



# CRISTALIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DE ENZIMAS OXIDATIVAS ATIVAS EM ÁCIDOS GRAXOS

**Palavras-Chave:** Biocombustíveis drop-in, Alcenos, Descarboxilases

**Autores(as):**

**RAUL DE CASTRO CUNHA CLAUDINO, IQ – UNICAMP / LNBR - CNPEM**

**Dr<sup>(a)</sup>. LETICIA MARIA ZANPHORLIN MURAKAMI (orientador(a)), FEA - UNICAMP / LNBR - CNPEM**

---

## INTRODUÇÃO:

Alcenos terminais constituem uma plataforma química industrialmente importante para a produção de polímeros, fertilizantes, lubrificantes, surfactantes e especialmente, biocombustíveis drop-in, pois são moléculas funcionalmente semelhantes àquelas de origem fóssil. Atualmente, alcenos são produzidos por meio de conversão química, isto é, craqueamento em condições de alta temperatura e pressão, usando matéria-prima baseada em petróleo. Alguns microrganismos descobertos recentemente, especialmente as bactérias dos gêneros *Jeotgalicoccus* e *Pseudomonas* são conhecidas por produzir alcenos naturalmente, pois possuem em seus genomas as enzimas CYP152 (pertencente à superfamília P450) e UndA, respectivamente, que são capazes de descarboxilar ácidos graxos produzindo 1-alcenos, o que poderia funcionar como uma plataforma biológica substituinte do petróleo. Raras enzimas do tipo UndA que possuem atividade de descarboxilação foram descobertas e apenas uma possui estrutura terciária elucidada (PDB 4WWJ). Diante disso, o conhecimento sobre os mecanismos moleculares dessas descarboxilases ainda é muito escasso, principalmente pelo fato da ausência de informações estruturais.

Sendo assim, o objetivo desse projeto de iniciação científica é otimizar os protocolos de expressão heteróloga e purificação das descarboxilases selecionadas (UI676 e UI187) para obter quantidade desejada visando estudos estruturais de alta resolução por cristalografia de raios-X. Além disso, realizar estudos biofísicos, utilizando técnicas de dicroísmo circular e espalhamento de luz dinâmico na presença e ausência de ácidos graxos de diferentes tamanhos. Os resultados poderão nos ajudar a entender a relação da estrutura e função dessas enzimas bem como seus mecanismos moleculares.

## METODOLOGIA:

Com o intuito de descobrir novas descarboxilases, nosso grupo de pesquisa realizou um consórcio microbiano contendo na presença de diferentes fontes de ácidos graxos. Interessantemente,

o sequenciamento genômico revelou que microrganismos do filo Proteobacteria, possuem em seus genomas, descarboxilases ortólogas da UndA com 23 (UI187) e 81% (UI676) de identidade na sequência primária. Os genes foram adquiridos comercialmente e testados inicialmente em nosso laboratório, sendo produzidos de forma heteróloga em solução.

A otimização das condições expressão das descarboxilases foi realizada, tendo as UI187 e UI676 suprerexpressas em elevados níveis na fração solúvel em linhagens de *Escherichia coli* B21(DE3). A purificação das UI187 e UI676 foi realizada com uma etapa de cromatografia de afinidade em coluna carregada com níquel, seguindo por uma cromatografia de exclusão molecular (EM). As proteínas UI187 e UI676 em suas formas puras tiveram os seus parâmetros biofísicos estudados por meio de ensaios de dicroísmo circular (CD) – JASCO J -815.

Por fim, os testes de cristalização das descarboxilases UI187 e UI676, realizados nas instalações do laboratório automatizado de cristalização de proteínas (Robolab, LNBio/CNPEM), foram promissores para a descarboxilase UI187, a qual apresentou cristais com faces bem delimitadas e com dimensões adequadas, que permitiram a sua difração na linha de luz MANACÁ do Sirius (CNPEM) com 1,5 Å de resolução.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Nos primeiros meses de desenvolvimento do projeto de iniciação científica (IC), as análises de otimização das condições expressão das descarboxilases UI187 e UI676 foram finalizadas, tendo as UI187 e UI676 suprerexpressas em elevados níveis na fração solúvel em linhagens de *E. coli* B21(DE3), como demonstra a Figura 1. Ademais, a purificação das UI187 e UI676, uma etapa essencial aos estudos biofísicos e ensaios de cristalização, foi realizada com uma etapa de cromatografia de afinidade em coluna carregada com níquel, seguindo por uma cromatografia de exclusão molecular (EM), sendo visualizados na Figura 2.

As proteínas UI187 e UI676 em suas formas puras tiveram os seus parâmetros biofísicos estudados por meio de ensaios de dicroísmo circular (CD), os quais revelaram que ambas as descarboxilases possuem estruturas secundárias dominadas por  $\alpha$ -hélices. Além disso, os experimentos de CD também mostraram que a UI187 e UI676 possuem temperaturas de transição ( $T_m$ ) 57,53 °C e 64,55 °C, respectivamente, como demonstra a Figura 3.

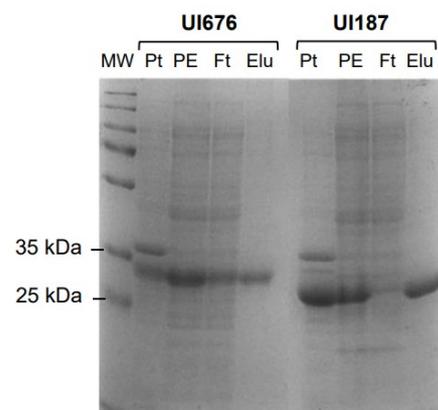


Figura 1. SDS-PAGE das descarboxilases UI676 e UI187. MW - marcador de massa molecular; Pt - proteínas do sedimento celular; PE - proteínas solúveis após centrifugação celular; Ft - proteínas não ligadas na coluna de afinidade; Elu - proteínas eluídas da coluna de afinidade. Os testes expressão foram realizados com *E. coli* BL21.

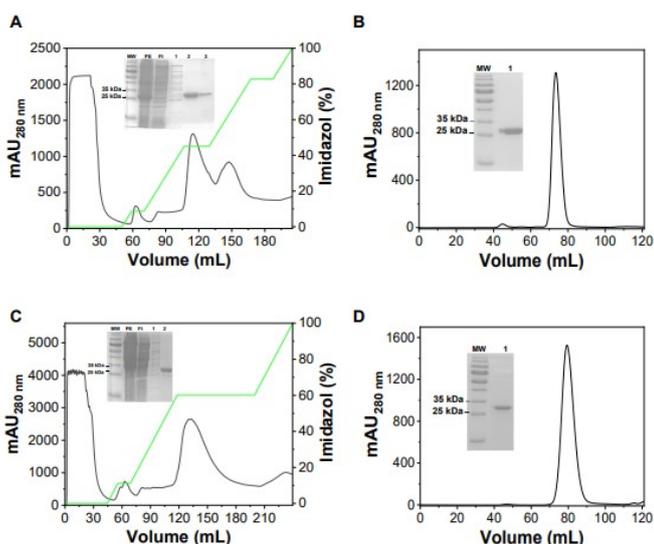


Figura 2. Purificação das descarboxilases UI187 e UI676. (A) Afinidade em coluna carregada com níquel da UI187 (Inserido gel de SDS-PAGE: MW - marcador de massa molecular; PE - proteínas solúveis após centrifugação celular; Ft - proteínas não ligadas na coluna de afinidade; 1 - primeiro pico; 2 - segundo pico; 3 - terceiro pico). (B) Exclusão molecular em coluna Superdex 200 16/60 da UI187 (inserido gel de SDS-PAGE: M: marcador de massa molecular; 1 - UI187 após etapa de EM). (C) Afinidade em coluna carregada com níquel da UI676 (Inserido gel de SDS-PAGE: MW - marcador de massa molecular; PE - proteínas solúveis após centrifugação celular; Ft - proteínas não ligadas na coluna de afinidade; 1 - primeiro pico; 2 - segundo pico). (D) Exclusão molecular em coluna Superdex 200 16/60 da UI676 (inserido gel de SDS-PAGE: M: marcador de massa molecular; 1 - UI676 após etapa de EM).

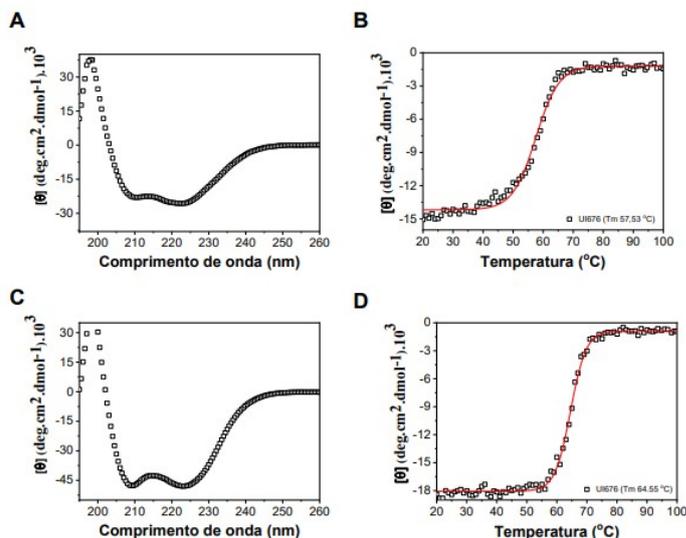


Figura 3. Estudos em nível de estrutura secundária das descarboxilases UI187 e UI676. (A) Os espectros mostram bandas com picos negativos 209 nm e 222 nm para a UI187. (B) Desnaturação térmica de 20 °C a 100 °C monitorada a 222 nm para a UI187. (C) Os espectros mostram bandas com picos negativos 209 nm e 222 nm para a UI676. (D) Desnaturação térmica de 20 °C a 100 °C monitorada a 222 nm para a UI676. Os experimentos foram realizados com 0,2 mg das proteínas em 25 mM de tampão fosfato de sódio pH 7,5 suplementado com 150 mM NaCl.

Com intuito de verificar os efeitos do pH e substratos sobre a estabilidade estrutural das UI187 e UI676, ambas as descarboxilases tiveram as suas composições de estrutura secundária e perfis de desnaturação térmica acessados pelo dicroísmo circular. Os resultados estão expressos nas tabelas 1 e 2, e demonstram diferentes comportamentos entre ambas descarboxilases.

**Tabela 1.** Dados de temperatura de transição (Tm) das descarboxilases UI187 e UI676 para cada um dos diferentes valores de pH avaliados. Os valores em destaque (negrito) mostram os maiores valores de Tm obtido para cada descarboxilase.

pH	UI187 ( °C)	UI676 ( °C)
4,5	47,93 ± 0,22	39,43 ± 6,33
5,0	59,84 ± 0,14	43,92 ± 7,15
5,5	62,36 ± 0,12	45,26 ± 1,44
6,0	<b>63,75 ± 0,14</b>	62,21 ± 0,50
6,5	62,26 ± 0,14	64,79 ± 0,18
7,0	61,71 ± 0,17	<b>65,14 ± 0,13</b>
7,5	51,86 ± 0,23	64,76 ± 0,13
8,0	44,23 ± 0,26	63,11 ± 0,16
8,5	31,38 ± 0,26	60,67 ± 0,13

**Tabela 2.** Dados de temperatura de transição ( $T_m$ ) das descarboxilases UI187 e UI676 para cada um dos ácidos graxos saturados. Os valores em destaque (negrito) mostram os maiores valores de  $T_m$  obtido para cada descarboxilase. Os experimentos foram realizados com 0,20 mg de ambas as descarboxilases. A UI187 foi incubada em tampão fosfato de sódio (25 mM, pH 6,0) e a UI676 em tampão fosfato de sódio (25 mM, pH 7,0).

Substrato	UI187 ( °C)	UI676 ( °C)
Controle (Sem substrato)	62,38 ± 0,10	65,14 ± 0,13
C10 (0,1 mM)	62,60 ± 0,11	66,36 ± 0,20
C10 (0,5 mM)	59,98 ± 0,11	65,88 ± 0,22
C12 (0,1 mM)	61,86 ± 0,11	<b>68,87 ± 0,23</b>
C12 (0,5 mM)	61,33 ± 0,14	63,59 ± 0,24
C14 (0,1 mM)	<b>62,46 ± 0,15</b>	65,24 ± 0,26
C14 (0,5 mM)	59,90 ± 0,13	45,90 ± 0,18

Por fim, a análise de estrutura 3D entre a UI187 e seu homólogo próximo, a PfUndA de *Pseudomonas fluorescens* (PDB: 6P5Q), revelou a UI187 como possuindo uma elevada similaridade estrutural, sendo observado apenas variações em algumas regiões de loop (Figura 5). Além disso, a partir de um alinhamento com a estrutura 3D da PfUndA foi possível identificar na UI187 um íon ferro, íon este essencial a reação de descarboxilação (MANLEY et al., 2019), conectado aos aminoácidos Glu82, His92 e His181 (Figura 4). A estrutura da UI187 também possui os aminoácidos His188 e Glu151, os quais se sobrepõem aos aminoácidos His201 e Glu159 da proteína homóloga PfUndA, também essenciais a conexão do segundo átomo de ferro. Entretanto, estes aminoácidos responsáveis pela conexão com o segundo ferro na UI187 apresentam uma ampliação de suas distâncias previstas aos seus 10 correspondentes na PfUndA (Figura 4) e, assim podendo ser uma possível justificativa a não presença deste íon na estrutura da UI187.

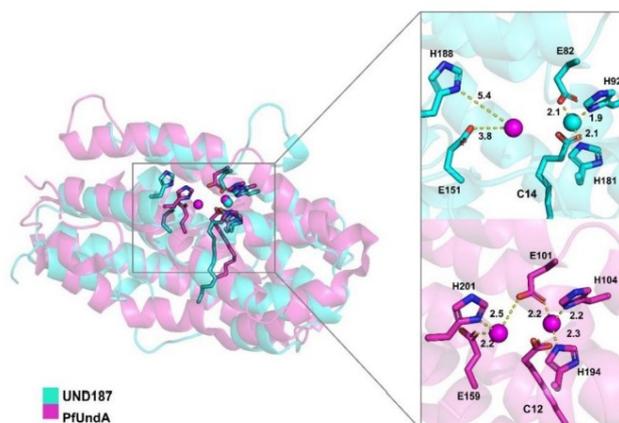


Figura 4. Análises 3D entre a estrutura da UI187 e seu homólogo próximo, a PfUndA de *Pseudomonas fluorescens* (PDB: 6P5Q). Na figura está descrito os aminoácidos responsáveis pela conexão dos dois íons ferro essenciais a reação de descarboxilação. Aos cristais da UI187 difrataramos 1,5 Å de resolução. A estrutura 3D da UI187 está representada em aquamarine e a estrutura da PfUndA de *Pseudomonas fluorescens* (PDB: 6P5Q) em magenta.

## CONCLUSÕES:

Portanto, avanços significativos nos estudos biofísicos de potenciais ferro-enzimas para a conversão de ácidos graxos à alcenos terminais foram realizados. Ao longo do projeto foram

investigadas duas descarboxilases (UI187 e UI676), e seus processos de expressão e purificação heteróloga foram propostos e otimizados com sucesso. Nesse sentido, os estudos biofísicos de dicroísmo circular demonstraram que suas estruturas secundárias são majoritariamente formadas por hélices- $\alpha$ , além de determinarem suas temperaturas de transição do estado enovelado para o desenovelado ( $T_m$ ), sendo elas respectivamente 57,53 °C e 64,55 °C para UI187 e UI676.

Além disso, para uma delas foi possível obter a estrutura terciária (UI187), que demonstrou uma conservação dos aminoácidos do sítio catalítico, quando comparado às ortólogas com estrutura já depositada no PDB. Contudo, a difração também elucidou uma distorção no centro catalítico, fato que pode afetar a atividade descarboxilativa dessa enzima.

Enfim, os resultados obtidos irão ser de extrema importância para uma maior compreensão das enzimas descarboxilases do tipo UndA, pois a partir de investigações biofísicas e estruturais, maiores investigações em seus mecanismos moleculares podem ser analisadas. Essas enzimas possuem grande importância em diversos setores biotecnológicos e, em especial, para a área de biocombustíveis drop-in, por isso, esse estudo se demonstra de suma importância para a possibilidade de produção de 1-alcenos via rota biotecnológica, substituindo o craqueamento do petróleo.

## BIBLIOGRAFIA

- GILLILAND, G. L.; TUNG, M.; BLAKESLEE, D. M.; LADNER, J. E. **Biological Macromolecule Crystallization Database, Version 3.0: new features, data and the NASA archive for protein crystal growth data**. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, v. 50, n. 4, p. 408–413, 1 jul. 1994.
- HOL, W. G. J.; SARFATY, S. H.; STEWART, L. J.; KIM, H. **US Patent 6267935**. 2001.
- JANCARIK, J.; KIM, S. H. **Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins**. Journal of Applied Crystallography, v. 24, n. 4, p. 409–411, 1 ago. 1991.
- MAJEED, S.; OFEK, G.; BELACHEW, A.; HUANG, C.; ZHOU, T.; KWONG, P. D. **Enhancing protein crystallization through precipitant synergy**. Structure, v. 11, n. 9, p. 1061–1070, set. 2003.
- MANLEY, O. M.; FAN, R.; GUO, Y.; MAKRIS, T. M. **Oxidative Decarboxylase UndA utilizes a dinuclear iron cofactor**. Journal of the American Chemical Society, v. 22, n. 141, p. 8684-8688, 2019.
- NEWMAN, J.; EGAN, D.; WALTER, T. S.; MEGED, R.; BERRY, I.; BEN JELLOUL, M.; SUSSMAN, J. L.; STUART, D. I.; PERRAKIS, A. **Towards rationalization of crystallization screening for small- to medium-sized academic laboratories: the PACT/JCSG+ strategy**. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, v. 61, n. 10, p. 1426–1431, 1 out. 2005.