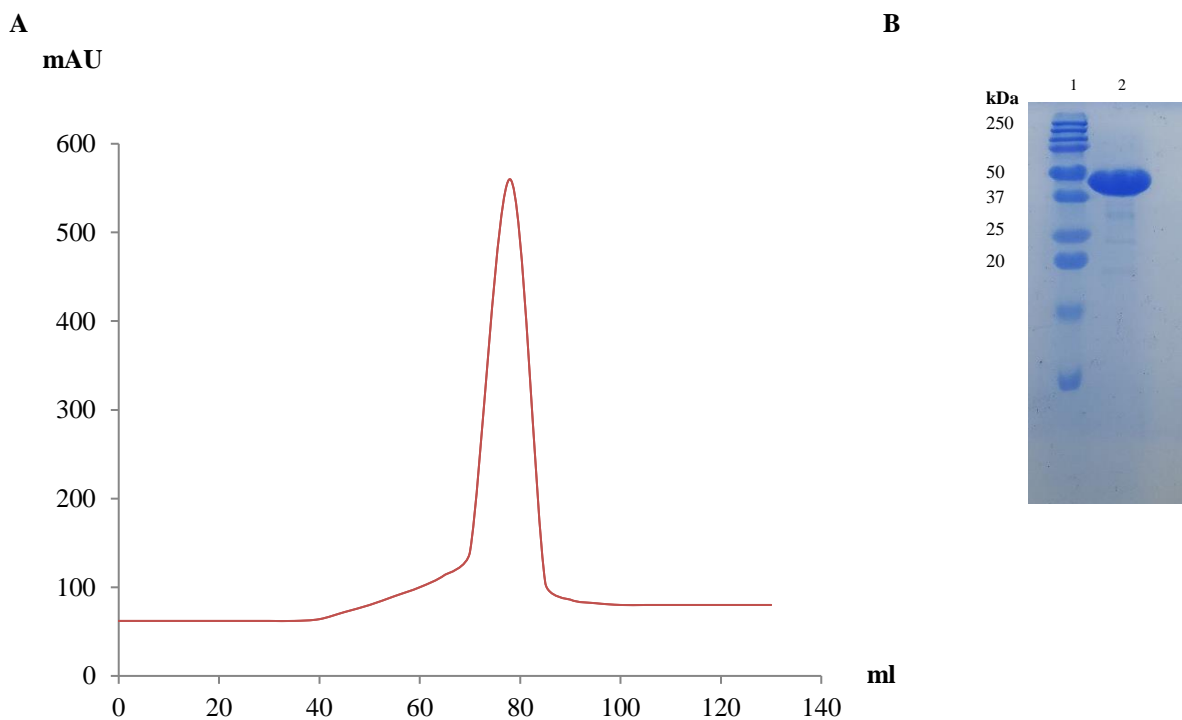


Figura 23. Purificação por exclusão molecular da BtrJ em estado nativo.

(A) Cromatograma da purificação onde apresenta-se a absorvância a 280 nm cujo sinal máximo está em aproximadamente 78 mL, correspondente com o volume de eluição da enzima. (B) Gel de poliacrilamida 12% SDS-PAGE. A banda presente no gel com aproximadamente 48 kDa corresponde à enzima purificada. (1) Marcador, (2) BtrJ concentrada.

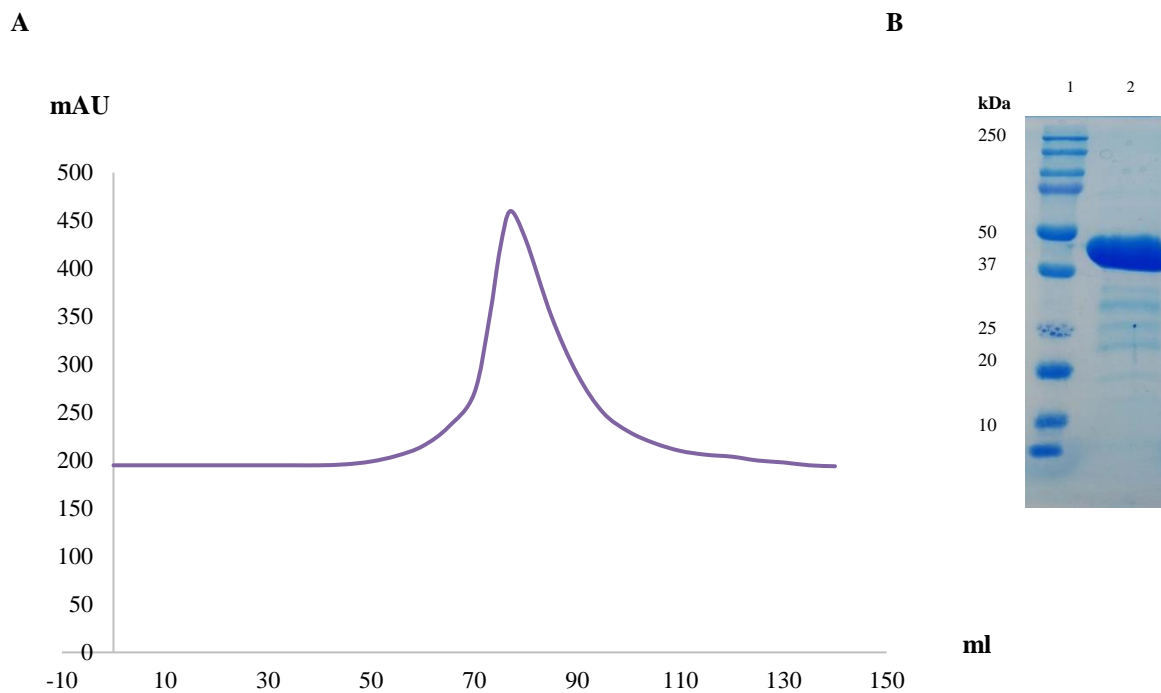


Figura 25. Purificação por exclusão molecular da BtrJ com incorporação de SeMet. (A) Cromatograma da purificação onde apresenta-se a absorvância a 280 nm cujo sinal máximo está em 77 mL. (B) Gel de poliacrilamida 12% SDS-PAGE. A banda presente no gel com aproximadamente 48 kDa corresponde à enzima purificada. (1) Marcador, (2) BtrJ concentrada.

4.6 Cristalização da BtrJ e coleta de dados

Ensaio iniciais de cristalização da BtrJ em estado nativo e com adição de ATP (5 mM) foram realizados em 4 placas de robô, totalizando centenas de condições. Depois de várias tentativas, foram observados cristais em 2 condições: a primeira 0,1 M HEPES pH 7,5, 10% p/v PEG 8000, 8% v/v etilenoglicol; e a segunda 0,1 M de acetato de sódio, 0,2 M de cloreto de cálcio e 20% de 2-propanol. A otimização dos cristais foi realizada em gota suspensa variando as concentrações do precipitante e foi adicionado 5 mM de ATP mediante co-cristalização. Foram observados cristais grandes em forma de losango e pequenos em forma de placas (**Figura 26A,B**). Para a obtenção da fase, foi realizado o *soaking* dos cristais na presença de diferentes metais pesados ou halogênios, mas mostraram-se muito sensíveis à solução.

Foram coletados conjuntos de dados de diferentes cristais, os quais foram ordenados e escalonados. Aqueles cristais com presença de bromo derivados do *soaking* com NaBr ou KBr, geraram o melhor conjunto de dados com o sinal anômalo mais forte e melhor resolução. Os dados do processamento se encontram resumidos na **Tabela 2**. Porém, o sinal anômalo obtido

não foi suficiente para a determinação estrutural. Quando existe um sinal anômalo fraco, na maioria dos casos não é possível a identificação de subestruturas (subconjunto de átomos na estrutura total) nem o faseamento (MCCOY; READ, 2010).

A introdução artificial de metais pesados na estrutura as vezes pode ser indesejada devido a mudanças na conformação original dos átomos da proteína até o ponto de destruir o cristal (RUPP, 2010). Por este motivo, foi realizada a expressão com incorporação de SeMet. Na totalidade de resíduos que conformam a BtrJ, 1,7% corresponde a resíduos de metioninas. Com uma média de 1 metionina em 60 resíduos, existe uma boa chance de obter um sinal anômalo necessário para a resolução estrutural (RUPP, 2010). Assim, foram realizados ensaios de cristalização da BtrJ com incorporação de SeMet mediante a técnica de gota suspensa usando as condições que previamente tiveram sucesso com a BtrJ em estado nativo. Mediante co-cristalização foi adicionado ATP (5 mM) onde observaram-se cristais quadrados (**Figura 26C**), e ATP (5 mM) + ácido L-glutâmico (5 mM) favorecendo a formação de cristais em forma de placas (**Figura 26D**). Os cristais apareceram entre as primeiras 48 e 120 horas após a incubação a 18°C.

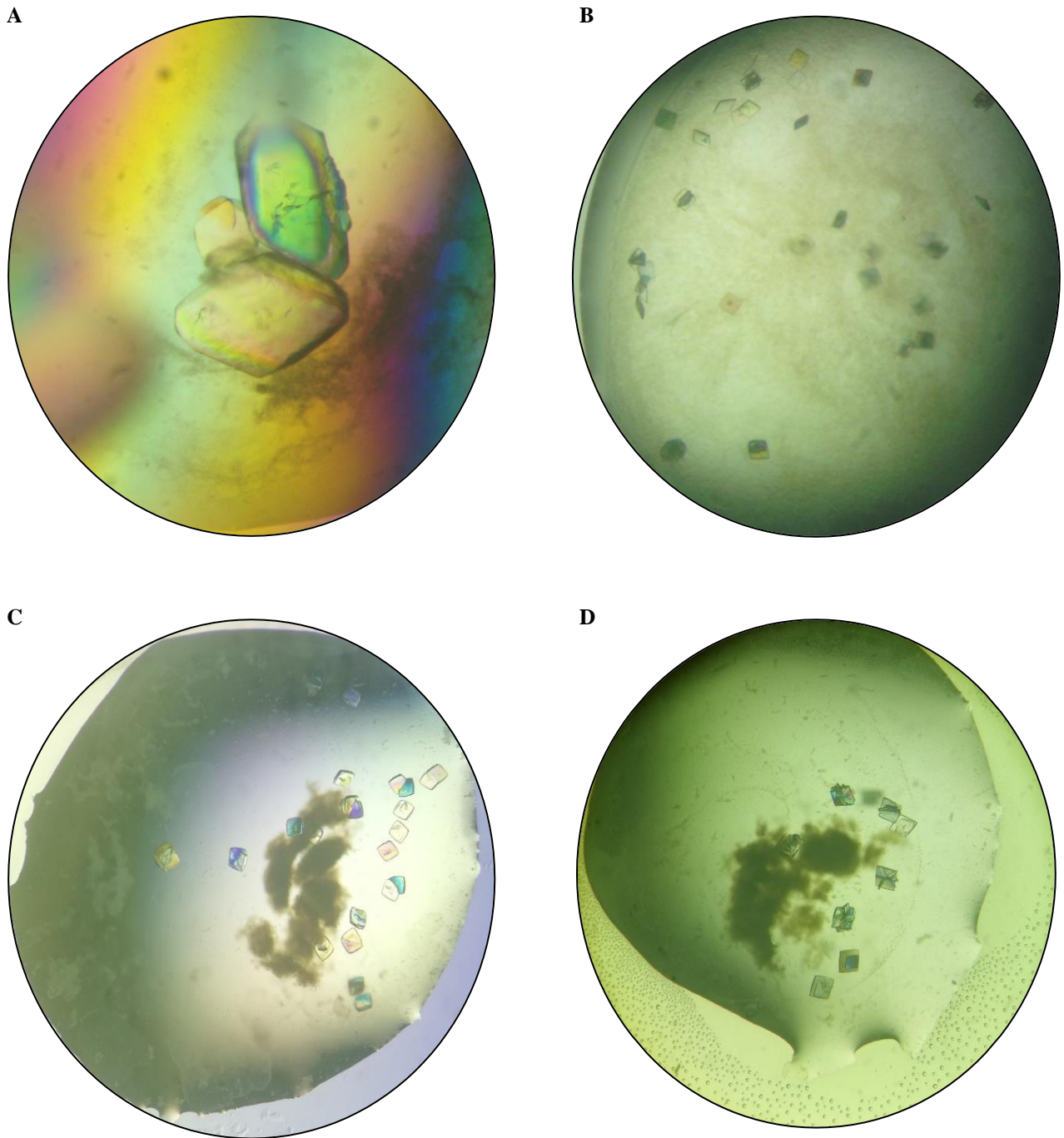


Figura 26. Cristais da BtrJ.

(A)(B) Cristais da expressão em meio LB com adição de ATP (5 mM) por co-cristalização. (C) Cristais da expressão com incorporação de SeMet e adição de ATP (5 mM) e (D) ATP + L-glu (5 mM). Os cristais obtiveram-se em soluções 0,1 M HEPES pH 7,5, 10% p/v PEG 8000, 8% v/v etilenoglicol (A)(C); e 0,1 M de acetato de sódio, 0,2 M de cloreto de cálcio e 20% de 2-propanol (B)(D).

Tabela 2. Análise dos dados de difração de raios X para a BtrJ na presença do sal NaBr. Estatísticas para a última camada de maior resolução são mostradas em parênteses.

Cristal	BtrJ+Br
Faixa de resolução (Å)	43,39-1,90 (1,94-1,90)
Grupo espacial	P 3 ₁ 2 1
a, b, c (Å)	77,07 ;77,07; 114,29
α , β , γ (°)	90; 90; 120
Completeza	0,999 (0,990)
Completeza anômala	0,999 (0,990)
Multiplicidade	19,4 (19,4)
Multiplicidade anômala	10,2 (10,0)
Média I/sigma (I)	16,2 (1,7)
R-merge	0,116 (2,457)
R-meas	0,119 (2,523)
CC1/2	0,999 (0,548)
Número de imagens analisadas	7200

Devido a dificuldades na disponibilização de tempo nas linhas dos Síncrotron DESy e Sírius como consequência da pandemia do SARS-CoV-2, não foi possível realizar a coleta nem a difração dos cristais. Assim, uma vez a situação volte à normalidade, espera-se que os cristais possam ser difratados para desvendar a estrutura da BtrJ. Devido à ausência de estruturas homólogas resolvidas, acreditamos que possa haver interessantes novidades estruturais para ampliar o conhecimento da extensa família de ligases dependentes de ATP, além de gerar informações cruciais para o entendimento da participação da BtrJ na biossíntese da butirósina.

4.7 Interação da BtrJ com L-glutamato

Para estudar uma interação entre a BtrJ e o seu substrato L-glutamato mediante DSF, foi necessária a purificação da BtrI visto que é a enzima encarregada de receber o L-aminoácido ativado e carregar os diferentes intermediários durante biossíntese do grupo AHBA. A BtrI é uma PCP com 9,8 kDa e apresenta homologia com outras ACP envolvidas na biossíntese de policetídeos (LI et al., 2005). A apo-BtrI foi purificada em tampão 50 mM

HEPES pH 7, 50 mM NaCl e 2 mM de DTT que mostrou ser favorável, pois a proteína não precipitou. De acordo com o cromatograma da GF, a proteína eluiu ao redor dos 117 mL com uma intensidade muito baixa (aproximadamente 15 mAU) devido à ausência de resíduos de triptofano (**Figura 27A**). Porém, a presença de outros resíduos aromáticos como

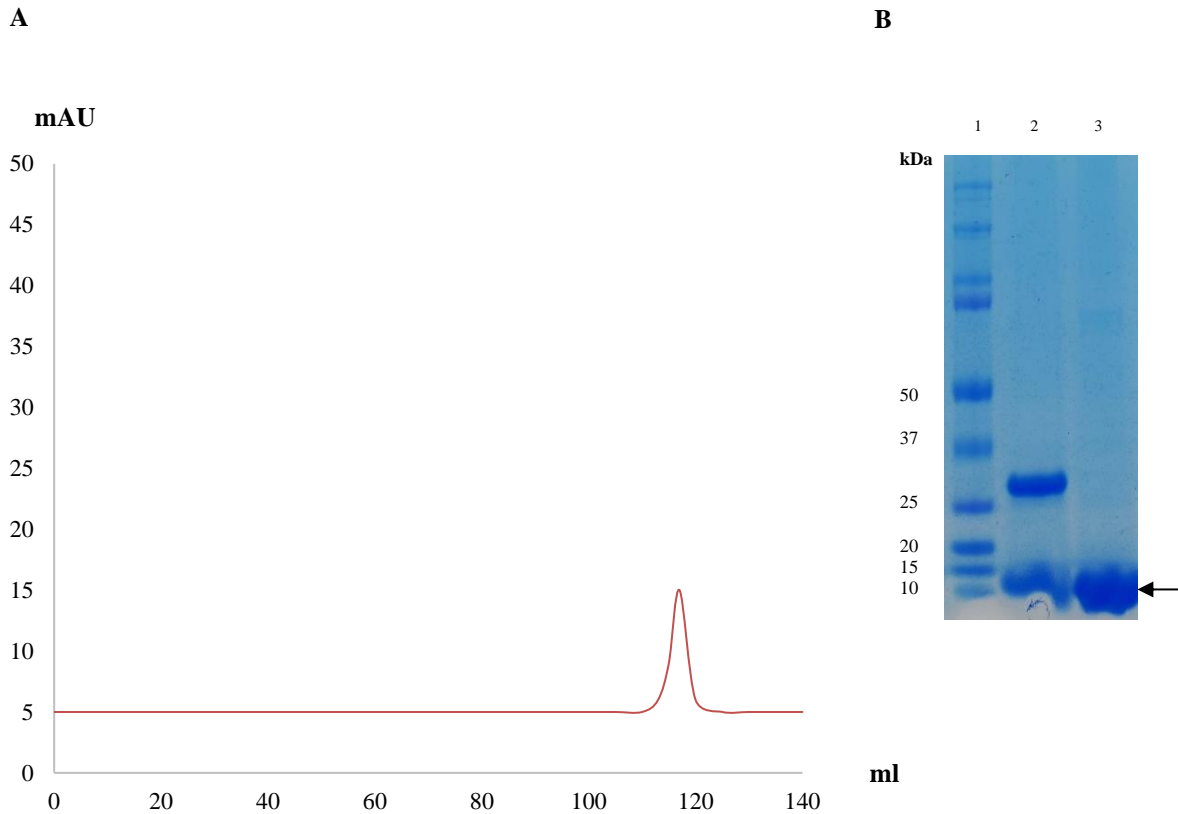


Figura 27. Purificação por exclusão molecular da *apo*-BtrI.

(A) Cromatograma da purificação onde apresenta-se a absorbância a 280 nm cujo sinal máximo está em 117 ml correspondente com o volume de eluição da enzima. (B) Gel de acrilamida FastCast TGX: A banda indicada pela seta preta corresponde à enzima purificada em aproximadamente 10 kDa. (1) Marcador, (2) Sfp e BtrI, (3) *apo*-BtrI concentrada.

fenilalanina, permitem a emissão de um pequeno sinal detectável à luz UV. A presença e pureza da proteína foi confirmada pela identificação de uma banda próxima aos 10 kDa em um gel de acrilamida FastCast TGX de 12% (BioRad) (**Figura 27B**).

A quantificação da *apo*-BtrI realizou-se pelo método de Bradford para o qual foi necessário realizar uma curva padrão com Soro Albumina Bovina (BSA) (**Figura 28**). A absorbância da *apo*-BtrI foi ajustada aos dados da curva e realizou-se a correção da diluição.

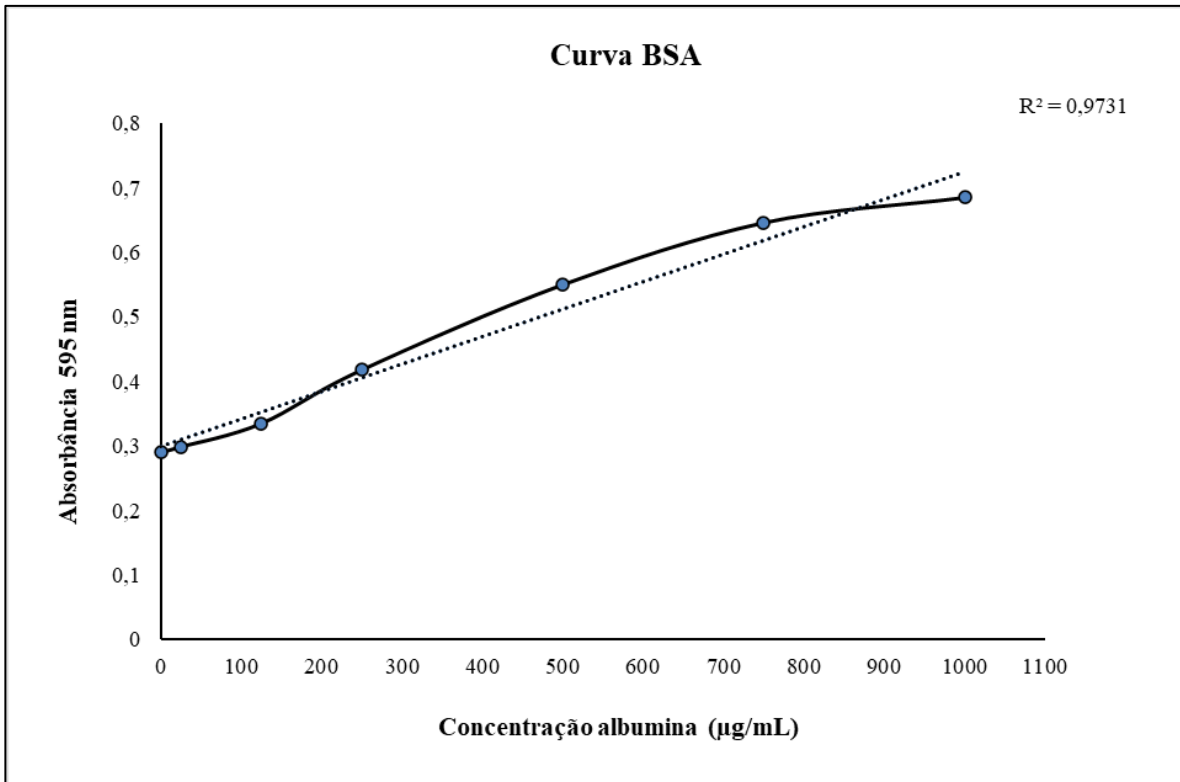


Figura 28. Curva padrão de BSA para método de Bradford.

Mediante o ensaio de DSF observaram-se variações nas T_m da BtrJ em ausência e presença do seu substrato e da *apo*-BtrI (**Figura 29 e Tabela 3**). A BtrJ em presença de ATP, teve uma T_m de 46,35°C e apresentou um comportamento sigmoide normal. Inicialmente o estado enovelado da proteína não emite nenhum sinal e, conforme a temperatura aumenta, acontece um desenovelamento expondo os resíduos hidrofóbicos que interagem com o SO emitindo um sinal de fluorescência. Esse comportamento assume algumas considerações, como o fato da proteína: (1) não apresentar fragmentos hidrofóbicos expostos na superfície, (2) estar estável no começo do experimento pois do contrário teria um aumento na fluorescência basal e (3) possuir um único domínio, já que se tivesse vários, o desenovelamento poderia acontecer a diferentes temperaturas (GAO; OERLEMANS; GROVES, 2020).

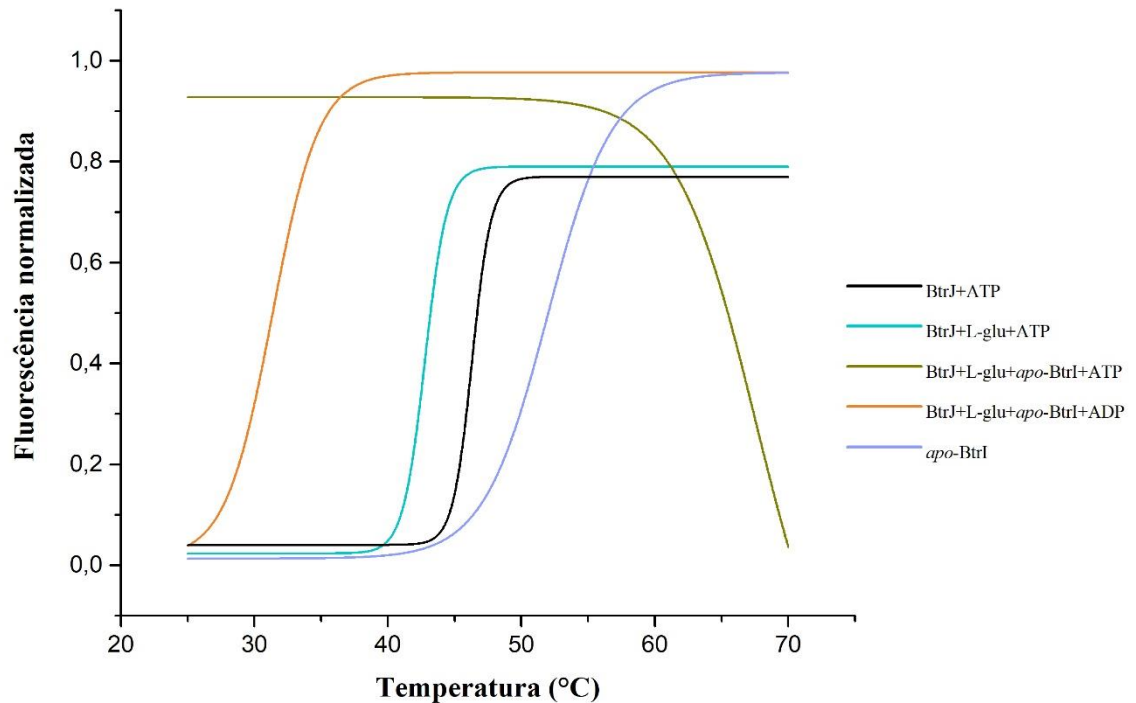


Figura 29. Ensaio de DSF para a interação entre a BtrJ e seu substrato e em presença da *apo*-BtrI.

Tabela 3. Temperatura de melting das enzimas BtrJ e BtrI assim como na presença do seu substrato.

Reação	T _m (°C)
BtrJ + ATP	46,35
BtrJ+L-glu+ATP	42,7
BtrJ+L-glu+ <i>apo</i> -BtrI+ATP	-
BtrJ+L-glu+ <i>apo</i> -BtrI+ADP	31,17
<i>apo</i> -BtrI	52,02

A reação com o ligante L-glutamato, diminuiu a T_m para 42,7°C. Geralmente, a formação de complexos ou a interação com ligantes estabiliza a proteína; porém, neste caso aconteceu o contrário o que não necessariamente significa que não exista uma interação, mas que a ligação acontece no estado desenovelado da enzima ou que o substrato promova a sua abertura. Assim, quando um ligante se liga melhor ao estado desdoblado da enzima do que ao

estado nativo, significa que a proteína é desestabilizada pelo ligante o que causa a diminuição da T_m (CIMPERMAN et al., 2008). Isso também pode supor a necessidade da presença da BtrI para a formação do complexo junto com o L-aminoácido.

A BtrJ em presença do L-glutamato, da *apo*-BtrI e de ATP foi completamente desfavorável pois o comportamento característico sigmoide não foi observado. O sinal da fluorescência começou muito alto devido possivelmente ao desenovelamento ou agregação da enzima desde o início da reação onde os resíduos hidrofóbicos estão expostos interagindo com o fluoróforo e conforme aumenta a temperatura o SO perde a sua intensidade. O estado nativo de uma proteína geralmente apresenta uma transição de *melting* definida que muda conforme aumenta a temperatura e pode ser reversível. Pelo contrário, uma proteína mal desenovelada pode não gerar ou gerar uma transição de *melting* menos favorável, criando um sinal de fluorescência alto no começo do experimento (BITER et al., 2016). Porém, quando a reação foi realizada com adição de ADP, mesmo com uma T_m baixa de 31,17°C, observou-se uma transição de *melting* normal. O anterior pode sugerir que a interação com ADP foi melhor que com ATP, particularmente quando acontece a ligação com o substrato. Em outras enzimas foi reportado que o estado ligado ao ATP, comparado com o ADP, apresenta uma menor afinidade por substratos como peptídeos (BANDLA et al., 2019). Entretanto, deve-se levar em consideração que os cátions divalentes também influenciam esse tipo de interação.

Em teoria, a BtrJ catalisa a ligação entre o L-glutamato e a BtrI na sua conformação *holo*. Para a obtenção da *holo*-BtrI seria necessário realizar a adição do grupo 4-fosfopantetína (4'-PP) derivado da coenzima A (CoA). De acordo com Li e colaboradores (2005), a *apo*-BtrI incubada com a 4'-fosfopanteteneil transferase Sfp de *B. subtilis* por 15 min é convertida >95% em *holo*-BtrI com massa molecular de 12,153 kDa confirmado por LC-ESI-MS. No presente projeto, foi realizada a tentativa da reação de fosfopanteteneilação mas não foi possível confirmar a formação da *holo*-BtrI através de ensaios de espectrometria de massas.

A *apo*-BtrI é estável com uma T_m de 52,02°C. Mesmo que não foi possível obter a *holo*-BtrI nem avaliar a sua estabilidade, alguns estudos indicam que a interação do grupo 4'PP com a ponte polipeptídica da PCP tem um efeito na estabilidade enzimática. Isso pode dever-se aos contatos com os aminoácidos na superfície da proteína que garantem a presença de vários doadores e aceptores para as ligações de hidrogênio (MODAK; SINHA; SUROLIA, 2007). A BtrI deve manter um ambiente estável para o grupo γ -glutamil e demonstra a sua importância

para a função das outras enzimas presentes na via biossintética, o que pode sugerir interação entre elas (LI et al., 2005).

Para a análise dos resultados da DSF também devem considerar-se as limitações da técnica. Por exemplo, as vezes os dados não podem ser ajustados em uma curva sigmoide (WU et al., 2020). A técnica de TSA também assume um único estado de desdobramento da proteína, pois a proteína pode ter diferentes estados conformais de desdobramento. Adicionalmente, o ensaio considera que a ligação acontece em uma estequiometria de 1:1, porém a ligação pode acontecer em diferentes estados e com diferentes potenciais (CIMPERMAN et al., 2008). Para diminuir os erros no experimento, era preciso fazer diferentes tipos de controles que avaliassem todos os reagentes presentes na reação: por exemplo controle com SO, assim como com os ligantes, uma vez que esses dados podem gerar algum tipo de sinal por reações de interação entre eles. O tampão da BtrJ continha glicerol o que pode ter alterado o sinal de fluorescência associado à viscosidade. Outros aditivos como o EDTA também podem ter interferido no sinal.

Por esses motivos, ensaios de interação entre proteínas devem complementar-se com outras técnicas que permitam uma melhor diferenciação de formação de possíveis complexos. Geralmente, para esclarecer informação sobre a ativação enzimática das PCP e ACP, estudos biofísicos com NMR são realizados, aprofundando sobre o reconhecimento da proteína com o seu substrato. Porém, os intermediários naturais ligados a essas enzimas são instáveis e altamente reativos. Uma alternativa interessante para superar essas características de instabilidade, seria a implementação do método criado no grupo de Tosin e colaboradores, baseado no uso de sondas não hidrolisáveis de unidades de malonato, sintetizadas quimicamente e ligadas às ACP capazes de interagir com intermediários biossintéticos que podem ser facilmente caracterizados (KILGOUR et al., 2019). A conjugação da BtrI com este braço prostético, poderia favorecer o estudo de interação com o L-glutamato e a BtrJ para serem analisados por ensaios de espectrometria de massas assim como por cristalografia. A compreensão dos mecanismos de ação e ligação com os diferentes intermediários é uma ferramenta poderosa que pode ser aplicada na biossíntese de moléculas mais eficientes no combate aos diferentes patógenos.

5 CONCLUSÃO

Foi determinada a estrutura da BtrK na presença do seu cofator PLP. Na unidade assimétrica existe um único protômero embora a proteína seja um dímero obrigatório em solução. O protômero contém 2 domínios, um N-terminal com um enovelamento tipo barril TIM que é altamente conservado e um C-terminal constituído por um β sanduíche. A interação entre eles permite a dimerização da enzima. Resíduos dos dois domínios e das duas cadeias ajudam na conformação do sítio ativo. O PLP liga-se covalentemente com um resíduo de lisina (Lys49) mediante a formação de uma base Schiff. Resíduos como a Tyr187(A) e a Glu269(A) ajudam na estabilização do cofator mediante um empilhamento dos anéis aromáticos e na retirada de elétrons do anel. Embora o substrato real da enzima seja o intermediário γ -L-glutamato-S-BtrI, que consiste em uma molécula de L-glutamato ligada à *holo*-BtrI, realizou-se uma simulação da possível interação do L-glutamato no sítio ativo. O ligante não interage diretamente com o PLP, mas faz ligações com os resíduos Tyr375(A) e Thr190 que podem estabilizar a posição do substrato no bolsão catalítico.

Apesar de várias tentativas de resolução da estrutura da BtrJ, não foi possível obter dados com um sinal anômalo para a determinação da fase utilizando a técnica de incorporação de metais pesados por *soaking*. Para a determinação da fase, também foi realizada a incorporação de SeMet e foram obtidos cristais promissores. Ainda, se espera continuar esse experimento pois a BtrJ, por tratar-se de um novo tipo de enzima capaz de ativar grupos carboxila de resíduos como o L-glutamato e catalisar a ligação com proteínas carreadoras de peptidil (PCP), resulta um alvo interessante de estudo.

Mediante ensaios de DSF, obtiveram-se resultados sobre uma possível interação entre a BtrJ e o seu substrato L-glutamato onde pode inferir-se a necessidade da presença da *holo*-BtrI para a formação de um complexo estável.

As análises dos mecanismos e ligações das diferentes enzimas têm implicações biológicas muito relevantes desde que é possível estudar se têm a capacidade para reconhecer outros substratos ou para a criação de enzimas híbridas que permitam a constituição de moléculas mais efetivas.

REFERÊNCIAS*

- ADAMS, P. D. et al. The Phenix software for automated determination of macromolecular structures. **Methods**, v. 55, n. 1, p. 94–106, 2011.
- AFONINE, P. V et al. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 68, n. Pt 4, p. 352–367, 2012.
- ARYA, D. P. **Aminoglycoside Antibiotics. For Chemical Biology to Drug Discovery**. [s.l.] Wiley-Blackwell, 2007.
- BANDLA, S. et al. ATPase activity of human binding immunoglobulin protein (BiP) variants is enhanced by signal sequence and physiological concentrations of Mn²⁺. **FEBS Open Bio**, v. 9, n. 8, p. 1355–1369, 2019.
- BITER, A. B. et al. DSF Guided Refolding As A Novel Method Of Protein Production. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–9, 2016.
- BRYLINSKI, M. Aromatic interactions at the ligand-protein interface: Implications for the development of docking scoring functions. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 91, n. 2, p. 380–390, 2018.
- BURY, P. D. S. et al. Structural Basis of the Selectivity of GenN, an Aminoglycoside N-Methyltransferase Involved in Gentamicin Biosynthesis. **ACS Chemical Biology**, v. 12, n. 11, p. 2779–2787, 2017.
- CHEN, V. B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 66, n. Pt 1, p. 12–21, 2010.
- CIMPERMAN, P. et al. A quantitative model of thermal stabilization and destabilization of proteins by ligands. **Biophysical Journal**, v. 95, n. 7, p. 3222–3231, 2008.
- CLARDY, J.; FISCHBACH, M. A.; WALSH, C. T. New antibiotics from bacterial natural products. v. 24, n. 12, p. 1541–1550, 2006.
- DESSAU, M. A.; MODIS, Y. Protein crystallization for X-ray crystallography. **Journal of Visualized Experiments**, v. 9, n. 47, p. 1–6, 2010.
- DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. p. 303–336, 2012.
- DION, H.; WOO, P.; WILLMER, N. Butirosin, a new aminoglycosidic antibiotic complex: isolation and characterization. **Antimicrobial agents**, v. 2, n. 2, p. 89–94, 1972.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

DU, Y. L.; RYAN, K. S. Pyridoxal phosphate-dependent reactions in the biosynthesis of natural products. **Natural Product Reports**, v. 36, n. 3, p. 430–457, 2019.

EDSON, R. S.; TERRELL, C. L. The Aminoglycosides. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 74, n. 5, p. 519–528, 1999.

ELIOT, A. C.; KIRSCH, J. F. Pyridoxal Phosphate Enzymes: Mechanistic, Structural, and Evolutionary Considerations. **Annual Review of Biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 383–415, 2004.

ELJAALY, K. et al. Plazomicin: A Novel Aminoglycoside for the Treatment of Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. **Drugs**, v. 79, n. 3, p. 243–269, 2019.

EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 60, n. Pt 12 Pt 1, p. 2126–2132, 2004.

EVANS, P. Scaling and assessment of data quality. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 62, n. Pt 1, p. 72–82, 2006.

GAO, K.; OERLEMANS, R.; GROVES, M. R. Theory and applications of differential scanning fluorimetry in early-stage drug discovery. **Biophysical Reviews**, v. 12, n. 1, p. 85–104, 2020.

GRISHIN, N. V. et al. X-ray structure of ornithine decarboxylase from *Trypanosoma brucei*: The native structure and the structure in complex with α difluoromethylornithine. **Biochemistry**, v. 38, n. 46, p. 15174–15184, 1999.

GURUPRASAD, K.; REDDY, B. V. B.; PANDIT, M. W. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: A novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 4, n. 2, p. 155–161, 1990.

HAGEMANS, D. et al. A script to highlight hydrophobicity and charge on protein surfaces. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 2, 13 out. 2015.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. v. 13, n. October, 2008.

KABSCH, W. XDS. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 66, n. Pt 2, p. 125–132, 2010.

KILGOUR, S. L. et al. A Light-Activated Acyl Carrier Protein “Trap” for Intermediate Capture in Type II Iterative Polyketide Biocatalysis. **Chemistry - A European Journal**, v. 25, n. 72, p. 16515–16518, 2019.

KOTRA, L. P.; HADDAD, J.; MOBASHERY, S. Aminoglycosides: Perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 12, p. 3249–3256, 2000.

KRAUSE, K. M. et al. Aminoglycosides : An Overview. p. 1–18, 2016.

KRISSINEL, E.; HENRICK, K. Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State. **Journal of Molecular Biology**, v. 372, n. 3, p. 774–797, 2007.

KUDO, F. et al. Biosynthesis of 2-deoxystreptamine by three crucial enzymes in *Streptomyces fradiae* NBRC 12773. **Journal of Antibiotics**, v. 58, n. 12, p. 766–774, 2005.

KUDO, F.; EGUCHI, T. **Chapter 20: Biosynthetic Enzymes for the Aminoglycosides Butirosin and Neomycin**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2009a. v. 459

KUDO, F.; EGUCHI, T. Biosynthetic genes for aminoglycoside antibiotics. **The Journal of Antibiotics**, v. 62, n. 9, p. 471–481, 2009b.

KUDO, F.; EGUCHI, T. Aminoglycoside Antibiotics : New Insights into the Biosynthetic Machinery of Old Drugs. p. 4–18, 2016.

LABBY, K. J.; GARNEAU-TSODIKOVA, S. Strategies to overcome the action of aminoglycoside-modifying enzymes for treating resistant bacterial infections. **Future Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 11, p. 1285–1309, 2013.

LAMBALOT, R. H.; WALSH, C. T. Cloning, overproduction, and characterization of the *Escherichia coli* holo-acyl carrier protein synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 42, p. 24658–24661, 1995.

LI, M. X.; CORSON, D. C.; SYKES, B. D. Isotope Labeling. **Encyclopedia of Biophysics**, v. 173, n. 3, p. 1161–1161, 2013.

LI, Y. et al. Biosynthesis of the unique amino acid side chain of butirosin: Possible protective-group chemistry in an acyl carrier protein-mediated pathway. **Chemistry and Biology**, v. 12, n. 6, p. 665–675, 2005.

LIANG, J. et al. Current advances on structure-function relationships of pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzymes. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 6, n. MAR, 2019.

LLEWELLYN, N. M.; LI, Y.; SPENCER, J. B. Biosynthesis of Butirosin: Transfer and Deprotection of the Unique Amino Acid Side Chain. **Chemistry & Biology. Cell Press**, v. 14, n. April, p. 379–386, 2007.

LLEWELLYN, N. M.; SPENCER, J. B. Chemoenzymatic acylation of aminoglycoside antibiotics. **Chemical Communications**, n. 32, p. 3786–3788, 2008.

MCCOY, A. J.; READ, R. J. Experimental phasing: Best practice and pitfalls. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 66, n. 4, p. 458–469, 2010.

MODAK, R.; SINHA, S.; SUROLIA, N. Isothermal unfolding studies on the apo and holo forms of *Plasmodium falciparum* acyl carrier protein: Role of the 4'-phosphopantetheine group in the stability of the holo form of *Plasmodium falciparum* acyl carrier protein. **FEBS Journal**, v. 274, n. 13, p. 3313–3326, 2007.

MURSHUDOV, G. N. et al. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 67, n. Pt 4, p. 355–367, 2011.

NGUYEN, H. et al. Post-PKS Tailoring Steps of the Spiramycin Macrolactone Ring in *Streptomyces ambofaciens*. v. 57, n. 8, p. 3836–3842, 2013.

- NI, J. et al. Hyperconjugation promoted by hydrogen bonding between His98/His241 and a carboxyl group contributes to tyrosine decarboxylase catalysis. **Catalysis Science and Technology**, v. 9, n. 22, p. 6222–6226, 2019.
- PHAM, J. et al. A Review of the Microbial Production of Bioactive Natural Products and Biologics. **Biologics. Front. Microbiol**, v. 10, p. 1404, 2019.
- POPOVIC, B. et al. Crystal Structures of the PLP- and PMP-Bound Forms of BtrR, A Dual Functional Aminotransferase Involved in Butirosin Biosynthesis. **PROTEINS: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 65, p. 220–230, 2006.
- RAMIREZ, M. S.; TOLMASKY, M. E. Aminoglycoside modifying enzymes. **Drug Resistance Updates**, v. 13, n. 6, p. 151–171, 2010.
- RAMIREZ, M. S.; TOLMASKY, M. E. Amikacin: Uses, resistance, and prospects for inhibition. **Molecules**, v. 22, n. 12, 2017.
- RAY, S. S. et al. Cocrystal Structures of Diaminopimelate Decarboxylase. **Structure**, v. 10, n. 11, p. 1499–1508, 2003.
- RAYCHAUDHURI, S. et al. Backbone makes a significant contribution to the electrostatics of α/β -barrel proteins. **Protein Science**, v. 6, n. 9, p. 1849–1857, 1997.
- RUPP, B. **Biomolecular Crystallography. Principles, Practice, and Application to Structural Biology**. [s.l.] Garland Science, 2010.
- SAGONG, H. Y. et al. Crystal structure and pyridoxal 5-phosphate binding property of lysine decarboxylase from *Selenomonas ruminantium*. **PLoS ONE**, v. 11, n. 11, p. 1–15, 2016.
- SCAPIN, G. Molecular replacement then and now. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 69, n. 11, p. 2266–2275, 2013.
- SCHNEIDER, G.; KÄCK, H.; LINDQVIST, Y. The manifold of vitamin B6 dependent enzymes. **Structure**, v. 8, n. 1, p. 1–6, 2000.
- SEELIGER, D.; DE GROOT, B. L. Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 24, n. 5, p. 417–422, 2010.
- TIBREWAL, N.; TANG, Y. **Biocatalysts for Natural Product Biosynthesis**. 2014.
- TIWARI, S. P.; REUTER, N. Similarity in Shape Dictates Signature Intrinsic Dynamics Despite No Functional Conservation in TIM Barrel Enzymes. **PLoS Computational Biology**, v. 12, n. 3, p. 1–26, 2016.
- VAGIN, A.; TEPLYAKOV, A. Molecular replacement with MOLREP. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 66, n. 1, p. 22–25, 2010.
- VANDUYNE, G. D. **Protocol for SeMet incorporation by metabolic inhibition**, 1993. .

WALSH, C. T. Antibiotics: Actions, origins, resistance. v. 95, n. Walsh 1998, p. 3059–3060, 2003.

WANG, S. C.; FREY, P. A. S-adenosylmethionine as an oxidant: the radical SAM superfamily. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 3, p. 101–110, 2007.

WIERENGA, R. K. The TIM-barrel fold: A versatile framework for efficient enzymes. **FEBS Letters**, v. 492, n. 3, p. 193–198, 2001.

WINN, M. D. et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 67, n. Pt 4, p. 235–242, 2011.

WRIGHT, G. D. Something old, something new: revisiting natural products in antibiotic drug discovery 1. **Research Press**, v. 60, p. 147–154, 2014.

WU, T. et al. Three Essential Resources to Improve Differential Scanning Fluorimetry (DSF) Experiments. 2020.

YOKOYAMA, K. et al. Involvement of two distinct N-acetylglucosaminyltransferases and a dual-function deacetylase in neomycin biosynthesis. **ChemBioChem**, v. 9, n. 6, p. 865–869, 2008.

ZHANG, L.; DEMAINE, A. L. Natural products and drug discovery. In: **Natural Products: Drug Discovery and Therapeutic Medicine**. [s.l.] Humana Press, 2005. p. 3–29.